

# **Untersuchungen zum Einfluss von roten Fruchtsäften, deren Extrakten und Inhaltsstoffen auf den Lipidstoffwechsel *in vitro* und *in vivo***

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzisch Technischen Universität Kaiserslautern-  
Landau am Standort Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der  
Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

D 386



vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin, M.Sc.

**Celina Rahn (geb. Göttel)**

geboren in Meisenheim

Betreuerin: Prof. Dr. Elke Richling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juni 2024



Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2019 bis August 2022 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Richling im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Rheinland-Pfälzisch Technischen Universität Kaiserslautern-Landau am Standort Kaiserslautern durchgeführt.

### **Prüfungskommission**

Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang Kleist

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Elke Richling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Winterhalter



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Kurzzusammenfassung.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Stand der Wissenschaft.....	3
2.1. Lipidmetabolismus.....	3
2.1.1. Fettgewebe.....	3
2.1.2. Verdauung und Resorption von Lipiden.....	5
2.1.3. Lipogenese und Lipolyse sowie deren Regulation.....	7
2.1.4. Phosphodiesterasen.....	12
2.1.5. Übergewicht, Adipositas und deren Folgeerkrankungen.....	14
2.2. Polyphenole.....	16
2.2.1. Absorption, Metabolismus, Eliminierung sowie Bioverfügbarkeit.....	17
2.2.2. Anthocyane, Copigmente und Polymere.....	19
2.2.3. Vorkommen von Polyphenolen in roten Früchten.....	21
2.2.4. Biologische Wirkungen der Polyphenole.....	25
3. Problemstellung.....	29
4. Kumulativer Teil – Publikationen.....	31
4.1. Publikation I „In Vitro Inhibition of Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts and Selected Anthocyanins“.....	31
4.1.1. Zusammenfassung.....	31
4.1.2. Veröffentlichtes Manuskript.....	33
4.2. Publikation II „Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism“.....	64
4.2.1. Zusammenfassung.....	64
4.2.2. Veröffentlichtes Manuskript.....	66
4.3. Publikation III „Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects“.....	92

---

4.3.1. Zusammenfassung .....	92
4.3.2. Humane Interventionsstudie .....	94
4.3.3. Veröffentlichtes Manuskript .....	99
5. Diskussion.....	122
5.1. Einfluss auf den Lipidmetabolismus <i>in vitro</i> .....	122
5.1.1. Extrakte .....	122
5.1.2. Anthocyane und Anthocyanidine .....	124
5.1.3. Fraktionen und Subfraktionen.....	125
5.2. Humane Interventionsstudie.....	131
6. Zusammenfassung und Ausblick .....	139
7. Material und Methoden.....	142
7.1. Material .....	142
7.2. Allgemeine Zellkultur.....	147
7.2.1. 3T3-L1-Zelllinie.....	147
7.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellaliquots .....	148
7.2.3. Mediumwechsel.....	149
7.2.4. Subkultivierung.....	149
7.2.5. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität.....	150
7.3. <i>In vitro</i> -Testsysteme.....	150
7.3.1. Bestimmung der Zytotoxizität.....	150
7.3.2. Bestimmung der Lipidakkumulation .....	152
7.3.3. Bestimmung der freien Fettsäuren (Lipolyse) .....	154
7.3.4. Bestimmung der cAMP-PDE 3B-Aktivität <i>in vitro</i> .....	156
7.4. <i>In vivo</i> -Untersuchungen .....	158
7.4.1. Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben aus der Humanstudie.....	158
7.4.2. Bestimmung der cAMP-PDE-Aktivität in Thrombozyten.....	159
7.4.3. Bestimmung von Leptin und GLP-1 in Plasma.....	160
7.4.4. Bestimmung des Harnsäuregehaltes in Plasma.....	161
7.5. Statistik .....	163
7.5.1. <i>In vitro</i> -Daten.....	163
7.5.2. <i>In vivo</i> -Daten .....	164
7.5.3. Korrelationsanalyse .....	164
8. Literaturverzeichnis .....	165

---

9. Abbildungsverzeichnis.....	194
10. Tabellenverzeichnis.....	196
Anhang.....	A
Genehmigungen .....	A
Veröffentlichungen.....	A
Publikationen.....	A
Posterpräsentationen .....	B
Vorträge .....	B
Akademischer Lebenslauf.....	C
Danksagung .....	D
Erklärung .....	F

## Abkürzungsverzeichnis

ADME	engl. <i>Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ASP	engl. <i>acylation-stimulating protein</i>
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase bzw. Triacylglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	engl. <i>Body-Mass-Index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCC	engl. <i>High-Speed Countercurrent Chromatography</i>
C/EBP	engl. <i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CF	Subfraktion der Cranberry-Copigmentfraktion
CGI-58	engl. <i>comparative gene identification 58</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
3-CQA	Neochlorogensäure bzw. 3-O-Caffeoylchinasäure
5-CQA	Chlorogensäure bzw. 5-O-Caffeoylchinasäure
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP 4	Dipeptidylpeptidase 4
DSB	DNA-Strangbrüche
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
ESI	Elektrosprayionisierung
FABP 4	Fettsäurebindungsprotein 4
FFM	fettfreie Masse
FM	Fettmasse
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FS	Fettsäure



---

FW	Frischgewicht
GAE	Gallussäureäquivalent
GF	Subfraktion der Granatapfel-Copigmentfraktion
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
HDL	<i>high-density</i> -Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> )
HSL	hormonsensitive Lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
LDL	<i>low-density</i> -Lipoprotein
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
LXR	Leber-X-Rezeptor
MAG	Monoacylglycerin
MGL	Monoacylglycerin-Lipase
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
n. n.	nicht nachweisbar
PBLs	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PK	Proteinkinase
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SOD	Superoxiddismutase
SD	Standardabweichung
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
Sirt 1	Sirtuin 1
SREBP	engl. <i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TAG	Triacylglycerid(e)
TBW	Gesamtkörperwasser (engl. <i>total body water</i> )

TEAC	engl. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TSK	säurearmes Traubensaftkonzentrat (Süße)
VB	Vollblut
UCP 1	entkoppelndes Protein 1 (engl. <i>uncoupling protein 1</i> )
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> )

## Kurzzusammenfassung

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas nahm in den Mitgliedsländern der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) in den letzten Dekaden deutlich zu und wurde zu einem Gesundheitsproblem mit alarmierendem Ausmaß. Häufig diskutierte Ursachen sind das Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und -verbrauch sowie ungesunde Ernährung und Bewegungsmangel (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017; World Health Organization, 2021). Sowohl epidemiologische, *in vitro*- und *in vivo*-Daten zeigten, dass eine polyphenolreiche Ernährung mit gesundheitsfördernden Eigenschaften (antioxidativ, antiinflammatorisch) assoziiert wird (Bakuradze *et al.*, 2019a; Maleki *et al.*, 2019; Schantz *et al.*, 2010). Inwieweit Polyphenole und Fruchtsäfte bzw. -konzentrate den Lipidmetabolismus regulieren können, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Zunächst wurden Extrakte aus roten Fruchtsäften und -konzentraten sowie ausgewählte Anthocyane auf ihr Phosphodiesterase (PDE) 3B-hemmendes Potential *in vitro* untersucht. Die drei potentesten Extrakte (Aronia, Cranberry und Granatapfel) wurden anschließend aktivitätsgeleitet fraktioniert und die erhaltenen Anthocyan-, Copigment- und Polymerfraktionen sowie Subfraktionen in drei *in vitro*-Assays (PDE 3B-Aktivität, Lipidakkumulation, Lipolyse) getestet. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass neben den Anthocyanen wie Cyanidin-3-glukosid, insbesondere auch Inhaltsstoffe der Copigmentfraktionen wie Zimtsäurederivate oder hydrolysierbare Tannine den Lipidstoffwechsel beeinflussen können. Als beteiligte Regulationswege werden die Inhibierung der PDE 3B und Lipidakkumulation sowie Induktion der Lipolyse diskutiert. Um die bisherigen *in vitro*-Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation zu übertragen, wurde dann eine neunwöchige, placebokontrollierte Interventionsstudie mit 36 männlichen Probanden durchgeführt. Das Testgetränk wurde aus den Säften von Aronia, Granatapfel und Cranberry hergestellt, die *in vitro* die potenteste Wirkung gezeigt hatten. Neben Analyse der Körperzusammensetzung und Ernährung wurden verschiedene Biomarker im Blut untersucht, z. B. Blutlipide, Hunger- und Sättigungshormone sowie die PDE-Aktivität in Thrombozyten. Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fruchtsaftinhaltsstoffe regulierend in den Lipidstoffwechsel des Menschen eingreifen und diesen positiv beeinflussen können. So wurde bei der Testgruppe nach vierwöchiger Interventionszeit mit dem Testgetränk eine Reduzierung der Energie- und Fettaufnahme, eine signifikante Erhöhung der fettfreien Masse und eine Abnahme der PDE-Aktivität beobachtet. Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Nährstoffaufnahme und der Fett- und Magermasse sowie eine positive Korrelation zwischen Körpergewicht und BMI mit dem Leptinspiegel nachgewiesen werden.

## Abstract

The prevalence of overweight and obesity has increased significantly in recent decades in Organisation for Economic Cooperation and Development countries (OECD), and has become a health problem of alarming extent. A frequently discussed cause is the imbalance between energy intake and energy expenditure, as well as unhealthy diets and physical inactivity (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017; World Health Organization, 2021). Epidemiological, *in vitro* and *in vivo* data showed that a polyphenol-rich diet is associated with several health-promoting properties (antioxidant, anti-inflammatory) (Bakuradze *et al.*, 2019a; Maleki *et al.*, 2019; Schantz *et al.*, 2010). The aim of this thesis was to investigate to which extent polyphenols and fruit juices or concentrates can regulate the lipid metabolism. First, extracts from red fruit juices and concentrates as well as selected anthocyanins were evaluated for their phosphodiesterase (PDE) 3B inhibitory potential *in vitro*. The three most potent extracts (chokeberry, cranberry, and pomegranate) were then subjected to activity-guided fractionation, and the obtained anthocyanin, copigment, and polymer fractions as well as their subfractions were tested in three *in vitro* assays (PDE 3B activity, lipid accumulation, lipolysis). It was shown that, in addition to anthocyanins such as cyanidin-3-glucoside, in particular various constituents in the copigment fractions such as cinnamic acid derivatives or hydrolyzable tannins can affect lipid metabolism *in vitro*. Inhibition of PDE 3B activity and lipid accumulation and induction of lipolysis were discussed as regulatory pathways involved. A nine-week, placebo-controlled intervention study was conducted in 36 male subjects to translate and verify the previous *in vitro* results to the *in vivo* situation. The polyphenol-rich beverage was prepared from the juices of the red fruits chokeberry, pomegranate, and cranberry, which were found to be the most potent ones in the *in vitro* tests. In addition to the analysis of body composition and dietary analysis several blood biomarkers were examined, including blood lipids, hunger and satiety hormones, and platelet PDE activity. The obtained results indicate that fruit juice constituents may have a regulating effect on lipid metabolism in humans and can positively influence it. For example, a reduction in energy and fat intake, a significant increase in fat-free mass, and a decrease in PDE activity were observed in the test group after a four-week intervention period of the polyphenol-rich beverage. Furthermore, a correlation of nutrient intake with fat mass and fat-free mass, and a positive correlation of body weight and BMI with leptin levels were observed in the participants.

# 1. Einleitung

Übergewicht und Adipositas resultieren aus übermäßiger Fettakkumulation und zählen mittlerweile zu den häufigsten Erkrankungen der Bevölkerung. In der Europäischen Region betrifft dies fast 60 % der Erwachsenen, weshalb man von epidemischem Ausmaß sprechen kann (World Health Organization, 2022). Nach Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird ein *Body-Mass-Index* (BMI) von 25–30 kg/m<sup>2</sup> als Übergewicht und ein BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> und mehr als Adipositas definiert. Die WHO stellte fest, dass sich die weltweite Prävalenz für Adipositas von 1975 bis 2016 verdreifacht hat. Auch im Kindesalter steigt die Prävalenz – 2020 waren bereits 39 Millionen Kinder unter fünf Jahren weltweit übergewichtig oder adipös (World Health Organization, 2021). Als häufige Ursache für Adipositas gilt das Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch, in Zusammenhang stehend mit ungesunder Ernährung, beispielsweise durch fett- und zuckerhaltige Lebensmittel, einhergehend mit unzureichender körperlicher Betätigung. Adipositas ist ein Risikofaktor für Begleit- und Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie einzelne Krebserkrankungen und führt somit zu einer geringeren Lebenserwartung. Körperliche Aktivität und Sport in Verbindung mit einer gesunden Ernährung können Adipositas positiv beeinflussen und präventiv wirken (Heintze *et al.*, 2008; Schienkiewitz *et al.*, 2017; Westermann *et al.*, 2019; World Health Organization, 2021). Aufgrund der kontinuierlichen Zunahme der Adipositasprävalenz beschäftigen sich viele wissenschaftliche Studien mit der ernährungsspezifischen Prävention. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss von Polyphenolen auf den Lipidstoffwechsel und damit einer möglichen langfristigen Reduktion des Körpergewichtes untersucht (Dallas *et al.*, 2008; Heber *et al.*, 2014; Kowalska *et al.*, 2017). Eine gute Aufnahmemöglichkeit für Polyphenole in der täglichen Ernährung bieten viele Obst- und Gemüsesorten sowie deren Säfte (Frede, 2010; Rimbach *et al.*, 2015).

Polyphenole sind aromatische Verbindungen, die mindestens zwei direkt an den aromatischen Ring gebundene Hydroxylgruppen enthalten und denen die unterschiedliche chemische Strukturen wie die phenolische Säuren, die Flavonoide (z. B. Anthocyane) sowie die komplexen, polymeren Tanninen zugeordnet werden (Andlauer, 2004). Sie kommen in Pflanzen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe vor und zeigen *in vitro* als auch *in vivo* unter anderem antioxidative, anti-inflammatorische, anti-bakterielle und anti-virale Wirkungen (Banach *et al.*, 2020; Dallas *et al.*, 2014; Ikuta *et al.*, 2012; Joseph *et al.*, 2014). Daneben weisen jüngste Studien zum einen auf ein neuroprotektives Potential und präventive

Wirkungen bei kardiovaskulären Erkrankungen hin und zum anderen wird ein Einfluss auf den Glukosemetabolismus und auf die Darmflora diskutiert (Adriouch *et al.*, 2018; Berger *et al.*, 2021; Bobadilla *et al.*, 2021; Figueira *et al.*, 2019; Groh *et al.*, 2020; Sesso *et al.*, 2022). Zusätzlich wurde in den letzten Jahren im Rahmen von Humanstudien auch ein Einfluss von roten Früchten und deren Säften auf den Lipidstoffwechsel und damit auf das Körpergewicht sowie die Körperzusammensetzung beobachtet (Bakuradze *et al.*, 2019a; Berger *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2017; Groh *et al.*, 2020; Tucakovic *et al.*, 2018). Weitgehend unklar bleibt bisher, um welchen molekularen Effekt es sich handelt und welche Inhaltsstoffe vor allem für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sind.

## 2. Stand der Wissenschaft

### 2.1. Lipidmetabolismus

#### 2.1.1. Fettgewebe

Das Fettgewebe einer normalgewichtigen Person macht einen Anteil von ca. 20 % des Körpergewichtes aus (Rehner und Daniel, 2010). Im menschlichen Körper lassen sich zwei Arten von Fettgewebe unterscheiden: das sogenannte weiße und das braune Fettgewebe. Das weiße Fettgewebe wird u. a. zur Energiespeicherung benötigt, wohingegen das braune Fettgewebe Wärme produziert (Thermogenese). Im braunen Fettgewebe wird chemische Energie, insbesondere durch Oxidation von Fettsäuren (FS) und/oder Glukose, in thermische Energie umgewandelt durch Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette über das *uncoupling protein 1* (UCP 1). UCP 1 transportiert Protonen mithilfe von FS aus dem Zytoplasma über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix und entkoppelt den von der Atmungskette aufgebauten Protonengradient von der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese. Die Energie der zellulären Oxidationsreaktionen wird dabei nicht als chemische Energie gespeichert, sondern als Wärme frei (Horino *et al.*, 2022; Merkel *et al.*, 2019).

Das braune Fettgewebe unterscheidet sich im Gegensatz zum weißen Fettgewebe durch eine höhere Anzahl an Mitochondrien und zahlreiche, kleinere Fettvakuolen, wodurch es makroskopisch dunkler (braun) erscheint. Beim Menschen ist braunes Fettgewebe hauptsächlich bei Neugeborenen dominant. Seine Masse nimmt postnatal rasch ab und der Anteil am Körpergewicht beträgt bei Erwachsenen maximal 1,5 %. Bei Neugeborenen kommt braunes Fettgewebe zwischen den Schulterblättern (interskapulär), entlang der Halsmuskulatur bis unter die Schlüsselbeine (supraklavikulär, axillär) sowie entlang der Trachea und des Ösophagus vor. Weiterhin wurde braunes Fettgewebe um die größeren mediastinalen Gefäße sowie die interkostalen Arterien gefunden. Im Abdomen sind die größten Depots im perirenal Bereich lokalisiert. Bei Erwachsenen wurde braunes Fettgewebe vor allem supraklavikulär und zervikal beschrieben. Dagegen ist das weiße Fettgewebe im gesamten Körper zu finden. Die größten Anteile liegen im viszeralen Bereich, perirenal und als subkutanes Fett abdominell, gluteal und im Oberschenkelbereich vor (Leitner *et al.*, 2017; Merkel *et al.*, 2019; Sharp *et al.*, 2012; Tews *et al.*, 2017).

Etwa ein Drittel der Zellen im Fettgewebe stellen die mit Triacylglyceride (TAGs) gefüllten Adipozyten dar. Den verbleibenden Teil bilden Endothelzellen, Blutzellen, Fibroblasten und Präadipozyten. Die Präadipozyten (Vorstadien der Adipozyten) entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen retikulären Ursprungs, den Adipoblasten. Diese entwickeln sich zu Präadipozyten, die noch keine TAG-Speicher besitzen (Richard *et al.* 2000).

Die Präadipozyten können unter den richtigen Bedingungen schließlich zu reifen Adipozyten ausdifferenzieren – dieser Vorgang wird als Adipogenese bezeichnet. Zur Untersuchung der Adipogenese werden häufig die murinen 3T3-L1-Zellen genutzt (Hokimoto *et al.*, 2023; Zebisch *et al.*, 2012). Im Allgemeinen werden zur Stimulierung der Differenzierungen von Zelllinien wie 3T3-L1-Zellen drei Komponenten verwendet, zu denen Insulin, Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) zählen (siehe Abbildung 1). Insulin wird häufig verwendet, um die Proliferation und Differenzierung von Präadipozyten zu induzieren. Bekannt ist, dass Insulin in hohen Konzentrationen den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (*Insulin-like growth factor*) 1 nachahmt und die mitogen-aktivierten Proteinkinasewege stimuliert (Lee *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2001). Weiterhin bewirkt Insulin die Expression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR) $\gamma$ , dem Hauptregulator der Adipogenese, als auch des *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP) 1c, welches wiederum die Genexpression der Lipoproteinlipase oder der Fettsäuresynthase steigert (Lee *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2023). Dexamethason ist ein entzündungshemmendes Glukokortikoidmolekül, das sowohl die osteogene als auch die adipogene Differenzierung in einer zell-, zeit- und konzentrationsabhängigen Weise stimuliert (Arutyunyan *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2011). IBMX ist ein kompetitiver, nicht-selektiver Phosphodiesterase (PDE)-hemmer, der das intrazelluläre zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Level erhöht und die Proteinkinase (PK) A aktiviert. Der PK A-Signalweg ist für die transkriptionelle Aktivierung von PPAR $\gamma$  und damit für die adipogene Genexpression erforderlich (Kim *et al.*, 2010). Darüber hinaus sind sowohl Dexamethason als auch IBMX Induktoren der beiden Transkriptionsfaktoren *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) $\beta$  und C/EBP $\delta$ , welche wiederum die Expression von PPAR $\gamma$  erhöhen (Hokimoto *et al.*, 2023). PPAR $\gamma$  wiederum induziert die Expression von C/EBP $\alpha$ . Eine weitere Klasse von Transkriptionsfaktoren, die Leber-X-Rezeptoren (LXR), sind am Lipidmetabolismus beteiligt. LXR $\alpha$  erhöht die Expression von PPAR $\gamma$  und SREBP 1c. Insgesamt resultiert diese Kaskade schließlich u. a. in der Expression von fettzellspezifischen Genen (z. B. Fettsäurebindungsprotein 4 (FABP 4)), der Synthese und Sekretion der Adipokine Leptin und Adiponektin sowie der Entwicklung der notwendigen Insulinsensitivität der Zelle. Die verwendeten Konzentrationen zur Induktion der Adipogenese in *in vitro*-Versuchen variieren je nach Zelllinie bzw. mesenchymaler oder pluripotenter Stammzellen (Dixon *et al.*, 2021; Scott *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018).



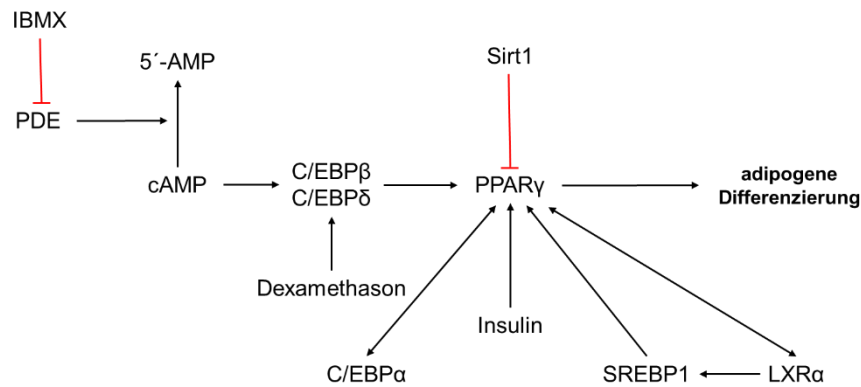


Abbildung 1: Regulation der adipogenen Differenzierung. An der Regulation der Differenzierung sind viele unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) oder *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)1 beteiligt. Rote Pfeile: inhibitorische Wirkung. AMP: Adenosinmonophosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; C/EBP: *CCAAT/enhancer binding protein*; IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin; LXR: Leber-X-Rezeptor; PDE: Phosphodiesterase; PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; Sirt1: Sirtuin 1; SREBP: *sterol regulatory element-binding protein* (modifiziert nach Kim *et al.*, 2010; Prawitt, 2006; Yang *et al.*, 2006).

Picard *et al.* konnten zeigen, dass PPAR $\gamma$  durch Sirtuin 1 (Sirt 1) in 3T3-L1-Zellen inhibiert und somit die Adipogenese gehemmt werden kann (Picard *et al.*, 2004).

### 2.1.2. Verdauung und Resorption von Lipiden

Als Lipide werden Substanzen biologischen Ursprungs definiert, die in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind und aus verseifbaren Lipiden wie Glyceriden und Phospholipiden sowie aus nicht verseifbaren Lipiden wie hauptsächlich den Steroiden bestehen (IUPAC, 1997). Sie stellen für den menschlichen Organismus eine wichtige Energiereserve in Form des Fettgewebes dar und dienen daneben als Isolationsschicht gegen Wärmeverluste sowie als Schutz von Organen gegen mechanische Einflüsse (Baur und Baur, 2022; Hopp, 2018). Durch ihren physiologischen Brennwert von 39,0 kJ/g sind Fette eine energiereichere Quelle als die beiden anderen Makronährstoffe Kohlenhydrate und Proteine (Brennwert je 17,2 kJ/g). TAGs machen mit 98 % den größten Anteil der zugeführten Nahrungsfette aus und bestehen aus dem dreiwertigen Alkohol Glycerin, der mit drei FS verestert ist. Der übrige Anteil zeichnet sich v. a. durch Cholesterin und Phospholipide aus (Guo *et al.*, 2020).

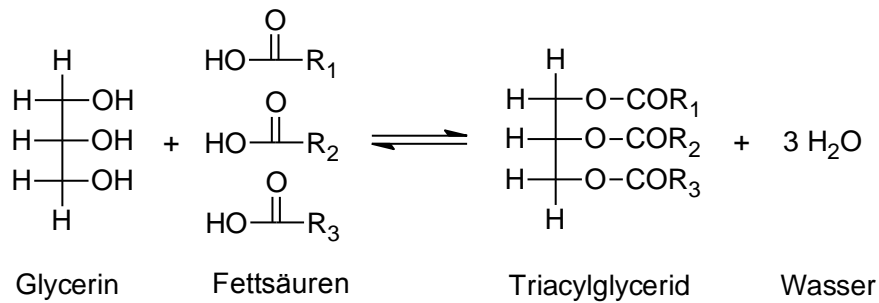


Abbildung 2: Bildung eines Triacylglycerids aus Glycerin und freien Fettsäuren durch Veresterung.

Bei der Verdauung von Lipiden wird die Esterbindung zwischen den FS und Glycerin enzymatisch durch Lipasen gespalten, damit die FS über das Dünndarmepithel absorbiert werden können (Berg *et al.*, 2018; Feigenspan, 2017). Die Fettverdauung beginnt mit der Zungengrundlipase im Speichel, die vor allem kurzkettige FS aus TAGs des Milchfettes abspaltet, sowie der Magenlipase im Magen, die jedoch nur ca. 5 % der Lipide spaltet. Beide Lipasen tragen nur bei Säuglingen wesentlich zur Fettverdauung bei (Baur und Baur, 2022; Feigenspan, 2017; Lim *et al.*, 2022). Aus dem Magen gelangen die Lipide in das Duodenum (Zwölffingerdarm) und werden dort durch Zugabe von Gallensäuren und -salzen aus der Leber und Gallenblase emulgiert, um mit der einhergehenden Oberflächenvergrößerung eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente hydrolytische Spaltung der Lipide zu gewährleisten. Die von der Bauchspeicheldrüse produzierte Pankreaslipase wird in das Duodenum abgegeben, wo diese in Gegenwart einer Colipase den Großteil der aufgenommenen Nahrungsfette in Glycerin bzw. in Monoacylglycerin (MAG) und FS spaltet (Baur und Baur, 2022; Clauss und Clauss, 2018; Feigenspan, 2017). Die FS und MAGs bilden mit den Gallensäuren und -salzen Mizellen und werden im Dünndarm resorbiert. Während kurz- und mittelkettige FS (mit bis zu zehn C-Atomen) direkt ins Blut resorbiert werden, werden aus längerkettigen FS und Glycerin am endoplasmatischen Retikulum der Mukosazellen durch Reveresterung wieder TAGs gebildet. Die entstandenen TAGs bilden zusammen mit Apolipoproteinen, Cholesterin und Phospholipiden die sogenannten Chylomikronen (Lipoproteine). Die Chylomikronen gelangen durch Exozytose nach Kontakt mit der Plasmamembran in die anliegenden Lymphgefäße und von dort über den *Ductus thoracicus* in die Blutzirkulation. Sobald die Chylomikronen von der Lymphe ins Blut übergetreten sind, hydrolysieren Lipoproteinlipasen die TAGs der Chylomikronen und es entstehen sogenannte Chylomikronen-Remnants. Die Remnants, welche cholesterinreich sind, werden in die Leber transportiert und dort abgebaut. Die freigesetzten FS der TAGs werden an das Blutprotein Serumalbumin gebunden, um zu den Geweben transportiert zu werden. Die FS werden von den extrahepatischen Geweben wie den Adipozyten durch verschiedene Transportmechanismen aufgenommen und zur Speicherung wieder verestert oder können bei hohen FS-Konzentrationen durch passive Diffusion die Plasmamembran

passieren. Für die Carrier-vermittelte FS-Aufnahme stehen Transportproteine wie das Fettsäuretransportprotein oder die Fettsäuretranslokase CD 36 zur Verfügung (Baur und Baur, 2022; Heinrich *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2022).

### 2.1.3. Lipogenese und Lipolyse sowie deren Regulation

In den Adipozyten finden zwei gegenläufigen Prozesse statt – einerseits die Lipogenese zur Speicherung der Energie, d. h. die Veresterung von freien FS mit Glycerin zu TAGs. Antiparallel zu diesem Vorgang findet bei Energiebedarf durch Fasten oder körperliche Aktivität andererseits auch der Abbau der TAGs statt, um freie FS bereitzustellen, was als Lipolyse bezeichnet wird (Heinrich *et al.*, 2022).

Der am besten untersuchteste Mechanismus zur Regulation der **Lipolyse** ist der cAMP-Signalweg (siehe Abbildung 3). Katecholamine wie Adrenalin oder Noradrenalin können durch Bindung an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche der Adipozyten befinden, die Lipolyse stimulieren. Bei Bindung an  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren werden antilipolytische Effekte vermittelt. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren, wobei  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren eine stimulierende G-Protein-Untereinheit ( $G_s$ ) und  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren eine inhibierende G-Protein-Untereinheit ( $G_i$ ) besitzen. Die G-Proteine interagieren mit der Adenylatzyklase, welche ATP zu cAMP umwandelt (Cho *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022; Nielsen *et al.*, 2014). Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration durch eine aktivierte Adenylatzyklase steigert die Lipolyse, während die Hemmung der Lipolyse mit einer Senkung des cAMP-Spiegels einhergeht. cAMP ist ein *second messenger*, der viele physiologische kinase- und rezeptorvermittelte Signalketten steuert. Durch ihn wird die cAMP-abhängige PK A aktiviert, die Perilipin A sowie die hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert. Die inaktive Form der HSL befindet sich im Zytosol der Adipozyten und die Phosphorylierung induziert eine Translokation an bzw. in die Lipidtröpfchen, die durch Bindung der HSL an das *adipocyte lipid binding protein* erhöht werden kann. Phosphoryliertes Perilipin bewirkt die Freisetzung des Coaktivators *comparative gene identification 58* (CGI-58) für das Enzym Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) und damit dessen Aktivierung (Berg *et al.*, 2018; Bézaire und Langin, 2009; Heinrich *et al.*, 2014; Lafontan und Langin, 2009; Nelson und Cox, 2009). An der basalen Lipolyse sind hauptsächlich drei Enzyme beteiligt – ATGL, HSL und Monoacylglycerin-Lipase (MGL). Die ATGL initiiert die Mobilisierung der TAGs, indem unter Bildung von Diacylglycerin (DAG) eine FS des TAGs abgespalten wird. DAG wird wiederum von einer HSL in eine freie FS und MAG hydrolysiert. HSL zeigt eine breite Substratspezifität und hydrolysiert neben TAGs auch DAGs, MAGs und Cholesterinester. *In vitro*-Studien zeigten, dass die Aktivität der HSL gegenüber DAG elffach höher ist als gegenüber TAG. Die

MGL schließt die Mobilisierung der FS ab, indem MAG in eine freie FS und Glycerin gespalten wird (Berg *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2023; Duncan *et al.*, 2007).

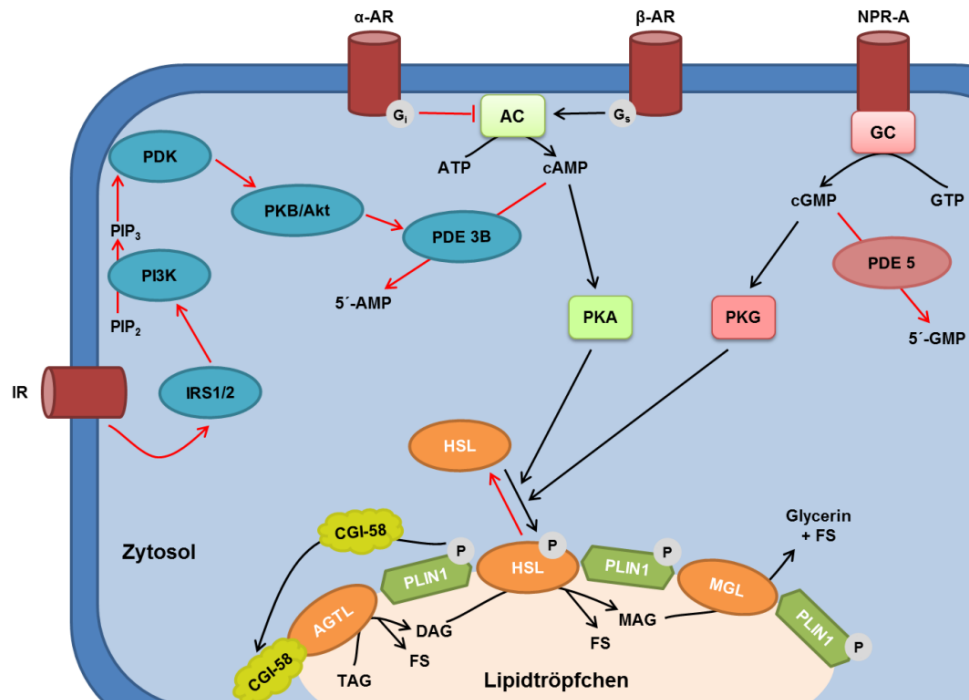


Abbildung 3: Regulationswege der Lipogenese und Lipolyse in Adipozyten. Die schwarzen Pfeile zeigen die lipolytischen Signalwege, die roten Pfeile die antilipolytischen Signale. AMP: Adenosinmonophosphat; AC: Adenylatcyclase; AR: adrenerger Rezeptor; ATGL: Adipozyten-Triglycerid-Lipase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CGI-58: *comparative gene identification 58*; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; DAG: Diacylglycerin; GC: Guanylatcyclase; G<sub>i</sub>: inhibitorisches G-Protein; G-Protein: Guanosintriphosphat-bindendes Protein; G<sub>s</sub>: stimulatorisches G-Protein; GTP: Guanosintriphosphat; HSL: hormonsensitive Lipase; IR: Insulinrezeptor; IRS1/2: Insulinrezeptorsubstrat 1 und 2; MAG: Monoacylglycerin; MGL: Monoacylglycerin-Lipase; NPR-A: natriuretischer-Peptid-Rezeptor A; P: Phosphorylierung; PDK: phosphoinositidabhängige Kinase; PLIN1: Perilipin A; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; PKA: Proteinkinase A; PKB/Akt: Proteinkinase B; PKG: Proteinkinase G; PDE 3B: Phosphodiesterase 3B; TAG: Triacylglycerid (modifiziert nach Nielsen *et al.*, 2014).

Die abgespaltenen FS können in den Adipozyten auch wieder reverestert werden. Der größte Teil wird jedoch an FABP 4 gebunden. FABP 4 ist ein zytosolisches Protein, welches in Fettzellen exprimiert wird und als Chaperon fungiert, indem FS gebunden, intrazellulär im wässrigen Milieu transportiert und aus der Zelle gelangen können. Außerhalb der Zelle werden die FS an Serumalbumin gebunden und über den Blutstrom zu den Organen wie der Leber oder den Muskeln transportiert und dort aufgenommen. Durch β-Oxidation in den Mitochondrien und Abbau im Citratzyklus werden die FS zur Deckung des Energiebedarfs genutzt. Glycerin wird via Aquaporin 7 aus den Adipozyten transportiert und aus dem Blut vor allem von der Leber und der Darmmukosa aufgenommen. Nach Aktivierung zu α-

Glycerophosphat kann es in der Leber zur Glukoneogenese verwendet werden (Duncan *et al.*, 2007; Heinrich *et al.*, 2014; Hertzler *et al.*, 2008; Rehner und Daniel, 2010).

Viele der mittels Lipolyse freigesetzten FS werden sofort in der **Lipogenese** wieder reverestert. Für die Lipogenese müssen FS und Glycerin zunächst in aktivierte Formen überführt werden. Die FS werden mithilfe der ATP-abhängigen Acyl-Coenzym A (CoA)-Synthetase in Acyl-CoA umgewandelt. Glycerin-3-phosphat ist die aktive Form des Glycerins und wird aus Dihydroxyacetonphosphat, das aus der Glykolyse stammt, durch Reduktion mittels Glycerin-3-phosphatdehydrogenase gebildet. Anschließend wird Glycerin-3-phosphat und zwei Moleküle Acyl-CoA mittels Acyl-CoA-Glycerin-3-phosphat-Acyl-Transferase verestert, sodass Phosphatidsäure entsteht. Danach wird mittels Phosphatidat-Phosphohydrolase der Phosphatrest abgespalten und an das entstandene DAG ein weiteres Acyl-CoA durch die Diacylglycerin-Acyl-Transferase angelagert (Heinrich *et al.*, 2022).

Bei der **de-novo-Lipogenese** werden Kohlenhydrate aus dem Blutkreislauf in FS umgewandelt, die dann entweder zur Synthese von TAGs oder anderen Lipidmolekülen verwendet werden. Im menschlichen Körper läuft dieser Stoffwechselweg hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe ab. Ein Teil der zirkulierenden Glukose, die durch kohlenhydratreiche Nahrung aufgenommen wurde, wird von den Adipozyten durch den Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) aufgenommen. Anschließend wird die Glukose zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und im Zytosol durch die Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt, welches zur weiteren Oxidation im Citratzyklus in die Mitochondrien transportiert wird. Citrat, ein Zwischenprodukt des Citratzyklus, wird in das Zytosol exportiert und als Substrat für die de-novo-Lipogenese verwendet. Durch die ATP-Citrat-Lyase wird Acetyl-CoA aus Citrat freisetzt. Das entstandene Acetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase 1 in Malonyl-CoA umgewandelt. Die Fettsäuresynthase verknüpft Acetyl-CoA und Malonyl-CoA mit schrittweiser Verlängerung zum Hauptprodukt, der Palmitinsäure, oder zu anderen gesättigten langkettigen FS. Durch Elongasen oder Desaturasen können die gesättigten FS weiter modifiziert werden, um so komplexe FS zu erzeugen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die endogene Bildung der FS aus der de-novo-Lipogenese nur einen geringen Beitrag zur Lipidhomöostase im menschlichen Organismus leistet (Ameer *et al.*, 2014; Calvisi, 2011; Song *et al.*, 2018).

Da die Lipolyse und Lipogenese beide in den Adipozyten ablaufen, werden diese Prozesse direkt durch rezeptorvermittelte Signalübertragung oder indirekt durch Beeinflussung der lipolytischen Kaskade reguliert (Kersten, 2001; Nielsen *et al.*, 2014).

Die **Katecholamine** Adrenalin und Noradrenalin stimulieren die Lipolyse durch Bindung an G-Protein gekoppelte  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren mit einer  $G_s$ -Untereinheit. Dadurch wird die Adenylatzyklase aktiviert, welche die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert. Ein Anstieg von cAMP aktiviert die PK A, welche die HSL und Perilipin phosphoryliert, um die Lipolyse zu stimulieren. Im Menschen sind sowohl die  $\beta_1$ - als auch die  $\beta_2$ -Isoformen an der Lipolyse beteiligt. Weiterhin können Katecholamine auch über *extracellular signal-regulated kinases* vermittelte Signalwege die Lipolyse regulieren. Entgegengesetzt inhibieren Katecholamine die Lipolyse über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren mit einer  $G_i$ -Untereinheit. Diese hemmen die Adenylatzyklase und somit die cAMP-Synthese (Ahmadian *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2018; Nielsen *et al.*, 2014; Robidoux *et al.*, 2006).

**Insulin**, ein von der Bauchspeicheldrüse gebildetes Hormon, inhibiert ebenfalls die Lipolyse und stimuliert die Lipogenese durch Bindung an den Insulinrezeptor auf der Zellmembran der Adipozyten. Die Bindung bewirkt eine Autophosphorylierung des Rezeptors, was zur Aktivierung und anschließenden Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate führt. Dies fördert die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat umwandelt. Die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat aktiviert die phosphoinositidabhängige Kinase, die eine Phosphorylierung und Aktivierung der PK B bewirkt. Schließlich aktiviert diese die PDE 3B, die cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (AMP) abbaut. Dadurch wird PK A inaktiviert, was zu einer verringerten Phosphorylierung von HSL sowie Perilipin A und zur Unterdrückung der Lipolyse führt (Nielsen *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020). Campell *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass Insulin die Lipolyserate signifikant durch eine steigernde Wiederveresterung der FS reduziert (Campbell *et al.*, 1992).

Neben den Katecholaminen und Insulin gehören auch **natriuretische Peptide** zu den Hauptregulatoren der Lipolyse im Menschen (Lafontan und Langin, 2009). Natriuretische Peptide binden an Typ-A-Rezeptoren, die einen zytoplasmatischen Anteil mit Guanylatzyklaseaktivität besitzen. Der Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) resultiert aus der Umwandlung von Guanostriphosphat mittels Guanylatzyklase und aktiviert die PK G, die ähnlich wie PK A HSL und Perilipin A phosphoryliert (Braun *et al.*, 2018). In 14 gesunden männlichen Probanden konnte durch intravenöse Gabe von atrialem natriuretischem Peptid eine gesteigerte Lipidmobilisierung und eine erhöhte Konzentration an unveresterten FS im Serum nachgewiesen werden (Birkenfeld *et al.*, 2005).

**Glukokortikoide** wie Dexamethason besitzen lipolytische Effekte durch die Affinität zu  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und durch Reduktion der Insulinsensitivität (Nielsen *et al.*, 2014). Xu *et al.* konnten zeigen, dass Glukokortikoide die Lipolyse in primären Rattenadipozyten erhöhten. Durch Inkubation mit Dexamethason konnte eine Herunterregulierung der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA)- und Proteinlevel der PDE 3B, eine erhöhte cAMP-Produktion und

eine Aktivierung der PK A beobachtet werden. Darüber hinaus induzierte Dexamethason die Phosphorylierung von Perilipin, erhöhte die mRNA- und Proteinkonzentration der HSL sowie der AGTL und steigerte die FS-Konzentration im Plasma (Xu *et al.*, 2009).

Des Weiteren können **Proteine** wie das *acylation-stimulating protein* (ASP), das von Adipozyten produziert wird, als Aktivator der Acyl-Transferasen fungieren. ASP stimuliert die FS-Aufnahme in den Fettzellen durch Aktivierung der Diacylglycerin-Acyl-Transferase. Weiterhin wird die Glukoseaufnahme durch die Glukosetransporter GLUT4 und GLUT1 erhöht und die Lipolyse durch Inhibierung der HSL reduziert (Rezvani *et al.*, 2024).

**Caveolae**, darunter Caveolin-1, sind kleine Einstülpungen in den Plasmamembranen von Zellen, die in Adipozyten stark ausgeprägt sind. Sie regulieren einerseits den FS-Transport und stimulieren andererseits die Lipolyse durch eine erleichterte PK A-vermittelte Phosphorylierung von Perilipin (Duncan *et al.*, 2007; Lafontan und Langin, 2009; Luse *et al.*, 2023).

Weiterhin werden mehrere Mechanismen beschrieben, die zur **Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$** -stimulierten Lipolyse beitragen. Einerseits wurde eine Hemmung der Insulin-vermittelten Signalübertragung beobachtet, wodurch eine verminderte PDE 3B-Aktivität und hohe cAMP-Level aufrechterhalten werden. Andererseits erhöht TNF $\alpha$  die Adenylatzyklaseaktivität durch die Abnahme der Expression von G<sub>i</sub>-Untereinheiten. Der dritte Mechanismus erfolgt über eine erhöhte Phosphorylierung und dadurch verringerte Perilipinkonzentrationen. Die Phosphorylierung erfolgt indirekt durch die Herabregulierung des PDE 3B-Proteingehaltes, was zu einem Anstieg von cAMP führt. Weiterhin werden die drei mitogenaktivierten Proteinkinasen p42/44, c-Jun-N-terminale Kinase und p38 durch TNF $\alpha$  aktiviert, von denen p42/44 und c-Jun-N-terminale Kinase an der Induktion der Lipolyse beteiligt sind (Ahmadian *et al.*, 2010; Hertzler *et al.*, 2008; Jack *et al.*, 2022; Nielsen *et al.*, 2014).

Auch **Hormone** wie Glukagon oder Adrenalin spielen eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung gespeicherter Energie, indem mittels Glykogenolyse der Abbau von Glykogen zu Glukose stimuliert wird. Glukagon wird von endokrinen Zellen des Pankreas synthetisiert und als Reaktion auf einen niedrigen Blutzuckerspiegel in den Blutkreislauf ausgeschüttet. Die Signaltransduktion durch Glukagon erfolgt ähnlich wie bei den Katecholaminen über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, die Adenylatzyklase und die Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels, wodurch Proteinkinasen aktiviert werden (Albrechtsen *et al.*, 2023; Armour *et al.*, 2023). Daneben gibt es auch Hormone wie Leptin und Adiponektin, die von Fettzellen selbst produziert werden. Die Leptinsynthese und -abgabe steigt proportional mit der Größe der Fettzellen. Entgegengesetzt dazu enthalten kleine Fettzellen besonders viel Adiponektin (Schling, 2020).

Außerdem kann durch die Aufnahme kohlenhydratreicher **Nahrung** die Lipogenese stimuliert werden. Glukose wird einerseits in Acetyl-CoA umgewandelt, wodurch die FS-Synthese gesteigert wird. Andererseits erhöht Glukose die Insulinfreisetzung und inhibiert die Glukagonsekretion aus den Alphazellen des Pankreas. Dagegen führt Fasten zur Reduzierung der Plasmaglukosekonzentration und zur Erhöhung der freien FS sowie der Ketonkörper. Während Nahrungskarenz wurde eine Verstärkung der Katecholamin-induzierten Lipolyse und eine Abnahme der Insulin-stimulierten Lipogenese beobachtet (Kersten, 2023).

Auch **körperliche Aktivität** kann die Lipolyse stimulieren durch erhöhte Blutkonzentrationen von Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumsfaktoren und Cortisol sowie erniedrigte Konzentrationen von Insulin (Nielsen *et al.*, 2014).

Des Weiteren wurde eine Beeinflussung der FS-Mobilisierung durch das **Alter oder Stress** diskutiert (Lafontan und Langin, 2009).

#### 2.1.4. Phosphodiesterasen

PDEs sind Enzyme, welche die Hydrolyse der beiden *second messenger* cAMP und cGMP zu 5'-AMP bzw. 5'-Guanosinmonophosphat (GMP) durch Spaltung der Phosphodiesterbindung katalysieren (siehe Abbildung 4). Damit beeinflussen PDEs eine Vielzahl von Signalwegen, einschließlich Muskelkontraktion, Zelldifferenzierung, Lipolyse, Glykogenolyse, Glukoneogenese sowie Apoptose und wurden als wichtige Zielmoleküle für die Behandlung von Krankheiten wie Herzinsuffizienz, Depression, Asthma und Inflammation identifiziert (Jeon *et al.*, 2005).

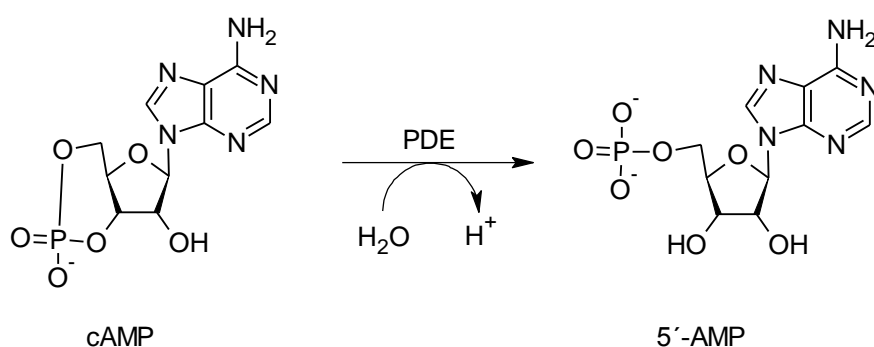


Abbildung 4: Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP durch PDEs an Position 3'. AMP: Adenosinmonophosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PDE: Phosphodiesterase.

Derzeit sind 12 PDE-Familien bekannt, die von 24 Genen kodiert werden und über 100 verschiedene Isoformen repräsentieren (siehe Tabelle 1). Je nach PDE-Familie variieren neben der Substratspezifität auch deren dreidimensionale Struktur, kinetische



Eigenschaften, Regulierungsmechanismen, intrazelluläre Lokalisierung, zelluläre Expression und Sensitivität gegenüber Inhibitoren (Bender und Beavo, 2006; Bizzi *et al.*, 2019).

Tabelle 1: Übersicht der PDE-Familien, ihrer Substratspezifität und des exprimierenden Gewebes (Gresele *et al.*, 2011).

PDE-Familie	Substrat	exprimierendes Gewebe
1	cGMP > cAMP	Herz, glatte Gefäßmuskulatur, Gehirn
2	cGMP = cAMP	Thrombozyten, Herz, Endothelzellen
3	cGMP < cAMP	Thrombozyten, glatte Gefäßmuskulatur, Schwellkörper ( <i>Corpus cavernosum</i> ), Herz
4	cAMP	Lunge, Herz, glatte Gefäßmuskulatur, Gehirn, Entzündungs- und Immunzellen
5	cGMP	Thrombozyten, glatte Gefäßmuskulatur, Schwellkörper ( <i>Corpus cavernosum</i> )
6	cGMP > cAMP	Stäbchen und Zapfen der Netzhaut
7	cGMP < cAMP	T-Zellen, B-Zellen, Skelettmuskel, Herz
8	cAMP	Hoden, Auge, Leber, Niere, Skelettmuskel, Embryo, Eierstöcke, Gehirn
9	cGMP	Gehirn, glatte Muskulatur des Dünndarms, Leber, Niere, Lunge, Hoden, Skelettmuskel, Herz
10	cGMP < cAMP	Hoden, Gehirn
11	cGMP = cAMP	Skelettmuskel, Prostata, Niere, Leber, Hypophyse, Speicheldrüsen, Hoden

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat.

Strukturell zeichnen sich alle PDE-Isoformen durch drei funktionelle Domänen aus, darunter einen konservierten, katalytischen Kern, einen regulatorischen N-Terminus und einen C-Terminus. Die konservierte, katalytische Domäne besteht aus ~270 Aminosäuren (18–46 % Sequenzidentität), die sich im C-terminalen Teil des Proteins befindet. Diese katalytische Domäne hat drei helikale Subdomänen: eine N-terminale, Zyklin-gefaltete Region, eine Linker-Region und ein C-terminales, helikales Bündel. An der Schnittstelle der drei Subdomänen wird eine tiefe hydrophobe Tasche gebildet, die aus den vier Teilbereichen Metallbindungsstelle für  $Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  (M-Stelle), Kerntasche (Q-Tasche), hydrophobe Tasche (H-Tasche) und einer Deckelregion (L-Bereich) besteht (Azevedo *et al.*, 2014; Bizzi *et al.*, 2019; Jeon *et al.*, 2005). Die Spezifität für das Substrat (cAMP und/oder cGMP) und die Fähigkeit, durch familien- und isoformspezifische Inhibitoren gehemmt zu werden,

ergeben sich durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz und der Tertiärstruktur in der katalytischen Region (Bizzi *et al.*, 2019).

Im Folgenden wird genauer auf die **PDE 3-Familie** eingegangen, da die PDE 3B aufgrund ihrer Beteiligung am Lipidmetabolismus für diese Arbeit von besonderem Interesse ist (siehe Kapitel 2.1.3.).

Die PDE 3-Familie besteht aus zwei Subfamilien, PDE 3A und PDE 3B. Die PDE 3A-Subfamilie wiederum umfasst drei Isoformen (PDE 3A1–PDE 3A3), während von PDE 3B bislang keine unterschiedlichen Isoformen bekannt sind (Azevedo *et al.*, 2014; Omori und Kotera, 2007). Die Enzyme der PDE 3-Familie werden von verschiedenen Geweben exprimiert – PDE 3A ist sowohl in Thrombozyten, der glatten Gefäßmuskulatur, Herzmuskelzellen und Eizellen lokalisiert. Die PDE 3B kommt vor allem in Zellen und Geweben vor, die für die Regulierung der Energiehomöostase sowie des Glukose- und Lipidstoffwechsels wichtig sind wie das Fettgewebe, Leber,  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse und Hypothalamus (Azevedo *et al.*, 2014; Bender und Beavo, 2006). Obwohl die PDE 3 sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysiert, ist die Hydrolysegeschwindigkeit für cAMP zehnmal höher als für cGMP. Dagegen ist die Affinität für cGMP deutlich größer, wodurch cGMP wie ein kompetitiver Inhibitor der cAMP-Hydrolyse wirkt. Als weitere PDE 3-Inhibitoren mit pharmakologischer Anwendung wurden Cilostazol, Milrinon, Vesnarinon, Lixazinon oder Anagrelid identifiziert (Gresele *et al.*, 2011; Omori und Kotera, 2007). Neben den spezifischen Inhibitoren wurden bereits 1962 die unspezifischen Inhibitoren Koffein, Theobromin oder Theophyllin entdeckt, welche die PDE-Aktivität und damit auch die Hydrolyse von cAMP zu AMP hemmen (Butcher und Sutherland, 1962). Des Weiteren konnten auch Flavonoide wie Flavone oder Anthocyane sowie flavonoidreiche Extrakte als PDE-Inhibitoren identifiziert werden (Dallas *et al.*, 2008; Kuppusamy und Das, 1992; Rauf *et al.*, 2022; Röhrig *et al.*, 2017).

### **2.1.5. Übergewicht, Adipositas und deren Folgeerkrankungen**

Bei normalgewichtigen Menschen liegt die durchschnittliche Umsatzrate von TAGs in der Körperfettmasse bei etwa 100–300 g TAGs/Tag. Ein Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und -verbrauch, in Zusammenhang mit ungesunder Ernährung durch fett- und zuckerhaltige Lebensmittel und Bewegungsmangel, führt zu einer übermäßigen Fettakkumulation, die in Übergewicht oder Adipositas resultieren kann (Lafontan und Langin, 2009; World Health Organization, 2021; World Health Organization, 2022). Daneben können auch die genetische Prädisposition, Alter, endokrine Erkrankungen (z. B. Hypothyreose,

Cushing-Syndrom), hormonelle Faktoren oder Medikamenteneinnahme zur Entstehung von Adipositas beitragen (Masood und Moorthy, 2023).

Bei ständig erhöhter Energiezufuhr werden die Speicherkapazitäten der Adipozyten überfordert und die zelluläre Homöodynamik gestört (Eisenstecken *et al.*, 2012). Die Daten der molekularen Mechanismen sind oft ambivalent. Beispielsweise kann die durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren stimulierte Lipolyse bei Fettleibigkeit beeinträchtigt sein. Daneben können verminderte HSL- und Perilipin-Proteingehalte im Fettgewebe adipöser Personen durch einen Postrezeptordefekt zur Beeinträchtigung der Katecholamin-vermittelten Lipolyse beitragen. HSL und Perilipin A sind normalerweise an der cAMP-abhängigen PK A-Aktivierung beteiligt (Duncan *et al.*, 2007; Large *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind die Konzentrationen der freien FS im Plasma bei Fettleibigkeit in der Regel erhöht, was auf eine Dysregulierung bei der Aufnahme durch die Fettzellen oder der Lipolyse hindeutet. Diese bei Übergewicht vermehrte Ausschüttung freier FS und verschiedener Adipokine kann die Insulinsensitivität maßgeblich beeinflussen. Adipokine oder Adipozytokine wie Interleukin-6, TNF $\alpha$  und Resistin können eine Insulinresistenz hervorrufen, während Adiponektin, das bei übergewichtigen Personen reduziert ist, die Insulinsensitivität steigert (Fasshauer *et al.*, 2004; Lafontan und Langin, 2009). Weiterhin wird eine Leptinresistenz als eine der Hauptursachen für Übergewicht und Adipositas diskutiert. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die Ursache ein gestörter Transportprozess ist und Leptin nur eingeschränkt die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Neuere Forschungen konnten jedoch zeigen, dass die Wirkung von Leptin auf Neuronen der tuberalen Region des Hypothalamus zum Sättigungseffekt beiträgt und so wurde ein Einfluss von Schäden an Neuronen als Ursache für die Leptinresistenz diskutiert (Haddad-Tóvulli *et al.*, 2023; Harrison *et al.*, 2019; Maffei und Giordano, 2022).

Bereits bei Kindern, ebenso wie bei Erwachsenen, steigt die Prävalenz für Übergewicht und Adipositas – Während im Jahr 1975 knapp 4 % der Kinder und Jugendlichen im Alter von fünf bis 19 Jahren weltweit übergewichtig oder adipös waren, ist der Wert im Jahr 2016 auf über 18 % angestiegen (World Health Organization, 2021). Der bei Übergewicht oder Adipositas erhöhte BMI ist ein Risikofaktor für Begleit- und Folgeerkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Typ-2-Diabetes und Erkrankungen des Bewegungsapparates (insbesondere Arthrose). Weiterhin wird das Risiko für einige Krebsarten einschließlich Endometrium-, Brust-, Eierstock-, Prostata-, Leber-, Gallenblasen-, Nieren- und Dickdarmkrebs durch starkes Übergewicht erhöht. Adipositas führt zudem gehäuft zu degenerativen Gelenkschäden, einer Fettleber und Depressionen. Nicht nur eine Reduktion der Lebensqualität, sondern auch eine erhöhte Morbidität und Mortalität wurde bei adipösen Personen beobachtet (Bischoff, 2022; Calle *et al.*, 2003; Lazarus und Bays, 2022; World Health Organization, 2021). Im Zusammenhang stehend mit starkem Übergewicht und

Adipositas ist das metabolische Syndrom. Als metabolisches Syndrom wird das gemeinsame Auftreten von viszeraler Adipositas, Dyslipidämie, Hyperglykämie und Hypertonie bezeichnet (Wang *et al.*, 2020).

Ein multimodaler Ansatz bestehend aus Ernährungs-, Bewegungs-, Verhaltenstherapie und medizinischer Betreuung sollte als Therapie zur Reduzierung von Adipositas bevorzugt genutzt werden. Untersuchungen zeigten, dass der durchschnittliche Gewichtsverlust über sechs Monate 5–10 % des Ausgangsgewichtes bei einer multimodalen Therapie betrug, wohingegen der durchschnittliche Gewichtsverlust bei einer einzelnen dieser Therapieformen lediglich bei 1–2 % des Ausgangsgewichtes lag (Bischoff, 2015; Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG), 2014).

## 2.2. Polyphenole

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die mengenmäßig zu den wichtigsten Verbindungsklassen in der Natur zählen und von denen bisher über 8.000 identifiziert wurden. Sie zeichnen sich durch mindestens zwei aromatische Ringe mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen (alkoholische OH-Gruppen) aus und liegen meist als Glykoside vor, zum Teil auch als Ester. In Pflanzen dienen Polyphenole als Blütenfarbe oder Farbpigmente, Ultraviolett (UV)-Lichtschutz und Fraßschutz (Belitz *et al.*, 2008; Kuhnert, 2013; Leri *et al.*, 2020). Daneben kommen sie in Lebensmitteln wie Obst, Gemüse Hülsenfrüchten, Kakao sowie in einigen Getränken wie Tee, Kaffee und Wein vor (Phenol-Explorer, 2015).

Polyphenole können je nach strukturellen Merkmalen in mehrere Untergruppen unterteilt werden, darunter die Phenolsäuren, Flavonoide oder Lignane (siehe Abbildung 5). Die Gruppe der Flavonoide wiederum, die in der Nahrung die am häufigsten vorkommenden Polyphenole sind und die sich durch das Flavan-Grundgerüst auszeichnen, wird in sieben Subklassen je nach Oxidierungsgrad und Verknüpfung der aromatische Ringe eingeteilt (Sandoval *et al.*, 2020; Watzl und Rechkemmer, 2001). In einer Studie um Zamora-Ros *et al.*, bei der die Aufnahme an Gesamtpolyphenolen in Europa untersucht wurde, wurde die höchste Aufnahmemenge in Dänemark mit ca. 1.700 mg/Tag und die niedrigste Aufnahme an Gesamtpolyphenolen in Griechenland (Männer 744 mg/Tag, Frauen 584 mg/Tag) bestimmt. Die größten Anteile der konsumierten Polyphenole stellten dabei auf die Klassen der Phenolsäuren und Flavonoide dar (Zamora-Ros *et al.*, 2016).

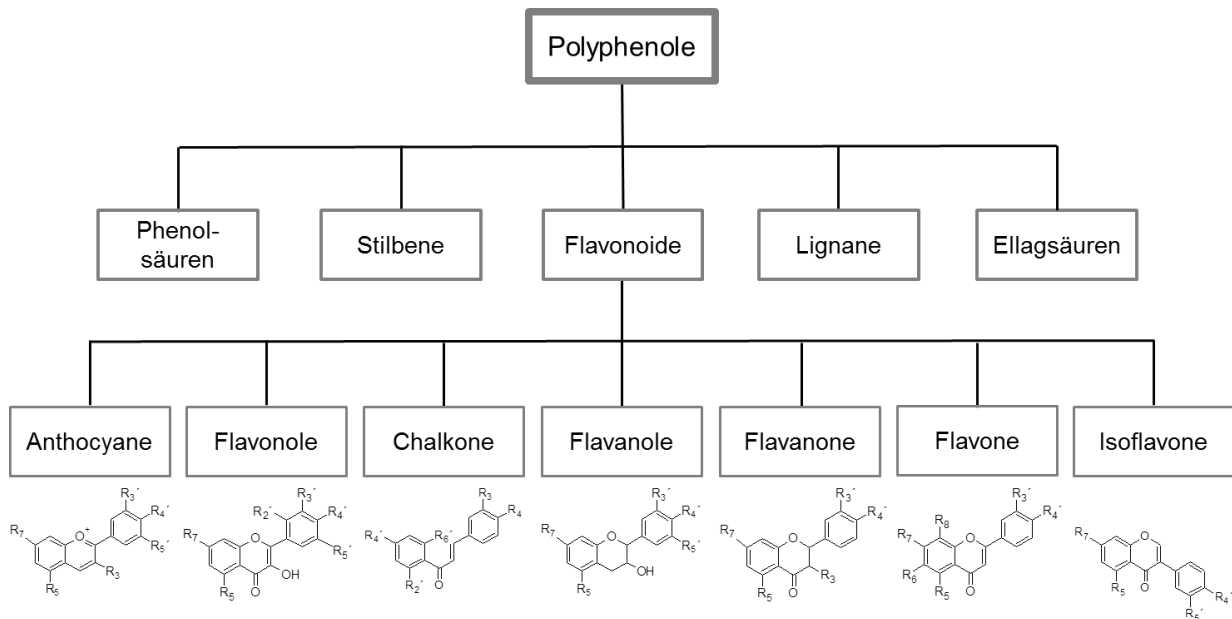


Abbildung 5: Klassifizierung der Polyphenole und der Flavonoid-Subklassen inkl. deren chemischer Struktur (modifiziert nach Sandoval *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2016).

### 2.2.1. Absorption, Metabolismus, Eliminierung sowie Bioverfügbarkeit

Die Aufnahme von Mikronährstoffen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in den Körper ist bei oraler Aufnahme nicht vollständig, da ein bestimmter Prozentsatz nicht absorbiert wird. Um die Menge zu quantifizieren, die tatsächlich absorbiert, im Gewebe verteilt, metabolisiert und schließlich eliminiert (ADME) wird, wurde der Begriff Bioverfügbarkeit eingeführt. Die Bioverfügbarkeit beschreibt die Konzentration einer bestimmten Verbindung oder des Metaboliten am Zielorgan (Holst und Williamson, 2008).

Die meisten Polyphenole liegen in der Nahrung in Form von Estern, Glykosiden oder Polymeren vor und sind persistent gegenüber den sauren Bedingungen während der Magenverdauung, da sie nicht in ihrer nativen Form absorbiert werden können (mit Ausnahme der Anthocyane). Nur 5–10 % der gesamten Polyphenolzufuhr, darunter meist die Aglyka und einige Glukoside, können direkt über den Magen und/oder den Dünndarm absorbiert werden (siehe Abbildung 6). Der Großteil der Polyphenole muss allerdings vor der Resorption von den Enzymen im Dünndarm oder der Mikrobiota des Dickdarms hydrolysiert werden (Arfaoui, 2021; Chen *et al.*, 2018; Manach *et al.*, 2004). Die Glykosylierung erhöht die Hydrophilie der Polyphenole und begrenzt dadurch die passive Diffusion. Die Glykoside können entweder durch aktive Aufnahme mittels  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glukosetransporters (SGLT-1) und anschließender Deglykosylierung im Enterozyten durch die zytosolische  $\beta$ -Glukosidase, nach Hydrolyse mittels Laktase-Phlorizin-Hydrolase an der Enterozytenmembran oder durch passive Diffusion des freigesetzten Aglykons absorbiert

werden (Chen *et al.*, 2018; Day *et al.*, 2003). Ist Rhamnose glykosidisch gebunden, wird die Bindung erst im Dickdarm durch die  $\alpha$ -Rhamnosidasen hydrolysiert. Andere Polyphenole wie die Hydroxyzimtsäuren oder Ellagitannine können von der Laktase-Phlorizin-Hydrolase oder  $\beta$ -Glukosidase nicht gespalten und daher auch nicht im Dünndarm resorbiert werden, sondern gelangen in den Dickdarm, wo die Mikrobiota die konjugierten Anteile abspaltet. Die so entstandenen Aglyka werden von der Mikrobiota verstoffwechselt, was zur Bildung verschiedener Hydroxyphenylelessigsäuren führt (Jaganath *et al.*, 2006; Landete, 2011; Marín *et al.*, 2015).

Nach Absorption im Dün- oder Dickdarm können Konjugationsprozesse in der Leber mittels Phase-II-Enzymen wie die Methylierung durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT), Sulfonierung durch Sulfotransferasen (SULT) und Glukuronidierung durch Uridindiphosphat-Glukuronosyltransferasen erfolgen. Die Metaboliten können über die Pfortader in den Blutkreislauf gelangen. Die zirkulierenden Polyphenolmetaboliten sind oft an Albumin gebunden und können unter anderem zu dem Fettgewebe, der Bauchspeicheldrüse oder den Muskeln transportiert werden, wo sie ihre biologischen Wirkungen entfalten. Alternativ werden sie zur Leber transportiert, wo hauptsächlich die Konjugationsprozesse zur metabolischen Detoxifizierung stattfinden, indem die Hydrophilie erhöht wird (D'Archivio *et al.*, 2010; Sandoval *et al.*, 2020). Einige der Polyphenolkonjugate werden über die Galle wieder zurück in den Darm ausgeschieden (enterohepatischer Kreislauf), womit sich auch die Verweildauer im Körper erhöht (Manach *et al.*, 2004). Durch diese umfangreichen metabolischen Veränderungen entstehen aus einem einzigen Polyphenol mehrere Metaboliten. Daher unterscheiden sich die Verbindungen, die die Zielzellen und -gewebe erreichen und wo sie ihre Bioaktivität entfalten, chemisch von der ursprünglichen, in der Nahrung vorkommenden Form (Arfaoui, 2021).

Polyphenole und ihre Derivate werden vor allem über den Urin und die Galle ausgeschieden – große, umfangreich konjugierte Metaboliten meist über die Galle, kleine Konjugate wie Monosulfate bevorzugt mit dem Urin. Nicht resorbierte Metaboliten werden über die Fäzes eliminiert (Manach *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2015).

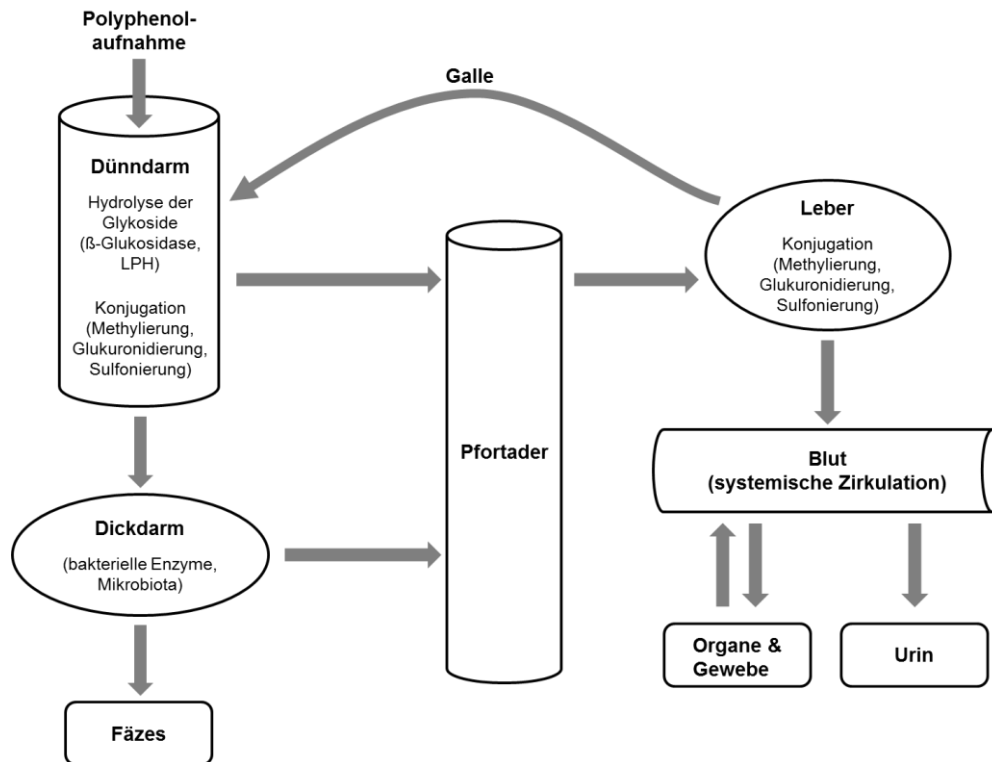


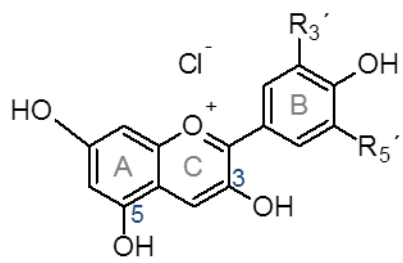
Abbildung 6: Absorption und Metabolismus der mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole. LPH: Laktase-Phlorizin-Hydrolase (modifiziert nach Cipolletti *et al.*, 2018; Marín *et al.*, 2015).

Die Zusammensetzung der Lebensmittelmatrix und die Wechselwirkung zwischen Polyphenolen und anderen Nahrungsbestandteilen (Proteine, Fette, Kohlenhydrate und Ballaststoffe) sowie die Tendenz der Polyphenole, Komplexe mit Proteinen zu bilden, sollten bei der Bewertung ihrer Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden (Arfaoui, 2021; D'Archivio *et al.*, 2010). Aufgrund der strukturellen Variation zwischen den einzelnen Polyphenolen hinsichtlich Molekülgröße, Stabilität, Polarität oder Metabolisierung zeigen sich auch dadurch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit (Koudoufio *et al.*, 2020). Je nach Polyphenol liegen die Werte der relativen Urinausscheidung zwischen 0,3 % und 43 % der aufgenommenen Menge, was die große Variabilität der Bioverfügbarkeit der verschiedenen Polyphenole verdeutlicht. Die Polyphenole, die beim Menschen am besten absorbiert werden, sind die Isoflavone und Gallussäuren, gefolgt von den Flavanonen und Quercetinglukosiden. Zu den am schlechtesten absorbierten Polyphenolen gehören die Proanthocyanidine und die Anthocyane (Manach *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2017).

### 2.2.2. Anthocyane, Copigmente und Polymere

**Anthocyane** (griech. *anthos* = Blüte und *cyanos* = blau) stellen eine Untergruppe der Flavonoide dar und sind wichtige polyphenolische sowie wasserlösliche Bestandteile von

Pflanzen, insbesondere von Früchten (v. a. Beeren), kommen aber auch in Blüten vor. Als strukturelles Merkmal tragen Anthocyane eine positive Ladung am C-Ring und werden daher als Flavylumkationen bezeichnet. Die Anthocyanidine (Aglyka; siehe Abbildung 7) sind für die rote, blaue oder violette Farbe verantwortlich und kommen in der Natur mit einem glykosidisch gebundenen Zuckeranteil wie Glukose, Galaktose, Rhamnose oder Arabinose an Position 3 vor. Über 700 Anthocyanderivate von 27 Aglyka sind bisher in der Natur identifiziert worden, wobei die 3-O-Glykoside und 3,5-O-Diglykoside von Cyanidin, Delphinidin, Peonidin, Petunidin, Pelargonidin und Malvidin die am häufigsten natürlich vorkommenden Anthocyane sind (Belitz *et al.*, 2008; Mattioli *et al.*, 2020; Wallace und Giusti, 2015).



Anthocyanidin	R <sub>3'</sub>	R <sub>5'</sub>
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Abbildung 7: Strukturen der sechs am häufigsten vorkommenden Anthocyanidine.

Die Stabilität und Farbe der Anthocyane ist abhängig von den Hydroxy- bzw. Methoxysubstituenten des B-Ringes, pH-Wert, Copigmenten, Licht, Temperatur oder Metallionen. Zunehmende Hydroxylierung bewirkt eine Blauverschiebung, wohingegen Glykosylierung und Methylierung zur Rotverschiebung führt. Bei einem niedrigen pH-Wert (pH 1–3) erscheinen Anthocyane rot und sind am stabilsten. Bei steigendem pH-Wert ist eine Farbverschiebung über das Violette ins Blaue zu beobachten. In Gegenwart von mehrwertigen Metallionen wie Al<sup>3+</sup> oder Fe<sup>3+</sup> kann eine Stabilisierung bei höheren pH-Werten erfolgen, wobei sich ein tiefblau gefärbter Komplex bildet (Belitz *et al.*, 2008; Khoo *et al.*, 2017; Mattioli *et al.*, 2020; Nassour *et al.*, 2020).

**Copigmente** sind häufig farblose Verbindungen, welche durch Komplexbildung mit Anthocyanen deren Farbe stabilisieren und Intensität verstärken können. Copigmentierung führt zu einem Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt). Es wird zwischen intramolekularer Copigmentierung, intermolekularer Copigmentierung, Selbstassoziation und Interaktion mit einem Metall unterschieden (Mu *et al.*, 2017; Trouillas *et al.*, 2016).



Zu den wichtigsten natürlich vorkommenden Copigment-bildenden Verbindungen gehören die hydrolysierbaren Tannine, Phenolsäuren und Flavonoide, darunter Flavonole, Flavone, Flavanole und Dihydroflavonole. Daneben zählen einige nicht-phenolische Klassen wie die Alkaloide, Aminosäuren, organische Säuren und Polysaccharide zu den Copigmenten. Diese weisen aber im Vergleich zu den Polyphenolen oftmals eine geringere Effizienz auf. Faktoren wie Struktur und Konzentration des Anthocyans und des Copigmentes, ihr molares Verhältnis, der pH-Wert oder die Temperatur können das Ausmaß der Copigmentierung beeinflussen (Rodriguez-Amaya und Carle, 2021; Trouillas *et al.*, 2016). Weiter wurde bei 3,5-Diglukosiden eine stärker ausgeprägte Copigmentierung als bei den 3-Monoglukosiden beobachtet (Escribano-Bailón *et al.*, 2019).

Als **Polymere** werden Makromoleküle bezeichnet, bei denen viele Monomere kovalent miteinander verknüpft sind (Koltzenburg *et al.*, 2014). In der Natur kommen polymere phenolische Verbindungen in großen Mengen vor, wobei die Lignine und Tannine als die bekanntesten gelten. Die Tannine wiederum werden in die hydrolysierbaren und die kondensierten bzw. nicht hydrolysierbaren Klassen eingeteilt (Panzella und Napolitano, 2017). Die zur Gruppe der kondensierten Tannine zählenden polymeren Proanthocyanidine, die von den Flavan-3-olen abgeleitet sind, wurden beispielsweise in Trauben und Aronia analysiert (Hernandez-Jimenez *et al.*, 2012; La Rosa *et al.*, 2019; Taheri *et al.*, 2013). Hydrolysierbare Tannine wie die Ellagtannine mit den beiden Hauptvertretern Punicalagin und Punicalin wurden in Granatäpfeln erfasst (Sun *et al.*, 2017). Gallotannine und Ellagtannine leiten sich von den Phenolsäuren ab und wurden ebenfalls in Obst, Gemüse und Nüssen nachgewiesen (La Rosa *et al.*, 2019; Smeriglio *et al.*, 2017).

### 2.2.3. Vorkommen von Polyphenolen in roten Früchten

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und kommen in pflanzlichen Lebensmitteln ubiquitär vor wie beispielsweise in Früchten, Gemüse, Getreide, Oliven, Hülsenfrüchten, Schokolade, Tee, Kaffee und Wein (Phenol-Explorer, 2015). Die höchsten Polyphenolgehalte wurden in Gewürzen wie Nelken mit 15.188 mg/100 g und Pfefferminze mit 11.960 mg/100 g bestimmt, gefolgt von Kakaoprodukten wie Kakaopulver (3.448 mg/100 g) oder dunkler Schokolade (1.664 mg/100 g). Ebenfalls hohe Gehalte an Polyphenolen wurden in Früchten wie Aronia (1.359 mg/100 g) oder schwarzer Johannisbeere (758 mg/100 g) bestimmt (siehe Tabelle 2). Bei Betrachtung der Lebensmittel mit dem höchsten Polyphenolgehalt pro Portion ergibt sich eine veränderte Reihenfolge – neben Kaffee weisen vorwiegend Früchte wie schwarze Holunderbeere, Aronia, schwarze Johannisbeere oder Heidelbeere hohe Polyphenolgehalt pro Portion auf (Pérez-Jiménez *et*

*al.*, 2010). Abhängig von Reifegrad, Lagerung, Düngung, Bodentyp oder Witterung, aber auch von den verwendeten Analysemethoden können die Gehalte variieren (Jeppsson, 2000; Kobori *et al.*, 2021).

Tabelle 2: Überblick der Polyphenolgehalte ausgewählter Früchte.

Fruchtart	Polyphenolgehalt [mg GAE/100 g FW]	Literatur
Aronia	1255 ± 183 *	(Jakobek <i>et al.</i> , 2012)
Cranberry	161 ± 16 *	(Juríková <i>et al.</i> , 2021)
Granatapfel	133 ± 7	(Ruiz-Torralba <i>et al.</i> , 2018)
Heidelbeere	258 ± 2	(Ruiz-Torralba <i>et al.</i> , 2018)
Holunderbeere	809 ± 226 *	(Pliszka, 2020)
rote Traube	124 ± 6	(Ruiz-Torralba <i>et al.</i> , 2018)
Kirsche	70 ± 3	(Ruiz-Torralba <i>et al.</i> , 2018)
schwarze Johannisbeere	685 ± 47 *	(Bakowska-Barczak und Kolodziejczyk, 2011)

FW: Frischgewicht; GAE: Gallussäureäquivalent. \* Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Polyphenolgehalte in die Einheit mg GAE/100 g umgerechnet.

Oft enthalten Lebensmittel komplexe Mischungen an Polyphenolen. Während Quercetin in vielen pflanzlichen Produkten vorkommt (Obst, Gemüse, Getreide, Hülsenfrüchte, Fruchtsäfte, Tee, Wein usw.), sind andere Polyphenole spezifisch für bestimmte Lebensmittel wie Flavanone in Zitrusfrüchten oder Isoflavone in Soja (Manach *et al.*, 2004; Phenol-Explorer, 2015).

Im Folgenden werden exemplarisch an den drei Früchten Aronia, Cranberry und Granatapfel die Unterschiede in den Polyphenolprofilen erörtert.

**Aronia** (*Aronia melanocarpa*) wird auch als schwarze Apfelbeere bezeichnet und gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Der mehrjährige Strauch stammt ursprünglich aus dem Osten der USA und Kanada, wird aber auch seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts in Europa angebaut. Die kugelförmigen, reifen Aroniafrüchte zeichnen sich durch eine schwarzblaue Farbe aus und werden aufgrund des adstringierenden Geschmackes meist zur Herstellung von Säften, Nektaren, Sirupen, Konfitüren, Konserven, Weinen, Frucht-desserts, Gelees, Fruchtttees und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet (Ochmian *et al.*, 2012; Sidor und Gramza-Michałowska, 2019). Das Polyphenolprofil der Aroniafrüchte zeichnet sich v. a. durch verschiedene Anthocyane (v. a. Cyanidinderivate), Proanthocyanidine, Flavanole, Flavonole und phenolische Säuren aus (siehe Tabelle 3). Die Gehalte an Polyphenolen liegen bei ca. 22 mg Gallussäureäquivalente (GAE)/g, variieren aber aufgrund verschiedener biologischer und ökologischer Einflussfaktoren wie Genotyp, Temperatur, Lichtintensität,

Salzgehalt oder Wassergehalt des Bodens. Weiterhin können sich die Gehalte je nach verwendeter Analysemethode unterscheiden (Kaloudi *et al.*, 2022; Ksouri *et al.*, 2008; Neveu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2021). Zusätzlich enthalten Aroniasäfte auch Gehalte von 1,97–3,16 g/100 mL des Zuckeralkohols Sorbit bzw. Sorbitol (Oziembłowski *et al.*, 2022).

Tabelle 3: Gehalte der einzelnen Polyphenole [mg/g Frischgewicht] in Aroniafrüchten (modifiziert nach Kaloudi *et al.*, 2022).

Polyphenol	Gehalt
<b>Anthocyane</b>	
Cyanidin-3-galaktosid	4,0 ± 0,1 mg Cyanidin-3-galaktosidäquivalente/g
Cyanidin-3-arabinosid	1,5 ± 0,1 mg Cyanidin-3-galaktosidäquivalente/g
Cyanidin-3-glukosid	0,3 ± 0,0 mg Cyanidin-3-galaktosidäquivalente/g
Cyanidin-3-xylosid	0,2 ± 0,0 mg Cyanidin-3-galaktosidäquivalente/g
<b>Hydroxyzimtsäuren</b>	
Chlorogensäure (5-CQA)*	0,5 ± 0,0 mg Chlorogensäureäquivalente/g
Neochlorogensäure (3-CQA)*	0,3 ± 0,0 mg Chlorogensäureäquivalente/g
<b>Flavonole</b>	
Quercetin-3-vicianosid	0,1 ± 0,0 mg Quercetin-3-rutinosidäquivalente/g
Quercetin-3-glukosid	0,2 ± 0,0 mg Quercetin-3-rutinosidäquivalente/g
Quercetin-3-rutinosid	0,2 ± 0,0 mg Quercetin-3-rutinosidäquivalente/g

\* Unterscheidung an Position der Veresterung: 3-O-Caffeoylchinasäure (3-CQA) bzw. 5-O-Caffeoylchinasäure (5-CQA).

Die aus Nordostamerika stammenden **Cranberries** (*Vaccinium macrocarpon*), auch bekannt als Kranbeeren, wachsen an einem immergrünen Zwergstrauch und gehören zur Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*). Die Hauptproduzenten sind heute in den USA und Kanada zu finden. Die Früchte sind etwa kirschgroß und leuchtend rot gefärbt (Hanke und Flachowsky, 2017). Nur etwa 5 % der Cranberries werden frisch verzehrt, der Großteil wird zu Saftgetränken, Soßen oder getrockneten Früchten verarbeitet. Ein Gesamtpolyphenolgehalt von ca. 3.600 mg/100 g Trockenmasse wurde bestimmt, wobei das Polyphenolprofil der Cranberries sowohl Anthocyane, Flavonole als auch Flavanole, Proanthocyanidine und phenolische Säuren umfasst (Neto und Vinson 2011; Oszmiański *et al.*, 2018).

Tabelle 4: Gehalte der Polyphenole [mg/100 g Trockenmasse] in drei Cranberrysorten. Die Gehalte variieren je nach Reifestadium und Cranberrysorte (modifiziert nach Oszmiański *et al.*, 2018).

<b>Polyphenol</b>	<b>Gehalt [mg/100 g Trockenmasse]</b>
<b>Anthocyane</b>	
Cyanidin-3-galaktosid	119,9–180,0
Cyanidin-3-arabinosid	64,5–95,6
Peonidin-3-galaktosid	131,3–310,3
Peonidin-3-arabinosid	42,9–95,2
<b>Phenolsäuren</b>	
p-Coumaroylhexoseisomer	3,6–50,0
Chlorogensäure (5-CQA)	26,6–79,2
Caffeoylhexosid	92,7–190,2
<b>Flavonole</b>	
Myricetin-3-galaktosid	156,5–348,4
Myricetin-3-pentosid	6,3–55,6
Myricetin-3-glukuronid	19,0–38,5
Quercetin-3-galaktosid	294,6–375,8
Quercetin-3-pentosid	21,2–122,9
Methoxyquercetinpentosid	3,4–61,0
<b>Flavanole und Proanthocyanidine</b>	
(–)-Epicatechin	47,5–60,8
A-Typ Proanthocyanidin-Dimer	14,5–108,7
A-Typ Proanthocyanidin-Trimer	15,1–53,8
B-Typ Proanthocyanidin-Dimer	5,3–203,0

Der **Granatapfel** (*Punica granatum*) wächst an einem kleinem Baum, der entweder einer eigenen Pflanzenfamilie *Punicaceae* oder den Weiderichgewächsen (*Lythraceae*) zugeordnet wird. Granatapfel, eine ursprünglich in Zentralasien beheimatete Pflanze, wird heute beispielsweise im Iran, Indien, in der Türkei, Ägypten, Tunesien, Spanien, Marokko sowie in Teilen Amerikas angebaut (Caruso *et al.*, 2020; Jagel, 2011; Zarfeshany *et al.*, 2014). Die im botanischen Sinne zu den Beeren gehörenden gelblich-roten Früchte sind 5–12 cm groß und haben ein Gewicht von ca. 200 g. Das Exokarp, d. h. die Schale des Granatapfels, macht etwa 50 % der gesamten Frucht aus, während der essbare Teil aus 10 % Samen und 40 % Arillen (fleischiger Samenmantel) besteht und insgesamt etwa 600 Arillen enthält. Neben dem rohen Verzehr wird der Granatapfel zu Saft oder Grenadinesirup verarbeitet. Weiterhin wird er in Form von Nahrungsergänzungsmitteln angeboten oder in der Kosmetikindustrie eingesetzt (Döll, 2020; Kandyliis und Kokkinomagoulos, 2020; Zarfeshany *et al.*, 2014). Der Granatapfel enthält hydrolysierbare sowie kondensierte Tannine, Flavonole, Anthocyane sowie Phenolsäuren und hat einen

Gesamtphenolgehalt von ca. 85–104 mg GAE/100 g (Kandylis und Kokkinomagoulos, 2020; Thakur *et al.*, 2018).

Tabelle 5: Gehalt einzelner Polyphenole in Granatapfelsaft (modifiziert nach Fischer *et al.*, 2011).

Polyphenol	Gehalt [mg/L]
<b>Anthocyane</b>	
Delphinidin-3,5-diglukosid	10,8 ± 0,1
Cyanidin-3,5-diglukosid	150,3 ± 1,0
Pelargonidin-3,5-diglukosid	16,8 ± 0,3
Cyanidin-3-glukosid	12,6 ± 0,2
<b>Hydrolysierbare Tannine</b>	
Galloylhexosid	11,4 ± 1,5
Digalloylhexosid	9,3 ± 0,1
Galloyl-HHDP-hexosid	62,7 ± 2,1
bis-HHDP-hexosid	110,6 ± 14,3
Digalloyl-HHDP-hexosid	70,7 ± 2,2
Ellagsäurederivat	43,8 ± 2,2
Galloyl-HHDP-glukuronsäure	24,7 ± 2,3
Digalloyl-HHDP-glukuronsäure	5,6 ± 0,7
Gallagylhexosid	9,0 ± 0,2
HHDP-gallagylhexosid	54,0 ± 1,2
<b>Phenolsäuren</b>	
Kaffeesäurehexosid	5,2 ± 0,4
Kaffeesäurehexosidderivat	6,8 ± 0,8
Kaffeesäurederivat	6,1 ± 0,2

HHDP: Hexahydroxydiphenoyl

#### 2.2.4. Biologische Wirkungen der Polyphenole

Polyphenole gehören nicht zu den essenziellen Nährstoffe für den Menschen, aber *in vitro*-, *in vivo*- und epidemiologische Studien haben gezeigt, dass sowohl eine kurz- als auch eine langfristige Zufuhr viele positive gesundheitliche Wirkungen haben kann (Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), 2014; Sandoval *et al.*, 2020).

Die **antioxidative** Wirkung phenolischer Verbindungen wird im Allgemeinen auf ihre Fähigkeit zurückgeführt, freie Radikale sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzufangen, zu inaktivieren und somit Biomoleküle wie Lipide, Proteine oder die Desoxyribonukleinsäuren (DNA) nicht irreversibel schädigen zu können. Mechanistisch wird entweder ein Wasserstoffatom der Phenolfunktion an ein Radikal abgegeben oder ein Elektron des Phenols auf ein Radikal übertragen unter Bildung eines stabilen Radikalkations (Brewer,

2011; Gebicki und Nauser, 2021; Leopoldini *et al.*, 2011). Die antioxidative Wirkung wird in Zusammenhang gebracht, chronischen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebs vorzubeugen oder diese abzuschwächen (Juan *et al.*, 2021; Quideau *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016). *In vitro* konnte in humanen Darmkrebszelllinien gezeigt werden, dass ein Heidelbeerextrakt die Glutathiongehalte erhöhte, intrazelluläre ROS-Level erniedrigte und vor oxidativen DNA-Schäden schützte (Schantz *et al.*, 2010). Diese antioxidativen Effekte konnten auch im Rahmen einer Humanstudie von Bakuradze *et al.* bestätigt werden. Dabei konsumierten die männlichen Probanden täglich 750 mL eines anthocyanreichen Mischfruchtsaftes, hergestellt aus roter Traube, Preiselbeere, Apfel, Heidelbeere, Erdbeere, Aronia und Acerola. Eine signifikante Abnahme der direkten und gesamten DNA-Schäden sowie eine Erhöhung der Superoxiddismutase (SOD)-Aktivität wurde beobachtet (Bakuradze *et al.*, 2019a). Das Enzym SOD katalysiert die Reduktion von SOD-Anionradikalen zu Wasserstoffperoxid (Gosslau und Rensing, 2002).

Die Bildung von ROS ist mit oxidativem Stress verbunden, der wiederum für die Induktion von Entzündungsprozessen verantwortlich ist (Salzano *et al.*, 2014). Der Entzündungsprozess ist eine komplexe Abwehrreaktion, die durch mikrobielle Infektionen oder Gewebsverletzungen ausgelöst wird (Zhang *et al.*, 2016). Dabei wandeln Cyclooxygenasen (COX) Arachidonsäuren in Prostaglandine um, welche als Entzündungsmediatoren zu Inflammationen führen können (Stockert, 2020). Chronische Entzündungen werden mit einer Reihe von Krankheiten wie Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen oder Krebs in Verbindung gebracht (Banach *et al.*, 2020). **Antiinflammatorische** Eigenschaften, die beispielsweise den Polyphenolen zugesprochen werden, können durch verschiedene Mechanismen wie der Hemmung von regulatorischen Enzymen (z. B. COX, Lipoxigenase) oder Transkriptionsfaktoren (z. B. nukleärer Faktor  $\kappa$ B) vermittelt werden (Maleki *et al.*, 2019). Eine multizentrische, klinische Studie wurde mit 1.139 Männern und Frauen im Alter von 55–80 Jahren durchgeführt, von denen die meisten übergewichtig bzw. adipös waren oder unter Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen litten wie Bluthochdruck, Diabetes oder Dyslipidämie. Nach einem Jahr wurde bei polyphenolreicher mediterraner Ernährung eine Abnahme der inflammatorischen Biomarker vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, Interleukin 6, TNF $\alpha$  und Monozyten-Chemoattraktor-Protein 1 beobachtet (Medina-Remón *et al.*, 2017).

Des Weiteren werden **antibakterielle** Wirkungen für Polyphenole beschrieben, die auf schädigenden Wirkungen gegen Bakterien beruhen (Ikuta *et al.*, 2012; Manso *et al.*, 2021). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass polyphenolreiche Extrakte antibakterielle Wirkungen sowohl gegen grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* als auch gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* haben (Cesoniene *et al.*, 2009; Nazzaro *et al.*, 2019). Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die zu einer antibakteriellen

Wirkung führen können: Destabilisierung oder Permeabilisierung der Plasmamembran, Hemmung extrazellulärer, mikrobieller Enzyme, direkte Wirkung auf den mikrobiellen Stoffwechsel und Entzug von Substraten, die für das mikrobielle Wachstum erforderlich sind (Burdulis *et al.*, 2009).

Eine weitere Eigenschaft, die im Zusammenhang mit Polyphenolen nachgewiesen werden konnte, ist die Beeinflussung des **Kohlenhydratstoffwechsels**. Der Kohlenhydratstoffwechsel wird durch Insulin, Glukagon oder Enzyme wie  $\alpha$ -Amylase und  $\alpha$ -Glukosidase reguliert. Letztere sind nötig, um die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate in Monosaccharideinheiten zu spalten. Polysaccharide (z. B. Stärke oder Glykogen) werden durch die in der Speichel- und Pankreasflüssigkeit enthaltene  $\alpha$ -Amylase in Dextrine, Maltotriosen und Maltosen gespalten. Allerdings können die vorhandenen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen nicht aufgespalten werden, wodurch sogenannte Grenzdextrine entstehen. Am Bürstensaum des Darmepithels sind die Enzyme Laktase, Maltase und Saccharase lokalisiert, welche die Disaccharide Laktose, Maltose und Saccharose spalten. Die entstandenen Monomere (z. B. Glukose) können über verschiedene Transporter wie beispielsweise den natriumabhängigen Glukosetransporter SGLT-1 in die intestinalen Epithelzellen aufgenommen werden. Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels können zu Diabetes mellitus, Hyperinsulinämie oder Kohlenhydratmalabsorption führen (Berg *et al.*, 2018; Heinrich *et al.*, 2022). Es wurde sowohl eine Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase- und  $\alpha$ -Glukosidaseaktivität durch rote Fruchtsaftextrakte *in vitro* beobachtet als auch eine Abnahme des Blutglukosespiegels durch einmalige Aufnahme eines Aroniaextraktes *in vivo* (Berger *et al.*, 2020; Berger *et al.*, 2021). Eine erhöhte Glukosekonzentration im Blut wird als Hyperglykämie bezeichnet und als diagnostischer Parameter für Diabetes mellitus verwendet (Heinrich *et al.*, 2022). Ähnliche Effekte wurden auch in einer Humanstudie von Xiao *et al.* mit Probanden, die ein erhöhtes Risiko hatten an Diabetes zu erkranken, gezeigt. Die Aufnahme von roten Himbeeren bei einer Frühstücksmahlzeit reduzierte die postprandiale maximale Glukosekonzentration und die *incremental area under the curve* von Insulin im Blut über einen Zeitraum von zwei Stunden im Vergleich zur Kontrollmahlzeit ohne Himbeeren (Xiao *et al.*, 2019). Viele der protektiven Wirkungen von Früchten werden dabei den als sekundären Pflanzeninhaltsstoffen vorkommenden phenolischen Verbindungen zugeschrieben.

Neben einer Beeinflussung des Kohlenhydratmetabolismus durch Polyphenole wird auch ein Einfluss auf den **Lipidmetabolismus** diskutiert. Als Modell für *in vitro*-Untersuchungen des Lipidstoffwechsels werden entweder die humanen Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS)-Zellen oder die murinen 3T3-L1-Zellen angewandt. Little *et al.* beobachteten, dass sowohl Quercetin als auch Ferulasäure ( $c = 3 \times 1 \mu\text{M}$  pro 24 h) den Lipidgehalt in differenzierten SGBS-Zellen reduzierten und Quercetin die Freisetzung von Glycerin ins

Zellkulturmedium stimulierte (Little *et al.*, 2020). Weiterhin wurde in 3T3-L1-Zellen gezeigt, dass durch siebentägige Inkubation mit dem Anthocyan Delphinidin-3-glukosid ( $c = 25\text{--}100 \mu\text{g/mL}$ ) der Lipidstoffwechsel beeinflusst werden kann. Die Lipidakkumulation wurde in den Zellen signifikant reduziert, die Gen- und Proteinexpression von PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP 1 herunter- sowie die Proteinexpression von Sirt 1 hochreguliert (Park *et al.*, 2019). In anderen Studien wurde eine Inhibierung der cAMP-PDE-Aktivität *in vitro* durch Cyanidin-3-glukosid, einen polyphenolreichen Zitrusextrakt und Kaffeeextrakte sowie mit Einzelverbindungen erzielt (Dallas *et al.*, 2008; Montoya *et al.*, 2014). PDEs sind Enzyme, die cAMP sowie cGMP zu 5'-AMP bzw. 5'-GMP abbauen. Eine Inhibierung der PDEs führt zu einem Anstieg der cAMP- und cGMP-Spiegel und damit zur Induktion der Lipolyse (Nielsen *et al.*, 2014). Auch wurden im Rahmen von Humanstudien Hinweise darauf erhalten, dass Polyphenole positive Wirkungen auf den Fettstoffwechsel haben. Durch Traubensaft ( $c = 400 \text{ mL/d}$ ) konnte bei 35 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von  $69,5 \pm 7,0$  Jahren das Körpergewicht und der BMI signifikant reduziert werden (Costa *et al.*, 2017). In einer prospektiven Kohortenstudie mit 54.787 Dänen wurde eine inverse Korrelation zwischen der Flavonidaufnahme und der Körperfettmasse beobachtet (Bondonno *et al.*, 2021). Weiterhin konnte in einer Studie von Koutsos *et al.* mit Personen, die leicht erhöhte Gesamtcholesterinwerte aufwiesen, eine Abnahme des Cholesterinspiegels (gesamt und *low-density*-Lipoprotein (LDL)) durch Konsum von zwei Äpfeln pro Tag über acht Wochen gezeigt werden. Die Aufnahme entsprach einer Gesamtmenge an Polyphenolen von 990 mg/d (Koutsos *et al.*, 2020).



### 3. Problemstellung

Die zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen gehörenden Polyphenole sind in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt und weisen zahlreiche präventive Wirkungen im Menschen auf. Mittels epidemiologischer, *in vitro*-, aber auch *in vivo*-Studien wurde u. a. ein antioxidatives, anti-inflammatorisches und neuroprotektives Potential beobachtet (Banach *et al.*, 2020; Bobadilla *et al.*, 2021; Figueira *et al.*, 2019; Joseph *et al.*, 2014).

Da die Prävalenz von Adipositas seit vielen Jahren weltweit steigt, thematisieren zahlreiche wissenschaftliche Studien die Bedeutung des Ernährungsverhaltens zur Prävention von Übergewicht (World Health Organization, 2021). Im Rahmen des abgeschlossenen AiF-Projektes 18068 N wurden Hinweise darauf erhalten, dass durch anthocyanreichen Mischfruchtsaftkonsum die Fettmasse (FM) reduziert und die fettfreie Masse (FFM) bei gesunden Probanden erhöht werden kann (Bakuradze *et al.*, 2019a). Unklar blieb bisher allerdings weitgehend, um welchen molekularen Effekt es sich handelt und welche Inhaltsstoffe vor allem für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sind. Diese Fragestellung sollte in der vorliegenden Dissertation genauer untersucht werden.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des AiF-Projektes 20277 N mit dem Titel „Einfluss von Fruchtsaftinhaltsstoffen auf Biomarker des Lipidstoffwechsels“ in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Winterhalter (Technische Universität Braunschweig). Hauptziel des Projektes war es, den Einfluss von Fruchtsäften bzw. dessen Inhaltsstoffen auf Biomarker des Lipidstoffwechsels zu untersuchen. Zentrale Hypothese war hierbei, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe von Fruchtsäften (insbesondere von Buntsäften) in der Lage sind, regulierend in den Lipidstoffwechsel einzugreifen.

Die vorliegende Arbeit ist in drei Teile gegliedert, die sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen beinhalten.

Im ersten Teil (**Publikation 1**) wurden Extrakte aus Säften und Konzentraten von insgesamt acht verschiedenen Fruchtarten durch den Projektpartner an der Technischen Universität Braunschweig hergestellt und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisierung-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) charakterisiert. Die Fruchtarten umfassten Aronia, Cranberry, Heidelbeere, Holunder, Granatapfel, rote Traube, Sauerkirsche sowie schwarze Johannisbeere, die sich in ihren Anthocyan- und

Copigmentprofilen unterschieden. Die Extrakte wurden auf ihre inhibierende Wirkung im zellfreien, radiochemischen PDE 3B-Assay *in vitro* untersucht. Ziel war es, die drei aktivsten Extrakte zu identifizieren mit der stärksten Wirkung auf die PDE 3B-Inhibierung und damit auf den Lipidstoffwechsel. Weiterhin wurden ausgewählte Anthocyane im PDE 3B-Assay getestet, um erste Hinweise über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit (**Publikation 2**) sollten die drei wirksamsten Extrakte aktivitätsgeleitet fraktioniert und die Fraktionen *in vitro* getestet werden. Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung erfolgte durch den Projektpartner. Nach der Membranchromatographie und der Hexanfällung standen drei Polyphenolfractionen (Anthocyane, Copigmente und Polymere) zur Verfügung. Des Weiteren wurden zwei Copigmentfraktionen mittels *High-Speed Countercurrent Chromatography* (CCC) weiter subfraktioniert. Zur Testung der Fraktionen und Subfraktionen wurden die folgenden Methoden angewendet: Hemmung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen (*Oil-Red-O*-Färbung), Induktion der Lipolyse in 3T3-L1-Zellen (Lipolyse-Assay-Kit) sowie Inhibierung der PDE 3B-Aktivität (radiochemischer Assay). Ziel war es, die Inhaltsstoffe zu identifizieren, die molekularen Strukturen der bioaktiven Schlüsselkomponenten zu charakterisieren und die zellulären Wirkmechanismen aufzuklären.

Im dritten Teil dieser Arbeit (**Publikation 3**) sollte anschließend untersucht werden, ob die *in vitro* identifizierten Extrakte aus roten Fruchtsäften bzw. Konzentraten auch Einfluss auf Biomarker des Lipidstoffwechsels *in vivo* nehmen (*proof of concept*). Dazu wurde eine neunwöchige humane, placebokontrollierte Interventionsstudie mit gesunden, männlichen Probanden durchgeführt, bei der die Probanden täglich 750 mL ein Testgetränk, hergestellt aus den drei aktivsten Säften bzw. Konzentraten der *in vitro*-Untersuchungen, konsumierten. Als Biomarker zur Beurteilung der Wirksamkeit wurden an drei Untersuchungsterminen Blutlipide wie Gesamtcholesterin, *high-density*-Lipoprotein (HDL)- und LDL-Cholesterin, TAGs sowie Lipaseaktivität und PDE-Aktivität in Thrombozyten erfasst. Zusätzlich wurden Hunger- bzw. Sättigungshormone (Leptin und GLP-1) mittels *enzyme-linked immunosorbent* Assay (ELISA) und Harnsäuregehalte mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Außerdem wurden Körpergewicht und Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzmessung sowie die Energie- und Nährstoffaufnahme der Probanden mittels Ernährungsprotokollen (sieben Tage vor jedem Vor-Ort-Untersuchungstermin) erfasst.

## 4. Kumulativer Teil – Publikationen

Der folgende kumulative Teil dieser Arbeit ist in drei Teile bzw. Publikationen untergliedert. Alle Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Projektpartnerforschungsstelle von Prof. Dr. Peter Winterhalter an der Technischen Universität Braunschweig publiziert, welche die chemisch-strukturellen Arbeiten durchgeführt hat.

### 4.1. Publikation I „In Vitro Inhibition of Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts and Selected Anthocyanins“

#### 4.1.1. Zusammenfassung

PDEs sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen der *second messenger* cAMP und cGMP zu 5'-AMP bzw. 5'-GMP katalysieren. Es ist bekannt, dass bestimmte Lebensmittel und/oder deren Inhaltsstoffe die PDE-Aktivität inhibieren können. Dazu zählen beispielsweise Koffein, Flavonoide (Flavonole, Flavone, Anthocyane, Flavanone und Flavanole) oder auch Extrakte aus roter Traube (Beretz *et al.*, 1978; Boswell-Smith *et al.*, 2006; Dallas *et al.*, 2008; Dell'Agli *et al.*, 2005; Kuppusamy und Das, 1992; Montoya *et al.*, 2014; Röhrig *et al.*, 2017).

In der durchgeführten Studie wurden zunächst vom Projektpartner an der Technischen Universität Braunschweig 18 Extrakte aus anthocyanreichen Fruchtsäften und -konzentraten mittels des Adsorbentmaterials XAD7 hergestellt, deren Gesamtphenolgehalt bestimmt sowie das Anthocyan- und Copigmentprofil charakterisiert. Anschließend wurden die Extrakte sowie Reinsubstanzen *in vitro* auf ihre hemmende Wirkung mittels zellfreiem, radiochemischem PDE 3B-Assay untersucht.

Es zeigte sich, dass die Phenolgehalte zwischen  $39,8 \pm 1,5$  g GAE/100 g bei den Heidelbeerextrakten und  $73,5 \pm 4,8$  g GAE/100 g bei den Aroniaextrakten lagen. Während es sich bei den Anthocyanen häufig um Glykoside von Cyanidin handelte, wurden bei den Copigmenten Phenolsäuren wie Chlorogensäure (5-CQA) und Cumarsäure, Flavonole wie Quercetin- und Myricetinderivate sowie hydrolysierbare Tannine in den Granatapfelextrakten identifiziert. Im PDE 3B-Assay wurde bei allen Extrakten eine Inhibierung des Enzyms sowie eine konzentrationsabhängige und signifikante Reduktion der PDE 3B-Aktivität beobachtet.

Anhand der berechneten mittleren inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) wurde das potenteste PDE 3B-Inhibierungspotential mit den Extrakten aus Aronia, Heidelbeere, Granatapfel und Cranberry mit  $IC_{50}$ -Werten von 163–180  $\mu\text{g/mL}$  gezeigt, gefolgt von den Extrakten aus Sauerkirsche, Holunderbeere und schwarzer Johannisbeere ( $IC_{50} = 185\text{--}229 \mu\text{g/mL}$ ). Die geringste Inhibierung der PDE 3B-Aktivität wurde bei den roten Traubenextrakten ermittelt. Von den getesteten Anthocyanen als Reinsubstanzen konnte das stärkste Inhibierungspotential beim Aglykon Cyanidin beobachtet werden, gefolgt von Peonidin-3-glukosid und Cyanidin-3-arabinsid, wohingegen keine hemmende Wirkung bei den Cyanidindisacchariden gezeigt wurde.

Zusammenfassend konnte bei diesen *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl Extrakte aus roten Fruchtsäften und -konzentraten, die eine komplexe Mischung an phenolischen Inhaltsstoffen enthalten, als auch Reinsubstanzen einen hemmenden Einfluss auf die PDE 3B-Aktivität haben. Dabei scheinen die Substituenten am B-Ring, die glykosidisch gebundenen Zuckeranteile und die Molekülgröße das Inhibierungspotential zu beeinflussen. Das Aglykon Cyanidin zeigte die poteste Wirkung und Glykosylierung verringerte den inhibitorischen Effekt. Weiterhin wurde bei den Anthocyanen mit zwei Substituenten am B-Ring eine stärkere Inhibierung der PDE 3B-Aktivität beobachtet im Vergleich zu den Anthocyanen mit drei Substituenten am B-Ring (z. B. Petunidin-3-glukosid). Diese ersten Hinweise über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollten in weiteren Studien untersucht werden.

**Referenz:**

Göttel, C.; Niesen, S.; Daub, V.; Werle, T.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. In Vitro Inhibition of Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts and Selected Anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6934.

<https://doi.org/10.3390/ijms21186934>.

## 4.1.2. Veröffentlichtes Manuskript





International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

# In Vitro Inhibition of Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts and Selected Anthocyanins

Celina Göttel <sup>1</sup>, Sonja Niesen <sup>2</sup>, Vanessa Daub <sup>1</sup>, Theresa Werle <sup>1</sup>, Tamara Bakuradze <sup>1</sup>, Peter Winterhalter <sup>2</sup>  and Elke Richling <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Division of Food Chemistry and Toxicology, Department of Chemistry, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany; goettel@chemie.uni-kl.de (C.G.); VanessaY@t-online.de (V.D.); werle@rhrk.uni-kl.de (T.W.); bakuradze@chemie.uni-kl.de (T.B.)

<sup>2</sup> Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstraße 20, D-38106 Braunschweig, Germany; s.niesen@tu-braunschweig.de (S.N.); p.winterhalter@tu-braunschweig.de (P.W.)

\* Correspondence: richling@chemie.uni-kl.de; Tel.: +49-631-205-4061

Received: 12 August 2020; Accepted: 10 September 2020; Published: 21 September 2020



**Abstract:** Phosphodiesterases (PDEs) are essential enzymes for the regulation of pathways mediated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Secondary plant compounds like anthocyanins (ACs) can inhibit PDE activity and, consequently, may be beneficial for lipid metabolism. This study investigated 18 AC-rich juice extracts and pure reference compounds from red fruits for potential inhibitory effects on PDE 3B activity. Extracts were obtained through adsorption on Amberlite® XAD 7 resin. Based on this screening, the chokeberry, blueberry, pomegranate, and cranberry extracts were active, with half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) ranging from 163 ± 3 µg/mL to 180 ± 3 µg/mL. The ACs in these extracts, peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-arabinoside, were the most active single compounds (IC<sub>50</sub> = 56 ± 20 µg/mL, 108 ± 6 µg/mL). All extracts comprised high amounts of phenolic compounds, as determined by the Folin–Ciocalteu assay, ranging from 39.8 ± 1.5 to 73.5 ± 4.8 g gallic acid equivalents (GAE)/100 g extract. Pomegranate and chokeberry extracts exhibited the largest amounts of polyphenols (72.3 ± 0.7 g GAE/100 g, 70.6 ± 4.1 g GAE/100 g, respectively). Overall, our results showed that fruit juice extracts and their ACs can inhibit PDE activity. Any potential health benefits in vivo will be investigated in the future.

**Keywords:** phosphodiesterase; cyclic adenosine monophosphate; anthocyanins; red fruit juice; inhibition; HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>; Folin–Ciocalteu

## 1. Introduction

The increased prevalence of obesity has become a major health problem worldwide. Abnormal or excessive fat accumulation is associated with higher risk of cardiovascular disease, type II diabetes, and other diseases, including some forms of cancer. In 2016, 39% of the world's adult population was overweight and around 13% was obese [1].

Numerous polyphenols from fruits, including flavonoids like anthocyanins (ACs), have been studied extensively over recent decades because they mediate various biological effects [2]. ACs represent a class of secondary plant compounds that occur in many red fruits, such as cranberries, red grapes, black currants, and blueberries, and juices of the daily diet, where they contribute to their visual attractiveness. Total AC concentrations range considerably from 0.7 to 1480 mg/100 g of fresh weight in gooseberry and chokeberry, respectively [3]. The concentrations differ considerably, but the compositions of ACs in the fruits also vary. Six common aglycones (delphinidin, cyanidin, petunidin,

pelargonidin, peonidin, and malvidin) were identified in all AC-rich plants, but with various sugar moieties and acylation patterns [3,4]. The different concentrations and compositions are thought to depend on both internal and environmental factors: genetic and agronomic factors, cultivation conditions (light intensity, irrigation, and temperature), as well as processing and storage conditions, respectively [5].

Besides the ACs, the abovementioned fruits also contain so-called copigments—colorless phenolic compounds such as phenolic acids, flavonols, and proanthocyanidins that can stabilize the colored structural form of the ACs and enhance their color intensity through intermolecular interactions or shifts in maximum absorption [4]. Several studies showed that ACs and copigments possess antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties and are associated with numerous health benefits [6–12]. Reports also suggest that lipolytic activity can be influenced by polyphenols such as flavonoids and flavanones via inhibition of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-phosphodiesterase, as demonstrated by an increasing cAMP level [13,14]. Cyclic AMP activates protein kinase A, leading to increased phosphorylation, which, consequently, stimulates activation of hormone-sensitive lipase as well as perilipin 1 and promotes lipolysis. During lipolysis, triglycerides located in fat cells (adipocytes) are degraded, releasing free fatty acids (FFAs) and glycerol [15,16]. These FFAs are bound to plasma albumin and transported to the liver, kidney, skeletal muscle, or myocardium, where they are used as oxidative fuel [17].

Phosphodiesterases (PDEs) are enzymes that catalyze the hydrolysis of phosphodiester bonds in the second messengers cAMP and 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP), resulting in the nucleoside 5'-monophosphates adenosine monophosphate and guanosine monophosphate, respectively. Together with adenylate and guanylate cyclases, PDEs play a major role in regulating signaling mediated by cAMP and cGMP. Compounds that can selectively inhibit PDEs are attractive for pharmaceutical research because PDE inhibition causes various beneficial physiological effects [18,19]. Certain constituents originating from foods can inhibit PDE. For example, caffeine was already recognized as a nonspecific inhibitor at the time of PDE discovery [20,21]. In addition, some classes of flavonoids (flavonols, flavones, ACs, flavanones, and flavanols) have shown PDE-inhibiting potential in several test systems [13,14,22–25]. The inhibitory effects of polyphenol-rich foods on PDE inhibition was demonstrated by inhibition of human cGMP-specific PDEs using red wine and grape skin extracts; this experiment was conducted using COS-7 cells that expressed the full-length cDNA of PDE 5A1 [26].

In the present study, we investigated the influence of 18 AC-rich fruit juice extracts obtained from pomegranates (*Punica granatum* L.; PG), blueberries (*Vaccinium myrtillus*; BB), cranberries (*Vaccinium macrocarpon*; CB), chokeberries (*Aronia melanocarpa*; CkB), black currants (*Ribes nigrum*; BC), elderberries (*Sambucus nigra*; EB), sour cherries (*Prunus cerasus*; SC), and red grapes (*Vitis vinifera*; RG) using a cell-free radiochemical cAMP PDE activity assay. The extracts were generated using Amberlite® XAD 7 adsorbent resin, and their AC and copigment profiles were analyzed using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>) analyses. Furthermore, we investigated the effects of selected ACs on PDE activity to identify PDE-inhibiting compounds that may influence lipid metabolism in vivo. Additionally, the total amounts of phenolic compounds in the extracts were determined using the Folin–Ciocalteu assay [27].

## 2. Results

Eighteen fruit products, including pure fruit juices (not from concentrate (NFC)) and concentrates (juice concentrate (JC)), derived from pomegranates (PG1, PG2), blueberries (BB1, BB2), cranberries (CB1, CB2), chokeberries (CkB1, CkB2), black currants (BC1, BC2), elderberries (EB1, EB2), sour cherries (SC1, SC2, SC3), and red grapes (RG1, RG2, RG3) were subjected to extraction using Amberlite® XAD 7 and the extracts were tested in vitro.

2.1. HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> Analysis

Tables 1 and 2 show the major ACs and copigments identified in the extracts of the eight fruit varieties. A wide spectrum of AC-glycosides was identified in the extracts from the fruit juices, including glycosides of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin. The selection of the major compounds is based on peak areas in the UV/Vis chromatogram. A complete list of all the anthocyanins detected is given in the Figures S1–S8, Tables S1, S3, S5, S7, S9, S11, S13 and S15.

**Table 1.** Major anthocyanins in the extracts of chokeberry, cranberry, pomegranate, blueberry, elderberry, red grape, sour cherry, and black currant identified in this study using (a) HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analysis and authentic references or (b) tentatively identified using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analysis and literature data. For details, see the Materials and Methods section, Section 4.3.

Red Fruit	Number of Anthocyanins Identified	Major Anthocyanins	[M + H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z
chokeberry	6	Cyanidin-3-galactoside <sup>(a)</sup>	449	287
		Cyanidin-3-arabinoside <sup>(a)</sup>	419	287
cranberry	7	Peonidin-3-galactoside <sup>(b)</sup>	463	301
		Cyanidin-3-galactoside <sup>(b)</sup>	449	287
pomegranate	4	Cyanidin-3,5-diglucoside <sup>(b)</sup>	611	287
		Cyanidin-3-glucoside <sup>(a)</sup>	449	287
blueberry	14	Peonidin-3-galactoside <sup>(b)</sup>	463	301
		Cyanidin-3-galactoside <sup>(a)</sup>	449	287
elderberry	4	Cyanidin-3-sambubioside <sup>(b)</sup>	581	287
red grape	21	Malvidin-3-glucoside <sup>(a)</sup>	493	331
		Peonidin-3-glucoside <sup>(a)</sup>	463	301
sour cherry	4	Cyanidin-3-(2G-glucosylrutinoside) <sup>(b)</sup>	757	287
		Cyanidin-3-rutinoside <sup>(b)</sup>	595	287
black currant	5	Cyanidin-3-rutinoside <sup>(b)</sup>	595	287
		Delphinidin-3-rutinoside <sup>(b)</sup>	611	303

The copigments identified included different types of phenolic compounds, such as flavonols (quercetin, myricetin, isorhamnetin), phenolic acids (chlorogenic acid, coumaric acid), and hydrolysable tannins (polymeric esters of gallic acid and sugars). A complete list of all the copigments detected is given in Figures S1–S8, Tables S2, S4, S6, S8, S10, S12, S14 and S16.

**Table 2.** Major copigments identified in the extracts of chokeberry, cranberry, pomegranate, blueberry, elderberry, red grape, sour cherry, and black currant identified in this study using (a) HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analysis and authentic references or (b) tentatively identified using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analysis and literature data. For details, see the Materials and Methods section, Section 4.3.

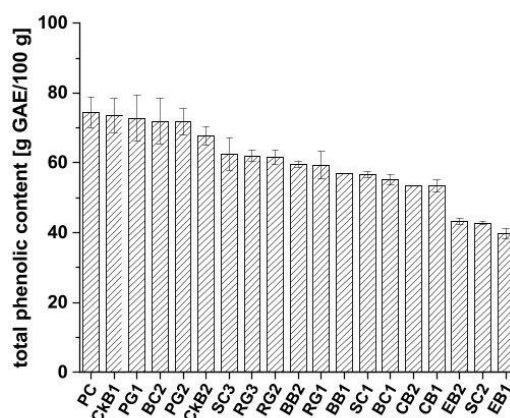
Red Fruit	Number of Copigments Identified	Major Copigments	[M – H] <sup>−</sup> m/z	Fragments m/z
chokeberry	10	Chlorogenic acid <sup>(a)</sup>	353	191, 179, 161
		Neochlorogenic acid <sup>(a)</sup>	353	191, 179, 135
cranberry	26	Quercetin-hexoside <sup>(b)</sup>	463	301
		Myricetin-hexoside <sup>(b)</sup>	479	316
pomegranate	28	Pedunculagine <sup>(b)</sup>	783	301
		Punicalagin <sup>(a)</sup>	1083	601

Table 2. Cont.

Red Fruit	Number of Copigments Identified	Major Copigments	[M – H] <sup>−</sup> m/z	Fragments m/z
blueberry	17	Chlorogenic acid <sup>(a)</sup>	353	191
		Cumaryliridoid <sup>(b)</sup>	535	371
		Quercetin-hexoside <sup>(b)</sup>	463	301
elderberry	10	Quercetin-3-rutinoside <sup>(a)</sup>	609	301
		Quercetin-3-glucoside <sup>(a)</sup>	463	301
red grape	9	Isorhamnetin-hexoside <sup>(b)</sup>	479	316
		Quercetin-hexoside <sup>(b)</sup>	463	301
sour cherry	10	Quercetin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinoside) <sup>(b)</sup>	771	301
		Quercetin-3-rutinoside <sup>(a)</sup>	609	301
black currant	11	Isorhamnetin-rutinoside <sup>(b)</sup>	625	317

## 2.2. The Folin–Ciocalteu Assay

The total phenolic content in fruit juice extracts from pomegranates (PG1, PG2), blueberries (BB1, BB2), cranberries (CB1, CB2), chokeberries (CkB1, CkB2), black currants (BC1, BC2), elderberries (EB1, EB2), sour cherries (SC1, SC2, SC3), and red grapes (RG1, RG2, RG3) was determined using the Folin–Ciocalteu assay. Gallic acid was used for calibration (gallic acid equivalents (GAE)) and ascorbic acid for the positive control (PC). The total phenolic content of each extract is presented in Figure 1.

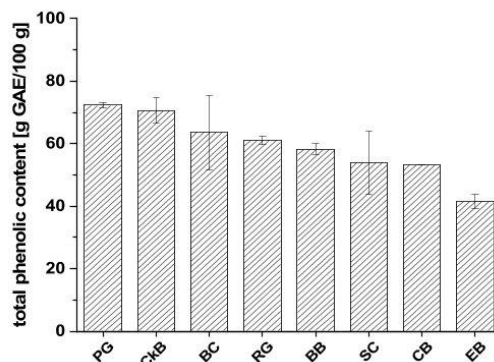


**Figure 1.** Total phenolic content of different extracts from chokeberry (CkB), cranberry (CB), pomegranate (PG), blueberry (BB), elderberry (EB), red grape (RG), sour cherry (SC), and black currant (BC) defined as gallic acid equivalents (g GAE/100g ± SD), compared to the positive control (PC), ascorbic acid.

All the fruit juice extracts examined showed high phenolic content, ranging from 39.8 to 73.5 g GAE/100 g of extract. The positive control, ascorbic acid (74.5 ± 4.3 g GAE/100 g), showed slightly higher phenolic content than the extracts from CkB1 (73.5 ± 4.9 g GAE/100 g) and PG1 (72.8 ± 6.7 g GAE/100 g). In comparison, the phenolic contents of extracts CkB2 and PG2 were 67.7 ± 2.7 g GAE/100 g and 71.8 ± 3.8 g GAE/100 g, respectively. BC2 extract also showed high total phenolic content (71.9 ± 6.5 g GAE/100 g). The following juice extracts exhibited phenolic contents in the medium range: SC3 (62.5 ± 4.7 g GAE/100 g), RG3 (61.9 ± 1.6 g GAE/100 g), RG2 (61.6 ± 2.0 g GAE/100 g), BB2



(59.5 ± 0.8 g GAE/100 g), RG1 (59.4 ± 3.8 g GAE/100 g), BB1 (57.0 ± 0.0 g GAE/100 g), SC1 (56.6 ± 0.8 g GAE/100 g), BC1 (55.2 ± 1.4 g GAE/100 g), CB2 (53.4 ± 0.0 g GAE/100 g), and CB1 (53.3 ± 1.7 g GAE/100 g). The lowest total phenolic content was found in EB2 (43.2 ± 0.9 g GAE/100 g), SC2 (42.8 ± 0.5 g GAE/100 g), and EB1 (39.8 ± 1.5 g GAE/100 g). For a better overview and comparison of the polyphenolic contents of the extracts, the average polyphenol contents were calculated from the data for each single fruit variety. The results are shown in Figure 2.



**Figure 2.** The average total phenolic contents of fruit juice extracts from chokeberry (CkB), cranberry (CB), pomegranate (PG), blueberry (BB), elderberry (EB), red grape (RG), sour cherry (SC), and black currant (BC) defined as gallic acid equivalents (g GAE/100 g ± SD).

Extracts of PG (72.3 ± 0.7 g GAE/100 g), CkB (70.6 ± 4.1 g GAE/100 g), and BC (63.5 ± 11.7 g GAE/100 g) showed the highest total phenolic contents, followed by RG (61.0 ± 1.4 g GAE/100 g) and BB (58.4 ± 1.8 g GAE/100 g). The lowest total phenolic contents were found in SC (53.9 ± 10.1 g GAE/100 g), CB (53.3 ± 0.1 g GAE/100 g), and EB (41.5 ± 2.4 g GAE/100 g). Most of the fruit extract varieties had mean phenolic content values with small standard deviations; the BC and SC juice extracts were the exceptions. A possible explanation could be that there are significant differences between the types of BC and SC which we studied or that the fruits originated from cultivation regions with different environmental and/or climatic conditions.

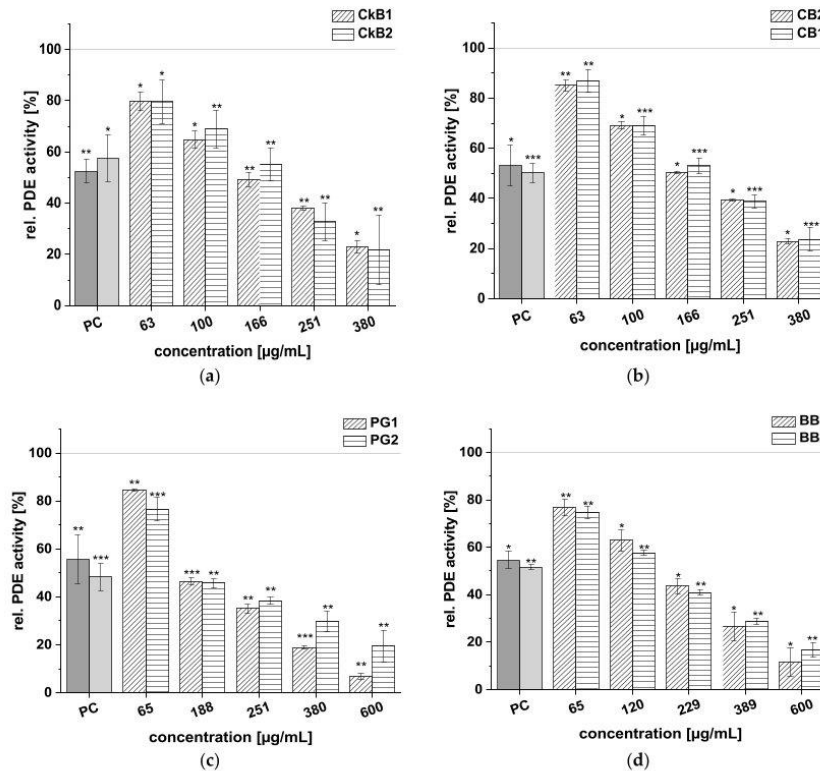
### 2.3. Inhibitory Effects of Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts on PDE 3B Activity In Vitro

The 18 extracts from red fruit juices or concentrates were tested for their ability to inhibit cAMP-specific PDE 3B activity in vitro. Data are presented as relative (rel.) PDE activity in percentage of the solvent control (2.5% dimethyl sulfoxide). Caffeine (1.21 mM), a well-known nonspecific PDE 3 inhibitor, was used as the positive control (PC) in this assay since it inhibited PDE activity by around 50% at a concentration of 1.21 mM.

The test results for the following extracts are presented in Figure 3: CkB1, CkB2, CB1, CB2, PG1, PG2, BB1, and BB2. Two different extracts from each fruit variety were tested to investigate potential differences between the PDE activity of extracts from the same fruit. All these fruit juice extracts showed significant, dose-dependent inhibition of the enzyme PDE 3B in vitro. For most of the fruit varieties, the PDE activities of the different juice extracts were in the same range.

Rel. PDE 3B activities of around 80% were shown by the CkB1 and CkB2 extracts ( $c = 63 \mu\text{g/mL}$ ); the highest concentrations of these extracts ( $c = 380 \mu\text{g/mL}$ ) decreased PDE activity to  $22.9 \pm 2.2\%$  and  $21.7 \pm 13.5\%$ , respectively, compared to the solvent control (Figure 3a). At the  $166 \mu\text{g/mL}$  concentration, the two CkB extracts showed levels of activity comparable to the PC caffeine (around 50% PDE activity). A similar effect was observed for the two CB extracts (Figure 3b).

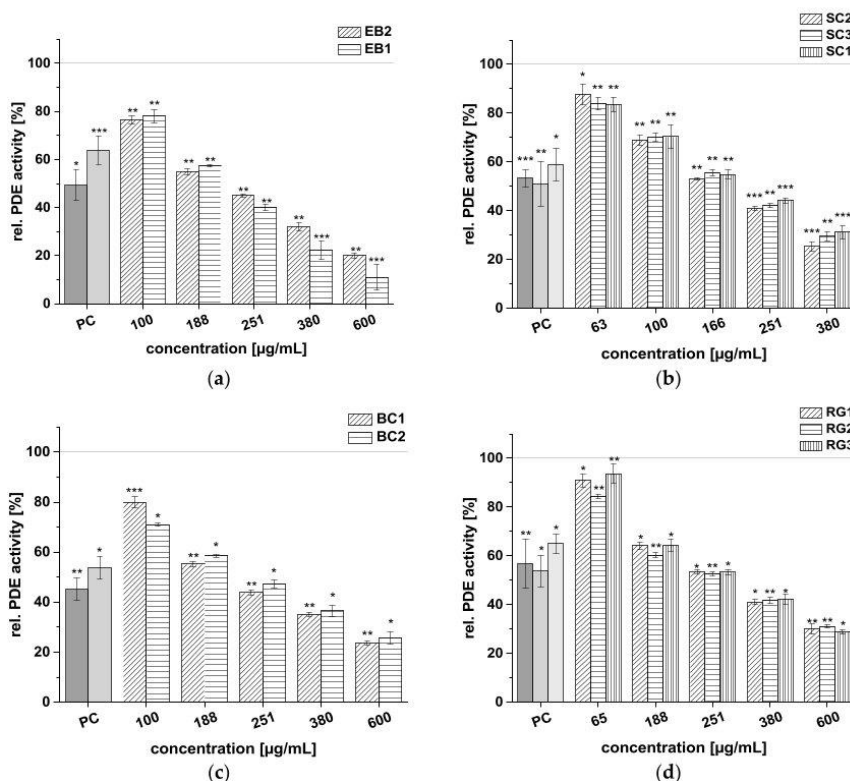
The PG extracts showed reduced activity of the PDE 3B enzyme when compared to the solvent control. At the highest concentration tested ( $c = 600 \mu\text{g/mL}$ ), the PG1 extract showed a stronger inhibitory effect on PDE activity ( $6.7 \pm 1.2\%$ ) than the PG2 extract ( $19.5 \pm 6.6\%$ ; Figure 3c). Furthermore, incubation of PDE 3B with the two BB extracts led to diminished impact of both the BB1 ( $11.6 \pm 6.1\%$ ) and BB2 ( $16.7 \pm 3.0\%$ ) extracts on PDE activity at the highest concentration tested ( $c = 600 \mu\text{g/mL}$ ), compared to the solvent control (Figure 3d). All the extracts of CkB, CB, PG, and BB demonstrated similar trends in PDE inhibition, ranging from around 20% to 80%.



**Figure 3.** Results for tests of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) activity after incubation each with two chokeberry (CkB1, CkB2) (a), cranberry (CB1, CB2) (b), pomegranate (PG1, PG2) (c), and blueberry (BB1, BB2) (d) extracts. Positive control (PC) was caffeine (1.21 mM). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in percentage of solvent control) as mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Test results for the following extracts are presented in Figure 4: EB1, EB2, SC1, SC2, SC3, BC1, BC2, RG1, RG2, and RG3. These fruit juice extracts also showed significant, dose-dependent inhibition of PDE activity, but the effects were less pronounced than the extracts from CkB, CB, PG, and BB shown in Figure 3. Extracts EB1 and EB2 both displayed concentration-dependent reduction of PDE enzyme activity (Figure 4a). At the highest concentration tested ( $c = 600 \mu\text{g/mL}$ ), the EB1 extract was more potent than the EB2 extract, as demonstrated by a lower rel. PDE activity of  $11.0 \pm 5.2\%$  for EB1 compared to  $20.1 \pm 1.0\%$  for EB2. The three SC extracts inhibited PDE activity compared to

the control, with activity levels ranging between  $25.3 \pm 2.0\%$  and  $31.3 \pm 2.7\%$  at a concentration of  $380 \mu\text{g/mL}$  (Figure 4b). The two BC extracts reduced PDE activity significantly at all concentrations tested ( $c = 100\text{--}600 \mu\text{g/mL}$ ), and, at a concentration of  $251 \mu\text{g/mL}$ , the effect of both extracts on PDE activity was comparable to that of caffeine (around 50% PDE activity; Figure 4c). The three RG extracts (RG1, RG2, RG3) showed the weakest impact on PDE 3B activity of all the fruit extracts. Nevertheless, PDE activity after treatment with the RG extracts also diminished in a concentration-dependent manner, and minimum activity of around 30% was observed at the highest concentration tested ( $600 \mu\text{g/mL}$ ; Figure 4d).



**Figure 4.** Results for tests of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) activity after incubation with elderberry (EB1, EB2) (a), sour cherry (SC1, SC2, SC3) (b), black currant (BC1, BC2) (c), and red grape (RG1, RG2, RG3) (d) extracts. Positive control (PC) was caffeine (1.21 mM). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in percentage of solvent control) as mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Based on the results of these PDE 3B activity assays, a half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was calculated for each of the 18 fruit juice extracts investigated. These  $IC_{50}$  values are presented in Table 3. The CkB extracts were the most active of the tested samples, exhibiting  $IC_{50}$  values between  $163 \pm 3 \mu\text{g/mL}$  and  $167 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ . The BB and PG extracts demonstrated comparable inhibitory potential. The CB extracts revealed near-similar effects against PDE 3B ( $IC_{50} = 175 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ – $180 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ ). All extracts of CkB, BB, PG, and CB showed  $IC_{50}$  values less

than 200  $\mu\text{g/mL}$ , whereas greater  $\text{IC}_{50}$  values were determined for extracts of SC (SC1, SC2, SC3), followed by EB (EB1, EB2) and BC (BC1, BC2).  $\text{IC}_{50}$  values from the extracts of SC, EB, and BC ranged from  $185 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  to  $229 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ . The three RG extracts were the least active among all tested samples ( $\text{IC}_{50} = 276 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ – $292 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ ).

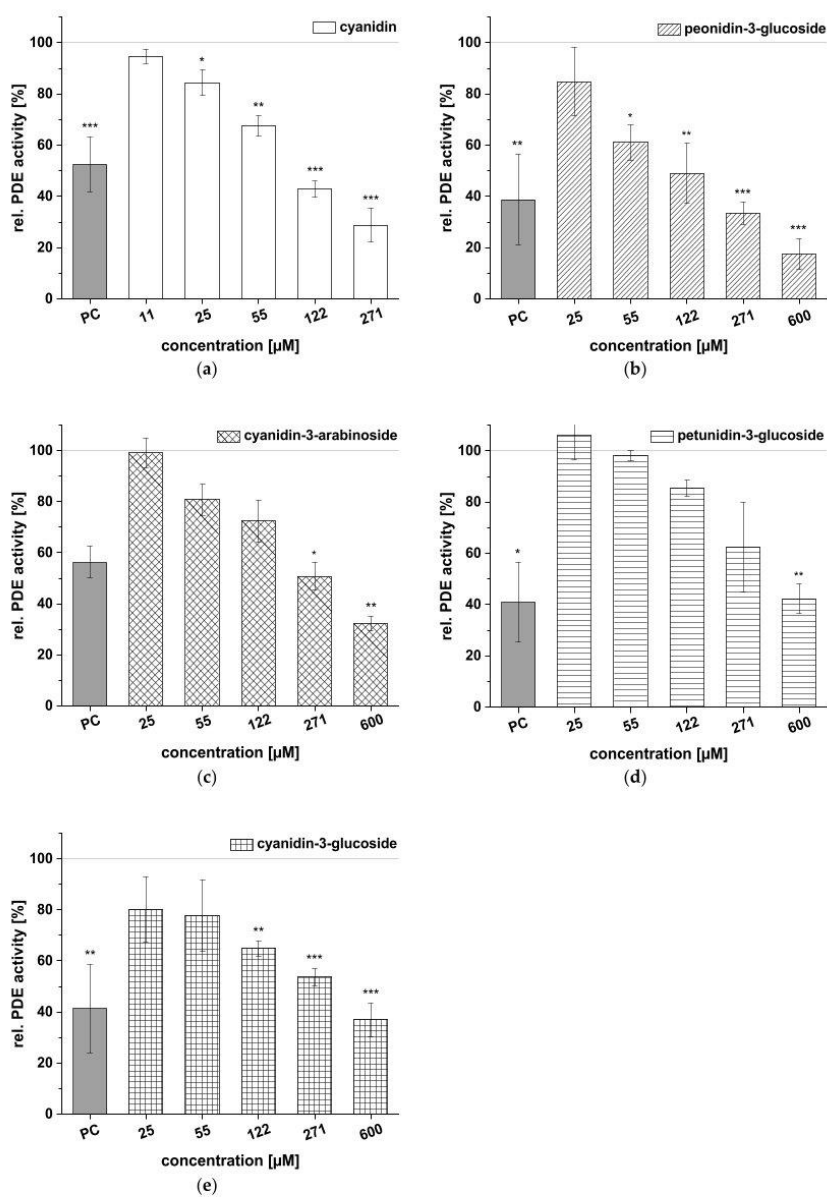
**Table 3.** Half-maximal inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) of the 18 different juice extracts tested using the PDE activity assay. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ – $4$ ). JC (juice concentrate), NFC (not from concentrate).

Extract	Abbreviation	Product	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
chokeberry	CkB1	JC	$163 \pm 3$
	CkB2	JC	$167 \pm 5$
blueberry	BB1	JC	$174 \pm 3$
	BB2	NFC	$165 \pm 2$
pomegranate	PG1	JC	$169 \pm 2$
	PG2	JC	$174 \pm 1$
cranberry	CB1	JC	$175 \pm 1$
	CB2	JC	$180 \pm 3$
sour cherry	SC1	NFC	$185 \pm 1$
	SC2	JC	$195 \pm 2$
	SC3	JC	$200 \pm 2$
elderberry	EB1	JC	$222 \pm 3$
	EB2	JC	$206 \pm 2$
black currant	BC1	NFC	$212 \pm 1$
	BC2	JC	$229 \pm 3$
red grape	RG1	JC	$290 \pm 2$
	RG2	NFC	$276 \pm 2$
	RG3	JC	$292 \pm 3$

#### 2.4. Inhibitory Effects of Selected Anthocyanins on PDE 3B Activity In Vitro

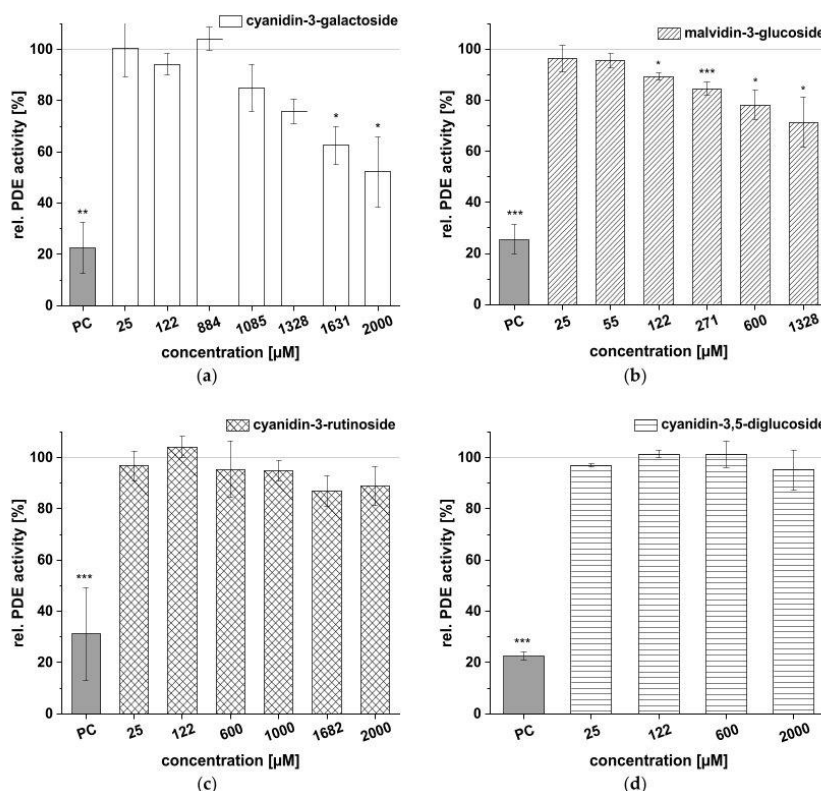
We tested the following eight commercially available ACs to obtain deeper insight into the inhibitory potential of extract constituents on PDE 3B: peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, petunidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, malvidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, and cyanidin-3,5-diglucoside. We also tested the aglycon cyanidin to evaluate whether the effects on PDE 3B activity could be linked to the presence of ACs and to obtain structural information required for determining the efficacy of PDE 3B inhibition. Data are presented as rel. PDE activity in percent of the solvent control (dimethyl sulfoxide). Caffeine was used as the PC.

The results of the evaluations of aglycon cyanidin and four ACs, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, petunidin-3-glucoside, and cyanidin-3-glucoside, on PDE activity are presented in Figure 5. All five compounds showed dose-dependent inhibition of the enzyme PDE 3B compared to the solvent control (100%). Cyanidin reduced PDE 3B activity in a dose-dependent manner from  $94.7 \pm 2.8\%$  at the lowest tested concentration ( $c = 11 \mu\text{M}$ ) to  $28.7 \pm 6.5\%$  ( $c = 271 \mu\text{M}$ ; Figure 5a). Peonidin-3-glucoside produced a similar effect, significantly diminishing the PDE activity at concentrations above  $55 \mu\text{M}$  and showing impacts on PDE activity levels at a concentration of  $271 \mu\text{M}$  that were comparable to those seen with caffeine (Figure 5b). Furthermore, when PDE was incubated with cyanidin-3-arabinoside, PDE activity was reduced to  $32.3 \pm 2.9\%$  ( $c = 600 \mu\text{M}$ ) of the solvent control (Figure 5c). The PDE activity (around 40%) of petunidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside at the  $600 \mu\text{M}$  concentration was in the same range (Figure 5d,e). Reduced PDE activities, compared to the solvent control, were already being detected with concentrations ranging from  $25$  to  $271 \mu\text{M}$  of cyanidin-3-glucoside than of petunidin-3-glucoside. Generally, the aglycon cyanidin was found to be a more potent PDE inhibitor than its conjugated form.



**Figure 5.** Results for tests of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) activity after incubation with cyanidin (a), peonidin-3-glucoside (b), cyanidin-3-arabinoside (c), petunidin-3-glucoside (d), and cyanidin-3-glucoside (e). Positive control (PC) was caffeine. Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in percentage of solvent control) as mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Test results for the ACs cyanidin-3-galactoside, malvidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, and cyanidin-3,5-diglucoside are illustrated in Figure 6. Cyanidin-3-galactoside had no influence on PDE activity at levels below 884  $\mu\text{M}$  (Figure 6a), but effects were observed at higher concentrations (1085–2000  $\mu\text{M}$ ;  $52.3 \pm 13.7\%$  PDE activity;  $c = 2000 \mu\text{M}$ ). Malvidin-3-glucoside effects on PDE activity were concentration-dependent, with a minimum PDE activity of  $71.4 \pm 9.7\%$  observed at a concentration of 1328  $\mu\text{M}$  (Figure 6b). Cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3,5-diglucoside ( $c = 25\text{--}2000 \mu\text{M}$ ) proved inactive, with no influence on PDE activity at any of the tested concentrations (Figure 6c,d).



**Figure 6.** Results for tests of cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) activity after incubation with cyanidin-3-galactoside (a), malvidin-3-glucoside (b), cyanidin-3-rutinoside (c), and cyanidin-3,5-diglucoside (d). Positive control (PC) was caffeine. Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in percentage of solvent control) as mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

We calculated the  $\text{IC}_{50}$  values of the ACs that we evaluated based on the results of the PDE activity assay summarized in Table 4. Cyanidin, the only aglycon tested, was the most potent inhibitor, with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $105 \pm 11 \mu\text{M}$ , followed by peonidin-3-glucoside ( $\text{IC}_{50} = 120 \pm 44 \mu\text{M}$ ). Furthermore, when PDE was incubated with cyanidin-3-araboside and cyanidin-3-glucoside,  $\text{IC}_{50}$  values between  $257 \pm 13 \mu\text{M}$  and  $299 \pm 56 \mu\text{M}$  were calculated. Petunidin-3-glucoside showed a weaker effect on

PDE inhibition, with an  $IC_{50}$  value of  $448 \pm 39 \mu\text{M}$ , and no  $IC_{50}$  values could be calculated for cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3,5-diglucoside, and malvidin-3-glucoside.

**Table 4.** Half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of cyanidin and anthocyanins (ACs). Results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 3-4$ ). n.d. = not determined due to weak inhibitory effects.

Anthocyanin/Anthocyanidin	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
cyanidin	$105 \pm 11$
peonidin-3-glucoside	$120 \pm 44$
cyanidin-3-arabinoside	$257 \pm 13$
cyanidin-3-glucoside	$299 \pm 56$
petunidin-3-glucoside	$448 \pm 39$
cyanidin-3-galactoside	n.d.
cyanidin-3-rutinoside	n.d.
cyanidin-3,5-diglucoside	n.d.
malvidin-3-glucoside	n.d.

### 3. Discussion

The aim of this work was to determine whether AC-rich fruit juice extracts and ACs present in the respective extracts could inhibit PDE 3B enzyme activity in vitro. Additionally, we analyzed the extracts using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> and determined their total phenolic contents using Folin-Ciocalteu assay.

Total phenolic content of each extract was determined using the Folin-Ciocalteu assay, an established method for quantifying phenolics in different areas of food research [28]. All extracts of interest showed high total phenolic content, ranging from 39.8 to 73.5 g GAE/100 g of extract.

We must consider that the Folin-Ciocalteu assay measures all reducing compounds and not phenolic compounds specifically [28]. Moreover, gallic acid was used as a reference and calibration standard; therefore, the results for the extracts are not absolute values and should be regarded as approximate values for comparing the contents of extracts from the same fruit. We determined that the extract contents of the fruit juices that we investigated were 0.4 g/100 mL of the CB, RG, and SC juices, around 0.6 g/100 mL in the PG and BB juices, and up to 1.4 g/100 mL in the EB and CkB juices. Moreover, the total phenolic contents of the juices ranged between 0.2 and 0.5 g/100 mL, with the CkB juice extract showing up to 1 g/100 mL of total phenolic content. This last finding corresponds with studies by Esatbeyoglu et al. [29], who focused on the composition of the phenolic components in CkB juices.

All tested red fruit juice extracts exhibited dose-dependent PDE 3B inhibition. Of the extracts tested, CkB, PG, BB, and CB demonstrated the strongest PDE inhibition. In fact, at a concentration of 380  $\mu\text{g/mL}$ , the CkB, PG, BB, and CB extracts inhibited PDE activity by around 80% (Figure 3). Based on the  $IC_{50}$  values of these extracts, the strength of the fruit extract inhibitory activity was ranked as follows: CkB > BB  $\approx$  PG > CB > SC > EB > BC >> RG.

Not much research has been conducted on the influence of AC-rich fruit extracts on PDE inhibition. However, one report demonstrated that a polyphenolic citrus extract (a mixture of red orange, grapefruit, and orange) was a potent inhibitor (97% inhibition) of phosphodiesterase 3',5'-cyclic nucleotide 5' nucleotidohydrolase [14]. Another study revealed that a Cabernet Sauvignon wine (containing 31.4 mg/L ACs) reduced human PDE 5A1 activity to  $78.8 \pm 2.0\%$ , and grape skin extracts reduced PDE 5A1 activity to between  $73.6 \pm 5.9\%$  and  $85.7 \pm 3.5\%$  compared to the control, which had a concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$  (calculated as total phenols) [26].

In our study, we observed PDE 3B activity of  $84.4 \pm 0.8\%$  due to the RG2 extract at a concentration of 65  $\mu\text{g/mL}$ , which is comparable to the findings of the abovementioned study [26]. In addition, Röhrig and coworkers tested the following polyphenol-rich extracts on PDE isolated from the lung tumor xenograft cell line LXFL529L: artichoke (*Cynara scolymus*) extract, which had a significant inhibitory influence on PDE activity ( $IC_{50} = 0.9 \pm 0.1 \text{ mg/mL}$ ); the flavones luteolin ( $IC_{50} = 41 \pm 10 \mu\text{M}$ ) and 3,4-dicaffeoylquinic acid ( $IC_{50} > 1.0 \text{ mM}$ ), and strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*) extract, which

showed no inhibitory effect on PDE at levels below 5 mg/mL. A plausible explanation for the lack of inhibition by the strawberry tree extract could be low AC content [25], as strawberry tree fruit has an AC content of only 0.51 mg per 100 g of fresh fruit [30].

We tested the following eight commercially available ACs to evaluate their effects on PDE 3B activity in connection with their presence in the extracts, as well as to obtain structural information required for the efficacy on PDE 3B: peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, petunidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, malvidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, and cyanidin-3,5-diglucoside. In addition, the aglycon cyanidin was included in this test series.

Cyanidin was the most potent PDE 3B inhibitor in our study, with an  $IC_{50}$  value of  $105 \pm 11 \mu\text{M}$ . Marko and coworkers reported cyanidin-induced inhibition of cytosolic PDE activity in HT29 cells ( $IC_{50} \approx 175 \mu\text{M}$ ) [22]. Furthermore, our results showed that peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, cyanidin-3-glucoside, and petunidin-3-glucoside showed potential for inhibiting PDE, with  $IC_{50}$  values ranging between  $120 \pm 44 \mu\text{M}$  and  $448 \pm 39 \mu\text{M}$ . No  $IC_{50}$  values could be determined for cyanidin-3-galactoside, malvidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, and cyanidin-3,5-diglucoside due to their weak inhibitory effects. Cyanidin-3-glucoside inhibited PDE 3B by 63% at a concentration of 600  $\mu\text{M}$ . Earlier publications reported that cyanidin-3-glucoside (diluted to 0.01% in dimethyl sulfoxide) resulted in 99% PDE inhibition [14].

We demonstrated that the aglycon cyanidin ( $IC_{50} = 105 \pm 11 \mu\text{M}$ ) and the cyanidin-monoglycosides ( $IC_{50} = 120 \pm 44 \mu\text{M}$ – $448 \pm 39 \mu\text{M}$ ) are more potent PDE inhibitors than cyanidin-disaccharides (no  $IC_{50}$  determinable). Previous investigations reported that the aglycon malvidin ( $IC_{50} = 24.9 \mu\text{M}$ ) was the most potent inhibitor of PDE 5A1 and that glucosylation diminished its inhibitory effect (malvidin-3-glucoside  $IC_{50} = 35.4 \mu\text{M}$ ) [26].

The ACs that we tested possessed different sugar moieties and aglycon substitution patterns. We investigated the influence of the aglycon on the levels of PDE inhibition using the following ACs: cyanidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, and petunidin-3-glucoside. Based on their  $IC_{50}$  values, these ACs ranked as follows: peonidin-3-glucoside < cyanidin-3-glucoside < petunidin-3-glucoside < malvidin-3-glucoside. The number of hydroxy or methoxy groups on the B-ring obviously influences inhibitory potential. Peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside ( $IC_{50}$  of  $120 \pm 44 \mu\text{M}$  and  $299 \pm 56 \mu\text{M}$ , respectively) each carry two substituents (hydroxy or methoxy groups) on the B-ring and have greater potential for PDE inhibition than the ACs with three B-ring substituents (petunidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside;  $IC_{50} = 448 \pm 39 \mu\text{M}$  and not determined). The additional B-ring substituent leads to larger molecule size, which might cause steric hindrance, resulting in a poor fit of these ACs into the PDE 3B binding pocket.

Inconsistent with our findings, a previously published report showed that glucosides and aglycons both inhibited human PDE 5A1 activity in the following order of potency: malvidin > peonidin = delphinidin > petunidin > pelargonidin = cyanidin [26]. Comparable to these results, Marko and coworkers showed the structure-based impact of anthocyanidins on the inhibition of cytosolic PDE activity in HT29 cells, which could be summarized as follows: malvidin > peonidin > pelargonidin  $\approx$  cyanidin > delphinidin. The authors concluded that the inhibitory potential of anthocyanidins on PDE increases with an increasing number of methoxy groups [22]. This observation could not be confirmed by our results. In fact, we found that malvidin-3-glucoside was the weakest inhibitor of PDE 3B.

The disparities among the studies could be due to the different test systems used (HT29 cells, human recombinant PDE 5A1 isoform prepared by expressing the full-length PDE 5A1 cDNA into COS-7 cells, or cell-free). In cells, the presence of various enzymes leads to metabolization of the ACs, which could explain the varying observations. In addition, Marko and coworkers only examined the aglycons, while, in this work, the respective anthocyanin-3-monoglucosides were also examined to determine their potential for PDE 3B inhibition. ACs and their respective aglycons might be unstable under certain conditions, and their degradation products might contribute to their inhibitory effects on PDE activity as well. Published literature reports the stability of selected ACs and cyanidin



under cell culture conditions. Anthocyanidins proved to be highly unstable in cell culture medium compared to their respective glycosides. ACs are more stable than anthocyanidins, and the resulting degradation products may contribute to their inhibitory effects. For example, cyanidin degraded rapidly in cell culture medium and the corresponding phenolic acid, protocatechuic acid, was formed asynchronously [8].

In the study presented, we demonstrated that red fruit juice extracts and their ACs could affect PDE activity. Since the tested fruits also contain copigments that can stabilize the colored structural form of the ACs and enhance their color intensity through intermolecular interactions or shifts in maximum absorption [4], we analyzed the ACs and copigment profiles of each extract (Tables 1 and 2) to correlate the effects of each extract with its phenolic composition.

The CkB extracts proved the most potent inhibitors ( $IC_{50} = 163 \pm 3 \mu\text{g/mL}$  and  $167 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ) and contained mostly cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside. The potential of the CkB extracts for PDE 3B inhibition might be linked to cyanidin-3-arabinoside, which has an  $IC_{50}$  value of  $108 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ . The PG extracts mainly contained cyanidin-3,5-diglucoside and cyanidin-3-glucoside. This study found no effect of cyanidin-3,5-diglucoside on PDE, but cyanidin-3-glucoside showed strong inhibitory potential ( $IC_{50} = 134 \pm 25 \mu\text{g/mL}$ ) and could possibly contribute to the inhibitory effects of the PG1 and PG2 extracts ( $IC_{50} = 169 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  and  $174 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ , respectively). For the three RG extracts,  $IC_{50}$  values ranged from  $276 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  to  $292 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ , and malvidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside were the most abundant ACs. Our analyses imply that peonidin-3-glucoside ( $IC_{50} = 56 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ ) might be responsible for the inhibition potential of the RG extracts since malvidin-3 glucose had only a small effect on PDE activity. The BB extracts contain mainly peonidin-3-galactoside and cyanidin-3-galactoside, among other ACs, and also inhibited PDE activity ( $IC_{50} = 174 \pm 3 \mu\text{g/mL}$  and  $165 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ). Since cyanidin-3-galactoside showed little PDE inhibition (Figure 6a), other compounds might be responsible for the inhibitory activity of the BB extracts.

In addition to ACs, the extracts contained numerous copigments (Table 2), which are different types of phenolic compounds, including flavonols (quercetin, myricetin, isorhamnetin), phenolic acids (chlorogenic acid, coumaric acid), and hydrolysable tannins (polymeric esters of gallic acid and sugars). Copigments could also influence PDE activity. Rauf et al. [31] examined the inhibitory activity of the phenolic acids chlorogenic acid and gallic acid against PDE 1 in vitro. The phenolic acids possessed  $IC_{50}$  values of  $36.67 \pm 1.60 \mu\text{M}$  and  $325.19 \pm 3.62 \mu\text{M}$ , respectively. Chlorogenic acid is a major copigment in the CkB and BB extracts that we studied and, thus, may contribute to their inhibitory activity against PDE 3B. In another study reported by Kuppasamy and Das [13], flavonoids were tested for their effects on phosphodiesterase from rat adipocytes. Quercetin, luteolin, and genistein showed inhibitory potencies comparable to or greater than 3-isobutyl-2-methylxanthine ( $IC_{50} = 30\text{--}50 \mu\text{M}$ ), whereas myricetin or kaempferol had  $IC_{50}$  values of  $125 \mu\text{M}$  and  $58 \mu\text{M}$ , respectively [13]. We identified quercetin-derivatives in the CB, BB, EB, and SC extracts (Table 2), and these extracts had  $IC_{50}$  values ranging between  $165 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  and  $222 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ . Thus, the inhibitory potency of these extracts could be attributed to the presence of both copigments and ACs. Since we did not investigate the effects of copigments on PDE 3B activity, we cannot fully explain any reasons for the influence of the copigments at present and must address this matter in future studies.

Caffeine, the positive control for the PDE activity assay, is an unspecific PDE inhibitor. In our study, caffeine ( $c = 1.21 \text{ mM}$ ) inhibited PDE 3B by around 50%, confirming reported data demonstrating that commercially-available PDE was inhibited by 56% with caffeine ( $c = 0.01\%$ , diluted in dimethyl sulfoxide) [14]. Montoya et al. showed dose-dependent PDE inhibition by caffeine concentrations ranging from 0.1 to 5 mM in human platelet lysates, in vitro, and determined an  $IC_{50}$  value of 0.7 mM for caffeine [32]. Furthermore, platelet PDE activity after coffee consumption by humans was tested, since caffeine is a major constituent of coffee, and the in vivo results revealed highly significant PDE inhibition after coffee intervention despite indirect dependence on the caffeine content of coffee.

Taken together, we characterized the red fruit juice extracts of interest using HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> analyses and identified different ACs and copigments. We also measured the total phenolic content

of each extract using the Folin–Ciocalteu assay. Most importantly, we identified extracts from red fruits and single ACs with PDE inhibitory potential. The use of an in vitro model of PDE activity reveals only preliminary data, yet one must acknowledge that such in vitro results are the first insights into structure–activity relationships. These insights require further evaluation with additional future studies, preferably in vivo—for example, performing human intervention studies that measure PDE activity in isolated thrombocytes with and without these red fruit juice extracts.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents used and purchased were of analytical quality. Adenosine monophosphate (AMP) was purchased from Alexis Biochemicals (Lörrach, Germany); barium hydroxide octahydrate ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), caffeine, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phosphodiesterase (PDE) 3B (recombinant, EC 3.1.4.17), gallic acid, and ascorbic acid from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-}3'5'$ -cyclic adenosine monophosphate ammonium salt, 9.25 MBq/mL, from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS), and hydrochloric acid were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The Folin–Ciocalteu reagent, magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), and zinc sulphate heptahydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) were ordered from Merck (Darmstadt, Germany), and dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from VWR Int. S.A.S. (Darmstadt, Germany). Peonidin-3-glucoside chloride, cyanidin-3-arabinoside chloride, petunidin-3-glucoside chloride, cyanidin-3-glucoside chloride, cyanidin-3-galactoside chloride, malvidin-3-glucoside chloride, cyanidin-3-rutinoside chloride, cyanidin-3,5-diglucoside chloride, and cyanidin chloride were supplied by PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany).

##### 4.2. Samples

All extracts were generated using Amberlite XAD7 adsorber resin from Sigma Aldrich. The extracts were derived from either authentic pure fruit juices (NFC) or fruit juice concentrates (JC) from commercial sources: BB1 (blueberry JC), BB2 (blueberry NFC), BC1 (black currant NFC), BC2 (black currant JC), CB1 (cranberry JC), CB2 (cranberry JC), CkB1 (chokeberry JC), CkB2 (chokeberry JC), EB1 (elderberry JC), EB2 (elderberry JC), PG1 (pomegranate JC), PG2 (pomegranate JC), RG1 (red grape JC), RG2 (red grape NFC), RG3 (red grape JC), SC1 (sour cherry JC) and SC2 (sour cherry NFC), SC3 (sour cherry JC).

A column filled with the adsorber resin was washed with methanol and equilibrated with water. Juices were applied directly onto the column, and concentrates had to be diluted with 5 parts water prior to application. Next, the column was washed with water to flush out sugars, minerals, proteins, and salt, and then phenolic compounds were eluted with methanol/acetic acid (19/1; *v/v*). The solvents were evaporated in vacuo and the residue was freeze-dried. The so-obtained extracts were free of sugars and the pH was almost neutral.

##### 4.3. HPLC-ESI-MS/MS Analysis

The HPLC system (1100/1200 series, Agilent, Waldbronn, Germany) includes a binary pump (G1312A), an autosampler (G1329B), and a DAD-detector (G1316A). It was coupled to an HCT Ultra Ion Trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) with an electrospray ionization source (ESI). The anthocyanins and copigments were separated on a Luna C18(2) 3  $\mu$  column (150  $\times$  2.0 mm, Phenomenex (Torrance, CA, USA)) using water/acetonitrile/formic acid (95/3/2; *v/v/v*) (eluent A) and water/acetonitrile/formic acid (48/50/2; *v/v/v*) (eluent B) at a flow rate of 0.2 mL/min. Gradient elution was performed: 0 min 6% B, 30 min 35% B, 35 min 40% B, 45 min 90% B, 50 min 90% B, 55 min 30% B, 70 min 6% B. The ESI source was operated in alternating mode (+/−3000 V) (positive mode for anthocyanins and negative mode for copigments), using nitrogen as the nebulizer (50 psi) and drying gas (10 L/min, 365 °C). The sample extracts (around 2 mg) were dissolved in 2 mL of eluent A with

a pH of 2.52 so that the flavylium cation form of the anthocyanins was stabilized. Aliquots of 5  $\mu\text{L}$  of each sample were analyzed by the HPLC-PDA-ESI-MS/MS method described above according to Ostberg-Potthoff et al. [33] using the Bruker Hystar 3.2, Bruker ESICompass 1.3 for HCT/Esquire, and Data Analysis Version 3.0 software packages (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

#### 4.4. The Folin–Ciocalteu Assay

The total phenolic content of each juice extract was determined using the Folin–Ciocalteu assay according to the method published by Singleton and Rossi [27]. The Folin–Ciocalteu reagent includes molybdatophosphoric acid and tungstophosphoric acid, which are reduced by the phenolic compounds and form a blue complex that can be photometrically quantified. Gallic acid was used for calibration in concentrations ranging from 10 to 60 mg/L. In each case, 200  $\mu\text{L}$  of the sample solution (100 mg extract/1 L  $\text{H}_2\text{O}$ ), the gallic acid solutions, the positive control ascorbic acid (50 mg/L), and water for a blank were put into semi-micro cuvettes. One milliliter (1 mL) of Folin–Ciocalteu solution (from Merck KGaA, Darmstadt, Germany; diluted 1 to 10 with water) and, after no more than 8 min, 800  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (7.5 %) were added to each cuvette. Then, after exactly 2 h, the samples were measured at a wavelength of  $\lambda = 760$  nm.

#### 4.5. The cAMP-Specific PDE Activity Assay

The inhibitory effect of each extract on PDE 3B was measured according to the method published by Pösch et al. [34] with slight modifications [25,32]. One hundred microliters (100  $\mu\text{L}$ ) of the sample and 20  $\mu\text{L}$  of PDE 3B (200 Units/mL) were incubated for 15 min at 4°C. Afterwards, a 50  $\mu\text{L}$  volume of cAMP Mix (30 mM Tris/HCl pH 7.4, 9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM 5'AMP, 3  $\mu\text{M}$  cAMP, 2.6  $\mu\text{Ci/mL}$  [2,8- $^3\text{H}$ ]-cAMP) was added and the mixture incubated for 25 min at 37 °C to allow for reaction. The mixture was then put on ice to stop the reaction, and 250  $\mu\text{L}$  of  $\text{ZnSO}_4$  (0.266 M) and  $\text{Ba(OH)}_2$  (0.266 M) were added. Then, the mixture was centrifuged at 13,000  $g$  for 9 min at 25 °C, 450  $\mu\text{L}$  of the supernatant was mixed with 3.5 mL of a scintillation cocktail, and the resulting radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2100 TR, Packard, Meriden, CT, USA or Tri-Carb 2810 TR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Sample stock solutions were prepared in DMSO and, afterwards, dissolved in assay buffer, which did not exceed a final concentration of 2.5% DMSO. The nonspecific PDE 3B inhibitor caffeine served as a positive control. Experiments were performed in triplicate, and  $\text{IC}_{50}$  values were determined after at least three independent experiments. The ranges of test concentrations of extracts and single substances were intentionally chosen to align with similar ranges used for previous studies (extracts < 600  $\mu\text{g/mL}$ ; ACs < 2000  $\mu\text{M}$ ) to facilitate comparison with previous experiments.

#### 4.6. Statistical Analysis

The results of the cAMP-specific PDE activity assay were presented as the mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments. Statistical analyses were conducted using the Analysis Tool in MS Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA) and Origin 2018G (OriginLab, Northampton, MA). Data were checked on normal distribution (David test) and homogeneity of variance (Fisher's  $f$ -test). The data of samples treated with extracts were analyzed for significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ ) compared to the solvent treated control (DMSO) by one-sample Student's  $t$ -test (one-sided).

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6934/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.R. and P.W.; methodology, C.G., S.N., V.D. and T.W.; validation, C.G. and S.N.; formal analysis, C.G. and S.N.; investigation, C.G., S.N., V.D. and T.W.; resources, E.R. and P.W.; data curation, C.G., S.N., V.D. and T.W.; writing—original draft preparation, C.G., T.B., E.R., P.W. and S.N.; writing—review and editing, E.R. and P.W.; visualization, C.G. and S.N.; supervision, E.R. and P.W.; project administration, E.R. and P.W.; funding acquisition, E.R. and P.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This IGF project of the FEI was funded via AiF within the program for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi), based on a resolution of the German Parliament, grant number AiF 20277 N.

**Acknowledgments:** We thank the members of the “Projektbegleitender Ausschuss” for their constructive discussions and support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

AC	anthocyanin
BB	blueberry
BC	black currant
cAMP	3',5'-cyclic adenosine monophosphate
CB	cranberry
cGMP	3',5'-cyclic guanosine monophosphate
CkB	chokeberry
DMSO	dimethyl sulfoxide
EB	elderberry
FFA	free fatty acid
GAE	gallic acid equivalents
HPLC-ESI-MS <sup>n</sup>	high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry
IC <sub>50</sub> value	half maximal inhibitory concentration
JC	juice concentrate
n.d.	not determined
NFC	not from concentrate, direct juices
PC	positive control
PDE	phosphodiesterase
PG	pomegranate
rel.	relative
RG	red grape
SC	sour cherry

#### References

1. World Health Organization. Obesity and Overweight. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 29 June 2020).
2. Williamson, G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull.* **2017**, *42*, 226–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4069–4075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Meskin, M.S.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. *Phytochemicals: Mechanisms of Action. Absorption and Metabolism of Anthocyanins: Potential Health Effects*, 1st ed.; Prior, R.L., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004; ISBN 9780849316722.
5. De Pascual-Teresa, S.; Sanchez-Ballesta, M.T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 281–299. [[CrossRef](#)]
6. Weisel, T.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Stockis, J.-P.; Kulling, S.; Rüfer, C.; Johannes, C.; Janzowski, C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 388–397. [[CrossRef](#)]
7. Kuntz, S.; Kunz, C.; Herrmann, J.; Borsch, C.H.; Abel, G.; Fröhling, B.; Dietrich, H.; Rudloff, S. Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: Results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition Investigation Alliance) study. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 925–936. [[CrossRef](#)]

8. Triebel, S.; Trieu, H.-L.; Richling, E. Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8902–8910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schantz, M.; Mohn, C.; Baum, M.; Richling, E. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *J. Berry Res.* **2010**, *1*, 25–33. [[CrossRef](#)]
10. Bakuradze, T.; Tausend, A.; Galan, J.; Groh, I.A.M.; Berry, D.; Tur, J.A.; Marko, D.; Richling, E. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radic. Res.* **2019**, *53*, 1045–1055. [[CrossRef](#)]
11. Geetha, T.; Malhotra, V.; Chopra, K.; Kaur, I.P. Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of quercetin. *Indian J. Exp. Biol.* **2005**, *43*, 61–67.
12. Graf, B.A.; Milbury, P.E.; Blumberg, J.B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *J. Med. Food* **2005**, *8*, 281–290. [[CrossRef](#)]
13. Kuppasamy, U.R.; Das, N.P. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1307–1315. [[CrossRef](#)]
14. Dallas, C.; Gerbi, A.; Tenca, G.; Juchaux, F.; Bernard, F.-X. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* **2008**, *15*, 783–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Girotti, C.; Ginet, M.; Demarne, F.C.; Lagarde, M.; Gélœn, A. Lipolytic activity of cirsimarin extracted from *Microtea debilis*. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1170–1172. [[CrossRef](#)]
16. Nielsen, T.S.; Jessen, N.; Jørgensen, J.O.L.; Møller, N.; Lund, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *52*, R199–R222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Spector, A.A. Fatty acid binding to plasma albumin. *J. Lipid Res.* **1975**, *16*, 165–179.
18. Boswell-Smith, V.; Spina, D.; Page, C.P. Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147* (Suppl. 1), S252–S257. [[CrossRef](#)]
19. Gresele, P.; Momi, S.; Falcinelli, E. Anti-platelet therapy: Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 634–646. [[CrossRef](#)]
20. Rall, T.; Sutherland, E.W. Formation of a cyclic adenosine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1065–1076.
21. Butcher, R.; Sutherland, E. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1244–1250.
22. Marko, D.; Puppel, N.; Tjaden, Z.; Jakobs, S.; Pahlke, G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 318–325. [[CrossRef](#)]
23. Ko, W.-C.; Shih, C.-M.; Lai, Y.-H.; Chen, J.-H.; Huang, H.-L. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2087–2094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Beretz, A.; Anton, R.; Stoclet, J.C. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia* **1978**, *34*, 1054–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Röhrig, T.; Pacjuk, O.; Hernández-Huguet, S.; Körner, J.; Scherer, K.; Richling, E. Inhibition of Cyclic Adenosine Monophosphate-Specific Phosphodiesterase by Various Food Plant-Derived Phytotherapeutic Agents. *Medicines* **2017**, *4*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dell'Agli, M.; Galli, G.V.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F.; Bosisio, E. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1960–1965. [[CrossRef](#)]
27. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
28. Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 5990. [[CrossRef](#)]
29. Esatbeyoglu, T.; Hillebrand, S.; Winterhalter, P. Analysis of phenolic components of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2010**, *106*, 374–382.
30. Pawlowska, A.M.; de Leo, M.; Braca, A. Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10234–10238. [[CrossRef](#)]

31. Rauf, A.; Orhan, I.E.; Ertas, A.; Temel, H.; Hadda, T.B.; Saleem, M.; Raza, M.; Khan, H. Elucidation of Phosphodiesterase-1 Inhibitory Effect of Some Selected Natural Polyphenolics Using In Vitro and In Silico Methods. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 412–417. [[CrossRef](#)]
32. Montoya, G.A.; Bakuradze, T.; Eirich, M.; Erk, T.; Baum, M.; Habermeyer, M.; Eisenbrand, G.; Richling, E. Modulation of 3',5'-cyclic AMP homeostasis in human platelets by coffee and individual coffee constituents. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1427–1437. [[CrossRef](#)]
33. Ostberg-Potthoff, J.J.; Berger, K.; Richling, E.; Winterhalter, P. Activity-Guided Fractionation of Red Fruit Extracts for the Identification of Compounds Influencing Glucose Metabolism. *Nutrients* **2019**, *11*, 1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pösch, G. Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1971**, *268*, 272–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



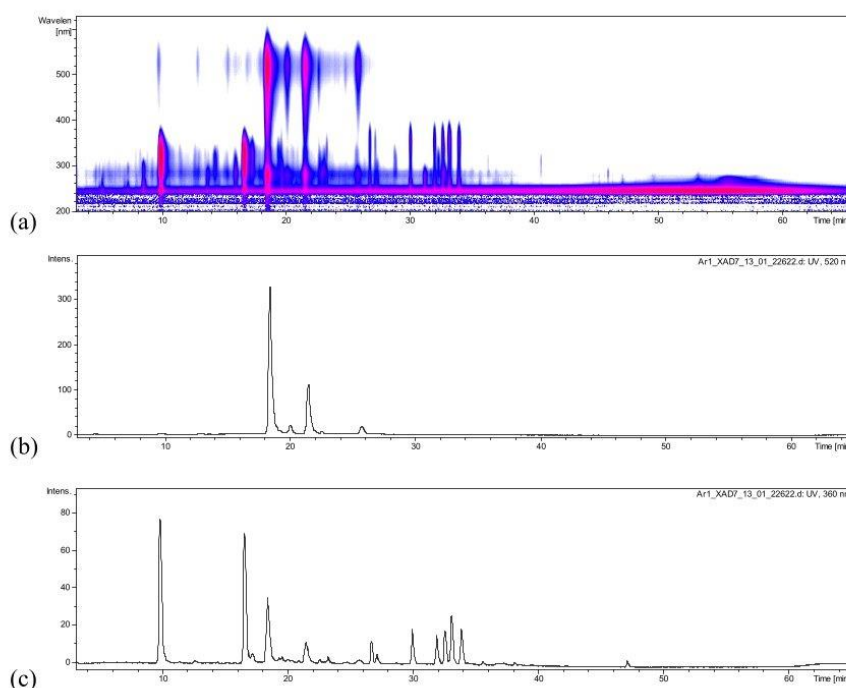
© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Supplementary Material:

International Journal of  
Molecular Sciences

HPLC-DAD chromatograms and isocontour plots for each juice type and complete list of the anthocyanins and copigments detected

## Chokeberry



**Figure S1.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of Ckb1. Peak identification is given in Tables 1 and 2.

**Table S1.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of Ckb1, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{max}$	Anthocyanin	Identification
1	9,9	737	575, 287	522	Cyanidin-derivative	C
2	12,9	707	575, 287	523	Cyanidin-derivative	C
3	18,4	449	287	515	Cyandin-3-galactoside	A
4	20,0	449	287	515	Cyanidin-3-glucoside	A
5	21,5	419	287	515	Cyanidin-3-araboside	A
6	25,8	419	287	517	Cyanidin-3-xyloside	B

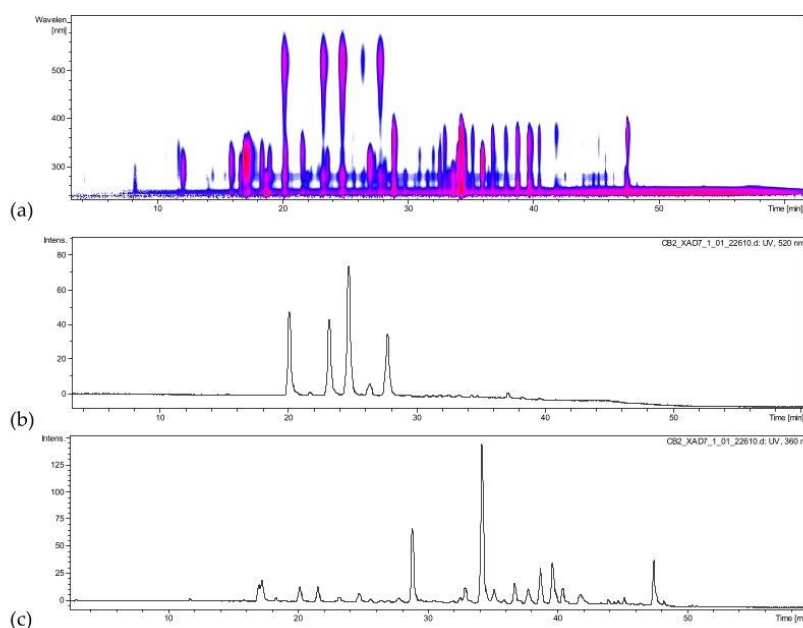
Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Table S2.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of Ckb1, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	10,0	353	191,179,135	323	Neochlorogenic acid	A
2	16,6	353	191, 179, 161	324	Chlorogenic acid	A
3	17,2	353	191	324	Cryptochlorogenic acid	A
4	26,8	625	301	351	Quercetin-dihexoside	C
5	27,2	625	301	349	Quercetin-dihexoside	C
6	29,9	595	301	352	Quercetin-3-vicianoside	B
7	32,0	609	301	351	Quercetin-3-robinobioside	B
8	32,6	609	301	349	Quercetin-3-rutinoside	A
9	33,2	463	301	352	Quercetin-3-galactoside	B
10	33,9	463	301	352	Quercetin-3-glucoside	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

### Cranberry



**Figure S2.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of CB2. Peak identification is given in Tables 3 and 4.



**Table S3.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of CB2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	20,2	449	287	515	Cyanidin-3-galactoside	A
2	21,9	449	287	524	Cyanidin-3-glucoside	A
3	23,3	419	287	516	Cyanidin-3-arabinoside	A
4	24,8	463	301	516	Peonidin-3-galactoside	B
5	26,5	463	301	520	Peonidin-3-glucoside	A
6	27,8	433	301	516	Peonidin-3-arabinoside	B
7	29,5	463	331	528	Malvidin-3-arabinoside	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

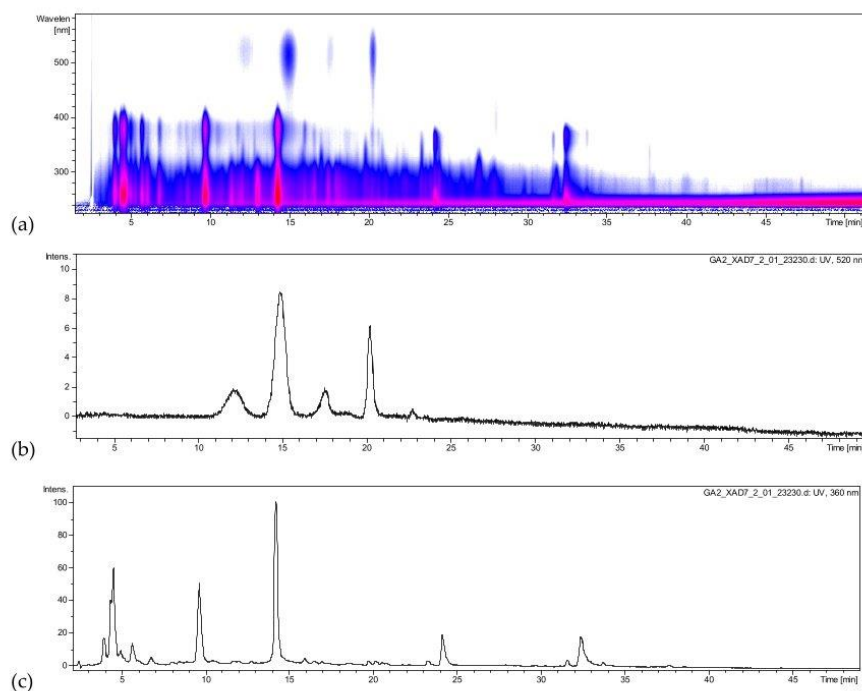
**Table S4.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of CB2, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	15,9	341	179, 135	313	Caffeic acid hexoside	B
2	17,0	325	163	315	Coumaric acid hexosid	B
3	17,3	325	145	322	Coumaric acid hexosid	B
4	17,5	353	191	322	Chlorogenic acid	A
5	18,6	355	193	328	Ferulic acid	A
6	19,2	577	407	308	Proanthocyanidin dimer	B
7	19,8	385	223	294	Sinapic acid hexoside	B
8	22,5	335	179	325	caffeoylshikimic acid	B
9	23,0	337	191	312	Coumaroylquinic acid	B
10	24,0	863	711	310	Proanthocyanidin trimer	B
11	28,9	479	316	354	Myricetin-hexoside	B
12	29,3	449	316	354	Myricetin-xyloside	B
13	30,8	493	330	357	Laricitrin-hexoside	B
14	32,0	535	371	351	Coumaroyl Iridoid hexoside	B
15	32,8	537	373	311	Coumaroyl-dihydromonotropein	B
16	34,2	463	301	352	Quercetin-hexoside	B
17	35,1	463	301	355	Quercetin-hexoside	B
18	36,7	433	301	351	Quercetin-pentoside	B
19	37,8	433	301	350	Quercetin-pentoside	B
20	38,7	433	301	351	Quercetin-pentoside	B
21	39,6	447	301	346	Quercetin-rhamnoside	B
22	40,4	507	344	352	Syringetin-hexoside	B
23	41,8	317	179	368	Myricetin	A

24	42,3	447	314	355	Isorhamnetin-pentoside	B
25	43,0	477	344	351	Syringetin-pentoside	B
26	47,4	301	179	368	Quercetin	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

### Pomegranate



**Figure S3.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of PG2. Peak identification is given in Tables 5 and 6.

**Table S5.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of PG2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	12,1	627	303	523	Delphinidin-3,5-diglucoside	B
2	14,9	611	287	514	Cyanidin-3,5-diglucoside	A
3	17,4	595	271	514	Delphinidin-3-glucoside	A
4	20,3	449	287	517	Cyanidin-3-glucoside	A

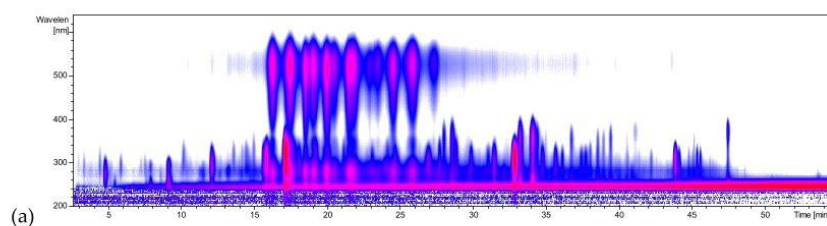
Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

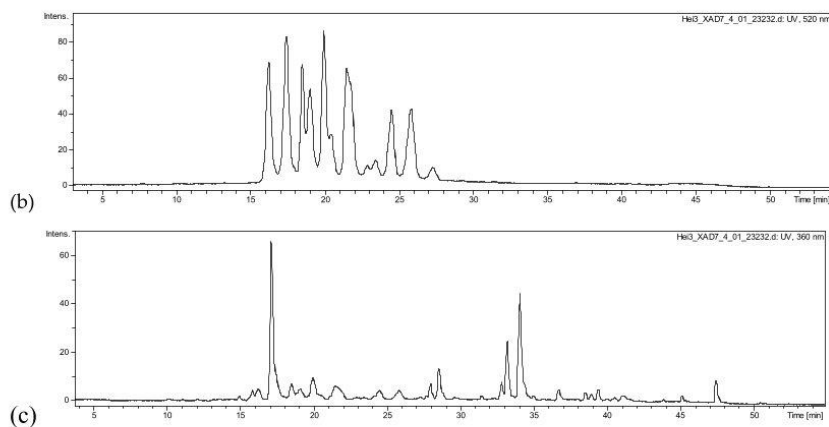
**Table S6.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of PG2, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H]	Fragments	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
		<i>m/z</i>	<i>m/z</i>			
1	3,4	783	721,601	377	Pedunculagin I	B
2	3,7	1101	781, 601	377	Punicalin-derivative	C
3	308	649	605, 301		Trisgalloyl-glucoside	B
4	3,9	781	601,271	378	Punicalin I	A
5	4,4	781	601,299	377	Punicalin II	A
6	4,8	1083	601		Punicalagin I	A
7	5,4	783	299,601	376	Pedunculagin II	B
8	7,9	783	301	377	Pedunculagin III	B
9	9,5	933	451	372	Galloyl-O-punicalin	B
10	10,9	469	425	371	Valonic acid bilactone	B
11	11,4	951	907	373	Granatin B	B
12	12,5	951	783	377	HHDP-valoneoyl-glucoside	B
13	13,3	1083	601	378	Punicalagin II	A
14	15,4	799	301	376	Ellagic acid derivative	C
15	15,8	1085	451	375	Digalloyl-gallagyl-hexoside	B
16	16,2	799	301	375	Granatin A	B
17	17,6	325	145	312	Coumaric acid hexoside	B
18	18,8	801	347	365	Digalloyl-HHDP-glucuronide	B
19	20,0	449	287	322	Dihydrokaempferol-hexoside	B
20	20,1	355	193	327	Ferulic acid hexoside	B
21	21,4	633	301	370	Galloyl-HHDP-glucoside	B
22	23,0	635	465	322	Tri-O-galloyl-glucoside	B
23	24,9	463	301	360	Ellagic acid hexoside	B
24	26,1	953	301	332	Galloyl-bis-HDDP-glucoside	B
25	29,5	447	301	360	Quercetin-3-rhamnoside	B
26	30,1	787	635	320	Tetra-O-galloyl-glucoside	B
27	32,3	491	328	369	Dimethyl ellagic acid hexoside	B
28	33,0	301	229	366	Ellagic acid	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

### Blueberry





**Figure S4.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of BB2. Peak identification is given in Tables 7 and 8.

**Table S7.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of BB2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	16,3	465	303	522	Delphinidin-3-galactoside	B
2	17,4	465	303	522	Delphinidin-3-glucoside	A
3	18,6	449	287	515	Cyanidin-3-galactoside	A
4	19,1	435	303	523	Delphinidin-3-arabinoside	B
5	20,0	449	287	515	Cyanidin-3-glucoside	A
6	20,6	479	317	522	Petunidin-3-galactoside	B
7	21,4	419	287	517	Cyanidin-3-arabinoside	A
8	21,9	479	317	523	Petunidin-3-glucoside	A
9	22,9	463	301	519	Peonidin-3-galactoside	B
10	23,5	449	317	524	Petunidin-3-arabinoside	B
11	24,4	493	331	519	Malvidin-3-galactoside	B
12	24,5	463	301	518	Peonidin-3-glucoside	A
13	25,8	493	331	524	Malvidin-3-glucoside	A
14	27,2	463	331	526	Malvidin-3-arabinoside	B

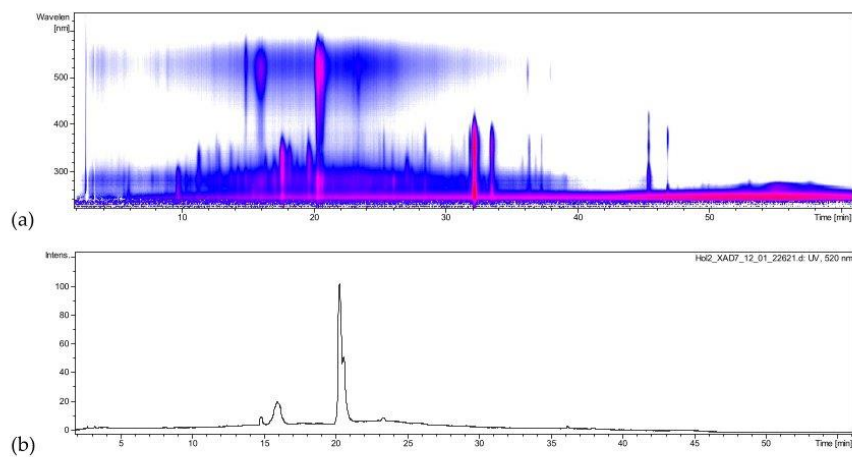
Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

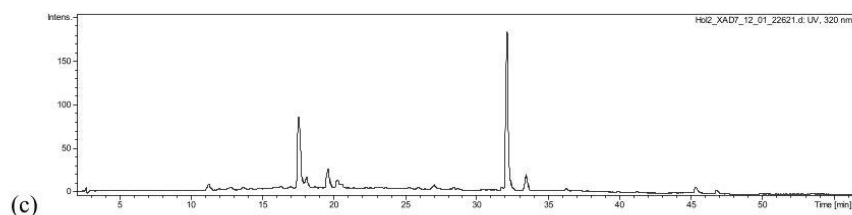
**Table S8.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of BB2, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	15,9	341	179	312	Caffeic acid hexoside	B
2	17,2	353	191	324	Chlorogenic acid	A
3	19,2	447	284	322	Kaempferol-hexoside	B
4	28,1	479	316	343	Myricetin-hexoside	B
5	28,5	479	316	348	Myricetin-hexoside	B
6	31,5	535	371	311	Coumaroyl Iridoid hexoside	B
7	32,4	463	301	348	Quercetin-hexoside	B
8	32,7	609	301	311	Quercetin-rutinoside	A
9	33,1	535	371	311	Coumaroyl Iridoid hexoside	B
10	34,0	463	301	352	Quercetin-hexoside	B
11	34,2	477	301	352	Quercetin-glucuronide	B
12	36,9	433	300,301	351	Quercetin-pentoside	B
13	38,1	411	145	-	Coumaric acid derivative	B
14	38,7	447	300,301	343	Quercetin-desoxyhexoside	B
15	39,5	507	344	343	Syringetin-hexoside	B
16	45,2	591	447	306	Quercetin-3-(4-HMG)-rhamnoside	B
17	47,5	301	151	369	Quercetin	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only. HMG = 3-hydroxy-3-methylglutaryl.

### Elderberry





**Figure S5.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  320 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of EB1. Peak identification is given in Tables 9 and 10.

**Table S9.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of EB1, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

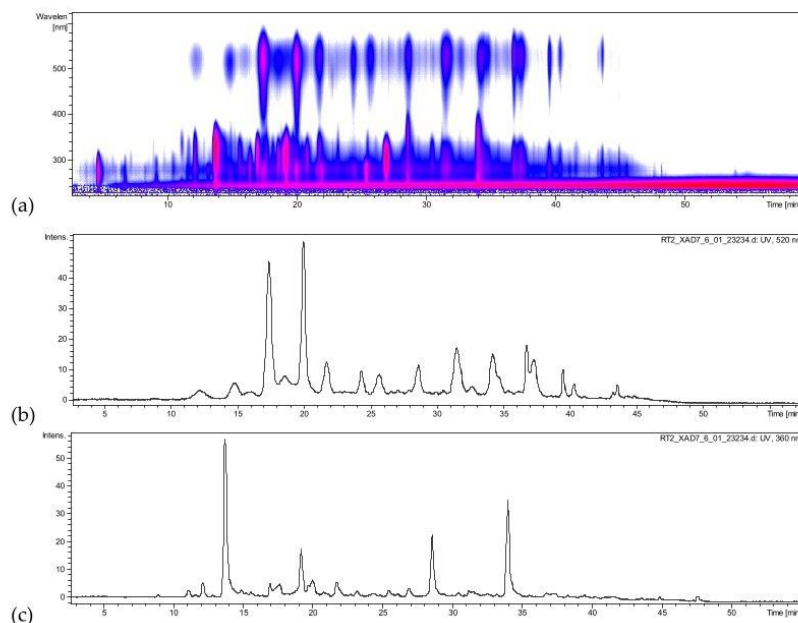
Peak No.	Retention time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	14,9	611	287	526	Cyanidin-dihexoside	B
2	16,0	743	287	514	Cyanidin-3-sambubioside-5-glucoside	B
3	20,4	581	287	516	Cyanidin-3-sambubioside	B
4	20,8	449	287	516	Cyanidin-3-glucoside	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Table S10.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of EB1, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	10,9	353	191	280, 320	Neochlorogenic acid	A
2	17,1	353 (707)	191	324	Chlorogenic acid	A
3	17,9	353	191	284, 319	Cryptochlorogenic acid	A
4	19,2	625	417, 463→301	285, 319	Quercetin-dihexoside	B
5	19,6	771	609→301	-	Quercetin-derivative	C
6	32,3	609	301	265, 352	Quercetin-3-rutinoside	A
7	33,7	463	301	255, 352	Quercetin-3-glucoside	A
8	36,5	593	285	265, 325	Kaempferol-3-rutinoside	B
9	37,4	623	315	338	Isorhamnetin-rutinoside	B
10	47,0	301	151	368	Quercetin	A

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Red Grape**

**Figure S6.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of RG2. Peak identification is given in Tables 11 and 12.

**Table S11.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of RG2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	12,4	627	303	518	Delphinidin-dihexoside	C
2	14,9	611	287	514	Cyanidin-dihexoside	C
3	16,0	641	317	519	Petunidin-dihexoside	C
4	17,4	465	303	522	Delphinidin-3-glucoside	A
5	18,6	625	301	515	Peonidin-dihexoside	C
6	20,0	449	287	515	Cyanidin-3-glucoside	A
7	21,7	479	317	523	Petunidin-3-glucoside	A
8	24,4	463	301	517	Peonidin-3-glucoside	A
9	25,8	493	331	525	Malvidin-3-glucoside	A
10	28,7	507	303	525	Delphinidin-3-(6''-acetyl)glucoside	B
11	31,3	491	287	523	Cyanidin-3-(6''-acetyl)glucoside	B
12	32,0	773	303	527	Delphinidin-3-(6''-coumaroyl)-5-diglucoside	B

13	32,6	521	317	523	Petunidin-3-(6''-acetoyl)hexoside	B
14	34,2	757	595, 287	522	Cyanidin-3-(6''-coumaroyl)-5-diglucoside	B
15	34,8	787	317, 625	530	Petunidin-3-(6''-coumaroyl)-5-diglucoside	B
16	36,8	611	303	527	Delphinidin-3-(6''-coumaroyl)hexoside	B
17	37,3	801	331, 639	525	Malvidin-3-(coumaroyl)-5-diglucoside	B
18	39,6	595	287	522	Cyanidin-3-(6''-coumaroyl)glucoside	B
19	40,4	625	317	530	Petunidin-3-(6''-coumaroyl)glucoside	B
20	43,4	609	301	530	Peonidin-3-(6''-coumaroyl)hexoside	B
21	43,6	639	331	530	Malvidin-3-(6''-coumaroyl)hexoside	B

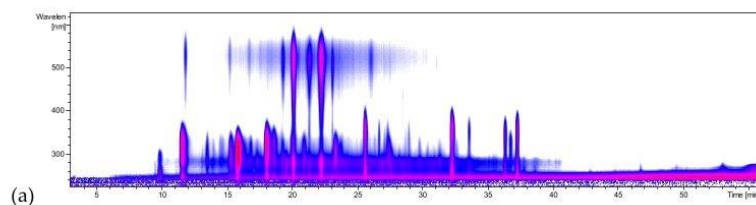
Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Table S12.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of RG2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

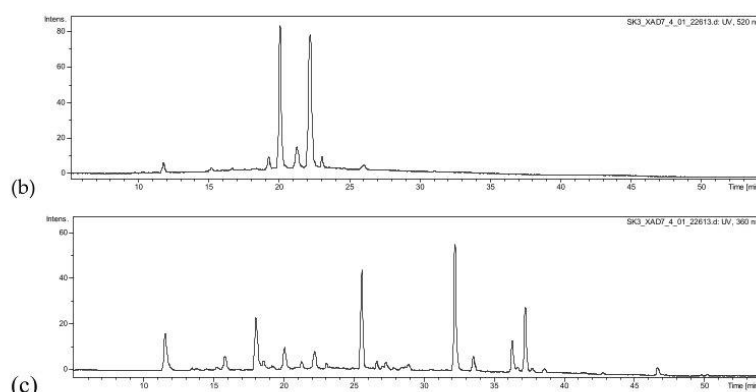
Peak No.	Retention Time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	5,1	169	125	-	Gallic acid	A
2	13,8	577	407	327	Proanthocyanidin dimer	B
3	17,1	325	145	314	Coumaric acid hexoside	B
4	19,2	295	163	313	Coutaric acid	B
5	19,8	577	407	315	Proanthocyanidin dimer	B
6	27,0	163	119	309	Coumaric acid	A
7	28,4	479	316,317	352	Isorhamnetin-hexoside	B
8	33,8	463	301	351	Quercetin-hexoside	B
9	34,1	477	301	314	Quercetin-glucuronide	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

### Sour Cherry







**Figure S7.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of SCI. Peak identification is given in Table 13 and 14.

**Table S13.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of SCI, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

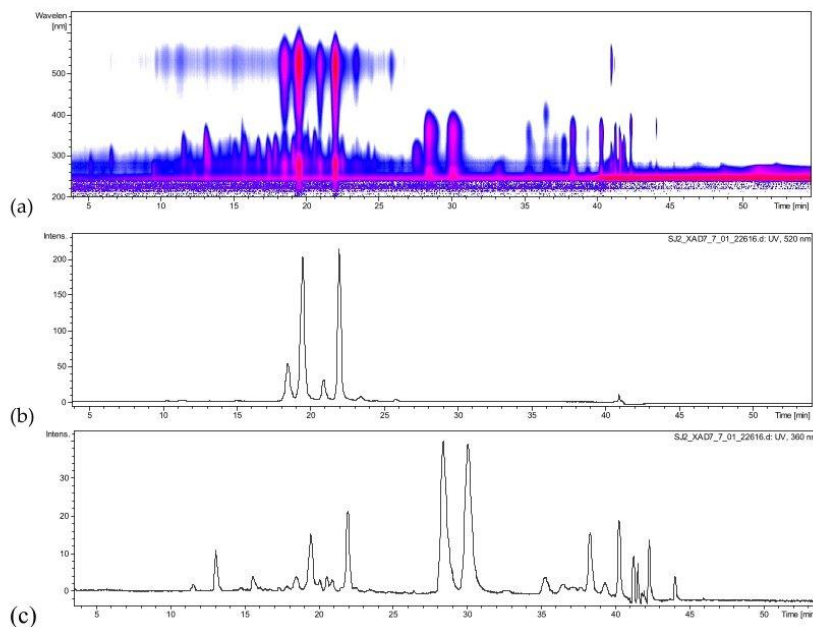
Peak No.	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	19,3	611	287	519	Cyanidin-3-sophoroside	B
2	20,1	757	287	517	Cyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinoside)	B
3	21,6	727	287	522	Cyanidin-3-(2 <sup>G</sup> -xylosylrutinoside)	B
4	22,3	595	287	517	Cyanidin-3-rutinoside	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Table S14.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of SCI, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention Time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	11,6	353	191	323	Neochlorogenic acid	A
2	15,9	337	163	310	Coumaroylquinic acid	B
3	18,1	353	191	324	Chlorogenic acid	A
4	18,7	353	191	321	Cryptochlorogenic acid	A
5	20,1	577	407	320	Proanthocyanidin dimer	B
6	25,6	771	301	351	Quercetin-3-(2 <sup>G</sup> -glucosylrutinoside)	B
7	27,4	625	301	308	Quercetin-derivative	C
8	32,3	609	301	353	Quercetin-3-rutinoside	A
9	36,4	593	285	347	Kaempferol-3-rutinoside	B
10	37,3	623	315	351	Isorhamnetin-rutinoside	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Black Currant**

**Figure S8.** Isocontour plot from  $\lambda$  200 to 600 (a) and DAD chromatograms at a wavelength of  $\lambda$  520 (b) and  $\lambda$  360 (c) of the high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) chromatograms of the XAD 7 extract of BC2. Peak identification is given in Tables 15 and 16.

**Table S15.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of BC2, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Identification
1	18,5	465	303	523	Delphinidin-3-glucoside	A
2	19,5	611	303	525	Delphinidin-3-rutinoside	B
3	20,9	449	287	515	Cyanidin-3-glucoside	A
4	22,0	595	287	516	Cyanidin-3-rutinoside	B
5	23,5	625	317	524	Petunidin-3-(6''-coumaroyl)glucoside	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.

**Table S16.** HPLC-ESI-MS/MS data of the XAD 7 extract of BC2, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ .

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Identification
1	13,2	341	179	319	Caffeic acid hexoside	B
2	15,7	627	301,475	306	Quercetin-derivative	C
3	18,1	325	145, 163	344	Coumaric acid hexoside	B
4	19,1	463	301	297	Quercetin-hexoside	B
5	20,6	609	301	326	Quercetin-derivative	C
6	28,4	625	317	355	Isorhamnetin-rutinoside	B
7	30,0	625	317,179	355	Isorhamnetin-derivative	C
8	38,4	609	301	352	Quercetin-3-rutinoside	A
9	40,1	463	301	352	Quercetin-3-hexoside	B
10	41,2	609	301	349	Quercetin-derivative	C
11	41,4	593	285	318	Kaempferol-rutinoside	B

Compounds were identified by (A) mass spectral data and comparison with authentic reference, (B) mass spectral data and literature data or (C) mass data only.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4.2. Publikation II „Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism“

### 4.2.1. Zusammenfassung

Polyphenole weisen viele biologische Wirkungen auf, darunter neben antioxidativen Eigenschaften auch einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus (Banach *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2017; Mosqueda-Solís *et al.*, 2017). Dabei kann durch Inhibierung der PDE-Aktivität und dem resultierenden cAMP-Anstieg die Lipolyse in den Adipozyten stimuliert werden, wodurch die in den Lipidtröpfchen gespeicherten TAGs zu freien FS und Glycerin hydrolysiert werden (Dallas *et al.*, 2008; Kuppusamy und Das, 1992; Nielsen *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Extrakte, die verschiedene Klassen von Polyphenolen oder einzelne Polyphenole enthielten, die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen beispielsweise durch eine gehemmte Differenzierung reduzierten (Huang *et al.*, 2014; Kowalska *et al.*, 2017).

Eine zuvor durchgeführte Studie (Kapitel 4.1.) zeigte, dass Extrakte aus Aronia, Cranberry und Granatapfel signifikant die PDE 3B-Aktivität inhibierten. Ziel dieser Studie war es, die drei Extrakte aktivitätsgeleitet zu fraktionieren, die Fraktionen zu charakterisieren und in drei *in vitro*-Assays des Lipidmetabolismus zu testen: Hemmung der Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen mittels *Oil-Red-O*-Färbung, Induktion der Lipolyse in 3T3-L1-Zellen mittels Lipolyse-Assay-Kits (photometrische Messung, 540 nm) sowie Inhibierung der PDE 3B-Aktivität mittels radiochemischem Assay. Dabei erfolgte die Fraktionierung und Charakterisierung durch den Projektpartner an der Technischen Universität Braunschweig.

Nach Membranchromatographie und Hexanfällung wurden die drei erhaltenen Fraktionen (Anthocyane, Copigmente und Polymere) auf ihre Wirkung in den drei genannten *in vitro*-Assays untersucht. Im PDE 3B-Assay wurde bei allen Fraktionen eine konzentrationsabhängige Reduktion der PDE 3B-Aktivität beobachtet, wobei das potenteste PDE 3B-Inhibierungspotential bei den Fraktionen des Granatapfelextraktes gezeigt wurde. In 3T3-L1-Zellen reduzierten alle untersuchten Fraktionen die Lipidakkumulation, wohingegen lediglich die Copigmentfraktionen der Aronia- und Cranberryextrakte die Lipolyse induzierten.

Da die Copigmentfraktionen der Cranberry- und Granatapfelextrakte ein starkes bioaktives Potential gezeigt hatten, wurden diese beiden Fraktionen weiter mittels CCC subfraktioniert. Dadurch konnten insgesamt fünf Cranberry-Copigmentsubfraktionen (CF1–CF5) sowie sieben Granatapfel-Copigmentsubfraktionen (GF1–GF7) erhalten werden. Die potentesten Wirkungen auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen und PDE 3B-Aktivität wurden durch die Cranberry-Copigmentsubfraktionen CF1 und CF5 beobachtet, in denen hauptsächlich Kaffeesäurederivate, Coumaroylsäure- und Sinapinsäurehexoside bzw. Quercetinderivate

enthalten waren. Bei den Granatapfel-Copigmentsubfraktionen zeigten GF3 und GF4 die stärksten Wirkungen, in denen vorwiegend Ellagsäurehexosid, Pedunculagin und Punicalagin bzw. zusätzlich Granatin A und Galloyl-O-Punicalin identifiziert wurden.

Die drei in dieser Studie untersuchten Parameter (Lipidakkumulation, Lipolyse und PDE 3B-Aktivität) repräsentieren Teile des Lipidmetabolismus. Zusammenfassend wurde in den *in vitro*-Versuchen gezeigt, dass neben den Anthocyanen (z. B. Cyanidin-3-glukosid) insbesondere auch verschiedene in den Copigmentfraktionen enthaltene Inhaltsstoffe wie Zimtsäurederivate (5-CQA), Flavonoide (Quercetin und Quercetinderivate) sowie hydrolysierbare Tannine (Ellagsäurederivate, Punicalagin) den Lipidstoffwechsel beeinflussen können. Die beobachteten Effekte beschränken sich allerdings auf *in vitro*-Untersuchungen und sollten beispielsweise im Rahmen einer Humanstudie überprüft und bekräftigt werden.

**Referenz:**

Niesen, S.<sup>†</sup>; Göttel, C.<sup>†</sup>; Becker, H.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism. *Foods* **2022**, *11*, 570.

<https://doi.org/10.3390/foods11040570>.



<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

## 4.2.2. Veröffentlichtes Manuskript



Article

## Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism

Sonja Niesen <sup>1,†</sup>, Celina Göttel <sup>2,†</sup>, Hanna Becker <sup>2</sup>, Tamara Bakuradze <sup>2</sup>, Peter Winterhalter <sup>1</sup>  and Elke Richling <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstraße 20, D-38106 Braunschweig, Germany; s.niesen@tu-braunschweig.de (S.N.); p.winterhalter@tu-braunschweig.de (P.W.)

<sup>2</sup> Division of Food Chemistry and Toxicology, Department of Chemistry, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany; goettel@chemie.uni-kl.de (C.G.); hbecker@chemie.uni-kl.de (H.B.); bakuradze@chemie.uni-kl.de (T.B.)

\* Correspondence: richling@chemie.uni-kl.de; Tel.: +49-631-205-4061

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Polyphenols show a spectrum of bioactive effects, including an influence on lipid metabolism. In this study, we performed activity-guided fractionations of black chokeberry (aronia), cranberry, and pomegranate extracts to identify the biologically active compounds. The extracts were prepared from fruit juice concentrates with the adsorbent resin Amberlite XAD-7 and were separated into a copigment and an anthocyanin fraction, followed by fractionation into a polymer and monomeric fraction by means of hexane precipitation. For further fractionation of the cranberry and pomegranate copigment fractions, high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) was used. The compounds in each fraction were identified by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS), and the quantification was performed by ultra high-performance liquid chromatography-diode array detector (UHPLC-DAD) analyses. Each of the (sub-)fractions was tested in three in vitro assays: phosphodiesterase 3B (PDE) activity, lipid accumulation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. The results showed that various fractions and subfractions can inhibit lipid accumulation and PDE activity as well as increase lipolysis, particularly copigments. Overall, our results indicate an influence of polyphenol-rich (sub-)fractions on the lipid metabolism.

**Keywords:** lipid accumulation; lipolysis; phosphodiesterase activity; anthocyanins; copigments; polymers; red fruit juice; HPLC-ESI-MS/MS; HPCCC



**Citation:** Niesen, S.; Göttel, C.; Becker, H.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E.

Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism. *Foods* **2022**, *11*, 570. <https://doi.org/10.3390/foods11040570>

Academic Editors: Ruth Hornedo-Ortega and Ana B. Cerezo

Received: 26 January 2022

Accepted: 12 February 2022

Published: 16 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

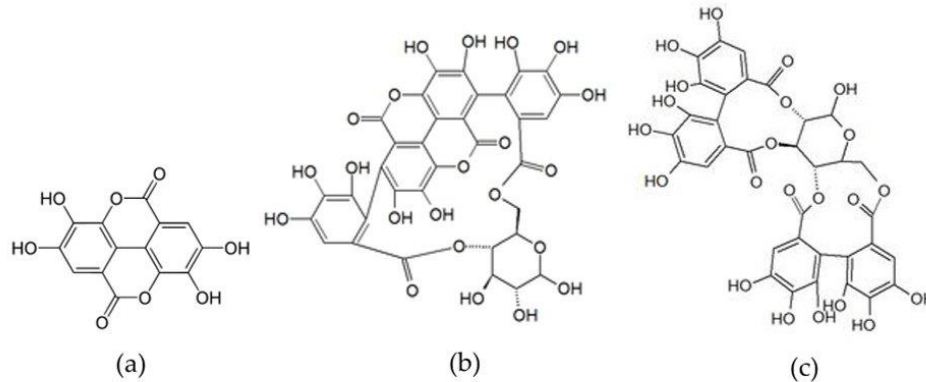


**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

It is well known that fruits and vegetables are good sources of vitamins, fiber, and bioactive phytochemicals [1]. Compounds with positive effects on health are present in fruits and can also be found in fruit juices, which are controversially discussed because of their sugar content. An already-published work by Ostberg-Potthoff et al. [2] showed that the consumption of red fruit juices can positively influence sugar metabolism by inhibiting sugar-metabolizing enzymes. In red fruit juices, polyphenols are the most important class of secondary metabolites. Polyphenols consist of many subclasses, such as phenolic acids, flavonoids, stilbenes, and lignans [3]. In the case of chokeberry, cranberry, and pomegranate, the phenolic acids and the flavonoids, especially the anthocyanins, are of particular importance [4].

Pomegranate contains another class of polyphenols, the so called hydrolyzable tannins, which are oligomers of ellagic and gallic acids [5,6]. The monomer ellagic acid and the oligomers punicalin and pedunculagin are shown as examples in Figure 1.



**Figure 1.** Structure of ellagic acid (a), punicalin (b), and pedunculagin (c).

Several studies have shown that polyphenols, especially anthocyanins and copigments, have antioxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial, and anti-viral properties and are discussed in the context of influencing glucose and lipid metabolism *in vitro* as well as *in vivo* [7–14].

Triglycerides are stored in cytosolic lipid droplets of fat cells (adipocytes) and are used as the main energy reserve. During lipolysis, triglycerides in fat cells are hydrolyzed; as a result, free fatty acids (FFAs) and glycerol are released. Lipolysis rates are regulated through biochemical or hormonal signals in response to changes in the nutritional state. Furthermore, lipolysis can be influenced by polyphenols, such as flavonoids, by inhibiting 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-phosphodiesterase (PDE), such as PDE 3B, which led to increased cAMP levels, as reported by Kuppusamy and Das [15] and Dallas et al. [16]. Cyclic AMP is a second messenger that activates protein kinase A, which leads to increased phosphorylation of hormone-sensitive lipase and perilipin 1. This stimulates the activation of both (hormone-sensitive lipase and perilipin 1) and promotes lipolysis [17,18]. In addition, extracts containing different classes of polyphenols or individual polyphenols have shown that they reduce lipid accumulation via suppressed differentiation and induced lipolysis in 3T3-L1 cells [19–22].

This paper describes the successful fractionation and identification of compounds from chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts, influencing lipid metabolism *in vitro*. Therefore, we examined the effects of the (sub-)fractions on lipid accumulation, lipolysis, and PDE activity, which represent some parts of human lipid metabolism.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals and Reagents

All chemicals and reagents used were of analytical grade. Adenosine monophosphate (AMP), and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) were purchased from Alexis Biochemicals (Lörrach, Germany); barium hydroxide octahydrate ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ), caffeine, Oil Red O, phosphodiesterase (PDE) 3B (recombinant, EC3.1.4.17), resazurin sodium salt, saponine, and butanol ( $\text{BuOH}$ ) were in HPLC grade from Sigma Aldrich (Steinheim Germany); [2,8- $^3\text{H}$ ]-3'5'-cyclic adenosine monophosphate ammonium salt, 37 MBq/mL, was from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) was obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), and resveratrol was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Formaldehyde solution of 37%; magnesium chloride hexahydrate ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ); zinc sulphate heptahydrate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); and the standards of cyanidin-3-glucoside, quercetin-3-glucoside, chlorogenic acid, and punicalin were ordered from Merck (Darmstadt, Germany). Isopropanol and *tert*-butyl methyl ether (*t*BME) in HPLC grade were purchased from Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Germany);

dimethyl sulfoxide (DMSO) was from J&K Scientific (Pforzheim, Germany). Acetonitrile (ACN) was purchased in HPLC and LC-MS grade from Honeywell Specialty Chemicals (Seelze, Germany), and methanol (MeOH) was in HPLC grade from VWR Chemicals (Darmstadt Germany). The mouse embryo 3T3-L1 cell line was obtained from Zenbio (Research Triangle Park, NC, USA). Cell culture consumable materials were obtained from Greiner Bio-One (Essen, Germany). The cinnamtannin A2 standard (epicatechin tetramer) was obtained from PhytoLab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Germany).

## 2.2. Samples

All extracts were generated using Amberlite® XAD-7 adsorber resin from Sigma Aldrich (Steinheim Germany). The extracts were obtained from authentic juice concentrates from commercial sources: chokeberry with a °Brix of 65.4 and a juice dilution of 18 °Brix, cranberry with 49.8 °Brix and juice dilution of 8.8 °Brix, and pomegranate with 64.5 °Brix and a juice dilution of 15 °Brix.

## 2.3. XAD-7 Extraction

About 2 L of the juice concentrates were applied onto an Amberlite® XAD-7 column. The column was washed with 4 L of water. The retained phenolic compounds were eluted with 2 L of a mixture of methanol/water (19/1 *v/v*). Solvents were evaporated under reduced pressure at 40 °C, and the XAD-7 extracts were freeze-dried with a Beta 2-8 LD plus from Christ (Osterode, Germany).

## 2.4. Fractionation by Membrane Chromatography

A Sartobind S IEX 150 mL cellulose membrane (Sartorius, Göttingen, Germany) was used to separate the anthocyanins from the copigments and other phenolic compounds, which will further collectively be called “copigment fraction”. The XAD-7 extracts (approx. 6 g) were dissolved in 1 L of methanol/acetic acid (19/1 *v/v*). The membrane was washed with 2 L of NaOH (1 N) and equilibrated with 2 L of HCl (0.01 N) and 1.5 L of methanol/acetic acid (19/1 *v/v*). Then, the membrane adsorber was loaded with the dissolved extracts. The copigment fractions were eluted with a further liter of methanol/acetic acid (19/1 *v/v*). The retained anthocyanins were eluted with 1 L of a mixture of aqueous NaCl solution (1 N) and methanol (1/1 *v/v*). The membrane was washed with 2 L of NaOH (1 N) and equilibrated with a mixture of aqueous NaCl solution (0.1 N) and ethanol (8/2 *v/v*). The solvent of the copigment fractions were removed in vacuo, and the residue was freeze-dried. For removal of NaCl from the liquid anthocyanin fraction, a further extraction with Amberlite XAD-7 had to be carried out [23] (see Section 2.3).

## 2.5. Precipitation of the Polymer Polyphenols

Polymer compounds can be precipitated by lipophilic solvents such as hexane. Therefore, the extract must first be solubilized in a hydrophilic solvent such as ethanol. With constant stirring of the dissolved sample, hexane is slowly added dropwise into the solution, so that the polymers precipitate. To some extent, hexane also precipitates the monomers, so that the correct ratio has to be found for each single sample. The precipitate can then be filtered off, the solvents evaporated, and then the precipitate (polymer fraction) can be freeze-dried [24]. The following ratios were used for the precipitation step: chokeberry extract with ethanol/hexane (4/3 *v/v*), cranberry extract with ethanol/hexane (1/1 *v/v*), and pomegranate extract with ethanol/hexane (2/1 *v/v*).

## 2.6. HPLC-ESI-MS/MS Parameters for Identification

The HPLC was from Agilent (Waldbronn, Germany). Pump: Agilent 1100 G1312A binary pump; autosampler: Agilent 1200 G1321B ALS SL; detector: Agilent 1100 G1315B DAD. The software used was Bruker HyStar V. 3.2 (Bremen, Germany), and the mass spectrometer was from Bruker (HCT Ultra Ion Trap with electrospray ionization). The column was an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 3.5 mm × 150 mm (3.5 µm). The flow rate



was 0.4 mL/min at a temperature of 40 °C, with solvent system A = 0.5% formic acid and B = acetonitrile and a gradient as follows: 0 min 1% B, 8 min 1% B, 15 min 5% B, 40 min 20% B, 45 min 30% B, 50 min 95% B, 55 min 1% B, and 60 min 1% B. Compound identification was done by the isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 600 nm and the DAD chromatogram at a wavelength of  $\lambda$  520 nm for anthocyanins and  $\lambda$  320 nm and  $\lambda$  360 nm for the copigments, as well as by mass spectra data.

#### 2.7. UHPLC-DAD-Parameters for Quantification

The pump, autosampler, column oven, and DAD detector were from Agilent (Waldbronn, Germany) and belong to the Agilent 1290 Infinity II series; the software was Agilent Open Lab CDS, ChemStation edition, version B.04.03-Sp2. The injection volume was 5  $\mu$ L, and the measured wavelength was from 200–700 nm. The column was an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 3.5 mm  $\times$  150 mm (1.8  $\mu$ m).

The conditions for all measurements, with the exception of polymers, were as follows: the flow rate was 0.55 mL/min and the temperature 45 °C. Solvent system A was 0.5% formic acid, and B was 100% acetonitrile with the following gradient: 0 min 1% B, 19 min 5% B, 23 min 30% B, 25 min 95% B, 27 min 95% B, 28 min 1% B, and 30 min 1% B. Quantification was performed with different calibration curves: with cyanidin-3-glucoside for anthocyanins at a wavelength of  $\lambda$  520 nm, with quercetin-3-glucoside for flavonoids at a wavelength of  $\lambda$  360 nm, with chlorogenic acid for phenolic acids at a wavelength of  $\lambda$  320 nm, and with punicalin for hydrolyzable tannins at a wavelength of  $\lambda$  360 nm.

The conditions for polymers were a flow rate of 0.5 mL/min, a temperature of 35 °C, and solvent A was 2% formic acid, and solvent B 100% acetonitrile with the following gradient: 0 min 5% B, 10 min 5% B, 30 min 20% B, 32 min 40% B, 38 min 60% B, 40 min 70% B, 42 min 80% B, 44 min 100% B, 46 min 100% B, 47 min 5% B, and 55 min 5% B. Quantification was performed with a calibration curve of cinnamtannin A2 at a wavelength of  $\lambda$  280 nm.

#### 2.8. High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)

The HPCCC was a Spectrum 13,020,203 Centrifuge, Dynamic Extractions Ltd. (Berkshire, UK) with a coil volume of 120 mL and an injection volume of 5 mL. The fractionations were performed at a rotation speed of 1600 rpm and in head-to-tail mode, the flow rate was 3 mL/min, and the detection took place at a wavelength of  $\lambda$  320 nm. Fractions were collected every 2 min.

The solvent system for the cranberry copigment fraction was *t*BME/ACN/H<sub>2</sub>O (2/2/3 *v/v/v*). The solvent system for the pomegranate copigment fraction was *t*BME/BuOH/ACN/H<sub>2</sub>O (4/2/3/8 *v/v/v/v*) + 0.1% TFA. The HPCCC fractionation of the cranberry copigment fraction extract had to be repeated about seven times because of the small amount of 300 mg that could be injected in order to obtain good fractionation. The separation of the pomegranate copigment fraction was repeated 28 times. The coil fraction was the liquid solution that remained in the HPCCC after completion of the separation.

#### 2.9. 3T3-L1 Cell Culture, Differentiation, and Treatment

The 3T3-L1 preadipocytes were grown in preadipocyte medium (Zenbio, Research Triangle Park, NC, USA), and the culture was maintained at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% relative humidity.

Due to their potential to differentiate from fibroblasts to adipocytes, 3T3-L1 cells are widely used for studying lipid metabolism. Therefore, cells were grown in 48-well plates (lipid accumulation assay) or 96-well plates (lipolysis assay and alamarBlue assay) at an initial density of  $0.9 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Two days post-confluence, the differentiation of the preadipocytes was stimulated by changing the medium to a differentiation medium (Zenbio, Research Triangle Park, NC, USA). After 4 days, the medium was replaced with adipocyte medium (Zenbio, Research Triangle Park, NC, USA). The medium was refreshed

at either three- or four-day intervals thereafter until analysis was performed 14 days after differentiation.

For determination of lipid accumulation, the differentiating 3T3-L1 cells were incubated with the fractions or subfractions ( $c = 10\text{--}50 \mu\text{g/mL}$ : chokeberry and cranberry;  $c = 5\text{--}25 \mu\text{g/mL}$ : pomegranate) for 14 days. For the lipolysis experiments, the differentiated adipocytes (14 days post-differentiation) were incubated with the fractions or subfractions at concentrations of  $1\text{--}4 \text{ mg/mL}$  for 3 h. Fractions and subfractions were dissolved in DMSO.

#### 2.10. Cytotoxicity (Alamarblue Assay)

Cytotoxicity was determined with the alamarBlue assay, which is used to measure metabolic activity by the reduction of resazurin to resorufin (fluorescent). Thus, cell viability is proportional to cell growth and mitochondrial integrity [25]. After incubation with the fractions or subfractions, either for 14 days (as in the lipid accumulation assay) or for 3 h (as in the lipolysis assay; see Section 2.9), the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and treated for 1 h with serum-free medium (200  $\mu\text{L}$ ) containing 10% resazurin solution. Fluorescence was measured by a microplate reader (Synergy 2, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany; ex 530 nm, em 590 nm, 37 °C). Saponine (0.1%) was used as a positive control. Results were expressed as relative cell viability as a percentage of that of the solvent control (DMSO).

#### 2.11. Determination of Lipid Accumulation by Oil Red O Staining

The lipid content in the differentiated 3T3-L1 adipocytes was determined using the Oil Red O staining method, according to the method published by Kowalska et al. [21] with slight modifications. Briefly, the cells were washed with PBS after incubation, fixed in 250  $\mu\text{L}$  formalin (10%) for 1 h, and washed with 60% isopropanol. The cells were then incubated with 100  $\mu\text{L}$  Oil red O staining solution (0.21% in 60% isopropanol) for 10 min at room temperature, washed with water to remove unbound dye, and left to dry. Fat droplets, stained red, were extracted from cells using 375  $\mu\text{L}$  100% isopropanol, and the absorbance was measured at a wavelength of 520 nm with a microplate reader (Sirius HT, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). Resveratrol ( $c = 11.4 \mu\text{g/mL}$  and  $22.8 \mu\text{g/mL}$ ) was used as a positive control, according to Fischer-Posovsky et al. [26]. Lipid accumulation is presented as the percentage of the solvent control (DMSO; final concentration 0.1%).

#### 2.12. Lipolysis Assay

Free fatty acid amounts were used as an indicator of adipocyte lipolysis and determined by using the Lipolysis Assay Kit for 3T3-L1 cells (Zenbio, Research Triangle Park, NC, USA), following the manufacturer's instructions. Values were corrected by the self-absorption of the test substances. Data are expressed as FFAs released in comparison to that of the solvent control (DMSO; final concentration 1%).

#### 2.13. The cAMP-Specific PDE Activity Assay

The inhibitory effect of each fraction and subfraction on cAMP-specific PDE 3B was measured according to the method published by Pösch et al. [27] with slight modifications [28]. Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of the sample (five concentrations depending on the inhibition strength) and 20  $\mu\text{L}$  of PDE 3B (200 Units/mL) were incubated for 15 min at 4 °C. After adding 50  $\mu\text{L}$  of cAMP mix (30 mM Tris/HCl pH 7.4, 9 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM 5'-AMP, 3  $\mu\text{M}$  cAMP, and 96.2 kBq/mL [2,8- $^3\text{H}$ ]-cAMP), the mixture was incubated for 25 min at 37 °C to allow the reaction. The enzyme reaction was stopped by adding 250  $\mu\text{L}$  of  $\text{ZnSO}_4$  (0.266 M) on ice. [ $^3\text{H}$ ]-5'-AMP was then precipitated by adding 250  $\mu\text{L}$  of  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (0.266 M). The tubes were then centrifuged at  $13,000 \times g$  for 9 min at 25 °C, 450  $\mu\text{L}$  of the supernatant was mixed with 3.5 mL of a scintillation cocktail, and the resulting radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1410, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Samples

were dissolved in DMSO (final concentration of 1%) or in assay buffer. Caffeine, the non-specific PDE 3B inhibitor, served as a positive control. The experiments were performed in triplicate, and the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were determined after at least three independent experiments.

#### 2.14. Statistical Analysis

The results of the in vitro assays were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments. Statistical analyses were conducted using the Analysis Tool Excel of Microsoft 365 Apps for Enterprise (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and Origin 2020 (OriginLab, Northampton, MA, USA). The data of samples treated with fractions or subfractions were analyzed for significant differences ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ ) compared to the solvent-treated control by a Student's *t*-test (one-sided).

### 3. Results

#### 3.1. Fractionation of the Extracts of Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate by Membrane Chromatography

First, extracts (see Section 2.1) were prepared from concentrates. These extracts contained polyphenolic compounds and were free of carbohydrates, minerals, and other components interfering with the assays used. The amount of dilution depended on the °Brix values, which were determined for each fruit juice by the Official Journal of the European Union [29]. The °Brix values correlated with the sugar content. The concentrates had an extract content and a calculated content for juice dilution, as shown in Table 1.

**Table 1.** Polyphenol content in the fruit concentrates of chokeberry, cranberry, and pomegranate and also calculated for the juice dilution at reduced °Brix levels.

Concentrate	°Brix of Juice Concentrate	Polyphenolic Content of Juice Concentrates in g/100 mL	°Brix of Juice Dilution	Polyphenolic Content in Juice in g/100 mL
Chokeberry	65.4	4.08	18.0	1.12
Cranberry	49.8	1.39	8.8	0.25
Pomegranate	64.5	2.31	15.0	0.54

Chokeberry revealed the highest polyphenolic content, with 4.08 g/100 mL, followed by pomegranate, with 2.31 g/100 mL, and cranberry, with 1.39 g/100 mL.

The next step was the fractionation of the extracts by membrane chromatography into the anthocyanin and copigment fractions (see Section 2.2). In this process, polymeric compounds were almost removed. The contents of anthocyanins and copigments in the extracts are shown in Table 2.

**Table 2.** Contents of anthocyanins and copigments in the extracts and total recovery.

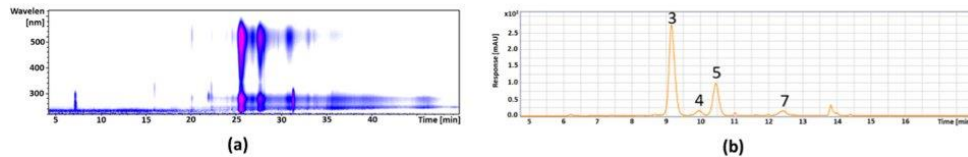
Extract	Anthocyanin Content in g/100 g	Copigment Content in g/100 g	Recovery in g/100 g
Chokeberry	47.9	39.6	87.5
Cranberry	17.7	72.2	89.9
Pomegranate	14.4	79.8	94.2

#### 3.2. Qualification and Quantification of Polyphenolic Compounds in Anthocyanin and Copigment Fractions

##### 3.2.1. Chokeberry

The identification of the polyphenols in the extracts was carried out using HPLC-ESI-MS/MS (see Section 2.3) and the quantification using UHPLC-DAD (see Section 2.4). Figure 2 shows the isocontour plot and the DAD chromatogram of the chokeberry anthocyanin fraction. Peak identification and quantification are provided in Table 3. The isocontour plot and the DAD chromatogram of the chokeberry copigment fraction are

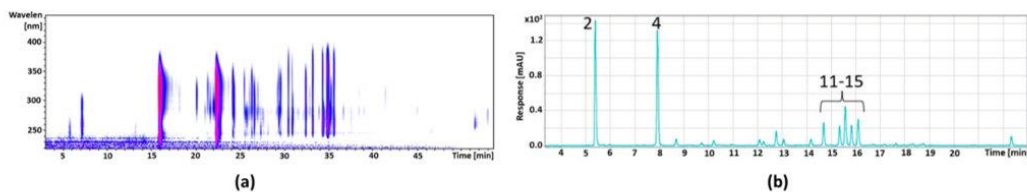
presented in Figure 3, and the peak identification and quantification are in Table 4. Compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [30,31].



**Figure 2.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 600 nm (a) and a DAD chromatogram of UHPLC separation at a wavelength of  $\lambda$  520 nm (b) from the chokeberry anthocyanin fraction. The numbers are defined in the Table of the HPLC-ESI-MS/MS data (Table 3).

**Table 3.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in the UHPLC-DAD chromatogram, and quantification with a calibration curve of cyanidin-3-glucoside as an equivalent of the chokeberry anthocyanin fraction. Compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [30,31].

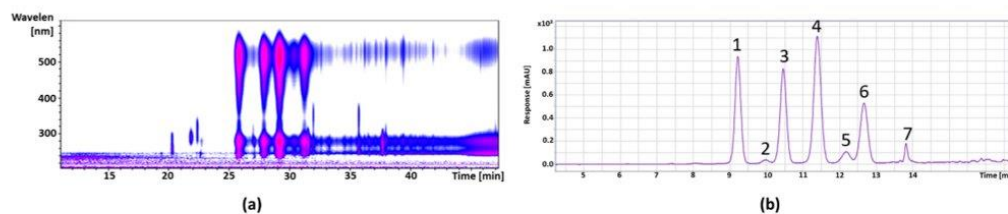
Peak No.	Retention Time (min)	[M-H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Concentration (mg/g)
1	6.2	737	575, 287	522	Cyanidin-3-hexoside-(epi)catechin	3.44 ± 0.09
2	7.4	707	575, 287	523	Cyanidin-3-pentoside-(epi)catechin	2.11 ± 0.05
3	9.1	449	287	515	Cyanidin-3-galactoside *	328.26 ± 6.12
4	9.9	449	287	515	Cyanidin-3-glucoside *	18.06 ± 1.07
5	10.5	419	287	515	Cyanidin-3-araboside *	120.93 ± 4.71
6	12.4	419	287	517	Cyanidin-3-xyloside	23.20 ± 0.52
7	13.8	491	287	520	Cyanidin-derivative	17.69 ± 0.43



**Figure 3.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 450 nm (a) and a DAD chromatogram of UHPLC separation at a wavelength of  $\lambda$  360 nm (b) from the chokeberry copigment fraction. The numbers are defined in the Table of the HPLC-ESI-MS/MS data (Table 4).

### 3.2.2. Cranberry

Figure 4 shows the isocontour plot and the DAD chromatogram of the cranberry anthocyanin fraction, whereas the peak identification and quantification are provided in Table 5. In Figure 5, the isocontour plot and the DAD chromatogram of the cranberry copigment fraction are shown. In Table 6, a summary of the peak identification and quantification is provided. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [32].



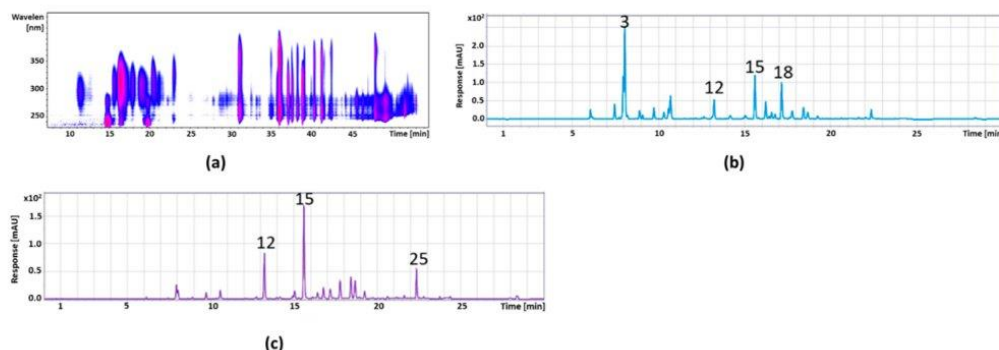
**Figure 4.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 600 nm (a) and a chromatogram of UHPLC-DAD separation and detection at a wavelength of  $\lambda$  520 nm (b) of the cranberry anthocyanin fraction.

**Table 4.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in UHPLC-DAD chromatogram, and concentrations calculated with a calibration curve as chlorogenic acid equivalents, for phenolic acids, or as quercetin-3-glucoside equivalents, for flavonols, in the chokeberry copigment fraction. Compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [30,31].

Peak No.	Retention Time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Concentration (mg/g)
1	3.6	153	109	295	Protocatechuic acid	0.29 ± 0.04
2	5.4	353	191,179,135	323	Neochlorogenic acid *	133.16 ± 4.35
3	7.1	461	337, 297, 275	310	Coumaroylquinic acid ester	3.49 ± 0.15
4	7.9	353	191, 179, 161	324	Chlorogenic acid *	118.90 ± 0.05
5	8.7	353	191	324	Cryptochlorogenic acid *	7.11 ± 0.41
6	9.7	367	335, 161, 132	323	Feruloylquinic acid	2.20 ± 0.08
7	10.2	595	385, 335, 235, 209	279	Unknown	7.27 ± 0.16
8	12.1	625	301	351	Quercetin-dihexoside	4.68 ± 0.25
9	12.7	625	301	349	Quercetin-dihexoside	10.01 ± 0.42
10	14.2	367	179, 135	-	Feruloylquinic acid	5.37 ± 0.27
11	14.7	595	301, 179, 151	352	Quercetin-3-vicianoside	15.39 ± 0.82
12	15.3	609	301	351	Quercetin-3-robinobioside	13.52 ± 0.79
13	15.5	609	301	349	Quercetin-3-rutinoside *	28.53 ± 1.03
14	15.8	463	301, 179	352	Quercetin-3-galactoside	13.95 ± 0.57
15	16.1	463	301, 151	352	Quercetin-3-glucoside *	18.83 ± 0.63
16	22.3	301	179, 151	-	Quercetin *	6.01 ± 0.18

**Table 5.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in the UHPLC-DAD chromatogram, and concentrations calculated with a calibration curve as cyanidin-3-glucoside equivalents of the cranberry anthocyanin fraction. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [32].

Peak No.	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Concentration (mg/g)
1	9.2	449	287	515	Cyanidin-3-galactoside *	97.59 ± 5.11
2	9.9	449	287	524	Cyanidin-3-glucoside *	3.77 ± 0.23
3	10.5	419	287	516	Cyanidin-3-arabinoside *	92.97 ± 5.09
4	11.4	463	301	516	Peonidin-3-galactoside	141.96 ± 6.05
5	12.2	463	301	520	Peonidin-3-glucoside *	14.09 ± 0.87
6	12.7	433	301	516	Peonidin-3-arabinoside	70.72 ± 4.36
7	13.9	463	331	528	Malvidin-3-arabinoside	9.77 ± 0.48



**Figure 5.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 450 nm (a) and a DAD chromatogram of the UHPLC separation at a wavelength of  $\lambda$  320 nm (b) and  $\lambda$  360 nm (c) from the cranberry copigment fraction.

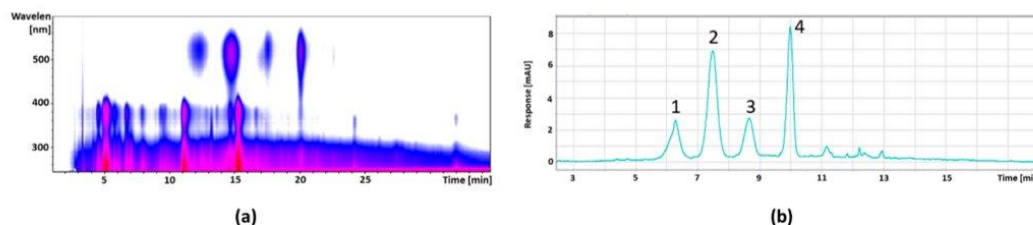
**Table 6.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in the UHPLC-DAD chromatogram, and concentrations calculated with a calibration curve as chlorogenic acid equivalents, for phenolic acids, or as quercetin-3-glucoside equivalents, for flavonols, of the cranberry copigment fraction. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [32].

Peak No.	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Concentration (mg/g)
1	6.0	341	179, 135	313	Caffeic acid hexoside	3.68 ± 0.12
2	7.4	325	163, 145, 117	315	Coumaric acid hexoside	6.75 ± 0.33
3	8.0	325	163, 145, 117	322	Coumaric acid hexoside	62.89 ± 3.91
4	8.8	353	191	322	Chlorogenic acid *	4.00 ± 0.15
5	9.1	355	193	328	Ferulic acid *	1.67 ± 0.09
6	9.7	577	407	308	Proanthocyanidin dimer	5.83 ± 0.34
7	10.3	385	223	294	Sinapic acid hexoside	3.41 ± 0.23
8	10.5	335	179	325	Caffeoylshikimic acid	4.94 ± 0.30
9	10.7	337	191	312	Coumaroylquinic acid	13.98 ± 0.68
10	12.6	863	711	310	Proanthocyanidin trimer	1.17 ± 0.09
11	13.2	479	316	354	Myricetin-hexoside	49.77 ± 1.87
12	13.9	449	316	354	Myricetin-xyloside	1.77 ± 0.10
13	14.1	493	330	357	Laricitrin-hexoside	2.27 ± 0.16
14	15.0	535	371	351	Coumaroyl Iridoid hexoside	8.95 ± 0.41
15	15.6	463	301	352	Quercetin-hexoside	104.73 ± 4.55
16	16.4	463	301	355	Quercetin-hexoside	6.71 ± 0.35
17	16.7	433	301	351	Quercetin-pentoside	13.78 ± 0.34
18	17.2	433	301	350	Quercetin-pentoside	60.66 ± 0.72
19	17.7	433	301	351	Quercetin-pentoside	21.13 ± 0.19
20	18.4	447	301	346	Quercetin-rhamnoside	25.35 ± 0.22
21	18.6	507	344	352	Syringetin-hexoside	24.06 ± 0.21
23	19.2	317	179	368	Myricetin *	8.32 ± 0.10
23	20.6	447	314	355	Isorhamnetin-pentoside	2.14 ± 0.10
24	21.6	477	344	351	Syringetin-pentoside	2.58 ± 0.11
25	22.3	301	179	368	Quercetin *	30.71 ± 0.87

### 3.2.3. Pomegranate

Figure 6 shows the isocontour plot and the DAD chromatogram of the pomegranate anthocyanin fraction; the peak identification and quantification are given in Table 7. Next follows the isocontour plot and the DAD chromatogram of the pomegranate copigment

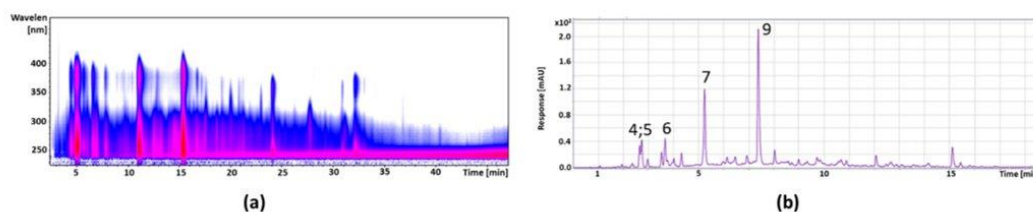
fraction in Figure 7 and the peak identification and quantification in Table 8. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic reference (marked with \*), and literature data [33,34].



**Figure 6.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 600 nm (a) and a DAD chromatogram of the UHPLC separation at a wavelength of  $\lambda$  520 nm (b) from the pomegranate anthocyanin fraction.

**Table 7.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified anthocyanins and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in the UHPLC-DAD chromatogram, and concentrations calculated with a calibration curve as cyanidin-3-glucoside equivalents of the pomegranate anthocyanin fraction. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [33,34].

Peak No.	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Anthocyanin	Concentration (mg/g)
1	6.3	627	303	523	Delphinidin-3,5-diglucoside	8.01 ± 0.29
2	7.5	611	287	514	Cyanidin-3,5-diglucoside *	22.51 ± 0.36
3	8.6	595	271	514	Delphinidin-3-glucoside *	7.36 ± 0.25
4	10.0	449	287	517	Cyanidin-3-glucoside *	16.89 ± 0.31



**Figure 7.** Isocontour plot of the HPLC-ESI-MS/MS analysis from  $\lambda$  200 to 500 nm (a) and a DAD chromatogram of UHPLC separation at a wavelength of  $\lambda$  360 nm (b) from the pomegranate copigment fraction.

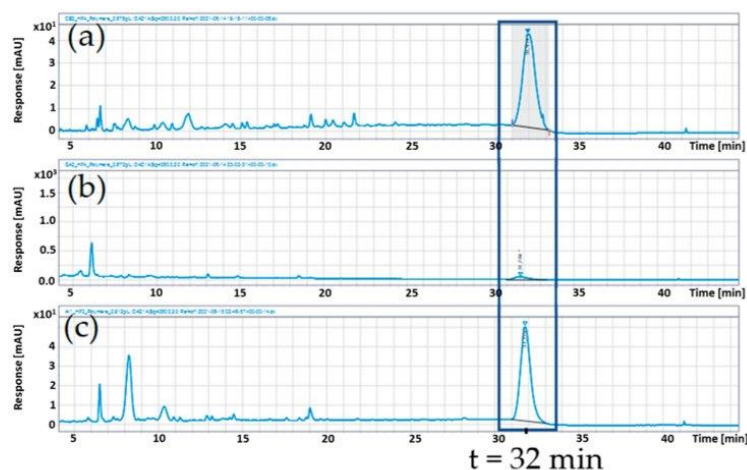
### 3.3. Polymer Content of the Extracts of Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate

The polymer content was determined by hexane precipitation. Figure 8 shows the UHPLC-chromatograms after precipitation. The polymers were quantified with a calibration curve as cinnamtannin A2 equivalents, which is an epicatechin tetramer. Table 9 lists the polymer contents in the precipitates as well as in the original extracts.

**Table 8.** HPLC-ESI-MS/MS data, identified copigments and their absorption maxima  $\lambda_{\max}$ , retention time of the compounds in the UHPLC-DAD chromatogram. And concentrations calculated with a calibration curve as punicalin equivalents, for hydrolyzable tannins, or as quercetin-3-glucoside equivalents, for flavonols, of the pomegranate copigment fraction. The compounds were identified by mass spectral data, comparisons with authentic references (marked with \*), and literature data [33,34].

Peak No.	Retention Time (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Fragments m/z	$\lambda_{\max}$	Copigment	Concentration (mg/g)
1	1.9	783	721, 601	377	Pedunculagin I	1.96 ± 0.11
2	2.1	1101	781, 601	377	Punicalin-derivative	9.77 ± 0.35
3	2.4	649	605, 301		Trisgalloyl-glucoside	7.15 ± 0.31
4	2.6	781	601, 271	378	Punicalin I *	40.36 ± 1.09
5	2.7	781	601, 299	377	Punicalin II *	53.44 ± 1.18
6	4.01	933	451	372	Galloyl-O-punicalin	37.17 ± 0.82
7	5.2	1083	601		Punicalagin I *	141.51 ± 3.60
8	6.9	951	907	373	Granatin B	12.25 ± 0.44
9	7.4	783	299, 601	376	Pedunculagin II	259.56 ± 10.79
10	8.0	469	425	371	Valonic acid bilactone	20.63 ± 0.58
11	8.3	951	783	377	HHDP-valoneoyl-glucoside	2.75 ± 0.14
12	8.6	799	301	376	Ellagic acid derivative	7.21 ± 0.26
13	8.9	1085	451	375	Digalloyl-galloyl-hexoside	1.96 ± 0.08
14	9.2	799	301	375	Granatin A	2.12 ± 0.09
15	9.3	325	145	312	Coumaric acid hexoside	6.31 ± 0.22
16	9.7	801	347	365	Digalloyl-HHDP-glucuronide	3.21 ± 0.20
17	9.8	449	287	322	Dihydrokaempferol-hexoside	7.81 ± 0.34
18	10.5	355	193	327	Ferulic acid hexoside	5.81 ± 0.29
19	10.7	633	301	370	Galloyl-HHDP-glucoside	9.59 ± 0.42
20	10.8	635	465	322	Tri-O-galloyl-glucoside	14.11 ± 0.57
21	12.1	463	301	360	Ellagic acid hexoside	29.09 ± 0.78
22	12.6	953	301	332	Galloyl-bis-HHDP-glucoside	12.78 ± 0.36
23	15.1	447	301	360	Quercetin-3-rhamnoside	66.68 ± 0.54
24	15.4	301	229	366	Ellagic acid *	13.53 ± 0.35

HHDP = hexahydroxydiphenic acid.



**Figure 8.** UHPLC-DAD chromatograms at  $\lambda$  280 nm of the polymer fractions of cranberry (a), pomegranate (b), and chokeberry (c) extracts, with the polymer peak at a retention time of 32 min.



**Table 9.** The polymer content of the precipitates and of the extracts from chokeberry, cranberry, and pomegranate, calculated as cinnamtannin A2 equivalents with a calibration curve.

	Polymer Content (g/100 g)	
	Polymer Fraction after Precipitation	Extract
Chokeberry	37.85 ± 0.67	14.62 ± 0.05
Cranberry	41.23 ± 0.51	18.12 ± 1.03
Pomegranate	5.31 ± 0.12	2.60 ± 0.04

The hexane precipitates only enriched the polymers, because there was always a balance between monomers, oligomers and polymers, but compared to the extracts, an accumulation took place after the precipitation. The cranberry extract showed the highest polymer content after precipitation with 41.2 g/100 g, followed by chokeberry extract with 37.8 g/100 g. The pomegranate extract revealed a very low polymer content of 5.3 g/100 g. These values are to be regarded as cinnamtannin A2 equivalents, so that the actual polymer content could be higher.

#### 3.4. Effects of the Three Fractions (Anthocyanins, Copigments, and Polymers) on Cytotoxicity and Lipid Metabolism In Vitro

##### 3.4.1. Cytotoxicity

The effects on cell viability of 3T3-L1 cells after treatment with the anthocyanin, copigment, and polymer fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts were determined by the alamarBlue assay.

To evaluate non-cytotoxic concentration ranges for the lipid accumulation assay, the cells were incubated for 14 days (as in the lipid accumulation assay) with the chokeberry, cranberry (each  $c = 10\text{--}100\ \mu\text{g/mL}$ ), as well as pomegranate fractions ( $c = 5\text{--}100\ \mu\text{g/mL}$ ). All tested fractions (anthocyanins, copigments, and polymers) reduced cell viabilities in a concentration-dependent manner. A cell viability of around 80% was observed for all fractions of chokeberry and cranberry extracts at concentrations of 10–25  $\mu\text{g/mL}$  and pomegranate extract at concentrations of 5–10  $\mu\text{g/mL}$  (data not shown). In general, the pomegranate fractions showed stronger effects on cell viability than the fractions produced from chokeberry or cranberry extracts, and the cell viability decreased in the order of chokeberry  $\approx$  cranberry  $>$  pomegranate. Based on this screening, the following concentration ranges for the lipid accumulation assay were selected: the fractions of chokeberry and cranberry extract were tested in concentrations of 10–50  $\mu\text{g/mL}$  and the fractions of pomegranate extract in concentrations of 5–25  $\mu\text{g/mL}$ .

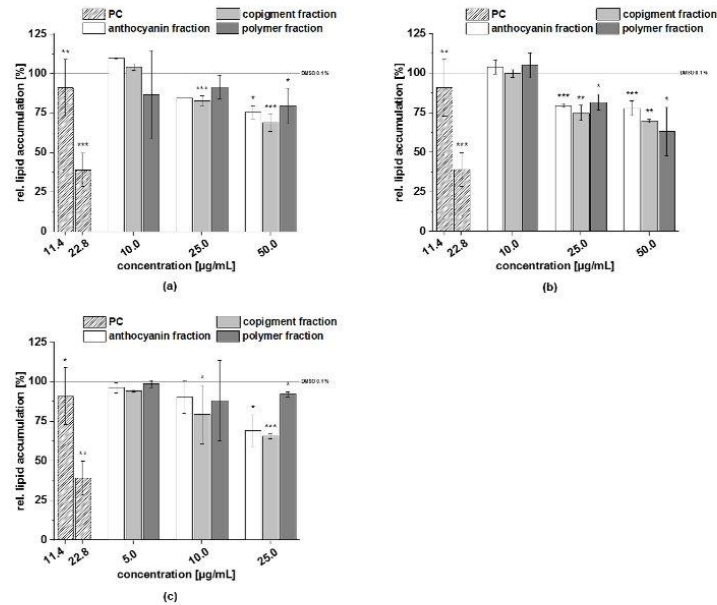
Since, for the lipolysis assay, the cells were incubated for 3 h, differentiated adipocytes (14 days post-differentiation) were treated with fractions at concentrations of 1–4 mg/mL. At lower concentrations ( $c = 1\text{--}2\ \text{mg/mL}$ ), a cell viability of 80–100% was observed, while at higher concentrations ( $c = 3\text{--}4\ \text{mg/mL}$ ; data not shown), a decrease of up to 65% was shown.

##### 3.4.2. Lipid Accumulation

Adipocyte differentiation is a process of morphological changes of preadipocytes to become differentiated adipocytes: rounded-shape cells with intracellular lipid accumulation. Therefore, the total content of lipid accumulation can indicate adipocyte differentiation and can be detected by using the Oil Red O staining technique [35].

Resveratrol can inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells [36] and was used as a positive control (PC) in this assay. The test results of the fractions (anthocyanins, copigments, and polymers) are presented in Figure 9. All fractions of the chokeberry extract did not significantly modulate lipid accumulation at a concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ ; however, the relative lipid accumulation at higher concentrations was reduced to approximately 85% ( $c = 25\ \mu\text{g/mL}$ ) and 75% ( $c = 50\ \mu\text{g/mL}$ ), respectively, compared to the solvent control (100% lipid accumulation). Dose-dependent effects were detected with the fractions of the cranberry extract. The relative lipid content was decreased by up to 63% following treat-

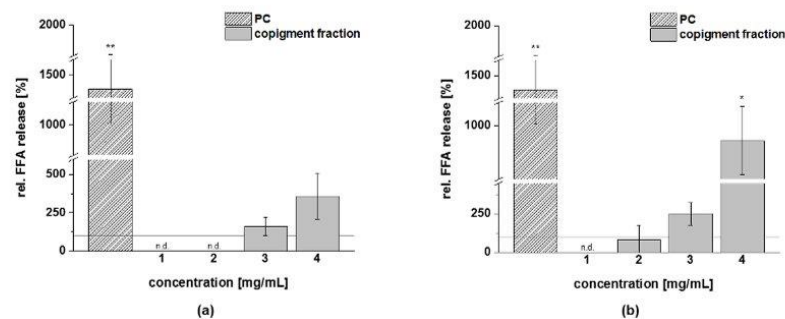
ment with the cranberry polymer fraction at a concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 9b). The pomegranate anthocyanin and copigment fractions showed similar effects on the relative lipid accumulation: both fractions ( $c = 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduced lipid content to approximately 69% and 65% compared to the control, while the polymer fraction showed just a slight effect.



**Figure 9.** Effects of the three fractions (anthocyanin, copigment, and polymer) of chokeberry (a), cranberry (b), and pomegranate (c) extracts on lipid accumulation in 3T3-L1 cells by Oil Red O staining. Fractions were added to the 3T3-L1 cell cultures at the stage of the differentiation process for 14 days at concentrations of 10–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or 5–25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The positive control (PC) was resveratrol. Data are the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3–11$ ). The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.4.3. Lipolysis

Adipocytes were incubated with the fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts to investigate whether they might reduce lipid content by increasing FFA release, which can be used as an indicator of adipocyte lipolysis. Isoproterenol was used as a positive control in this assay, since it stimulated lipolysis via beta adrenergic receptor activation and cAMP-dependent signaling [37]. The results (Figure 10) confirmed that isoproterenol stimulates lipolysis significantly. For the extract fractions under study, at a concentration of 3  $\text{mg}/\text{mL}$ , the chokeberry copigment fraction increased lipolysis in a range of 1.6-fold greater than the solvent control, and at a concentration of 4  $\text{mg}/\text{mL}$ , the FFA release was 3.6-fold greater. The cranberry copigment fraction induced FFA release in a dose-dependent manner of up to 9-fold greater than the solvent control. It could not be excluded that the effects observed in 3T3-L1 cells might have been amplified by reduced cell viability at the highest tested concentrations of the fractions. All other fractions (anthocyanin and polymer) of the extracts and the pomegranate copigment fraction did not significantly increase FFA release in comparison to the control (data not shown).

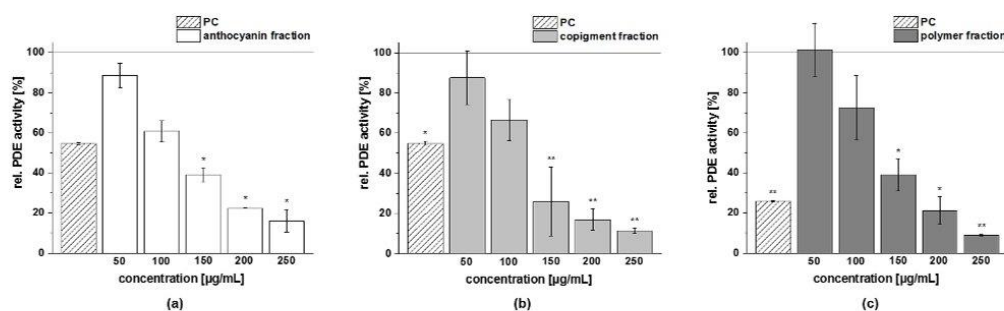


**Figure 10.** The effects of the copigment fractions of chokeberry (a) and cranberry (b) extracts on 3T3-L1 adipocyte lipolysis (FFA kit). Differentiated adipocytes were treated for three hours. The conditioned medium was removed from each well and assayed for the relative (rel.) free fatty acid (FFA) content (in percentage of solvent control). The positive control (PC) was isoproterenol (211 ng/mL). Values are expressed as means  $\pm$  standard deviation ( $n = 1-5$ ). The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . n.d. = non-determinable.

#### 3.4.4. PDE 3B Activity

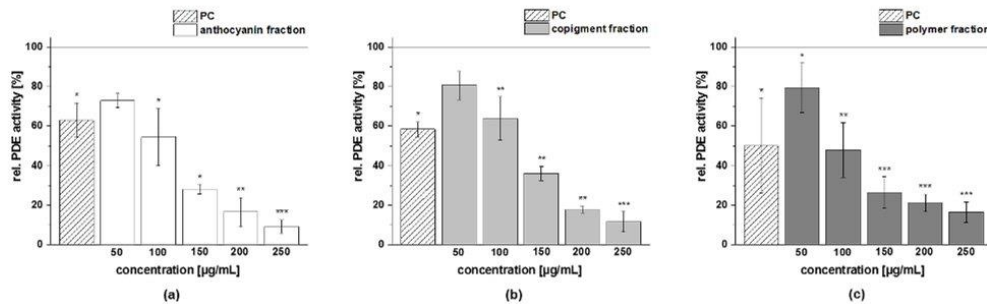
The obtained fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts were tested for their influence on cAMP-specific PDE 3B activity *in vitro*. Data are presented as the relative PDE activity in a percentage of the solvent control. Caffeine ( $c = 235 \mu\text{g/mL}$ ) was used as the positive control (PC) in this assay, since it is a well-known nonspecific PDE 3 inhibitor.

All the tested fractions showed a dose-dependent inhibition of the enzyme PDE 3B *in vitro* (Figure 11). The PDE 3B activities of the three fractions (anthocyanin, copigment, and polymer) of the chokeberry extract ( $c = 50-250 \mu\text{g/mL}$ ) were in the same concentration range. Relative PDE 3B activities of 60–80% were shown by the chokeberry fractions at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . The highest tested concentration of these fractions ( $c = 250 \mu\text{g/mL}$ ) decreased PDE activity to  $16 \pm 6\%$ ,  $11 \pm 1\%$ , and  $9 \pm 1\%$ , respectively, compared to the solvent control (Figure 11).



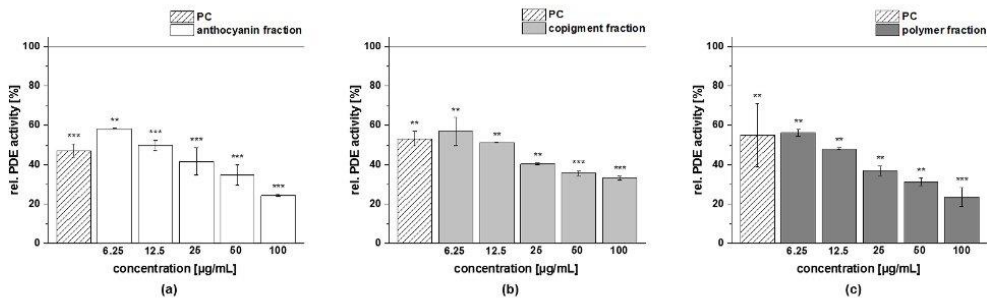
**Figure 11.** Results of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) activity inhibition after incubation with anthocyanin (a), copigment (b), and polymer (c) fractions of the chokeberry extract. The positive control (PC) was caffeine (235  $\mu\text{g/mL}$ ). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in a percentage of the solvent control) as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

A similar reduced activity of the PDE 3B enzyme activity was observed for the three fractions of the cranberry extract compared to the solvent control (Figure 12). At the 100 µg/mL concentration, the inhibitory activity of the anthocyanin, copigment, and polymer fractions were comparable to the PC caffeine (around 50% PDE activity).



**Figure 12.** Results of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) activity inhibition after incubation with anthocyanin (a), copigment (b), and polymer (c) fractions of the cranberry extract. The positive control (PC) was caffeine (235 µg/mL). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in a percentage of the solvent control) as the mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

The three fractions of the pomegranate extract showed the strongest impact on PDE 3B enzyme activity. For the anthocyanin fraction, a significantly diminished PDE activity at the lowest tested concentration ( $c = 6.25$  µg/mL) was observed, and the impact on PDE activity was comparable to those seen with the PC caffeine (around 50% PDE activity; Figure 13a). A similar tendency as for the anthocyanin fraction was observed for the pomegranate copigment and polymer fraction. The copigment fraction reduced PDE 3B activity in a dose-dependent manner from  $57 \pm 7\%$  at the lowest tested concentration ( $c = 6.25$  µg/mL) to  $33 \pm 1\%$  ( $c = 100$  µg/mL).



**Figure 13.** Results of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) activity inhibition after incubation with the anthocyanin (a), copigment (b), and polymer (c) fractions of the pomegranate extract. The positive control (PC) was caffeine (235 µg/mL). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in a percentage of the solvent control) as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. The significance of differences between sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Based on the results of the PDE 3B activity assays, a half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was calculated for each of the fractions investigated (Table 10). The fractions

(anthocyanin, copigment, and polymer) of the pomegranate extract were the most active of the tested samples, exhibiting  $IC_{50}$  values between 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The fractions of the chokeberry and cranberry extracts demonstrated a comparable inhibitory potential and revealed nearly similar effects against PDE 3B ( $IC_{50} = 94\text{--}126 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Table 10.** Half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of the three fractions (anthocyanin, copigment, and polymer) of the different extracts tested using the PDE 3B activity assay. Results are presented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3\text{--}4$ ).

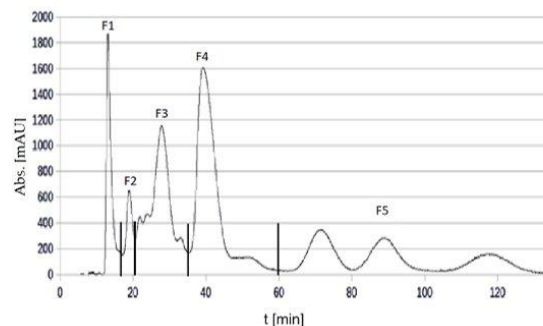
Extract	Fraction	$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
Chokeberry	anthocyanin	120 $\pm$ 6
	copigment	113 $\pm$ 15
	polymer	126 $\pm$ 13
Cranberry	anthocyanin	94 $\pm$ 13
	copigment	104 $\pm$ 10
	polymer	95 $\pm$ 20
Pomegranate	anthocyanin	13 $\pm$ 3
	copigment	12 $\pm$ 4
	polymer	10 $\pm$ 1

### 3.5. Subfractionation of the Cranberry and Pomegranate Copigment Fraction by High Performance Counter Current Chromatography (HPCCC)

Since the copigment fractions of the cranberry and pomegranate extracts showed the highest influence on lipid metabolism, both fractions were further fractionated by high performance counter current chromatography.

#### 3.5.1. Fractionation of Cranberry Copigments by HPCCC

The separation of the cranberry copigment fraction by HPCCC had to be repeated about seven times because of the small amount (300 mg) that could be injected in order to obtain a good fractionation. The total amount that had been separated was about 2.2 g. One of the HPCCC chromatograms is presented in Figure 14, and the fractionation is shown in the chromatogram.



**Figure 14.** UV-chromatogram at  $\lambda$  320 nm of the fractionation of the cranberry copigment fraction by HPCCC.

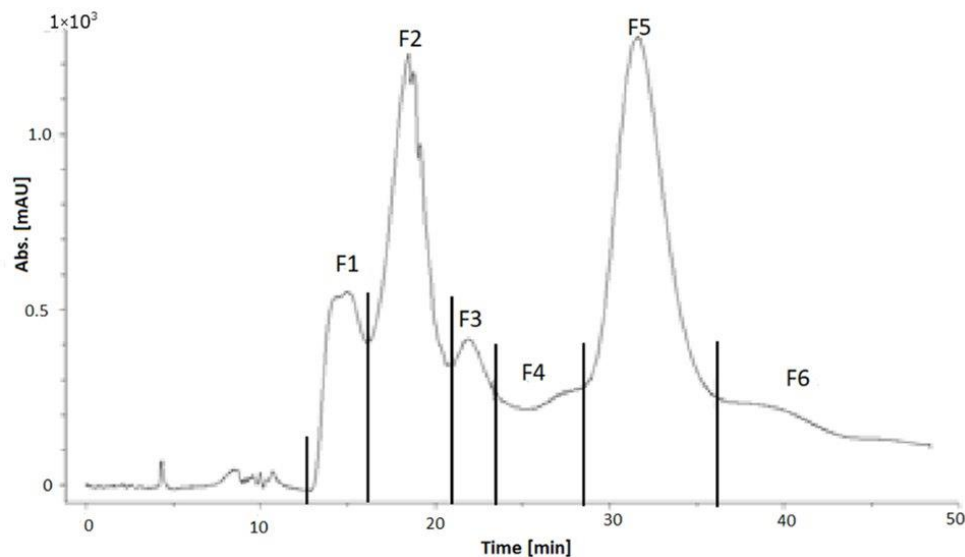
Five subfractions (F1–F5), and the so-called coil fraction, could be collected. The coil fraction was the liquid solution that remained in the HPCCC after completion of the separation and could be collected after separation. Due to the low amount, the coil fraction of the cranberry copigment separation was not further examined. The amount and yield of each fraction are given in Table 11.

**Table 11.** The amount and yield of the subfractions F1–F5 and coil fraction (F6) obtained after HPCCC separation of the cranberry copigment fraction.

Subfraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6 (Coil)	Sum
Amount (g)	0.72	0.48	0.26	0.24	0.20	0.11	2.01
Yield (%)	32.7	21.8	11.8	10.9	9.1	5.0	91.3

### 3.5.2. Fractionation of the Pomegranate Copigments by HPCCC

The separation of the pomegranate copigment fraction by HPCCC had to be repeated 28 times because, for a successful fractionation, only 200–300 mg could be injected. The total injected amount was about 6.1 g. One of the HPCCC chromatograms is presented as an example in Figure 15, and the fractionation is shown in the chromatogram. Six subfractions (F1–F6) and the coil fraction (F7) could be collected. The amount and yield of each fraction are given in Table 12.



**Figure 15.** UV-chromatogram at  $\lambda$  320 nm of the fractionation of the pomegranate copigment fraction by HPCCC.

**Table 12.** The amount and yield of subfractions obtained after HPCCC separation of the pomegranate copigment fraction.

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7 (Coil)	Sum
Amount (g)	1.08	0.58	1.03	0.90	0.34	0.83	0.66	5.42
Yield (%)	17.6	9.4	16.7	14.7	5.5	13.5	10.7	88.1

### 3.5.3. Characterization of the HPCCC Subfractions

The characterization of the HPCCC subfractions was performed by HPLC-DAD-MS/MS analyses. The identified compounds are listed in Table 13.

**Table 13.** Identified compounds in the HPCCC subfractions of the cranberry and pomegranate copigment fractionations, according to the results in Section 3.2.

Subfraction	Cranberry	Pomegranate
F1	Caffeic acid hexoside, Caffeic acid derivative, Coumaric acid hexoside, Sinapic acid hexoside	Punicalin, Pedunculagin, Punicalagin, Punicalagin like
F2	Caffeic acid hexoside, Coumaric acid hexoside, Ferulic acid hexoside, Sinapic acid hexoside, Coumaroyl Iridoid hexoside	Punicalin, Pedunculagin, Galloyl-O-punicalin, Punicalagin, Punicalagin derivative
F3	Coumaric acid hexoside, Myricetin hexosid, Coumaroyl Iridoid hexoside	Ellagic acid hexoside, Pedunculagin, Punicalagin
F4	Chlorogenic acid, Chlorogenic acid hexoside, Quercetin hexoside, Laricitrin hexoside	Ellagic acid hexoside, Pedunculagin, Galloyl-O-punicalin, Granatin A, Punicalagin
F5	Coumaric acid, Myricetin-pentosides, Proanthocyanidin dimer, Quercetin-hexosides, Quercetin	Ellagic acid hexoside, Pedunculagin, Punigluconin, HHDP-valoneoyl hexoside, Digalloyl-gallagyl hexosid
F6		Ellagic acid, Ferulic acid hexoside, HHDP hexoside, Galloyl-HHDP hexoside, Tri-O-galloyl hexoside, Pedunculagin, Digalloyl-HHDP hexoside, Granatin A, Granatin B, Galloyl-bis-HDDP hexoside
F7 (Coil)		Caffeic acid, Ellagic acid, Coumaric acid hexoside, Quercetin, Luteolin hexoside, Valonic acid dilactone, Digalloyl-HHDP hexoside, Tetra-O-galloyl hexoside, Granatin A, HHDP-valoneoyl hexoside, Granatin B

With HHDP = hexahydroxydiphenic acid.

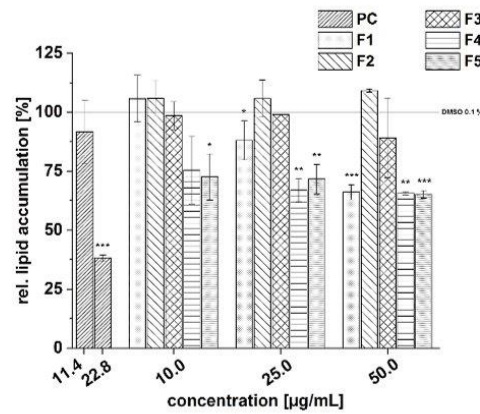
#### 3.5.4. Effects of the Subfractions of the Cranberry Copigment Fraction on Cytotoxicity and Lipid Metabolism In Vitro

First, we determined the effects on cell viability of 3T3-L1 cells after treatment with the subfractions of the cranberry copigment fraction by the alamarBlue assay. After treating 3T3-L1 cells for 14 days with subfraction F1, a dose-dependent reduction of viability in comparison to the solvent control was observed; however, when the cells were treated with concentrations of 10–50 µg/mL of the subfractions F2–F5, no significant cytotoxicity was observed (cell viability  $\geq 80\%$ ; data not shown). Based on this screening, a concentration range of 10–50 µg/mL was used for the determination of lipid accumulation.

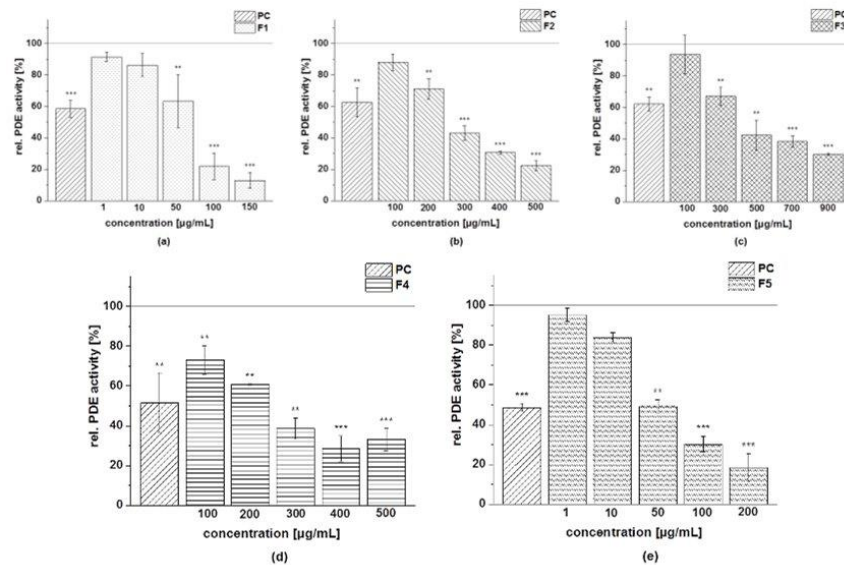
The positive control resveratrol reduced lipid accumulation significantly at a concentration of 22.8 µg/mL, compared to the solvent control. Subfractions F4 and F5 were the most active subfractions in reducing lipid accumulation (Figure 16). In the case of subfraction F1, a dose-dependent inhibition of lipid accumulation was observed. No inhibition of lipid accumulation was shown for the subfractions F2 and F3.

The five subfractions (F1–F5) of the cranberry copigment fraction did not stimulate lipolysis of differentiated adipocytes (3T3-L1 cells) by increasing FFA release (data not shown).

The results of the testing of the five subfractions of the cranberry copigment fraction on PDE 3B activity are presented in Figure 17. All compounds showed dose-dependent inhibition of the enzyme PDE 3B in comparison to the solvent control (100% PDE activity) but to varying degrees. The subfractions F1 and F5 were found to be more potent PDE inhibitors than F2 and F4, followed by subfraction F3. Nevertheless, PDE activity was also diminished in a concentration-dependent manner after treatment with F3, and a minimum activity of around 30% was observed at the highest concentration tested (900 µg/mL; Figure 17c).



**Figure 16.** Effects of the five subfractions (F1–F5) of the cranberry copigment fraction on lipid accumulation in 3T3-L1 cells by Oil Red O staining. Subfractions were added to the 3T3-L1 cell cultures at the stage of the differentiation process for 14 days at concentrations of 10–50 µg/mL. The positive control (PC) was resveratrol. Data are the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 17.** Results of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) activity inhibition after incubation with subfractions of the cranberry copigment fraction; F1 (a), F2 (b), F3 (c), F4 (d), and F5 (e). The positive control (PC) was caffeine (235 µg/mL). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in a percentage of the solvent control) as the mean  $\pm$  standard deviation of three or four independent experiments. The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

We calculated the  $IC_{50}$  values of the subfractions of the cranberry copigment fraction that we evaluated based on the results of the PDE 3B activity assay (Table 14). The sub-



fractions F1 and F5 were the most potent inhibitors, with  $IC_{50}$  values of 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , followed by F2 ( $IC_{50} = 266 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) and F4 ( $IC_{50} = 229 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). A weaker effect on PDE inhibition was shown by F3, and an  $IC_{50}$  value of 471  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was calculated.

**Table 14.** Half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of the subfractions (F1–F5) of the cranberry copigment fraction. Results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 3$ –4).

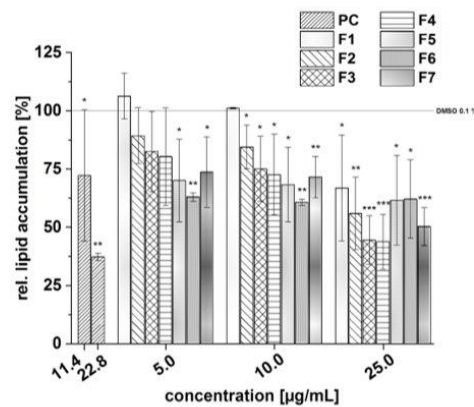
Fraction	Subfraction	$IC_{50}$ [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
Cranberry copigment fraction	F1	45 $\pm$ 15
	F2	266 $\pm$ 10
	F3	471 $\pm$ 67
	F4	229 $\pm$ 23
	F5	37 $\pm$ 7

### 3.5.5. Effects of the Subfractions of the Pomegranate Copigment Fraction on Cytotoxicity and Lipid Metabolism In Vitro

The seven subfractions (F1–F7) of the pomegranate copigment fraction were tested in the different in vitro assays, too. Since the copigment fraction of pomegranate extract did not induce FFA release in 3T3-L1 cells, we did not test the subfractions in the lipolysis assay.

There was minimal cytotoxicity of all seven subfractions treated with low concentrations ( $c = 5$ – $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), with relative viabilities  $\geq 78\%$ . Treatment with concentrations of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly decreased the viability of 3T3-L1 cells compared with the solvent control (data not shown). For the determination of lipid accumulation, the same concentration ranges of 5–25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as for the fractions of the pomegranate extract, were used for the subfractions.

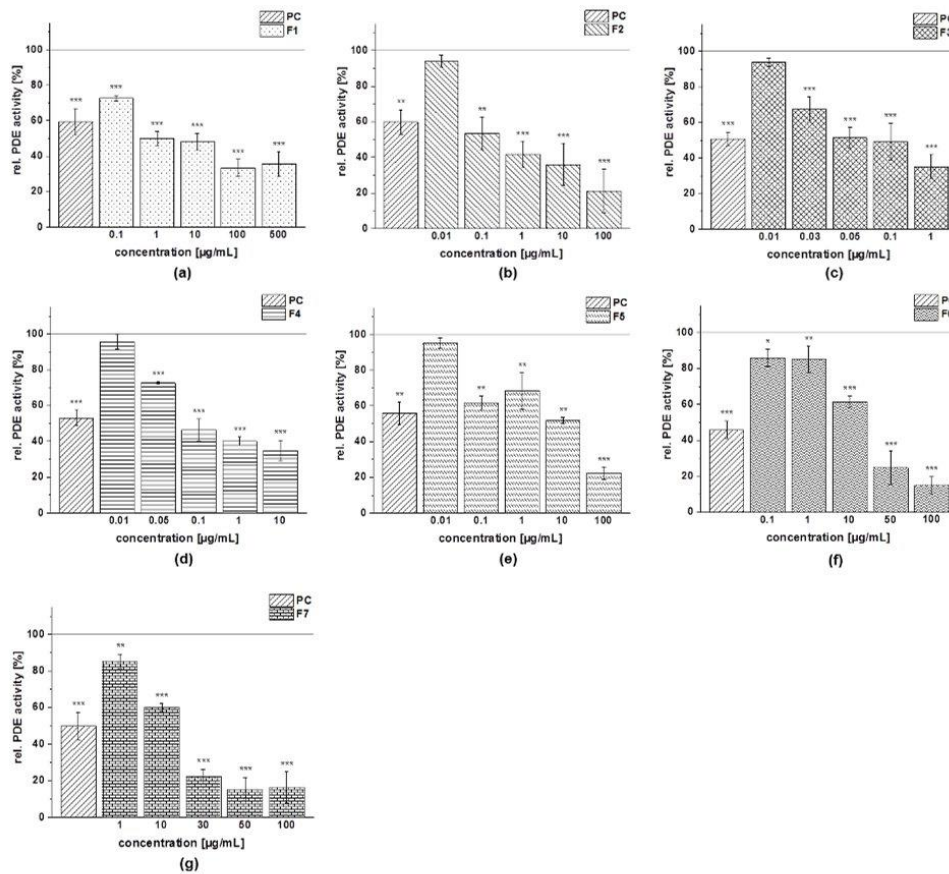
All subfractions tended to reduced lipid accumulation in 3T3-L1 cells in the following order of potency: F3  $\approx$  F4 > F2  $\approx$  F5  $\approx$  F6  $\approx$  F7 > F1 (Figure 18), respectively. The subfractions F3 and F4 showed the strongest inhibitory potential and reduced lipid accumulation to approximately 70% at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , compared to the solvent control.



**Figure 18.** Effects of the seven subfractions (F1–F7) of the pomegranate copigment fraction on lipid accumulation in the 3T3-L1 cells by Oil Red O staining. The subfractions were added to the 3T3-L1 cell cultures at the stage of the differentiation process for 14 days at concentrations of 5–25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The positive control (PC) was resveratrol. Data are the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). The significance of differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

In addition, the inhibitory effects of the subfractions of the pomegranate copigment fraction on PDE 3B activity were investigated in vitro. All tested subfractions (F1–F7)

were able to reduce PDE activity (Figure 19). Subfractions F2, F3, and F4 showed the strongest inhibitory effect, whereas a weaker impact on PDE 3B activity was observed by the subfractions F1, F5, F6, and F7. Nevertheless, PDE 3B enzyme activity was also diminished, and a minimum activity of around 15% was observed for the subfraction F7 at the highest concentration tested ( $c = 100 \mu\text{g/mL}$ ; Figure 19g).



**Figure 19.** Results of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) activity inhibition after incubation with subfractions of the pomegranate copigment fraction; F1 (a), F2 (b), F3 (c), F4 (d), F5 (e), F6 (f), and F7 (g). The positive control (PC) was caffeine (235  $\mu\text{g/mL}$ ). Data are expressed as relative (rel.) PDE activity (in a percentage of the solvent control) as the mean  $\pm$  standard deviation of three to five independent experiments. The significance of the differences between the sample and solvent control (100%) was assessed using a Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

The  $\text{IC}_{50}$  values of the subfractions of the pomegranate copigment fraction are listed in Table 15 and showed that  $\text{IC}_{50}$  values less than 10  $\mu\text{g/mL}$  were calculated. The less active ones were the subfractions F6 and F7, with  $\text{IC}_{50}$  values of 8.5  $\mu\text{g/mL}$  and 9.0  $\mu\text{g/mL}$ . The subfractions F1 ( $\text{IC}_{50} = 4.8 \mu\text{g/mL}$ ) and F5 ( $\text{IC}_{50} = 3.8 \mu\text{g/mL}$ ) showed a comparable inhibition level. All other fractions revealed nearly the same inhibitory potential against PDE, i.e., subfraction F2 ( $\text{IC}_{50}$  values of 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ), F3 (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ), and F4 (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ), respectively.

**Table 15.** Half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of the subfractions (F1–F7) of the pomegranate copigment fraction. Results are presented as means ± SD (*n* = 3–5).

Fraction	Subfraction	IC <sub>50</sub> [µg/mL]
Pomegranate copigment fraction	F1	4.8 ± 1.6
	F2	0.5 ± 0
	F3	0.2 ± 0.1
	F4	0.5 ± 0.2
	F5	3.8 ± 1.2
	F6	8.5 ± 3.0
	F7	9.0 ± 0.1

#### 4. Discussion

Within the last years, it has been reported that polyphenols can influence the lipid metabolism *in vitro* and *in vivo* [8,16,38,39]. In our previous work, extracts from red fruit juices or concentrates like cranberry, red grape, or blueberry have proven to be potent inhibitors of the enzyme PDE 3B [28]. To identify fruit juice constituents which influence lipid metabolism, a fractionation of the three most potent extracts from chokeberry, cranberry, and pomegranate was performed, and the effects of the anthocyanin, copigment, and polymer fractions in three different *in vitro* assays (lipid accumulation, lipolysis, and PDE 3B activity) were investigated.

First of all, XAD-7 extracts of commercially available concentrates from chokeberry, cranberry, and pomegranate were generated. These extracts were separated into an anthocyanin and a copigment fraction by membrane chromatography [23]. It was found that the copigment fractions made up the greater part in the extracts of cranberry, with 72.2%, and of pomegranate, with 79.8%. In the chokeberry extract, the anthocyanin fraction predominated, with 47.9%, in comparison to the copigment fraction, with 36.9%. The chokeberry anthocyanin fraction only contained cyanidin derivatives (cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside). In the copigment fraction, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, and different quercetin derivatives dominated. In the cranberry anthocyanin fraction, cyanidin-, peonidin-pentosides and -hexosides were identified. Peonidin-3-galactoside showed the highest concentration, followed by cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside. In the copigment fraction, several phenolic acids, such as feruloylquinic acid, chlorogenic acids, and coumaroylic acids, and several flavonols, such as myricetin, laricetin, quercetin, syringetin, and isorhamnetin derivatives, were present. The compounds in the copigment fraction with the highest concentration were quercetin-hexoside and coumaroyl-hexoside. The pomegranate anthocyanin fraction contained cyanidin and delphinidin mono- and diglucosides. The major compounds were cyanidin-3,5-diglucoside and delphinidin-3-glucoside. The variety of the copigments was much larger and consisted mainly of hydrolyzable tannins of epigallic and gallic acid glycosides, like pedunculagin and punicalagin. These results are in-line with previously published work [30,31,33,34,40]. The polymers were also separated from the extracts. A complete separation could not be obtained, only an enrichment of the polymers.

We could demonstrate that all the tested fractions influenced lipid metabolism by decreasing lipid accumulation and inhibition of PDE 3B activity, whereas only the copigment fractions of the chokeberry and cranberry extracts tended to increase FFA release by lipolysis. Based on the effects of the *in vitro* assay, the fractions ranked as follows: pomegranate anthocyanin fraction ≈ pomegranate copigment fraction > pomegranate polymer fraction > cranberry polymer fraction > cranberry copigment fraction ≈ cranberry anthocyanin fraction ≈ chokeberry anthocyanin fraction ≈ chokeberry copigment fraction > chokeberry polymer fraction. However, when evaluating the relevance of these results, it could not be excluded that the effects observed in 3T3-L1 cells might have been amplified by reduced cell viability at the highest tested concentrations of the fractions.

Some *in vitro* studies have also examined the effects of polyphenol-rich extracts on lipid metabolism, as well as one of our previous studies [20,28,41]. Kowalska et al. revealed

that a berry fruit extract obtained from chokeberry, raspberry, bilberry, and cranberry fruits ( $c = 25\text{--}100 \mu\text{g/mL}$ ) significantly decreased lipid accumulation in 3T3-L1 cells without showing cytotoxicity [21]. Comparable to the findings of Kowalska and coworkers, in our study, we observed a reduced lipid accumulation in 3T3-L1 cells for the fractions of chokeberry and cranberry extracts at concentrations of  $25\text{--}50 \mu\text{g/mL}$ . Dallas et al. reported that a citrus-based polyphenolic dietary supplement (containing mainly cyanidin-3-glucoside and naringin) significantly stimulated the lipolytic activity of human adipocytes (ex vivo), and it showed a strong effect on cAMP-PDE inhibition [16]. We identified cyanidin-3-glucoside in the anthocyanin fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts and observed inhibitory activities of these fractions towards PDE 3B. In addition, in our earlier study, it was demonstrated that peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-arabinoside, and cyanidin-3-glucoside could inhibit PDE 3B activity with  $\text{IC}_{50}$  values between  $120 \pm 44 \mu\text{M}$  and  $299 \pm 56 \mu\text{M}$  [28]. In this study, we identified these anthocyanins in the anthocyanin fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts and confirmed that the anthocyanin fractions are potent inhibitors of the enzyme PDE 3B.

Not only the anthocyanin fractions, but also the copigment fractions, showed a strong influence on the lipid metabolism. The anthocyanin fractions of the chokeberry and cranberry extracts contained both cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside, while in the cranberry anthocyanin fraction, additionally, peonidin-3-galactoside was identified, whereas cyanidin-3,5-diglucoside and delphinidin-3-glucoside were the major compounds in the pomegranate anthocyanin fraction. It was shown that the fruit-dependent inhibition of PDE 3B activity and lipid accumulation is mainly due to the copigments, e.g., hydrolyzable tannins, which were found in the pomegranate copigment fraction and were efficient inhibitors of PDE 3B activity and lipid accumulation, whereas for the stimulation of lipolysis via FFA release, copigments like phenolic acids and flavonols were responsible.

Since the copigment fractions of cranberry and pomegranate extract showed strong effects on lipid metabolism in vitro, these two copigment fractions were further fractionated by HPLC. Five subfractions (F1–F5) of the cranberry copigment fraction and seven subfractions (F1–F7) of the pomegranate copigment fraction were obtained. The first and second subfractions, F1 and F2, of the cranberry copigments contained mainly phenolic acids, such as caffeic acid, as well as hexosides of coumaric, ferulic, and sinapic acid. Subfraction F3 consisted of coumaric acid hexoside, myricetin hexoside, and coumaroyl iridoid hexoside, and subfraction F4 consisted of chlorogenic acid (hexoside), myricetin, and quercetin hexosides. The fifth subfraction (F5) included different quercetin derivatives, coumaric acid, and myricetin-pentosides. It was more difficult to differentiate the subfractions of the pomegranate copigment extract. Punicalin occurred in the subfractions F1 and F2, punicalagin in the subfractions F1–F4, and pedunculagin in F1–F6. Ellagic acid hexoside was found in the subfractions F3–F5 and ellagic acid in F6 and F7. The last subfractions, F6 and F7, also included phenolic acids, such as caffeic acid, ferulic acid, and coumaric acid, and subfraction F7 included the flavonoids quercetin and luteolin hexoside.

All investigated subfractions prepared from the pomegranate copigment fraction by HPLC reduced lipid accumulation in 3T3-L1 cells, whereas for the subfractions F2 and F3 of the cranberry copigment fraction, no influence on lipid accumulation was observed. The strongest inhibition of lipid accumulation could be detected for subfractions F3 and F4 of the pomegranate copigment fraction. Subfraction F3 consisted of ellagic acid hexoside, pedunculagin, and punicalagin, and subfraction F4 contained additionally granatin A and galloyl-O-punicalin. Similarly, Les et al. found that ellagic acid and punicalagin were able to reduce triglyceride accumulation in 3T3-L1 adipocytes [41]. Respectively, the strongest effects on lipid accumulation for the subfractions of the cranberry copigment fraction were shown by F1, F4, and F5. HPLC-ESI-MS/MS analysis of the HPLC subfraction F1 revealed mainly caffeic acid, coumaroyl acid, and sinapic acid hexosides, whereas subfraction F4 contained chlorogenic acid and quercetin hexoside. Quercetin derivatives were enriched in subfraction F5, and the recorded activity could be linked to these compounds. In other studies, the influence of quercetin on the lipid metabolism in vitro was observed.

Little et al. reported that a longer-term treatment for three sequential 24 h doses with low concentrations ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) of quercetin significantly lowered stored lipid content in human Simpson–Golabi–Behmel syndrome (SGBS) adipocytes [42]. In comparison to 3T3-L1 cells, SGBS expressed higher levels of adipocyte-specific transcripts during the process of differentiation, and differentiated SGBS expressed more comparable transcript levels, morphology, and biochemical functions to primary omental adipocytes [43].

The trends observed for the subfractions in the lipid accumulation assay were similar to those observed in the PDE activity assay. All investigated subfractions of the cranberry and pomegranate copigment fractions inhibited PDE 3B enzyme activity in vitro. Contrary to moderately active subfractions of the cranberry copigment fraction ( $\text{IC}_{50} = 37 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ – $471 \pm 67 \mu\text{g/mL}$ ), the subfractions of the pomegranate copigment fraction were more active, and the  $\text{IC}_{50}$  values ranged from  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  to  $9.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ . Within the cranberry copigment subfractions under study, F5 was the most potent PDE 3B inhibitor. We identified quercetin derivatives in subfraction F5 and determined an  $\text{IC}_{50}$  value of  $37 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ . Quercetin, which was tested for the effect on PDE from isolated rat adipocytes by Kuppusamy and Das, showed an inhibitory potency, with an  $\text{EC}_{50}$  value of  $32 \mu\text{M}$ , and additionally a dose-dependent increase in lipolysis was observed [15]. The subfractions F2, F3, and F4 of the pomegranate copigment fraction demonstrated the strongest PDE 3B inhibition and contained primarily ellagic acid hexoside, pedunculagin, and punicalagin. Little has been published regarding the influence of these compounds on PDE inhibition. However, in our earlier study, pomegranate extracts, in which pedunculagin and punicalagin were identified as the major copigments, were already found to be potent inhibitors of the enzyme PDE 3B [28].

Our findings showed that the tested fractions and subfractions reduce lipid accumulation, increase lipolysis by FFA release, and inhibit PDE 3B activity in vitro, which are in vitro models and represent some parts of the human lipid metabolism. Therefore, the consumption of red fruit juices from chokeberry, cranberry, and pomegranate might influence lipid metabolism and help to prevent obesity. Since we did not investigate the effects of single compounds in the three in vitro assays (lipid accumulation, lipolysis, and PDE 3B activity), we cannot fully explain any finding and mechanism being responsible for the effects influencing lipid metabolism at present and must address this matter in future studies. Moreover, it could be helpful to reach a better separation of the copigments so that it could be possible in the future to determine their biological activity with single compounds.

Taken together, we were able to fractionate extracts (activity-guided) from fruit juice concentrates and could identify compounds in the fractions and subfractions, which are crucial for the effects on the lipid metabolism. However, the use of in vitro models provides only preliminary data, so further evaluation with additional studies, preferably in vivo, is essential, for example, by performing human intervention studies that investigate different parameters of lipid metabolism.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.R. and P.W.; methodology, C.G., S.N. and H.B.; validation, C.G. and S.N.; formal analysis, C.G., H.B. and S.N.; investigation, C.G., S.N. and H.B.; resources, E.R. and P.W.; data curation, C.G., S.N. and H.B.; writing—original draft preparation, C.G., T.B., E.R., P.W. and S.N.; writing—review and editing, E.R. and P.W.; visualization, C.G. and S.N.; supervision, E.R. and P.W.; project administration, E.R. and P.W.; funding acquisition, E.R. and P.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This IGF project of the FEI was funded via AiF, within the program for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi), based on a resolution of the German Parliament, grant number AiF 20277 N.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** We thank the members of the “Projektbegleitender Ausschuss” for their constructive discussions and support. The authors gratefully acknowledge PD Gerhard Erkel for using the liquid scintillation counter. We thank D. Bohlen, J. Leidner and S. Stegmüller for their support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Williamson, G. The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutr. Bull.* **2017**, *42*, 226–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ostberg-Potthoff, J.J.; Berger, K.; Richling, E.; Winterhalter, P. Activity-guided fractionation of red fruit extracts for the identification of compounds influencing glucose metabolism. *Nutrients* **2019**, *11*, 1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Iriti, M.; Faoro, F. Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, 611–634. [[CrossRef](#)]
- Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2006; ISBN 9780470988558.
- Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 205–215. [[CrossRef](#)]
- Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094–1117. [[CrossRef](#)]
- Bakuradze, T.; Meiser, P.; Galan, J.; Richling, E. DNA protection by an aronia juice-based food supplement. *Antioxidants* **2021**, *10*, 857. [[CrossRef](#)]
- Da Cañete Costa, P.; Pires Dorneles, G.; Da Vital Silva, I.R.; Pereira de Araujo, C.L.; Pereira Reinaldo, G.; Peres, A.; Funchal, C.; Dal Lago, P.; Dani, C.; Rostirola Elsner, V. Chronic purple grape juice consumption induces age-dependent changes on cognitive function in elderly women. *J. Syst. Integr. Neurosci.* **2017**, *3*, 2–6. [[CrossRef](#)]
- Kuntz, S.; Kunz, C.; Herrmann, J.; Borsch, C.H.; Abel, G.; Fröhling, B.; Dietrich, H.; Rudloff, S. Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: Results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition Investigation Alliance) study. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 925–936. [[CrossRef](#)]
- Schantz, M.; Mohn, C.; Baum, M.; Richling, E. Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *J. Berry Res.* **2010**, *1*, 25–33. [[CrossRef](#)]
- Berger, K.; Ostberg Potthoff, J.J.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. Blood glucose lowering effect by an extract from aronia (*aronia melanocarpa*)—A pilot intervention study. *CNT* **2021**, *2*, 223–229. [[CrossRef](#)]
- Joseph, S.V.; Edirisinghe, I.; Burton-Freeman, B.M. Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3886–3903. [[CrossRef](#)]
- Banach, M.; Wiloch, M.; Zawada, K.; Cyplik, W.; Kujawski, W. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanin-rich water-soluble aronia dry extracts. *Molecules* **2020**, *25*, 4055. [[CrossRef](#)]
- Ikuta, K.; Hashimoto, K.; Kaneko, H.; Mori, S.; Ohashi, K.; Suzutani, T. Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Microbiol. Immunol.* **2012**, *56*, 805–809. [[CrossRef](#)]
- Kuppusamy, U.R.; Das, N.P. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1307–1315. [[CrossRef](#)]
- Dallas, C.; Gerbi, A.; Tenca, G.; Juchaux, F.; Bernard, F.-X. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* **2008**, *15*, 783–792. [[CrossRef](#)]
- Girotti, C.; Ginet, M.; Demarne, F.C.; Lagarde, M.; Gélouën, A. Lipolytic activity of cirsimarin extracted from *Microtea debilis*. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1170–1172. [[CrossRef](#)]
- Nielsen, T.S.; Jessen, N.; Jørgensen, J.O.L.; Møller, N.; Lund, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *52*, R199–R222. [[CrossRef](#)]
- Huang, C.-C.; Huang, W.-C.; Hou, C.-W.; Chi, Y.-W.; Huang, H.-Y. Effect of black soybean koji extract on glucose utilization and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 8280–8292. [[CrossRef](#)]
- Kim, H.-K.; Kim, J.N.; Han, S.N.; Nam, J.-H.; Na, H.-N.; Ha, T.J. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 770–777. [[CrossRef](#)]
- Kowalska, K.; Olejnik, A.; Szwajgier, D.; Olkiewicz, M. Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188583. [[CrossRef](#)]
- Mosqueda-Solís, A.; Lasa, A.; Gómez-Zorita, S.; Eseberri, I.; Picó, C.; Portillo, M.P. Screening of potential anti-adipogenic effects of phenolic compounds showing different chemical structure in 3T3-L1 preadipocytes. *Food Funct.* **2017**, *8*, 3576–3586. [[CrossRef](#)]
- Juadjur, A.; Winterhalter, P. Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2427–2433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Juadjur, A.; Mohn, C.; Schantz, M.; Baum, M.; Winterhalter, P.; Richling, E. Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and in vitro antioxidative activity testing. *Food Chem.* **2015**, *167*, 418–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- O’Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Fischer-Posovszky, P.; Kukulius, V.; Tews, D.; Unterkircher, T.; Debatin, K.-M.; Fulda, S.; Wabitsch, M. Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 5–15. [CrossRef]
27. Pösch, G. Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **1971**, *268*, 272–299. [CrossRef] [PubMed]
28. Göttel, C.; Niesen, S.; Daub, V.; Werle, T.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. In vitro inhibition of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by anthocyanin-rich fruit juice extracts and selected anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6934. [CrossRef]
29. Directive 2012/12/EU of the European Parliament and of the Council of 19 April 2012 Amending Council Directive 2001/112/EC Relating to Fruit Juices and Certain Similar Products Intended for Human Consumption. 2012. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:115:0001:0011:EN:PDF> (accessed on 25 January 2022).
30. Esatbeyoglu, T.; Rodríguez-Werner, M.; Winterhalter, P. Fractionation and isolation of polyphenols from Aronia melanocarpa by countercurrent and membrane chromatography. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 1261–1275. [CrossRef]
31. Wu, X.; Gu, L.; Prior, R.L.; McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7846–7856. [CrossRef]
32. Jurikova, T.; Skrovankova, S.; Mlcek, J.; Balla, S.; Snopek, L. Bioactive compounds, antioxidant activity, and biological effects of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos*). *Molecules* **2018**, *24*, 24. [CrossRef]
33. Liu, Y.; Seeram, N.P. Liquid chromatography coupled with time-of-flight tandem mass spectrometry for comprehensive phenolic characterization of pomegranate fruit and flower extracts used as ingredients in botanical dietary supplements. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 3022–3033. [CrossRef]
34. Abdulla, R.; Mansur, S.; Lai, H.; Ubul, A.; Sun, G.; Huang, G.; Aisa, H.A. Qualitative analysis of polyphenols in macroporous resin pretreated pomegranate husk extract by HPLC-QTOF-MS. *Phytochem. Anal.* **2017**, *28*, 465–473. [CrossRef]
35. Zebisch, K.; Voigt, V.; Wabitsch, M.; Brandsch, M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* **2012**, *425*, 88–90. [CrossRef]
36. Chang, C.-C.; Lin, K.-Y.; Peng, K.-Y.; Day, Y.-J.; Hung, L.-M. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocr. J.* **2016**, *63*, 169–178. [CrossRef]
37. Robidoux, J.; Kumar, N.; Daniel, K.W.; Moukdar, F.; Cyr, M.; Medvedev, A.V.; Collins, S. Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37794–37802. [CrossRef]
38. Park, K.S. Raspberry ketone, a naturally occurring phenolic compound, inhibits adipogenic and lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 870–875. [CrossRef]
39. Moghe, S.S.; Juma, S.; Imrhan, V.; Vijayagopal, P. Effect of blueberry polyphenols on 3T3-F442A preadipocyte differentiation. *J. Med. Food* **2012**, *15*, 448–452. [CrossRef]
40. Jungfer, E.; Zimmermann, B.F.; Ruttkat, A.; Galensa, R. Comparing procyanidins in selected *Vaccinium* species by UHPLC-MS(2) with regard to authenticity and health effects. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9688–9696. [CrossRef]
41. Les, F.; Arbonés-Mainar, J.M.; Valero, M.S.; López, V. Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *220*, 67–74. [CrossRef]
42. Little, R.; Houghton, M.J.; Carr, I.M.; Wabitsch, M.; Kerimi, A.; Williamson, G. The ability of quercetin and ferulic acid to lower stored fat is dependent on the metabolic background of human adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2020**, *64*, e2000034. [CrossRef]
43. Allott, E.H.; Oliver, E.; Lysaght, J.; Gray, S.G.; Reynolds, J.V.; Roche, H.M.; Pidgeon, G.P. The SGBS cell strain as a model for the in vitro study of obesity and cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **2012**, *14*, 774–782. [CrossRef] [PubMed]

### 4.3. Publikation III „Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects“

#### 4.3.1. Zusammenfassung

Die Prävalenz für Übergewicht und Adipositas hat in den letzten Jahren stetig zugenommen und ist zu einem weltweiten Gesundheitsproblem geworden. Damit einhergehend steigt auch das Risiko für Krankheiten wie Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs. Ein Gewichtsverlust durch eine reduzierte Energiezufuhr und einen erhöhten Verzehr von Obst und Gemüse kann das Risiko für Adipositas und damit verbundenen Krankheiten wirksam senken (Penn *et al.*, 2013; Sierra-Johnson *et al.*, 2008; World Health Organization, 2021). Durch Konsum polyphenolreicher Produkte konnte eine Reduktion des Körpergewichtes und der Leptingehalte sowie eine Verbesserung der Blutlipidwerte gezeigt werden, weshalb Polyphenole in Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Lipidmetabolismus diskutiert werden (Aires *et al.*, 2019; Bakuradze *et al.*, 2019a; Tucakovic *et al.*, 2018).

Ziel dieser placebokontrollierten Interventionsstudie war es daher, den Einfluss eines polyphenolreichen Getränkes auf den Lipidstoffwechsel zu untersuchen und die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse (Kapitel 4.1. und 4.2.) zu verifizieren. Basierend auf den vorherigen Ergebnissen, bei denen gezeigt wurde, dass *in vitro* Aronia-, Cranberry- und Granatapfelextrakte die stärksten Wirkungen auf den Lipidstoffwechsel hatten, wurde das hier getestete Getränk aus diesen drei Fruchtarten hergestellt. Aus der achtwöchigen Intervention wurden Blutproben erhalten und verschiedene Biomarker des Lipidstoffwechsels wie Blutlipide, Hunger- und Sättigungshormone sowie die PDE-Aktivität in Thrombozyten analysiert. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung und Nahrungsaufnahme bestimmt sowie die Harnsäurekonzentrationen und DNA-Schäden untersucht.

In der Testgruppe wurde nach achtwöchiger Intervention des polyphenolreichen Getränkes eine signifikante Verringerung der Fett- und Proteinaufnahme im Vergleich zur *wash-out*-Phase beobachtet. Weiterhin nahm die FFM nach vier Wochen zu, während in der Placebogruppe eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes und der Leptinkonzentration gezeigt wurde. Keine Modulation der Blutlipide wurde durch Intervention des polyphenolreichen Getränkes über den gesamten Studienzeitraum nachgewiesen, wohingegen die TAG-Werte nach Intervention des Placebogetränktes signifikant erhöht waren. In den Thrombozyten wurde eine signifikante Hemmung der PDE-Aktivität beobachtet, die in der Testgruppe stärker ausgeprägt war, verglichen mit der Kontrollgruppe. Des Weiteren verringerte der Konsum des polyphenolreichen Getränkes die gesamten DNA-



Strangbrüche im Vollblut sowie die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schäden in isolierten Lymphozyten. Im Rahmen der Korrelationsanalyse konnte u. a. ein Zusammenhang zwischen der Körperzusammensetzung und der Energieaufnahme sowie der Leptingehalte ermittelt werden.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fruchtsaftinhaltsstoffe von Aronia, Cranberry und Granatapfel regulierend in den Lipidstoffwechsel des Menschen eingreifen und diesen günstig beeinflussen können. Um die erhaltenen Ergebnisse dieser Pilotstudie zu bekräftigen, sollte eine Folgestudie mit einer größeren Anzahl an Probanden durchgeführt werden. Zusätzliche Erkenntnisse über die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels durch den Konsum roter Fruchtsäfte könnten in weiterführenden Studien beispielsweise mit weiblichen oder adipösen Personen erhalten werden.

**Referenz:**

Rahn, C.; Bakuradze, T.; Stegmüller, S.; Galan, J.; Niesen, S.; Winterhalter, P.; Richling, E. Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 841.

<https://doi.org/10.3390/ijms24010841>.

### 4.3.2. Humane Interventionsstudie

In welchem Ausmaß Inhaltsstoffe polyphenolreicher Fruchtsäfte den Lipidstoffwechsel beeinflussen können, war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Eine Klärung für diese Fragestellung sollte eine neunwöchige humane Interventionsstudie an Probanden liefern, bei der die zuvor *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf die *in vivo*-Situation im Menschen übertragen werden sollten (*proof of concept*). Das Testgetränk der Studie sollte aus den drei potentesten Extrakten der *in vitro*-Untersuchungen hergestellt werden.

#### Studiendesign und Durchführung

Die Studie mit dem Titel „Studie zur Beeinflussung des Lipidstoffwechsels im Menschen durch Fruchtsaftinhaltsstoffe“ (Antragsnummer: 2020-15101) erhielt am 30.06.2020 ein positives Votum durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (Mainz) und wurde im Zeitraum vom 14.09.2020 bis 26.11.2020 an der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt.

Die neunwöchige Studie war mit 60 Probanden vorgesehen, aber aufgrund der Covid-19-Pandemie konnten nur 45 Probanden für die Studie rekrutieren werden. Die Personen wurden gemäß den folgenden Einschlusskriterien für die Studie rekrutiert: gesunde Männer, Alter 20-40 Jahre, Europid (kaukasische Abstammung), Nichtraucher, BMI 19–25 kg/m<sup>2</sup>, keine Einnahme von Medikamenten (auch keine rezeptfreien Medikamente). Die rekrutierten Probanden hatten ein durchschnittliches Alter von 24,3 ± 2,3 Jahre und einen BMI von 24,8 ± 0,9 kg/m<sup>2</sup>. Es wurden nur Probanden eingeschlossen, die die Ernährungsvorgaben während der Studie tolerierten (siehe Tabelle 6). Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Medikamenten (auch rezeptfreie Medikamente) und Nahrungsergänzungsmitteln, BMI > 25 kg/m<sup>2</sup>, Tabakkonsum, Ausübung von Leistungssport, vorhandene Stoffwechselstörungen, Teilnahme an anderen Studien und die Teilnahme an Blutspenden.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte innerhalb der Technischen Universität Kaiserslautern durch Aushänge und Intranet. Die Interessenten wurden in einer Online-Veranstaltung ausführlich über Design, Ablauf und Dauer der Studie informiert. Nach der Rekrutierung wurden die Probanden gemäß dem Ethikvotum einer ärztlichen Voruntersuchung inklusive klinischer Marker unterzogen: kleines Blutbild, Kreatinin (Marker für Nierenfunktion), Gamma-Glutamyltransferase (Marker für Leberfunktion) und C-reaktives Protein (Marker für inflammatorische Prozesse) sowie die Blutlipide Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin und TAGs. Da die Lipidbestimmungen u. a. zu den häufigsten Laboruntersuchungen zählen (Holzgreve, 2012), wurde die Analyse der Standard-Laborparameter in den Blutproben am Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern vom Institut für Laboratoriumsmedizin (Chefarzt Prof. Dr. med. Yagmur) durchgeführt. Zwei Personen wurde

die Teilnahme an der Studie aufgrund ihrer klinischen Werte untersagt und zwei Probanden entschieden sich aus persönlichen Gründen gegen die Studienteilnahme. Die verbliebenen 41 Personen wurden nach BMI randomisiert in die Testgruppe (n = 20) und die Kontrollgruppe (n = 21) eingeteilt. Ein Proband beendete die Studie vorzeitig während der einwöchigen *wash-out*-Phase aus persönlichen Gründen, sodass die Interventionsphase mit 40 Probanden (Testgruppe n = 20, Kontrollgruppe n = 20) am 21.09.2020 begonnen wurde. Vier weitere Probanden beendeten die Studie nach der 2. Blutentnahme (nach vierwöchiger Intervention), sodass die Studie mit 36 Probanden am 26.11.2020 abgeschlossen werden konnte.

Nach der einwöchigen *wash-out*-Phase (polyphenolarme Ernährung und Vermeidung eines übermäßigen Fettverzehr) konsumierte die Testgruppe über acht Wochen täglich 750 mL des Testgetränkes in drei Portionen über den Tag verteilt und die Kontrollgruppe gleiche Volumina des Placebogetränkes (siehe Abbildung 8). Während der gesamten Studienzeit ernährten sich die Probanden polyphenolarm. Sie sollten keine roten Obst- und Gemüsesäfte sowie kein rot gefärbtes Obst oder Gemüse, Tee (schwarz, grün, weiß), Rotwein, Kaffee, koffeinhaltige Getränke, Kakao, dunkle Schokolade, Nahrungsergänzungsmittel (z. B. Vitaminpräparate, Extrakte) oder Multivitaminsaft zu sich nehmen. Weiterhin sollte ein übermäßiger Fettverzehr vermieden werden. Ansonsten wurden die Probanden aufgefordert, ihre normalen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten.

Tabelle 6: Ernährungsvorgaben während der neunwöchigen humanen Interventionsstudie.

<b>erlaubt (in vernünftigen Mengen):</b>	<b>nur in geringer Menge erlaubt:</b>
<b>Getränke</b>	
Soft-Drinks, Milch, Tees (Anis, Apfel, Fenchel, Orangenschalen, Süßholzwurzel, Zitronengras, Zitronenschalen), klare Spirituosen, Wasser, Weißwein	Bier, Tees (Früchte, Kräuter, Rooibostee), Fruchtsäfte (keine Beerensäfte, Grapefruitsaft)
<b>Obst</b>	
Apfel (geschält), Ananas, Aprikosen, Avocado, Banane, Birne (geschält), Datteln, Feige, Melone, Quitte, Rosinen, Zitrone	Grapefruit, Kiwi, Nektarine, Orange, Pfirsich, Mango
<b>Gemüse</b>	
Bohnen (weiß), Blumenkohl, Chinakohl, Eisbergsalat, grüner Salat, Gurke, Kartoffeln, Kürbis (gelb), Linsen, Mais, Pilze, Rettich (weiß), Sellerie, Zucchini (geschält), Weißkohl	Bohnen (rot, schwarz, grün), Buchweizen, Brokkoli, Spinat, Knoblauch, Oliven (schwarz, grün), Paprika, Chili, Rote Beete, Rotkohl, Salat mit rot gefärbten Blättern (z. B. Lollo Rosso), Soja, Soja-Produkte, Sprossen, Tomaten, Karotten, Zwiebeln
<b>Sonstige Lebensmittel</b>	
Brot, Ei, Ei-Produkte, Fisch, Fleisch, Fleisch-Produkte, Honig, Milch-Produkte, Margarine, Nudeln, Rapsöl, weißer Reis, Salz, Sonnenblumenöl, weiße Schokolade, Wurst, Zucker	Nüsse (z. B. Haselnüsse, Erdnüsse, Walnüsse) Sesam, Olivenöl, Pfefferminze, Vollmilchschokolade, alle Produkte, die braune Schokolade erhalten

Den Probanden wurde nach der einwöchigen *wash-out*-Phase (vor dem Verzehr der Studiengetränke) am ersten Tag der Interventionsphase Blut im nüchternen Zustand entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten nach vier Wochen (an Tag 28) und am Ende der achtwöchigen Interventionsphase an Tag 56 (insgesamt drei Blutentnahmen pro Teilnehmer). In den Blutproben wurden die Blutlipide (Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin, TAGs) sowie die Lipaseaktivität vom Institut für Laboratoriumsmedizin am Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern ermittelt. Weiterhin wurden in den Blutproben von der Forschungsstelle an der Technischen Universität Kaiserslautern Biomarker des Fettstoffwechsels, Hunger- und Sättigungshormone, PDE-Aktivität in Thrombozyten, DNA-Schäden sowie der Harnsäuregehalt bestimmt. Außerdem wurden das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung (FM, Gesamtkörperwasser (TBW) und FFM) mittels Bioimpedanzanalyse erfasst sowie Spoturinproben gesammelt. Sowohl die Blutentnahmen,

die Abgabe der Spoturinproben, als auch die Bioimpedanzanalysen erfolgten morgens im nüchternen Zustand. Die Energie- und Nährstoffaufnahme der Studienteilnehmer wurde mittels Ernährungsprotokollen sieben Tage vor jedem Vor-Ort-Untersuchungstermin erfasst. Zur Ermittlung der Nährstoffmenge und -zusammensetzung wurde unter Einbeziehung der dokumentierten Ernährungsprotokolle der Probanden das Nährwertkalkulationsprogramm PRODI® Expert verwendet werden.

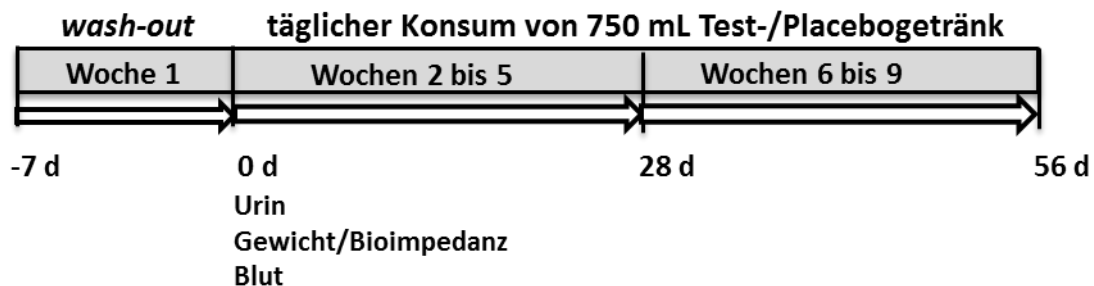


Abbildung 8: Studiendesign der humanen Interventionsstudie über insgesamt neun Wochen (eine Woche *wash-out*-Phase; acht Wochen Intervention).

### Studiengetränke

Im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen wurden aus insgesamt 18 untersuchten Extrakten die Extrakte von Aronia, Cranberry und Granatapfel als die Potentesten identifiziert. Aus diesem Grund wurde das Testgetränk für die humane Interventionsstudie aus den drei genannten Fruchtsaftkonzentraten produziert. Um den Konsum des Testgetränkes über einen Zeitraum von insgesamt acht Wochen verträglich und genießbar zu machen, wurde dem Getränk Traubensaft aus rektifiziertem Traubensaftkonzentrat (TSK; Süße) zugesetzt. Das Placebogetränk wurde aus Wasser, rektifiziertem Traubensaftkonzentrat, Aromastoffen, Zitronen- und Äpfelsäure mit vergleichbarem, angepasstem Zuckergehalt hergestellt (siehe Tabelle 7).

Die Rohwaren zur Herstellung des Test- und Placebogetränkes wurden von Eckes-Granini, riha WeserGold und ADM Wild bereitgestellt. Das Testgetränk wurde deklariert als: Mehrfruchtnektar mit 73 % Saftgehalt – Wasser, Traubensaft aus Traubensaftkonzentrat (TSK, 22 %), Aroniasaft aus Aroniasaftkonzentrat (17 %), Granatapfelsaft aus Granatapfelsaftkonzentrat (17 %), Cranberrysaft aus Cranberrysaftkonzentrat (17 %). Bei dem Placebogetränk handelte es sich um eine Mischung aus Wasser, Traubensaft aus Traubensaftkonzentrat (TSK), Aromastoffen, Zitronen- und Äpfelsäure. Da Sorbit als natürlicher Inhaltsstoff in Aronia vorkommt (siehe Kapitel 2.2.3), unterschieden sich diese Gehalte im Test- und Placebogetränk. Die Analyse der Getränke erfolgte durch ADM Wild Europe GmbH & Co. KG in Heidelberg-Eppelheim und die Projektpartnerforschungsstelle

des Arbeitskreises von Prof. Dr. Peter Winterhalter an der Technischen Universität Braunschweig.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Studiengetränke.

	<b>Testgetränk</b>	<b>Placebogetränk</b>
Brix [°]	9,2	8,3
Glukose [g/L]	35,3	35,2
Fruktose [g/L]	33,3	38,6
Saccharose [g/L]	n. n.	n. n.
Myo-Inosit [g/L]	0,15	0,14
Sorbit [g/L]	8,67	n. n.
Ascorbinsäure [g/L]	n. n.	n. n.
Zitronensäure [g/L]	3,7	3,7
Äpfelsäure [g/L]	2,8	2,8
Gesamtpolyphenolgehalt (Folin-Ciocalteu-Assay) [g GAE/L]	3,0	0,1
Antioxidative Kapazität (TEAC-Assay) [mmol/L]	20,9	2,8
Anthocyangehalt [mg/L]	735,8	n. n.
Flavonoidgehalt [mg/L]	235,0	n. n.
Chlorogensäuregehalt [mg/L]	306,9	n. n.
Tanningehalt [mg/L]	400,8	n. n.
Polymergehalt [mg/L]	367,1	n. n.
Traubensaftkonzentrat (TSK) [g/L]	55,8	121,0
Gesamtzucker, berechnet [g/L]	68,6	73,8
Kalorien, berechnet [kcal/L]	315,1	315,1

GAE: Gallussäureäquivalent; n. n.: nicht nachweisbar; TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*; TSK: säurearmes Traubensaftkonzentrat (Süße).

### 4.3.3. Veröffentlichtes Manuskript





International Journal of  
*Molecular Sciences*



Article

## Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects

Celina Rahn <sup>1</sup>, Tamara Bakuradze <sup>1</sup>, Simone Stegmüller <sup>1</sup>, Jens Galan <sup>2</sup>, Sonja Niesen <sup>3</sup>, Peter Winterhalter <sup>3</sup>   
and Elke Richling <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Division of Food Chemistry and Toxicology, Department of Chemistry, Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau, Erwin-Schrödinger-Straße 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany

<sup>2</sup> Medical Institute, Hochgewanne 19, D-67269 Grünstadt, Germany

<sup>3</sup> Institute of Food Chemistry, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstraße 20, D-38106 Braunschweig, Germany

\* Correspondence: richling@chemie.uni-kl.de; Tel.: +49-631-205-4061

**Abstract:** Polyphenols are a diverse and widely distributed class of secondary metabolites, which possess numerous beneficial properties including a modulation of glucose and lipid metabolism. This placebo-controlled human intervention study was performed to explore effects of polyphenol-rich beverage (PRB) uptake on lipid metabolism, as well as DNA integrity. In this case, 36 healthy men were randomly divided to consume either 750 mL of a PRB (containing 51% chokeberry, cranberry, and pomegranate) or a placebo drink daily for eight weeks. Only PRB consumption was found to decrease fat and protein intakes significantly compared to the preceding one-week washout period. During the intervention with PRB an increased fat-free mass was shown after four weeks, whereas a significant elevation in body weight and leptin was observed in placebo group. Blood lipids were not significantly altered after PRB consumption, while triglyceride levels increased after placebo drink intake. In platelets, a significant inhibition of phosphodiesterase (PDE) activity was observed, more pronounced in test group. Consuming the PRB decreased total DNA strand breaks in whole blood as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced breaks in isolated lymphocytes. Overall, our study suggested beneficial effects on lipid metabolism by reduced energy intake, modulation of biomarkers such as PDE activity and improved DNA integrity associated with PRB consumption.

**Keywords:** human intervention study; polyphenol-rich beverage; lipid metabolism; phosphodiesterase activity; DNA integrity



**Citation:** Rahn, C.; Bakuradze, T.; Stegmüller, S.; Galan, J.; Niesen, S.; Winterhalter, P.; Richling, E. Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 841. <https://doi.org/10.3390/ijms24010841>

Academic Editor: Lucia Panzella

Received: 22 November 2022

Revised: 21 December 2022

Accepted: 21 December 2022

Published: 3 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

Overweight and obesity are characterized by excessive fat accumulation and classified by a body mass index (BMI) greater than or equal to 25 or 30 kg m<sup>-2</sup>, respectively. Since the prevalence of overweight and obesity in humans has risen in recent years and increased the risk for diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer, it has become a major health problem worldwide [1]. Growing evidence suggests that polyphenols could have protective effect against these disorders.

Polyphenols are a relevant class of secondary metabolites, which show highly diverse structures and consist of many subclasses such as flavonoids (e.g., anthocyanins), phenolic acids, stilbenes, or lignans [2]. They are abundant in the human diet, particularly in fruits, vegetables, beverages or cereals, and the total polyphenol contents ranges from more than 15,000 mg per 100 g in cloves, 1432 mg per 100 g in black chokeberry to 7.8 mg per 100 mL in rosé wine [3]. Many beneficial effects have been described for polyphenols in vitro and in vivo. They possess anti-bacterial or anti-inflammatory properties and can affect glucose metabolism as well as gut microbiota [4–8]. Furthermore, many studies also highlighted DNA-protective and antioxidant effects in humans [5,8,9]. Additionally, polyphenol-rich products are discussed in the context of influencing lipid metabolism by lowering body weight, improvement of plasma lipid levels or

change of lipid profile [10–14]. Several studies have demonstrated that especially anthocyanin-rich red fruits and their juices are associated with health benefits in various experimental models. It has been reported that the daily consumption of anthocyanin-rich fruit juice was linked with a significant reduction in body fat, an increase of fat-free mass (FFM) and it can affect blood lipid profiles by decreasing triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations [9,14,15]. Thus, weight loss and maintaining a healthy body weight by reduced energy intake and an increased consumption of fruits and vegetables has also been indicated to effectively lower the risk for morbidities associated with obesity [1,16,17]. A proposed mechanism for weight loss is the stimulation of lipolysis—the hydrolyzation of TGs to free fatty acids and glycerol—via inhibition of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-phosphodiesterase (PDE), resulting in increased cAMP levels [18]. Polyphenols and foods containing flavonoids have shown PDE-inhibiting effects *in vitro* as well as *in vivo* [19–23]. Furthermore, many studies evidenced that plasma leptin levels are correlated with the body weight and can be a useful bio-marker for obesity, since the levels increase with overweight and decrease with weight loss [24]. Foods rich in anthocyanins have also demonstrated to significantly reduce body weight or BMI, and decrease leptin blood levels as shown by supplementation with plum juice in a human intervention study [11]. Consequently, the presence of the metabolic syndrome is associated with statistically significant higher values of plasma and serum leptin [25,26]. Furthermore, uric acid, an end product of the purine nucleotide metabolism in humans, has received attention recently. Elevated plasma uric acid levels are a risk factor of both, gout and obesity, which may result in an increased incidence of the metabolic syndrome, characterized by visceral obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, and hypertension [27,28].

A previous intervention study found that the consumption of 750 mL anthocyanin-rich fruit juice modulated body composition in healthy male volunteers [9]. Therefore, this placebo-controlled human intervention study reported here focuses on the influence of polyphenol-rich beverage (PRB) on lipid metabolism. Preliminary findings on lipid metabolism *in vitro* regarding lipid accumulation, lipolysis, and PDE activity showed that extracts of the red berries chokeberry, cranberry, and pomegranate revealed the most potent effects [29]. Based on these *in vitro* results, the beverage tested here was produced from chokeberry, cranberry, and pomegranate. The different biomarkers of the lipid metabolism such as blood lipids, hunger and satiety hormones as well as PDE activity in platelets were analyzed after daily consumption of 750 mL PRB over an eight-week period. In addition, the effects on anthropometric measurements and food intake were determined. Moreover, plasma uric acid concentrations, background, and total DNA strand breaks in whole blood as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks in isolated peripheral blood lymphocytes (PBLs) were examined.

## 2. Results

### 2.1. Composition of the Study Beverages

The composition of the PRB and placebo drink is summarized in Table 1. Due to the comparability of the two study beverages, the participants received isocaloric beverages, each providing 315.1 kcal L<sup>-1</sup>. Both study beverages had similar Brix values, myo-inositol contents as well as sugars and identical acid concentrations, but differed in their sorbitol (8.7 g L<sup>-1</sup> vs. 0 g L<sup>-1</sup>) and polyphenol contents (3.0 g gallic acid equivalents (GAE) L<sup>-1</sup> vs. 0.1 g L<sup>-1</sup>). Anthocyanins determined were cyanidin-derivative I (4.6%) and II (2.4%), cyanidin-3-galactoside (60.3%), cyanidin-3-glucoside (5.5%), cyanidin-3-arabinoside (22.2%), peonidin-3-galactoside (1.1%), and cyanidin-3-xyloside (3.9%) with a total of 735.8 mg L<sup>-1</sup>. Flavonoids identified were myricetin-hexoside (3.8%), quercetin-hexoside-pentoside (6.7%), syringetin-hexoside-derivative (27.0%), quercetin-rhamnoside-hexoside I (7.9%) and II (8.2%), quercetin-3-galactoside (21.2%), quercetin-3-glucoside (11.5%), and quercetin (13.6%) with a total amount of 235.0 mg L<sup>-1</sup>. High contents of the chlorogenic acids, i.e., neochlorogenic acid (3-CQA, 54.6%) and chlorogenic acid (5-CQA, 45.4%) with a sum of 306.9 mg L<sup>-1</sup> as well as tannins ( $\alpha$ -punicalin (25.2%),  $\beta$ -punicalin (38.7%),



punicalagin-derivatives I (1.8%) and II (4.3%),  $\alpha$ -punicalagin (8.6%), and  $\beta$ -punicalagin (21.4%) with a total amount of 400.8 mg L<sup>-1</sup> were found in the PRB compared to the placebo drink.

**Table 1.** The composition of the two study beverages.

	Polyphenol-Rich Beverage	Placebo Drink
brix [°]	9.2	8.3
glucose [g L <sup>-1</sup> ]	35.3	35.2
fructose [g L <sup>-1</sup> ]	33.3	38.6
myo-inositol [g L <sup>-1</sup> ]	0.2	0.1
sorbitol [g L <sup>-1</sup> ]	8.67	n.d.
citric acid [g L <sup>-1</sup> ]	3.7	3.7
malic acid [g L <sup>-1</sup> ]	2.8	2.8
total phenolic content (Folin-Ciocalteu assay) [g GAE L <sup>-1</sup> ]	3.0	0.1
antioxidative capacity (TEAC assay) [mmol L <sup>-1</sup> ]	20.9	2.8
total anthocyanins [mg L <sup>-1</sup> ]	735.8	n.d.
total flavonoids [mg L <sup>-1</sup> ]	235.0	n.d.
total chlorogenic acids [mg L <sup>-1</sup> ]	306.9	n.d.
total tannins [mg L <sup>-1</sup> ]	400.8	n.d.
polymeric content [mg L <sup>-1</sup> ]	367.1	n.d.

GAE: gallic acid equivalents; n.d.: not detectable; TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

## 2.2. Compliance

Compliance was monitored on the one hand by seven-day food records, which showed that the participants complied with the dietary restrictions. On the other hand, spot urine samples from the participants were analyzed for anthocyanins by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) previously reported by Mueller et al. with slight modifications [30]. The monitoring of anthocyanins in the urine of participants from both groups showed levels below the LOD after the washout period. During the intervention phase, urine samples of the test group demonstrated detectable concentrations of anthocyanins, while no anthocyanins were detected in urine samples of the placebo group (data not shown).

## 2.3. Nutrient Intake

The daily energy and nutrient intakes of the volunteers were calculated based on seven-day food records, which were completed at the end of the washout period as well as after four and eight weeks of intervention (Table 2). Although the participants consumed equicaloric study beverages, significantly decreased protein intakes after four weeks as well as decreased fat and protein intakes after eight weeks of intervention in comparison to the washout period were found only in the test group. In contrast, consumption of placebo drink did not influence noticeably any of the measured nutrient intake parameters. Test group and placebo group differed significantly ( $p < 0.05$ ) in terms of fat intake after eight weeks of the intervention.

**Table 2.** The average daily energy and nutrient intakes of volunteers calculated with PRODI 5 Expert software, based on seven-day food records completed in the one week of the washout period, four and eight weeks of intervention. Data are presented as means and standard deviation (SD); significant differences in comparison to the washout period: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

	After Washout Period	After Four Weeks of Intervention	After Eight Weeks of Intervention
<b>test group</b>			
energy intake [kcal]	2142.5 ± 494.5	2125.3 ± 358.9	1999.2 ± 418.0
protein [g]	87.5 ± 22.2	77.1 ± 12.7 *	70.3 ± 22.7 **
fat [g]	77.7 ± 19.6	77.5 ± 19.6	67.2 ± 27.9 *
carbohydrates [g]	239.6 ± 51.5	263.4 ± 64.0	245.9 ± 66.9
<b>placebo group</b>			
energy intake [kcal]	2139.1 ± 663.3	2125.7 ± 629.1	2116.6 ± 682.3
protein [g]	85.9 ± 27.8	82.4 ± 32.4	83.1 ± 37.6
fat [g]	79.8 ± 31.8	80.6 ± 34.0	78.5 ± 30.2
carbohydrates [g]	259.1 ± 114.3	256.5 ± 74.0	252.5 ± 81.1

#### 2.4. Body Weight and Body Composition

Anthropometric measurements were carried out after the washout period as well as after four and eight weeks of intervention (Table 3). In Figure 1 the changes of body weight, fat-free mass (FFM), and fat mass (FM) in both groups during the intervention compared to the end of the washout period are presented. Both groups of participants showed similar trends in body weight and composition over the time course of the study. Notably, there was a decrease in FM and significant increase in FFM after four weeks consumption of the PRB, whereas a significant elevation in body weight was observed in the placebo group. Further uptake of both study drinks showed no significant modulation of these parameters during the following weeks. The two groups did not significantly differ in any of the measured parameter of body weight and composition, respectively.

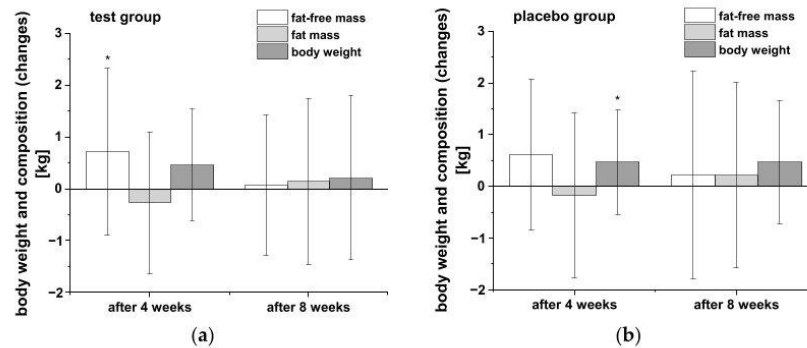
**Table 3.** Body weight and body composition of the participants throughout the study. Data are presented as mean values and SD. Significant differences in comparison to the washout period: \*  $p < 0.05$ .

	After Washout Period	After Four Weeks of Intervention	After Eight Weeks of Intervention
<b>test group</b>			
body weight [kg]	75.5 ± 8.9	75.9 ± 8.2	75.7 ± 8.5
FFM [kg]	59.3 ± 5.9	60.0 ± 6.7 *	59.4 ± 6.0
FM [kg]	16.2 ± 4.8	15.9 ± 4.3	16.3 ± 4.3
TBW [L]	43.4 ± 4.3	43.9 ± 4.9	43.4 ± 4.4
<b>placebo group</b>			
body weight [kg]	79.4 ± 7.9	79.9 ± 7.8 *	79.9 ± 7.7
FFM [kg]	61.7 ± 6.1	62.3 ± 5.7	61.9 ± 5.5
FM [kg]	17.7 ± 4.3	17.6 ± 4.3	18.0 ± 4.2
TBW [L]	45.2 ± 4.4	45.6 ± 4.2	45.3 ± 4.0

FFM: fat-free mass; FM: fat mass; TBW: total body water.

#### 2.5. Blood Lipid Profile and Lipase Activity

In Table 4 the results from analyses of blood lipids and lipase activity are summarized. No modulation of neither blood lipids such as TGs or high-density lipoprotein (HDL) cholesterol nor lipase activity was detected in the test group throughout the entire study period. Compared to the test group, consumption of placebo drink led to significantly increased TG levels during intervention. Lipase activity was slightly increased in placebo group during the whole intervention period.



**Figure 1.** The changes in body weight, fat-free mass, and body fat of participants in both groups during the intervention in comparison to the washout period: (a) test group (n = 18), (b) placebo group (n = 18). Data are presented as mean values and SD of differences. Significant differences in body weight and composition relative to the washout period: \*  $p < 0.05$ .

**Table 4.** The blood lipid profiles and lipase activity of the participants throughout the study. Data are presented as mean values and SD. Significant differences in comparison to the washout period: \*\*  $p < 0.01$ .

	After Washout Period	After Four Weeks of Intervention	After Eight Weeks of Intervention
<b>test group</b>			
triglycerides [mg dL <sup>-1</sup> ]	87.2 ± 53.4	84.8 ± 27.1	94.8 ± 43.8
total cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	171.4 ± 20.3	172.2 ± 16.1	170.3 ± 21.9
HDL cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	54.6 ± 11.6	54.9 ± 11.1	49.9 ± 10.0
LDL cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	110.3 ± 19.2	112.8 ± 20.1	109.1 ± 19.3
lipase activity [U L <sup>-1</sup> ]	31.3 ± 6.5	31.4 ± 6.4	31.7 ± 6.1
<b>placebo group</b>			
triglycerides [mg dL <sup>-1</sup> ]	83.2 ± 30.4	102.3 ± 37.5 **	104.9 ± 41.3 **
total cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	182.6 ± 30.7	181.5 ± 30.9	179.4 ± 36.9
HDL cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	53.5 ± 10.8	54.3 ± 12.3	49.3 ± 14.0
LDL cholesterol [mg dL <sup>-1</sup> ]	123.3 ± 29.6	120.7 ± 29.2	120.3 ± 28.5
lipase activity [U L <sup>-1</sup> ]	39.1 ± 17.7	43.6 ± 29.8	43.6 ± 14.2

HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein.

#### 2.6. Plasma Concentrations of Leptin and Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

The equation of energy intake and expenditure is tightly controlled by hormonal signaling among the gut, brain, and adipose tissue [31]. Table 5 provides the concentrations of the two hormones leptin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1). No significant differences in leptin plasma concentrations after the consumption of PRB compared to the preceding washout period were observed. However, a slight decrease in leptin concentrations was observed in the test group after four weeks of intervention. The consumption of placebo drink resulted in a significantly higher leptin plasma concentrations compared to the preceding washout period. In general, the placebo group showed higher baseline levels

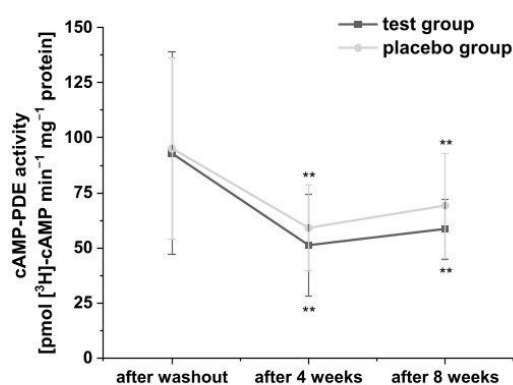
of leptin compared to the test group. In contrast, administration of placebo drink slightly increased GLP-1 levels, but the changes were not significant (Table 5), whereas in test group a significant decrease in GLP-1 compared to the washout period was shown.

**Table 5.** The mean plasma leptin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations after the washout period, as well as after four- and eight-weeks intervention period of 750 mL polyphenol-rich beverage or placebo drink. The values are shown as means  $\pm$  SD. Significant differences in comparison to the washout period: \*  $p < 0.05$ .

	After Washout Period	After Four Weeks of Intervention	After Eight Weeks of Intervention
<b>test group</b>			
leptin [pg mL <sup>-1</sup> ]	617.8 $\pm$ 595.8	600.7 $\pm$ 494.2	616.2 $\pm$ 562.6
GLP-1 [pg mL <sup>-1</sup> ]	19.3 $\pm$ 10.0	19.6 $\pm$ 8.3	15.0 $\pm$ 6.0 *
<b>placebo group</b>			
leptin [pg mL <sup>-1</sup> ]	1088.4 $\pm$ 2332.7	1362.9 $\pm$ 2708.3 *	1230.7 $\pm$ 2379.5 *
GLP-1 [pg mL <sup>-1</sup> ]	18.6 $\pm$ 10.3	19.2 $\pm$ 10.8	20.6 $\pm$ 10.6

### 2.7. Platelet cAMP-PDE Activity

Platelets possess three PDE isoforms (PDE 2, PDE 3, and PDE 5), which catalyze the hydrolysis of the second messengers cAMP and cyclic guanosine monophosphate, and thus, play an important role in the regulation of lipid metabolism [32]. In order to confirm the inhibitory effects of polyphenol-rich fruit juice and concentrate extracts as well as their fractions on PDE 3B activity in vitro, which we had observed in our previous studies [21,29], we investigated the effects of PRB uptake on cAMP-PDE activity in platelets in this human intervention study. The results of cAMP-PDE activity are presented in Figure 2. Compared to baseline, consumption of the study beverages significantly reduced cAMP-PDE activity after four- and eight-week intervention in both groups. Surprisingly, participants who consumed the PRB experienced a stronger (but not significant) decrease compared to placebo group.

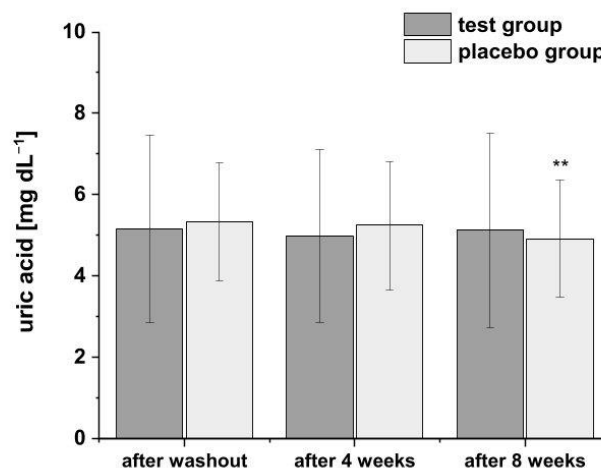


**Figure 2.** The modulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-phosphodiesterase (PDE) activity in the platelets of subjects. Values are expressed as means  $\pm$  SD. Data were normalized to protein content and expressed in units of cAMP-PDE activity (pmol cAMP min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein). Significant differences in comparison to the washout period: \*\*  $p < 0.01$ .

### 2.8. Uric Acid

Considering the relationships between uric acid levels and obesity or metabolic syndrome [27,28], respectively, we also determined the uric acid concentrations during the

study using HPLC-ESI-MS/MS (Figure 3). The levels of plasma uric acid were all within the normal range at baseline. After consumption of PRB for four and eight weeks, uric acid levels decreased slightly. A similar trend in uric acid levels was observed after intervention of placebo drink, but with a more pronounced and significant decrease after eight weeks compared to the washout period. However, the two groups did not significantly differ in terms of plasma uric acid concentrations at any point of the study period.

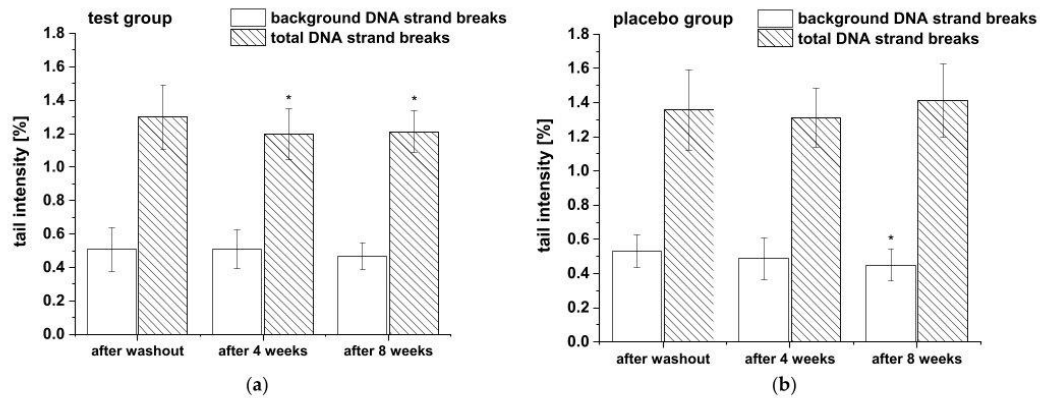


**Figure 3.** The plasma uric acid concentrations after the washout period, after four and eight weeks of intervention. Data are expressed as means  $\pm$  SD. Significant differences in comparison to the washout period: \*\*  $p < 0.01$ .

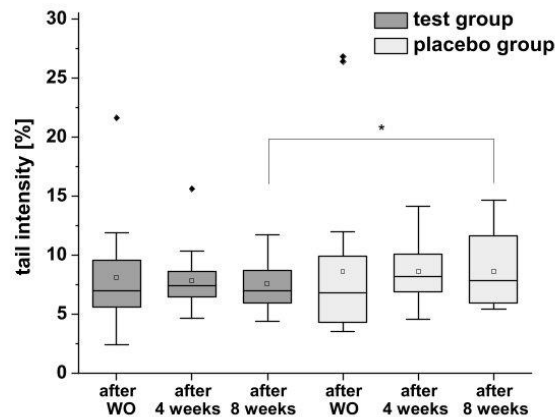
#### 2.9. DNA Strand Breaks (Comet Assay)

The modulation of background and total DNA strand breaks was assessed in whole blood. Additionally, to monitor alterations in cell sensitivity to reactive oxygen species-induced DNA damage, the total DNA strand breaks in PBLs were analyzed after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge. The results of background and total DNA strand breaks in whole blood are presented in Figure 4 and showed a significant decrease of total DNA strand breaks (with formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) treatment) in test group during the whole study period, whereas no modulation in background DNA breaks (without FPG treatment) were observed. In placebo group DNA strand breaks remained unchanged except a slight significant reduction in background DNA breaks after eight weeks compared to washout period.

The results of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced total DNA strand breaks are presented in Figure 5. In test group a distinct (but not significant) decrease of DNA damage was observed, whereas no modulation was demonstrated in placebo group during the intervention period. However, a significant difference was observed between the test and placebo groups after eight weeks of the intervention.



**Figure 4.** The background and total DNA strand breaks in whole blood during the nine-week study: (a) test group (n = 18), (b) placebo group (n = 18). Data are expressed as mean tail intensity [%]  $\pm$  SD. Significant differences in comparison to the washout period: \*  $p < 0.05$ .

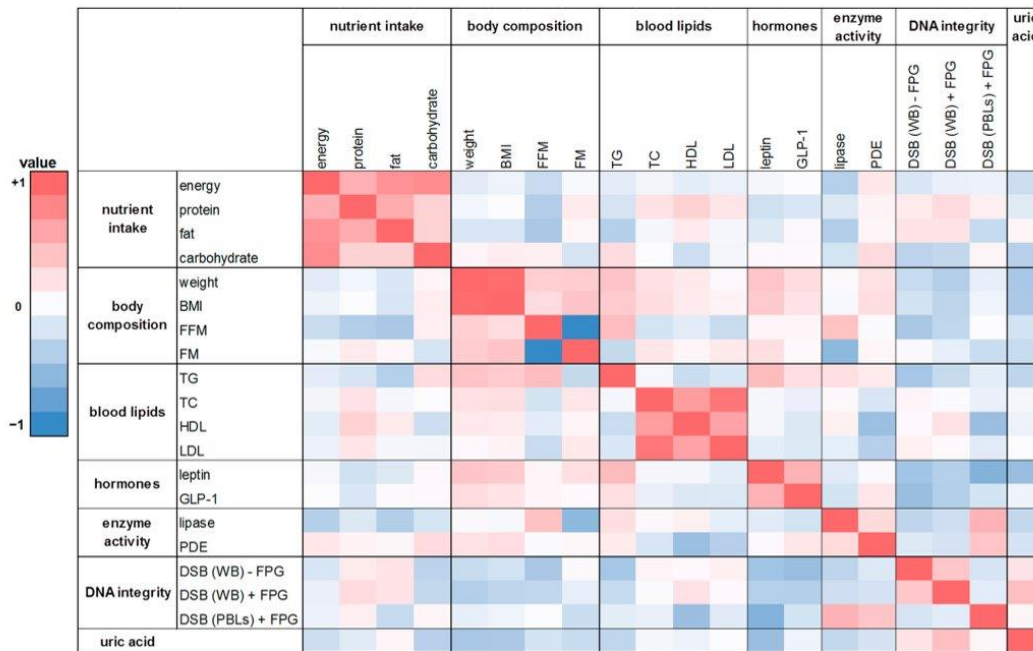


**Figure 5.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks (with formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) treatment) in isolated peripheral blood lymphocytes after the washout (WO) period, after four and eight weeks of intervention. Data are expressed as mean tail intensity [%]  $\pm$  SD. Squares represent mean values; horizontal lines within the boxes represent median values; rhombuses represent outliers. \*  $p < 0.05$ .

#### 2.10. Correlation Analysis

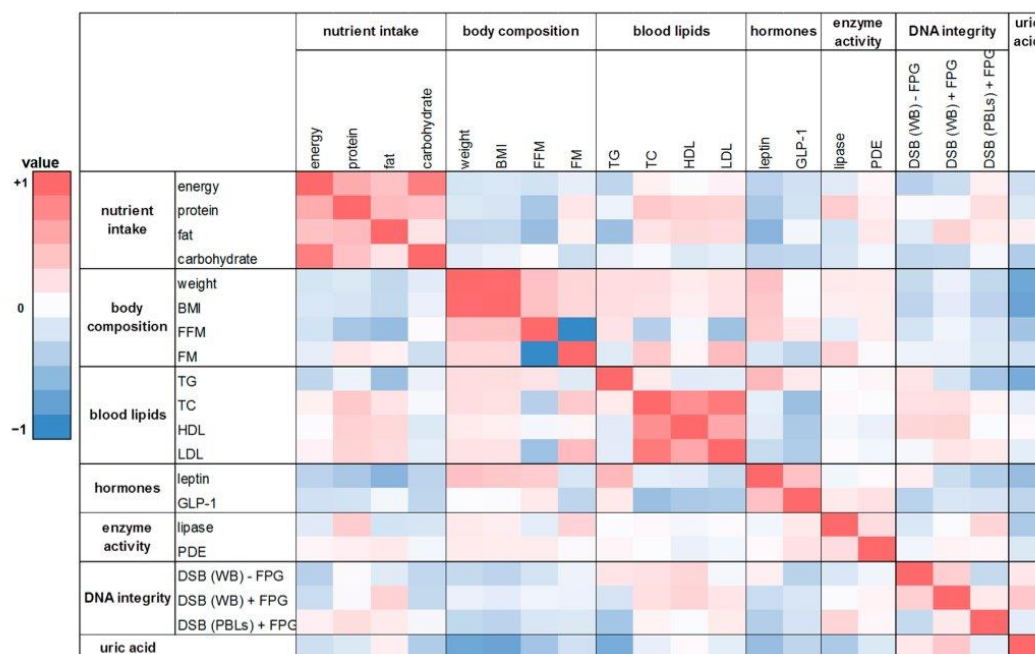
In this human intervention study 20 parameters on nutrient intake, body composition, blood lipids, hunger and satiety hormones, enzymes of the lipid metabolism, DNA integrity, and uric acid were investigated. In order to receive insights into relationships between various pairs of parameters, we performed Spearman correlations analysis. The heat maps (Figures 6 and 7) show the calculated correlation coefficients ( $\rho$ ) of all parameters determined in this study. Spearman correlation coefficients were calculated based on the changes of the washout period to the intervention period after four weeks. There was a weak correlation between energy and nutrient intake and body composition (FM and FFM;  $\rho = -0.28$  and  $0.17$ ). A positive and partly significant correlation was shown between leptin and body weight, BMI, and FM ( $\rho = 0.25$  to  $0.42$ ). Likewise, a significant positive correlation was obtained for TG levels with body weight and BMI, respectively ( $\rho = 0.38$

and 0.43;  $p < 0.02$ ). Total DNA strand breaks in PBLs correlated negatively with HDL cholesterol ( $\rho = -0.33$ ;  $p = 0.05$ ). Furthermore, the expected correlations of the individual parameters within the group of energy and nutrient intake as well as within the group of body composition could be confirmed, such as the significant correlation of body weight with FM ( $\rho = 0.37$ ;  $p = 0.03$ ) or the significant correlations of energy intake with protein, fat, and carbohydrate intake ( $\rho = 0.56$  to  $0.79$ ;  $p < 0.001$ ).



**Figure 6.** The heat map correlation matrix of all parameters investigated during the human intervention study. The coefficients were calculated based on the changes between the washout period and the intervention period after four weeks. Colored fields: red: positive correlation; blue: negative correlation. BMI: body mass index; DSB: DNA strand breaks; TC: total cholesterol; TG: triglyceride; WB: whole blood.

A similar trend was shown in the correlation analysis based on the changes of the washout period to the intervention period after eight weeks (Figure 7). There was a weak positive correlation between FM and protein intake as well as FM and fat intake ( $\rho = 0.21$  and  $0.15$ ). A negative correlation was found for FFM with energy intake and with nutrient intake ( $\rho = -0.30$  to  $-0.09$ ). For protein intake and TC levels a significant positive correlation was observed ( $\rho = 0.41$ ;  $p = 0.01$ ). Similar to the effects observed after four weeks, leptin was significantly correlated with body weight as well as BMI after eight weeks ( $\rho = 0.41$  and  $0.45$ , respectively;  $p \leq 0.01$ ). Further correlations were shown between lipase activity and FM ( $\rho = 0.33$ ;  $p = 0.05$ ) as well as for total DNA strand breaks in whole blood (with FPG) and uric acid content ( $\rho = 0.41$ ;  $p = 0.01$ ).



**Figure 7.** The heat map correlation matrix of all parameters investigated during the human intervention study. The coefficients were calculated based on the changes between the washout period and the intervention period after eight weeks. Colored fields: red: positive correlation; blue: negative correlation.

### 3. Discussion

It is well known that polyphenols possess a plethora of beneficial properties. The aim of the present human intervention study was to investigate the effects of PRB consumption on different biomarkers regarding lipid metabolism, such as blood lipids or PDE activity. In addition, nutrient intake, hunger, and satiety hormones as well as uric acid concentrations were monitored. Supplementary, parameters of oxidative stress such as DNA strand breaks were examined. The participants consumed either 750 mL of the PRB on a daily basis over an eight-week intervention period, which was produced from different red fruit juices/concentrates (chokeberry, cranberry, and pomegranate) or 750 mL of the placebo drink. These three different fruit varieties were chosen here based on preliminary in vitro studies on lipid accumulation, lipolysis, and PDE activity [21,29]. Study PRB as well as placebo drink were produced isocaloric but differed slightly in their fructose content ( $33.3 \text{ g L}^{-1}$  vs.  $38.6 \text{ g L}^{-1}$ ). Fructose can have a lipogenic effect by stimulating the fatty acid synthesis [33]. Additionally, the PRB contained relatively high amounts of polyphenols ( $3.0 \text{ g GAE L}^{-1}$ ) and total anthocyanins ( $735.8 \text{ mg L}^{-1}$ ) as well as flavonoids ( $235.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), chlorogenic acids ( $306.9 \text{ mg L}^{-1}$ ), and tannins ( $400.8 \text{ mg L}^{-1}$ ). The high concentration of sorbitol determined in PRB as a natural ingredient of chokeberry. Since no polyphenols or natural ingredients of red fruits such as sorbitol were present in the placebo drink, urine was checked for anthocyanins as compliance marker. The obtained results approved that all participants were compliant and had adhered to the study protocol.

Evaluation of the food and beverage records pointed out that only PRB consumption was found to decrease fat and protein intakes significantly compared to the washout period. No modulation in carbohydrate intake might be observed, since the PRB consumed



during the intervention period was rich in carbohydrates, especially glucose and fructose. Although the participants consumed isocaloric study beverages, energy and nutrient intake did not alter in placebo group after uptake of placebo drink. The trend we identified in the present study towards reducing energy intake, caused by the consumption of the polyphenol-rich drink, might help to improve the satiating capacity and, thus, support body weight management. In C57BL/6J mice a decreased food intake in proportion to the concentration of cyanidin-3-galactoside enriched chokeberry extract treatment was found [34]. In line with our results, in a human intervention study with 57 healthy male volunteers, Bakuradze et al. observed a significantly increased energy and carbohydrate intake but decreased fat and protein intake after four and eight weeks of anthocyanin-rich fruit juice consumption in comparison to the washout period [9]. Furthermore, in overweight but otherwise healthy men, daily energy intake was significantly lower at week 11 after intervention of orange juice (250 mL/d) when compared to pre-intervention [35].

In the current study, we provide evidence of the beneficial effects of PRB consumption (containing chokeberry, cranberry, and pomegranate juice; total phenolics = 3.0 g L<sup>-1</sup>) on anthropometric parameters. During the intervention with PRB, a significant increased FFM was shown after four weeks, while a significant elevation in body weight was observed after placebo drink consumption. Numerous studies investigated the effects of polyphenols on body composition. In agreement with our findings, Bakuradze and co-workers reported that male volunteers who consumed daily 750 mL of an anthocyanin-rich fruit juice (total phenolics = 3.6 g L<sup>-1</sup>) experienced a significant increase in FFM and a significant decrease of FM after one and four week intervention [9]. Similar effects on body composition were observed in a study conducted with 35 elderly women by Costa et al. They showed a significantly reduced FM and BMI after grape juice consumption (400 mL d<sup>-1</sup>) [10]. Other data highlighted that plum juice supplementation (200 mL d<sup>-1</sup>) over four weeks significantly reduced body weight and BMI in 20 healthy volunteers [11]. In a prospective cohort study with 54,787 Danish men and women, it was observed that higher flavonoid intakes were cross-sectionally associated with lower estimates of body fat [36].

Regarding the impact of PRB consumption on the regulation of lipid metabolism in terms of hormonal signaling, GLP-1 and leptin play a central role. GLP-1 is secreted by pancreatic cells and is involved in the reducing gastric emptying and food intake, thus promoting satiety but also in lowering blood glucose [37]. In the present study, we analyzed slightly increased GLP-1 levels after placebo drink consumption. However, with PRB intervention in healthy men a slight increase in GLP-1 was observed after four weeks, whereas a significant decrease in GLP-1 levels was shown after eight weeks compared to the washout period. Many of the studies investigated the short-term effects of GLP-1 or examined the effects in subjects with type 2 diabetes [38,39]. However, in healthy male C57BL/6J mice fed with a diet including 40 mg anthocyanidins/kg body weight for 14 weeks, Daveri et al. observed significantly higher plasma GLP-1 concentration compared to control group [40]. In line with these results, delphinidin-3-rutinoside significantly increased the secretion of GLP-1 in GLUTag cells, followed by delphinidin and malvidin [41]. The murine GLUTag cell line is widely used to investigate the effects of food components on GLP-1 secretion and to examine the signaling pathways underlying nutrient-induced GLP-1 release [42]. Controversially, Akbarpour and co-workers described no significant changes in GLP-1 after 100 mL intervention of pomegranate juice daily over eight weeks in women with type 2 diabetes [43]. In addition, another study showed that plasma concentrations of GLP-1 were rapidly increased in response to ileal carbohydrate and lipid perfusion [44]. The reduction in GLP-1 levels we observed after eight weeks intervention of PRB might be linked to the reduced fat intake in the test group. The type of test system, study subjects (healthy or not), the consumed product, inter-individual variation or other differences in study conditions may be responsible for these conflicting results. Still, we cannot fully explain the reduction in GLP-1 after eight weeks PRB consumption in our study. Future research is necessary to understand this effect. Another hormone, namely leptin, is important for regulating energy balance. It is produced by the adipose tissue in proportion

to the size of fat stores and secreted by adipocytes. The receptors for leptin are mainly found in the hypothalamus, which is known to act in controlling food intake and metabolic rate. Normally, leptin concentrations correlate with body weight and FM, so the levels are elevated in overweight and obese people [45,46]. We observed significantly higher leptin concentrations compared to the preceding washout period in placebo group after the whole intervention period, whereas consumption of PRB resulted in a slight decrease in leptin plasma concentrations after four weeks. Likewise, Tucakovic et al. described a decrease (but not significant) in leptin levels after four weeks of intervention with 200 mL anthocyanin-rich plum juice in 20 healthy individuals [11]. Previously studies with animals have shown similar findings where cyanidin-3-glucoside and plum juice decreased plasma leptin in Wistar rats or grape-bilberry juice reduced serum leptin in Fischer rats [47,48]. We hypothesized that we received only indications of hormonal effects in our study since the number of participants was small ( $n = 18$  per group) and we found a high inter-individual variation in leptin and GLP-1 levels as it was shown by high differences in baseline levels between the participants. Several studies have discussed the impact of gender and age on hormone status [49–51]. Since we had only young male volunteers participating in the study, these two factors are of minor importance. Furthermore, environmental factors, genetic variability in receptors, emotional states or psychological variables can affect hormone levels, too, which can result in a high inter-individual variation [52,53]. An additional factor influencing hormone concentrations might be the inter-individual variation in the absorption, distribution, and elimination of polyphenols, which may be down to the variation of the volunteer's gut microbiota [54–56]. Despite the variability, we confirmed the significant, positive relationship between leptin and body weight as well as BMI within the framework of the correlation analysis (see Section 2.10). In line with our findings, Rangel-Huerta et al. observed a significant, positive correlation between BMI and leptin in overweight and obese adults after the 12-week orange juice intervention [57]. This holds true not only in human intervention studies with fruit juice, but also with coffee. Coffee is a rich source of bioactive compounds, especially polyphenols such as phenolic acids, mostly chlorogenic or caffeic and in smaller amounts ferulic and p-coumaric acid but also alkaloids such as caffeine [58]. Bakuradze et al. revealed a significant decrease in body fat over the whole study period and a positive correlation between leptin and body fat of both female and male subjects [59].

In general, many studies have discussed the effects of polyphenols on blood lipid profiles [15,34,38]. A study with male healthy subjects showed a significant decrease in TC and LDL cholesterol within 24 h as well as after one-week intervention of an anthocyanin-rich fruit juice. However, these parameters increased towards the end of the study [9]. In line with these findings, in literature a meta-analysis indicated that daily supplementation for 6–8 weeks with aronia berry extracts significantly reduced TC with even larger effects among adults over the age of 50 years [60]. According to a study conducted by Habanova et al., regular consumption of bilberries (150 g of frozen stored bilberries three times a week for six weeks) decreased TC, LDL cholesterol, and TGs in healthy women ( $n = 25$ ) and men ( $n = 11$ ) [15]. Likewise, Koutsos et al. noticed that consumption of two apples daily (sum of polyphenols 990 mg) over eight weeks decreased TC, LDL cholesterol, and TGs in healthy mildly hypercholesterolemic volunteers [14]. In contrast, consumption of 750 mL cranberry juice over two weeks did not alter the lipid profile (TG, TC, HDL, and LDL cholesterol) measured in blood of 20 healthy female volunteers. The authors discussed that the lack of effect on plasma lipid profiles may reflect the relatively short duration of the study [61]. In the present study, we observed no changes of blood lipid profiles in both groups except significantly increased TG levels in placebo group during the whole intervention. Both, the study of Duthie et al. and our study were conducted with healthy subjects, and additionally the number of participants was low, which might have an influence on the lack of effect regarding blood lipid profile. Nevertheless, the correlation analysis showed a significant positive correlation of TG levels with body weight and BMI after four weeks of intervention. As described by Zaha et al., an increased BMI is

associated with statistically significant higher waist and hip circumference, systolic and diastolic blood pressure, fasting glycemia or TGs [25]. Furthermore, lipidomics analysis showed that lipid profile of the participants changed during PRB consumption, and the saturation level of the fatty acid moieties decreased significantly (detailed information see Chipeaux et al., submitted). It was the first time lipidomics analysis of some of these compounds was conducted in the frame of a human intervention study. Due to limited knowledge about the correlation of lipid species and lipidomics, respectively, with blood lipids such as TGs, TC, HDL, and LDL cholesterol, future investigations are crucial.

In the present study, we investigated the PDE activity in platelets as another important parameter for monitoring the biological effects of PRB consumption on lipid metabolism. Especially the enzyme PDE 3B is essential for the regulation of pathways mediated by the second messenger cAMP and thus, can influence lipid metabolism via stimulation of lipolysis when PDE activity is inhibited [18]. There is evidence, that extracts rich in polyphenols from fruits or their juices can inhibit PDE activity in vitro [19,20,23]. Our previous investigations with extracts from red fruit juices and concentrates, their fractions (anthocyanin, copigment, and polymer) as well as selected anthocyanins on PDE 3B activity showed that the extract of chokeberry was a potent inhibitor of PDE 3B, followed by the extracts of blueberry, pomegranate, and cranberry. Additionally, the respective copigment fractions of chokeberry, cranberry, and pomegranate extracts were strong inhibitors of PDE 3B activity, too [21,29]. In this study, a significant inhibition of platelet cAMP-PDE activity was shown after PRB consumption, which was more pronounced compared to placebo group. In consideration of our in vitro data, the trends in PDE inhibition observed in this human study might be linked to the bioactive compounds of red fruits. Not much research has been conducted on the influence of polyphenols on PDE inhibition in vivo yet. Nevertheless, Montoya et al. investigated the modulation of cAMP-PDE activity in platelets after coffee consumption. They revealed a significantly reduced PDE activity after coffee intervention that was not directly dependent on the caffeine content of coffee. In addition, they had closer look at the effects of single coffee constituents in platelets isolated from platelet-rich plasma and described a similar PDE-inhibiting effect for the polyphenols 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid as for caffeine [22].

In addition to the above mentioned parameters, the plasma uric acid concentrations were determined as indicator in the frame of clinical trials, since overproduction of uric acid can indicate the prevalence of the metabolic syndrome and can lead to the occurrence of gout [27,28]. It was shown that elevated uric acid levels (hyperuricemia) were significantly associated with visceral fat accumulation [62]. This effect might be mediated by intracellular and mitochondrial oxidative stress [63,64]. We observed slight decreases in plasma uric acid concentrations during intervention in both test group and placebo group. Previous studies have shown that high fruit and soybean intake for three months could be a way to reduce blood uric acid in asymptomatic hyperuricemia Chinese patients (n = 187) [65]. In line with these findings, Montmorency tart cherry concentrate (60 mL) significantly decreased serum urate with the greatest mean change at 8 h post-supplement in 20 healthy participants [66], which had been confirmed in a study by Hillman and Uhranowsky [67]. Büsing et al. investigated the effects of orange juice and caffeine-free soft drink (cola) consumption in 26 healthy adults in a 2 × 2-week intervention period and found that levels of uric acid did not change with soft drink (cola) uptake but decreased with orange juice intervention due to increased uric acid excretion. They discussed an uricosuric effect of vitamin C, since the mean intake of vitamin C from orange juice was  $447 \pm 78 \text{ mg d}^{-1}$  [68]. Red fruit juices of chokeberry, cranberry, or pomegranate contained in the PRB have lower naturally occurring amounts of vitamin C than orange juice [69–71]. In addition, consumed foods can influence uric acid levels, since dietary fructose, meat and seafood consumption are associated with higher serum levels of uric acid (independent from protein intake), whereas dairy consumption was inversely associated with serum uric acid level [72,73]. Furthermore, we performed the present study with healthy young men with normal uric acid levels, so it is difficult to detect a preventive effect of PRB consumption. Correlation

analysis showed a significant positive correlation for uric acid content with total DNA strand breaks in whole blood. Del Bo' et al. found a positive correlation between the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and uric acid in women, which could not be observed in men [74]. Inconsistent effects had been described for uric acid as antioxidant. It is suggested that uric acid could play an important role as antioxidant and could be involved in protecting DNA from damage [75]. Despite its proposed protective properties, at the same time, high levels of uric acid were recognized as a marker of inflammatory states, cardiovascular, and metabolic diseases [76–78].

Many studies reported the antioxidant potential of polyphenols *in vitro* as well as *in vivo* [5,8,79–82]. The PRB applied in the present study exhibited a high antioxidative capacity, reflected by a Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) value of 20.9 mmol L<sup>-1</sup> Trolox compared to the placebo drink with 2.8 mmol L<sup>-1</sup> Trolox. As we know, antioxidants can neutralize or protect a biological system from reactive oxygen species and possess DNA-protective activities. Recently published studies from our group regarding DNA protective effects of anthocyanin-rich fruit juice and supplements in humans showed a significant reduction in background and total DNA strand breaks as well as reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks *ex vivo* [9,80]. Under healthy conditions background DNA damage is low and it is difficult to detect any potentially protective effects of PRB intervention. Thus, we used H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment in isolated lymphocytes to induce an acute oxidative condition that mimics what may happen in diseased state. To verify the results from our previous research, we investigated the effects of PRB consumption on DNA strand breaks during this study. We could show that intervention of the beverage rich in polyphenols reduced total DNA strand breaks in both whole blood and lymphocytes treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This result is in accordance with data on DNA-protective effects of wild blueberry drink intake published by Riso et al., who reported that endogenously oxidized DNA bases and the levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage were significantly reduced in 18 male volunteers with cardiovascular risk factors after six weeks of intervention [83]. Fortunately, similar effects of red fruit juices and aronia juice-based food supplements on DNA integrity over an eight-week intervention period could be demonstrated in two studies with healthy men by our group [9,80]. Comparable results on DNA integrity by reduced spontaneous DNA strand breaks were obtained after consumption of other sources rich in polyphenols such as coffee [81].

In conclusion, this study demonstrated the beneficial effects of a PRB (containing chokeberry, cranberry, and pomegranate juice) on human health. The focus of the study was on parameters of the lipid metabolism, and we could observe an influence on reduced energy intake, which was correlated by a decrease in fat and protein intake. Furthermore, an inhibited PDE activity might be partly responsible for the stimulation of lipolysis and consequently, a modulation of body weight and composition. In addition, the beverage rich in polyphenols tended to improve DNA integrity. We are aware that our study is only a pilot intervention study since it has a limited number of participants. Future studies with an extended number of volunteers should be performed. Since we had the main focus in this study on the lipid metabolism, investigations with overweight or obese people should be performed to confirm the observed effects, respectively. Complementary, follow up studies could aim to focus more on single food compounds utilising controlled-feeding trials. To have a closer look at gender-specific effects, intervention studies with men and women could be conducted.

#### 4. Materials and Methods

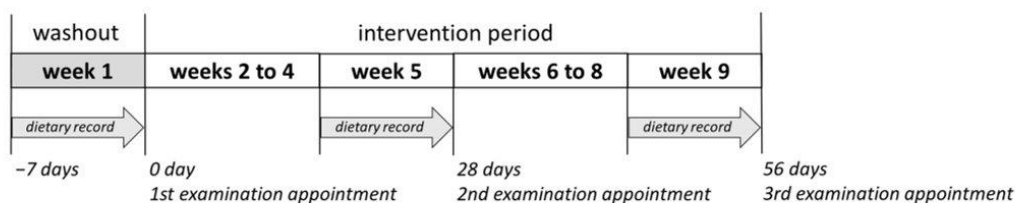
##### 4.1. Chemicals

All chemicals used in the presented research were of analytical grade.

##### 4.2. Study Design

The present intervention study was approved by the Local Ethics Committee of Rhineland-Palatinate, Mainz, Germany (No. 2020-15101). It consisted of a nine-week

prospective, randomized, placebo-controlled human study with parallel design. Male volunteers ( $n = 41$ ,  $BMI = 23.5 \pm 1.8 \text{ kg m}^{-2}$ ,  $\text{age} = 24.3 \pm 2.3$  years) who matched the following inclusion criteria were recruited to participate in the study: healthy, non-smokers, no practice of excessive sports, no intake of pharmaceutical drugs or food supplements during the study period, no pre-existing disease, not simultaneously participating in another study, and not donate blood during the observation period. Only male volunteers were selected in the study to have fewer hormonal fluctuations than in females. The volunteers were subjected to a standard medical health check including a questionnaire, blood pressure measurements, anthropometric measurements, and standard clinical blood biochemistry tests, after providing their informed written consent. The volunteers were then randomly divided into two groups according to their BMI (test group,  $n = 20$ ,  $BMI = 23.2 \pm 2.1 \text{ kg m}^{-2}$ ; placebo group,  $n = 21$ ,  $BMI = 23.7 \pm 1.4 \text{ kg m}^{-2}$ ). Five volunteers dropped out of the study for illness or private reasons. The remaining 36 volunteers (test group,  $n = 18$ ; placebo group,  $n = 18$ ) completed the nine-week study. After one-week washout period (no food rich in polyphenols), the volunteers consumed 750 mL of PRB or placebo drink assigned to their group in three equal portions over eight weeks (Figure 8). The volunteers were instructed to keep their normal dietary habits and lifestyle during the study, except the intake of foods rich in polyphenols such as red berries, coffee, or dark chocolate, and the consumption of foods rich in fat, which should have been avoided. At each examination appointment—after the washout period, after four and eight weeks of intervention—body weight as well as body composition of the study subjects were assessed on an empty bladder and both venous blood and spot urine samples were collected. Further, nutrient intake was recalled from seven-day dietary protocols recorded in the last week before each examination appointment.



**Figure 8.** The design of the nine-week placebo-controlled intervention study.

#### 4.3. Sample Preparation and Analysis of the Study Beverages

The study beverages (PRB and placebo drink) were produced at the Hochschule Geisenheim (Germany) and filled into in brown 750 mL bottles. The concentrates, juices and other materials were provided by Eckes-Granini Group GmbH (Niederolm, Germany), riha WeserGold GmbH & Co. KG (Rinteln, Germany), and ADM Wild Europe GmbH & Co. KG (Eppenheim, Germany). The PRB with 73% juice content was produced from water, rectified grape juice from concentrate (22%), chokeberry juice from concentrate (17%), cranberry juice from concentrate (17%), and pomegranate juice from concentrate (17%). The placebo drink was prepared from water, rectified grape juice from concentrate, citric and malic acids, and flavorings.

Soluble solids (Brix values) were measured refractometrically in accordance with the International Fruit and Vegetable Juice Association (IFU)-8 method (2017). For determination of myo-inositol as well as sorbitol ion chromatography with electrochemical detection was used, which was based on the IFU-79 method (2011). The sugar content of glucose and fructose was determined enzymatically with the method ASU L 31.00-12 (1997-01), citric acid with ASU L 31.00-14 (1997-01), and malic acid with ASU L 31.00-15 (1997-01).

Total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu-Assay and expressed as the concentration of GAE as previously reported [21].

The antioxidative capacity was determined using the TEAC assay according to method published by Re et al. [84]. This method is based on the decolorization of 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation. ABTS had been pre-activated by 2.45 mM potassium persulfate for at least 12 h in the dark and diluted with ethanol to reach an absorbance of 0.7–0.9 at 734 nm. For the measurement, 1 mL diluted ABTS<sup>•+</sup> solution was put in semi-micro cuvettes and the absorbance (A1) was determined at 734 nm. After adding the diluted samples (1:50 or 1:100), calibration standards, positive control (ascorbic acid,  $c = 50 \text{ mg L}^{-1}$ ), and solvent controls, the absorbance was measured again after 6 min (A2). Trolox was used for calibration (final concentrations 0.1–1.5 mM).

Identification of the anthocyanins and copigments by HPLC-ESI-MS/MS as well as quantification by ultra-high-performance liquid chromatography-diode array detector (UHPLC-DAD) was performed as described before by Niesen et al. [29].

#### 4.4. Nutrient Intake

The nutrient intake (kcal, carbohydrates, fat, and proteins) of each subject during each study period was calculated on the basis of the seven-day food and beverage records using the nutrition software package PRODI 5 Expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Germany).

#### 4.5. Anthropometric Measurements

Anthropometric measurements were performed in the morning before breakfast with an emptied bladder as follows: the subjects' body weights were determined using a medical scale (Seca delta 707; Seca, Hamburg, Germany) and their heights were measured using a Seca 206 measuring tape (Seca) to calculate their BMI ( $\text{kg m}^{-2}$ ). A bioelectrical impedance analyzer 101 (BIA 101, SMT medical GmbH, Würzburg, Germany) was used to estimate body composition (total body water (TBW), FM, and FFM). The measurements were performed at a horizontal position. Special skin electrodes were placed on the right hand and foot on dry skin according to the manufacturer's instructions.

#### 4.6. Blood and Urine Collection, Processing, and Storage

Venous blood was collected in EDTA tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at  $2500 \times g$  for 10 min at room temperature. The achieved plasma was used for the quantification of GLP-1 and leptin as well as the concentration of uric acid. For blood lipid measurements (TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol) and lipase activity, the venous blood was collected in Li-heparin tubes and sent immediately to the Department of Laboratory Medicine (Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, Germany) for analysis. For cAMP-PDE activity assay, platelets were isolated from platelet-rich plasma by centrifugation ( $150 \times g$ , 15 min,  $24^\circ\text{C}$ ). The platelet-rich plasma was once more centrifuged at  $800 \times g$  for 5 min at  $24^\circ\text{C}$ . Supernatants were removed and pellets were gently resuspended in Tris buffer. To assess the amount of DNA strand breaks, the blood samples in EDTA tubes were immediately processed for the comet assay. Human PBLs were isolated by centrifugation with Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Briefly, 7 mL of freshly collected human blood was layered onto 7 mL of Histopaque-1077 and continuously centrifuged at room temperature at  $400 \times g$  for 25 min. PBLs were collected from the layer between the plasma and Histopaque 1077, transferred into 10 mL RPMI 1640 medium (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin, and tempered at  $37^\circ\text{C}$ . Thereafter, the cell suspension was centrifuged for 10 min ( $250 \times g$ ), and the pellet was resolved in 6 mL RPMI 1640 medium and repeatedly centrifuged. Immediately afterwards, the PBLs were analyzed using the comet assay. For the stabilization of anthocyanins in urine, the collected spot urine samples were adjusted to pH 2.5 with hydrochloric acid (1 M). All samples were stored in aliquots at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis was performed.

#### 4.7. Blood Lipids and Lipase Activity

The blood lipids such as TG, TC, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and lipase activity were determined with standard methods at the Department of Laboratory Medicine (Westfalz-Klinikum Kaiserslautern, Germany).

#### 4.8. Human Blood Platelet cAMP-PDE Activity Assay

For cAMP-PDE activity assays, isolated platelets were resuspended in Tris buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM benzamidine, and a protease inhibitor mix) and lysed by ultrasonic treatment on ice. After centrifugation (12,000 × g, 15 min, 4 °C), the supernatant was removed and directly used for the PDE assay. PDE activity was determined according to a method by Pösch and Montoya et al. with slight modifications [22,85]. Briefly, 50 µL of the samples and 50 µL of the Tris buffer were incubated at 37 °C with 50 µL cAMP mix (30 mM Tris/HCl, pH 7.4, 9 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM 5'-AMP, 3 µM cAMP, and 96.2 kBq mL<sup>-1</sup> [2,8-<sup>3</sup>H]-cAMP). The enzyme reaction was stopped on ice after 20 min with 250 µL ZnSO<sub>4</sub> (0.266 mM) and [2,8-<sup>3</sup>H]-5'-AMP was precipitated by adding 250 µL Ba(OH)<sub>2</sub> (0.266 mM). Tubes were centrifuged (13,000 × g, 5 min, 4 °C) and then 450 µL of the supernatant was mixed with 3.5 mL of a scintillation cocktail, and the resulting radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1410, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Typing for PDE isoenzyme activity in platelet-rich plasma from the intervention study subjects was achieved with the aid of specific inhibitors, namely 50 µM erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA; PDE 2), 10 µM Milrinone (PDE 3), 50 µM Rolipram (PDE 4), and 10 µM Zaprinast (PDE 5) [22,32]. For each blood sample, three independent measurements were performed. Data were normalized to protein content and expressed in units of PDE activity (pmol cAMP min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein). Therefore, protein concentrations of the samples were determined according to the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard [86].

#### 4.9. Leptin and GLP-1

Plasma leptin and GLP-1 levels were determined using commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria). All analyses were carried out according to the manufacturer's protocols.

#### 4.10. Uric Acid

The uric acid content in the plasma samples was measured using HPLC-ESI-MS/MS with isotope labelled 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uric acid as an internal standard (IS) according to the method published by Kim et al. with slight modifications [87]. The stock solutions were prepared in 0.3 M KOH at a concentration of 1500 µg mL<sup>-1</sup> for uric acid and 1600 µg mL<sup>-1</sup> for IS and stored at -18 °C. The quantification of uric acid in plasma was carried out by a calibration curve using concentrations from 2 µg mL<sup>-1</sup> to 100 µg mL<sup>-1</sup>, with a final concentration of 40 µg mL<sup>-1</sup> IS. The calibration curves were plotted as concentration vs. peak area ratio of the analytes and the IS, yielding a correlation coefficient of R<sup>2</sup> > 0.99. Signal-to-noise ratios were defined as 3:1 relative to the LOD and 10:1 relative to the LOQ. LOD was determined as 0.2 µg mL<sup>-1</sup> and LOQ as 0.4 µg mL<sup>-1</sup>. Intra-day repeatability was assessed by ten replicate analyses of one standard concentration plus fixed concentration of IS. Inter-day reproducibility was obtained by analysis of one concentration level of the analyte plus fixed concentration of IS for five days in a row. The coefficient of variation was 3.4% for intra-day and 4.6% for inter-day experiments. Recovery of 94 ± 8% was determined by spiking plasma with 8, 10, and 12 µg mL<sup>-1</sup> of uric acid. The IS (40 µg mL<sup>-1</sup>) was added to 200 µL plasma sample. After 3 h equilibration at 4 °C, 40 µL of trichloroacetic acid (10%) was added for protein precipitation and the sample was centrifuged for 1 min at 20 °C and 17,000 × g. The supernatant was filtered through a 0.2 µm nylon filter by centrifugation for 5 min at 17,000 × g. The filtrate was further analyzed by HPLC-ESI-MS/MS.

Analysis of the samples was performed with an HPLC Agilent 1100 Series equipped with a degasser (G1322A), quaternary pump (G1311A), autosampler (G1313A), column oven (G1316A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and coupled an API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with ESI source. Liquid chromatography analyses were performed in a gradient elution mode using Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18(2) 100Å (250 mm  $\times$  4.6 mm) column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) coupled with a Phenomenex Luna C8(2), 5  $\mu\text{m}$  particle size guard column. The mobile phase used included 5 mM ammonium acetate/0.1% acetic acid (A) and acetonitrile/0.1% formic acid (B). The mobile phase flow was 0.9 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The gradient was as follows: 0–3.8 min, 5% B; 3.8–6.7 min, 5–35% B; 6.7–7.6 min, 35%B; 7.6–8.0 min, 35–95% B; 8.0–9.8 min, 95% B; next, reversed to the original composition of 5% B over 0.5 min, after which it was kept constant for 1.8 min to re-equilibrate the column. The ESI source was operated in negative ion mode (–4000 V), and nitrogen was used as nebulizer gas (45 psi), heater gas (30 psi, 500 °C), curtain gas (30 psi), and collision gas (4 psi). Uric acid as well as the isotopically labelled IS were detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The parent ion of uric acid was  $m/z$  167.0 and monitored MRM ions were  $m/z$  123.9 and 95.8. In case of IS the parent ion of 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uric acid was  $m/z$  169.0 and monitored MRM ions were  $m/z$  124.9 and 96.9. The substance-specific parameters of individual compounds are listed in Table 6.

**Table 6.** HPLC-ESI-MS/MS (MRM) ion transitions [ $m/z$ ], retention times [min], and substance-specific parameters (DP: declustering potential, EP: entrance potential, FP: focusing potential, CEP: cell entrance potential, CE: collision energy, CXP: cell exit potential [V]) for uric acid and the isotope labelled 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uric acid as internal standard (IS).

Compound	MRM Ion Transition [ $m/z$ ]	Retention Time [min]	DP [V]	EP [V]	FP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
uric acid	167.0/123.9	4.1	–36.0	–6.0	–220.0	–12.0	–18.0	–8.0
	167.0/95.8		–36.0	–6.0	–220.0	–12.0	–22.0	–6.0
IS (1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -uric acid)	169.0/124.9	4.1	–36.0	–11.0	–230.0	–12.0	–20.0	–8.0
	169.0/96.9		–36.0	–11.0	–230.0	–12.0	–6.0	–6.0

#### 4.11. Comet Assay in Whole Blood Samples and in Isolated Human Peripheral Blood Lymphocytes (PBLs)

Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay in whole blood with and without FPG solution) was performed according to Collins et al. [88] with slight modifications as previously reported [89].

For the comet assay in PBLs, 2  $\times$  50,000 freshly isolated PBLs were centrifuged, and the pellet was mixed with low-melting agarose. Next, the slides were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu\text{M}$ ) on ice for 5 min, according to previous publications [80]. After the treatment, the cells were subjected to lysis, washed, then incubated in 50  $\mu\text{L}$  FPG solution for 30 min at 37 °C. After DNA unwinding and horizontal gel electrophoresis, slides were washed, stained with GelRed, and analyzed using a fluorescence microscope (Imager, A1, filter set 15, Zeiss, Germany) and computerized image analysis (Comet IV, Perceptive Instruments), scoring 2  $\times$  50 images per slide (2 gels per slide). DNA migration was directly expressed as mean tail intensity (%) from two gels.

#### 4.12. Compliance Analysis

Compliance to the study was ascertained by monitoring urinary excretion of anthocyanins in all volunteers. The anthocyanin content of acidified spot urine samples was determined according to Mueller et al. with slight modifications [30]. Urine samples (6 mL), which included 20  $\mu\text{L}$  of delphinidin-3,5-diglucoside (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), were applied to a solid-phase extraction cartridge (Strata C18, 500 mg, Phenomenex, Aschaffenburg,



Germany), preconditioned with methanol (4 mL) and equilibrated with water/formic acid (95/5, v/v, 4 mL). Elution was performed with methanol/formic acid (95/5, v/v, 3 mL), eluates were concentrated using a vacuum centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). The residue was resuspended in 200  $\mu$ L of water/formic acid/acetonitrile (87/10/3, v/v/v). After centrifugation (16,000  $\times$  g, 5 min), 20  $\mu$ L of the supernatant was analyzed with HPLC-ESI-MS/MS using an Agilent HPLC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to an API 3200 MS (AB Sciex, Framingham, MA, USA). HPLC chromatographic separation was carried out with a Luna 5  $\mu$ m C18(2) 100Å (250 mm  $\times$  4.6 mm) column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) coupled with a Phenomenex Luna C18(2), 5  $\mu$ m particle size guard column. The HPLC parameters were as follows: flow 0.7 mL min<sup>-1</sup>; solvent A (water/formic acid/acetonitrile, 87/10/3, v/v/v); solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50/40/10, v/v/v). The gradient was comprised of 0–0.7 min, 2% B; 0.7–14.9 min, 2–14% B; 14.9–28.6 min, 14% B; 28.6–35.7 min, 14–15% B; 35.7–39.3 min, 15–19% B; 39.3–46.4 min, 19–20% B; 46.4–46.5 min, 20–99% B; linear step to 99% B for 4.5 min; and return to initial condition of 2% B for 0.1 min (equilibration time: 16.9 min). The ESI-MS instrument-parameters were carried out in positive mode: curtain gas (30 psi), ion spray (5000 V), temperature (450 °C), gas 1 (50 psi), and gas 2 (40 psi). The substance-specific parameters of individual compounds and transitions are listed in Table 7. For identification, a standard mix of the IS (delphinidin-3,5-diglucoside) and the two main anthocyanins of the PRB, namely cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside, was measured at a final concentration of 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Cyanidin-3-galactoside was used as qualifier and a LOD of 0.05  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> was determined.

**Table 7.** HPLC-ESI-MS/MS (MRM) ion transitions [*m/z*], retention times [min], and substance-specific parameters (DP: declustering potential, EP: entrance potential, CEP: cell entrance potential, CE: collision energy, CXP: cell exit potential [V]) of anthocyanins.

Analyte	MRM Ion Transition [ <i>m/z</i> ]	Retention Time [min]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
delphinidin-3,5-diglucoside (IS)	627/303	12.5	76.0	9.5	29.4	49.0	26.0
cyanidin-3-galactoside	449/287	18.5	66.0	7.5	20.0	31.0	26.0
cyanidin-3-arabinoside	419/287	22.3	66.0	10.5	20.0	33.0	24.0

IS: internal standard.

#### 4.13. Statistical Analysis

The results of tested parameters were presented as the mean and standard deviation (SD). Statistical analyses were conducted using the Analysis Tool Excel of Microsoft 365 Apps for Enterprise (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), Origin 2020 (OriginLab, Northampton, MA, USA) and R 2.13.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The Anderson-Darling test was used for the analysis of normal distribution. The statistical significance of differences in parameters between the study phases within each respective group were analyzed with a one-sided paired t-test (differences normally distributed) or a one-sided paired Wilcoxon's signed rank test (differences without normal distribution). The statistical significance of differences in parameters between the test group and placebo group were analyzed by either a two-sample t-test (normal distribution) or a Mann-Whitney U-test (non-normal distribution). Spearman correlation coefficients were calculated based on the changes of the washout period to both the intervention period after four and after eight weeks. Significant correlations were determined by means of t-test.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.R. and P.W.; methodology, C.R., T.B., S.S., J.G. and S.N.; validation, C.R., T.B. and S.N.; formal analysis, C.R., T.B. and S.N.; investigation, C.R., T.B., S.S., J.G. and S.N.; resources, E.R. and P.W.; data curation, C.R., T.B. and S.N.; writing—original draft preparation, C.R., T.B. and S.N.; writing—review and editing, E.R. and P.W.; visualization, C.R. and

T.B.; supervision, E.R. and P.W.; project administration, E.R. and P.W.; funding acquisition, E.R. and P.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This IGF Project of the FEI was supported via AiF within the programme for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economics and Climate Action (BMWK), based on a resolution of the German Parliament, grant number AiF 20277 N.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee of Rhineland-Palatinate, Mainz, Germany [No. 2020-15101].

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article.

**Acknowledgments:** We thank the members of the “Projektbegleitender Ausschuss” for their constructive discussions and support. The authors gratefully acknowledge Gerhard Erkel for providing access to the liquid scintillation counter and Dorothea Schipp for performing the randomization of the volunteers. We thank our volunteers for their participation in the study, Karlos Kespohl and the members of the research group for their support and Sylvia Schmidt, Kathrin Wirz, Liane Schanajew, Sarah Edinger, and Marcel Arnoldt for supporting laboratory work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. World Health Organization. Obesity and Overweight. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 21 June 2022).
2. Iriti, M.; Faoro, F. Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1934578X0900400. [CrossRef]
3. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: An application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64* (Suppl. S3), S112–S120. [CrossRef] [PubMed]
4. Joseph, S.V.; Edirisinghe, I.; Burton-Freeman, B.M. Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 3886–3903. [CrossRef] [PubMed]
5. Banach, M.; Wiloch, M.; Zawada, K.; Cyplicki, W.; Kujawski, W. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanin-rich water-soluble aronia dry extracts. *Molecules* **2020**, *25*, 4055. [CrossRef] [PubMed]
6. Ikuta, K.; Hashimoto, K.; Kaneko, H.; Mori, S.; Ohashi, K.; Suzutani, T. Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Microbiol. Immunol.* **2012**, *56*, 805–809. [CrossRef]
7. Berger, K.; Ostberg Potthoff, J.J.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. Blood glucose lowering effect by an extract from aronia (*aronia melanocarpa*)—A pilot intervention study. *CNT* **2021**, *2*, 223–229. [CrossRef]
8. Groh, I.A.M.; Riva, A.; Braun, D.; Sutherland, H.G.; Williams, O.; Bakuradze, T.; Pahlke, G.; Richling, E.; Haupt, L.M.; Griffiths, L.R.; et al. Long-term consumption of anthocyanin-rich fruit juice: Impact on gut microbiota and antioxidant markers in lymphocytes of healthy males. *Antioxidants* **2020**, *10*, 10027. [CrossRef]
9. Bakuradze, T.; Tausend, A.; Galan, J.; Groh, I.A.M.; Berry, D.; Tur, J.A.; Marko, D.; Richling, E. Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free Radic. Res.* **2019**, *53*, 1045–1055. [CrossRef]
10. Costa, P.C.; Dorneles, G.P.; Silva, I.R.V.; De Araujo, C.L.P.; Reinaldo, G.P.; Peres, A.; Funchal, C.; Dal Lago, P.; Dani, C.; Elsner, V.R. Chronic purple grape juice consumption induces age-dependent changes on cognitive function in elderly women. *J. Syst. Integr. Neurosci.* **2017**, *3*, 149. [CrossRef]
11. Tucakovic, L.; Colson, N.; Santhakumar, A.B.; Kundur, A.R.; Shuttleworth, M.; Singh, I. The effects of anthocyanins on body weight and expression of adipocyte’s hormones: Leptin and adiponectin. *J. Funct. Foods* **2018**, *45*, 173–180. [CrossRef]
12. Aires, V.; Labbé, J.; Deckert, V.; Pais de Barros, J.-P.; Boidot, R.; Haumont, M.; Maquart, G.; Le Guern, N.; Masson, D.; Prost-Camus, E.; et al. Healthy adiposity and extended lifespan in obese mice fed a diet supplemented with a polyphenol-rich plant extract. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9134. [CrossRef] [PubMed]
13. Dallas, C.; Gerbi, A.; Elbez, Y.; Caillard, P.; Zamaria, N.; Cloarec, M. Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 212–218. [CrossRef] [PubMed]
14. Koutsos, A.; Riccadonna, S.; Ulaszewska, M.M.; Franceschi, P.; Trošt, K.; Galvin, A.; Braune, T.; Fava, F.; Perenzoni, D.; Mattivi, F.; et al. Two apples a day lower serum cholesterol and improve cardiometabolic biomarkers in mildly hypercholesterolemic adults: A randomized, controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *111*, 307–318. [CrossRef] [PubMed]
15. Habanova, M.; Saraiva, J.A.; Haban, M.; Schwarzova, M.; Chlebo, P.; Predna, L.; Gažo, J.; Wýka, J. Intake of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) reduced risk factors for cardiovascular disease by inducing favorable changes in lipoprotein profiles. *Nutr. Res.* **2016**, *36*, 1415–1422. [CrossRef]

16. Penn, L.; White, M.; Lindström, J.; den Boer, A.T.; Blaak, E.; Eriksson, J.G.; Feskens, E.; Ilanne-Parikka, P.; Keinänen-Kiukaanniemi, S.M.; Walker, M.; et al. Importance of weight loss maintenance and risk prediction in the prevention of type 2 diabetes: Analysis of European Diabetes Prevention Study RCT. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sierra-Johnson, J.; Romero-Corral, A.; Somers, V.K.; Lopez-Jimenez, F.; Thomas, R.J.; Squires, R.W.; Allison, T.G. Prognostic importance of weight loss in patients with coronary heart disease regardless of initial body mass index. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2008**, *15*, 336–340. [[CrossRef](#)]
18. Nielsen, T.S.; Jessen, N.; Jørgensen, J.O.L.; Møller, N.; Lund, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *52*, R199–R222. [[CrossRef](#)]
19. Dallas, C.; Gerbi, A.; Tenca, G.; Juchaux, F.; Bernard, F.-X. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* **2008**, *15*, 783–792. [[CrossRef](#)]
20. Dell'Agli, M.; Galli, G.V.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F.; Bosisio, E. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1960–1965. [[CrossRef](#)]
21. Göttel, C.; Niesen, S.; Daub, V.; Werle, T.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. In vitro inhibition of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by anthocyanin-rich fruit juice extracts and selected anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6934. [[CrossRef](#)]
22. Montoya, G.A.; Bakuradze, T.; Eirich, M.; Erk, T.; Baum, M.; Habermeyer, M.; Eisenbrand, G.; Richling, E. Modulation of 3',5'-cyclic AMP homeostasis in human platelets by coffee and individual coffee constituents. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 1427–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Röhrig, T.; Pacjuk, O.; Hernández-Huguet, S.; Körner, J.; Scherer, K.; Richling, E. Inhibition of cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase by various food plant-derived phytotherapeutic agents. *Medicines* **2017**, *4*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boden, G.; Chen, X.; Mozzoli, M.; Ryan, I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 3419–3423. [[CrossRef](#)]
25. Carmen Zaha, D.; Vesa, C.; Uivarosan, D.; Bratu, O.; Fratila, O.; Mirela Tit, D.; Pantis, C.; Diaconu, C.; Bungau, S. Influence of inflammation and adipocyte biochemical markers on the components of metabolic syndrome. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *20*, 121–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zamboni, M.; Zoico, E.; Fantin, F.; Panourgia, M.P.; Di Francesco, V.; Tosoni, P.; Solerte, B.; Vettor, R.; Bosello, O. Relation between leptin and the metabolic syndrome in elderly women. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2004**, *59*, 396–400. [[CrossRef](#)]
27. Alberti, K.G.M.; Zimmet, P.; Shaw, J. The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *Lancet* **2005**, *366*, 1059–1062. [[CrossRef](#)]
28. Chang, J.-B.; Chen, Y.-L.; Hung, Y.-J.; Hsieh, C.-H.; Lee, C.-H.; Pei, D.; Lin, J.-D.; Wu, C.-Z.; Liang, Y.-J.; Lin, C.-M. The role of uric acid for predicting future metabolic syndrome and type 2 diabetes in older people. *J. Nutr. Health Aging* **2017**, *21*, 329–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Niesen, S.; Göttel, C.; Becker, H.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. Fractionation of extracts from black chokeberry, cranberry, and pomegranate to identify compounds that influence lipid metabolism. *Foods* **2022**, *11*, 570. [[CrossRef](#)]
30. Mueller, D.; Jung, K.; Winter, M.; Rogoll, D.; Melcher, R.; Richling, E. Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chem.* **2017**, *231*, 275–286. [[CrossRef](#)]
31. Matafome, P.; Eickhoff, H.; Letra, L.; Seiça, R. Neuroendocrinology of adipose tissue and gut-brain axis. *Adv. Neurobiol.* **2017**, *19*, 49–70. [[CrossRef](#)]
32. Gesele, P.; Momi, S.; Falcinelli, E. Anti-platelet therapy: Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 634–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Parks, E.J.; Skokan, L.E.; Timlin, M.T.; Dingfelder, C.S. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1039–1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lim, S.-M.; Lee, H.S.; in Jung, J.; Kim, S.M.; Kim, N.Y.; Seo, T.S.; Bae, J.-S.; Kim, E.J. Cyanidin-3-O-galactoside-enriched Aronia melanocarpa extract attenuates weight gain and adipogenic pathways in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrients* **2019**, *11*, 1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Simpson, E.J.; Mendis, B.; Macdonald, I.A. Orange juice consumption and its effect on blood lipid profile and indices of the metabolic syndrome; a randomised, controlled trial in an at-risk population. *Food Funct.* **2016**, *7*, 1884–1891. [[CrossRef](#)]
36. Bondonno, N.P.; Dalgaard, F.; Murray, K.; Davey, R.J.; Bondonno, C.P.; Cassidy, A.; Lewis, J.R.; Kyro, C.; Gislason, G.; Scalbert, A.; et al. Higher habitual flavonoid intakes are associated with a lower incidence of diabetes. *J. Nutr.* **2021**, *151*, 3533–3542. [[CrossRef](#)]
37. Shah, M.; Vella, A. Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2014**, *15*, 181–187. [[CrossRef](#)]
38. Liu, C.-Y.; Huang, C.-J.; Huang, L.-H.; Chen, I.-J.; Chiu, J.-P.; Hsu, C.-H. Effects of green tea extract on insulin resistance and glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes and lipid abnormalities: A randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91163. [[CrossRef](#)]
39. Törrönen, R.; Sarkkinen, E.; Niskanen, T.; Tapola, N.; Kilpi, K.; Niskanen, L. Postprandial glucose, insulin and glucagon-like peptide 1 responses to sucrose ingested with berries in healthy subjects. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1445–1451. [[CrossRef](#)]
40. Daveri, E.; Cremonini, E.; Mastaloudis, A.; Hester, S.N.; Wood, S.M.; Waterhouse, A.L.; Anderson, M.; Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Cyanidin and delphinidin modulate inflammation and altered redox signaling improving insulin resistance in high fat-fed mice. *Redox Biol.* **2018**, *18*, 16–24. [[CrossRef](#)]

41. Kato, M.; Tani, T.; Terahara, N.; Tsuda, T. The anthocyanin delphinidin 3-rutinoside stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in murine GLUTag cell line via the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II pathway. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126157. [[CrossRef](#)]
42. Gil-Lozano, M.; Brubaker, P.L. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models: Murine GLUTag Cells*; Springer: Cham, Switzerland, 2015; ISBN 9783319157917.
43. Akbarpour, M.; Shoorabeh, F.F.; Mardani, M.; Majd, F.A. Effects of eight weeks of resistance training and consumption of pomegranate on GLP-1, DPP-4 and glycemic statuses in women with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Nutr. Food Sci. Res.* **2021**, *8*, 5–10.
44. Layer, P.; Holst, J.J.; Grandt, D.; Goebell, H. Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Association with inhibition of gastric acid secretion in humans. *Dig. Dis. Sci.* **1995**, *40*, 1074–1082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pan, W.W.; Myers, M.G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 95–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Yıldız, E.; Guldas, M.; Ellergezen, P.; Acar, A.G.; Gurbuz, O. Obesity-associated pathways of anthocyanins. *Food Sci. Technol* **2021**, *41*, 1–13. [[CrossRef](#)]
47. Bhaswant, M.; Fanning, K.; Netzel, M.; Mathai, M.L.; Panchal, S.K.; Brown, L. Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. *Pharmacol. Res.* **2015**, *102*, 208–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Graf, D.; Seifert, S.; Jaudszus, A.; Bub, A.; Watzl, B. Anthocyanin-rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in Fischer rats. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66690. [[CrossRef](#)]
49. Fulda, S.; Linseisen, J.; Wolfram, G.; Himmerich, S.; Gedrich, K.; Pollmächer, T.; Himmerich, H. Leptin plasma levels in the general population: Influence of age, gender, body weight and medical history. *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17*, 1436–1440. [[CrossRef](#)]
50. Jéquier, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **2002**, *967*, 379–388. [[CrossRef](#)]
51. Ostlund, R.E.; Yang, J.W.; Klein, S.; Gingerich, R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, *81*, 3909–3913. [[CrossRef](#)]
52. Klen, J.; Dolžan, V. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of type 2 diabetes mellitus and obesity: The impact of pharmacological properties and genetic factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3451. [[CrossRef](#)]
53. Licinio, J.; Negrao, A.B.; Wong, M.-L. Plasma leptin concentrations are highly correlated to emotional states throughout the day. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Landberg, R.; Manach, C.; Kerckhof, F.-M.; Minihane, A.-M.; Saleh, R.N.M.; de Roos, B.; Tomas-Barberan, F.; Morand, C.; van de Wiele, T. Future prospects for dissecting inter-individual variability in the absorption, distribution and elimination of plant bioactives of relevance for cardiometabolic endpoints. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 21–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Feliciano, R.P.; Mills, C.E.; Istas, G.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A. Absorption, metabolism and excretion of cranberry (poly)phenols in humans: A dose response study and assessment of inter-individual variability. *Nutrients* **2017**, *9*, 268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tomás-Barberán, F.A.; González-Sarriás, A.; García-Villalba, R.; Núñez-Sánchez, M.A.; Selma, M.V.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C. Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 901. [[CrossRef](#)]
57. Rangel-Huerta, O.D.; Aguilera, C.M.; Martín, M.V.; Soto, M.J.; Rico, M.C.; Vallejo, F.; Tomas-Barberan, F.; Perez-de-la-Cruz, A.J.; Gil, A.; Mesa, M.D. Normal or high polyphenol concentration in orange juice affects antioxidant activity, blood pressure, and body weight in obese or overweight adults. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1808–1816. [[CrossRef](#)]
58. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. [[CrossRef](#)]
59. Bakuradze, T.; Parra, G.A.M.; Riedel, A.; Somoza, V.; Lang, R.; Dieminger, N.; Hofmann, T.; Winkler, S.; Hassmann, U.; Marko, D.; et al. Four-week coffee consumption affects energy intake, satiety regulation, body fat, and protects DNA integrity. *Food Res. Int.* **2014**, *63*, 420–427. [[CrossRef](#)]
60. Hawkins, J.; Hires, C.; Baker, C.; Keenan, L.; Bush, M. Daily supplementation with aronia melanocarpa (chokeberry) reduces blood pressure and cholesterol: A meta analysis of controlled clinical trials. *J. Diet. Suppl.* **2021**, *18*, 517–530. [[CrossRef](#)]
61. Duthie, S.J.; Jenkinson, A.M.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L.S.; Christen, P.; Duthie, G.G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 113–122. [[CrossRef](#)]
62. Tamba, S.; Nishizawa, H.; Funahashi, T.; Okauchi, Y.; Ogawa, T.; Noguchi, M.; Fujita, K.; Ryo, M.; Kihara, S.; Iwahashi, H.; et al. Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and serum adiponectin concentration in Japanese men. *Intern. Med.* **2008**, *47*, 1175–1180. [[CrossRef](#)]
63. Choi, Y.-J.; Shin, H.-S.; Choi, H.S.; Park, J.-W.; Jo, I.; Oh, E.-S.; Lee, K.-Y.; Lee, B.-H.; Johnson, R.J.; Kang, D.-H. Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes. *Lab. Invest.* **2014**, *94*, 1114–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lanaspá, M.A.; Sanchez-Lozada, L.G.; Choi, Y.-J.; Cicerchi, C.; Kanbay, M.; Roncal-Jimenez, C.A.; Ishimoto, T.; Li, N.; Marek, G.; Duranay, M.; et al. Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: Potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40732–40744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Zhang, M.; Gao, Y.; Wang, X.; Liu, W.; Zhang, Y.; Huang, G. Comparison of the effect of high fruit and soybean products diet and standard diet interventions on serum uric acid in asymptomatic hyperuricemia adults: An open randomized controlled trial. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *67*, 335–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Bell, P.G.; Gaze, D.C.; Davison, G.W.; George, T.W.; Scotter, M.J.; Howatson, G. Montmorency tart cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate lowers uric acid, independent of plasma cyanidin-3-O-glucosiderutinoside. *J. Funct. Foods* **2014**, *11*, 82–90. [CrossRef]
67. Hillman, A.R.; Uhranowsky, K. Acute ingestion of Montmorency tart cherry reduces serum uric acid but has no impact on high sensitivity C-reactive protein or oxidative capacity. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2021**, *76*, 83–89. [CrossRef]
68. Büsing, F.; Hägele, F.A.; Nas, A.; Döbert, L.-V.; Fricker, A.; Dörner, E.; Podlesny, D.; Aschoff, J.; Pöhl, T.; Schweiggert, R.; et al. High intake of orange juice and cola differently affects metabolic risk in healthy subjects. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 812–819. [CrossRef]
69. Kulling, S.E.; Rawel, H.M. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1625–1634. [CrossRef]
70. Jain, S.K.; Khurdiya, D.S. Vitamin C enrichment of fruit juice based ready-to-serve beverages through blending of Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn.) juice. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2004**, *59*, 63–66. [CrossRef]
71. U.S. Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service. FoodData Central: Cranberry Juice, Unsweetened. Available online: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168117/nutrients> (accessed on 14 November 2022).
72. Choi, H.K.; Liu, S.; Curhan, G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52*, 283–289. [CrossRef]
73. Siqueira, J.H.; Mill, J.G.; Velasquez-Melendez, G.; Moreira, A.D.; Barreto, S.M.; Benseñor, I.M.; Molina, M.D.C.B. Sugar-sweetened soft drinks and fructose consumption are associated with hyperuricemia: Cross-sectional analysis from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Nutrients* **2018**, *10*, 981. [CrossRef]
74. Del Bo', C.; Martini, D.; Bernardi, S.; Gigliotti, L.; Marino, M.; Gargari, G.; Meroño, T.; Hidalgo-Liberona, N.; Andres-Lacueva, C.; Kroon, P.A.; et al. Association between food intake, clinical and metabolic markers and DNA damage in older subjects. *Antioxidants* **2021**, *10*, 730. [CrossRef]
75. Foksinski, M.; Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A.; Guz, J.; Szpila, A.; Dziaman, T.; Olinski, R. Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *Eur. J. Nutr.* **2007**, *46*, 174–180. [CrossRef] [PubMed]
76. Ruggiero, C.; Cherubini, A.; Ble, A.; Bos, A.J.G.; Maggio, M.; Dixit, V.D.; Lauretani, F.; Bandinelli, S.; Senin, U.; Ferrucci, L. Uric acid and inflammatory markers. *Eur. Heart J.* **2006**, *27*, 1174–1181. [CrossRef] [PubMed]
77. Verdecchia, P.; Schillaci, G.; Reboldi, G.; Santeusano, F.; Porcellati, C.; Brunetti, P. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study. *Hypertension* **2000**, *36*, 1072–1078. [CrossRef]
78. Sui, X.; Church, T.S.; Meriwether, R.A.; Lobelo, F.; Blair, S.N. Uric acid and the development of metabolic syndrome in women and men. *Metabolism* **2008**, *57*, 845–852. [CrossRef] [PubMed]
79. Shen, Y.; Zhang, H.; Cheng, L.; Wang, L.; Qian, H.; Qi, X. In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chem.* **2016**, *194*, 1003–1012. [CrossRef]
80. Bakuradze, T.; Meiser, P.; Galan, J.; Richling, E. DNA protection by an aronia juice-based food supplement. *Antioxidants* **2021**, *10*, 857. [CrossRef]
81. Bakuradze, T.; Lang, R.; Hofmann, T.; Schipp, D.; Galan, J.; Eisenbrand, G.; Richling, E. Coffee consumption rapidly reduces background DNA strand breaks in healthy humans: Results of a short-term repeated uptake intervention study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 682–686. [CrossRef] [PubMed]
82. Weisel, T.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Stockis, J.-P.; Kulling, S.; Rüfer, C.; Johannes, C.; Janzowski, C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 388–397. [CrossRef]
83. Riso, P.; Klimis-Zacas, D.; Del Bo', C.; Martini, D.; Campolo, J.; Vendrame, S.; Möller, P.; Loft, S.; de Maria, R.; Porrini, M. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 949–961. [CrossRef]
84. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [CrossRef] [PubMed]
85. Pösch, G. Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3', 5'-AMP as substrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* **1971**, *268*, 272–299. [CrossRef]
86. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef] [PubMed]
87. Kim, K.M.; Henderson, G.N.; Ouyang, X.; Frye, R.F.; Sautin, Y.Y.; Feig, D.I.; Johnson, R.J. A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2032–2038. [CrossRef] [PubMed]
88. Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *MB* **2004**, *26*, 249–261. [CrossRef]
89. Bakuradze, T.; Becker, D.; Reischmann, J.; Meiser, P.; Galan, J.; Richling, E. Protection from DNA damage by use of an aronia food supplement—Results from a pilot human intervention study. *Curr. Pharmacol. Rep.* **2019**, *5*, 188–195. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 5. Diskussion

Aufgrund des erhöhten Ernährungsbewusstseins sind vor allem Früchte und daraus hergestellte Fruchtsäfte in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da diese neben Vitaminen auch einen signifikanten Anteil weiterer bioaktiver Inhaltsstoffe wie Polyphenole enthalten (Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), 2012). Polyphenole kommen u. a. in Obst, Gemüse, Tee sowie Kaffee vor und sind somit Bestandteil der menschlichen Ernährung, denen viele biologische Wirkungen wie antioxidative oder antibakterielle Effekte zugeschrieben werden (Groh *et al.*, 2020; Ikuta *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2019; Phenol-Explorer, 2015; Ramis *et al.*, 2020). In den letzten Jahren wurde in *in vitro*-Studien darüber diskutiert, dass zahlreiche Polyphenole im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Lipidstoffwechsels stehen (Chang *et al.*, 2016; Kowalska *et al.*, 2017; Little *et al.*, 2020). Auch deuten Hinweise aus Humanstudien darauf hin, dass der Konsum von polyphenolreichen Extrakten sowie Fruchtsaft das Körpergewicht und die Körperfettmasse reduzieren kann (Bakuradze *et al.*, 2019a; Costa *et al.*, 2017; Dallas *et al.*, 2014; Tucakovic *et al.*, 2018). Aufgrund der Vielzahl an Inhaltsstoffen von Fruchtsäften ist es allerdings schwer zu erfassen, welche Fruchtsaftinhaltsstoffe vor allem für die beobachteten Wirkungen auf den Lipidmetabolismus verantwortlich sind und um welche molekularen Effekte es sich dabei handelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst den Einfluss von Extrakten aus Fruchtsäften bzw. -konzentraten sowie deren Fraktionen auf den Fettstoffwechsel *in vitro* zu untersuchen. Anschließend sollten die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse im Rahmen einer neunwöchigen humanen Interventionsstudie überprüft werden, bei der das konsumierte Testgetränk aus den drei potentesten Fruchtsäften bzw. Konzentraten hergestellt wurde.

### 5.1. Einfluss auf den Lipidmetabolismus *in vitro*

#### 5.1.1. Extrakte

Wie in Publikation I (siehe Kapitel 4.1.) beschrieben, wurden 18 Extrakte aus Fruchtsäften und -konzentraten der Fruchtarten Aronia, Cranberry, Granatapfel, Heidelbeere, Holunderbeere, rote Traube, Sauerkirsche und schwarze Johannisbeere hergestellt, deren Gesamtpolyphenolgehalt sowie Anthocyan- und Copigmentprofil mittels HPLC-ESI-MS/MS bestimmt wurden. Diese Extrakte wurden dann hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials

auf die PDE 3B-Enzymaktivität mittels Radioassay getestet. Das Enzym PDE 3B wird vorwiegend von Zellen wie den Adipozyten exprimiert, die an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind. (Degerman *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2014). Durch Cilostazol, einen selektiven PDE 3-Inhibitor, konnte beispielsweise in C57BL/6-Mäusen gezeigt werden, dass die PDE 3B entscheidend zur Regulierung des Lipidmetabolismus beiträgt (Seo *et al.*, 2022). Spezifische PDE 3B-Inhibitoren könnten daher einen wesentlichen Beitrag zur Behandlung von Übergewicht leisten und hätten ein besseres Nutzen-Risiko-Verhältnis im Vergleich zu einem unspezifischen Inhibitor wie Koffein, das nicht-selektiv verschiedene Phosphodiesterasen hemmt (Kilanowska und Ziółkowska, 2020). Allgemein zeigten unsere Ergebnisse vergleichbare Effekte von Extrakten einer Fruchtart. Die stärksten inhibitorischen Wirkungen und damit die niedrigsten  $IC_{50}$ -Werte wurden bei den beiden Aroniaextrakten ( $IC_{50} \approx 165 \mu\text{g/mL}$ ) ermittelt. Ähnliche Wirkungen auf die Hemmung der PDE 3B-Aktivität wurden bei den Heidelbeer-, Granatapfel- und Cranberryextrakten mit  $IC_{50}$ -Werten von  $\leq 180 \mu\text{g/mL}$  gezeigt, gefolgt von den Sauerkirsch-, Holunderbeer- und schwarze Johannisbeerextrakten mit  $IC_{50}$ -Werten von 185–230  $\mu\text{g/mL}$ . Alle drei untersuchten roten Traubenextrakte inhibierten die PDE 3B am schwächsten ( $IC_{50} \approx 290 \mu\text{g/mL}$ ). In der Literatur liegen bisher nur wenige Daten über eine Modulation des Lipidmetabolismus *in vitro* durch Inhibierung der PDE-abhängigen Signalwege mittels polyphenolreicher Extrakte vor. Dallas *et al.* beobachteten eine potente Hemmung der PDE-Aktivität von 97 % durch einen Zitrusextrakt, der einen Polyphenolanteil von 60 % hatte (Dallas *et al.*, 2008). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Extrakte aus Kürbiskernen sowie Rotwein und Traubenschalen die PDE 5-Aktivität hemmten, während Extrakte aus den Kernen roter Trauben die PDE 5-Aktivität kaum inhibierten (Ademiluyi *et al.*, 2019; Dell'Agli *et al.*, 2005). Eine Inhibierung des Enzyms PDE 5 führt zu einem cGMP-Anstieg und damit zur Aktivierung der PK G, welche wiederum analog der PK A die lipolytischen Signalwege aktiviert (Nielsen *et al.*, 2014). Auch sind seit längerem Effekte von Flavonoiden, Kaffeeinhaltsstoffen, Artischoke- und Ingwerextrakten auf die PDE-Aktivität in isolierter PDE 3, Lungenkarzinomzellen (LXFL529L) oder Thrombozyten des Blutes bekannt (Dallas *et al.*, 2008; Kuppusamy und Das, 1992; Montoya *et al.*, 2014; Röhrig *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Arbeit zeigten neben den getesteten Cranberryextrakten die Extrakte mit den höchsten Polyphenolgehalten (Granatapfel, Aronia und Heidelbeere) von über 60 g GAE/100 g einen stark inhibierenden Effekt auf die Aktivität des Enzyms PDE 3B. Dagegen zeigten die Holunderbeerextrakte mit den niedrigsten Polyphenolgehalten von ca. 40 g GAE/100 g tendenziell eine schwächere inhibitorische Wirkung auf die PDE 3B-Aktivität. Jedoch sollte beachtet werden, dass der Gesamtpolyphenolgehalt mittels Folin-Ciocalteu-Assays bestimmt wurde und dort alle reduzierenden Substanzen erfasst werden. Bei den beiden getesteten Cranberryextrakten lag der Polyphenolgehalt bei 53 g GAE/100 g.

Allerdings wiesen diese Extrakte trotz des verhältnismäßig geringeren Polyphenolgehaltes einen  $IC_{50}$ -Wert von 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und somit ein starkes inhibitorisches Potential auf. Demnach scheint es weitere Parameter wie beispielsweise die jeweilig, enthaltenen Inhaltsstoffen zu geben, welche einen Einfluss auf die inhibitorischen Wirkungen der Extrakte vermuten lassen. Aus diesem Grund wurden im nächsten Abschnitt Einzelverbindungen auf eine Inhibierung der PDE 3B untersucht.

### 5.1.2. Anthocyane und Anthocyanidine

Um ein besseres Verständnis über die Struktur-/Wirkungsbeziehungen zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit (in Publikation I, siehe Kapitel 4.1.) zusätzlich acht ausgewählte Anthocyane sowie das Aglykon Cyanidin auf ihre Hemmwirkung im PDE 3B-Assay untersucht.

Bei Variation der Aglyka ergab sich folgende Reihenfolge für die  $IC_{50}$ -Werte: Peonidin-3-glukosid < Cyanidin-3-glukosid < Petunidin-3-glukosid < Malvidin-3-glukosid. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anzahl der Hydroxy- oder Methoxygruppen am B-Ring das hemmende Potenzial beeinflusst – Peonidin-3-glukosid und Cyanidin-3-glukosid, die jeweils zwei Substituenten (Hydroxy- oder Methoxygruppen) am B-Ring haben, inhibierten die PDE 3B-Aktivität stärker im Vergleich zu den Anthocyanen mit drei B-Ring-Substituenten. Der zusätzliche B-Ring-Substituent führt zu einer Vergrößerung des Moleküls und könnte damit die Inhibierung des Enzyms durch eine sterische Hinderung beeinflussen. Seit längerem ist bekannt, dass die Wirkung der Flavonoide auf die Enzymaktivität von der dreidimensionalen Struktur und den elektrostatischen Interaktionen (Van-der-Waals-Kräfte) zwischen Flavonoiden und Proteinen (Enzymen) abhängig ist. Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse wurde gezeigt, dass Flavonoide wie die Anthocyane gut in das katalytische Zentrum der PDE 3B passen. Weiterhin wiesen Ergebnisse aus molekularen Dockingstudien auf einen kompetitiven Hemmmechanismus hin, was durch die mittels Lineweaver-Burk-Diagramm erhaltenen Enzymkinetiken gezeigt wurde (Kuppusamy und Das, 1992; Peluso, 2006).

In der Literatur wurden allerdings gegenteilige Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Anzahl an Substituenten auf die PDE-Aktivität diskutiert, wobei die Datenlage noch gering ist. Sowohl das Glukosid als auch das Aglykon von Malvidin (drei Substituenten am B-Ring) hatten den stärksten Einfluss auf die PDE 5A1-Aktivität von transfizierten COS-7-Zellen, wohingegen Cyanidin und Pelargonidin sowie deren Glukoside eine schwächere Wirkung zeigten (Dell'Agli *et al.*, 2005). Auch in HT29-Zellen, die vor allem die Enzymklasse PDE 4 exprimieren, inhibierte Malvidin die zytosolische PDE am potentesten im Gegensatz zu Cyanidin und Delphinidin. Dabei wurde ein Zusammenhang der Methoxygruppen mit der



Enzymhemmung diskutiert (Marko *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde eine Abnahme der Inhibierungsstärke auf die PDE 3-Aktivität durch Änderung der Substituenten (Hydroxy- zu Methoxygruppen) gezeigt (Ko *et al.*, 2004). Wie in Kapitel 4.1. beschrieben könnten mögliche Ursachen für die inkonsistenten Ergebnisse die unterschiedlichen PDE-Klassen (PDE 3B vs. PDE5A1 vs. PDE 4) sein, was eine Studie von Ko *et al.* unterstreicht. Dabei wurde die Wirkung von Flavonoiden auf die Aktivität fünf verschiedener PDE-Klassen untersucht (Ko *et al.*, 2004). Daneben könnten die untersuchten Substanzen (Anthocyan vs. Anthocyanidin) für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein oder die Anthocyanidine und Anthocyane könnten in den Zellen metabolisiert werden, sodass die beobachteten Wirkungen nicht auf die Anthocyane selbst zurückzuführen waren. Triebel *et al.* zeigten, dass Cyanidin im Zellkulturmedium innerhalb von 60 min zu 98,5% abgebaut wurde und die Konzentration des Metabolits Protocatechusäure asynchron zunahm. Im Vergleich zum Aglykon Cyanidin wurde bei den Glykosiden eine höhere Stabilität beschrieben – nach 24 h konnte noch 45% der Glykosid-Ausgangskonzentration detektiert werden (Triebel *et al.*, 2012).

Weiterhin ist die biologische Wirkung offenbar auch abhängig von der Molekülgröße. Es wurde das stärkste hemmende Potential bei dem Aglykon Cyanidin erfasst, gefolgt von den Cyanidin-Monosacchariden Cyanidin-3-arabinosid (Pentose) und Cyanidin-3-glukosid (Hexose), wohingegen mit den Disacchariden Cyanidin-3-rutinosid und Cyanidin-3,5-diglukosid keine Inhibierung der PDE 3B-Aktivität beobachtet wurde. Bereits 1992 veröffentlichten Kuppusamy und Das ihre Ergebnisse zum Einfluss von Flavonoiden auf die PDE-Aktivität aus isolierten Rattenadipozyten und konnten ein schwächeres inhibitorisches Potential durch die Flavonoidglykoside wie beispielsweise Luteolin-7-glukosid im Vergleich zu Luteolin messen (Kuppusamy und Das, 1992). Übereinstimmende Effekte wurden von Dell'Agli *et al.* beschrieben, allerdings untersuchten sie den Einfluss der Glykosylierung von Malvidin auf die PDE 5A1-Aktivität. Das Aglykon Malvidin zeigte die potenteste Wirkung, während dessen Glukosid die hemmende Wirkung verringerte und das entsprechende 3,5-Diglukosid inaktiv war (Dell'Agli *et al.*, 2005). Auch Prior *et al.* beobachteten in einer Studie an Mäusen, dass die Entstehung von Übergewicht durch die in Himbeere enthaltenen Anthocyane Cyanidin-3-xylosylrutinosid und Cyanidin-3-rutinosid nicht beeinflusst wurde (Prior *et al.*, 2010). Bei den beiden genannten Anthocyanen handelt es sich um Di- bzw. Triglykoside von Cyanidin.

### 5.1.3. Fraktionen und Subfraktionen

Als Testsubstanzen wurden in dieser Arbeit Extrakte aus Fruchtsäften und Konzentraten getestet, welche eine komplexe Mischung unterschiedlicher Polyphenole enthielten.

Bei den im PDE 3B-Assay getesteten Extrakten wurde viele unterschiedliche Anthocyane nachgewiesen, darunter vor allem Cyanidinglykoside, aber auch Glykoside von Delphinidin, Peonidin, Malvidin und Petunidin. Dabei kamen einige Anthocyane wie das Cyanidin-3-glukosid in den meisten Extrakten (Aronia, Cranberry, Granatapfel, Heidelbeere, Holunderbeere, rote Traube, schwarze Johannisbeere) vor, wohingegen Delphinidin-3,5-diglukosid spezifisch war für die Granatapfelextrakte oder Malvidin-3-galaktosid nur in den Heidelbeerextrakten erfasst wurde. Bei den Copigmenten wurden hauptsächlich die Stoffklassen der Phenolsäuren, Flavonole und hydrolysierbaren Tanninen identifiziert. Das Copigmentprofil der Granatapfelextrakte, das gekennzeichnet war durch hydrolysierbare Tannine wie Pedunculagin, Punicalagin, Granatin A und B sowie durch Phenolsäuren wie Ellagsäure, unterschied sich deutlich von den Copigmentprofilen der übrigen Extrakte. Weiterhin war der Anteil an Anthocyanen, Copigmenten und Polymeren in den Extrakten unterschiedlich wie in Publikation II erläutert (siehe Kapitel 4.2.). Während beispielsweise bei den Cranberry- und Granatapfelextrakten der Anteil an Copigmenten mit 72 g/100 g bzw. 80 g/100 g im Vergleich zu den Anthocyanen überwog, wurde bei den Aroniaextrakten ein höherer Anthocyananteil nachgewiesen (48 g/100 g Anthocyane vs. 40 g/100 g Copigmente). Ein hoher Polymergehalt wurde bei den Cranberryextrakten (18 g/100 g) und Aroniaextrakten (15 g/100 g) bestimmt, wo im Unterschied dazu die Granatapfelextrakte kaum Polymere enthielten (3 g/100 g).

Aufgrund der verschiedenen enthaltenen Polyphenolklassen und der Vielzahl an Inhaltsstoffen in den Extrakten war es schwierig Aussagen über die bioaktiven Schlüsselkomponenten zu treffen. Auch konnte eine synergistische Wirkung von mehreren Verbindungen nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt, um die molekularen Strukturen der bioaktiven Schlüsselkomponenten in den Extrakten zu identifizieren. Die bisher beschriebenen Ergebnisse der Extrakte auf die Hemmung der PDE 3B-Aktivität bildeten die Grundlage für die Auswahl der drei potentesten Extrakte (Aronia, Cranberry, Granatapfel) zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung.

Die gewonnenen Fraktionen (Anthocyane, Copigmente und Polymere) wurden, wie in Publikation II (siehe Kapitel 4.2.) erläutert, in drei verschiedenen *in vitro*-Systemen getestet. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Testung der Polymerfraktionen muss beachtet werden, dass mittels Hexanfällung lediglich eine Anreicherung der Polymere erreicht wurde und keine komplette Abtrennung (siehe Tabelle 8). So wurden beispielsweise in der Polymerfraktion des Cranberryextraktes 41 g Polymere/100 g im Vergleich zum Cranberryextrakt mit 18 g/100g nachgewiesen. Bei der Polymerfraktion des Granatapfelextraktes konnten nur 5 g Polymere/100 g im Vergleich zum Granatapfelextrakt mit 3 g/100g angereichert werden.

Neben den angereicherten Polymeren enthielten die Polymerfraktionen immer noch Monomere und Oligomere (z. B. Anthocyane). Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Polymergehalte als Cinnamtannin A2-Äquivalente berechnet wurden.

Tabelle 8: Vergleich der Polymergehalte [g/100 g] der Extrakte und Polymerfraktionen.

<b>Fruchtart</b>	<b>Polymergehalt des Extraktes [g/100 g]</b>	<b>Polymergehalt der Polymerfraktion [g/100 g]</b>
Aronia	14,6 ± 0,1	37,9 ± 0,7
Cranberry	18,1 ± 1,0	41,2 ± 0,5
Granatapfel	2,6 ± 0,0	5,3 ± 0,1

Es stellte sich heraus, dass alle Fraktionen der Aronia-, Cranberry- und Granatapfelextrakte die PDE 3B-Aktivität reduzierten. Das potenteste PDE 3B-Inhibierungspotential wurde durch Inkubation mit den Fraktionen (Anthocyane, Copigmente, Polymere) aus Granatapfelextrakt mit  $IC_{50}$ -Werten von etwa 10  $\mu\text{g/mL}$  gezeigt. Die Anthocyan-, Copigment- und Polymerfraktionen aus Cranberryextrakt wiesen  $IC_{50}$ -Werte von 95–104  $\mu\text{g/mL}$  auf, gefolgt von den Fraktionen des Aroniaextraktes ( $IC_{50} = 113\text{--}126 \mu\text{g/mL}$ ). Nach unseren bisherigen Daten scheinen unterschiedliche Polyphenolklassen zur Hemmung der PDE 3B-Aktivität beizutragen. Dass verschiedene Flavonoidklassen die PDE 3-Aktivität hemmen, ist bereits aus der Literatur bekannt, wobei eine stärkere Wirkung bei den Flavonen, Flavonolen und Isoflavonen im Gegensatz zu den Flavanonen beobachtet wurde (Ko *et al.*, 2004).

Die PDE 3B-Aktivität hängt direkt zusammen mit der Lipolyse – Durch Inhibierung des Enzyms steigt die Konzentration des *second messengers* cAMP in den Adipozyten an, wodurch wiederum die lipolytischen Signalwege aktiviert werden und die TAGs zu freien FS und Glycerin hydrolysiert werden (Nielsen *et al.*, 2014). Daher wurde neben dem zellfreien PDE 3B-Assay zusätzlich die Lipolyse und die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen untersucht. Die murine 3T3-L1-Zelllinie wird aufgrund des Differenzierungspotentials von Präadipozyten zu Adipozyten und der damit verbundenen TAG-Synthese häufig zur Untersuchung der Adipogenese genutzt (Rizzatti *et al.*, 2013). Um Effekte durch zytotoxische Wirkungen der Fraktionen einzuschränken, wurden die Konzentrationsbereiche für die Zellkulturversuche so gewählt, dass keine bzw. nur eine geringe zytotoxische Wirkung der Fraktionen zu beobachten war. Daher wurden die Fraktionen des Granatapfelextraktes bei 14-tägiger Inkubation (wie bei der Untersuchung der Lipidakkumulation) aufgrund der zytotoxischen Wirkung in einem niedrigeren Konzentrationsbereich im Vergleich zu den Fraktionen der Aronia- und Cranberryextrakte getestet. Weiterhin wurden im Lipolyse-Assay deutlich höhere Konzentrationen für die dreistündige Inkubation mit den Fraktionen gewählt im Gegensatz zur 14-tägigen Inkubationszeit zur Bestimmung der Lipidakkumulation.

Im Lipolyse-Assay konnte der Gehalt an freien FS im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle durch die Copigmentfraktionen der Aronia- und Cranberryextrakte ( $c = 3\text{--}4 \text{ mg/mL}$ ) in 3T3-L1-Zellen erhöht werden. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachteten Wirkungen bei den verwendeten Konzentrationen eine physiologische Relevanz haben. Aranaz *et al.* wiesen ebenfalls darauf hin, dass Ergebnisse aus *in vitro*-Assays mit Konzentrationen von über  $100 \mu\text{M}$  nicht auf physiologische Bedingungen extrapoliert werden können (Aranaz *et al.*, 2019), sondern beispielsweise einer Absicherung durch *in vivo*-Studien bedürfen. Allerdings wurden in der Literatur stimulierende Effekte auf die Lipolyse durch hohe Konzentrationen polyphenolhaltiger Extrakte beschrieben. So zeigten Kowalska *et al.*, dass die Glycerinfreisetzung durch Inkubation mit einem lyophilisiertem Cranberryextrakt ( $c = 5\text{--}20 \text{ mg/mL}$ ) in 3T3-L1-Zellen erhöht wurde (Kowalska *et al.*, 2014). Übereinstimmende, signifikante Ergebnisse wurden bei Untersuchungen auf die Glycerinfreisetzung mit einem Maisseidenextrakt ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ ) sowie auf die FS-Freisetzung mit einem Zitrusextrakt ( $c = 20 \text{ mg/mL}$ ) in 3T3-L1-Zellen erhalten (Chaittianan *et al.*, 2017; Dallas *et al.*, 2008).

Eine weitere Methode, die *in vitro* vielfach zur Untersuchung des Lipidmetabolismus genutzt wird, ist die Bestimmung der Lipidakkumulation mittels *Oil-Red-O*-Färbung (Kowalska *et al.*, 2017; Payab *et al.*, 2020). In unserer Studie zeigten alle Fraktionen der Aronia-, Cranberry- und Granatapfelextrakte eine hemmende Wirkung auf die Lipidakkumulation, wobei die Fraktionen (Anthocyane, Copigmente, Polymere) aus Granatapfelextrakt die Lipidakkumulation am stärksten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle inhibierten. Für die Fraktionen der Aronia- und Cranberryextrakte konnte eine vergleichbare Wirkung auf die Hemmung der Lipidakkumulation beobachtet werden. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde der Einfluss von polyphenolreichen Extrakten auf die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen beschrieben. So wurde durch einen polyphenolreichen Extrakt aus Aronia, Heidelbeeren, Himbeeren und Cranberrys die Lipidakkumulation konzentrationsabhängig reduziert (Kowalska *et al.*, 2017). Analoge Ergebnisse wurden durch Inkubation der Zellen mit einem polyphenolreichen Extrakt aus Arekapalmentee sowie mit einem Aroniaextrakt erhalten (Lee *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2017). Weiterhin konnten Les *et al.* eine Abnahme der TAG-Akkumulation sowohl durch Granatapfelsaftextrakt als auch durch dessen Hauptpolyphenole Ellagsäure, Punicalagin sowie den Metaboliten Urolithin A zeigen (Les *et al.*, 2018).

Es scheint also nicht nur eine einzelne Verbindung für die beobachtete Wirkung verantwortlich zu sein, was auch die Ergebnisse unserer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung annehmen lassen. Die Anthocyanfraktion des Aroniaextraktes enthielt nur Cyanidinderivate wie Cyanidin-3-galaktosid und Cyanidin-3-arabinosid, wohingegen in der Anthocyanfraktion des Cranberryextraktes neben Malvidin-3-arabinosid auch Cyanidin- und Peonidinpentoside sowie -hexoside identifiziert wurden. Die Anthocyanfraktion des Granatapfelextraktes enthielt

Mono- bzw. Diglukoside von Cyanidin und Delphinidin wie Cyanidin-3,5-diglukosid und Delphinidin-3-glukosid. Die Vielfalt bei den Copigmenten war wesentlich größer als bei den Anthocyanen, so dominierten in der Copigmentfraktion des Aroniaextraktes Neochlorogensäure (3-CQA), 5-CQA sowie verschiedene Quercetinderivate. In der Copigmentfraktion des Cranberryextraktes waren Phenolsäuren wie 5-CQA und Cumarsäure sowie deren Derivate und Flavonole wie Myricetin-, Quercetin- und Syringetinderivate enthalten, während die Copigmentfraktion des Granatapfelextraktes hauptsächlich aus hydrolysierbaren Tanninen wie Pedunculagin und Punicalin bestand. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurden diese Verbindungen auch in einer Studie von Ostberg-Potthoff *et al.* identifiziert (Ostberg-Potthoff *et al.*, 2019).

Wesentliche Erkenntnisse der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung waren, dass neben den Anthocyanen wie z. B. Cyanidin-3-glukosid, insbesondere auch verschiedene in den Copigmentfraktionen enthaltene Inhaltsstoffe den Lipidstoffwechsel *in vitro* beeinflussen können. So gab es Hinweise darauf, dass Zimtsäurederivate (5-CQA), Flavonoide (Quercetin und Quercetinderivate) sowie hydrolysierbare Tannine (Ellagsäurederivate und Punicalagin) wichtige Beiträge zur Modulation des Lipidmetabolismus leisten. Aus diesem Grund wurden die Copigmentfraktionen der Cranberry- und Granatapfelextrakte, bei denen der stärkste Einfluss in den *in vitro*-Assays gezeigt wurde, weiter mittels CCC subfraktioniert.

Die bei der Subfraktionierung der Copigmentfraktionen erhaltenen fünf Cranberry-subfraktionen (CF1–CF5) sowie sieben Granatapfelsubfraktionen (GF1–GF7) wurden ebenfalls in den drei *in vitro*-Assays getestet, um die bioaktiven Schlüsselkomponenten identifizieren zu können. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte in 3T3-L1-Zellen keine Erhöhung des freien FS-Gehaltes im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und somit keine induzierende Wirkung auf die Lipolyse beobachtet werden. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass durch einzelne Copigmente Effekte auf die Lipolyse nachgewiesen werden konnten. Durch Inkubation von 3T3-L1-Zellen mit dem Flavonol Myricetin wurde eine zeit- sowie konzentrationsabhängige Erhöhung der Glycerinkonzentration gezeigt (Wang *et al.*, 2015). Auch Little *et al.* beobachteten eine signifikante Glycerinfreisetzung durch Inkubation von SGBS-Zellen mit Quercetin. Hierbei wurden die Zellen dreifach jeweils über einen Zeitraum von 24 h mit geringen Konzentrationen von 1  $\mu$ M Quercetin behandelt. Die Autoren begründeten dieses Vorgehen damit, dass durch geringe Dosen und eine mehrfache Behandlung physiologische Bedingungen besser abgebildet werden können (Little *et al.*, 2020). Ein Vergleich mit unseren Ergebnissen wird jedoch durch eine unterschiedliche Inkubationszeit und/oder Anwendung einer anderen Zelllinie erschwert. Aufgrund der Reveresterung der FS bei längeren Inkubationszeiten wurde in unseren Experimenten zur Lipolyse nur eine Inkubationszeit von 3 h gewählt (Wang *et al.*, 2022;

ZenBio, 2016). Des Weiteren exprimieren die humanen SGBS-Zellen höhere Mengen an adipozytenspezifischen Genen wie Leptin, des Glukosetransporter Typ 4 oder der Lipoproteinlipase, was vergleichbar ist mit dem Genexpressionsmuster von menschlichen Primärzellen (Allott *et al.*, 2012; Wabitsch *et al.*, 2001).

Im Lipidakkumulations-Assay wurde bei 14-tägiger Inkubation der Zellen mit den Cranberrysubfraktionen (CF1–CF5), die aus der Copigmentfraktion des Cranberryextraktes gewonnen wurden, eine Reduktion der Lipidakkumulation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei den Subfraktionen CF4 und CF5 beobachtet, gefolgt von CF1, während keine signifikante inhibierende Wirkung durch CF2 und CF3 gezeigt wurde. Im Gegensatz dazu hemmten alle Granatapfelsubfraktionen (GF1–GF7) die Lipidakkumulation in einem niedrigeren Konzentrationsbereich verglichen mit den Cranberrysubfraktionen, wobei die stärkste Abnahme durch die Granatapfelsubfraktionen GF3 und GF4 beobachtet wurde.

Übereinstimmende Effekte wurden im PDE 3B-Assay erhalten – Durch die Cranberrysubfraktionen CF1 und CF5 wurden die niedrigsten  $IC_{50}$ -Werte von ca. 40  $\mu\text{g/mL}$  ermittelt, gefolgt von den CF2 und CF4 ( $IC_{50} = 229\text{--}266 \mu\text{g/mL}$ ) sowie CF5 ( $IC_{50} = 471 \mu\text{g/mL}$ ). Bei den Granatapfelsubfraktionen wurde das potenteste Inhibierungspotential durch GF2, GF3 und GF4 ( $IC_{50} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ ) gezeigt, wobei generell alle  $IC_{50}$ -Werte der Granatapfelsubfraktionen unter 10  $\mu\text{g/mL}$  lagen. Dies zeigt, im Vergleich zu den Cranberrysubfraktionen, dass bereits durch niedrigere Konzentrationen der Granatapfelsubfraktionen eine Enzymhemmung erreicht werden konnte.

Werden die Verbindungen in den einzelnen Subfraktionen betrachtet, so kann erneut festgehalten werden, dass vor allem die Gruppen der Phenolsäuren, Flavonole und hydrolysierbaren Tannine den Lipidmetabolismus deutlich zu beeinflussen scheinen. In der Cranberrysubfraktion CF1 wurden Inhaltsstoffe wie Kaffee-, Cumar- und Sinapinsäurehexoside identifiziert sowie in der Cranberrysubfraktion CF5 vorwiegend Myricetin- und Quercetinderivate. In den Granatapfelsubfraktionen GF3 und GF4 wurden hauptsächlich Ellagsäurehexosid, Pedunculagin, Punicalagin und Granatin A nachgewiesen. Dadurch, dass in den Subfraktionen immer noch mehrere Verbindungen enthalten waren und es nicht gelang Einzelverbindungen zu isolieren, ist eine synergistische Wirkung der Inhaltsstoffe weiterhin nicht auszuschließen.

Die gegenwärtige Forschung zeigt allerdings, dass einzelne Polyphenole wie Kaffeesäure, Ellagsäure, Punicalagin, Quercetin oder 5-CQA die Lipidakkumulation in 3T3-L1-Zellen reduzieren (Dantas *et al.*, 2018; Les *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2008). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Liu *et al.*, die eine Abnahme der Expression vieler adipozytenspezifischer Gene wie PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  und SREBP 1c beschrieben, ist eine Beeinflussung der Lipidakkumulation durch Inhibierung der

Zelldifferenzierung denkbar (Liu *et al.*, 2020). Weiterhin konnte bereits beobachtet werden, dass Copigmente den Fettstoffwechsel auch über PDE-vermittelte Signalwege modulieren können. Als wichtiges strukturelles Merkmal für eine PDE 3-Inhibierung wurde die Hydroxylierung an Position C7 bei Flavonoiden beschrieben (Janda *et al.*, 2016). Kuppusamy und Das diskutierten auch die strukturelle Relevanz von Hydroxygruppen an Position C3' und C4' des B-Ringes bei Flavonoiden wie beispielsweise bei Quercetin für eine signifikante Hemmung der PDE, wie in isolierten Rattenadipozyten gezeigt wurde (Kuppusamy und Das, 1992). Analoge Ergebnisse wurden durch die beiden Flavonole Quercetin und Myricetin auf die PDE 3-Aktivität beobachtet (Ko *et al.*, 2004). Bisher gibt es keine Literaturdaten hinsichtlich des Einflusses von hydrolysierbaren Tanninen (Einzelverbindungen) auf die PDE-Aktivität. Um unsere Hypothese zu überprüfen, dass hydrolysierbare Tannine wie Pedunculagin und Punicalagin potente Inhibitoren der PDE sind, sollten jedoch Reinsubstanzen der hydrolysierbaren Tannine im PDE 3B-Assay getestet werden.

## 5.2. Humane Interventionsstudie

Aktuell wird in zahlreichen Veröffentlichungen darüber diskutiert, dass viele Polyphenole im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Lipidstoffwechsels und damit einer langfristigen Reduktion des Körpergewichts stehen (Aires *et al.*, 2019; Dallas *et al.*, 2014; Koutsos *et al.*, 2020; Little *et al.*, 2020). Allerdings wurde bisher wenig untersucht, um welchen molekularen Effekt es sich dabei handelt.

Aufbauend aus den *in vitro*-Ergebnissen wurde das Testgetränk der Humanstudie aus gleichen Anteilen von Aronia-, Cranberry- und Granatapfelsaft hergestellt. Dadurch enthielt das Testgetränk einen beträchtlichen Anteil an Polyphenolen wie den Flavonoiden (inkl. Anthocyane), Chlorgensäuren, Tanninen und Polymeren. Um den Konsum des Getränkes über den Studienzeitraum von insgesamt acht Wochen verträglich und genießbar zu machen, wurde das Testgetränk mit TSK gesüßt. Fruchtarten, die als purer Fruchtsaft entweder aufgrund des hohen Säuregehaltes oder der Konsistenz nicht als Fruchtsaft geeignet sind, werden zu Fruchtnektaren verarbeitet. Fruchtnektare enthalten je nach Fruchtart mindestens 25–50 % Frucht sowie Wasser und gegebenenfalls Zucker oder Honig. Die Mindestgehalte an Fruchtsaft und/oder Fruchtmark sind in der Richtlinie 2012/12/EU über Fruchtsäfte und bestimmte gleichartige Erzeugnisse für die menschliche Ernährung sowie in der Fruchtsaft- und Erfrischungsgetränke- und Teeverordnung geregelt. Das Placebogetränk wurde isokalorisch hergestellt, hatte einen ähnlichen Zuckergehalt (73,8 g/L vs. 68,6 g/L im Testgetränk) und gleiche Säuregehalte, allerdings konnten keine phenolischen Verbindungen analysiert werden.

Um beurteilen zu können, ob das polyphenolreiche Testgetränk den Lipidstoffwechsel beeinflusst, wurden verschiedene Parameter untersucht. Neben den Blutlipiden, Hunger- und Sättigungshormonen sowie der PDE-Aktivität in Thrombozyten wurden daher auch Körpergewicht und die Körperzusammensetzung sowie die Energie- und Nährstoffaufnahme erfasst. Ergänzend wurden im Blut die Harnsäurekonzentrationen und DNA-Schäden bestimmt (siehe Publikation III, Kapitel 4.3.).

Die Ergebnisse der Energie- und Nährstoffaufnahme zeigten, dass in der Testgruppe durch Intervention des polyphenolreichen Testgetränkes die Eiweißaufnahme nach vier und acht Wochen sowie die Fettaufnahme nach acht Wochen im Vergleich zur *wash-out*-Phase signifikant reduziert werden konnten. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung in der Energie- und Nährstoffaufnahme über den Studienzeitraum beobachtet. Diese Gruppe konsumierte das Placebogetränk, das isokalorisch hergestellt wurde, allerdings nahezu keine Polyphenole enthielt verglichen mit dem Testgetränk (0,1 g GAE/L vs. 20,9 g GAE/L). In einer Studie von Bakuradze *et al.* konnte ebenfalls eine Abnahme der Fett- und Eiweißaufnahme durch Intervention eines anthocyanreichen Mischfruchtsaftes beobachtet werden, jedoch nahm bei den Probanden die Energie- und Kohlenhydrataufnahme zu (Bakuradze *et al.*, 2019a).

Ob die erniedrigte Energie- und Nährstoffaufnahme einen Einfluss auf die Körperzusammensetzung hatte, wurde durch Bestimmung des Körpergewichtes und der Körperzusammensetzung mittels Bioimpedanzanalyse untersucht. Obwohl eine gleichsinnige Modulation von Körpergewicht und Körperzusammensetzung der Probanden aus beiden Gruppen während des Interventionszeitraums zu erkennen war, konnte in der Testgruppe eine signifikante Erhöhung der FFM und eine leichte Abnahme der FM nach vier Wochen Intervention beobachtet werden. Der weitere Konsum des Testgetränkes über insgesamt acht Wochen führte zu keiner Veränderung der Parameter. In der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes nach vierwöchiger Intervention. Durch die Korrelationsanalyse nach Spearman wurde der Zusammenhang zwischen Eiweiß- und Fettaufnahme mit der Körperzusammensetzung bestätigt – So bestand eine positive Korrelation mit der FM und eine negative Korrelation mit der FFM (siehe Abbildung 9). Wie bereits viele *in vitro*-Untersuchungen sowie unsere vorherigen Ergebnisse aus Kapitel 4.1. zeigten, konnte die Lipidakkumulation durch polyphenolreiche Extrakte in 3T3-L1-Zellen reduziert werden (Kowalska *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021). In der Humanstudie deutete sich auch eine leichte Abnahme der FM durch Intervention des Testgetränkes an. Da die Abnahme der FM allerdings relativ gering war und dieser Effekt nur nach vierwöchiger Intervention gezeigt werden konnte, kann dies nur als Hinweis betrachtet werden, dass die *in vitro*-Wirkungen auch *in vivo* zu beobachten sind. Generell ist anzumerken, dass unsere



Humanstudie mit normalgewichtigen Probanden durchgeführt wurde, die einen BMI von  $23,5 \pm 1,8 \text{ kg/m}^2$  hatten. Möglicherweise hätten ausgeprägtere Effekte mit adipösen Personen erzielt werden können. In unterschiedlichen Veröffentlichungen konnte sowohl bei normalgewichtigen als auch bei übergewichtigen bzw. adipösen Personen eine Abnahme des Körpergewichtes oder der FM durch eine polyphenolreiche Ernährung bzw. Produkte nachgewiesen werden (Barth *et al.*, 2012; Bondonno *et al.*, 2021; Tucakovic *et al.*, 2018).

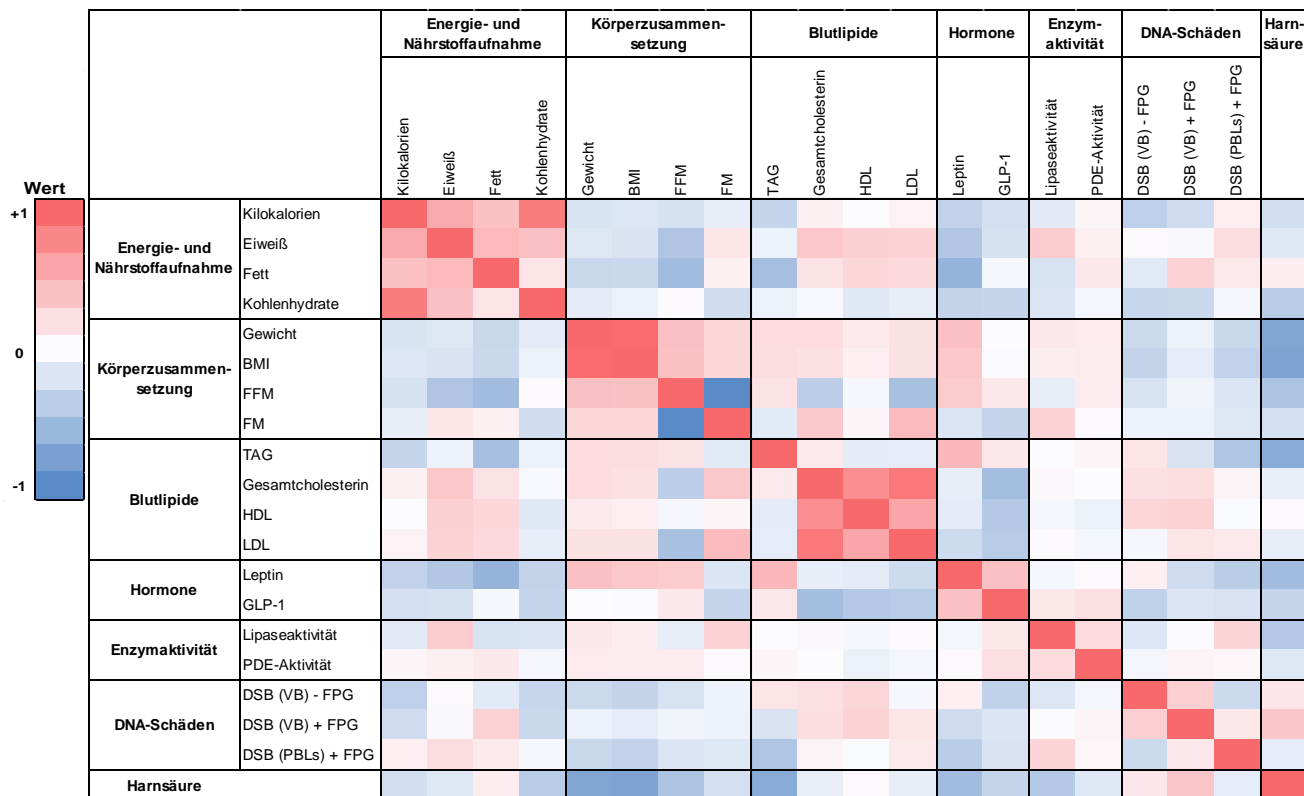


Abbildung 9: Spearman-Korrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) aller Parameter, die während der humanen Interventionsstudie untersucht wurden. Datenbasis ist die Veränderung/Differenz der Messwerte von der *wash-out*-Phase zur Intervention nach acht Wochen. Rote Felder: positive Korrelation; blaue Felder: negative Korrelation. BMI: *Body-Mass-Index*; DSB: DNA-Strangbrüche; FFM: fettfreie Masse; FM: Fettmasse; FPG: Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase; GLP-1: *Glucagon-like Peptide 1*; HDL: *high-density-Lipoprotein*; LDL: *low-density-Lipoprotein*; PBLs: periphere Blutlymphozyten; PDE: Phosphodiesterase; TAG: Triacylglycerid(e); VB: Vollblut (Rahn *et al.*, 2023).

Dass der Energiehaushalt u. a. durch Hormone reguliert wird, ist aus der Literatur bekannt (Matafome *et al.*, 2017). Weiterhin konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass das Hormon Leptin, welches hauptsächlich von Adipozyten exprimiert wird, mit dem Körpergewicht und der FM korreliert und als Marker für Übergewicht genutzt werden kann (Boden *et al.*, 1996; Pan und Myers, 2018). Aus diesem Grund wurden die Gehalte von Leptin im Blutplasma während der Studie untersucht. Während sich in der Testgruppe eine leichte Abnahme der Leptinkonzentration nach vierwöchiger Intervention zeigte, wurde in der

Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Leptinkonzentration sowohl nach vier als auch nach acht Wochen Intervention jeweils im Vergleich zur *wash-out*-Phase beobachtet. In der anschließenden Korrelationsanalyse konnte der positive Zusammenhang von Leptin mit dem Körpergewicht sowie dem BMI bestätigt werden. Des Weiteren wurden die Gehalte von *Glucagon-like Peptide 1* (GLP-1) bestimmt, einem Hormon, das nach Nahrungsaufnahme sezerniert wird und beispielsweise die Magenentleerung verzögert, Appetit vermindert oder die Insulinsekretion steigert (Lai *et al.*, 2015; Shah und Vella, 2014). Die GLP-1-Konzentration im Plasma nahm nach achtwöchigem Konsum des Testgetränkes signifikant im Vergleich zur *wash-out*-Phase ab, wohingegen in der Kontrollgruppe die GLP-1-Konzentration über den Interventionszeitraum leicht zunahm. Wir konnten die Ergebnisse aus der Literatur, bei der eine Erhöhung von GLP-1 durch polyphenolreiche Extrakte, Beeren oder Anthocyanidine beobachtet wurde, nicht bestätigen (Daveri *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2014; Törrönen *et al.*, 2012). Wie in Kapitel 4.3. diskutiert, wurde ein Vergleich mit unseren Ergebnissen erschwert, da in diesen Studien Kurzeffekte über einen Zeitraum von 120 Minuten ermittelt wurden oder im Gegensatz zu unserer Studie die Untersuchungen an Mäusen und Patienten mit Diabetes Typ 2 durchgeführt wurden. Um festzustellen, inwiefern GLP-1 zur Verringerung der Energieaufnahme aufgrund von Sättigungseffekten beitragen kann und ob es zum Kurzzeitscreening geeignet ist, sollte künftig GLP-1 postprandial über einen Zeitraum von zwei Stunden bestimmt werden. Weiterhin kann das Enzym Dipeptidylpeptidase 4 (DPP 4) die GLP-1-Konzentration beeinflussen. Dieses Enzym baut GLP-1 ab (Ahmed *et al.*, 2017), weshalb die Inhibition von DPP 4 zu einer Verlängerung der Wirkung von GLP-1 führen kann. *In vitro* konnte eine Inhibierung der DPP 4 durch Extrakte aus roten Fruchtsäften, Pürees, Konzentraten und beispielsweise die Einzelverbindungen Ellagsäure und Punicalagin beobachtet werden (Berger, 2022; Les *et al.*, 2018). Kritisch zu betrachten sind in der vorliegenden Arbeit die hohen Standardabweichungen (SD) bei den Ergebnissen von Leptin und GLP-1, die auf interindividuelle Unterschiede der Probanden hindeuten könnten. Solche interindividuellen Schwankungen können auf genetische, psychologische Faktoren oder Umwelteinflüsse zurückzuführen sein. Zusätzlich spielt die Absorption, Metabolisierung und Ausscheidung der Polyphenole sowie die Zusammensetzung und Aktivität der intestinalen Mikrobiota eine wichtige Rolle bei der interindividuellen Variation (Feliciano *et al.*, 2017; Klen und Dolžan, 2022; Landberg *et al.*, 2019; Licinio *et al.*, 2014; Tomás-Barberán *et al.*, 2017).

Die Blutlipide (Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin und TAGs) wurden ebenfalls im Rahmen der Humanstudie bestimmt, da Übergewicht mit einer Störung des Fettstoffwechsels verbunden sein kann und zu erhöhten Blutfettwerten führen kann (Schoeler und Caesar, 2019). Zaha *et al.* beschrieben bereits, dass ein erhöhter BMI mit erhöhten TAG-Werten assoziiert sein kann (Zaha *et al.*, 2020). Dies konnte auch bei unserer

Korrelationsanalyse bestätigt werden, wo wir nach vierwöchiger Intervention eine signifikante Korrelation zwischen dem Körpergewicht sowie BMI mit den TAG-Werten ermittelt hatten. Die Untersuchung der TAG-Werte im Rahmen der Labordiagnostik könnte sich daher als Biomarker für Übergewicht und Adipositas eignen. Allerdings zeigten unsere Ergebnisse lediglich eine signifikante Erhöhung der TAG-Werte nach vier- und achtwöchiger Interventionszeit in der Kontrollgruppe, wohingegen bei allen anderen Parametern (Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin) keine signifikante Modulation sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe beobachtet wurde. Hinsichtlich des Einflusses von Polyphenolen auf die Blutlipide gibt es ambivalente Literaturdaten (Duthie *et al.*, 2006; Habanova *et al.*, 2016; Koutsos *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2019). Hawkins *et al.* ermittelten in ihrer Metaanalyse eine signifikante Reduzierung des Gesamtcholesterins bei den Probanden durch Supplementierung mit Aroniaprodukten über 6–8 Wochen (Hawkins *et al.*, 2021). Dagegen konnten Duthie *et al.* keine Beeinflussung der Blutlipide durch Konsum von Cranberrysaft (750 mL/d) über zwei Wochen bei 20 gesunden Frauen im Alter von 18–40 Jahren nachweisen. Sie diskutierten, dass die kurze Interventionszeit für das Nichtvorhandensein einer Wirkung verantwortlich sein könnte (Duthie *et al.*, 2006). Weiterhin muss beachtet werden, dass sowohl in der Studie von Duthie *et al.* als auch in unserer Studie nur normalgewichtige gesunde Probanden teilgenommen hatten und die Probandenzahl gering war.

Als weiterer Parameter wurde die PDE-Aktivität in den Thrombozyten bestimmt. Aus den Blutproben lassen sich Thrombozyten gut isolieren, welche die PDE-Klassen 2, 3 und 5 exprimieren (Gresele *et al.*, 2011; Montoya *et al.*, 2014). Unsere *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass sowohl Extrakte aus roten Fruchtsäften und Konzentraten als auch deren Fraktionen und Subfraktionen die PDE 3B-Aktivität inhibierten (vgl. Kapitel 4.1. und 4.2.). Diese Beobachtungen konnten wir im Rahmen der Humanstudie bestätigen, bei der eine signifikante Abnahme der PDE-Aktivität in den Thrombozyten durch Intervention mit dem polyphenolreichen Testgetränk sowohl nach vier als auch nach acht Wochen Intervention im Vergleich zur *wash-out*-Phase erfasst wurde. Ein ähnlicher Verlauf der Werte zeigte sich auch in der Kontrollgruppe, jedoch waren die Effekte weniger stark ausgeprägt als in der Testgruppe. Ein Vergleich mit Literaturdaten erweist sich als schwierig, da bisher der Einfluss von Fruchtsäften auf die PDE-Aktivität im Menschen nicht beschrieben wurde. Allerdings konnte sowohl in einer Pilotstudie mit 36 Probanden als auch in einer humanen Interventionsstudie mit 84 Probanden gezeigt werden, dass durch Kaffeeconsum die PDE-Aktivität in Thrombozyten signifikant reduziert werden kann. In *in vitro*-Experimenten wurde eine Inhibierung der PDE durch die Kaffeeinhaltsstoffe Koffein, *N*-Methylpyridinium, Trigonellin, verschiedenen Pyrazinen sowie Kaffeesäure und 5-CQA gezeigt (Montoya *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014). Um die Hypothese zu bestätigen, dass das polyphenolreiche

Testgetränk den Lipidstoffwechsel durch Hemmung der PDE-Aktivität und der daraus resultierenden Stimulierung der Lipolyse beeinflusst, könnte im Weiteren der Gehalt an freien FS oder Glycerin im Blut untersucht werden. So konnte längst eine signifikante Erhöhung der freien FS im Plasma sowohl durch Intervention eines polyphenolreichen Zitrusextraktes bei übergewichtigen Probanden aber auch durch Kaffeekonsum bei normalgewichtigen Probanden gemessen werden (Dallas *et al.*, 2014; Riedel *et al.*, 2014).

Erhöhte Harnsäuregehalte stehen im Zusammenhang mit der Prävalenz von Gicht sowie des metabolischen Syndroms, das gekennzeichnet ist durch Übergewicht, Hyperglykämie, Fettstoffwechselstörungen (Dyslipidämie) und Hypertonie (Alberti *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2017). Zusätzlich wurde eine signifikante, positive Korrelation von Hyperurikämie mit der Akkumulation von viszeralem Fett nachgewiesen (Tamba *et al.*, 2008), weshalb in der vorliegenden Arbeit auch die Harnsäuregehalte im Blut der Probanden untersucht wurden. Mithilfe der entwickelten HPLC-ESI-MS/MS-Methode konnten die Konzentrationen im Plasma erfolgreich bestimmt werden. Durch Verwendung eines isotopenmarkierten, internen Standards (1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Harnsäure) sollten einerseits Analytverluste während der Probenaufarbeitung kompensiert und andererseits die Ionensuppression ausgeglichen werden (Rychlik und Asam, 2009). Da sich bei der Methodenetablierung herausstellte, dass die Harnsäurestammlösungen bei 4 °C nicht stabil waren, wurden die Stammlösungen wie von Dai *et al.* beschrieben bei –20 °C gelagert und die Arbeitslösungen täglich neu angesetzt (Dai *et al.*, 2007). Im Allgemeinen wurde gezeigt, dass sich die Harnsäuregehalte der Probanden im Normalbereich befanden, da es sich bei den Studienteilnehmenden um gesunde Personen gehandelt hatte. Tendenziell konnte durch beide Studiengetränke (Test- und Placebogetränk) lediglich eine leichte Abnahme der Harnsäurekonzentrationen im Plasma verglichen mit der *wash-out*-Phase beobachtet werden, wobei in der Kontrollgruppe die Abnahme nach acht Wochen signifikant war. Die Korrelationsanalyse konnte einen positiven Zusammenhang der Harnsäuregehalte mit der Körperzusammensetzung wie von Tamba *et al.* beschrieben nicht bestätigen. Unsere Erwartung und die Ergebnisse aus der Literatur, dass polyphenolreiche Produkte die Harnsäuregehalte stark senken könnten, wurden im Rahmen der Humanstudie nicht bekräftigt (Bell *et al.*, 2014; Büsing *et al.*, 2019; Hillman und Uhanowsky, 2021; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Teilweise wurden die in der Literatur beschriebenen Studien einerseits mit einer größeren Anzahl an Probanden durchgeführt und andererseits litten die Studienteilnehmer an Hyperurikämie. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Choi *et al.* und Siqueira *et al.* wurde eine Erhöhung der Harnsäuregehalte durch purinreiche Ernährung (Fleisch, Fisch und Meeresfrüchte) sowie Fruktose nachgewiesen, wohingegen Milchprodukten auf die Harnsäurewerte senkten, die eine detaillierte Analyse der Ernährungsprotokolle in unserer Studie nötig machen (Choi *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2018).

Ergänzend wurden die DNA-Schäden mittels Comet-Assay im Vollblut und in isolierten Lymphozyten ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -induziert) als weiterer Parameter im Rahmen der Humanstudie bestimmt. Durch Behandlung mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) wird zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden erhalten (Collins, 2014). In der Testgruppe zeigte sich keine Veränderung der direkten DNA-Strangbrüche (ohne FPG) und eine signifikante Abnahme der gesamten DNA-Strangbrüche (mit FPG) nach vier- und achtwöchiger Intervention des Testgetränkes im Vergleich zur *wash-out*-Phase. Dagegen konnte in der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der direkten DNA-Strangbrüche nach achtwöchiger Intervention mit Placebogetränk im Vergleich zur *wash-out*-Phase beobachtet werden, während die gesamten DNA-Strangbrüche tendenziell nach acht Wochen zunahmten. Bisherige Studien zeigten sowohl eine Reduktion der direkten, der gesamten als auch der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Strangbrüche durch anthocyanreiche Produkte (Bakuradze *et al.*, 2019b; Bakuradze *et al.*, 2021; Riso *et al.*, 2013). Durch Induktion von DNA-Strangbrüchen mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann ein Krankheitszustand imitiert und somit der potenziell protektive Effekt einer Intervention besser nachgewiesen werden, da bei Gesunden die DNA-Schäden gering sind (Bakuradze *et al.*, 2021). In der Testgruppe nahmen die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten, gesamten DNA-Schäden in den Lymphozyten leicht ab, während in der Kontrollgruppe keine Modulation über den Interventionszeitraum beobachtet wurde. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten, gesamten DNA-Schäden in den Lymphozyten zwischen Test- und Kontrollgruppe nach achtwöchiger Intervention. Eine positive Korrelation der Harnsäuregehalte mit den DNA-Schäden im Vollblut wurde bei unserer Studie ermittelt. Ob es sich hierbei um eine kausale Beziehung (Ursache-Wirkungs-Beziehung) handelt, kann durch die Korrelationsanalyse nicht geklärt werden. Harnsäure ist aufgrund ihrer einerseits antioxidativen, andererseits aber auch prooxidativen Wirkung sowohl an der Abwehr als auch an der Entstehung von oxidativem Stress beteiligt. Die antioxidativen Eigenschaften wurden primär in hydrophilen Umgebungen biologischer Flüssigkeiten wie beispielsweise im Plasma beobachtet (Foksinski *et al.*, 2007; Kang und Ha, 2014; Sautin und Johnson, 2008). Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnten DelBo' *et al.* eine signifikante, positive Korrelation der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Schäden mit den Harnsäurekonzentrationen zeigen, die allerdings nur bei Frauen vorlag (DelBo' *et al.*, 2021). Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die DNA-Schäden in isolierten Lymphozyten bei adipösen Frauen ( $\text{BMI} = 33,05 \pm 2,17 \text{ kg/m}^2$ ) signifikant erhöht waren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem durchschnittlichen BMI von  $26,33 \pm 3,32 \text{ kg/m}^2$ . Mittels Spearman-Korrelation konnten die Autoren einen signifikanten Zusammenhang der DNA-Schäden mit dem Körpergewicht, dem BMI und der FM aufzeigen, was auf einen nachteiligen Effekt der erhöhten Lipidakkumulation auf die DNA-Integrität hindeutet. An der Studie von Włodarczyk *et al.* nahmen insgesamt 114 Probanden teil,

darunter 88 adipöse und 26 nicht-adipöse Frauen. (Włodarczyk *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen konnten im Rahmen unserer Studie bei normalgewichtigen männlichen Probanden und der Korrelationsanalyse nicht verifiziert werden.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Übergewicht und Adipositas zählen zu den in den letzten Jahren immer häufiger auftretenden Krankheiten, an der neben Erwachsenen auch Kinder und Jugendliche leiden (World Health Organization, 2022). In den Vereinigten Staaten, Mexiko, Neuseeland und Ungarn sind über 30 % der Bevölkerung im Alter von 15 Jahren und älter adipös, in Deutschland mehr als 23 % (Organisation for Economic Cooperation and Development, 2017). Um diesem Gesundheitsproblem entgegenzuwirken, bieten Eingriffe in den Lipidstoffwechsel und in dessen Signalwege einen möglichen therapeutischen Ansatz. Wissenschaftliche Studien deuten auf ein gesundheitsförderndes Potential von roten Früchten und daraus hergestellten Fruchtsäften hin, welche neben Vitaminen auch einen signifikanten Anteil weiterer bioaktiver sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe enthalten (Bakuradze *et al.*, 2019a; Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), 2014; Iriti und Faoro, 2009; Tucakovic *et al.*, 2018). Insbesondere aufgrund der oftmals negativen Berichterstattung von Fruchtsäften in den Medien, die sich meist allein auf die zu hohen Zuckergehalte beziehen, sollten auch die positiven Wirkungen der Inhaltsstoffe von Fruchtsäften wie beispielsweise den Polyphenolen berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit, die Rahmen des AiF-Projektes 20277 N entstand, war daher die Untersuchung des Einflusses von roten Fruchtsäften, deren Extrakten und Inhaltsstoffen auf den Lipidmetabolismus *in vitro* und *in vivo*.

Zunächst wurden Extrakte aus roten Fruchtsäften und Konzentraten (hergestellt vom Kooperationspartner an der Technischen Universität Braunschweig, Prof. Dr. Winterhalter) auf ihr PDE 3B-hemmendes Potential *in vitro* untersucht. Beim Screening konnten wir erfolgreich zeigen, dass alle getesteten Extrakte die PDE 3B-Aktivität inhibierten, wobei die stärkste Hemmung durch die Aronia-, Cranberry- Granatapfel- und Heidelbeerextrakte erfolgte. Weiterhin wurden ausgewählte Anthocyane und ein Aglykon im selbigen Assay getestet, um erste Einblicke in Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten. Hinsichtlich der biologischen Wirkungen waren das Aglykon und die Anthocyane, welche Monosaccharide gebunden hatten, aktiver als die Anthocyan-Disaccharide, führten zu einer potenten Inhibition des Enzyms PDE 3B und deuteten einen Einfluss der Molekülgröße bei der Enzymhemmung an. Da sich die Zusammensetzung der Extrakte im Hinblick auf die Aglyka und Zuckereinheiten der Anthocyane und Copigmente unterschied, wurden die drei aktivsten Extrakte (Aronia, Cranberry und Granatapfel) nachfolgend aktivitätsgeleitet fraktioniert, um die bioaktiven Schlüsselkomponenten identifizieren zu können. Die erhaltenen Anthocyan-, Copigment- und

Polymerfraktionen wurden in drei *in vitro*-Assays (PDE 3B-Aktivität, Lipidakkumulation, Lipolyse) untersucht und ihre Zusammensetzung analysiert. Wesentliche Erkenntnisse der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung (Technische Universität Braunschweig) waren, dass neben den Anthocyanen wie z. B. das Cyanidin-3-glukosid, insbesondere auch verschiedene in den Copigmentfraktionen enthaltene Inhaltsstoffe den Lipidstoffwechsel *in vitro* beeinflussen können durch Inhibierung der PDE 3B-Aktivität und Lipidakkumulation sowie Induktion der Lipolyse. So gab es erste Hinweise darauf, dass Zimtsäurederivate (5-CQA), Flavonoide (Quercetin, Quercetinderivate) sowie hydrolysierbare Tannine (Ellagsäurederivate, Punicalagin) wichtige Beiträge zur Modulation des Lipidmetabolismus leisten. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Copigmentfraktionen der Cranberry- und Granatapfalextrakte, bei denen der stärkste Einfluss in den *in vitro*-Assays gezeigt wurde, weiter mittels CCC subfraktioniert in fünf Cranberrysubfraktion und sieben Granatapfelsubfraktionen. In den potentesten Subfraktionen, welche u. a. die Cranberrysubfraktion CF1 war, wurden Inhaltsstoffe wie Kaffee-, Cumar- und Sinapinsäurehexoside identifiziert sowie in der Cranberrysubfraktion CF5 vorwiegend Myricetin- und Quercetinderivate. In den aktivsten Granatapfelsubfraktionen GF3 und GF4 wurden hauptsächlich Ellagsäurehexosid, Pedunculagin, Punicalagin und Granatin A nachgewiesen. Dadurch, dass in den Subfraktionen allerdings noch mehrere Verbindungen enthalten waren, ist eine synergistische Wirkung der Inhaltsstoffe nicht auszuschließen. Aus diesem Grund wäre es notwendig auch verschiedene in den Copigmentfraktionen vorkommende Reinsubstanzen *in vitro* zu testen.

Im Rahmen einer humanen placebokontrollierten Interventionsstudie mit 36 männlichen Probanden wurden anschließend die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse überprüft. Das Testgetränk wurde dabei aus Säften der roten Früchte Aronia, Granatapfel und Cranberry hergestellt. Neben Analyse der Körperzusammensetzung und der Ernährung wurden verschiedene Biomarker im Blut untersucht – darunter die Blutlipide (Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin und TAGs), Hunger- und Sättigungshormone (Leptin und GLP-1) oder PDE-Aktivität in Thrombozyten.

Bei der Testgruppe wurde eine Reduzierung der Eiweiß- und Fettaufnahme sowie eine leichte Erhöhung der FFM beobachtet, wohingegen in der Kontrollgruppe keine signifikante Modulation dieser Parameter gezeigt wurde. Ein Zusammenhang der Nährstoffaufnahme mit der FM (positive Korrelation) sowie mit der FFM (negative Korrelation) konnte mittels Spearman-Korrelationsanalyse dargelegt werden. Weiterhin konnten wir in unserer Studie eine positive Korrelation des Körpergewichtes und BMIs mit dem Leptingehalt zeigen, weswegen der Leptingehalt ein sinnvoller Parameter zur Untersuchung des Lipidmetabolismus zu sein scheint. Auch wurde während der achtwöchigen Intervention die PDE-Aktivität in beiden Gruppen reduziert, wobei in der Testgruppe die Effekte stärker



ausgeprägt waren. Zusätzlich wurden positive Effekte durch das Testgetränk nicht nur bei Parametern des Lipidmetabolismus beobachtet, sondern auch DNA-protective Wirkungen. Da allerdings die interindividuellen Unterschiede bei den untersuchten Parametern z. T. hoch waren (besonders bei den Hormonen Leptin und GLP-1), könnten deutlichere Ergebnisse durch eine größere Probandenzahl in künftigen Studien erhalten und die SD minimiert werden. Weiter sollte in nachfolgenden Studien abgeklärt werden, ob die protektiven Wirkungen auch in weiblichen Personen und adipösen Probanden beobachtet werden können.

Zusammenfassend geben die erzielten Ergebnisse Hinweise darauf, dass Fruchtsaftinhaltsstoffe regulierend in den Lipidstoffwechsel des Menschen eingreifen und diesen positiv beeinflussen können. Damit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag für die Fruchtsaftindustrie zum Wissen um die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe von Früchten und Fruchtsäften hinsichtlich einer lipidregulierenden Wirkung, die allerdings durch weitere Studien noch abgesichert werden sollten.

## 7. Material und Methoden

### 7.1. Material

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern/Lieferanten.

Gerät	Hersteller/Lieferant
<b>Autoklav</b> Tuttnauer 5075 E	Systemec, Linden, Deutschland
<b>Biofreezer</b> (-80 °C)	Sanyo, Moriguchi, Japan
<b>Brutschrank</b> CB 210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
<b>Eismaschine</b>	CMM, Budenheim, Deutschland
<b>HPLC-MS/MS-System</b>	
HPLC: Serie 1100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
1100 Degasser G1322A	
1100 Quat Pump G1311A	
1100 Autosampler G1313A	
1100 TCC G1316A	
MS: API 2000	Applied Biosystems, Framingham, USA
<b>Kühl-Gefrier-Kombination</b> Glassline	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
<b>Magnetrührer</b> MR 3001 K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
<b>Mikroskop</b>	
Labovert	Leitz, Kleinzell, Deutschland
Primo Vert	Zeiss, Jena, Deutschland
Leica DMI1 mit MC170 Kamera	Leica, Wetzlar, Deutschland
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
<b>Plattenphotometer</b>	
Synergy 2	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Sirius HT	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
<b>pH-Meter</b> pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
<b>Pipetten</b>	
Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Research plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
<b>Sicherheitswerkbank LaminAir HLB 2448 GS</b>	Heraeus, Hanau, Deutschland
<b>Szintillationszähler Wallac 1410</b>	Pharmacia, Uppsala, Schweden
<b>Trockenschrank</b>	Memmert, Schwabach, Deutschland
<b>Ultraschallbad Sonorex RK100</b>	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
<b>Ultraschallhomogenisator Labsonic 2000</b>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Vortexmischer</b>	
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Vortex Genius 3	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
<b>Waagen</b>	
Ultrafeinwaage XP6U Comparator	Mettler Toledo LLC., Columbus, USA
Feinwaage CP224 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Feinwaage BP210 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Wasserbäder</b>	
PC	Julabo, Seelbach, Deutschland
G, Thermostat D3	Haake, Karlsruhe, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	
Microfuge® R	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotina 96S	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Micro Star 17R	VWR, Darmstadt, Deutschland
Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 10: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern/Lieferanten.

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Autosampler-Vials mit Inserts und Deckel	LLG (Lab Logistics Group), Meckenheim, Deutschland
Deckgläser (24 mm x 24 mm)	neoLab, Heidelberg, Deutschland
HPLC-Säule Luna C18(2) 100Å (250 mm x 4,6 mm), 5 µm	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
HPLC-Vorsäule Luna C8(2), 5 µm	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Kryoröhrchen (2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Messpipetten (5 mL, 10 mL)	Brand, Wertheim, Deutschland
Monovetten (EDTA, Serum, Li-Heparin; 2,7 mL, 9 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich® (WU), Mainz, Deutschland
pH-Papier (pH 6,4–8,0)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Pipettenspitzen ( $V_{\max} = 10 \mu\text{L}$ , 200 µL, 1.000 µL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen ( $V_{\max} = 20 \mu\text{L}$ )	VWR, Darmstadt, Deutschland
Polypropylen-Gefäße (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Szintillationsfläschchen (4 mL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
48-Well-Platten (steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platten (steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen „Cellstar“ (25, 75 cm <sup>2</sup> ; steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugeneinheiten Costar® Spin-X®	Corning, Amsterdam, Niederlande
Zentrifugeneinheiten Nylon 0,2 µm (500 µL)	VWR, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
2,8- <sup>3</sup> H-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM, HPLC)	VWR International LLC, Radnor, USA
5'-Adenosinmonophosphat (AMP)	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland
Adipozytenmedium (AM-1-L1)	ZenBio, Durham, USA
Ameisensäure (MS-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bariumhydroxid-octahydrat (Ba(OH) <sub>2</sub> • 8 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)-Standard-Lösung (2 mg/dL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM), <i>high glucose</i> mit Phenolrot	Gibco, Paisley, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
Differenzierungsmedium (DM-2-L1)	ZenBio, Durham, USA
Dimethylformamid (DMF)	Janssen, Beerse, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	J&K Scientific GmbH, Pforzheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNA) hydrochlorid	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Essigsäure (ULC/MS-Grade)	Biosolve B.V., Valkenswaard, Niederlande
Ethanol	Chemsolute®, Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Paisley, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
GLP-1-ELISA-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Harnsäure	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxidplättchen (KOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Koffein	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland E
Leptin-ELISA-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich
Leupeptin	Biomol, Hamburg, Deutschland
<i>Lipolysis Assay Kit for 3T3-L1 Cells – Non-Esterified Fatty Acids Detection</i>	ZenBio, Durham, USA
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milrinon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
Pepstatin A	Serva, Heidelberg, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland
Phosphodiesterase 3B ( <i>recombinant</i> , EC 3.1.4.17)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Präadipozytenmedium (PM-1-L1)	ZenBio, Durham, USA
Propan-2-ol/Isopropanol (≥ 99,8 %)	VWR International LLC, Radnor, USA
Resazurin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rolipram	Calbiochem, San Diego, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl, 37 %)	Bernd Kraft, Duisburg, Deutschland
Szintillationscocktail „Rotiszint Eco Plus“	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>trans</i> -Resveratrol	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %) mit Phenolrot	Gibco, Paisley, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Trypsininhibitor aus <i>Glycine max</i> (soybean)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zaprinast	Calbiochem, San Diego, USA
Zinksulfatheptahydrat ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland

Tabelle 12: Liste der verwendeten Zellen mit Herstellern/Lieferanten.

<b>Zellen</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
3T3-L1-Präadipozyten	ZenBio, Durham, USA

Tabelle 13: Liste der verwendeten Softwares mit Herstellern/Lieferanten.

<b>Software</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Analyst 1.6.3	AB Sciex, Framingham, USA
ChemSketch 12.01	ACD.Labs, Toronto, Kanada
Gen5 1.02.8	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporations, Redmond, USA
Origin 2020	OriginLab, Northampton, USA
R 2.13.1	R, Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich

## 7.2. Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur erfolgten mit sterilen Materialien unter einer Sicherheitswerkbank. Alle verwendeten Lösungen wurden in autoklavierten Flaschen oder steril bezogenen Verbrauchsmaterialien angesetzt.

### 7.2.1. 3T3-L1-Zelllinie

Als Modell für die *in vitro*-Untersuchungen zum Lipidmetabolismus wurden 3T3-L1-Zellen genutzt. Diese Zellen, die Green und Kehinde in den 1970er-Jahren etablierten, wurden aus dem Gewebe des Embryos einer Hausmaus (*Mus musculus*) isoliert und wachsen in Zellkultur adhärent als Fibroblasten mit einer Verdopplungszeit von 20–30 h. Durch Zusatz

von Insulin, Glukokortikoiden (z. B. Dexamethason) und PDE-Hemmern (z. B. IBMX) kann der Differenzierungsprozess von 3T3-L1-Fibroblasten zu Adipozyten gefördert werden. Die Differenzierung stellt auf molekularer Ebene eine Verschiebung des Genexpressionsmusters der Zelle dar. Daraus resultierend ist eine vermehrte Synthese und Akkumulation von TAGs in den Lipidtröpfchen des Zytoplasmas zu beobachten (Green und Kehinde, 1974; Riedel *et al.*, 2012; Rizzatti *et al.*, 2013; Zebisch *et al.*, 2012; ZenBio, 2016).

## 7.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellaliquots

### Chemikalien und Lösungen

Tabelle 14: Lösungen zum Einfrieren und Auftauen von Zellaliquots.

Lösung	Zusammensetzung
PBS-Stammlösung (10x)	100 g NaCl 14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g KCl ad. 1 L H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
PBS-Gebrauchslösung (1x)	PBS-Stammlösung (10x) 1:10 mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> verdünnen, steril autoklavieren

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung

### Durchführung

Kurz vor Erreichen der Konfluenz des Zellrasens in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde das Präadipozytenmedium entfernt und mehrmals mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zum Ablösen mit 1–2 mL Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Medium abgestoppt. Nach Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 7.2.5.) wurde die Zellsuspension zentrifugiert (280 x g, 20 °C, 5 min) und das restliche Medium entfernt. Das Zellpellet wurde in Präadipozytenmedium aufgenommen, sodass dieses ungefähr 1.000.000 Zellen/mL enthielt. In die Kryoröhrchen wurden anschließend 150 µL fetalem Kälberserum, 150 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) und 1.200 µL Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden im Kryokontainer langsam eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff bei –196 °C gelagert (Kryokonservierung).

Zum Auftauen der Zellstocks wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C angetaut und, sobald sich die Zellsuspension vom Rand löste, in ein Polypropylenröhrchen mit 10 mL vorgewärmtem Präadipozytenmedium gegeben und damit die toxische Wirkung des DMSOs



minimiert. Nach Zentrifugation (280 x g, 20 °C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit etwas Medium wieder aufgenommen. Nach Überführung in eine 25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden die Zellen zum Anwachsen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um die toten und stark geschädigten Zellen zu entfernen und das Wachstum der lebenden Zellen nicht zu beeinträchtigen (ZenBio, 2016).

### 7.2.3. Mediumwechsel

Für das Wachstum der Zellen und zur Erhaltung der Vitalität ist es wichtig, regelmäßig das Medium zu wechseln, da Bestandteile des Mediums und dessen Zusätze (Nährstoffe wie Glukose oder Aminosäuren) von den Zellen metabolisiert werden. Weiterhin können z. T. auch toxische Stoffwechselendprodukte (z. B. Laktat oder Ammoniak) gebildet werden, die das Wachstum der Zellen nachteilig beeinflussen (Gstraunthaler und Lindl, 2021).

Bei einem Mediumwechsel wurde zuerst das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums sowie tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde frisches Präadipozytenmedium hinzugegeben – Der Gehalt war dabei abhängig von der Größe der Kulturflasche. Bei einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden beispielsweise 20 mL Präadipozytenmedium verwendet.

### 7.2.4. Subkultivierung

Wenn die gesamte Wachstumsfläche von kultivierten Zellen bedeckt ist (Konfluenz), wachsen i. d. R. strikt adhärente Zelllinien nicht mehr weiter, die Proliferationsrate sinkt und die Kultur kann durch Kontaktinhibition absterben. Daher sollte die Kultur vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert bzw. passagiert werden (Gstraunthaler und Lindl, 2021). Die Passagehäufigkeit hängt dabei von der Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie ab. Für die in dieser Arbeit verwendeten 3T3-L1-Zellen beträgt die Verdopplungszeit ca. 20–30 h (ZenBio, 2016).

Zuerst wurde das Zellkulturmedium verworfen und der Zellrasen zweimal mit vorgewärmtem PBS (37 °C, 10 mL) gewaschen. Nach Zugabe der Trypsin-EDTA-Lösung (1–2 mL) wurden die Zellen im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten. Nach Zugabe von Präadipozytenmedium (10 mL) wurde die Zellsuspension resuspendiert und die Zellen verdünnt in einer mit Präadipozytenmedium (20 mL) vorgelegten Kulturflasche im Brutschrank weiterkultiviert.

### 7.2.5. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Der Mittelwert (MW) der vier ausgezählten Eckquadrate wurde mit dem Kammerfaktor von 10.000 multipliziert, dies ergab die Zellzahl pro mL, wobei eventuelle Verdünnungen der Zellsuspension zu berücksichtigen waren (Gstraunthaler und Lindl, 2021).

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde das Anfärben mit Trypanblau genutzt. Tote Zellen erscheinen im Lichtmikroskop blau, da sie den Farbstoff nicht mehr aktiv ausschleusen können. Lebende, intakte Zellen dagegen können Trypanblau ausschleusen und erscheinen daher im Lichtmikroskop weiß (Schmitz, 2011). Die beim Passagieren erhaltene Zellsuspension wurde mit Trypanblaulösung verdünnt und mittels einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

$$ZZ/mL = MW(ZZ) * VF * KF$$

MW = Mittelwert der Zellzahl aus den vier Eckquadraten

VF = Verdünnungsfaktor

KF = Kammerfaktor = 10.000

ZZ = Zellzahl

Durch die ermittelten Zellzahlen der lebenden sowie toten Zellen ließ sich die Viabilität in % aus dem Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl berechnen (Schmitz, 2011).

## 7.3. *In vitro*-Testsysteme

### 7.3.1. Bestimmung der Zytotoxizität

Zu Beginn der *in vitro*-Untersuchungen wurde die Zytotoxizität der Testsubstanzen in 3T3-L1-Zellen mittels Resazurin-Reduktionstests bestimmt. Der Resazurin-Reduktionstest wird bereits seit den 1950er Jahren zur Bestimmung der relativen Zellvitalität genutzt. Er basiert auf der Metabolisierungsaktivität vitaler Zellen (O'Brien *et al.*, 2000). Dabei wird der blaue, nicht-fluoreszierende Farbstoff Resazurin von metabolisch aktiven Zellen zu dem pink, fluoreszierendem Resorufin reduziert (siehe Abbildung 10). Diese Reduktion kann z. B. durch mitochondriale oder mikrosomale Enzyme sowie Enzyme der Atmungskette zusammen mit Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) oder Nikotinamidadenindinukleotid-phosphat (NADPH) als Reduktionsäquivalente stattfinden (Präbst *et al.*, 2017). Die Reduktion des Resazurins und damit die Stärke der Fluoreszenz ist abhängig von der Anzahl der vorhandenen, lebenden Zellen (O'Brien *et al.*, 2000; van den Driessche *et al.*, 2014). Die

verwendete Methode ist in Kapitel 4.2. der vorliegenden Arbeit ebenso beschrieben (Niesen *et al.*, 2022).

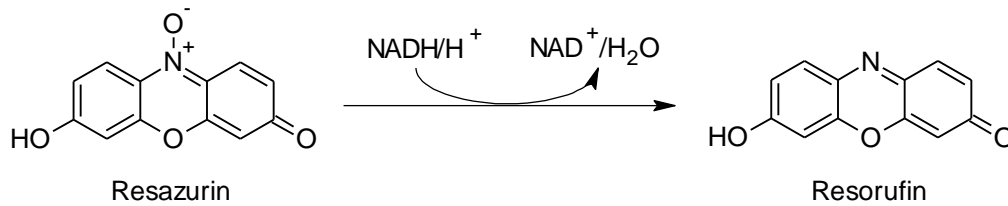


Abbildung 10: Reduktion von Resazurin zu Resorufin mittels  $\text{NADH/H}^+$  in lebenden Zellen. NADH: reduzierte Form von Nikotinamidadenindinukleotid,  $\text{NAD}^+$ : oxidierte Form von Nikotinamidadenindinukleotid (Matsuura *et al.*, 2019).

## Chemikalien und Lösungen

Tabelle 15: Lösungen für den Resazurin-Reduktionstest zur Bestimmung der Zytotoxizität. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. Während die Resazurin-Stammlösung 4 Wochen haltbar ist, wurde die Resazurin-Gebrauchslösung immer frisch angesetzt.

Lösung	Zusammensetzung
Resazurin-Stammlösung	11,05 mg Resazurin 100 $\mu\text{L}$ DMF
NaCl/ $\text{P}_i$ -Puffer	900 mg NaCl 14,4 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 52,8 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ad. 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
Resazurin-NaCl/ $\text{P}_i$ -Lösung	100 $\mu\text{L}$ Resazurin-Stammlösung ad. 100 mL NaCl/ $\text{P}_i$ -Puffer
Resazurin-Gebrauchslösung	5 mL Resazurin-NaCl/ $\text{P}_i$ -Lösung 45 mL serumfreies Medium (DMEM)
PBS	siehe Tabelle 14

## Inkubation

Um nicht zytotoxische Konzentrationen für die weiteren *in vitro*-Untersuchungen mittels Lipidakkumulation und Lipolyse zu bestimmen, wurden 3.000 3T3-L1-Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgestreut und anwachsen gelassen, bis diese zu 100 % konfluent waren. Danach wurde nochmals für 48 h inkubiert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Anschließend wurden die Zellen ausdifferenziert und entweder für 14 Tage (Lipidakkumulation) oder für 3 h (Lipolyse) mit den Testsubstanzen inkubiert. Die untersuchten Konzentrationsbereiche variierten aufgrund der unterschiedlichen Inkubationsdauer und lagen für die 14-tägige Inkubation bei  $c = 10\text{--}100 \mu\text{g/mL}$  für Aronia

und Cranberry bzw.  $c = 5\text{--}100 \mu\text{g/mL}$  für Granatapfel. Dagegen wurde für die 3-stündige Inkubation ein Konzentrationsbereich von  $c = 1\text{--}4 \text{ mg/mL}$  gewählt (siehe Kapitel 4.2.). Als Positivkontrolle wurde eine Endkonzentration von 0,1 % Saponin verwendet.

### Resazurin-Reduktionstest

Nach Ende der Inkubation wurde das Medium aus den Wells entfernt und zweimal mit je  $200 \mu\text{L/Well}$  PBS ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gewaschen. Das gesamte PBS sowie die Mediumreste wurden verworfen. Nach Zugabe von  $200 \mu\text{L/Well}$  Resazurin-Gebrauchslösung wurde für 1 h inkubiert ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 95 % relative Luftfeuchte, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Anschließend wurde die Zellvitalität am Photometer mittels fluorimetrischer Messung ( $\lambda_{\text{Anregung}} = 530 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Emission}} = 590 \text{ nm}$ ) bestimmt. Als relative Vitalität in % wurde der Messwert der Probe in Relation zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) unter Abzug des Leerwertes angegeben. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Zellvitalität  $V$  [%] erfolgte nach folgender Gleichung:

$$V [\%] = 100 \cdot \frac{M_B - M_{LW}}{M_K - M_{LW}}$$

$V$  = relative Zellvitalität,  $M$  = Messwert,  $B$  = Behandlung,  $LW$  = Leerwert,  $K$  = Lösungsmittelkontrolle

### 7.3.2. Bestimmung der Lipidakkumulation

Mittels *Oil-Red-O*-Färbung wurde die Lipidakkumulation bestimmt. *Oil-Red-O* ist ein roter, fettlöslicher Azofarbstoff, der zum Anfärben von TAGs in Adipozyten verwendet wird (Proescher, 1927; Riedel *et al.*, 2012). Der Differenzierungsprozess der 3T3-L1-Zellen sowie die anschließende *Oil-Red-O*-Färbung wurden in Anlehnung an die Methode von Riedel *et al.* (2012) durchgeführt. Die verwendete Methode ist in Kapitel 4.2. der vorliegenden Arbeit ebenfalls beschrieben (Niesen *et al.*, 2022).

## Chemikalien und Lösungen

Tabelle 16: Lösungen zur Bestimmung der Lipidakkumulation.

Lösung	Zusammensetzung
PBS	siehe Tabelle 14
Formalinlösung (10 %)	54 mL Formaldehydlösung (37 %) ad. 200 mL PBS
Isopropanol (60 %)	300 mL Isopropanol 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<i>Oil-Red-O</i> -Lösung (0,21 %)	0,21 g <i>Oil-Red-O</i> ad. 100 mL Isopropanol (60 %)

### Inkubation und Differenzierungsprozess

Nach Subkultivierung und Zellzahlbestimmung der 3T3-L1-Zellen wurden 10.000 Zellen/Well auf einer 48-Well-Platte ausgestreut. Die Zellen wurden in Präadipozytenmedium im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) anwachsen gelassen, bis sie zu 100 % konfluent waren. Danach wurde nochmals für 48 h inkubiert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

Die Stammlösungen Fraktionen und Subfraktionen ( $c = 5\text{--}25\text{ mg/mL}$ ,  $10\text{--}50\text{ mg/mL}$  bzw.  $25\text{--}100\text{ mg/mL}$ ) wurden in DMSO angesetzt und auf Endkonzentrationen von  $5\text{--}25\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $10\text{--}50\text{ }\mu\text{g/mL}$  bzw.  $25\text{--}100\text{ }\mu\text{g/mL}$  in Medium verdünnt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde demnach 0,1 %-ige DMSO-Lösung verwendet. Aufgrund der Inhibierung der Differenzierung durch Resveratrol ( $c = 11,4\text{ }\mu\text{g/mL}$  und  $22,8\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) wurde dieses als Positivkontrolle gewählt (Fischer-Posovszky *et al.*, 2010). Pro Platte wurde eine Zweifachbestimmung der Proben durchgeführt. Zur Differenzierung der Zellen wurde das Präadipozytenmedium abpipettiert, 500  $\mu\text{L}$  Inkubationslösung/Well hinzugegeben, angesetzt in Differenzierungsmedium, und vier Tage inkubiert. Anschließend wurde die Inkubationslösung entfernt (300  $\mu\text{L}$ /Well) und neue Inkubationslösung (400  $\mu\text{L}$ /Well), angesetzt in Adipozytenmedium, hinzugegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde für alle Inkubationslösungen Adipozytenmedium verwendet. Danach wurden alle vier Tage die Inkubationslösungen gewechselt (300  $\mu\text{L}$ /Well). Die Zellen wurden zwei Wochen mit den Testsubstanzen inkubiert, bevor die Färbung mittels *Oil-Red-O*-Lösung erfolgte.

### *Oil-Red-O*-Färbung

Zur quantitativen photometrischen Messung wurden die TAGs in den differenzierten 3T3-L1-Zellen mittels *Oil-Red-O*-Lösung angefärbt. Dazu wurden die Inkubationslösungen

abpipettiert, die differenzierten Zellen mit PBS und mit Formalinlösung (10 %) gewaschen. Nach erneuter Zugabe der Formalinlösung (10 %, 250  $\mu$ L/Well) zur Fixierung der Zellen wurde die Platte 1 h dunkel bedeckt. Dann wurde mit Isopropanol (60 %) gewaschen, die Zellen mit *Oil-Red-O*-Lösung (0,21 %, 100  $\mu$ L/Well) angefärbt und qualitativ die Lipidakkumulation mithilfe eines Mikroskops ausgewertet (siehe Abbildung 11). Nach Entfernen des überschüssigen Farbstoffes und viermaligem Waschen mit  $H_2O_{dd}$  wurde die Platte für ca. 30 min trocknen gelassen. Zum Auswaschen des Farbstoffes wurden die Zellen wurden mit Isopropanol (100 %, 375  $\mu$ L/Well) versetzt und die Absorption mittels Photometer ( $\lambda = 520$  nm) gemessen.

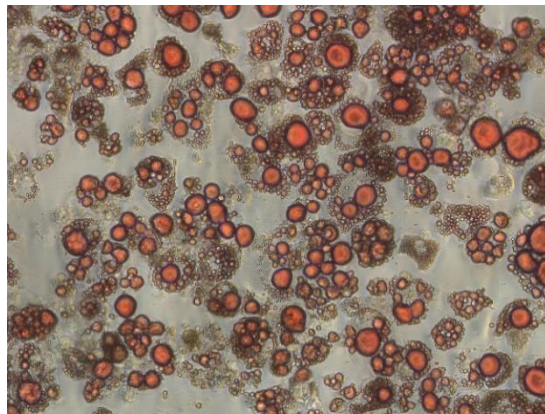


Abbildung 11: Anfärbung der TAGs (rot) in 3T3-L1-Zellen mittels *Oil-Red-O* nach 14-tägiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1%).

Als relative Lipidakkumulation in % wurde der Messwert der Proben im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO angegeben.

### 7.3.3. Bestimmung der freien Fettsäuren (Lipolyse)

Die lipolytische Wirkung der Testsubstanzen wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Lipolyse-Assay-Kits untersucht, bei dem der Gehalt an freien FS bestimmt wurde. Die verwendete Methode ist in Kapitel 4.2. der vorliegenden Arbeit ebenfalls beschrieben (Niesen *et al.*, 2022).

#### Inkubation und Differenzierungsprozess

Nach Subkultivierung und Zellzahlbestimmung der 3T3-L1-Zellen wurden 3.000 Zellen/Well auf einer 96-well-Platte ausgestreut. Die Zellen wurden in Präadipozytenmedium im Brutschrank (37 °C, 5 %  $CO_2$ , 95 % Luftfeuchtigkeit) anwachsen gelassen, bis sie zu 100 % konfluent waren. Danach wurde nochmals für 48 h inkubiert. Das Medium wurde nach vier Tagen gewechselt.

Das Präadipozytenmedium wurde abpipettiert, das Differenzierungsmedium hinzugegeben (150  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ) und erneut für vier Tage inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt (90  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ), Adipozytenmedium (120  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ) hinzugegeben und nochmals vier Tage inkubiert. Danach wurde alle vier Tage das Medium gewechselt, d. h. das alte Medium wurde abpipettiert (90  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ) und neues Adipozytenmedium zugegeben. Nach dem 14-tägigen Differenzierungsprozess erfolgte die Messung der freien FS mittels Lipolyse-Assay-Kits von ZenBio (Durham, USA).

### Lipolyse-Assay

Die lipolytische Aktivität wurde mithilfe einer gekoppelten Reaktion bestimmt, bei der die Konzentration der nicht veresterten, freien FS gemessen wurde. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Aus jedem Well der 96-Well-Platte wurden 120  $\mu\text{L}$  Adipozytenmedium entfernt und zweimal mit je 200  $\mu\text{L}/\text{Well}$  Waschpuffer gewaschen. Die Inkubationslösungen der (Sub-)Fraktionen wurden in Assaypuffer angesetzt und die Zellen für 3 h mit den Lösungen bei 37 °C inkubiert (100  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ; jeweils in Triplikaten). Als Positivkontrolle diente Isoproterenol ( $c = 1 \mu\text{M}$ ). Währenddessen wurde ausgehend von einer freien FS-Stammlösung ( $c = 1 \text{ mM}$ ) eine Standardreihe in Assaypuffer von 1,4–333,0  $\mu\text{M}$  angesetzt und je 50  $\mu\text{L}$  in Duplikaten auf eine Messplatte übertragen. Nach Beendigung der Inkubation wurden je 50  $\mu\text{L}$  der Überstände bzw. Inkubationslösungen auf eine separate Messplatte pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{L}/\text{Well}$  Reagenz A zur Standardreihe sowie zu den Inkubationslösungen. Dabei wurde Acyl-CoA mittels Acyl-CoA-Synthase aus den freien FS und CoA unter ATP-Verbrauch gebildet. Nach zehninütiger Inkubation wurden die Standardreihe und die Inkubationslösungen mit je 50  $\mu\text{L}/\text{Well}$  Reagenz B versetzt und für weitere 10 min inkubiert. Dadurch wurde Acyl-CoA unter Einfluss von Sauerstoff durch die Acyl-CoA-Oxidase zum 2,3-*trans*-Enoyl-CoA oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entstand. Im letzten Schritt reagierte 4-Aminoantipyrin in Gegenwart von Wasserstoffperoxid mit 3-Methyl-*N*-ethyl-*N*-( $\beta$ -hydroxyethyl)-anilin zu einem violetten Produkt, welches Licht bei  $\lambda = 540\text{--}550 \text{ nm}$  absorbiert. Nach 5 min Äquilibrierung bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei  $\lambda = 540 \text{ nm}$  gemessen.

Die Eigenabsorption der Inkubationslösungen wurde vor der Messung im Lipolyse-Assay bestimmt und von den im Lipolyse-Assay erhaltenen Werten abgezogen. Der Gehalt an freien FS wurde über eine externe Kalibrierung ( $c = 1,4\text{--}333,0 \mu\text{M}$ ) bestimmt und der Gehalt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle angegeben.

### 7.3.4. Bestimmung der cAMP-PDE 3B-Aktivität *in vitro*

#### Chemikalien und Lösungen

Tabelle 17: Lösungen zur Bestimmung der PDE 3B-Aktivität *in vitro*.

Lösung	Zusammensetzung
Assay-Puffer	1 mL TRIS/HCl (500 mM, pH 7,4) 1 mL MgCl <sub>2</sub> (100 mM) 0,1 mL EDTA (10 mM, pH 8,4) ad. 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
PDE-Puffer	0,292 g NaCl 0,0231 g DTT 2,5 mL TRIS/HCl (500 mM, pH 7,4) 25 mL Glycerin 0,025 mL Tween 20 ad. 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
cAMP-Grundmix	3 mL TRIS/HCl (500 mM, pH 7,4) 4,5 mL MgCl <sub>2</sub> (100 mM) 0,059 g AMP (Natriumsalz) 0,5 mL cAMP (0,3 mM) ad. 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

#### Durchführung und Auswertung

Die Durchführung des PDE 3B-Assays erfolgte in Anlehnung an die Methode von Pösch (1971). Die verwendete Methode ist zudem auch in den Kapiteln 4.1. und 4.2. der vorliegenden Arbeit beschrieben (Göttel *et al.*, 2020; Niesen *et al.*, 2022).

Das kommerziell erhältliche Enzym PDE 3B (Sigma-Aldrich) wurde auf eine Aktivität von 200 Units/mL ( $\pm$  49,14 ng/mL) mit PDE-Puffer verdünnt, dabei entspricht eine Unit einer Umsatzrate von 1 pmol cAMP pro Minute bei pH 7,4 und 37 °C. Als Positivkontrolle wurde 1,21 mM Koffeinelösung verwendet. Sowohl die Stammlösungen ( $c = 10$  mg/mL) als auch die Zwischenverdünnungen der Extrakte, Fraktionen und Subfraktionen wurden abhängig von ihrer Löslichkeit in DMSO oder Assay-Puffer angesetzt und auf pH 7,4 eingestellt. Je nach inhibitorischer Aktivität der Extrakte und (Sub-)Fraktionen wurden Standardreihen mit fünf Konzentrationen angesetzt, sodass ein IC<sub>50</sub>-Wert berechnet werden konnte.

Zu jeder Probe (100  $\mu$ L), außer dem Blindwert, wurden 20  $\mu$ L PDE 3B (200 Units/mL) hinzugefügt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Kurz vor Verwendung wurde dem cAMP-Grundmix eine definierte Menge [2,8-<sup>3</sup>H]-cAMP hinzugegeben (z. B. 1,25 mL cAMP-Mix +



3,25  $\mu\text{Ci}$   $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP} \cong 3,25 \mu\text{L}$ ). Nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$   $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP-Mix}$  zu jeder Probe (auch Blindwert) wurde anschließend für 25 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis durch die schnelle Zugabe von 250  $\mu\text{L}$   $\text{ZnSO}_4$  (0,266 M) gestoppt und durch 250  $\mu\text{L}$   $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (0,266 M) 5'-AMP ausgefällt. Die Proben wurden 9 min bei 13.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. 450  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurden in einen 3,5 mL vorbereiteten Szintillationscocktail überführt und gleichmäßig geschüttelt.

Die Vermessung des im Überstand verbliebenen  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMPs}$  erfolgte am Flüssigszintillationszähler. Dabei entsprachen die gemessenen *counts per minute* (cpm) der überschüssigen cAMP-Konzentration.

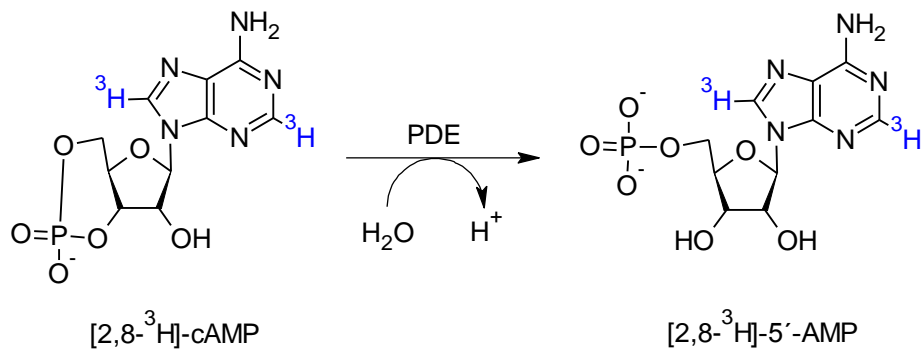


Abbildung 12: Hydrolyse von  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$  zu  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-5'-AMP}$ . AMP: Adenosinmonophosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PDE: Phosphodiesterase (modifiziert nach Barbosa *et al.*, 2011).

Die gemessenen cpm sind antiproportional zur Hydrolyserate und proportional zur  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$ -Konzentration im Überstand. Zur Auswertung wurden die gemessenen cpm jeder Probe auf den Blindwert bezogen, wodurch sich die jeweilige PDE 3B-Aktivität ergab. Diese wurde prozentual zur Lösungsmittelkontrolle angegeben und von 100 % subtrahiert. Dadurch konnte von jeder Probe die prozentuale Inhibition des Enzyms PDE 3B ermittelt werden. Die Ermittlung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte, bei der die Enzymaktivität 50 % betrug, erfolgte über die Erstellung einer Regressionsgeraden, in der die logarithmischen Substratkonzentrationen gegen die prozentuale PDE 3B-Aktivitäten aufgetragen wurden.

## 7.4. *In vivo*-Untersuchungen

### 7.4.1. Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben aus der Humanstudie

#### Chemikalien und Lösungen

Tabelle 18: Lösungen zur Aufbereitung der Blutproben.

Lösung	Zusammensetzung
Run-III-Puffer	1,5 mL TRIS/HCl (500 mM, pH 7,4) 1,5 mL MgCl <sub>2</sub> (100 mM) 150 µL EDTA (10 mM, pH 8,4) 1,5 µL Pepstatin A (10 mM in DMSO) 1,5 µL Leupeptin (10 mM) 75 µL PMSF (100 mM in DMSO) 11,7 mg Benzamidin 0,15 mg Trypsininhibitor 0,53 µL β-Mercaptoethanol ad. 15 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

#### Plasma

Für die Entnahme des Blutes der Probanden wurden 9 mL EDTA-Monovetten verwendet. Das Blut wurde zehn Minuten bei 2.500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Während der Zentrifugation schieden sich die festen Blutbestandteile, vor allem Erythrozyten und Thrombozyten, am Boden des Röhrchens ab. Das daraus resultierende überstehende, gelblich gefärbte Plasma wurde abgetrennt, aliquotiert und im Biofreezer bei -80 °C gelagert.

#### Thrombozyten

Das Vollblut in EDTA-Monovetten wurde bei 150 x g, 15 min, 24 °C zentrifugiert und anschließend 200 µL des plättchenreichen Plasmas (obere Phase) abgenommen. Danach wurde das plättchenreiche Plasma erneut bei 800 x g, 5 min, 24 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet (Thrombozyten) in Run-III-Puffer gelöst. Insgesamt wurden für jeden Zeitpunkt und Probanden vier Aliquots gewonnen. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

## 7.4.2. Bestimmung der cAMP-PDE-Aktivität in Thrombozyten

### Chemikalien und Lösungen

Tabelle 19: Lösungen zur Bestimmung der PDE-Aktivität in Thrombozyten.

Lösung	Zusammensetzung
Run-III-Puffer	siehe Tabelle 18
cAMP-Grundmix	siehe Tabelle 17

### Durchführung und Auswertung

Die Durchführung des radiochemischen PDE-Assays erfolgte in Anlehnung an die Methode von Pöch (1971) und Montoya *et al.* (2014). Die verwendete Methode ist ebenso in Kapitel 4.3. der vorliegenden Arbeit beschrieben (Rahn *et al.*, 2023).

Zunächst wurden die bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Thrombozyten kurz antauen gelassen und durch Ultraschallbehandlung auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation ( $12.000 \times g$ , 15 min,  $4\text{ °C}$ ) wurde der Überstand abgenommen und direkt für den PDE-Assay verwendet.

Dem cAMP-Grundmix wurde eine definierte Menge  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP}$  hinzugegeben (z. B.  $1,25\text{ mL cAMP-Mix} + 3,25\text{ }\mu\text{Ci } [2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP} \triangleq 3,25\text{ }\mu\text{L}$ ). Abhängig von der Probe wurden zu  $50\text{ }\mu\text{L } [2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP-Mix}$  Zelllysate, Positivkontrolle und/oder Run-III-Puffer hinzugefügt und bei  $37\text{ °C}$  inkubiert (Pipettierschema siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Pipettierschema für den PDE-Assay *in vivo*.

Probe	Zusammensetzung
Leerwert	100 $\mu\text{L}$ Run-III-Puffer
	50 $\mu\text{L}$ $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP-Mix}$
Plasmaprobe Proband	50 $\mu\text{L}$ Run-III-Puffer
	50 $\mu\text{L}$ Zelllysate
	50 $\mu\text{L}$ $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP-Mix}$
Positivkontrolle	50 $\mu\text{L}$ Positivkontrolle
	50 $\mu\text{L}$ Zelllysate
	50 $\mu\text{L}$ $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-cAMP-Mix}$

Die Enzymreaktion wurde nach 20 min mit  $250\text{ }\mu\text{L ZnSO}_4$  ( $0,266\text{ mM}$ ) auf Eis gestoppt und  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{-5'-AMP}$  durch Zugabe von  $250\text{ }\mu\text{L Ba(OH)}_2$  ( $0,266\text{ mM}$ ) ausgefällt. Nach Zentrifugation ( $13.000 \times g$ , 5 min,  $4\text{ °C}$ ) wurden anschließend  $450\text{ }\mu\text{L}$  des Überstandes mit  $3,5\text{ mL}$  eines Szintillationscocktails vermischt und die resultierende Radioaktivität mit einem

Flüssigszintillationszähler gemessen. Als Positivkontrollen wurden 50 µM Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNA; PDE 2-Hemmer), 10 µM Milrinon (PDE 3-Hemmer), 50 µM Rolipram (PDE 4-Hemmer) und 10 µM Zaprinast (PDE 5-Hemmer) verwendet (Gresele *et al.*, 2011; Montoya *et al.*, 2014). Zur Auswertung wurden alle Proben auf den Leerwert bezogen und daraus die Enzymaktivität in pmol cAMP pro Minute, normalisiert auf den Proteingehalt des Zelllysates, berechnet (pmol cAMP/min • mg Protein).

### Bestimmung des Proteingehaltes

Um die unterschiedlichen PDE-Aktivitäten vergleichen zu können, wurde nach dem Proteingehalt normalisiert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Assay. Der Bradford-Assay basiert auf der Proteinbindung an den Farbstoff Coomassie-Brillantblau im sauren Milieu, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschiebt (Bradford, 1976).

10 µL der aufgeschlossenen, ggf. verdünnten Probelösung oder 10 µL bovine Serumalbumin (BSA)-Lösung ( $c = 0,1\text{--}0,7$  mg/mL) als Referenzstandard wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. In jedes Well wurden anschließend 190 µL Bradford-Reagenz gegeben. Nach 15 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration der Probe und konnte durch lineare Regression einer externen Kalibrierung mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,1–0,7 mg/mL berechnet werden.

### 7.4.3. Bestimmung von Leptin und GLP-1 in Plasma

Die Bestimmung von Leptin und GLP-1 im Blutplasma erfolgte mittels ELISA-Kits. Dieses Testprinzip beruht auf einer direkten Sandwich-Technik. Hierbei dient ein Enzym als Marker, sodass die Antigenkonzentration (Leptin bzw. GLP-1) über den Substratumsatz ermittelt werden kann. Bei den verwendeten ELISA-Kits (Thermo Fisher Scientific, Wien) handelte es sich um einen zweiseitigen Immunoassay mit einer Festphase. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Festphase bestand aus dem spezifischen Antikörper gegen Leptin bzw. GLP-1. Durch Inkubation mit einer Plasmaprobe band das darin vorhandene Leptin bzw. GLP-1 an die Antikörper der Festphase. Da nicht alle reaktiven Plasmabestandteile mittels Waschvorgang entfernt werden konnten, wurde ein enzymgebundener Antikörper hinzugegeben. Dieser erkennt das gebundene Leptin bzw. GLP-1 an der Festphase und lagerte sich daran an, sodass es zur Bildung eines Konjugates kam. Durch einen erneuten Waschvorgang wurden die ungebundenen, enzymmarkierten Antikörper entfernt. Mittels Farbreaktion wurde anschließend das gebundene Konjugat durch Zugabe einer Substratlösung nachgewiesen, welche aus Hydrogenperoxid und einem

Chromogen (Tetramethylbenzidin) bestand. Nach Inkubation wurde die Umsetzung durch Säurezugabe gestoppt und die Absorption bei 450 nm am Plattenphotometer gemessen. Die Gehalte an Leptin und GLP-1 in den Plasmaproben wurden mittels externer Kalibriergerade berechnet und in pg/mL angegeben.

#### 7.4.4. Bestimmung des Harnsäuregehaltes in Plasma

Mittels HPLC-ESI<sub>neg</sub>-MS/MS wurde der Gehalt an Harnsäure in den Plasmaproben in Anlehnung an die Methode von Kim *et al.* (2009) bestimmt. Die verwendete Methode ist auch in Kapitel 4.3. der vorliegenden Arbeit beschrieben (Rahn *et al.*, 2023).

Zunächst wurden die Substanzen sowohl substanz- als auch gerätespezifisch getunt, um eine sensitive Methode im *multiple reaction monitoring* (MRM)-Modus zu entwickeln. Zur Messung wurde ein HPLC-MS/MS-System bestehend aus einer Agilent 1100 HPLC-Anlage, ausgestattet mit einem Autosampler (G1313A), einer quaternären Pumpe (G1311A) und einem Säulenofen (G1316A), gekoppelt mit einem API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Applied Biosystems) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Luna C18(2) (Phenomenex) mit einer Partikelgröße von 5 µm und in den Dimensionen 4,6 x 250 mm sowie einer Security Guard C8(2)-Vorsäule (Phenomenex) in den Dimensionen 3,0 x 4,0 mm. Die mobile Phase bestand aus 5 mM Ammoniumacetat/0,1 % Essigsäure (Fließmittel A) und Acetonitril/0,1 % Ameisensäure (Fließmittel B). Die HPLC-Parameter sowie die substanzspezifischen MS-Parameter sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 zusammengefasst. Folgende gerätespezifische Parameter wurden ausgewählt: *ion spray voltage* -4000 V; *ion source temperature* 500 °C; *curtain gas* 30 psi; *nebulizer gas* 45 psi, *heater gas* 30 psi, *collisionally acitvated dissociation gas* 4 psi. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit der Software Analyst, Version 1.6.3 (AB Sciex).

Tabelle 21: HPLC-Parameter der etablierten Methode (System: 1100 Series, Agilent Technologies).

<b>Säule</b>	<b>Luna C18(2) 250 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex)</b>							
<b>Vorsäule</b>	Security Guard C8(2) 4 x 3 mm (Phenomenex)							
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µL							
<b>Flussrate</b>	900 µL/min							
<b>Säulenofentemperatur</b>	30 °C							
<b>Fließmittel A</b>	5 mM Ammoniumacetat/0,1 % Essigsäure							
<b>Fließmittel B</b>	Acetonitril/0,1 % Ameisensäure							
<b>Zeit [min]</b>	<b>0,00</b>	<b>3,80</b>	<b>6,70</b>	<b>7,60</b>	<b>8,00</b>	<b>9,80</b>	<b>10,30</b>	<b>12,10</b>
<b>Fließmittel A [%]</b>	95	95	65	65	5	5	95	95
<b>Fließmittel B [%]</b>	5	5	35	35	95	95	5	5

Tabelle 22: Substanzspezifische MS-Parameter der Harnsäure (HS) und des internen Standards (1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-HS).

<b>Analyt</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>	<b>RT</b>	<b>dw</b>	<b>DP</b>	<b>CEP</b>	<b>FP</b>	<b>EP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
<b>HS</b>	167,0	123,9*	4,1	200	-36	-12	-220	-6	-18	-8
	167,0	95,8	4,1	200	-36	-12	-220	-6	-22	-6
<b>1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-HS</b>	169,0	124,9*	4,1	200	-36	-12	-230	-11	-20	-8
	169,0	96,9	4,1	200	-36	-12	-230	-11	-6	-6

CE: collision energy [V]; CEP: cell entrance potential [V]; CXP: cell exit potential [V]; DP: declustering potential [V]; dw: dwell time [msec]; EP: entrance potential [V]; FP: focusing potential [V]; Q1: Quadrupol 1 [m/z]; Q3: Quadrupol 3 [m/z]; RT: Retentionszeit [min]. \* Übergang, welcher als Quantifier verwendet wurde.

Sowohl die Harnsäure-Stammlösung ( $c = 1.500 \mu\text{g/mL}$ ) als auch die Stammlösung des isotopenmarkierten, internen Standards (1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Harnsäure;  $c = 1.600 \mu\text{g/mL}$ ) wurden in 0,3 M Kaliumhydroxidlösung angesetzt. Alle weiteren Verdünnungen wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hergestellt. Die Harnsäure-Kalibriergerade, welche eine Endkonzentration des isotopenmarkierten, internen Standards von 40 µg/mL enthielt, wurde im Bereich zwischen 2–100 µg/mL aufgenommen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  lag bei mindestens 0,99. Die Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*) des Analyten lag bei 0,2 µg/mL bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3:1 und die Bestimmungsgrenze (engl. *limit of quantification*) bei 0,4 µg/mL bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 10:1. Die Messpräzision der HPLC-ESI<sub>neg</sub>-MS/MS-Methode wurde durch die Lauf-zu-Lauf-Variabilität und die Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt. Dazu wurde eine Lösung verwendet, die je 50 µg/mL Harnsäure und 40 µg/mL des isotopenmarkierten internen Standards enthielt. Zur Bestimmung der Lauf-zu-Lauf-Variabilität wurde die Lösung an einem Tag zehnmal hintereinander vermessen, zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Variabilität an fünf aufeinander folgenden Tagen. Die Lauf-zu-Lauf-Variabilität lag bei 3,4 % und die Tag-zu-Tag-Variabilität bei 4,6 %. Die Wiederfindung

wurde durch Aufdotieren von 8 µg/mL, 10 µg/mL und 12 µg/mL Harnsäure zur Probenmatrix (aufgearbeitete Plasmaproben) bestimmt und betrug  $94 \pm 8 \%$ .

### Probenaufarbeitung

Um den Harnsäuregehalt im Blutplasma zu bestimmen, wurden zu 200 µL Plasma 5 µL isotopenmarkierter, interner Standard ( $c = 1600 \mu\text{g/mL}$ ) gegeben. Nach einer dreistündigen Äquilibrierungsphase bei 4 °C wurden 40 µL Trichloressigsäure (10 %) zur Proteinfällung hinzugegeben. Anschließend wurde für 1 min bei  $17.000 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in eine Zentrifugeneinheit (0,2 µm Nylonfilter) pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min,  $17.000 \times g$ , Raumtemperatur) wurde der Harnsäuregehalt in den Plasmaproben mittels HPLC-ESI<sub>neg</sub>-MS/MS bestimmt. Ein exemplarisches HPLC-ESI<sub>neg</sub>-MS/MS-Chromatogramm einer aufgearbeiteten Plasmaprobe ist in Abbildung 13 zu sehen.

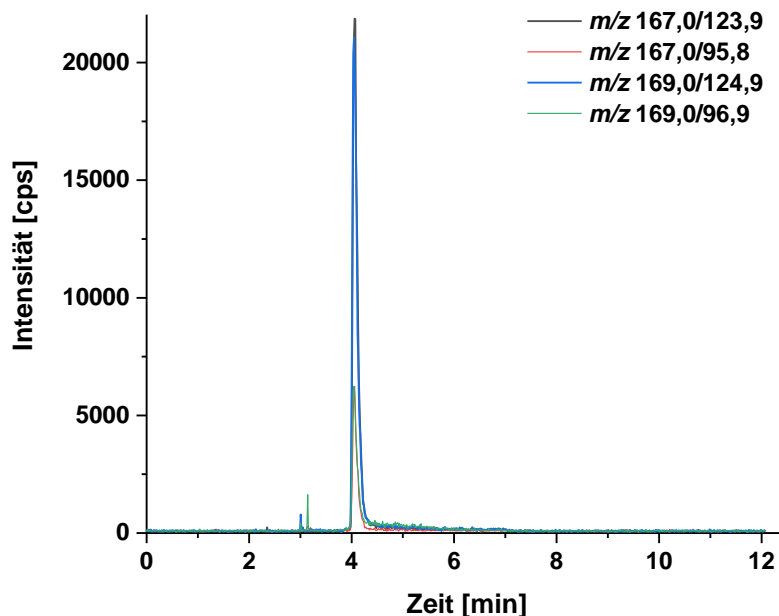


Abbildung 13: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus einer aufgearbeiteten Plasmaprobe (P2, 2. Blutentnahme, n=1) mit 40 µg/mL 1,3-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Harnsäure als internem Standard.

## 7.5. Statistik

### 7.5.1. *In vitro*-Daten

Die Ergebnisse sind dargestellt als  $MW \pm SD$ . Die Signifikanzen wurden mittels einseitigem *Student's t*-Test im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle angegeben (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 7.5.2. *In vivo*-Daten

Die in der Humanstudie erhaltenen Daten wurden als  $MW \pm SD$  dargestellt. Mittels Anderson-Darling-Test wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung geprüft. Die Unterschiede in der jeweiligen Gruppe mit normalverteilten Daten wurden einem einseitig gepaarten t-Test unterzogen, während die Daten ohne Normalverteilung mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt wurden. Die Unterschiede zwischen Testgruppe und Kontrollgruppe mit normalverteilten Daten wurden einem Zweistichproben t-Test unterzogen, während die Daten ohne Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt wurden (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 7.5.3. Korrelationsanalyse

Um die Rang-Korrelationskoeffizienten für jedes Paar von Parametern zu berechnen, wurde die Spearman-Korrelation genutzt. Datenbasis sind die Differenzen der Messwerte von der *wash-out*-Phase zur Intervention nach vier bzw. nach acht Wochen (Messwert nach vier Wochen Intervention abzüglich Messwert nach *wash-out*-Phase bzw. Messwert nach acht Wochen Intervention abzüglich Messwert nach *wash-out*-Phase). Die Korrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) sind folgendermaßen zu interpretieren:

- Positives Vorzeichen: Veränderungen der Parameter tendieren in die gleiche Richtung.
- Negatives Vorzeichen: Veränderungen der Parameter tendieren in entgegengesetzte Richtung.
- Die Koeffizienten können Werte in einem Bereich zwischen  $-1$  und  $+1$  annehmen. Ein Betrag von  $1$  signalisiert einen maximalen, vollständig linearen Zusammenhang der Veränderungen der Parameter.

Die Korrelation gibt keine Hinweise auf eine Ursache-Wirkungs-Beziehung. Bei einer hohen Korrelation kann ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern bestehen, sie kann aber ebenso durch Einflüsse eines dritten, nicht spezifizierten Parameters hervorgerufen werden.



## 8. Literaturverzeichnis

**Ademiluyi**, A.O.; Oyeniran, O.H.; Jimoh, T.O.; Oboh, G.; Boligon, A.A. (2019): Fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) seed modulates some markers of erectile function in isolated rat's corpus cavernosum: Influence of polyphenol and amino acid constituents. *Journal of food biochemistry* 43 (11), e13037. DOI: 10.1111/jfbc.13037.

**Adriouch**, S.; Lampuré, A.; Nechba, A.; Baudry, J.; Assmann, K.; Kesse-Guyot, E.; Hercberg, S.; Scalbert, A.; Touvier, M.; Fezeu, L.K. (2018): Prospective association between total and specific dietary polyphenol intakes and cardiovascular disease risk in the nutrinet-Santé French Cohort. *Nutrients* 10 (11). DOI: 10.3390/nu10111587.

**Ahmadian**, M.; Wang, Y.; Sul, H.S. (2010): Lipolysis in adipocytes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42 (5), 555–559. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.009.

**Ahmed**, R.H.; Huri, H.Z.; Muniandy, S.; Al-Hamodi, Z.; Al-Absi, B.; Alsalahi, A.; Razif, M.F. (2017): Altered circulating concentrations of active glucagon-like peptide (GLP-1) and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) in obese subjects and their association with insulin resistance. *Clinical biochemistry* 50 (13-14), 746–749. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.03.008.

**Aires**, V.; Labbé, J.; Deckert, V.; Pais de Barros, J.-P.; Boidot, R.; Haumont, M.; Maquart, G.; Le Guern, N.; Masson, D.; Prost-Camus, E.; Prost, M.; Lagrost, L. (2019): Healthy adiposity and extended lifespan in obese mice fed a diet supplemented with a polyphenol-rich plant extract. *Scientific reports* 9 (1), 9134. DOI: 10.1038/s41598-019-45600-6.

**Alberti**, K.G.M.; Zimmet, P.; Shaw, J. (2005): The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet* 366 (9491), 1059–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67402-8.

**Albrechtsen**, N.J.W.; Holst, J.J.; Cherrington, A.D.; Finan, B.; Gluud, L.L.; Dean, E.D.; Campbell, J.E.; Bloom, S.R.; Tan, T.M.-M.; Knop, F.K.; Müller, T.D. (2023): 100 years of glucagon and 100 more. *Diabetologia* 66 (8), 1378–1394. DOI: 10.1007/s00125-023-05947-y.

**Allott**, E.H.; Oliver, E.; Lysaght, J.; Gray, S.G.; Reynolds, J.V.; Roche, H.M.; Pidgeon, G.P. (2012): The SGBS cell strain as a model for the in vitro study of obesity and cancer. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 14 (10), 774–782. DOI: 10.1007/s12094-012-0863-6.

- Ameer**, F.; Scanduzzi, L.; Hasnain, S.; Kalbacher, H.; Zaidi, N. (2014): De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism: clinical and experimental* 63 (7), 895–902. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.04.003.
- Andlauer**, W. (2004): Bioaktive sekundäre Pflanzenstoffe – Polyphenole. *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin* (2), 14–18.
- Aranaz**, P.; Navarro-Herrera, D.; Zabala, M.; Miguélez, I.; Romo-Hualde, A.; López-Yoldi, M.; Martínez, J.A.; Vizmanos, J.L.; Milagro, F.I.; González-Navarro, C.J. (2019): Phenolic compounds inhibit 3T3-L1 adipogenesis depending on the stage of differentiation and their binding affinity to PPAR $\gamma$ . *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (6). DOI: 10.3390/molecules24061045.
- Arfaoui**, L. (2021): Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (10). DOI: 10.3390/molecules26102959.
- Armour**, S.L.; Stanley, J.E.; Cantley, J.; Dean, E.D.; Knudsen, J.G. (2023): Metabolic regulation of glucagon secretion. *The Journal of endocrinology* 259 (1). DOI: 10.1530/JOE-23-0081.
- Arutyunyan**, I.V.; Rzhaniyova, A.A.; Volkov, A.V.; Goldstein, D.V. (2009): Effect of dexamethasone on differentiation of multipotent stromal cells from human adipose tissue. *Bulletin of experimental biology and medicine* 147 (4), 503–508. DOI: 10.1007/s10517-009-0548-5.
- Azevedo**, M.F.; Faucz, F.R.; Bimpaki, E.; Horvath, A.; Levy, I.; Alexandre, R.B. de; Ahmad, F.; Manganiello, V.; Stratakis, C.A. (2014): Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocrine reviews* 35 (2), 195–233. DOI: 10.1210/er.2013-1053.
- Bakowska-Barczak**, A.M.; Kolodziejczyk, P.P. (2011): Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* 34 (2), 1301–1309. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.10.002.
- Bakuradze**, T.; Tausend, A.; Galan, J.; Groh, I.A.M.; Berry, D.; Tur, J.A.; Marko, D.; Richling, E. (2019a): Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free radical research* 53 (sup1), 1045–1055. DOI: 10.1080/10715762.2019.1618851.
- Bakuradze**, T.; Becker, D.; Reischmann, J.; Meiser, P.; Galan, J.; Richling, E. (2019b): Protection from DNA damage by use of an aronia food supplement—Results from a pilot human intervention study. *Curr Pharmacol Rep* 5 (3), 188–195. DOI: 10.1007/s40495-019-00178-5.

- Bakuradze, T.;** Meiser, P.; Galan, J.; Richling, E. (2021): DNA protection by an aronia juice-based food supplement. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 10 (6). DOI: 10.3390/antiox10060857.
- Banach, M.;** Wiloch, M.; Zawada, K.; Cyplik, W.; Kujawski, W. (2020): Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanin-rich water-soluble aronia dry extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland) 25 (18). DOI: 10.3390/molecules25184055.
- Barbosa, M.L.d.C.;** Fumian, M.M.; Miranda, A.L.P. de; Barreiro, E.J.; Lima, L.M. (2011): Therapeutic approaches for tumor necrosis factor inhibition. *Braz. J. Pharm. Sci.* 47 (3), 427–446. DOI: 10.1590/S1984-82502011000300002.
- Barth, S.W.;** Koch, T.C.L.; Watzl, B.; Dietrich, H.; Will, F.; Bub, A. (2012): Moderate effects of apple juice consumption on obesity-related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. *European journal of nutrition* 51 (7), 841–850. DOI: 10.1007/s00394-011-0264-6.
- Baur, A.;** Baur, S. (2022): *Humanbiologie für Lehramtsstudierende. Ein Arbeits- und Studienbuch.* 2. Aufl. 2022. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-64608-3. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-2010452>.
- Belitz, H.-D.;** Grosch, W.; Schieberle, P. (2008): *Lebensmittelchemie.* Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-540-73201-3.
- Bell, P.G.;** Gaze, D.C.; Davison, G.W.; George, T.W.; Scotter, M.J.; Howatson, G. (2014): Montmorency tart cherry (*Prunus cerasus* L.) concentrate lowers uric acid, independent of plasma cyanidin-3-O-glucosiderutinoside. *J. Funct. Foods* 11, 82–90. DOI: 10.1016/j.jff.2014.09.004.
- Bender, A.T.;** Beavo, J.A. (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* 58 (3), 488–520. DOI: 10.1124/pr.58.3.5.
- Beretz, A.;** Anton, R.; Stoclet, J.C. (1978): Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia* 34 (8), 1054–1055. DOI: 10.1007/BF01915343.
- Berger, K.;** Ostberg-Potthoff, J.J.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. (2020): Carbohydrate hydrolase-inhibitory activity of juice-based phenolic extracts in correlation to their anthocyanin/copigment profile. *Molecules* (Basel, Switzerland) 25 (22). DOI: 10.3390/molecules25225224.
- Berger, K.;** Ostberg Potthoff, J.J.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. (2021): Blood glucose lowering effect by an extract from aronia (*Aronia melanocarpa*) - A pilot intervention study. *CNT* 2 (3), 223–229. DOI: 10.2174/2665978602666210709103232.

- Berger, K.** (2022): Einfluss ausgewählter roter Fruchtsaftextrakte und deren Inhaltsstoffe auf den Glucosestoffwechsel in vitro und in vivo. Dissertation Technische Universität Kaiserslautern.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Gatto, G.J.; Stryer, L.** (2018): Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-54619-2.
- Bézaire, V.; Langin, D.** (2009): Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *The Proceedings of the Nutrition Society* 68 (4), 350–360. DOI: 10.1017/S0029665109990279.
- Birkenfeld, A.L.; Boschmann, M.; Moro, C.; Adams, F.; Heusser, K.; Franke, G.; Berlan, M.; Luft, F.C.; Lafontan, M.; Jordan, J.** (2005): Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (6), 3622–3628. DOI: 10.1210/jc.2004-1953.
- Bischoff, G.** (2022): Was ist gesichert in der Therapie der Adipositas. *Innere Medizin (Heidelberg, Germany)* 63 (12), 1219–1228. DOI: 10.1007/s00108-022-01420-x.
- Bischoff, S.** (2015): Adipositas im Erwachsenenalter. *Aktuel Ernährungsmed* 40 (03), 147–178. DOI: 10.1055/s-0034-1387650.
- Bizzi, M.F.; Bolger, G.B.; Korbonits, M.; Ribeiro-Oliveira, A.** (2019): Phosphodiesterases and cAMP pathway in pituitary diseases. *Frontiers in endocrinology* 10, 141. DOI: 10.3389/fendo.2019.00141.
- Bobadilla, M.; García-Sanmartín, J.; Martínez, A.** (2021): Natural food supplements reduce oxidative stress in primary neurons and in the mouse brain, suggesting applications in the prevention of neurodegenerative diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (1). DOI: 10.3390/antiox10010046.
- Boden, G.; Chen, X.; Mozzoli, M.; Ryan, I.** (1996): Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81 (9), 3419–3423. DOI: 10.1210/jcem.81.9.8784108.
- Bondonno, N.P.; Dalgaard, F.; Murray, K.; Davey, R.J.; Bondonno, C.P.; Cassidy, A.; Lewis, J.R.; Kyrø, C.; Gislason, G.; Scalbert, A.; Tjønneland, A.; Hodgson, J.M.** (2021): Higher habitual flavonoid intakes are associated with a lower incidence of diabetes. *The Journal of nutrition* 151 (11), 3533–3542. DOI: 10.1093/jn/nxab269.
- Boswell-Smith, V.; Spina, D.; Page, C.P.** (2006): Phosphodiesterase inhibitors. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1 (Suppl 1), 252-7. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706495.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

**Braun, K.; Oeckl, J.; Westermeier, J.; Li, Y.; Klingenspor, M. (2018):** Non-adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissues. *The Journal of experimental biology* 221 (Pt Suppl 1). DOI: 10.1242/jeb.165381.

**Brewer, M.S. (2011):** Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10 (4), 221–247. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.

**Burdulis, D.; Sarkinas, A.; Jasutienė, I.; Stackevičienė, 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 (4), 399–408.

**Büsing, F.; Hägele, F.A.; Nas, A.; Döbert, L.-V.; Fricker, A.; Dörner, E.; Podlesny, D.; Aschoff, J.; Pöhl, T.; Schweiggert, R.; Fricke, W.F.; Carle, R.; Bosy-Westphal, A. (2019):** High intake of orange juice and cola differently affects metabolic risk in healthy subjects. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 38 (2), 812–819. DOI: 10.1016/j.clnu.2018.02.028.

**Butcher, R.W.; Sutherland, E.W. (1962):** Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *The Journal of biological chemistry* 237, 1244–1250.

**Calle, E.E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K.; Thun, M.J. (2003):** Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* 348 (17), 1625–1638. DOI: 10.1056/NEJMoa021423.

**Calvisi, D.F. (2011):** De-novo-Lipogenese: Bedeutung beim hepatozellulären Karzinom. *Der Pathologe* 32 Suppl 2, 174–180. DOI: 10.1007/s00292-011-1529-9.

**Campbell, P.J.; Carlson, M.G.; Hill, J.O.; Nurjhan, N. (1992):** Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *The American journal of physiology* 263 (6), E1063-9. DOI: 10.1152/ajpendo.2006.263.6.E1063.

**Caruso, A.; Barbarossa, A.; Tassone, A.; Ceramella, J.; Carocci, A.; Catalano, A.; Basile, G.; Fazio, A.; Iacopetta, D.; Franchini, C.; Sinicropi, M.S. (2020):** Pomegranate: Nutraceutical with Promising Benefits on Human Health. *Applied Sciences* 10 (19), 6915. DOI: 10.3390/app10196915.

**Cesoniene, L.; Jasutiene, I.; Sarkinas, A. (2009):** Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 45 (12), 992–999.

- Chaiittianan**, R.; Sutthanut, K.; Rattanathongkom, A. (2017): Purple corn silk: A potential anti-obesity agent with inhibition on adipogenesis and induction on lipolysis and apoptosis in adipocytes. *Journal of ethnopharmacology* 201, 9–16. DOI: 10.1016/j.jep.2017.02.044.
- Chang**, C.-C.; Lin, K.-Y.; Peng, K.-Y.; Day, Y.-J.; Hung, L.-M. (2016): Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocrine journal* 63 (2), 169–178. DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0545.
- Chang**, J.-B.; Chen, Y.-L.; Hung, Y.-J.; Hsieh, C.-H.; Lee, C.-H.; Pei, D.; Lin, J.-D.; Wu, C.-Z.; Liang, Y.-J.; Lin, C.-M. (2017): The role of uric acid for predicting future metabolic syndrome and type 2 diabetes in older people. *The journal of nutrition, health & aging* 21 (3), 329–335. DOI: 10.1007/s12603-016-0749-3.
- Chen**, L.; Cao, H.; Xiao, J. (2018): *Polyphenols: Properties, recovery, and applications*. Elsevier. ISBN: 9780128135723.
- Cho**, C.H.; Patel, S.; Rajbhandari, P. (2023): Adipose tissue lipid metabolism: lipolysis. *Current opinion in genetics & development* 83, 102114. DOI: 10.1016/j.gde.2023.102114.
- Choi**, H.K.; Liu, S.; Curhan, G. (2005): Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis and rheumatism* 52 (1), 283–289. DOI: 10.1002/art.20761.
- Cipolletti**, M.; Solar Fernandez, V.; Montalesi, E.; Marino, M.; Fiocchetti, M. (2018): Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: the modulation of estrogen receptors (ERs) signaling. *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092624.
- Clauss**, W.; Clauss, C. (2018): *Humanbiologie kompakt*. 2. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg. Springer Spektrum. ISBN: 978-3-662-55849-2 (Springer eBook Collection).
- Collins**, A.R. (2014): Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et biophysica acta* 1840 (2), 794–800. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.04.022.
- Costa**, P.C.; Pires Dorneles, G.; Da Vital Silva, I.R.; Pereira de Araujo, C.L.; Pereira Reinaldo, G.; Peres, A.; Funchal, C.; Dal Lago, P.; Dani, C.; Rostiola Elsner, V. (2017): Chronic purple grape juice consumption induces age-dependent changes on cognitive function in elderly women. *J Syst Integr Neurosci* 3 (1). DOI: 10.15761/JSIN.1000149.
- Dai**, X.; Fang, X.; Zhang, C.; Xu, R.; Xu, B. (2007): Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS)

as a candidate reference method. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 857 (2), 287–295. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.07.035.

**Dallas, C.**; Gerbi, A.; Tenca, G.; Juchaux, F.; Bernard, F.-X. (2008): Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 15 (10), 783–792. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.05.006.

**Dallas, C.**; Gerbi, A.; Elbez, Y.; Caillard, P.; Zamaria, N.; Cloarec, M. (2014): Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals. *Phytotherapy research : PTR* 28 (2), 212–218. DOI: 10.1002/ptr.4981.

**Dantas, M.B.**; Sampaio, T.L.; Menezes, R.R.P.P.B. de; Ferreira, J.M.; Melo, T.S.; Meneses, R.R.C.; Rodrigues, H.G.; Lima, D.B.; Martins, A.M.C.; Queiroz, M.G.R. de (2018): Caffeic acid reduces lipid accumulation and reactive oxygen species production in adipocytes. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 12 (20), 263–268. DOI: 10.5897/AJPP2018.4937.

**D'Archivio, M.**; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. (2010): Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences* 11 (4), 1321–1342. DOI: 10.3390/ijms11041321.

**Daveri, E.**; Cremonini, E.; Mastaloudis, A.; Hester, S.N.; Wood, S.M.; Waterhouse, A.L.; Anderson, M.; Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. (2018): Cyanidin and delphinidin modulate inflammation and altered redox signaling improving insulin resistance in high fat-fed mice. *Redox biology* 18, 16–24. DOI: 10.1016/j.redox.2018.05.012.

**Day, A.J.**; Gee, J.M.; DuPont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. (2003): Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* 65 (7), 1199–1206. DOI: 10.1016/S0006-2952(03)00039-X.

**Degerman, E.**; Ahmad, F.; Chung, Y.W.; Guirguis, E.; Omar, B.; Stenson, L.; Manganiello, V. (2011): From PDE3B to the regulation of energy homeostasis. *Current opinion in pharmacology* 11 (6), 676–682. DOI: 10.1016/j.coph.2011.09.015.

**DelBo', C.**; Martini, D.; Bernardi, S.; Gigliotti, L.; Marino, M.; Gargari, G.; Meroño, T.; Hidalgo-Liberona, N.; Andres-Lacueva, C.; Kroon, P.A.; Cherubini, A.; Guglielmetti, S.; Porrini, M.; Riso, P. (2021): Association between food intake, clinical and metabolic markers and DNA damage in older subjects. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (5). DOI: 10.3390/antiox10050730.

**Dell'Agli, M.;** Galli, G.V.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F.; Bosisio, E. (2005): In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 53 (6), 1960–1965. DOI: 10.1021/jf048497+.

**Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG),** e.V. (2014): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) e.V. (Version 2.0). Online verfügbar unter [https://register.awmf.org/assets/guidelines/050-001I\\_S3\\_Adipositas\\_Pr%C3%A4vention\\_Therapie\\_2014-11-abgelaufen.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/050-001I_S3_Adipositas_Pr%C3%A4vention_Therapie_2014-11-abgelaufen.pdf), zuletzt geprüft am 15.05.2023.

**Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE),** e.V. (2012): Ein hoher Gemüse- und Obstverzehr fördert die Gesundheit. DGE stellt wissenschaftliche Datenlage vor. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/presse/pm/ein-hoher-gemuese-und-obstverzehr-foerdert-die-gesundheit/>, zuletzt geprüft am 23.04.2023.

**Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE),** e.V. (2014): Sekundäre Pflanzenstoffe und ihre Wirkung auf die Gesundheit - Eine Aktualisierung anhand des Ernährungsberichts 2012. DGE info, S178-186. Online verfügbar unter <https://www.dge.de/wissenschaft/weitere-publikationen/fachinformationen/sekundaere-pflanzenstoffe-und-ihre-wirkung/>, zuletzt geprüft am 04.01.2023.

**Dixon, E.D.;** Nardo, A.D.; Claudel, T.; Trauner, M. (2021): The Role of Lipid Sensing Nuclear Receptors (PPARs and LXR) and Metabolic Lipases in Obesity, Diabetes and NAFLD. *Genes* 12 (5). DOI: 10.3390/genes12050645.

**Döll, M.** (2020): *Gesund mit Granatapfel. Mit dem Vitalstoffwunder Zellen und Gefäße schützen. Aktualisierte und überarbeitete Neuauflage.* Stuttgart. Herbig. ISBN: 978-3776628838 (Hausapotheke).

**Duncan, R.E.;** Ahmadian, M.; Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Sul, H.S. (2007): Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annual review of nutrition* 27, 79–101. DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734.

**Duthie, S.J.;** Jenkinson, A.M.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L.S.; Christen, P.; Duthie, G.G. (2006): The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European journal of nutrition* 45 (2), 113–122. DOI: 10.1007/s00394-005-0572-9.

**Eisenstecken, E.;** Gostner, J.M.; Fuchs, D.; Überall, F. (2012): Molekulare Stoffwechselsensorik bei durch Adipositas induzierter Entzündung. *Schweiz Z Ganzheitsmed* 24 (4), 221–231. DOI: 10.1159/000341337.



**Escribano-Bailón**, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; García-Estévez, I. (2019): Wine color evolution and stability. *Red Wine Technology*, 195–205. DOI: 10.1016/B978-0-12-814399-5.00013-X.

**Fasshauer**, M.; Klein, J.; Blüher, M.; Paschke, R. (2004): Adipokine: Mögliches Bindeglied zwischen Insulinresistenz und Adipositas. *Dtsch Arztebl* 101 (51–52), 3491–3495. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/44822/Adipokine-Moegliches-Bindeglied-zwischen-Insulinresistenz-und-Adipositas>, zuletzt geprüft am 05.07.2023.

**Feigenspan**, A. (2017): *Prinzipien der Physiologie. Grundlegende Mechanismen und evolutionäre Strategien*. 1. Aufl. 2017. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-54116-6. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1591345>.

**Feliciano**, R.P.; Mills, C.E.; Istaş, G.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A. (2017): Absorption, metabolism and excretion of cranberry (poly)phenols in humans: A dose response study and assessment of inter-individual variability. *Nutrients* 9 (3). DOI: 10.3390/nu9030268.

**Figueira**, I.; Tavares, L.; Jardim, C.; Costa, I.; Terrasso, A.P.; Almeida, A.F.; Govers, C.; Mes, J.J.; Gardner, R.; Becker, J.D.; McDougall, G.J.; Stewart, D.; Filipe, A.; Kim, K.S.; Brites, D.; Brito, C.; Brito, M.A.; Santos, C.N. (2019): Blood-brain barrier transport and neuroprotective potential of blackberry-digested polyphenols: an in vitro study. *European journal of nutrition* 58 (1), 113–130. DOI: 10.1007/s00394-017-1576-y.

**Fischer-Posovszky**, P.; Kukulus, V.; Tews, D.; Unterkircher, T.; Debatin, K.-M.; Fulda, S.; Wabitsch, M. (2010): Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *The American Journal of Clinical Nutrition* 92 (1), 5–15. DOI: 10.3945/ajcn.2009.28435.

**Fischer**, U.A.; Carle, R.; Kammerer, D.R. (2011): Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food chemistry* 127 (2), 807–821. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.156.

**Foksinski**, M.; Gackowski, D.; Rozalski, R.; Siomek, A.; Guz, J.; Szpila, A.; Dziaman, T.; Olinski, R. (2007): Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. *European journal of nutrition* 46 (3), 174–180. DOI: 10.1007/s00394-006-0642-7.

**Frede**, W. (2010): *Handbuch für Lebensmittelchemiker*. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-642-01684-4.

**Gebicki**, J.M.; Nauser, T. (2021): Fast antioxidant reaction of polyphenols and their metabolites. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (8). DOI: 10.3390/antiox10081297.

**Gossiau, A.; Rensing, L. (2002):** Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 35 (2), 139–150. DOI: 10.1007/s003910200018.

**Göttel, C.; Niesen, S.; Daub, V.; Werle, T.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. (2020):** In vitro inhibition of phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by anthocyanin-rich fruit juice extracts and selected anthocyanins. *International journal of molecular sciences* 21 (18). DOI: 10.3390/ijms21186934.

**Green, H.; Kehinde, O. (1974):** Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1 (3), 113–116. DOI: 10.1016/0092-8674(74)90126-3.

**Gresele, P.; Momi, S.; Falcinelli, E. (2011):** Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *British journal of clinical pharmacology* 72 (4), 634–646. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04034.x.

**Groh, I.A.M.; Riva, A.; Braun, D.; Sutherland, H.G.; Williams, O.; Bakuradze, T.; Pahlke, G.; Richling, E.; Haupt, L.M.; Griffiths, L.R.; Berry, D.; Marko, D. (2020):** Long-term consumption of anthocyanin-rich fruit juice: Impact on gut microbiota and antioxidant markers in lymphocytes of healthy males. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (1). DOI: 10.3390/antiox10010027.

**Gstraunthaler, G.; Lindl, T. (2021):** Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-62605-4.

**Guo, Y.; Cai, Z.; Xie, Y.; Ma, A.; Zhang, H.; Rao, P.; Wang, Q. (2020):** Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (2), 759–800. DOI: 10.1111/1541-4337.12537.

**Habanova, M.; Saraiva, J.A.; Haban, M.; Schwarzova, M.; Chlebo, P.; Predna, L.; Gažo, J.; Wyka, J. (2016):** Intake of bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) reduced risk factors for cardiovascular disease by inducing favorable changes in lipoprotein profiles. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 36 (12), 1415–1422. DOI: 10.1016/j.nutres.2016.11.010.

**Haddad-Tóvulli, R.; Morari, J.; Barbizan, R.; Bóbbio, V.C.; Carraro, R.S.; Solon, C.; Dragano, N.R.; Torsoni, M.A.; Araujo, E.P.; Velloso, L.A. (2023):** Maternal obesity damages the median eminence blood-brain barrier structure and function in the progeny: the beneficial impact of cross-fostering by lean mothers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 324 (2), E154-E166. DOI: 10.1152/ajpendo.00268.2022.

**Hanke, M.-V.; Flachowsky, H. (2017):** Obstzüchtung und wissenschaftliche Grundlagen. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-54084-8.

- Harrison, L.;** Schriever, S.C.; Feuchtinger, A.; Kyriakou, E.; Baumann, P.; Pfuhlmann, K.; Messias, A.C.; Walch, A.; Tschöp, M.H.; Pfluger, P.T. (2019): Fluorescent blood-brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. *International journal of obesity* 43 (6), 1305–1318. DOI: 10.1038/s41366-018-0221-z.
- Hawkins, J.;** Hires, C.; Baker, C.; Keenan, L.; Bush, M. (2021): Daily supplementation with *Aronia melanocarpa* (chokeberry) reduces blood pressure and cholesterol: a meta analysis of controlled clinical trials. *Journal of dietary supplements* 18 (5), 517–530. DOI: 10.1080/19390211.2020.1800887.
- Heber, D.;** Zhang, Y.; Yang, J.; Ma, J.E.; Henning, S.M.; Li, Z. (2014): Green tea, black tea, and oolong tea polyphenols reduce visceral fat and inflammation in mice fed high-fat, high-sucrose obesogenic diets. *The Journal of nutrition* 144 (9), 1385–1393. DOI: 10.3945/jn.114.191007.
- Heinrich, P.C.;** Müller, M.; Graeve, L. (2014): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-642-17971-6.
- Heinrich, P.C.;** Müller, M.; Graeve, L.; Koch, H.-G. (2022): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-60265-2.
- Heintze, C.;** Metz, U.; Dieterich, A.; Schwantes, U.; Wiesner, J. (2008): Ursachen von Übergewicht. *Präv Gesundheitsf* 3 (4), 289–295. DOI: 10.1007/s11553-008-0142-0.
- Hernandez-Jimenez, A.;** Kennedy, J.A.; Bautista-Ortin, A.B.; Gomez-Plaza, E. (2012): Effect of ethanol on grape seed proanthocyanidin extraction. *American Journal of Enology and Viticulture* 63 (1), 57–61. DOI: 10.5344/ajev.2011.11053.
- Hertz, A.V.;** Thompson, B.R.; Wiczner, B.M.; Bernlohr, D.A. (2008): Lipid metabolism in adipose tissue. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, 277–304. DOI: 10.1016/B978-044453219-0.50012-X.
- Hillman, A.R.;** Uhanowsky, K. (2021): Acute ingestion of Montmorency tart cherry reduces serum uric acid but has no impact on high sensitivity C-reactive protein or oxidative capacity. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 76 (1), 83–89. DOI: 10.1007/s11130-021-00879-7.
- Hokimoto, S.;** Funakoshi-Tago, M.; Tago, K. (2023): Identification of DDX5 as an indispensable activator of the glucocorticoid receptor in adipocyte differentiation. *The FEBS journal* 290 (4), 988–1007. DOI: 10.1111/febs.16618.
- Holst, B.;** Williamson, G. (2008): Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology* 19 (2), 73–82. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.03.003.

- Holzgreve**, H. (2012): Blutfette nicht unbedingt nüchtern messen. *MMW - Fortschritte der Medizin* 154 (21), 1. DOI: 10.1007/s15006-012-1550-9.
- Hopp**, V. (2018): *Chemische Kreisläufe in der Natur. Chemie - Biologie - Energetik*. 2. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-662-55859-1. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1558490>.
- Horino**, M.; Ikeda, K.; Yamada, T. (2022): The Role of Thermogenic Fat Tissue in Energy Consumption. *Current issues in molecular biology* 44 (7), 3166–3179. DOI: 10.3390/cimb44070219.
- Huang**, C.-C.; Huang, W.-C.; Hou, C.-W.; Chi, Y.-W.; Huang, H.-Y. (2014): Effect of black soybean koji extract on glucose utilization and adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *International journal of molecular sciences* 15 (5), 8280–8292. DOI: 10.3390/ijms15058280.
- Ikuta**, K.; Hashimoto, K.; Kaneko, H.; Mori, S.; Ohashi, K.; Suzutani, T. (2012): Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of blackcurrants (*Ribes nigrum* L.). *Microbiology and immunology* 56 (12), 805–809. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00510.x.
- Iriti**, M.; Faoro, F. (2009): Bioactivity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications* 4 (5), 1934578X0900400. DOI: 10.1177/1934578X0900400502.
- IUPAC** (1997): *Compendium of Chemical Terminology. Biochemistry of Lipids*. 2nd ed. (the "Gold Book"). DOI: 10.1351/goldbook.L03571.
- Jack**, B.U.; Mamushi, M.; Viraragavan, A.; Dias, S.; Pfeiffer, C. (2022): Comparing the effects of tumor necrosis factor alpha, lipopolysaccharide and palmitic acid on lipid metabolism and inflammation in murine 3T3-L1 adipocytes. *Life sciences* 297, 120422. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120422.
- Jaganath**, I.B.; Mullen, W.; Edwards, C.A.; Crozier, A. (2006): The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free radical research* 40 (10), 1035–1046. DOI: 10.1080/10715760600771400.
- Jagel**, A. (2011): *Punica granatum – Granatapfelbaum (Punicaceae)*. *Jahrb. Bochumer Bot. Ver.* (2), 249–252.
- Jakobek**, L.; Drenjančević, M.; Jukić, V.; Šeruga, M.; Turalija, A.; Milić, M. (2012): Polyphenols, anthocyanins and antiradical activity of chokeberries. *EJEAFChe* 11(2), 76–84.
- Janda**, E.; Lascala, A.; Martino, C.; Ragusa, S.; Nucera, S.; Walker, R.; Gratteri, S.; Mollace, V. (2016): Molecular mechanisms of lipid- and glucose-lowering activities of bergamot flavonoids. *PharmaNutrition* 4, S8-S18. DOI: 10.1016/j.phanu.2016.05.001.
- Jeon**, Y.H.; Heo, Y.-S.; Kim, C.M.; Hyun, Y.-L.; Lee, T.G.; Ro, S.; Cho, J.M. (2005): Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and

recent progress in drug development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (11), 1198–1220. DOI: 10.1007/s00018-005-4533-5.

**Jeppsson**, N. (2000): The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'. *Scientia Horticulturae* 83 (2), 127–137. DOI: 10.1016/S0304-4238(99)00070-9.

**Joseph**, S.V.; Edirisinghe, I.; Burton-Freeman, B.M. (2014): Berries: anti-inflammatory effects in humans. *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (18), 3886–3903. DOI: 10.1021/jf40444056.

**Juan**, C.A.; La Pérez de Lastra, J.M.; Plou, F.J.; Pérez-Lebeña, E. (2021): The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences* 22 (9). DOI: 10.3390/ijms22094642.

**Juríková**, T.; Mlček, J.; Balla, Š.; Ondrášová, M.; Dokoupil, L.; Sochor, J.; Ďurišová, L.; Eliáš, P.; Adámková, A.; Baroň, M.; Ercisli, S. (2021): The elucidation of total polyphenols, individual phenolic compounds, antioxidant activity of three underutilized fruit species—Black crowberry, honeyberry, European cranberry with their accumulation. *Agronomy* 11 (1), 73. DOI: 10.3390/agronomy11010073.

**Kaloudi**, T.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. (2022): *Aronia melanocarpa*: Identification and exploitation of its phenolic components. *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (14). DOI: 10.3390/molecules27144375.

**Kandyliis**, P.; Kokkinomagoulos, E. (2020): Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives. *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (2). DOI: 10.3390/foods9020122.

**Kang**, D.-H.; Ha, S.-K. (2014): Uric acid puzzle: Dual role as anti-oxidant and pro-oxidant. *Electrolyte & blood pressure : E & BP* 12 (1), 1–6. DOI: 10.5049/EBP.2014.12.1.1.

**Kersten**, S. (2001): Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* 2 (4), 282–286. DOI: 10.1093/embo-reports%2Fkve071.

**Kersten**, S. (2023): The impact of fasting on adipose tissue metabolism. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1868 (3), 159262. DOI: 10.1016/j.bbalip.2022.159262.

**Khoo**, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. (2017): Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research* 61 (1), 1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.

**Kilanowska, A.; Ziółkowska, A. (2020):** Role of phosphodiesterase in the biology and pathology of diabetes. *International journal of molecular sciences* 21 (21). DOI: 10.3390/ijms21218244.

**Kim, K.M.; Henderson, G.N.; Ouyang, X.; Frye, R.F.; Sautin, Y.Y.; Feig, D.I.; Johnson, R.J. (2009):** A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 877 (22), 2032–2038. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.05.037.

**Kim, S.; Ha, J.M.; Yun, S.J.; Kim, E.K.; Chung, S.W.; Hong, K.W.; Kim, C.D.; Bae, S.S. (2010):** Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 399 (1), 55–59. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.038.

**Klen, J.; Dolžan, V. (2022):** Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of type 2 diabetes mellitus and obesity: The impact of pharmacological properties and genetic factors. *International journal of molecular sciences* 23 (7). DOI: 10.3390/ijms23073451.

**Kobori, R.; Yakami, S.; Kawasaki, T.; Saito, A. (2021):** Changes in the polyphenol content of red raspberry fruits during ripening. *Horticulturae* 7 (12), 569. DOI: 10.3390/horticulturae7120569.

**Koltzenburg, S.; Maskos, M.; Nuyken, O. (2014):** *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-642-34772-6.

**Koudoufio, M.; Desjardins, Y.; Feldman, F.; Spahis, S.; Delvin, E.; Levy, E. (2020):** Insight into polyphenol and gut microbiota crosstalk: Are their metabolites the key to understand protective effects against metabolic disorders? *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9 (10). DOI: 10.3390/antiox9100982.

**Koutsos, A.; Riccadonna, S.; Ulaszewska, M.M.; Franceschi, P.; Trošt, K.; Galvin, A.; Braune, T.; Fava, F.; Perenzoni, D.; Mattivi, F.; Tuohy, K.M.; Lovegrove, J.A. (2020):** Two apples a day lower serum cholesterol and improve cardiometabolic biomarkers in mildly hypercholesterolemic adults: a randomized, controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 111 (2), 307–318. DOI: 10.1093/ajcn/nqz282.

**Ko, W.-C.; Shih, C.-M.; Lai, Y.-H.; Chen, J.-H.; Huang, H.-L. (2004):** Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 68 (10), 2087–2094. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.06.030.

- Kowalska**, K.; Olejnik, A.; Rychlik, J.; Grajek, W. (2014): Cranberries (*Oxycoccus quadripetalus*) inhibit adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 cells. *Food chemistry* 148, 246–252. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.032.
- Kowalska**, K.; Olejnik, A.; Sz wajgier, D.; Olkowicz, M. (2017): Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells. *PLoS one* 12 (11), e0188583. DOI: 10.1371/journal.pone.0188583.
- Ksouri**, R.; Megdiche, W.; Falleh, H.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Smaoui, A.; Abdelly, C. (2008): Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes rendus biologiques* 331 (11), 865–873. DOI: 10.1016/j.crv.2008.07.024.
- Kuhnert**, N. (2013): Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. *Chemie in unserer Zeit* 47 (2), 80–91. DOI: 10.1002/ciuz.201300589.
- Kuppusamy**, U.R.; Das, N.P. (1992): Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochemical Pharmacology* 44 (7), 1307–1315. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90531-m.
- La Rosa**, L.A. de; Moreno-Escamilla, J.O.; Rodrigo-García, J.; Alvarez-Parrilla, E. (2019): Phenolic compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry*, 253–271. DOI: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9.
- Lafontan**, M.; Langin, D. (2009): Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research* 48 (5), 275–297. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.05.001.
- Lai**, C.-S.; Wu, J.-C.; Pan, M.-H. (2015): Molecular mechanism on functional food bioactives for anti-obesity. *Current Opinion in Food Science* 2, 9–13. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.11.008.
- Landberg**, R.; Manach, C.; Kerckhof, F.-M.; Minihane, A.-M.; Saleh, R.N.M.; Roos, B. de; Tomas-Barberan, F.; Morand, C.; van de Wiele, T. (2019): Future prospects for dissecting inter-individual variability in the absorption, distribution and elimination of plant bioactives of relevance for cardiometabolic endpoints. *European journal of nutrition* 58 (Suppl 2), 21–36. DOI: 10.1007/s00394-019-02095-1.
- Landete**, J.M. (2011): Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 44 (5), 1150–1160. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.027.
- Large**, V.; Reynisdottir, S.; Langin, D.; Fredby, K.; Klannemark, M.; Holm, C.; Arner, P. (1999): Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in

subcutaneous fat cells of obese subjects. *Journal of Lipid Research* 40 (11), 2059–2065. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)32429-9.

**Lazarus, E.;** Bays, H.E. (2022): Cancer and obesity: An obesity medicine association (OMA) clinical practice statement (CPS) 2022. *Obesity Pillars (Online)* 3, 100026. DOI: 10.1016/j.obpill.2022.100026.

**Lee, H.-Y.;** Suh, K.S.; Kim, Y.I.; Jang, B.-K.; Kim, B.-H.; Yim, S.-V. (2021): Bioactive fraction of *Aronia melanocarpa* fruit inhibits adipogenic differentiation of cultured 3T3-L1 cells. *Applied Sciences* 11 (19), 9224. DOI: 10.3390/app11199224.

**Lee, J.-E.;** Schmidt, H.; Lai, B.; Ge, K. (2019): Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis. *Molecular and cellular biology* 39 (11). DOI: 10.1128/MCB.00601-18.

**Leitner, B.P.;** Huang, S.; Brychta, R.J.; Duckworth, C.J.; Baskin, A.S.; McGehee, S.; Tal, I.; Dieckmann, W.; Gupta, G.; Kolodny, G.M.; Pacak, K.; Herscovitch, P.; Cypess, A.M.; Chen, K.Y. (2017): Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (32), 8649–8654. DOI: 10.1073/pnas.1705287114.

**Leopoldini, M.;** Russo, N.; Toscano, M. (2011): The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food chemistry* 125 (2), 288–306. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.012.

**Leri, M.;** Scuto, M.; Ontario, M.L.; Calabrese, V.; Calabrese, E.J.; Bucciantini, M.; Stefani, M. (2020): Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms. *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041250.

**Les, F.;** Arbonés-Mainar, J.M.; Valero, M.S.; López, V. (2018): Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit  $\alpha$ -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. *Journal of ethnopharmacology* 220, 67–74. DOI: 10.1016/j.jep.2018.03.029.

**Licinio, J.;** Negrao, A.B.; Wong, M.-L. (2014): Plasma leptin concentrations are highly correlated to emotional states throughout the day. *Translational psychiatry* 4, e475. DOI: 10.1038/tp.2014.115.

**Lim, S.Y.;** Steiner, J.M.; Cridge, H. (2022): Lipases: it's not just pancreatic lipase! *American journal of veterinary research* 83 (8). DOI: 10.2460/ajvr.22.03.0048.

**Li, N.;** Li, X.; Ding, Y.; Liu, X.; Diggle, K.; Kisseleva, T.; Brenner, D.A. (2023): SREBP regulation of lipid metabolism in liver disease, and therapeutic strategies. *Biomedicines* 11 (12). DOI: 10.3390/biomedicines11123280.



- Little, R.;** Houghton, M.J.; Carr, I.M.; Wabitsch, M.; Kerimi, A.; Williamson, G. (2020): The ability of quercetin and ferulic acid to lower stored fat is dependent on the metabolic background of human adipocytes. *Molecular nutrition & food research* 64 (12), e2000034. DOI: 10.1002/mnfr.202000034.
- Liu, C.-C.;** Chen, J.-Y.; Chu, C.-C.; Chen, S.-Y.; Chu, H.-L.; Duh, P.-D. (2020): Chlorogenic acid decreases lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes by modulating the transcription factors. *JFNR* 8 (7), 313–319. DOI: 10.12691/jfnr-8-7-2.
- Liu, C.-Y.;** Huang, C.-J.; Huang, L.-H.; Chen, I.-J.; Chiu, J.-P.; Hsu, C.-H. (2014): Effects of green tea extract on insulin resistance and glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes and lipid abnormalities: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled trial. *PloS one* 9 (3), e91163. DOI: 10.1371/journal.pone.0091163.
- Li, Y.;** Li, Z.; Ngandiri, D.A.; Llerins Perez, M.; Wolf, A.; Wang, Y. (2022): The molecular brakes of adipose tissue lipolysis. *Frontiers in physiology* 13, 826314. DOI: 10.3389/fphys.2022.826314.
- Luse, M.A.;** Jackson, M.G.; Juśkiewicz, Z.J.; Isakson, B.E. (2023): Physiological functions of caveolae in endothelium. *Current opinion in physiology* 35. DOI: 10.1016/j.cophys.2023.100701.
- Maffei, M.;** Giordano, A. (2022): Leptin, the brain and energy homeostasis: From an apparently simple to a highly complex neuronal system. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 23 (1), 87–101. DOI: 10.1007/s11154-021-09636-2.
- Maleki, S.J.;** Crespo, J.F.; Cabanillas, B. (2019): Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry* 299, 125124. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125124.
- Manach, C.;** Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (5), 727–747. DOI: 10.1093/ajcn/79.5.727.
- Manach, C.;** Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1 Suppl), 230S-242S. DOI: 10.1093/ajcn/81.1.230S.
- Manso, T.;** Lores, M.; Miguel, T. de (2021): Antimicrobial activity of polyphenols and natural polyphenolic extracts on clinical isolates. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11 (1). DOI: 10.3390/antibiotics11010046.
- Marín, L.;** Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. (2015): Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international* 2015, 905215. DOI: 10.1155/2015/905215.

**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 & food research* 48 (4), 318–325. DOI: 10.1002/mnfr.200400034.

**Masood, B.;** Moorthy, M. (2023): Causes of obesity: a review. *Clinical medicine (London, England)* 23 (4), 284–291. DOI: 10.7861/clinmed.2023-0168.

**Matafome, P.;** Eickhoff, H.; Letra, L.; Seïça, R. (2017): Neuroendocrinology of adipose tissue and gut-brain axis. *Advances in neurobiology* 19, 49–70. DOI: 10.1007/978-3-319-63260-5\_3.

**Matsuura, K.;** Wang, W.-H.; Ching, A.; Chen, Y.; Cheng, C.-M. (2019): Paper-based resazurin assay of inhibitor-treated porcine sperm. *Micromachines* 10 (8). DOI: 10.3390/mi10080495.

**Mattioli, R.;** Francioso, A.; Mosca, L.; Silva, P. (2020): Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (17). DOI: 10.3390/molecules25173809.

**Medina-Remón, A.;** Casas, R.; Tresserra-Rimbau, A.; Ros, E.; Martínez-González, M.A.; Fitó, M.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. (2017): Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *British journal of clinical pharmacology* 83 (1), 114–128. DOI: 10.1111/bcp.12986.

**Merkel, M.;** Schmid, S.M.; Iwen, K.A. (2019): Physiologie und klinische Bedeutung von weißem, beigem und braunem Fettgewebe. *Der Internist* 60 (2), 115–121. DOI: 10.1007/s00108-018-0540-0.

**Montoya, G.A.;** Bakuradze, T.; Eirich, M.; Erk, T.; Baum, M.; Habermeyer, M.; Eisenbrand, G.; Richling, E. (2014): Modulation of 3',5'-cyclic AMP homeostasis in human platelets by coffee and individual coffee constituents. *The British journal of nutrition* 112 (9), 1427–1437. DOI: 10.1017/S0007114514002232.

**Mosqueda-Solís, A.;** Lasa, A.; Gómez-Zorita, S.; Eseberri, I.; Picó, C.; Portillo, M.P. (2017): Screening of potential anti-adipogenic effects of phenolic compounds showing different chemical structure in 3T3-L1 preadipocytes. *Food & function* 8 (10), 3576–3586. DOI: 10.1039/C7FO00679A.

**Mueller, D.;** Jung, K.; Winter, M.; Rogoll, D.; Melcher, R.; Richling, E. (2017): Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food chemistry* 231, 275–286. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.130.

**Mu**, T.; Sun, H.; Zhang, M.; Wang, C. (2017): Sweet potato anthocyanins. *Sweet Potato Processing Technology*, 279–355. DOI: 10.1016/B978-0-12-812871-8.00006-4.

**Nassour**, R.; Ayash, A.; Al-Tameemi, K. (2020): Anthocyanin pigments: Structure and biological importance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* (13), 45–57.

**Nazzaro**, F.; Fratianni, F.; Cozzolino, R.; Martignetti, A.; Malorni, L.; Feo, V. de; Cruz, A.G.; d'Acierno, A. (2019): Antibacterial activity of three extra virgin olive oils of the Campania region, southern Italy, related to their polyphenol content and composition. *Microorganisms* 7 (9). DOI: 10.3390/microorganisms7090321.

**Nelson**, D.L.; Cox, M.M. (2009): *Lehninger Biochemie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übersetzung der 5. amerikanischen Auflage. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-540-68637-8.

**Neto**, C.C.; Vinson, J.A. (2011): *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects*. Cranberry. 2nd. Hg. v. Iris F. F. Benzie und Sissi Wachtel-Galor. Boca Raton (FL). ISBN: 9781439807132.

**Neveu**, V.; Perez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; Du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; Scalbert, A. (2010): Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database : the journal of biological databases and curation* 2010, bap024. DOI: 10.1093/database/bap024.

**Nielsen**, T.S.; Jessen, N.; Jørgensen, J.O.L.; Møller, N.; Lund, S. (2014): Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of molecular endocrinology* 52 (3), R199-222. DOI: 10.1530/JME-13-0277.

**Niesen**, S.; Göttel, C.; Becker, H.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. (2022): Fractionation of extracts from black chokeberry, cranberry, and pomegranate to identify compounds that influence lipid metabolism. *Foods (Basel, Switzerland)* 11 (4). DOI: 10.3390/foods11040570.

**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 (17), 5421–5426. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

**Ochmian**, I.D.; Grajkowski, J.; Smolik, M. (2012): Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 40 (1), 253. DOI: 10.15835/nbha4017181.

**Omori**, K.; Kotera, J. (2007): Overview of PDEs and their regulation. *Circulation research* 100 (3), 309–327. DOI: 10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1.

- Organisation for Economic Cooperation and Development** (2017): Obesity Update. Online verfügbar unter <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2017.pdf>, zuletzt geprüft am 04.09.2023.
- Ostberg-Potthoff**, J.J.; Berger, K.; Richling, E.; Winterhalter, P. (2019): Activity-guided fractionation of red fruit extracts for the identification of compounds influencing glucose metabolism. *Nutrients* 11 (5). DOI: 10.3390/nu11051166.
- Oszmiański**, J.; Lachowicz, S.; Gorzelany, J.; Matłok, N. (2018): The effect of different maturity stages on phytochemical composition and antioxidant capacity of cranberry cultivars. *Eur Food Res Technol* 244 (4), 705–719. DOI: 10.1007/s00217-017-2994-z.
- Oziembłowski**, M.; Trenka, M.; Czaplicka, M.; Maksimowski, D.; Nawirska-Olszańska, A. (2022): Selected properties of juices from black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) fruits preserved using the PEF method. *Applied Sciences* 12 (14), 7008. DOI: 10.3390/app12147008.
- Pan**, W.W.; Myers, M.G. (2018): Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nature reviews. Neuroscience* 19 (2), 95–105. DOI: 10.1038/nrn.2017.168.
- Panzella**, L.; Napolitano, A. (2017): Natural phenol polymers: Recent advances in food and health applications. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 6 (2). DOI: 10.3390/antiox6020030.
- Park**, M.; Sharma, A.; Lee, H.-J. (2019): Anti-adipogenic effects of delphinidin-3-O- $\beta$ -glucoside in 3T3-L1 preadipocytes and primary white adipocytes. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (10). DOI: 10.3390/molecules24101848.
- Payab**, M.; Hasani-Ranjbar, S.; Baeeri, M.; Rahimifard, M.; Arjmand, B.; Haghi-Aminjan, H.; Abdollahi, M.; Larijani, B. (2020): Development of a novel anti-obesity compound with inhibiting properties on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *Iranian biomedical journal* 24 (3), 155–163. DOI: 10.29252/ibj.24.3.155.
- Peluso**, M.R. (2006): Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 231 (8), 1287–1299. DOI: 10.1177/153537020623100802.
- Penn**, L.; White, M.; Lindström, J.; Boer, A.T. den; Blaak, E.; Eriksson, J.G.; Feskens, E.; Ilanne-Parikka, P.; Keinänen-Kiukaanniemi, S.M.; Walker, M.; Mathers, J.C.; Uusitupa, M.; Tuomilehto, J. (2013): Importance of weight loss maintenance and risk prediction in the prevention of type 2 diabetes: analysis of European Diabetes Prevention Study RCT. *PLoS one* 8 (2), e57143. DOI: 10.1371/journal.pone.0057143.

**Pérez-Jiménez**, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. (2010): Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition* 64 Suppl 3, S112-20. DOI: 10.1038/ejcn.2010.221.

Phenol-Explorer (2015): Database on polyphenol content in foods. Online verfügbar unter <http://phenol-explorer.eu/>, zuletzt geprüft am 15.02.2024.

**Picard**, F.; Kurtev, M.; Chung, N.; Topark-Ngarm, A.; Senawong, T.; Machado De Oliveira, R.; Leid, M.; McBurney, M.W.; Guarente, L. (2004): Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429 (6993), 771–776. DOI: 10.1038/nature02583.

**Pliszka**, B. (2020): Content and correlation of polyphenolic compounds, bioelements and antiradical activity in black elder berries (*Sambucus nigra* L.). *J. Elem.* (2/2020). DOI: 10.5601/jelem.2019.24.1.1829.

**Pösch**, G. (1971): Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3', 5'-AMP as substrate. *Naunyn-Sehmiedebergs Arch. Pharmak.* 268, 272–299.

**Präbst**, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. (2017): Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1601, 1–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_1.

**Prawitt**, J. (2006): Entwicklung eines Adipozytenmodells aus einer humanen mesenchymalen Stammzelllinie und dessen molekulare und funktionale Charakterisierung. Dissertation. Universität Hamburg.

**Prior**, R.L.; Wilkes, S.; Rogers, T.; Khanal, R.C.; Wu, X.; Hager, T.J.; Hager, A.; Howard, L. (2010): Dietary black raspberry anthocyanins do not alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *Journal of agricultural and food chemistry* 58 (7), 3977–3983. DOI: 10.1021/jf9030772.

**Proescher**, F. (1927): Oil Red O pyridin, a rapid fat stain. *Stain Technology* 2 (2), 60–61. DOI: 10.3109/10520292709115655.

**Qiu**, Z.; Wei, Y.; Chen, N.; Jiang, M.; Wu, J.; Liao, K. (2001): DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 276 (15), 11988–11995. DOI: 10.1074/jbc.M011729200.

**Quideau**, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. (2011): Pflanzliche Polyphenole: chemische Eigenschaften, biologische Aktivität und Synthese. *Angew. Chem.* 123 (3), 610–646. DOI: 10.1002/ange.201000044.

- Rahn, C.;** Bakuradze, T.; Stegmüller, S.; Galan, J.; Niesen, S.; Winterhalter, P.; Richling, E. (2023): Polyphenol-rich beverage consumption affecting parameters of the lipid metabolism in healthy subjects. *International journal of molecular sciences* 24 (1). DOI: 10.3390/ijms24010841.
- Ramis, M.R.;** Sarubbo, F.; Moranta, D.; Tejada, S.; Lladó, J.; Miralles, A.; Esteban, S. (2020): Cognitive and neurochemical changes following polyphenol-enriched diet in rats. *Nutrients* 13 (1). DOI: 10.3390/nu13010059.
- Rauf, A.;** Bawazeer, S.; Herrera-Bravo, J.; Raza, M.; Naz, H.; Gul, S.; Muhammad, N.; Almarhoon, Z.M.; Mabkhot, Y.N.; Ramadan, M.F.; Setzer, W.N.; Daştan, S.D.; Mahmud, S.; Sharifi-Rad, J. (2022): Potent in vitro phosphodiesterase 1 inhibition of flavone isolated from *Pistacia integerrima* galls. *BioMed research international* 2022, 6116003. DOI: 10.1155/2022/6116003.
- Ray, H.;** Pinteur, C.; Frering, V.; Beylot, M.; Large, V. (2009): Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids in health and disease* 8, 58. DOI: 10.1186/1476-511X-8-58.
- Rehner, G.;** Daniel, H. (2010): *Biochemie der Ernährung*. 3. Aufl. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 978-3-8274-2041-1. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1582424>.
- Rezvani, R.;** Shadmand Fomani Moghadam, M.R.; Cianflone, K. (2024): Acylation stimulating protein/C3adesArg in the metabolic states: role of adipocyte dysfunction in obesity complications. *The Journal of physiology*. DOI: 10.1113/JP285127.
- Richard, A.J.;** White, U.; Elks, C.M.; Stephens, J.M. (2000): *Adipose tissue: Physiology to metabolic dysfunction*. Endotext. Hg. v. Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Marc R. Blackman, Alison Boyce, George Chrousos, Emiliano Corpas, et al. South Dartmouth (MA).
- Riedel, A.;** Pignitter, M.; Hochkogler, C.M.; Rohm, B.; Walker, J.; Bytof, G.; Lantz, I.; Somoza, V. (2012): Caffeine dose-dependently induces thermogenesis but restores ATP in HepG2 cells in culture. *Food & function* 3 (9), 955–964. DOI: 10.1039/c2fo30053b.
- Riedel, A.;** Dieminger, N.; Bakuradze, T.; Lang, R.; Montoya Parra, G.A.; Hochkogler, C.M.; Winkler, S.; Bytof, G.; Lantz, I.; Stiebitz, H.; Richling, E.; Hofmann, T.; Marko, D.; Schipp, D.; Raedle, J.; Somoza, V. (2014): A 4-week consumption of medium roast and dark roast coffees affects parameters of energy status in healthy subjects. *Food Research International* 63, 409–419. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.002.
- Rimbach, G.;** Nagursky, J.; Erbersdobler, H.F. (2015): *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Berlin, Heidelberg. Springer. ISBN: 978-3-662-46279-9.

- Riso, P.;** Klimis-Zacas, D.; Del Bo', C.; Martini, D.; Campolo, J.; Vendrame, S.; Møller, P.; Loft, S.; Maria, R. de; Porrini, M. (2013): Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *European journal of nutrition* 52 (3), 949–961. DOI: 10.1007/s00394-012-0402-9.
- Rizzatti, V.;** Boschi, F.; Pedrotti, M.; Zoico, E.; Sbarbati, A.; Zamboni, M. (2013): Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution. *European journal of histochemistry* : EJH 57 (3), e24. DOI: 10.4081/ejh.2013.e24.
- Robidoux, J.;** Kumar, N.; Daniel, K.W.; Moukdar, F.; Cyr, M.; Medvedev, A.V.; Collins, S. (2006): Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry* 281 (49), 37794–37802. DOI: 10.1074/jbc.M605572200.
- Rodriguez-Amaya, D.B.;** Carle, R. (2021): Alterations of natural pigments. *Chemical Changes During Processing and Storage of Foods*, 265–327. DOI: 10.1016/B978-0-12-817380-0.00007-5.
- Röhrig, T.;** Pacjuk, O.; Hernández-Huguet, S.; Körner, J.; Scherer, K.; Richling, E. (2017): Inhibition of cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase by various food plant-derived phytotherapeutic agents. *Medicines (Basel, Switzerland)* 4 (4). DOI: 10.3390/medicines4040080.
- Ruiz-Torralba, A.;** Guerra-Hernández, E.J.; García-Villanova, B. (2018): Antioxidant capacity, polyphenol content and contribution to dietary intake of 52 fruits sold in Spain. *CyTA - Journal of Food* 16 (1), 1131–1138. DOI: 10.1080/19476337.2018.1517828.
- Rychlik, M.;** Asam, S. (2009): Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Environ Sci Eur* 21 (5), 470–482. DOI: 10.1007/s12302-009-0082-0.
- Salzano, S.;** Checconi, P.; Hanschmann, E.-M.; Lillig, C.H.; Bowler, L.D.; Chan, P.; Vaudry, D.; Mengozzi, M.; Coppo, L.; Sacre, S.; Atkuri, K.R.; Sahaf, B.; Herzenberg, L.A.; Herzenberg, L.A.; Mullen, L.; Ghezzi, P. (2014): Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (33), 12157–12162. DOI: 10.1073/pnas.1401712111.
- Sandoval, V.;** Sanz-Lamora, H.; Arias, G.; Marrero, P.F.; Haro, D.; Relat, J. (2020): Metabolic impact of flavonoids consumption in obesity: From central to peripheral. *Nutrients* 12 (8). DOI: 10.3390/nu12082393.

**Sautin**, Y.Y.; Johnson, R.J. (2008): Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 27 (6), 608–619. DOI: 10.1080/15257770802138558.

**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. *Journal of Berry Research* 1 (1), 25–33. DOI: 10.3233/BR-2010-003.

**Schienkiewitz**, A.; Mensink, G.; Kuhnert, R.; Lange, C. (2017): Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*. DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-025.

**Schling**, P. (2020): *Fettgewebe – zu Unrecht ungeliebt*. Wiesbaden. Springer Fachmedien. ISBN: 978-3-658-29244-7.

**Schmitz**, S. (2011): *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 978-3-8274-2572-0.

**Schoeler**, M.; Caesar, R. (2019): Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 20 (4), 461–472. DOI: 10.1007/s11154-019-09512-0.

**Scott**, M.A.; Nguyen, V.T.; Levi, B.; James, A.W. (2011): Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 20 (10), 1793–1804. DOI: 10.1089/scd.2011.0040.

**Seo**, D.H.; Shin, E.; Lee, Y.-H.; Park, S.-E.; Nam, K.T.; Kim, J.-W.; Cha, B.-S. (2022): Effects of a phosphodiesterase inhibitor on the browning of adipose tissue in mice. *Biomedicines* 10 (8). DOI: 10.3390/biomedicines10081852.

**Sesso**, H.D.; Manson, J.E.; Aragaki, A.K.; Rist, P.M.; Johnson, L.G.; Friedenberg, G.; Copeland, T.; Clar, A.; Mora, S.; Moorthy, M.V.; Sarkissian, A.; Carrick, W.R.; Anderson, G.L. (2022): Effect of cocoa flavanol supplementation for the prevention of cardiovascular disease events: the COcoa Supplement and Multivitamin Outcomes Study (COSMOS) randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 115 (6), 1490–1500. DOI: 10.1093/ajcn/nqac055.

**Shah**, M.; Vella, A. (2014): Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 15 (3), 181–187. DOI: 10.1007/s11154-014-9289-5.

**Sharp**, L.Z.; Shinoda, K.; Ohno, H.; Scheel, D.W.; Tomoda, E.; Ruiz, L.; Hu, H.; Wang, L.; Pavlova, Z.; Gilsanz, V.; Kajimura, S. (2012): Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS one* 7 (11), e49452. DOI: 10.1371/journal.pone.0049452.



**Sidor**, A.; Gramza-Michałowska, A. (2019): Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L.-A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential. *Molecules* (Basel, Switzerland) 24 (20). DOI: 10.3390/molecules24203710.

**Sierra-Johnson**, J.; Romero-Corral, A.; Somers, V.K.; Lopez-Jimenez, F.; Thomas, R.J.; Squires, R.W.; Allison, T.G. (2008): Prognostic importance of weight loss in patients with coronary heart disease regardless of initial body mass index. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 15 (3), 336–340. DOI: 10.1097/HJR.0b013e3282f48348.

**Siqueira**, J.H.; Mill, J.G.; Velasquez-Melendez, G.; Moreira, A.D.; Barreto, S.M.; Benseñor, I.M.; Molina, M.D.C.B. (2018): Sugar-sweetened soft drinks and fructose consumption are associated with hyperuricemia: Cross-sectional analysis from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Nutrients* 10 (8). DOI: 10.3390/nu10080981.

**Smeriglio**, A.; Barreca, D.; Bellocco, E.; Trombetta, D. (2017): Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British journal of pharmacology* 174 (11), 1244–1262. DOI: 10.1111/bph.13630.

**Song**, F.; Tang, M.; Wu, Q.; Shen, X.; Wang, H.; Chen, H.; Zhao, S. (2017): Anti-adipogenic effects of polyphenol extracts of areca flower tea on 3T3-L1 preadipocytes. *FSTR* 23 (5), 705–715. DOI: 10.3136/fstr.23.705.

**Song**, Z.; Xiaoli, A.M.; Yang, F. (2018): Regulation and metabolic significance of de novo lipogenesis in adipose tissues. *Nutrients* 10 (10). DOI: 10.3390/nu10101383.

**Stockert**, K. (2020): Lipidmediatoren und ihre Rolle bei Entzündungen und Allergien. *Allergieprävention*, 185–245. DOI: 10.1007/978-3-662-58140-7\_6.

**Sun**, Y.; Tao, X.; Men, X.; Xu, Z.; Wang, T. (2017): In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture* 16 (8), 1808–1818. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61560-5.

**Taheri**, R.; Connolly, B.A.; Brand, M.H.; Bolling, B.W. (2013): Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (36), 8581–8588. DOI: 10.1021/jf402449q.

**Tamba**, S.; Nishizawa, H.; Funahashi, T.; Okauchi, Y.; Ogawa, T.; Noguchi, M.; Fujita, K.; Ryo, M.; Kihara, S.; Iwashashi, H.; Yamagata, K.; Nakamura, T.; Shimomura, I.; Matsuzawa, Y. (2008): Relationship between the serum uric acid level, visceral fat accumulation and

serum adiponectin concentration in Japanese men. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 47 (13), 1175–1180. DOI: 10.2169/internalmedicine.47.0603.

**Tews, D.**; Fischer-Posovszky, P.; Debatin, K.M.; Beer, A.J.; Wabitsch, M. (2017): Physiologische Relevanz des braunen Fettgewebes beim Menschen. *Monatsschr Kinderheilkd* 165 (6), 502–509. DOI: 10.1007/s00112-016-0129-4.

**Thakur, A.**; Thakur, N.S.; mid, H.; Kumar, P. (2018): Studies on physico-chemical and antioxidant properties of wild pomegranate fruits in different locations of Himachal Pradesh. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7 (08), 2842–2850. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.708.299.

**Tomás-Barberán, F.A.**; González-Sarrías, A.; García-Villalba, R.; Núñez-Sánchez, M.A.; Selma, M.V.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C. (2017): Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Molecular nutrition & food research* 61 (1). DOI: 10.1002/mnfr.201500901.

**Törrönen, R.**; Sarkkinen, E.; Niskanen, T.; Tapola, N.; Kilpi, K.; Niskanen, L. (2012): Postprandial glucose, insulin and glucagon-like peptide 1 responses to sucrose ingested with berries in healthy subjects. *The British journal of nutrition* 107 (10), 1445–1451. DOI: 10.1017/S0007114511004557.

**Triebel, S.**; Trieu, H.-L.; Richling, E. (2012): Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* 60 (36), 8902–8910. DOI: 10.1021/jf3028842.

**Trouillas, P.**; Sancho-García, J.C.; Freitas, V. de; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. (2016): Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical reviews* 116 (9), 4937–4982. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00507.

**Tucakovic, L.**; Colson, N.; Santhakumar, A.B.; Kundur, A.R.; Shuttleworth, M.; Singh, I. (2018): The effects of anthocyanins on body weight and expression of adipocyte's hormones: Leptin and adiponectin. *J. Funct. Foods* 45, 173–180. DOI: 10.1016/j.jff.2018.03.042.

**van den Driessche, F.**; Rigole, P.; Brackman, G.; Coenye, T. (2014): Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of microbiological methods* 98, 31–34. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.12.011.

**Wabitsch, M.**; Brenner, R.E.; Melzner, I.; Braun, M.; Möller, P.; Heinze, E.; Debatin, K.M.; Hauner, H. (2001): Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 (1), 8–15. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801520.

- Wallace**, T.C.; Giusti, M.M. (2015): Anthocyanins. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.) 6 (5), 620–622. DOI: 10.3945/an.115.009233.
- Wang**, C.; MacIntyre, B.; Mutch, D.M. (2022): Inhibition of  $\Delta$ -6 desaturase reduces fatty acid re-esterification in 3T3-L1 adipocytes independent of changes in n3-PUFA cellular content. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1867 (7), 159160. DOI: 10.1016/j.bbalip.2022.159160.
- Wang**, H.; Cheng, L.; Lin, D.; Ma, Z.; Deng, X. (2017): Lemon fruits lower the blood uric acid levels in humans and mice. *Scientia Horticulturae* 220, 4–10. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.03.023.
- Wang**, H.H.; Lee, D.K.; Liu, M.; Portincasa, P.; Wang, D.Q.-H. (2020): Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition* 23 (3), 189–230. DOI: 10.5223/pghn.2020.23.3.189.
- Wang**, Q.; Wang, S.; Yang, X.; You, P.; Zhang, W. (2015): Myricetin suppresses differentiation of 3 T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 35 (4), 317–327. DOI: 10.1016/j.nutres.2014.12.009.
- Watzl**, B.; Rechkemmer, G. (2001): Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48 (12), 498–502.
- Westermann**, S.; Happe, K.; Fiedler, K.; Hauner, H.; Hertwig, R.; Huber, G.; Mata, J.; Rösler, F.; Roosen, J.; Stroebe, W.; Braun, J. von (2019): Übergewicht und Adipositas. Thesen und Empfehlungen zur Eindämmung der Epidemie. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina. Halle (Saale). Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e.V. - Nationale Akademie der Wissenschaften. ISBN: 978-3-8047-3862-1 (Diskussion / Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Nr. 22).
- Włodarczyk**, M.; Jabłonowska-Lietz, B.; Olejarz, W.; Nowicka, G. (2018): Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients* 10 (5). DOI: 10.3390/nu10050578.
- World Health Organization** (2021): Obesity and overweight. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, zuletzt aktualisiert am 09.06.2021, zuletzt geprüft am 21.06.2022.
- World Health Organization** (2022): WHO European Regional Obesity Report 2022. Regional Office for Europe. Online verfügbar unter <https://apps.who.int/iris/handle/10665/353747>, zuletzt geprüft am 26.03.2023.
- Wu**, D.; Ma, X.; Tian, W. (2013): Pomegranate husk extract, punicalagin and ellagic acid inhibit fatty acid synthase and adipogenesis of 3T3-L1 adipocyte. *Journal of Functional Foods* 5 (2), 633–641. DOI: 10.1016/j.jff.2013.01.005.

- Xiao, D.;** Zhu, L.; Edirisinghe, I.; Fareed, J.; Brailovsky, Y.; Burton-Freeman, B. (2019): Attenuation of postmeal metabolic indices with red raspberries in individuals at risk for diabetes: A randomized controlled trial. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 27 (4), 542–550. DOI: 10.1002/oby.22406.
- Xu, C.;** He, J.; Jiang, H.; Zu, L.; Zhai, W.; Pu, S.; Xu, G. (2009): Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 23 (8), 1161–1170. DOI: 10.1210/me.2008-0464.
- Xu, P.;** Zhai, Y.; Wang, J. (2018): The Role of PPAR and Its Cross-Talk with CAR and LXR in Obesity and Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences* 19 (4). DOI: 10.3390/ijms19041260.
- Yang, J.-Y.;** Della-Fera, M.A.; Rayalam, S.; Ambati, S.; Hartzell, D.L.; Park, H.J.; Baile, C.A. (2008): Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life sciences* 82 (19-20), 1032–1039. DOI: 10.1016/j.lfs.2008.03.003.
- Yang, T.;** Fu, M.; Pestell, R.; Sauve, A.A. (2006): SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17 (5), 186–191. DOI: 10.1016/j.tem.2006.04.002.
- Zaha, D.C.;** Vesa, C.; Uivarosan, D.; Bratu, O.; Fratila, O.; Mirela Tit, D.; Pantis, C.; Diaconu, C.C.; Bungau, S. (2020): Influence of inflammation and adipocyte biochemical markers on the components of metabolic syndrome. *Experimental and therapeutic medicine* 20 (1), 121–128. DOI: 10.3892/etm.2020.8663.
- Zamora-Ros, R.;** Knaze, V.; Rothwell, J.A.; Hémon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyrø, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.-C.; Touillaud, M.; Katzke, V.; Kühn, T.; Boeing, H.; Förster, J.; Trichopoulou, A.; Valanou, E.; Peppas, E.; Palli, D.; Agnoli, C.; Ricceri, F.; Tumino, R.; Magistris, M.S. de; Peeters, P.H.M.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Engeset, D.; Skeie, G.; Hjartaker, A.; Menéndez, V.; Agudo, A.; Molina-Montes, E.; Huerta, J.M.; Barricarte, A.; Amiano, P.; Sonestedt, E.; Nilsson, L.M.; Landberg, R.; Key, T.J.; Khaw, K.-T.; Wareham, N.J.; Lu, Y.; Slimani, N.; Romieu, I.; Riboli, E.; Scalbert, A. (2016): Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European journal of nutrition* 55 (4), 1359–1375. DOI: 10.1007/s00394-015-0950-x.
- Zarfeshany, A.;** Asgary, S.; Javanmard, S.H. (2014): Potent health effects of pomegranate. *Advanced biomedical research* 3, 100. DOI: 10.4103/2277-9175.129371.
- Zebisch, K.;** Voigt, V.; Wabitsch, M.; Brandsch, M. (2012): Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical biochemistry* 425 (1), 88–90. DOI: 10.1016/j.ab.2012.03.005.

**ZenBio** (2016): Lipolysis Assay Kit for 3T3-L1 Cells - Non-Esterified Fatty Acids Detection 100 point assay kit. Online verfügbar unter <https://www.zen-bio.com/pdf/ZBM0041.00LIP2L13T3L1LipolysisKitNEFA08.08.pdf>, zuletzt geprüft am 30.01.2023.

**Zhang**, M.; Gao, Y.; Wang, X.; Liu, W.; Zhang, Y.; Huang, G. (2016): Comparison of the effect of high fruit and soybean products diet and standard diet interventions on serum uric acid in asymptomatic hyperuricemia adults: an open randomized controlled trial. *International journal of food sciences and nutrition* 67 (3), 335–343. DOI: 10.3109/09637486.2016.1153608.

**Zhang**, Y.; Zhao, Y.; Liu, X.; Chen, X.; Ding, C.; Dong, L.; Zhang, J.; Sun, S.; Ding, Q.; Khatoon, S.; Cheng, Z.; Liu, W.; Shen, L.; Xiao, F. (2021): Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as a new functional food relationship with health: an overview. *Journal of Future Foods* 1 (2), 168–178. DOI: 10.1016/j.jfutfo.2022.01.006.

**Zhao**, J.; Wu, Y.; Rong, X.; Zheng, C.; Guo, J. (2020): Anti-lipolysis induced by insulin in diverse pathophysiologic conditions of adipose tissue. *DMSO* Volume 13, 1575–1585. DOI: 10.2147/DMSO.S250699.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation der adipogenen Differenzierung. An der Regulation der Differenzierung sind viele unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie <i>CCAAT/enhancer binding protein</i> (C/EBP) oder <i>sterol regulatory element-binding protein</i> (SREBP) <sup>1</sup> beteiligt. Rote Pfeile: inhibitorische Wirkung. AMP: Adenosinmonophosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; C/EBP: <i>CCAAT/enhancer binding protein</i> ; IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin; LXR: Leber-X-Rezeptor; PDE: Phosphodiesterase; PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor; Sirt1: Sirtuin 1; SREBP: <i>sterol regulatory element-binding protein</i> (modifiziert nach Kim <i>et al.</i> , 2010; Prawitt, 2006; Yang <i>et al.</i> , 2006). .....	5
Abbildung 2: Bildung eines Triacylglycerids aus Glycerin und freien Fettsäuren durch Veresterung.....	6
Abbildung 3: Regulationswege der Lipogenese und Lipolyse in Adipozyten. Die schwarzen Pfeile zeigen die lipolytischen Signalwege, die roten Pfeile die antilipolytischen Signale. AMP: Adenosinmonophosphat; AC: Adenylatzyklase; AR: adrenerger Rezeptor; ATGL: Adipozyten-Triglycerid-Lipase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CGI-58: <i>comparative gene identification 58</i> ; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; DAG: Diacylglycerin; GC: Guanylatzyklase; G <sub>i</sub> : inhibitorisches G-Protein; G-Protein: Guanosintriphosphat-bindendes Protein; G <sub>s</sub> : stimulatorisches G-Protein; GTP: Guanosintriphosphat; HSL: hormonsensitive Lipase; IR: Insulinrezeptor; IRS1/2: Insulinrezeptorsubstrat 1 und 2; MAG: Monoacylglycerin; MGL: Monoacylglycerin-Lipase; NPR-A: natriuretischer-Peptid-Rezeptor A; P: Phosphorylierung; PDK: phosphoinositidabhängige Kinase; PLIN1: Perilipin A; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP <sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP <sub>3</sub> : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; PKA: Proteinkinase A; PKB/Akt: Proteinkinase B; PKG: Proteinkinase G; PDE 3B: Phosphodiesterase 3B; TAG: Triacylglycerid (modifiziert nach Nielsen <i>et al.</i> , 2014). .....	8
Abbildung 4: Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP durch PDEs an Position 3'. AMP: Adenosinmonophosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PDE: Phosphodiesterase.....	12
Abbildung 5: Klassifizierung der Polyphenole und der Flavonoid-Subklassen inkl. deren chemischer Struktur (modifiziert nach Sandoval <i>et al.</i> , 2020; Zhang <i>et al.</i> , 2016). .....	17
Abbildung 6: Absorption und Metabolismus der mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole. LPH: Laktase-Phlorizin-Hydrolase (modifiziert nach Cipolletti <i>et al.</i> , 2018; Marín <i>et al.</i> , 2015). .....	19

---

Abbildung 7: Strukturen der sechs am häufigsten vorkommenden Anthocyanidine. ....	20
Abbildung 8: Studiendesign der humanen Interventionsstudie über insgesamt neun Wochen (eine Woche <i>wash-out</i> -Phase; acht Wochen Intervention). ....	97
Abbildung 9: Spearman-Korrelationskoeffizienten ( <i>rho</i> ) aller Parameter, die während der humanen Interventionsstudie untersucht wurden. Datenbasis ist die Veränderung/Differenz der Messwerte von der <i>wash-out</i> -Phase zur Intervention nach acht Wochen. Rote Felder: positive Korrelation; blaue Felder: negative Korrelation. BMI: <i>Body-Mass-Index</i> ; DSB: DNA-Strangbrüche; FFM: fettfreie Masse; FM: Fettmasse; FPG: Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase; GLP-1: <i>Glucagon-like Peptide 1</i> ; HDL: <i>high-density</i> -Lipoprotein; LDL: <i>low-density</i> -Lipoprotein; PBLs: periphere Blutlymphozyten; PDE: Phosphodiesterase; TAG: Triacylglycerid(e); VB: Vollblut (Rahn <i>et al.</i> , 2023).....	133
Abbildung 10: Reduktion von Resazurin zu Resorufin mittels NADH/H <sup>+</sup> in lebenden Zellen. NADH: reduzierte Form von Nikotinamidadenindinukleotid, NAD <sup>+</sup> : oxidierte Form von Nikotinamidadenindinukleotid (Matsuura <i>et al.</i> , 2019).....	151
Abbildung 11: Anfärbung der TAGs (rot) in 3T3-L1-Zellen mittels <i>Oil-Red-O</i> nach 14-tägiger Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1%).....	154
Abbildung 12: Hydrolyse von [2,8- <sup>3</sup> H]-cAMP zu [2,8- <sup>3</sup> H]-5'-AMP. AMP: Adenosinmonophosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PDE: Phosphodiesterase (modifiziert nach Barbosa <i>et al.</i> , 2011). ....	157
Abbildung 13: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm im negativen MRM-Modus einer aufgearbeiteten Plasmaprobe (P2, 2. Blutentnahme, n=1) mit 40 µg/mL 1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Harnsäure als internem Standard. ....	163

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der PDE-Familien, ihrer Substratspezifität und des exprimierenden Gewebes (Gresele <i>et al.</i> , 2011).....	13
Tabelle 2: Überblick der Polyphenolgehalte ausgewählter Früchte.....	22
Tabelle 3: Gehalte der einzelnen Polyphenole [mg/g Frischgewicht] in Aroniafrüchten (modifiziert nach Kaloudi <i>et al.</i> , 2022).....	23
Tabelle 4: Gehalte der Polyphenole [mg/100 g Trockenmasse] in drei Cranberrysorten. Die Gehalte variieren je nach Reifestadium und Cranberrysorte (modifiziert nach Oszmiański <i>et al.</i> , 2018).....	24
Tabelle 5: Gehalt einzelner Polyphenole in Granatapfelsaft (modifiziert nach Fischer <i>et al.</i> , 2011).....	25
Tabelle 6: Ernährungsvorgaben während der neunwöchigen humanen Interventionsstudie.	96
Tabelle 7: Zusammensetzung der Studiengetränke.....	98
Tabelle 8: Vergleich der Polymergehalte [g/100 g] der Extrakte und Polymerfraktionen. ....	127
Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte mit Herstellern/Lieferanten.....	142
Tabelle 10: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern/Lieferanten. ....	144
Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten. ....	145
Tabelle 12: Liste der verwendeten Zellen mit Herstellern/Lieferanten.....	147
Tabelle 13: Liste der verwendeten Softwares mit Herstellern/Lieferanten.....	147
Tabelle 14: Lösungen zum Einfrieren und Auftauen von Zellaliquots.....	148
Tabelle 15: Lösungen für den Resazurin-Reduktionstest zur Bestimmung der Zytotoxizität. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. Während die Resazurin-Stammlösung 4 Wochen haltbar ist, wurde die Resazurin-Gebrauchslösung immer frisch angesetzt. ....	151
Tabelle 16: Lösungen zur Bestimmung der Lipidakkumulation. ....	153
Tabelle 17: Lösungen zur Bestimmung der PDE 3B-Aktivität <i>in vitro</i> .....	156
Tabelle 18: Lösungen zur Aufbereitung der Blutproben.....	158
Tabelle 19: Lösungen zur Bestimmung der PDE-Aktivität in Thrombozyten. ....	159
Tabelle 20: Pipettierschema für den PDE-Assay <i>in vivo</i> . ....	159
Tabelle 21: HPLC-Parameter der etablierten Methode (System: 1100 Series, Agilent Technologies).....	162
Tabelle 22: Substanzspezifische MS-Parameter der Harnsäure (HS) und des internen Standards (1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -HS).....	162



## Anhang

Um Ressourcen einzusparen befinden sich alle Rohdaten sowie alle Berechnungen der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen im digitalen Anhang auf beiliegendem Daten-Stick. Weiter befinden sich dort die Chromatogramme und MS-Spektren der Harnsäurebestimmung.

### Genehmigungen

Abbildung 3 wiedergegeben (modifiziert) aus „Nielsen, T.S.; Jessen, N.; Jørgensen, J.O.L.; Møller, N.; Lund, S. (2014): Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of molecular endocrinology* 52 (3), R199-222. DOI: 10.1530/JME-13-0277“, © 2014 Society for Endocrinology. Verwendet mit Genehmigung von Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC").

### Veröffentlichungen

#### Publikationen

Göttel, C., Niesen, S., Daub, V., Werle, T., Bakuradze, T., Winterhalter, P., Richling, E. (2020) In Vitro Inhibition of Phosphodiesterase 3B (PDE 3B) by Anthocyanin-Rich Fruit Juice Extracts and Selected Anthocyanins. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6934–6952. DOI: 10.3390/ijms21186934.

Göttel, C., Becker, H., Niesen, S., Bakuradze, T., Winterhalter, P., Richling, E. (2021) Einfluss anthocyanreicher Extrakte aus Fruchtsaftkonzentraten und deren Fraktionen auf den Lipidstoffwechsel *in vitro*. *Lebensmittelchemie* 75, S1-087–S1-088. DOI: 10.1002/lemi.202155010.

Niesen, S., Göttel, C., Becker, H., Bakuradze, T., Winterhalter, P., Richling, E. (2022) Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism. *Foods* 11, 570–596. DOI: 10.3390/foods11040570.

Rahn, C., Bakuradze, T., Stegmüller, S., Galan, J., Niesen, S., Winterhalter, P., Richling, E. (2023) Polyphenol-Rich Beverage Consumption Affecting Parameters of the Lipid Metabolism in Healthy Subjects. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 841–864. DOI: 10.3390/ijms24010841.

## **Posterpräsentationen**

Göttel, C., Bakuradze, T., Niesen, S., Richling, E., Winterhalter, P. Impact of polyphenol-rich fruit juice on lipid metabolism in humans. 10<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols and Health (ICPH) 2022, London, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland.

## **Vorträge**

Göttel, C. Einfluss anthocyanreicher Extrakte aus Fruchtsaftkonzentraten und deren Fraktionen auf den Lipidstoffwechsel in vitro. GDCh-Regionaltagung Südwest 2021, online.

---

## Akademischer Lebenslauf

10/2019–08/2022

### **Promotion**

Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie,  
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling

10/2017–09/2019

### **Master of Science**

Lebensmittelchemie-Studium an der Technischen Universität  
Kaiserslautern  
Titel der Abschlussarbeit: „Testung von anthocyanreichen  
Saftextrakten auf die Lipidakkumulation von 3T3-L1  
Präadipozyten“.

03/2018–05/2018

### **Forschungsarbeit**

Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie,  
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling  
Titel der Arbeit: „Zytotoxizität von Arbutin aus  
Erdbeerbaumfrüchten und dessen Aglykon Hydrochinon“.

10/2014–09/2017

### **Bachelor of Science**

Lebensmittelchemie-Studium an der Technischen Universität  
Kaiserslautern  
Titel der Abschlussarbeit: „Untersuchung von „Bad Liebenzeller,  
das natürliche Mineralwasser aus dem Hunsrück“ auf  
wesentliche Inhaltsstoffe, lebensmittelrechtliche Beurteilung“.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elke Richling bedanken für die Überlassung des spannenden Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen und für die fachliche Unterstützung.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter für das Anfertigen des Zweitgutachtens sowie für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des AiF-Projektes.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kleist danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Besonders bedanken möchte ich mich für die Förderung des Forschungsvorhabens AiF 20277 N und die damit verbundene finanzielle Unterstützung. Das Forschungsvorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

In diesem Zusammenhang möchte mich auch bei unserem Projektpartner an der Technischen Universität Braunschweig und dem projektbegleitenden Ausschuss für die gute Kooperation und das freundliche Umfeld während der gemeinsamen Sitzungen bedanken. Sonja, dir an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön für die tolle Zusammenarbeit und den konstruktiven Austausch.

Weiterhin danke ich Dr. med. Jens Galan, Karlos Kespohl, allen teilnehmenden Probanden sowie Kolleg\*innen für die reibungslose und erfolgreiche Durchführung der Humanstudie.

PD Dr. Gerhard Erkel danke ich dafür, dass ich den Szintillationszähler im Isotopenlabor für meine Messungen nutzen durfte.

Liebe Tamara, vielen Dank für dein stets offenes Ohr, deine fachliche Unterstützung, für unseren konstruktiven Austausch und dass ich so viel von dir lernen durfte. Ein großes Danke auch für dein ausführliches Korrekturlesen und die hilfreichen Kommentare und Anmerkungen.

Ein herzliches Dankschön auch an Simone für die Unterstützung bei den analytischen Fragestellungen.

Außerdem danke ich sowohl den aktuellen als auch den ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Arbeitskreises Richling Daniel Bohlen, Nadine Beißmann, Dorothea Karlstetter, Daniela Becker, Verena Kirsch, Tobias Jochum, Hanna Becker, Sullivan Sadzik, Jonas Appel, Rainer Scheuermann, Eva Gorgus, Janina Leidner, Sylvia Schmidt und Ingrid Hemm in Anbetracht der guten Zusammenarbeit und der freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre während der letzten Jahre.

Ein großer Dank geht auch an meine Masterandin Hanna und meine Forschungspraktikantinnen Marie-Jo, Kathrin, Liane und Marleen.

Zutiefst dankbar bin ich für die Unterstützung meiner Freunde und meiner Familie. Insbesondere danke ich meinen Eltern Beate und Klaus, meiner Schwester Ricarda und meinem Mann Julian von ganzem Herzen für die grenzenlose Unterstützung und den Rückhalt in allen Lebenssituationen. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, Celina Rahn geb. Göttel, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel **„Untersuchungen zum Einfluss von roten Fruchtsäften, deren Extrakten und Inhaltsstoffen auf den Lipidstoffwechsel *in vitro* und *in vivo*“** selbstständig verfasst und die für diese Arbeit verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Bestandteile dieser kumulativen Arbeit wurden bereits auf Tagungen und in Printmedien veröffentlicht (siehe Veröffentlichungen).

Die vorliegende Dissertation wurde von mir weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet.

Die geltende Promotionsordnung für den Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern vom 25. März 2014 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den

---

Celina Rahn