

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Helga Stopper

# Anthocyane -

Modulation oxidativen Stresses in vivo und in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Theresa Irina Arnaudov

aus Wertheim

Würzburg, Dezember 2016



Referent/Referentin: Prof. Dr. Helga Stopper  
Korreferent/Korreferentin: PD Dr. Malgorzata Burek  
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin.



Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis .....</u>	<u>I</u>
<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>V</u>
<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>VII</u>
<b>I</b> <u>Einleitung .....</u>	<u>1</u>
I.1 Oxidativer Stress .....	1
I.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	1
I.1.2 Antioxidantien .....	2
I.1.3 Auswirkungen von oxidativem Stress .....	4
I.2 Anthocyane .....	6
I.2.1 Eigenschaften und Aufgaben der Anthocyane.....	6
I.2.2 Anthocyane als Teil der menschlichen Ernährung.....	8
I.2.3 Antioxidative Wirkung .....	9
I.2.4 Positive Wirkungen der Anthocyane .....	12
I.2.5 Metabolismus und Bioverfügbarkeit.....	15
I.3 Fibromyalgiesyndrom .....	16
I.3.1 Definition, Prävalenz und Einteilung .....	16
I.3.2 Symptome .....	17
I.3.3 Diagnose .....	17
I.3.4 Ätiologie.....	19
I.3.5 Prognose & Therapie.....	22
I.4 Zielsetzung.....	25
<b>II</b> <u>Material .....</u>	<u>27</u>
II.1 Chemikalien .....	27
II.2 Geräte und Materialien.....	30
II.3 Puffer und Lösungen .....	32
II.4 Software .....	33
<b>III</b> <u>Methoden .....</u>	<u>35</u>
III.1 Zellkultur.....	35
III.1.1 HT-29-Zellen.....	35
III.1.2 Zellkultivierung.....	35
III.1.3 Experimentelle Erzeugung oxidativen Stresses.....	35
III.1.4 Vitalitätstest .....	36

III.1.5	Comet-Assay .....	37
III.1.6	FPG-Comet-Assay.....	39
III.1.7	DHE-Assay .....	40
III.1.8	Glutathion-Assay .....	41
III.2	Fibromyalgiestudie .....	45
III.2.1	Studienaufbau.....	45
III.2.2	Lymphozytenisolation .....	47
III.2.3	NBT-Assay .....	47
III.2.4	Durchflusszytometrie: DCF-Assay .....	48
III.2.5	Glutathion-Assay .....	48
III.2.6	Hämoglobinbestimmung .....	49
III.2.7	FRAP-Assay .....	50
III.3	Statistische Auswertung .....	51
<b>IV</b>	<b><u>Ergebnisse .....</u></b>	<b><u>53</u></b>
IV.1	In vitro-Testung am HT-29-Zellkulturmodell.....	53
IV.1.1	Comet-Assay.....	53
IV.1.2	FPG-Comet-Assay .....	57
IV.1.3	Glutathion-Assay im HT-29-Modell.....	59
IV.1.4	DHE-Assay .....	60
IV.2	Ergebnisse der Fibromyalgiestudie .....	63
IV.2.1	NBT .....	63
IV.2.2	FRAP-Assay.....	64
IV.2.3	Durchflusszytometrie mit DCF.....	66
IV.2.4	Glutathion-Assay aus Erythrozyten .....	66
IV.2.5	Zusammenfassung der eigenen Studienergebnisse und Messungen der Projektpartner .....	73
<b>V</b>	<b><u>Diskussion.....</u></b>	<b><u>77</u></b>
V.1	Zellversuche am HT-29-Modell .....	77
V.1.1	Oxidative DNA-Schäden.....	77
V.1.2	Glutathion .....	78
V.1.3	ROS-Level .....	80
V.2	Fibromyalgiestudie .....	81
V.2.1	ROS-Level .....	81
V.2.2	Antioxidative Kapazität .....	82



## Inhaltsverzeichnis

---

V.2.3	Glutathion .....	84
V.2.4	Vergleich mit den Ergebnissen der Projektpartner.....	85
V.3	Bedeutung, Limitationen und Ausblick .....	86
<u>VI</u>	<u>Zusammenfassung.....</u>	<u>91</u>
<u>VII</u>	<u>Summary.....</u>	<u>93</u>
	<u>Literaturverzeichnis .....</u>	<u>95</u>
	<u>Anhang.....</u>	<u>107</u>
	Danksagung	
	Lebenslauf	



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	engl. American College of Rheumatology
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
BWS	Brustwirbelsäule
bzw.	beziehungsweise
CA	Comet-Assay
ca.	circa
CAS	engl. Chemical Abstracts Service
CFS	chronisches Fatigue-Syndrom
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonat-Ion
COX	Cyclooxygenase
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DCF	2,7-Dichlorofluorescein
DCFDA	2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DCFH	2,7-Dichlorofluorescin
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DUOX	Duale Oxidasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lat. et alii)
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
FDA	Fluoresceindiacetat
Fe <sup>III</sup> -TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridil)-s-triazin
FIQR	engl. Fibromyalgia Impact Questionnaire Revised (Fragebogen)

## Abkürzungsverzeichnis

---

FITC	Fluorescein isothiocyanate
FPG	Formamidopyrimidine-DNA-glycosylase
FPG-CA	Comet-Assay mit FPG-Enzym
FRAP	engl. Ferric Ion Reducing Antioxidant Power
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, Einheit bei Zentrifugation
g	Gramm
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
gr.	griechisch
GSH	Glutathion (reduziert)
GSH <sub>total</sub>	Gesamtglutathion
GSRS-IBS	engl. Gastrointestinal Symptom Rating Scale Irritable Bowl Syndrom (Fragebogen)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HMP	HighMeltingPoint Agarose
HOBr <sup>b</sup>	Hypobromige Säure
HOCl <sup>c</sup>	Hypochlorige Säure
HOO <sup>-</sup>	Hydroperoxyradikal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWS	Halswirbelsäule
K	Kontrollgruppe
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KPE	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
lat.	lateinisch
LDL	Low Density Lipoprotein
LMP	2-Hydroxyethylagarose, Typ VII

## Abkürzungsverzeichnis

---

LWS	Lendenwirbelsäule
M	Mittelwert
M2VP	1-Methyl-2-Vinylpyridinium-triflat
mA	Milliampere
MAX	Maximum
MCB	Monochlorobiman
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minuten
MIN	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
N	Anzahl der Versuche oder Probanden
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert Tetrasodiumsalzhydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NOX	NADPH-Oxidasen
NRS	Numerische Rating Skala
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Superoxid-Anion
O <sub>3</sub>	Ozon
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
P	Patientengruppe
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd

## Abkürzungsverzeichnis

---

pH	lat. potentia hydrogenii
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
RO <sup>•</sup>	Alkoxyradikal
ROO <sup>•</sup>	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SGLT	engl. Sodium dependent glucose transporter
SOD	Superoxiddismutase
SOP	Standardmethodenbeschreibung
TAC	Totale antioxidative Kapazität
TBARS	engl. Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TEAC	Trolox äquivalente antioxidative Kapazität
TNB	5'-Thiobis-2-nitrobenzoesäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v.a.	vor allem
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
vs	versus
WPI	engl. Widespread Pain Index
XO	Xanthinoxidase
z. B.	zum Beispiel
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	micromolar
8-oxo-G	8-oxo-7,8-dihydroguanin
8-oxo-Guo	8-oxo-7,8-dihydroguanosin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung von Superoxid-Anionen ( $O_2^{2-}$ ), Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale ( $HO\bullet$ ) als Nebenprodukte des Elektronentransports in Mitochondrien.....	2
Abbildung 2: 3 wichtige enzymatische Abwehrreaktionen gegen ROS.....	3
Abbildung 3: Ungleichgewicht von ROS und Antioxidantien führt zu oxidativem Stress.....	5
Abbildung 4: Grundgerüst der Anthocyanidine und Formeln der 6 wichtigsten Vertreter. ....	6
Abbildung 5: Strukturveränderung und Farbumschlag der Anthocyanidine in Abhängigkeit des pH-Wertes.....	7
Abbildung 6: Vereinfachtes Modell zur Ätiologie des Fibromyalgiesyndroms nach [104]. ....	20
Abbildung 7: Ablaufschema des Comet-Assays nach Singh et al. [135].....	37
Abbildung 8: Darstellung einer Zelle im Comet-Assay. ....	39
Abbildung 9: Ethidium (Etd+) und 2-Hydroxyethidium als Produkte der HE-Oxidation.....	40
Abbildung 10: Reaktionskreislauf des Glutathion-Assays. ....	41
Abbildung 11: Flaschenetikett des roten Mehrfruchtsaftes mit 100 % Fruchtgehalt der Forschungsanstalt Geissenheim und Fruchtsaftanalyse auf Anthocyanengehalt. ....	46
Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme in der Fibromyalgiestudie. ....	46
Abbildung 13: Reduktion des $Fe^{III}$ -TPTZ durch Antioxidantien.....	50
Abbildung 14: Ermittlung der Bedingungen für eine Positivkontrolle der Comet-Assays im HT-29-Modell. ....	53
Abbildung 15: Intakter Zellkern im Comet Assay (links) und beschädigter Zellkern mit DNA-Schweif nach genotoxischer Behandlung (rechts).....	54
Abbildung 16: Abnahme eines Wasserstoffperoxid- induzierten DNA-Schadens durch Präinkubation mit Delphinidin im Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell. ....	55
Abbildung 17: Testung von Cyanidin im Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell. Abnahme des Wasserstoff-induzierten DNA-Schaden durch Präinkubation mit Cyanidin.....	56
Abbildung 18: Abnahme des DNA-Schadens im Comet-Assay mit HT-29-Zellen bei Behandlung mit Cyanidin und Delphinidin im Vergleich. ....	57
Abbildung 19: Testung von Cyanidin im FPG-Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell. ....	58
Abbildung 20: Vergleich der Abnahme des DNA-Schadens durch Präinkubation mit Cyanidin mit und ohne FPG.....	58
Abbildung 21: Gemessene Menge an Gesamtglutathion im Glutathion-Recycling-Assay.....	59
Abbildung 22: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell. ....	60

Abbildung 23: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell. ....	61
Abbildung 24: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell .....	61
Abbildung 25: Vergleich der relativen DHE-Fluoreszenz im HT-29-Zellkulturmodell nach Präinkubation mit Cyanidin bzw. Delphinidin. ....	62
Abbildung 26: DHE-Fluoreszenz, Aufnahmen der HT-29-Zellen in 40-facher Vergrößerung jeweils aus einem zusammenhängenden Versuch.....	62
Abbildung 27: Absorption im NBT-Assay als Korrelat der ROS-Produktion in den frischen Leukozyten der Patienten- und Kontrollgruppe.....	63
Abbildung 28: Messung der antioxidativen Kapazität im Plasma mit dem FRAP-Assay.....	65
Abbildung 29: FACS-Messung des oxidativen Stresslevels mit DCF Farbstoff. ....	66
Abbildung 30: Standardkurve zur Berechnung des Gesamtglutathions. ....	68
Abbildung 31: Standardkurve zur Berechnung des oxidierten Glutathions.....	68
Abbildung 32: Gesamtglutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.....	70
Abbildung 33: Vergleich der Gesamtglutathionmenge zu allen 3 Zeitpunkten in Kontroll- und Patientengruppe. ....	70
Abbildung 34: Reduziertes Glutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.....	71
Abbildung 35: Oxidiertes Glutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.....	72
Abbildung 36: Verhältnis von GSH zu GSSG als oxidativer Stressparameter.....	73
Abbildung 37: Ernährungsempfehlungen für eine anthocyanarme Ernährung während der Einwaschphase der Fibromyalgiestudie. ....	112



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Radikale und Nicht-Radikale Sauerstoffspezies nach [4].	1
Tabelle 2: Gehalt an Anthocyanen in verschiedenen Früchten [24, 25].	9
Tabelle 3: Humane Interventionsstudien mit phenolreichen Produkte.	11
Tabelle 4: Untersuchungen zu oxidativem Stress bei Fibromyalgiepatienten.	21
Tabelle 5: Chemikalienliste.	27
Tabelle 6: Geräteliste.	30
Tabelle 7: Materialliste.	31
Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Herstellung.	32
Tabelle 9: Software zur Versuchsauswertung.	33
Tabelle 10: Konzentrationen der Zellbehandlung beim Comet-Assay mit HT-29-Zellen.	38
Tabelle 11: Konzentrationen der Standardreihen des GSH-Assays mit HT-29-Zellen für Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion.	43
Tabelle 12: Konzentrationen der Standardreihen des GSH-Assays mit Erythrozyten für Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion.	49
Tabelle 13: NBT-Assay – Absorption nach 60 Minuten Inkubation bei 620 nm.	64
Tabelle 14: FRAP-Assay. Mittelwerte in $\mu\text{Mol/ml}$ und Standardabweichungen.	65
Tabelle 15: Größenordnung aller ermittelter Glutathionwerte.	69
Tabelle 16: Zusammenfassung der laborchemischen Parameter der Fibromyalgie-Studie.	74
Tabelle 17: Klinische Parameter der Fibromyalgiepatienten.	75
Tabelle 18: Einzelwerte im Comet-Assay –Versuchsreihe mit Wasserstoffperoxid.	107
Tabelle 19: Einzelwerte im Comet-Assay – Versuchsreihe mit Delphinidin.	107
Tabelle 20: Einzelwerte im Comet-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin.	108
Tabelle 21: Einzelwerte im FPG-Comet Assay - Versuchsreihe mit Cyanidin (C).	109
Tabelle 22: Einzelwerte im Glutathion-Recycling-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin (C).	110
Tabelle 23: Einzelwerte im DHE-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin.	111
Tabelle 24: Einzelwerte DHE-Assay – Versuchsreihe mit Delphinidin.	111
Tabelle 25: Zusätzliche persönliche Daten der Fibromyalgiepatienten: Codierung, Alter, Geschlecht, Gewicht, weitere Diagnosen, Medikamenteneinnahme.	113
Tabelle 26: Einzelwerte NBT-Assay - Absorption nach 60 Minuten Inkubation bei 620 nm.	115
Tabelle 27: Einzelwerte im FRAP-Assay – FRAP im Plasma in $\mu\text{Mol/ml}$ .	116
Tabelle 28: Einzelwerte DCF - Assay.	117
Tabelle 29: Einzelwerte des Glutathion-Recycling-Assays in Erythrozyten.	118



# I Einleitung

## I.1 Oxidativer Stress

Unter „oxidativem Stress“ versteht man eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Oxidantien und Antioxidantien. In dieser Stoffwechsellage stehen der Zelle keine ausreichenden antioxidativen Mittel zur Verfügung, um eine vermehrt auftretende Menge an oxidativen Molekülen abzufangen. Dieses Ungleichgewicht kann durch strukturelle Modifikation von körpereigenen Molekülen zu Schäden führen [1].

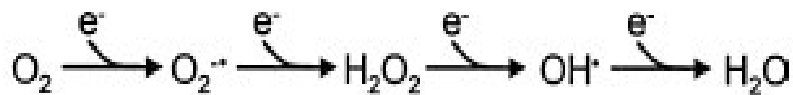
### I.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoff, O<sub>2</sub>, ist in der Luft zu 21% enthalten und ist für aerobe Organismen unersetzlich. Eukaryote Zellen nutzen ihn in der inneren Membran der Mitochondrien zur Energiegewinnung. Im letzten Schritt der Atmungskette wird Sauerstoff durch die Cytochrom-C-Oxidase zu Wasser reduziert und die frei werdende Energie wird zur ATP-Synthese verwendet. Als Nebenprodukte der Zellatmung können Reaktive Sauerstoffspezies (ROS für engl. reactive oxygen species) entstehen [2, 3]. Unter ROS versteht man zum einen freie Radikale, die durch ungepaarte Elektronen eine hohe Reaktivität der Moleküle bewirken, und zum anderen Nicht-Radikale Sauerstoffderivate wie Hydrogenperoxid oder Ozon (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Radikale und Nicht-Radikale Sauerstoffspezies nach [4].**

Radikale Sauerstoff-Spezies		Nicht-Radikale Sauerstoffspezies	
Superoxid-Anion	O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hydroxylradikal	OH <sup>·</sup>	Ozon	O <sub>3</sub>
Hydroperoxyradikal	HOO <sup>·</sup>	Singulett-Sauerstoff	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Peroxyradikal	ROO <sup>·</sup>	Hydroperoxid	ROOH
Alkoxyradikal	RO <sup>·</sup>	Hypochlorige Säure	HOCl <sup>c</sup>
Carbonat-Ion	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Hypobromige Säure	HOBr <sup>b</sup>

Abbildung 1 zeigt die Entstehung von ROS als Nebenprodukte des Elektronentransportes in den Mitochondrien. 1-2 % der Elektronen in dieser Reaktionskette entweichen als ROS dem System. Neben ROS müssen auch Reaktive Stickstoffspezies (RNS) als wichtige Oxidantien mit ähnlich hohem reaktiven Potential erwähnt werden [4].



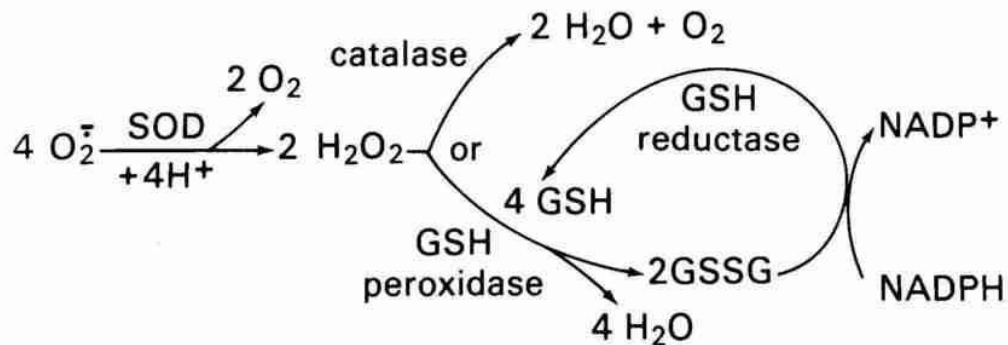
**Abbildung 1: Bildung von Superoxid-Anionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Hydroxylradikale ( $\text{HO}^\bullet$ ) als Nebenprodukte des Elektronentransports in Mitochondrien.**  
(Quelle: Podda et Grundmann-Kollmann [5])

Neben der Zellatmung sind Enzyme der NOX/DUOX-Familie, NADPH-Oxidasen und duale Oxidasen, eine weitere wichtige endogene ROS-Quelle. In unterschiedlichen Zellen und Geweben produzieren diese Enzyme angeregt durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Calciumsignale reaktive Sauerstoffspezies, die wichtige physiologische Funktionen übernehmen. ROS sind als Teil der angeborenen Immunabwehr an der Vernichtung von Mikroorganismen beteiligt und können Zellproliferation, Apoptose und rezeptorgesteuerte Zellsignalwege beeinflussen. Außerdem sind sie an Entgiftungsprozessen in der Elektronentransportkette des Cytochrom-P450-Systems und an der Synthese und Modifizierung von Proteinen der Extrazellulären Matrix beteiligt [6, 7]. Auch exogene Faktoren können die körpereigene ROS-Produktion anregen (z. B. UV-A, UV-B Licht, ionisierende Strahlung, Traumata) oder ROS können direkt aus der Umwelt aufgenommen werden (z. B. durch Zigarettenrauch) [8-10].

### I.1.2 Antioxidantien

Um ungewünschte Oxidationen zu verhindern, können ROS im Körper durch sogenannte Antioxidantien unschädlich gemacht werden. Darunter versteht man eine inhomogene Gruppe an Molekülen, die oxidativen Schäden entgegenwirkt. Man unterscheidet zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien. Die drei wichtigsten antioxidativen Enzyme sind die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase [1].

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der ablaufenden Reaktionen. Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reduktion von Superoxidanionen zu Wasser unter Bildung von Hydrogenperoxid. Letzteres kann durch Katalase und Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff zersetzt werden.



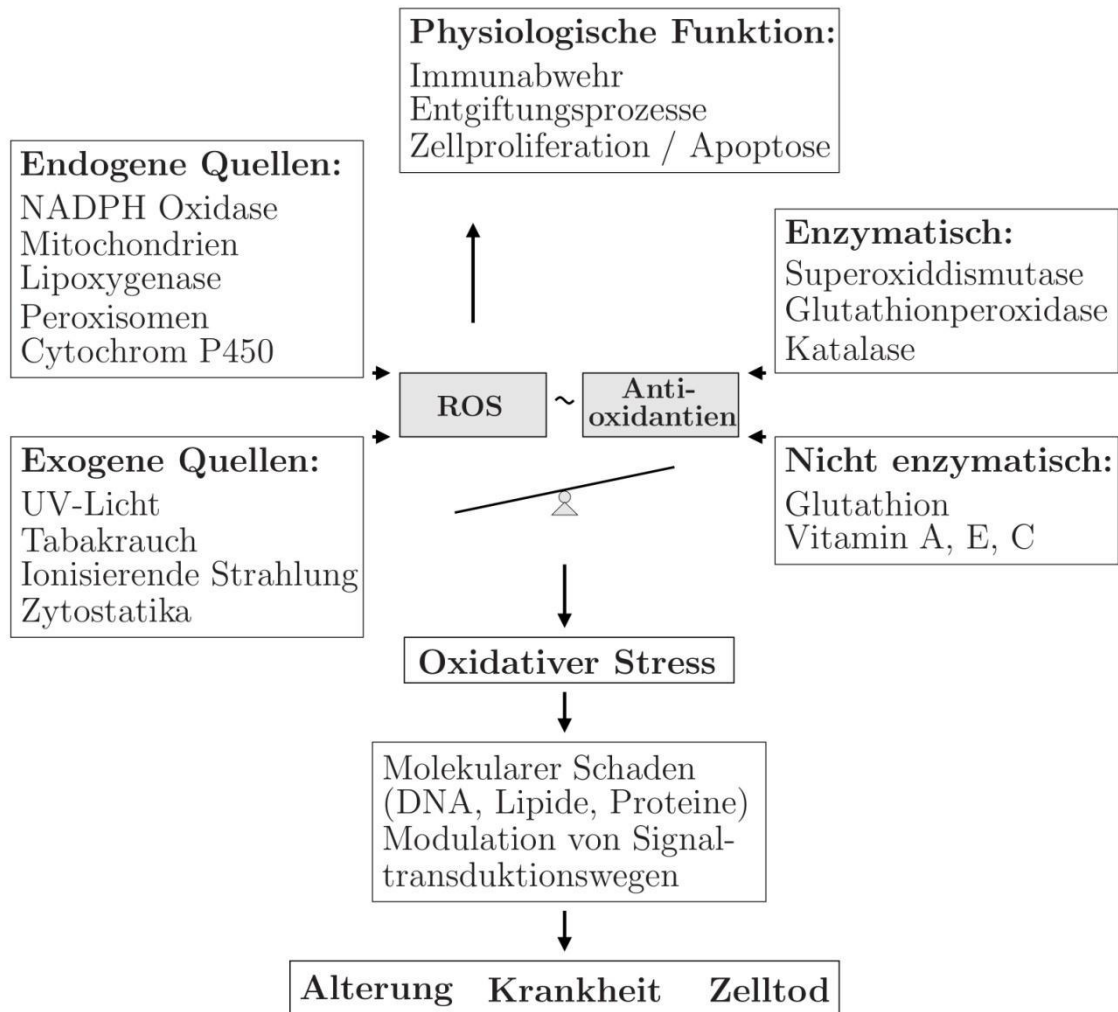
**Abbildung 2: 3 wichtige enzymatische Abwehrreaktionen gegen ROS.**

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Umwandlung von  $\text{O}_2^{2-}$  zu Hydrogenperoxid. Dieses wird durch die Katalase zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  reduziert. Zum anderen reduziert die Glutathionperoxidase  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  durch Übertragung von Elektronen des Glutathions (GSH). Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird durch die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch aus dem Hexose-Monophosphat-Shunt wieder zu GSH reduziert (Quelle: Proctor et Reynolds [11]).

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen zum einen niedermolekulare endogene Antioxidantien wie z. B. Glutathion, Melatonin oder Harnsäure und exogene Radikalfänger, die über die Nahrung aufgenommen werden müssen. Das Glutathion besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und besitzt eine freie Thiolgruppe, die zur Reduktion von ROS genutzt wird. Zwei oxidierte Glutathionmoleküle (GSSG) verbinden sich zu einem Glutathiondisulfid (GSSG) unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (s. Abbildung 2). Das oxidierte Glutathion wird durch die Glutathionreduktase reduziert und steht dem Reaktionskreislauf wieder zu Verfügung [12]. Durch die Nahrung werden exogene Antioxidantien aufgenommen wie z. B. Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherol (Vitamin E),  $\beta$ -Karotin (Provitamin A) und Polyphenole, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören [13].

### I.1.3 Auswirkungen von oxidativem Stress

Normalerweise werden ROS durch oben genannte enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen in weniger reaktive Moleküle umgewandelt. Wenn diese Maßnahmen nicht mehr ausreichend greifen und sich das Gleichgewicht zugunsten prooxidativer Prozesse verschiebt, entsteht oxidativer Stress, der zelluläre Strukturen wie DNA, Lipide und Proteine schädigen kann. Typische oxidative DNA-Schäden sind beispielsweise Basenverluste, oxidierte Nukleinbasen [z. B. 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG)] oder Einzel- und Doppelstrangbrüche [14]. Proteine können durch ROS beschädigt werden durch Oxidation von Seitengruppen der Aminosäuren, Bildung von Protein-Cross-Links und Fragmentierung der Polypeptidketten [15]. Außerdem können reaktive Radikale Lipidperoxidationen verursachen, die die Integrität der Zellmembran stören [16]. Durch diese unterschiedlichen Mechanismen spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle im physiologischen Alterungsprozess [17] und in der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen wie z. B. Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson, Multiple Sklerose und Demenz vom Alzheimer Typ, unterschiedliche Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus [18]. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht des Gleichgewichtes zwischen ROS und Antioxidantien sowie der Entstehung und Auswirkung von oxidativem Stress.



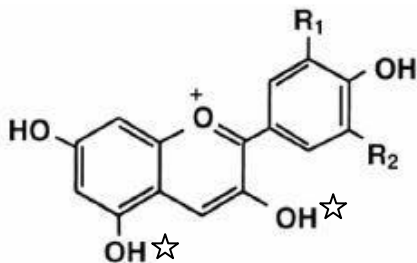
**Abbildung 3: Ungleichgewicht von ROS und Antioxidantien führt zu oxidativem Stress.**  
 ROS (= reaktive Sauerstoffspezien) werden endogen oder durch den Einfluss exogener Faktoren gebildet. Im Körper nehmen sie wichtige physiologische Funktionen wahr. Den ROS stehen verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien gegenüber, die ROS abfangen und oxidative Schäden verhindern. Wenn die Homöostase nicht aufrecht erhalten werden kann und sich das Gleichgewicht zu Gunsten der ROS verschiebt, entsteht oxidativer Stress. Körpereigene Moleküle werden oxidiert und Signaltransduktionswege verändert. Oxidativer Stress ist ein grundlegender Mechanismus des physiologischen Alterns und verschiedener Pathologien (modifiziert nach [17]).

## I.2 Anthocyane

Anthocyane sind wasserlösliche glykosidische Pflanzenfarbstoffe, die Blüten und Früchte eine charakteristische rote, blaue oder auch violette Färbung verleihen. Der Name leitet sich aus den altgriechischen Wörtern für Blüte „ánthos“ und dunkelbau „kyáneos“ ab.

### I.2.1 Eigenschaften und Aufgaben der Anthocyane

Anthocyane werden zu der großen Gruppe der Flavonoide gezählt. Flavonoide gehören neben den Phenolcarbonsäuren, den Lignanen und den Stilbenen zu der Gruppe der Polyphenole und leiten sich strukturell vom Flavan ab. Das Grundgerüst der Anthocyane ist das Flavyliumkation (s. Abbildung 4). In Pflanzen liegen sie meist in Verbindung mit einem Chloridion und somit als Pyryliumchloride (Chloridsalze des 2-Phenylbenzo-[b]-pyrans) vor [19]. Die ca. 400 verschiedenen Anthocyane unterscheiden sich in der Anzahl der Hydroxylgruppen, der Anzahl und Art der angehängten Zucker und deren Position, sowie verbundene aliphatische und aromatische Säuren [20].

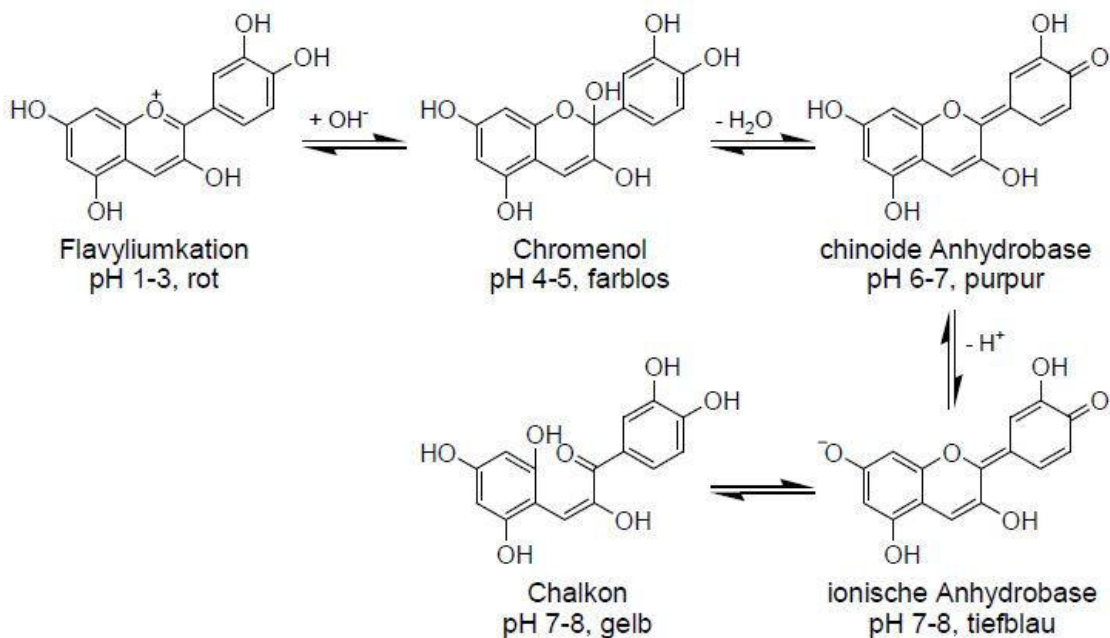


R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Anthocyanidin
H	H	Pelargonidin
OH	H	Cyanidin
OCH <sub>3</sub>	H	Peonidin
OH	OH	Delphinidin
OCH <sub>3</sub>	OH	Petunidin
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Malvidin

**Abbildung 4: Grundgerüst der Anthocyanidine und Formeln der 6 wichtigsten Vertreter.**  
Stern: Glykosylierungspositionen bei Anthocyanen, freie Hydroxylgruppen bei Anthocyanidinen (Quelle: [21]).



Die eigentlichen Farbstoffkomponenten der Anthocyane sind die Anthocyanidine. Durch Glykosylierung mit Glucose, Galactose, Rhamnose, Arabinose oder Xylose werden aus den Anthocyanidinen Anthocyane, wobei die Zucker als Mono-, Di- oder Trisaccharide vorkommen können. Von den 17 verschiedenen Anthocyanidinen kommen 6 häufig in der Natur vor. Cyanidin ist am häufigsten vertreten (50 %), gefolgt von Delphinidin (12 %), Pelargonidin (12 %), Peonidin (12 %), Petunidin (7 %) und Malvidin (7 %) [22]. Abbildung 4 zeigt ihre strukturellen Unterschiede an Position 3' (= R1) und 5' (= R2) des Phenylrestes. Anthocyane haben ein Absorptionsmaximum zwischen 270 und 290 nm (UV-Strahlung) sowie im sichtbaren Bereich zwischen 465 und 560 nm (blau bis grün). Die Absorptionseigenschaft ist durch Molekülstruktur und pH-Wert beeinflussbar und bestimmt die wahrnehmbare Färbung. Nur im sauren Milieu, bei pH-Werten unter 3, liegen Anthocyane in der rot-gefärbten, mesomeriestabilisierten Form des Flavylumsalzes vor. Strukturelle Veränderungen bewirken bei einer pH-Verschiebung einen Farbumschlag, der in Abbildung 5 nachvollzogen werden kann [19].



**Abbildung 5: Strukturveränderung und Farbumschlag der Anthocyanidine in Abhängigkeit des pH-Wertes.**

(Quelle: [19])

Eine Komplexbildung mit dreiwertigen Metallionen wie z. B.  $\text{Fe}^{3+}$  oder  $\text{Al}^{3+}$  bewirkt eine Verschiebung in den bläulichen Farbbereich [19].

Diese Farbstoffe tragen den größten Teil zur pflanzlichen Farbenvielfalt bei und sind weit verbreitet. Cyanidin, Pelargonidin und Delphinidin beispielsweise sind in 80 % aller gefärbten Blätter, 69 % aller Blüten und 50 % aller Früchte erhalten [20]. Man bezeichnet Anthocyane als chymotrope Farbstoffe, da sie im Zellsaft der Vakuolen gelöst vorkommen. Sie werden in den meisten höheren Pflanzen, vor allem in der äußersten Zellschicht, der Epidermis, gebildet. Für die Biosynthese werden Produkte der Photosynthese benötigt. Man zählt die Pflanzenfarbstoffe zu den sekundären Pflanzenstoffen, weil sie nicht im Primärstoffwechsel hergestellt werden und nicht überlebenswichtig für die Pflanze sind. Trotzdem erfüllen Anthocyane wichtige Aufgaben: Sie wirken als Attraktantien für Tiere und fördern so Vermehrung und Verbreitung. Als Phytoalexine bieten sie Schutz vor Pilz- und Bakterieninfektionen und wirken Insektenbefall entgegen [20]. Anthocyane spielen dank ihrer Absorptionsfähigkeit auch eine wichtige Rolle im Schutz vor UV-Strahlung. Außerdem nutzen sie auch in Pflanzen ihr antioxidatives Potential, um freie Radikale zu binden und oxidativen Schaden vorzubeugen.

### I.2.2 Anthocyane als Teil der menschlichen Ernährung

Spätestens seit der Diskussion um das „französische Paradoxon“, das den Franzosen dank regelmäßigen moderaten Rotweingenuss ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten trotz fettreicher Ernährung nachsagt [23], finden sekundäre Pflanzenstoffe wie Anthocyane als Bestandteil der menschlichen Nahrung Beachtung. Da Anthocyane beinahe ubiquitär in der Pflanzenwelt vorkommen, findet man sie in zahlreichen Nahrungsmitteln. Sie sind in roten und blauen Beeren wie z. B. Blaubeeren, Johannisbeeren, Erdbeeren, Brombeeren, Himbeeren, aber auch in Äpfeln, Trauben, Pfirsichen und in zahlreichen Gemüsesorten wie z. B. Bohnen, Kohl, Auberginen, Blattsalaten, roten Zwiebeln, Radieschen und roten Hülsenfrüchten enthalten [24]. Fruchtsäfte und Rotwein bieten eine weitere Möglichkeit zur Aufnahme von Anthocyanen aus der Nahrung. Als natürlicher Farbstoff (Lebensmittelschutzstoff E163) werden sie auch zur Färbung von Süßspeisen und Fertigprodukten ohne

Höchstmengenbeschränkung verwendet. Die Menge an Anthocyanen in einzelnen Nahrungsmitteln ist auf Grund verschiedener Einflussfaktoren wie genetische Faktoren, Reifegrad, Lagerung, Düngung, Bodentyp und Witterung aber auch verwendeter Analysenmethoden schwierig allgemeingültig zu bestimmen [19]. In Tabelle 2 ist der Anthocyanengehalt der Fruchtsorten, aus denen der später vorgestellte Studiensaft hergestellt wurde, dargestellt.

**Tabelle 2: Gehalt an Anthocyanen in verschiedenen Früchten [24, 25].**

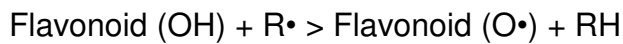
<b>Anthocyanengehalt</b> [mg / 100 mg Frucht]	<b>Wu et al. 2006</b>	<b>Clifford 2000</b>
Rote Trauben ( <i>Vitis vinifera</i> )	26.7 ± 10.9	30 ± 750
Rote Himbeeren ( <i>Rubus idaeus</i> )	92.1 ± 19.7	10 ± 60
Holunderbeeren ( <i>Sambucus nigra</i> )	1375	200 ± 1000
Schwarze Johannisbeeren ( <i>Ribes nigrum</i> L.)	476 ± 115	130 ± 400
Wildheidelbeeren ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	486.5	82,5 ± 420
Aronia ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	1480	506 ± 1000

Die tägliche Aufnahmemenge ist abhängig von Ess- und Trinkgewohnheiten und saisonalen und regionalen Obst- und Gemüsebeständen. 1976 schätzte Kuhnau die Aufnahme auf 180 - 215 mg Anthocyane pro Tag [26]. Wu et al. gingen von 12,5 mg pro Tag in der Ernährung eines US-Amerikaners aus [24]. In Deutschland wird die tägliche Aufnahme auf durchschnittlich 2,7 mg pro Person geschätzt mit einer Schwankungsbreite von 0 - 76 mg [27].

### 1.2.3 Antioxidative Wirkung

Anthocyane können oxidativen Stress entgegenwirken und Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA verhindern. Viele Publikationen beschäftigen sich mit dem Zusammenhang von Struktur und Mechanismen der antioxidativen Fähigkeit in vitro [28-34]. Flavonoide können Elektronen oder Wasserstoffatome von ihren phenolischen Hydroxylgruppen auf freie Radikale übertragen und

damit Radikale-Kettenreaktionen unterbinden [31]. Folgende Reaktion läuft dabei ab [35]:



R• ist hierbei das freie Radikal und Flavonoid (O•) stellt ein deutlich stabileres, weniger reaktives Radikal dar. Beispielsweise Peroxynitrit, Superoxid-Radikale oder Singulett-Sauerstoff können auf diesem Weg abgefangen werden [28, 36, 37]. Durch Metallbindungsdomänen (Hydroxyl-, Dihydroxyl- oder Carbonylgruppen) können Anthocyane Chelatkomplexe mit redoxaktiven Metallionen wie z. B. Eisen oder Kupfer eingehen und diese an sich binden [34]. Beispielsweise kann so die Bildung von Hydroxylradikalen aus der Fenton-Reaktion, die durch Eisensalze katalysiert wird, verhindert werden. In unterschiedlichen Zellkulturmodellen wurde der Einfluss von Anthocyanen auf oxidativen Stress in vitro getestet. Beispielsweise vermindern in Rotwein enthaltene Anthocyane die Oxidation von LDL [38]. Noroozi et al. konnten in humanen Lymphozyten einen größeren antioxidativen Effekt durch Flavonoiden als durch Vitamin C nachweisen [39]. Auch in Erythrozyten ließen sich protektive Effekte der aus Rotwein gewonnenen Anthocyane nachweisen [40]. Tarozzi et al. untersuchten die Wirkung von Cyanidin-3-O-β-glucopyranoside in humanen Keratinozyten und konnten eine Verminderung der durch UV-A Licht hervorgerufenen oxidativen Effekte sehen [41]. Auch gegen den durch die Mycotoxinen Aflatoxin B1 und Ochratoxin A hervorgerufenen Zellschaden in humanen Hepatozyten (Hep-G2) und humanen Kolonkarzinomzellen (Caco-2) zeigte Cyanidin-3-O-β-glucopyranoside protektive Wirkung [42]. Unterschiedliche in vivo-Versuche im Ratten-Modell zeigten das antioxidative Potential der Anthocyane [43-45]. Tsuda et al. untersuchten beispielsweise als oxidatives Stress-Modell die Leberreperfusion nach Ischämie in Ratten. Die dadurch ausgelöste ROS-Freisetzung und die entstandenen Leberzellschäden konnten durch 2-wöchige Fütterung mit Cyanidin-3-O-β-d-glucosid vermindert werden [45]. Es gibt zahlreiche humane Interventionsstudien mit phenolreichen Produkten und unterschiedlichen Endpunkten [21]. In einigen liegt das Augenmerk auf der antioxidativen Wirkung der Produkte. Tabelle 3 listet einige Ergebnisse dieser Untersuchungen beispielhaft auf und zeigt, dass auch im

Menschen antioxidative Effekte durch Anthocyane nachgewiesen werden konnten.

**Tabelle 3: Humane Interventionsstudien mit phenolreichen Produkte.**

Studienaufbau und Ergebnisse hinsichtlich oxidativer Stressparameter.. ↑=Zunahme, ↓ = Abnahme, -- = kein Effekt, n = Anzahl, d = Tag (modifiziert nach Pojer et al. [21] ).

Studienaufbau	Ergebnisse
9 Probanden, 300 ml Rotwein in 30 Minuten <i>Whitehead et al. 1995 [46]</i>	Antioxidative Kapazität im Serum ↑ (18 % nach 1h, 11 % nach 2 h)
8 ältere Probandinnen, 240 g Erdbeeren <i>Cao et al. 1998 [47]</i>	Antioxidative Kapazität im Serum & Urin ↑ Vitamin C – Level ↑
5 männliche Probanden, 100 g gefriergetrocknetes Blaubeerenpulver (1,2 g Gesamtgehalt an Anthocyane) <i>Mazza et al. 2002 [48]</i>	Antioxidative Kapazität im Serum ↑
18 gesunde Probanden, 700 ml roter Furchtsaft / d über 4 Wochen mit Kontrollgruppe (N=9) <i>Weisel et al. 2006 [49]</i>	Oxidativer DNA-Schaden im Blut ↓ GSH-Level ↑
10 Patienten mit Barrett-Ösophagus, 45 oder 32 g gefriergetrocknetes Himbeerenpulver ( 5-7 % Anthocyane) / d über 6 Monate <i>Kresty et al. 2006 [50]</i>	Oxidative Stressmarker im Urin ↓ ( 8-Iso-PGF2, 8-OHdG)
11 gesunde Frauen, 750 ml / d Cranberry-Saft für 2 Wochen mit Placebo-Gruppe (n=9) <i>Duthie et al. 2006 [51]</i>	Antioxidatives Potential im Plasma -- (GSH, FRAP, Gesamtphenol, antioxidativer Enzymaktivität) Oxidative DNA-Schäden in Lymphozyten. --
Hämodialyse-Patienten, über 14 Tage, 50 ml roter Traubensaft x 2 / d (n=8), 800 IU Vitamin E / d (n=8), Saft + Vitamin E (n=8), Kontrolle (n=8) <i>Castilla et al. 2008 [52]</i>	Oxidiertes LDL ↓ NADPH-Oxidase- Aktivität ↓ HDL ↑

21 Hämodialyse-Patienten, 200 ml Rotfruchtsaft / d für 4 Wochen <i>Spormann et al. 2008 [53]</i>	Oxidativer DNA-Schaden ↓ Protein- & Lipidperoxidation ↓ tGSH ↑ GSSG ↓
Gesunde Probanden, 500 g Erdbeeren / d für 30 Tage <i>Alvarez-Suarez et al. 2014 [54]</i>	Malondialdehyd im Serum ↓ 8-OHdG & Isoprostanelevel im Urin ↓ Antioxidative Kapazität im Plasma ↑

#### I.2.4 Positive Wirkungen der Anthocyane

Es werden verschiedene positive Effekte von Anthocyanen auf den menschlichen Organismus vermutet. Einige Übersichtsarbeiten der letzten Jahre fassen zahlreiche Einzelexperimente und Studien zu möglichen gesundheitsfördernden Effekten von Anthocyanen zusammen [21, 55-57]. Folgende Wirkungen werden diskutiert:

1. antioxidative Wirkung
2. antikanzerogene Wirkung
3. antibakterielle und antivirale Effekte
4. antiinflammatorische Wirkung
5. Schutz vor Herz-Kreislauferkrankungen
6. neuroprotektive Wirkung
7. Verbesserung von Sehvorgängen
8. antidiabetische Wirkung
9. Wirkung gegen Übergewicht

Das antioxidative Potential wurde bereits vorgestellt (vergleiche I.2.3). In unterschiedlichen in vitro-Versuchen konnte eine antikanzerogene Wirkung von Anthocyanen gezeigt werden. Mögliche Mechanismen der antiproliferativen Wirkung auf Krebszelllinien sind Blockade der G1/G0 oder G2/M Phase im Zellzyklus, Induktion von Apoptose und Verhinderung der Angiogenese, Schutz vor oxidativem DNA-Schaden, Induktion der Phase-II-Enzyme, antimutagene Effekte und Inhibition der COX-2 Enzyme [21]. Auch einige Tiermodelle unterstützen diese Beobachtung. Zum Beispiel konnten Lala et al. in einem Rattenmodell für Kolonkarzinom ein Rückgang der tumorspezifischen

Biomarker bei Anreicherung des Futters mit anthocyanreichen Extrakt aus Blaubeere, Traube und Aronia feststellen [58]. Allerdings konnte dieses antikanzerogene Potential bisher nicht in epidemiologischen Studien gesehen werden [59]. Eine italienischen Fall-Kontrollstudie mit über 800 Mund- und Pharynxkarzinom Patienten und über 2000 Kontrollen konnte beispielsweise kein Zusammenhang zwischen Aufnahme von Anthocyanen und Krebsrisiko feststellen [60]. In der Volksmedizin wird Moosbeerensaft (engl. cranberries) schon lange zur Bekämpfung von Harnwegsinfekten eingesetzt. In zahlreichen in vitro-Versuchen konnte eine Hemmung des Wachstums von grampositiven sowie gramnegativen Bakterien durch anthocyanreiche Extrakte beobachtet werden. Neben Moosbeeren [61-63] wurden auch zahlreiche Extrakte aus anderen Beeren [64] auf ihre antimikrobielles Potential positiv getestet. Anthocyane können durch Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 antiinflammatorisch wirken [57]. In einer Untersuchung von Wang et al. zeigte Cyanidin stärkere inhibierende Effekte auf die Cyclooxygenase 1 als Aspirin [65]. In einer weiteren Studie zeigten sich in einem Rattenmodell zu akuten Entzündungen der Lunge die Entzündungsparameter bei vorausgehender intraperitonealen Gabe von Brombeerextrakt vermindert [66]. Im Menschen konnte nach Gabe von Anthocyanen aus Rotwein eine Verringerung des proinflammatorischen Zytokins MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1) im Blut gemessen werden [67]. Eine erhöhte Anthocyanaufnahme kann sich positiv auf das kardiovaskuläre System auswirken. Mögliche Mechanismen sind dabei eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität, Protektion vor LDL-Oxidation, Entzündungs- und Plättchenaggregationshemmung [68]. In klinischen Interventionsstudien konnten entsprechende Parameter gemessen werden [52, 68, 69]. Man muss davon ausgehen, dass sich diese protektiven kardiovaskuläre Effekte nicht allein auf Anthocyane zurückführen lassen. Aber sie scheinen dazu beizutragen [57]. Des Weiteren gibt es in der Literatur Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung der Anthocyane. Sie scheinen positiven Einfluss auf altersbedingte Neurodegeneration und kognitiven Abbau zu nehmen. 2012 berichteten beispielsweise Krikorian et al. über eine Verbesserung der Gedächtnisleistung bei Erwachsenen mit milder kognitiven

Beeinträchtigung nach 12-wöchiger Einnahme von Blaubeersaft [70]. Neben der Verhinderung von Neuroinflammation und der Modulation der neuronalen Signalübertragung kommt auch die Verbesserung des zerebralen Blutflusses als mögliche Mechanismen in Frage [55]. Die ersten positiven Effekte von Anthocyanen, über die berichtet wurde, sind die Auswirkungen auf das Sehen. Schon im 2. Weltkrieg aßen angeblich Piloten der britischen Royal Air Force Blaubeermarmelade um ihr Nachtsehen zu verbessern. Es wird diskutiert, ob Anthocyane durch vermehrte Produktion von Retinapigmenten das skotopische Sehen verbessern, die Durchblutung der Retina fördern, die diabetische Retinopathie einschränken und der Bildung von Glaukomen, Retinitis pigmentosa und Katarakten entgegenwirken. Die Studienlage dazu ist allerdings widersprüchlich [71]. Außerdem deuten die Ergebnisse mehrerer Studien daraufhin, dass eine polyphenolreiche Ernährung der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ 2 entgegenwirken kann [72-75]. In vitro konnten Jayaprakasam et al. pankreatische  $\beta$ -Zellen durch die Zugabe von Cyanidin-3-glucosid und Delphinidin-3-glucosid in Glucose-haltiger Umgebung zur Insulinsekretion stimulieren [76]. Tsuda et al. fütterten Ratten mit einer fettreichen hochkalorischen Nahrung für 12 Wochen und beobachteten Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie. Die zweite Gruppe bekam neben der fettreichen Nahrung das Cyanidin-3-Glukosid-reiches „Purple Corn Color“ aus lila Mais gefüttert. Es traten weder obengenannte Blutveränderungen noch eine Hypertrophie der Adipozyten auf [77]. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte, dass isolierte Rattenadipozyten durch Behandlung mit Anthocyanen zur vermehrten Sekretion von Adipozytokinen (Adiponektin und Leptin), zur Expression von PPARs (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) und spezifische Adipozyten Gene (z. B. Lipoproteinlipase) angeregt werden können [78]. Hypertrophe Adipozyten produzieren weniger Adiponectin, ein Hormon, dass die Wirkung von Insulin stärkt. Eine vermehrte Produktion von PPARs kann unter anderem die Blutfettwerte senken und sich positiv auf Fett- und Glucosestoffwechsel auswirken.



### I.2.5 Metabolismus und Bioverfügbarkeit

Um die vielversprechenden Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Menschen richtig beurteilen zu können, ist ein Verständnis der Bioverfügbarkeit und des Metabolismus der Anthocyane entscheidend. Im Allgemeinen sind die in Plasma und Urin gefundenen Konzentrationen nach Aufnahme anthocyanreicher Produkte sehr gering und es wird auf eine geringe Bioverfügbarkeit geschlossen [57]. Die Aufnahme erfolgt an unterschiedlichen Stellen des Gastrointestinaltrakts. Im sauren Milieu des Magens zeigen Anthocyane eine hohe Stabilität [79]. Man geht davon aus, dass die Resorption dennoch schon im Magen beginnt. In der Magenschleimhaut können Anthocyane unter Beteiligung der Bilitranslocase aufgenommen werden und über Pfortader und Leber den Blutkreislauf erreichen [80]. Hauptsächlich findet die Resorption jedoch im Dünndarm statt. Wahrscheinlich können Anthocyane entweder über aktive Transportmechanismen, wie z. B. dem Natrium abhängigen Glukose-Cotransporter SGLT, aufgenommen werden oder nach Hydrolyse durch  $\beta$ -Glucosidasen als hydrophobes Anthocyanidin (Aglykan) passiv durch die biologische Membran diffundieren [81]. He et al. maßen eine Aufnahme von 7,5 % der eingenommenen Anthocyanmenge durch den Dünndarm im Rattenmodell [82]. Auch die mikrobielle Flora des Kolons scheint durch Umbau der Anthocyane zu Aglykanen und phenolischen Säuren an der Resorption beteiligt zu sein [83]. Nicht-resorbierte Anthocyane werden über die Faeces ausgeschieden. Resorbierte Anthocyane werden entweder intakt über die Nieren ausgeschieden oder als Metabolite nach Glucuronidierung, Sulfatierung und Methylierung durch Phase-II-Enzyme über Urin und Galle ausgeschieden oder dem enterohepatischem Kreislauf zugefügt [57, 84]. In unterschiedlichen Studien lagen die maximalen Plasmakonzentrationen 0,5 bis 4 Stunden nach einer oralen Aufnahme zwischen 68 und 1300 mg Anthocyanen in einem Bereich von 1,4 bis 592 nmol/l. Durchschnittlich wird von einer Ausscheidung im Urin von 0,03-4 % der Einnahmedosis mit einer Eliminationshalbwertszeit von 1,5-3 Stunden und einer maximalen Ausscheidungsrate nach 1-4 Stunden [81] ausgegangen. Die Bioverfügbarkeit wird beeinflusst von der chemischen Struktur, sowohl des

Aglykons als auch der Zuckerkomponente und wahrscheinlich auch von der restlichen Zusammensetzung der Nahrungsmittel [21, 85]. Eine mögliche Bioaktivität der Metabolite sollte auch berücksichtigt werden.

### **I.3 Fibromyalgiesyndrom**

#### **I.3.1 Definition, Prävalenz und Einteilung**

Das Fibromyalgiesyndrom bezeichnet eine nicht-entzündliche chronische funktionseinschränkende Schmerzerkrankung des nicht-knöchernen Bewegungsapparates. Zum typischen Beschwerdekomples gehören Begleitsymptome wie z. B. Müdigkeit, Schlafstörungen und Morgensteifigkeit. Ein somatischer Krankheitsfaktor wie z. B. eine strukturelle Gewebeschädigung, der die Symptome ursächlich erklären kann, ist nicht nachweisbar.

Fibromyalgie bedeutet wörtlich „Faser-Muskel-Schmerz“ [fibra (lat.) = Faser, mys (gr.) = Muskel und algos (gr.) = Schmerz]. Der Begriff wurde 1976 von Hench erstmalig verwendet [86] und löste alte Begriffe wie „Weichteilrheuma“ und „Fibrositis“ ab. Die Bezeichnung „generalisierte Tendomyopathie“ konnte sich international nicht durchsetzen [87, 88]. Yunus et al. definierte die Bezeichnung „Fibromyalgie“ 1981 diagnostisch weiter [89]. Smythe und Moldofsky beschrieben die Krankheit, wie wir sie heute verstehen, als chronisches Schmerzsyndrom mit zahlreichen Nebensymptomen [90]. Fibromyalgie ist eine häufige Erkrankung, die vor allem das weibliche Geschlecht betrifft. Laut aktueller deutscher Leitlinie [91] wird in Deutschland eine Punktprävalenz von 3,5 % angenommen. Frauen sind 7- bis 8-mal häufiger betroffen als Männer. Besonders häufig sind die Patienten im mittleren Lebensalter [92]. Der Altersgipfel beträgt 50. Lebensjahre [93]. Hierbei muss beachtet werden, dass oft Jahrzehnte bis zur Diagnosestellung vergehen können und die meisten Patienten eine lange schmerzgeprägte Krankengeschichte haben, die zum Teil bis in die Kindheit zurückreicht. Grundsätzlich kann die Krankheit in jedem Alter auftreten und wird im Kinder- und Jugendalter als Juvenile Fibromyalgie bezeichnet [94]. Man unterscheidet primäre und sekundäre Fibromyalgie. Letztere entsteht als Folge einer anderen Erkrankung z. B. einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung wie der

rheumatoiden Arthritis. Im ICD-10-Code von 2014 wird die Krankheit unter „Sonstige Krankheiten des Weichteilgewebes, anderenorts nicht klassifiziert“ aufgeführt (M79.7).

### I.3.2 Symptome

Das Hauptsymptom der Fibromyalgie sind die diffusen, multifokalen muskuloskelettalen Schmerzen, die oft in ihrer Stärke fluktuieren und die Lokalisation ändern [95]. Sie können am gesamten Körper auftreten, vor allem an Rücken, Nacken, Kopf, Brustkorb und Gelenke der Arme und Beine. Die Schwelle der Schmerzwahrnehmung scheint bei Patienten herabgesetzt zu sein [96, 97]. Bei einer Umfrage der deutschen Fibromyalgievereinigung gaben mehr als 96 % der 699 Befragten folgende Kernsymptome an: Muskelschmerzen wechselnder Lokalisation, Rückenschmerzen, Müdigkeit, Gelenkschmerzen wechselnder Lokalisation, Gefühl, schlecht geschlafen zu haben, Morgensteifigkeit, Zerschlagenheit am Morgen, Konzentrationsschwäche, Antriebsschwäche, geringe Leistungsfähigkeit und Vergesslichkeit [98]. Die Krankheit kann mit unterschiedlichen funktionellen und vegetativen Störungen (z. B. Rest-Less-leg Syndrom, Reizdarmsyndrom, Obstipation, Herzrhythmusstörungen, Trockenheit der Schleimhäute, Libidoverlust, Hyperhidrosis, Parästhesien, Menstruationsstörungen) vergesellschaftet sein. Außerdem ist sie häufig mit Psychopathologien wie Depressionen, Angst- und Panikstörungen oder einer posttraumatischen Belastungsstörung assoziiert [98]. Laborwerte und bildgebende Verfahren sind meistens nicht wegweisend. Da eine allgemein anerkannte Schweregradeinteilung nicht existiert, können die unterschiedlich schweren Verlaufsformen nur anhand klinischer Charakteristika festgelegt werden [91].

### I.3.3 Diagnose

Die Diagnosestellung stellt sich oft als schwieriger und langwieriger Prozess dar. Eine Studie des Rheumazentrums Heidelberg stellte eine durchschnittliche chronische Schmerzsymptomatik von 15,8 Jahren vor Diagnosestellung fest. Im Durchschnitt litten die Patienten bereits 10,4 Jahre an lokalisierten und 5,3 Jahre an generalisierten chronischen Schmerzen [99]. Lange Zeit wurden die

Klassifikationskriterien, die die Amerikanische Rheumatologische Gesellschaft für das Fibromyalgiesyndrom 1990 festlegte [100], zur Diagnosestellung genutzt. Diese „ACR-Kriterien“ umfassten folgendes:

- Chronischer Schmerz in mehreren Körperregionen (CWP= „chronic widespread pain“), definiert als Schmerz im Achsenskelett (d.h. HWS, BWS, LWS oder vorderer Brustkorb) und Schmerz in der oberen und unteren Körperhälfte und Schmerz in der rechten und linken Körperseite über eine Dauer von mindestens drei Monaten.
- Druckschmerz an sogenannten Tenderpoints („Tenderness at tender point sites“): Angabe von mindestens milden Schmerzen bei ca. 4 kg Druck auf definierte über den Körper verteilte Punkte (häufig Muskel-Sehnen-Übergänge).

Die Verwendung der Tenderpoints wurde auf Grund der unzureichenden Objektivität und mangelnder Validität kritisiert. Wolfe et al. sahen 2010 etwa 25% der Patienten, bei denen der klinische Eindruck einer Fibromyalgie besteht, nicht durch die ACR-Kriterien von 1990 erfasst [101]. Deshalb finden seit 2010 die modifizierten diagnostischen Kriterien des ACR Beachtung [101]:

- Beim Widespread Pain Index (WPI) werden systematisch 19 verschiedene Lokalisationen nach Schmerzhaftigkeit in den letzten Wochen abgefragt.
- Der Symptomschwerescore (Symptom severity scale) erfasst die drei Bereiche Schwächegefühl, wenig erholsamer Schlaf und kognitive Symptome, sowie zusätzlich das generelle Auftreten von somatischen Symptomen.

Die diagnostischen Kriterien für eine Fibromyalgie sind unter folgenden Bedingungen erfüllt:

- Mindestens 7 Schmerzorte im Widespread-Pain-Index und mindestens 5 Punkte im Symptom-Schwere-Score.
- Dauer der Symptome beträgt mindestens drei Monaten.

- Eine andere körperliche Erkrankung, die das Symptommuster ausreichend erklärt, kann ausgeschlossen werden.

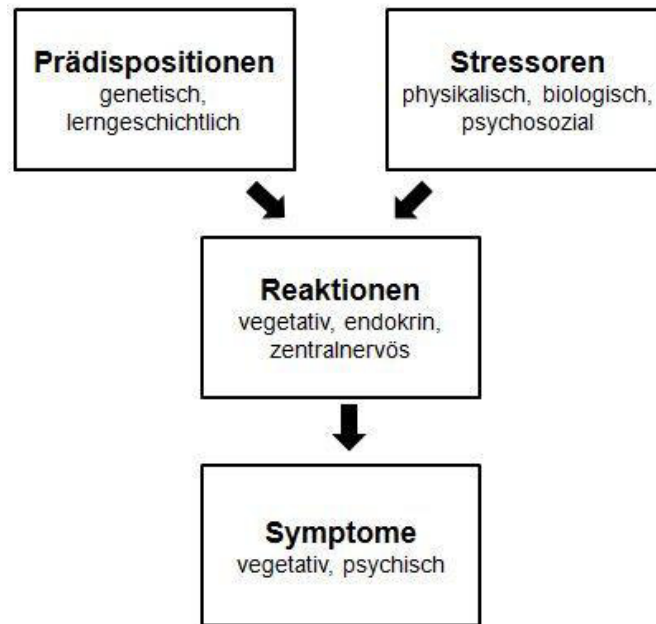
Daneben stellte die deutsche S3-Leitlinie zur Fibromyalgie folgende symptombasierten Kriterien vor [102]:

- Chronischer Schmerz in mehreren Körperregionen (nach ACR-1990-Kriterien).
- Auftreten von Müdigkeit und Schlafstörungen und/oder nicht-erholsamer Schlaf und Schwellungs- und/oder Steifigkeitsgefühl der Hände und/oder Füße und/oder Gesichts.
- Ausschluss einer anderen Erkrankung, die die Symptome ausreichend erklären kann.

Bei Erstevaluation wird das Ausfüllen einer regionalen Schmerzskizze oder Schmerzskala, die gezielte Exploration weiterer Kernsymptome, vollständige Anamneseerhebung, körperliche Untersuchung und Basislabor empfohlen. Außerdem sollte ein Screening auf vermehrte seelische Symptombelastung erfolgen z. B. mit dem Patientenfragebogen zur Gesundheit (PHQ-4). Sollte sich neben dem typischen Beschwerdekomples kein Hinweis auf internistische, orthopädische oder neurologische Erkrankungen ergeben, wird zu keiner weiteren technischen Diagnostik geraten [91].

#### I.3.4 Ätiologie

Die Ätiologie und Pathogenese des Fibromyalgiesyndroms ist nicht geklärt. Man geht von einem komplexen Entstehungsprozess aus, der nicht allein durch einen organischen Faktor ausgelöst wird, sondern durch unterschiedliche biologische, psychische, interpersonelle und soziokulturelle Faktoren beeinflusst wird. Die verschiedenen Prädispositionen, Auslöser und Chronifizierungsfaktoren versucht man im Rahmen eines biopsychozialen Vulnerabilitätsstressmodell zu ordnen und zu verstehen [103]. Abbildung 6 zeigt in einem vereinfachten Modell, dass verschiedene Stressoren bei Prädisposition unterschiedliche pathophysiologische Reaktionen auslösen können, die die Symptome der Erkrankung bedingen.



**Abbildung 6: Vereinfachtes Modell zur Ätiologie des Fibromyalgiesyndroms nach [104].**

Das Fibromyalgiesyndrom tritt familiär gehäuft auf [105]. Neben psychosozialen Aspekten werden hierfür genetische Prädispositionen verantwortlich gemacht. Verschiedene Gene aus dem serotonergen, katecholaminergen und dopaminergen System werden diskutiert z. B. Genpolymorphismen des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors [104, 106]. Neben Rauchen, Übergewicht und mangelnder körperliche Aktivität gilt das Leiden an einer entzündlich-rheumatischen Erkrankung als Risikoindikator [107-109]. Verschiedene psychische Faktoren werden mit der Entwicklung eines Fibromyalgiesyndroms assoziiert wie z. B. Stress am Arbeitsplatz [110], körperliche Misshandlung und sexueller Missbrauch in Kindheit und Erwachsenenalter [111]. Die Studienlage zur Assoziation des Fibromyalgiesyndroms und Vitamin-D-Mangel, Infektionskrankheiten (z. B. Hepatitis C, Borreliose) und Traumata ist nicht eindeutig [104]. Unterschiedliche pathophysiologische Veränderungen könnten eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen [104]. Eine Dysfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse [112], Störungen des Immunsystems, Schädigungen des peripheren Nervensystems [113] oder auch eine veränderte zentrale Schmerz Wahrnehmung werden als mögliche

Mechanismen diskutiert. Für zahlreiche weitere Hypothesen wie z. B. Störungen der thyreoidalen oder weiblichen Hormonproduktion, Störungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System oder strukturelle Muskelveränderungen, liegt keine Evidenz vor [104].

Oxidativer Stress spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Krankheitsentstehung. Hinweise darauf ergeben erhöhte oxidative Stressparameter bei Fibromyalgiepatienten im Vergleich zu Gesunden. In Tabelle 4 sind beispielhaft einige Studien und ihren Ergebnissen zusammengefasst. Ob diese Veränderungen tatsächlich zur Krankheitsentstehung beitragen oder lediglich als Folge der Erkrankung auftreten, ist nicht hinreichend geklärt.

**Tabelle 4: Untersuchungen zu oxidativem Stress bei Fibromyalgiepatienten.**

(P=Patientengruppe, K=Kontrollgruppe, SOD=Superoxiddismutase, GPX=Glutathionperoxidase, XO=Xanthinoxidase, MDA=Malondialdehyd → Abbauprodukt bei Oxidation von Lipiden, FIQR= Fibromyalgia Impact Questionnaire Revised).

Studienaufbau	Ergebnisse
41 Patienten, 46 Kontrollen HPLC-Messung von Pentosidin im Serum <i>Hein et al. 2002 [114]</i>	Signifikanter Unterschied: Pentosidin: P>K (= <b>A</b> dvanced <b>G</b> lycation <b>E</b> nd-product )
85 Patientinnen, 80 gesunde Frauen Messung von MDA und SOD-Aktivität <i>Bagis et al. 2005 [115]</i>	Signifikante Unterschiede: MDA: P>K SOD: P<K
20 Patienten, 20 Kontrollen Messung von Totaler Antioxidativer Kapazität (TAC), Peroxide im Plasma, Oxidativer Stress Index (OSI) <i>Altindag et al 2006 [116]</i>	Signifikante Unterschiede : TAC: P < K; Peroxide: P>K; OSI: P> K. Korrelation zwischen TAC und Schmerzskala.
16 Patientinnen, 8 Kontrollen, TBARS (Thiobarbitursäure, Produkt der Lipidperoxidation) und Nitritmessung, Enzymaktivität <i>Ozgoemen et al. 2006 [117]</i>	Signifikanter Unterschied: TBARS: P>K Nitrit: P<K Kein Unterschied in Enzymaktivität. (SOD, XO, Adenosindeaminase)

<p>48 Patienten, 96 Kontrollen Messung der F2-Isoprostan-Ausscheidung im Urin, Korrelation mit Symptomen <i>Chung et al. 2008 [118]</i></p>	<p>P/K: Kein Unterschied in der Ausscheidung. P: Korrelation der Ausscheidung mit Müdigkeit („ Fatigue Visual Analog Scale “)</p>
<p>16 Patienten, 30 Kontrollen Messung von Coenzym Q10 (Antioxidant) in Plasma und in periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) <i>Cordero et al. 2009 [119]</i></p>	<p>Signifikanter Unterschied: Coenzym Q10 Plasma: P&gt;K Coenzym Q10 PBMC: P&lt;K  ROS-Produktion in PBMC: P&gt;K</p>
<p>59 Patienten, 39 Kontrollen Messung im Serum: Ischämie modifiziertes Albumin, MDA <i>Toker et al. 2014 [120]</i></p>	<p>Signifikanter Unterschied: MDA: P&gt;K  Kein Unterschied: Ischämie modifiziertes Albumin</p>
<p>127 Patienten, 56 Kontrollen Enzymaktivität von SOD und GPX <i>Akbas et al. 2014 [121]</i></p>	<p>Signifikanter Unterschied: SOD: P&gt;K  Kein Unterschied: GPX: P=K</p>
<p>30 Patientinnen, 30 Kontrollen Messung im Plasma von Lipidperoxiden, Carbonylprotein. Enzymaktivität im Blutlysat von Katalase, GPX, GR Messung klinischer Symptome mit FIQR <i>Fatima et al. 2015 [122]</i></p>	<p>Signifikanter Unterschied: Katalase, GPX: P&lt;K Lipidperoxide / Carbonylproteine: P&gt;K  P: Positive Korrelation zwischen Lipidperoxidlevel und FIQR.  P/K: Positive Korrelation zwischen Carbonylproteinlevel und FIQR.</p>

### I.3.5 Prognose & Therapie

Das Fibromyalgiesyndrom ist eine unheilbare chronische Erkrankung, deren individueller Verlauf stark variieren kann. Die Spannweite reicht von milder Beeinträchtigung im Alltag bis zur Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung. Die Fibromyalgie verursacht in Deutschland u. a. durch vermehrte Arztbesuche, Therapien und Krankschreibungen hohe direkte und indirekte Krankheitskosten [91]. Die Mortalität ist nicht erhöht. Jedoch ist das standardisierte Risiko für Suizid laut einer amerikanischen Studie, die über 8000 Patienten retrospektiv



umfasste, im Vergleich zur US-amerikanischen Bevölkerung erhöht [123]. Das Therapiekonzept beruht auf einem interdisziplinären, multimodalen Ansatz, der neben Patientenschulung, Bewegung, Psychotherapie und pharmakologischer Therapie sogar alternative Therapieoptionen umfasst. Nachfolgende Zusammenfassung der Therapieempfehlungen orientiert sich an der aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinie zum Fibromyalgiesyndrom, die 2012 bei AWMF veröffentlicht wurde. Die Aufklärung und Schulung des Patienten über seine Erkrankung ist von zentraler Bedeutung.

Dem Patienten sollte verdeutlicht werden, dass keine organische Erkrankung, sondern eine funktionelle Störung Ursache der legitimen Beschwerden ist. Diese sollten anhand eines biopsychosozialen Modells erklärt werden. Die Möglichkeit durch aktives Handeln die Beschwerden zu verbessern und in Eigenverantwortung Therapieerfolge aufrecht zu erhalten, sollte betont werden [124]. Bewegung bildet das zweite wichtige Standbein der Therapie. Patienten profitieren von körperlicher Aktivität und sollten dazu motiviert werden. Ausdauertraining mit geringer oder mittlerer Intensität, Funktionstraining wie Trocken- oder Wassergymnastik, Krafttraining in geringer oder mäßiger Intensität und Stretching werden dauerhaft empfohlen. Ergänzend kann auch der Einsatz von Thermalbädern als physikalisches Therapieverfahren erwogen werden [125]. Bei einer maladaptiven Krankheitsbewältigung, Modulation der Beschwerden durch Alltagsstress, interpersonelle Probleme oder komorbiden psychischen Störungen wird eine psychotherapeutische Behandlung empfohlen. Es können z. B. Entspannungsverfahren in Kombination mit aerobem Training oder kognitive Verhaltenstherapie in Kombination oder als Einzeltherapie angewandt werden [126].

Die Medikamentöse Therapie ist beim Fibromyalgiesyndrom von untergeordnetem Stellenwert. Zur Therapie von Begleiterkrankungen oder erleichterten Durchsetzung des multimodalen Therapiekonzeptes haben Medikamente durchaus ihre Berechtigung. Die vielfältig diskutierten Wirkstoffe kommen aus dem Bereich der Psychopharmaka, Analgetika, Antikonvulsiva, Muskelrelaxantien und Hormontherapie. Der Einsatz vieler Substanzen wird durch eine kontroverse Studienlage und/oder mangelnde Zulassung für das

Fibromyalgiesyndrom erschwert. Aktuell wird der zeitlich befristete Einsatz folgender Präparate empfohlen werden: Duloxetin (Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, 60 mg/Tag, bei komorbider depressiver Störung und/oder Angststörung), Amitriptylin (Trizyklisches Antidepressivum, 10-50 mg/Tag), Fluoxetin oder Paroxetin (Serotoninwiederaufnahmehemmer, 20-40 mg/Tag, bei komorbider depressiver Störung und/oder Angststörung). Die Studienlage langt nicht um den Einsatz von Gabapentin (Antikonvulsivum), Noradrenalinwiederaufnahmehemmern, schwachen Opioiden, Acetylsalicylsäure, Paracetamol oder Metamizol eindeutig zu bewerten [127].

Komplementäre und unkonventionelle Therapieverfahren können bei Fibromyalgiepatienten ergänzend eingesetzt werden. Stark empfohlen werden meditativen Bewegungstherapien wie z. B. Tai-Chi oder Yoga. Auch der Einsatz von Akupunktur über einen begrenzten Zeitraum kann erwogen werden. Der Einsatz von Nahrungsergänzungsmitteln unter anderem von Anthocyanen wird in der aktuellen Leitlinie auf Grund der eingeschränkten Studienlage nicht empfohlen [128]. Allerdings zeigten sich in einer doppelblind Crossover-Studie von Edwards et al. mit 12 Patientinnen kleine signifikante positive Effekte nach einer täglichen Einnahme von 80 mg Anthocyanidine pro Tag für 1 Monat hinsichtlich Schlafstörungen, Fatigue und Ergebnisse im General Health Questionnaire (GHQ28) [129].

## **I.4 Zielsetzung**

Oxidativer Stress spielt bekannterweise eine Rolle in der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen. Die Möglichkeiten seiner Modulationen und Förderung antioxidativer Mechanismen geraten deshalb immer stärker ins öffentliche Interesse. Besonders interessant erscheint hierbei die natürliche Wirkung von Nahrungsbestandteilen auszunutzen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Anthocyane, als vielversprechende antioxidative Pflanzenstoffe. Im ersten Teil sollen die zwei wichtigsten Vertreter der Anthocyanidine, Delphinidin und Cyanidin, an einem Zellkulturmodell mit HT-29-Zellen untersucht und verglichen werden. Hierbei soll überprüft werden, ob beide Pflanzenstoffe auch in geringen Konzentrationen in humanen Zellen antioxidativ wirken und oxidativen Genomschaden verhindern können. Im zweiten Teil der Arbeit werden in einer 10-wöchigen Interventionsstudie mit Fibromyalgiepatienten und einer jungen, gesunden Kontrollgruppe die Auswirkungen eines anthocyanreichen roten Fruchtsaftes getestet. Es gilt die Hypothese zu prüfen, dass dieser Saft bei andauernder, konzentrierter Einnahme antioxidativ im Menschen wirkt und messbar oxidative Stressparameter im Blut verändert. Des Weiteren sollen die erhobenen Parameter der Fibromyalgiepatienten mit denen der Kontrollgruppe verglichen und hinsichtlich eines höheren oxidativen Stresslevels untersucht werden. Außerdem soll die Frage geklärt werden, ob der Fruchtsaft die Symptomatik der Patienten beeinflusst und ob klinische Veränderungen in Korrelation mit veränderten oxidativen Stressparametern stehen. Hierzu werden die in der Schmerzambulanz der Universitätsklinik Würzburg erhobenen klinischen Parameter zur Krankheitsaktivität verwendet. Alle Daten sollen im Anschluss kritisch auf mögliche Hinweise hinsichtlich der Rolle von oxidativem Stress in der Fibromyalgieerkrankung und der Bedeutung von Anthocyanen als Therapieoption im Rahmen des multimodalen Therapiekonzeptes beurteilt werden.



## II Material

### II.1 Chemikalien

Alle zur Erstellung der Arbeit verwendeten Chemikalien werden in Tabelle 5 mit Bezugsquelle und, falls vorhanden, CAS-Nummer aufgelistet.

**Tabelle 5: Chemikalienliste.**

<b>Chemikalien</b>	<b>CAS</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan	280-57-9	Sigma
1-Methyl-2-Vinylpyridinium-triflat	339530-78-8	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	7365-45-9	Sigma
2,4,6-Tri(2-pyridil)-s-triazin	3682-35-7	Fluka (Sigma)
2'7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	4091-99-0	Life Technologies
2-Hydroxyethylagarose, Typ VII	39346-81-1	Sigma
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure	69-78-3	Sigma
Antimycin A	1397-94-0	Sigma
Bovines Serumalbumin		GE Healthcare
Cyanidinchlorid	528-58-5	Roth
Delphinidinchlorid	528-53-0	Cayman Chemical
Dihydroethidium	38483-26-0	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	7758-11-4	Merck
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Roth
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose)		Sigma
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	7782-63-0	Fluka (Sigma)
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	10025-77-1	Roth

Essigsäure	64-19-7	Sigma
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	6381-92-6	Roth
Fluoresceindiacetat	596-09-8	Serva
Formamidopyrimidin-DNA-glycosylase		Bio Labs New England
Fötales Bovines Serum		Biochrom
GelRed™		Biotrend
Glutathion (oxidiert)	27025-41-8	Sigma
Glutathion (reduziert)	70-18-8	Sigma
Glutathionreduktase	9001-48-3	Sigma
Hämoglobin (human)	9008-02-0	Sigma
High Melting Point Agarose	9012-36-6	Roth
Histopaque-1077		Sigma
Insulin (human)	11061-68-0	Santa Cruz
Kaliumchlorid	7447-40-7	Sigma
Kaliumcyanid	151-50-8	Sigma
Kaliumhexacyanoferrat	13746-66-2	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Merck
Kaliumhydroxid	1310-58-3	Merck
Metaphosphorsäure (33,5 %)	37267-86-0	Sigma
Methanol	67-56-1	Roth
Monochlorobiman	7421-73-3	Fluka (Sigma)
Natriumacetat	127-09-3	Merck
Natriumbikarbonat	144-55-8	Sigma

Natriumchlorid	7647-14-5	Roth
Natriumhydroxid	1310-73-2	Roth
Natriumpyruvat	113-24-6	Fluka (Sigma)
N-Ethylmaleimid	128-53-0	Sigma
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat reduziertes Tetrasodiumsalzhydrat	2646-71-1	Roche
Nitroblautetrazoliumchlorid (98 %)	298-83-9	Sigma
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz	137-16-6	Applichem
Paraformaldehyd	30525-89-4	Aldrich
RPMI-1640 Medium		Sigma
Salzsäure (37 %)	7647-01-0	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	77-86-1	Roth
Triton X-100	9002-93-1	Sigma
Trypsin EDTA-Lösung		Sigma
Wasserstoffperoxid	7722-84-1	Sigma

AppliChem GmbH	(Darmstadt, Deutschland)
Biotrend	(Köln, Deutschland)
Carl Roth GmbH + Co. KG	(Karlsruhe, Deutschland)
Cayman Chemical	(Ann Arbor, USA)
GE Healthcare	(Freiburg, Deutschland)
Life Technologies GmbH	(Darmstadt, Deutschland)
Merck Bioscience GmbH	(Schwalbach, Deutschland)
New England BioLabs	(Frankfurt, Deutschland)
Santa Cruz Biotechnology	(Heidelberg, Deutschland)
Serva Electrophoresis GmbH	(Heidelberg, Deutschland)
Sigma-Aldrich	(München, Deutschland)

## II.2 Geräte und Materialien

Folgende zwei Tabellen enthalten eine Auflistung der verwendeten Geräte (Tabelle 6) und benutzter Materialien (Tabelle 7).

**Tabelle 6: Geräteliste.**

Geräte	Hersteller
Brutschrank	Heraeus (D - Hanau)
Durchflusszytometer	BD-LSR, Beckton Dickinson (D - Heidelberg)
	BD FACScan, Beckton Dickinson (D - Heidelberg)
Feinwaage	Sartorius (D - Göttingen)
Kühlschränke	-80°, Hera Freeze, Thermo Fisher Scientific (USA - Waltham)
	-20°, Liebherr (D - Ochsenhausen)
Mikroskope	Zeiss Mikroskop, Carl Zeiss (D - Jena)
	Labophot 2 Nikon+ COHU High Performance CCD Camera, Nikon (D - Düsseldorf)
	Eclipse TE 55i Nikon + Fluoro Pro MP 5000 Kamera, Nikon (D - Düsseldorf)
	Eclipse TS 100, Nikon (D - Düsseldorf)
Plate Reader	Bio Tek EL-800, Bio Tek (D - Bad Friedrichshall)
	Spectra Max 340, Molecular Devices (D - Biberach an der Riß)
Zentrifugen	Universal K2 S, Hettich (D - Tuttlingen)
	Labofuge 400e, Heraeus (D - Hanau)
	Universal 16 R, Hettich (D - Tuttlingen)
	Megafuge 1.OR, Heraeus (D - Hanau)



Material

---

Sterilwerkbank	SN 82503, Gelaire (Australien - Sydney)
Ultraschallbad	Sonorex , RK 100H, Bandelin (D - Berlin)
Wasserbad	GFL (D - Burgwedel)
Pipetten	Gilson (France - Villiers le Bel)
Photometer	Evolution 160 UV-VIS, Thermo Fisher Scientific (USA - Waltham)

**Tabelle 7: Materialliste.**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger	Menzel Superfrost, Gerhard Menzel (D - Braunschweig)
Zellkultur	Tissue Culture Plate, 6-Well, Flat Bottom Cell+, Sarstedt (D - Nümbrecht)
	96-Well Cell Culture Plate, sterile, F Bottom, with lid, Cellstar, Greiner Bio-one (D - Frickenhausen)
	Tissue Culture Flask, yellow cell+, Sarstedt (D - Nümbrecht)

### II.3 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet (s. Tabelle 8).

**Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Herstellung.**

PBS	80 g NaCl + 2 g KCl + 5,75 g $\text{N}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ → in 1 Liter $\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4 mit NaOH einstellen
Lysepuffer für Comet-Assay	2,5 M NaCl (146,10 g/l) + 100 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ (37,22 g/l) + 10 mM Tris (1,21 g/l) + 1 % Na-Sarcosinat (10 g/l) → in $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 10 mit NaOH Plättchen einstellen
Lyselösung für Comet-Assay	66,75 ml Lysepuffer + 7,5 ml DMSO + 0,75 ml Triton X-100
Elektrophoresepuffer für Comet-Assay	120 ml NaOH + 10 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Lösung auf 2 Liter mit destilliertem Wasser auffüllen
Tris-Puffer für Comet-Assay	48,44 g Tris (0,4 mol/L) in 1 L destilliertem Wasser lösen und 25 ml HCl 37% dazugeben; pH 7,5
Enzympuffer für FPG-Assay	40 mM Hepes (9,520 g/l) + 100 mM KCl (7,455 g/l) + 0,5 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$ (186,12 mg/l) + BSA (200 mg/l) → in $\text{H}_2\text{O}$ ; mit KOH auf pH 8,00 einstellen
KPE-Puffer für Glutathion-Assay	Puffer A (= 6,8 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in 500 ml VE- $\text{H}_2\text{O}$ ) Puffer B (= 8,5 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ in 500 ml VE- $\text{H}_2\text{O}$ ) 16 ml Puffer A + 84 ml Puffer B pH-Wert 7,5 (+/- 0,05) anpassen Zugabe von 0,327 g $\text{Na}_2\text{EDTA}$
Extraktionspuffer für Glutathion-Assay	20 $\mu\text{l}$ Triton X-100 + 0,12 g Sulfosalicylsäure in 20 ml 0,1M KPE lösen, pH 7,5 einstellen und auf Eis lagern
Drabkin-Lösung	400 mg $\text{NaHCO}_3$ + 400 $\mu\text{l}$ Kaliumcyanid-Lösung (50 mg/ml) + 400 $\mu\text{l}$ Kaliumhexacyanoferrat III-Lösung (20 mg/ml) auf 400 ml mit Roth HPLC-Wasser auffüllen
FRAP-Lösung	10 ml Acetatpuffer (300 mM, pH 3,6 mit Essigsäure eingestellt) + 1 ml Eisenchlorid Hexahydrat (20 mM, gelöst in destilliertem Wasser) + 1 ml Eisen-Tripyridiltriazin (10 mM, gelöst in 40 mM HCl)

## II.4 Software

Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Programmen ausgewertet. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der verwendeten Software zur Versuchsauswertung und zur statistischen Berechnung.

**Tabelle 9: Software zur Versuchsauswertung.**

Comet-Assay	Komet with Meteor II, Version 5.0, Kinetic Imaging Ltd, (UK - Bromborough)
DHE-Assay	Q Capture Pro, Q Imaging Corporation 2003, Media Cybernetics, (USA - Rockville) Image J, Wayne Rasband, National Institute of Health USA ( <a href="http://imagej.nih.gov/ij/index.html">http://imagej.nih.gov/ij/index.html</a> )
Glutathion-Assay	Gen 5, Version 2.00.18, Bio Tek Instruments, (D - Bad Friedrichshall)
Durchflusszytometrie	BD CellQuest Pro™ Software, Beckton Dickinson, (D - Heidelberg)
Plate-Reader-Software	Soft Max Pro, Version 1.1, Molecular Devices (D - Biberach an der Riß)
Statistik	Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation (USA - Redmond) IBM SPSS Statistic, Version 21 (USA-Armonk)
Literatur	Endnote, Version X7.5, Thomson Reuters (Kanada - Toronto)



### **III Methoden**

Alle Untersuchungen wurden im Labor des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg in den Jahren 2012 und 2013 durchgeführt.

#### **III.1 Zellkultur**

Soweit nicht anders im Text angegeben orientierte sich die Arbeit mit Zellkultur an den in der Arbeitsgruppe geltende Standardmethodenbeschreibungen.

##### **III.1.1 HT-29-Zellen**

Als Zellkulturmodell für die in vitro-Testungen der Anthocyanidine wurden HT-29-Zellen verwendet. Die adhärent wachsenden humanen Adenokarzinomzellen des Kolons wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD; HPACC, Salisbury, UK) bezogen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM High Glucose (4,5 g/L) kultiviert. Dem Medium wurden 10 % FBS, 1 % L-Glutamin und 0,4 % Penicillin (50 U/ml) / Streptomycin (50 mg/ml) hinzugefügt. Dreimal pro Woche wurden die Zellen passagiert.

##### **III.1.2 Zellkultivierung**

Zur Subkultivierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgte durch 5-minütige Inkubation (37 °C) mit 1 ml Trypsin-EDTA. Durch Zugabe von 3 ml Medium wurde der Prozess beendet und die Zellen konnten in einer Neubauerzählkammer ausgezählt werden. Entsprechende Zellzahlen wurden für die neue Kultur bzw. für die Versuche ausgesät.

##### **III.1.3 Experimentelle Erzeugung oxidativen Stresses**

Zur Erzeugung oxidativen Stresses wurde zum einen Wasserstoffperoxid, ein Vertreter der ROS, verwendet. Zum anderen wurde Antimycin A, ein Antibiotikum aus Streptomyceten und Inhibitor des Elektronentransportes in der Atmungskette [130], eingesetzt. Im zweiten Teil der Arbeit fand auch Insulin

Verwendung. Das Hormon kann über die Aktivität von NOX-Enzymen oxidativen Stress erzeugen [131].

### III.1.4 Vitalitätstest

Um eine Zytotoxizität der Zellbehandlungen in den verschiedenen Konzentrationen auszuschließen, wurde die Vitalität jedes Versuchsansatzes kontrolliert. Dazu wurden die Zellen mit den zwei fluoreszierenden Farbstoffen FDA und GelRed™ gefärbt. Letzterer ersetzt beim Anfärben der Nukleinsäuren den häufig für diese Methode eingesetzten toxischen Farbstoff Ethidiumbromid. Zur Herstellung der GelRed™-Gebrauchslösung wurde die Stocklösung zunächst 1:100 mit destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt und dann mit der dreifachen Menge DABCO vermischt. Die Färbelösung, bestehend aus 2 ml PBS, 12 µl FDA und 2 µl der GelRed™ -Gebrauchslösung, wurde maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert. 70 µl der zu untersuchenden Zellsuspension wurde mit 30 µl der Färbelösung vermischt.

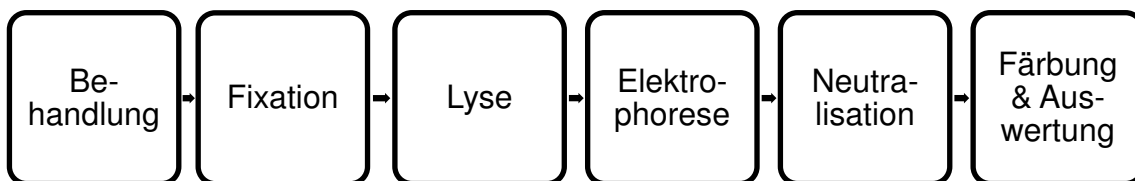
20 µl der gefärbten Suspension wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. In vitalen Zellen können Esterasen durch Abspaltung der Acetatgruppen aus FDA das grün fluoreszierende Fluorescein herstellen. GelRed hingegen überwindet die Membran absterbender Zellen und färbt die DNA rot an. Jeweils 200 Zellen wurden direkt im Anschluss an die Färbung mikroskopisch ausgewertet (Zeiss Mikroskop, 40fache Vergrößerung, FITC-Filter: Ex 465-495, DM 505, BA 515-555). Die Vitalität wurde prozentual aus dem Verhältnis der vitalen Zellen zur Gesamtzahl berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen}}{[\text{Anzahl vitaler Zellen} + \text{Anzahl toter Zellen}]} * 100\%$$

### III.1.5 Comet-Assay

Um den Einfluss von Anthocyanidinen auf DNA-schädigende Behandlungen in der Zellkultur zu untersuchen, wurden Comet-Assays durchgeführt. Dieses, auch Einzelzellelektrophorese genannte, Verfahren ist seit langem in der Genotoxizitätsprüfung etabliert [132]. 1975 gelang Rydberg und Johanson die Quantifizierung von DNA-Schaden auf Einzelzellniveau [133]. 9 Jahre später stellten Ostling und Johanson aus der gleichen Arbeitsgruppe die „Mikroelektrophorese“ vor [134]. Nach Einbettung von Zellen in Agarose, Lyse und Elektrophorese bei neutralem pH konnten sie Doppelstrangbrüche der DNA durch fluoreszierende Färbung quantifizieren. Die negativ geladenen Bruchstücke entfernen sich im elektrischen Feld von den intakten Zellkernen und formieren sich zu dem typischen kometenhaften Schweif, dessen Länge in Proportion zum Genomschaden gesetzt werden kann. Singh et al. verbesserte die Sensitivität dieses Verfahrens für die Genotoxizitätsprüfung durch das Einführen von alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} > 13$ ) während der Zellyse und der Gelelektrophorese [135].

Durch die Erhöhung des pH-Wertes können auch Einzelstrangbrüche der DNA detektiert werden, sowie auch DNA-Strangbrüche, die nur nach Exposition mit Basen entstehen (sogenannte Alkali-labile Seiten z. B. abasische Stellen). In Abbildung 7 sind die einzelnen Arbeitsschritte der verwendeten alkalischen Variante zur Übersicht dargestellt. Je 300000 HT-29-Zellen wurden am Tag vorher in eine Kammer der 6-Well-Platte ausgesät.



**Abbildung 7: Ablaufschema des Comet-Assays nach Singh et al. [135].**

Der eigentlichen Versuchsreihe ging eine Ermittlung der passenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration als Positivkontrolle voraus. Die Ansätze mit verschiedenen

Konzentrationen von Delphinidin bzw. Cyanidin und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden stets mit Positivkontrolle und Negativkontrolle (Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}$ ) getestet. Die genauen Konzentrationen der Zellbehandlung sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die Zellen wurden bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  20 Minuten mit den Anthocyanidinen präinkubiert und daraufhin 30 Minuten in FBS-freiem Medium mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Nach dem Ernten wurden sie auf Eis gelagert.  $20\text{ }\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in  $180\text{ }\mu\text{l}$  der  $0,5\%$  LMP-Agarose resuspendiert.  $45\text{ }\mu\text{l}$  der Suspension wurden vorsichtig auf ein mit  $1,5\%$  HMP-Agarose überzogenen Objektträger verteilt und mit einem Deckglas bedeckt. Für jeden Ansatz wurden 2 Objektträger hergestellt. Nach Erhärten der LMP-Agarose wurde das Deckglas entfernt. Eine Stunde lang wurden die Objektträger lichtgeschützt zur Zellyse und DNA-Entfaltung in die vorgekühlte Lyselösung bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gestellt. Die gekühlte Elektrophoresekammer wurde mit  $4\text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Elektrophoresepuffer befüllt. Nach der Lyse wurden die Objektträger zur DNA-Entwindung zunächst 20 Minuten ohne laufende Elektrophorese in die Kammer gelegt.

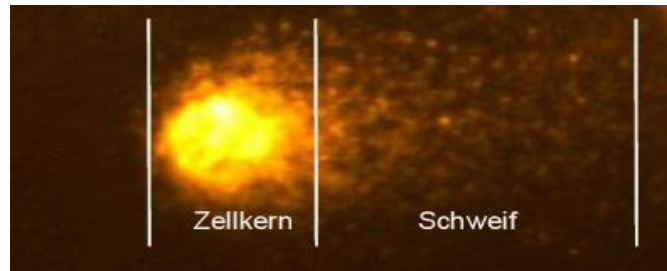
**Tabelle 10: Konzentrationen der Zellbehandlung beim Comet-Assay mit HT-29-Zellen.**

[+ = Positivkontrolle; - = Negativkontrolle]

Behandlung	Ansatz							
	-	+	1	2	3	4	5	6
Anthocyanidin ( $\mu\text{M}$ )			1	3,2	10	1	3,2	10
$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )		100				100	100	100

Im Anschluss lief die Elektrophorese für 20 Minuten bei 25 V und 300 mA. Nach dem Waschen in  $0,4\text{ M}$ -Trispuffer (pH 7,4) und anschließender Fixierung in kaltem Methanol wurden die Ansätze mit einer Mischung aus GelRed<sup>TM</sup> und DABCO (1:3) gefärbt und haltbar gemacht. Zur Auswertung wurde ein Laboshop-2 Mikroskop (20fache Vergrößerung, TRITC-Filter: Ex 540/2, DM 565, BA 605/55) benutzt. Es wurde jeweils der Komet von 50 einzelnen Zellen pro Objektträger (= 100 Zellen pro Ansatz) mit dem Programm Komet 5 ausgemessen.





**Abbildung 8: Darstellung einer Zelle im Comet-Assay.**

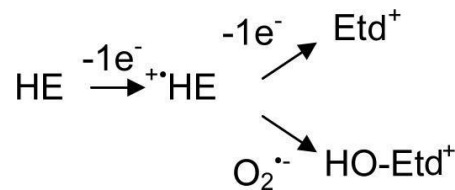
Beschädigte DNA wandert aus dem Zellkern und bildet einen Schweif.

### III.1.6 FPG-Comet-Assay

Um die Sensitivität des Comet-Assays für oxidative DNA-Schäden zu erhöhen, kann er durch eine Behandlung mit einem Reparaturenzym erweitert werden. Neben der Endonuklease III, die oxidierte Pyrimidine erkennt, wird die bakterielle Formamidopyrimidin DNA-Glycosylase (FPG) häufig eingesetzt. Als Teil des Basenexzisionreparatursystems detektiert FPG vor allem 8oxoGuanin, aber auch andere oxidierte Purine [136]. Es schneidet die veränderten Basen heraus und hinterlässt apurinische Stellen, die durch die integrierte AP-Lyase-Aktivität zu DNA-Bruchstellen werden [137]. Durch eine Integration dieses Enzyms in die Einzelzellelektrophorese verlängert sich bei oxidativem DNA-Schaden der Kometenschweif durch vermehrte Strangbrüche. In der Versuchsreihe sollte getestet werden, ob durch eine Präinkubation mit dem Anthocyanin der oxidative DNA-Schaden abnimmt und sich diese Abnahme stärker im sensitiveren FPG-Ansatz zeigt. Das Vorgehen entspricht dem des Comet-Assays. Nach 1 h Bad im 4 °C kaltem Lysepuffer wurden beide Objektträger eines Ansatzes dreimal mit Enzympuffer gewaschen. Ein Objektträger wurde anschließend mit 80 µl FPG-Enzym (1:1000 verdünnt mit Enzympuffer) behandelt, der andere wurde nur mit 80 µl Enzympuffer benetzt. Es folgte eine einstündige, lichtgeschützte Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde die Elektrophorese, Färbung und Auswertung auf gleiche Weise wie beim Comet-Assay durchgeführt.

### III.1.7 DHE-Assay

Um die Modulation von oxidativen Stress weiter zu untersuchen, wurde der fluoreszierende Farbstoff Dihydroethidium (DHE, auch Hydroethidium HE genannt), ein Indikator der intrazellulären ROS-Produktion, verwendet. Rothe und Valet maßen 1990 [138] bei der Oxidation des Dihydroethidium das rot-fluoreszierende Produkt (Ethidiumbromid, Etd<sup>+</sup>) als Marker der ROS-Produktion in Phagozyten („respiratory burst“) (s. Abbildung 9). Neuere Studien postulieren, dass verschiedene Produkte durch die Oxidation von DHE entstehen, wobei 2-Hydroxyethidium als Produkt der Oxidation mit Superoxid erkannt wurde [139]. Auf eine selektivere Betrachtung des Hydroxyethidiums durch den zusätzlichen Einsatz niedriger Anregungs-Wellenlängen (396 nm) [140] wurde verzichtet, da die Fluoreszenz bei Anregung mit Wellenlängen um 510 nm höher war und der Einfluss der Anthocyanidine allgemein auf die Prozesse untersucht werden sollte.

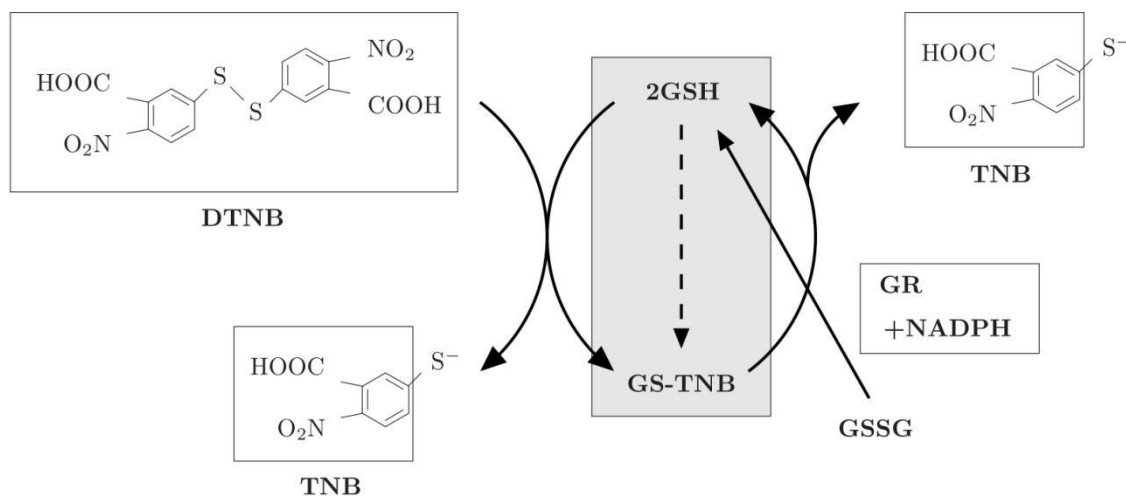


**Abbildung 9: Ethidium (Etd<sup>+</sup>) und 2-Hydroxyethidium als Produkte der HE-Oxidation**  
nach [140].

Am Vortag wurden 250000 Zellen auf 24 mm große Glasplättchen in 6-Well-Platten ausgesät. Die Ansätze wurden für 20 Minuten mit dem Anthocyanidin und/oder anschließend für 30 Minuten mit Antimycin bei 37 °C behandelt. Nach dem Wechsel des Mediums wurde 10 µM DHE hinzugegeben und bei 37 °C für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS im abgedunkelten Raum. Mit Hilfe eines Eclipse 55i Mikroskop (Nikon TRITC-Filter: Ex 540/2, DM 565, BA 605/55) und einer Fluoro Pro MP 5000 Kamera (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) wurden Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung gemacht. Im Anschluss wurden 200 Zellen pro Ansatz mit dem Programm Image J ausgewertet, das die Intensität der einzelnen Färbungen durch einen Graufilter bestimmt.

### III.1.8 Glutathion-Assay

Die enzymatische Recycling-Methode zur Bestimmung der Glutathionkonzentration geht ursprünglich auf die Arbeit von Tietze zurück [12]. Sie ermöglicht die Bestimmung des reduzierten (GSH) sowie des oxidierten Glutathions (GSSG) und die Berechnung des Quotienten beider Werte. Die Methode beruht auf einer kinetischen Reaktion. In zwei verschiedenen Ansätzen wird zum einen das Gesamtglutathion ( $\text{GSH}_{\text{total}} = \text{GSH} + \text{GSSG}$ ), zum anderen das GSSG bestimmt. Letzteres wird durch eine Entfernung des reduzierten GSH aus dem Reaktionskreislauf möglich. Nach Zugabe der Glutathionreduktase, des Farbstoffes DTNB (= Ellman-Reagenz) zur Detektion der freien Thiolgruppen und NADPH als Energielieferant startet der Reaktionskreislauf (s. Abbildung 10). Das entstehende Produkt TNB (5'-Thiobis-2-Nitrobenzoesäure) kann spektrophotometrisch detektiert werden.



**Abbildung 10: Reaktionskreislauf des Glutathion-Assays.**

GSSG wird zu GSH reduziert, das mit DTNB reagiert, GS-TNB bildet und durch die Glutathionreduktase (GR) und NADPH wieder recycelt wird. Spektrophotometrische Detektion von TNB (Absorptionsmaximum bei 412 nm). Modifiziert nach [141].

Die Absorption wird an 3 Zeitpunkten gemessen. Daraus wird die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet, die proportional zur Konzentration des enthaltenen Glutathions ist. Anhand der Standardreihen können die Konzentrationen berechnet werden. Die GSSG-Konzentrationen können durch

eine Oxidation der Thiolgruppen des GSH während der Probenherstellung artifiziell erhöht werden [142]. Eine schnelle und irreversible Bindung der Thiolgruppen und Entfernung des GSH aus dem Reaktionskreislauf ist für eine realistische GSSG-Messung essentiell. Üblicherweise werden dazu Substanzen wie N-Ethylmaleimid (NEM) [143] oder 2-Vinylpyridine [144] verwendet. In dieser Arbeit wurde 1-Methyl-2-vinylpyridinium-trifluoromethan-sulfonat (M2VP) verwendet, das den Vorteil einer sehr schnellen Reaktionszeit bietet und so die Auto-Oxidation minimieren kann. Außerdem behindert M2VP im Gegensatz zum NEM nicht die Aktivität der Glutathionreduktase [145]. Die Durchführung der Versuche orientierte sich an dem Protokoll von Rahman et al. [141].

### Probenherstellung

400000 Zellen wurden am Vortag in jede Kammer der 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden nach der Behandlung (z. B. BSO 24 h, 50 Minuten Cyanidin, 30 Minuten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geerntet. In einigen Ansätzen wurde die Glutathionsynthese durch Präinkubation mit BSO inhibiert, um die Zellen für den oxidativen Stress zu sensibilisieren. Nach 5-minütiger Zentrifugation mit 1000 g bei 4 °C, wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden im Dunklen ausgeführt und die Proben durchgängig auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml kaltem Extraktionspuffer vermischt, mit einem Teflon-Pistill homogenisiert und gevortext. Die Eppendorf-Röhrchen wurden für 5 Minuten in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad gestellt, um die Zellen vollständig zu lysieren. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C für 4 Minuten wurden jeweils 100 µl des Überstandes als GSH bzw. GSSG-Probe in geschwärzte Eppendorf-Röhrchen überführt. Der GSSG-Probe wurde nach Zugabe von 10 µl M2VP (c = 32 mM in KPE-Puffer gelöst) für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### Standardreihe

Zur Messung wurde jeweils eine Standardreihe für GSH und GSSG benötigt. Die Lösungen dafür wurden für jede Messung frisch hergestellt. Die Stocklösungen (GSH: 1 mg in 1 ml 0,1 M KPE, GSSG: 1 mg in 1 ml 0,1 M

KPE) wurden bei -20 °C gelagert. Für den Zellversuch wurden jeweils 100 µl der folgenden Standardkonzentrationen hergestellt (s. Tabelle 11).

**Tabelle 11: Konzentrationen der Standardreihen des GSH-Assays mit HT-29-Zellen für Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion.**

GSH <sub>total</sub> Standardkonzentrationen	GSSG Standardkonzentrationen
26,4 nmol / ml	1,65 nmol / ml
13,2 nmol / ml	0,83 nmol / ml
6,6 nmol / ml	0,41 nmol / ml
3,3 nmol / ml	0,2 nmol / ml
1,65 nmol / ml	0,1 nmol / ml

Die GSH<sub>total</sub>-Stocklösung wurde zunächst 1:125 mit 0,1 M KPE verdünnt und dann jeweils im Verhältnis 1:1. Nach einer Verdünnung der GSSG-Stocklösung von 1:1000 mit 0,1 M KPE und jeweils weiteren Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:1, wurden die 100 µl GSSG-Standard unter gleichen Bedingungen wie die Proben mit 10 µl M2VP inkubiert.

#### Messung in der Mikrotiterplatte

Jeweils 3 Vertiefungen der 96-Well-Platte wurden mit 20 µl KPE (= Blank), 20 µl der Standards und 20 µl jeder Probe gefüllt. DTNB (2 mg in 3 ml KPE gelöst) und Glutathionreduktase (c = 250 U/ml, in 3 ml KPE) wurden frisch im Verhältnis 1:1 gemischt und lichtgeschützt auf Eis gelagert. β-NADPH (2 mg in 3 ml KPE gelöst) wurde bis zur Verwendung ebenfalls lichtgeschützt auf Eis gestellt. In jede Vertiefung wurden 120 µl der DTNB/Glutathionreduktase-Lösung hinzugefügt und die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl β-NADPH gestartet. Ohne Verzögerung wurde mit der Messung am Spektrophotometer begonnen. Die Absorption wurde bei 405 nm zum Zeitpunkt 0, 1 Minute und 2 Minuten gemessen, mit dem Programm GEN 5.2 gespeichert und in Excel importiert.

### Berechnung

Für jeden Zeitpunkt wurde jeweils der Absorptionsdurchschnitt aus den 3 Vertiefungen der Probe berechnet:  $X_{M\ 0min}$ ,  $X_{M\ 1min}$ ,  $X_{M\ 2min}$ . Die Geschwindigkeit  $V$  der Absorptionsänderung berechnete sich wie folgt:

$$V = (X_{M\ 2min} - X_{M\ 0min}) / 2$$

Mit den Standards wurde genauso verfahren. Von den errechneten Geschwindigkeiten wurde jeweils die Geschwindigkeit  $V_{Blank}$  abgezogen. Es wurde eine Standardkurve erstellt, indem die Geschwindigkeit gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Die Gesamtglutathion- und die GSSG-Konzentrationen konnten an der jeweiligen Standardkurve abgelesen werden. Daraus konnten die GSH-Werte mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$GSH_{total} = GSH + 2 \times GSSG$$


$$GSH = GSH_{total} - 2 \times GSSG$$

## III.2 Fibromyalgiestudie

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Arbeit standen die Versuche mit den Patienten- und Kontrollproben aus der klinischen Studie zur Fibromyalgie. Der zu Grunde liegende Ethikantrag (Nr. 81/12) wurde am 26.6.2012 bewilligt.

### III.2.1 Studienaufbau

Für die Fibromyalgiestudie an der Schmerzambulanz des Universitätsklinikums Würzburg konnten 19 Fibromyalgie Patienten gewonnen werden. Darunter befanden sich 18 weibliche und 1 männlicher Proband im Alter zwischen 41 und 72 Jahren (Altersdurchschnitt: 54,68 Jahre). Die Kontrollgruppe umfasste 10 gesunde Probanden, 4 Männer und 6 Frauen im Alter zwischen 24 und 58 Jahren (Altersdurchschnitt: 38,1 Jahre). Die Studienteilnehmer wurden von Frau C. Samwer unter der Leitung von Herrn Dr. med. E.-M. Brede, Leiter der Schmerzambulanz, rekrutiert und betreut. Nach Einwilligung zur Studienteilnahme sollten die Teilnehmer in den ersten zwei Versuchswochen, der sogenannten Einwaschphase, Ernährungsempfehlungen für eine anthocyanarme Diät einhalten. Daraufhin erfolgte die 4-wöchige Phase der Fruchtsaftaufnahme, in der die Patienten 750 ml des roten Mehrfruchtsaftes aufgeteilt in drei Portionen jeweils vor den Mahlzeiten zu sich nahmen. Der Mehrfruchtsaft mit 100 % Fruchtgehalt wurde für die Studie von der Forschungsanstalt Geisenheim hergestellt und enthielt 54 % roten Traubensaft, 17 % Himbeersaft, 10 % Sauerkirschsafte, 8 % Holundersaft, 6 % Johannisbeersaft, 3 % Wildheidelbeersaft und 3 % Aroniasaft. Der Saft enthielt 123,2 mg/l Anthocyane. Den größten Anteil bildete dabei Cyanidin-3,5-diglucosid (37,4 mg/l), Cyanidin-3-(coumaroyl)glucosid (20 mg/l), Malvidin-3,5-diglucosid (16,7 mg/l) und Delphinidin-3-glucosid (16,0 mg/l). Die genaue Zusammensetzung kann Abbildung 11 entnommen werden. Die tägliche Anthocyanaufnahme der Studienteilnehmer betrug somit ca. 92,4 mg.



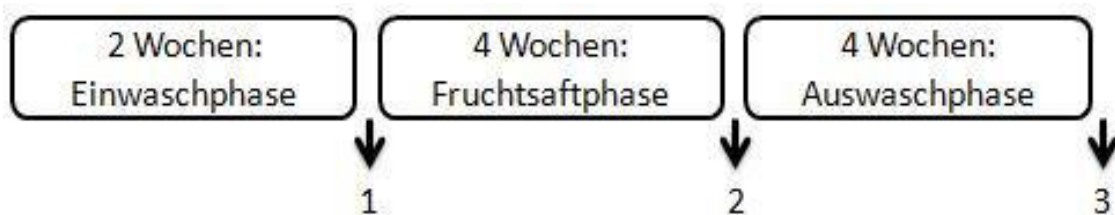
Peak #	Substanz	RT Reprosil 125/2	Full Scan M+	$\lambda_{max}$ (nm)	Anthocyane [mg/L]*
1	Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid	8.95	743 581 449 287	516	3.6
2	Petunidin-3,5-diglucosid	9.77	641 479 317	522	2.8
3	Delphinidin-3-glucosid	10.74	465 303	518	16.0
4	Peonidin-3,5-diglucosid	11.25	625 463 301	514	9.0
5	Cyanidin-3,5-diglucosid	11.73	611 449 287	521	37.4
6	Malvidin-3,5-diglucosid	12.2	655 493 331	517	16.7
7	Cyanidin-3-(coumaroyl)glucosid	13.39	595 449 287	518	20.0
8	Peonidin-3-glucosid	15.03	463 301	517	5.4
9	Malvidin-3-glucosid	15.97	493 331	525	6.4
10	Malvidin-3-(coumaroyl)-5-diglucosid	21.82	801 639 493 331	522	2.3
11	Malvidin-3-(acetyl)glucosid	22.01	535 331	527	3.5
Summe					123.2

\*berechnet als Malvidin-3-glucosid; Doppelbestimmung

**Abbildung 11: Flaschenetikett des roten Mehrfruchtsaftes mit 100 % Fruchtgehalt der Forschungsanstalt Geisenheim und Fruchtsaftanalyse auf Anthocyanengehalt.**

Der Saft enthält 123,2 mg/l Anthocyane, wobei anteilig am meisten Cyanidin-3,5-diglucosid (37,4 mg/l) enthalten ist.

Die Studie endete für die Probanden nach anschließender 4-wöchiger Auswaschphase. In Abbildung 12 ist der Ablauf der Studie schematisch skizziert.



**Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme in der Fibromyalgiestudie.**

Jeweils zum Ende der Einwaschphase (Tag 15), der Fruchtsafteinnahme (Tag 43) und der Auswaschphase (Tag 70) stellten sich die Teilnehmer in der Schmerzzambulanz mit der 24-Stunden Urin-Sammlung des vorherigen Tages vor. Es erfolgte eine venöse Blutentnahme und die Befragung der Patienten hinsichtlich des Reizdarmsyndroms und des chronischen Fatigue-Syndroms, sowie einer Schmerzeinschätzung mit Hilfe des Deutschen Schmerzfragebogens. Kurz nach Entnahme wurden die Blutproben sowie die Urinproben an das toxikologische Labor übergeben. Umgehend nach Erhalt wurden sie in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Bankoglu aufgearbeitet. Die Proben wurden codiert untersucht und erst nach Abschluss der Versuche wurde die Einteilung bekanntgegeben (AX = Patient, X = Kontrollgruppe). Im Zeitraum vom 10. August 2012 bis zum 16. April 2013 wurden insgesamt 87 einzelne Patientenproben gesammelt.



### III.2.2 Lymphozytenisolation

Eine Blutprobe bestand aus zweimal 5 ml mit EDTA versetztem Vollblut. 7 ml des frisch abgenommen Blutes wurden vorsichtig auf 7 ml vorgewärmtes Histopaque gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. An der Grenze zwischen Plasma und Histopaque konnte mit einer Pasteur-Pipette die dünne weiße Schichtung aus Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen abgetragen werden. Nach Zugabe von 10 ml Lymphozytenmedium wurden sie erneut zentrifugiert (RT, 1300 U/min, 10 Minuten). Lymphozytenmedium bestand aus einer 500 ml Flasche RPMI-1640 Medium angereichert mit 15 % FBS, 1 % L-Glutamin, 0,4 % Antibiotika [Penicillin (50 U/ml) / Streptomycin (50 mg/ml)], 1 % Natriumpyruvat, 1 % Nicht-Essentielle-Aminosäuren und 0,1 % Tylosin. Das Zellpellet wurde in 3 ml Lymphozytenmedium resuspendiert und auf Eis gelagert. Das isolierte Plasma und die Erythrozyten wurden portioniert und bei -80 ° C für die Versuche zu einem späteren Zeitpunkt eingefroren.

### III.2.3 NBT-Assay

Mit Hilfe des Farbstoffes Nitroblautetrazoliumchlorid wurden die frisch isolierten Lymphozyten auf ihre ROS-Produktion untersucht. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz wird von den Zellen aufgenommen und im Zytoplasma durch Superoxidanionen zu dem wasserunlöslichen blauen Formazan reduziert [146]. Der Ablauf des NBT-Assays [147, 148] wurde für die nicht-adhären wachsenden Lymphozyten abgeändert. 1 mg NBT wurde in 1 ml Lymphozytenmedium aufgelöst. In 650 µl dieses NBT-Mediums wurden 300000 Zellen resuspendiert und anschließend je 100 µl in 6 Vertiefungen einer 96-Well-Platte aufgeteilt. Je 3 Vertiefungen wurden mit Insulin, als Induktor der ROS-Produktion [149], (Endkonzentration: 10 µM) behandelt. Der Ansatz wurde lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert. Nach 30 Minuten sowie nach 60 Minuten wurde die Absorption mit dem Plate Reader Spectra Max 340 bei 620 nm [150] und 540 nm [151] gemessen.

### III.2.4 Durchflusszytometrie: DCF-Assay

In den frisch isolierten Lymphozyten wurde die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies durchflusszytometrisch gemessen. Dazu wurden die Zellen mit der Fluoreszenzsubstanz 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFDA) behandelt. DCFDA überwindet die Zellmembran, sammelt sich im Zytosol an und wird durch zelleigene Esterasen deacetyliert. Das entstandene nicht-fluoreszierende Dichlorofluorescein (DCFH) kann sowohl durch ROS als auch durch RNS zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert werden [152]. Dieses Produkt kann mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und bei 525 nm erfasst werden. DCF-Fluoreszenz kann nicht als spezifischer Nachweis einer reaktiven Sauerstoffspezies verstanden werden, sondern eher als Messung generellen oxidativen Stresses [4]. 500000 frisch isolierte Lymphozyten wurden mit PBS gewaschen und in 3 ml 1 % BSA/PBS resuspendiert. 1,5 µl der DCFDA-Lösung (20 mM in DMSO) wurden zur Zellsuspension dazugegeben und 10 Minuten auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min und 4 °C wurde das Zellpellet in 1 ml 2 % PFA/PBS resuspendiert und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Becton Dickinson FACScan und dem Programm CellQuest Pro wurden 20000 Events mit dem FL1-H Filter gemessen.

### III.2.5 Glutathion-Assay

Das Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion wurde auch in den Patientenproben als Marker des oxidativen Stresses bestimmt. Auch dafür wurde die Enzym-Recycling-Methode nach Tietze [12] angewendet und sich am Protocol von Rahman et al. [141] orientiert. Die bei -80 °C eingefrorenen Erythrozyten wurden aufgetaut. 500 µl wurden als Gesamt-Glutathion Probe in ein 15 ml Tube gegeben und auf Eis gestellt. Weitere 500 µl wurden lichtgeschützt unmittelbar nach dem Auftauen mit 50 µl M2VP versetzt, gevortext und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Proben wurden mit 2 ml 5 %- Metaphosphorsäure vermischt und anschließend bei 4 °C 10 Minuten lang mit 3000 U/min zentrifugiert. Um die Inhibierung der

Glutathionreduktaseaktivität im niedrigen pH Bereich zu vermeiden [153], wurden jeweils 25 µl der sauren Überstände mit 1500 µl KPE-Puffer verdünnt. Die Standardreihen (s. Tabelle 12) wurden für jede Messung frisch hergestellt. Die spektrophotometrische Messung erfolgte auf gleiche Weise wie bei der Messung der Zellproben. Um auf die Glutathionkonzentrationen in den 500 µl Erythrozyten zu schließen, wurden die Ergebniskonzentrationen der Messung mit dem Verdünnungsfaktor 1:305 verrechnet. Er setzte sich zusammen aus der 1:5 Verdünnung der 500 µl Erythrozyten mit 2000 µl Metaphosphorsäure und der 1:61 Verdünnung der 25 µl Probe mit 1500 µl KPE-Puffer.

**Tabelle 12: Konzentrationen der Standardreihen des GSH-Assays mit Erythrozyten für Gesamtglutathion und oxidiertes Glutathion.**

GSH <sub>total</sub> Standardkonzentrationen	GSSG Standardkonzentrationen
26,4 nmol / ml	0,83 nmol / ml
13,2 nmol / ml	0,41 nmol / ml
6,6 nmol / ml	0,2 nmol / ml
3,3 nmol / ml	0,1 nmol / ml
1,65 nmol / ml	0,05 nmol / ml
0,83 nmol / ml	0,025 nmol / ml

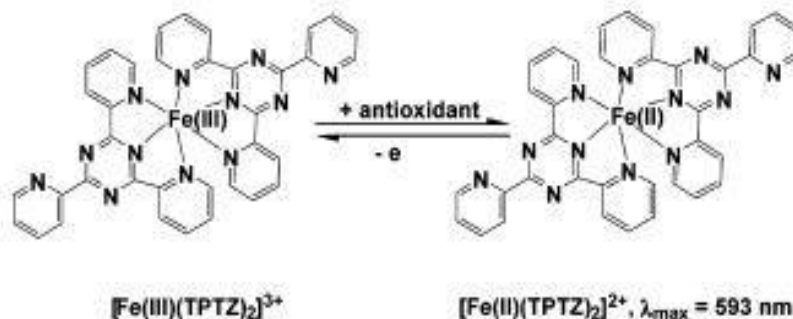
### III.2.6 Hämoglobinbestimmung

Zur besseren Darstellung wurden die Glutathionmesswerte auf die Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten bezogen. Dafür wurde die Hämoglobinkonzentration mit der Methode nach Drabkin bestimmt [154, 155]. Die wässrige Drabkin-Lösung besteht aus Natriumbikarbonat, Kaliumcyanid und Kaliumferricyanid. Sie lysiert die Erythrozyten und setzt alle Hämoglobine (außer Sulfhämoglobin) zu Hämoglobincyanid um. Letzteres ist ein stabiler roter Komplex und ist gut zur photometrischen Messung geeignet. Dazu wurde eine frische Standardreihe aus humaner Hämoglobin-Lösung (8 mg humanes Hämoglobin/ ml H<sub>2</sub>O) und Drabkin-Lösung erstellt. Die Endkonzentrationen

betragen 0, 160, 264, 400, 800, 1600 µg/ml. Die Erythrozytenproben wurden mit Drabkin-Lösung verdünnt (1:200). Daraufhin wurden 200 µl verdünnte Lösung zu 800 µl Drabkin-Lösung in die Messküvette gegeben und bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden bei 540 nm mit dem Photometer dreifach gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt und mit den Mittelwerten der 3 Absorptionen die Hämoglobinkonzentration der Erythrozytenprobe berechnet. Das Ergebnis wurde mit dem Verdünnungsfaktor 1000 multipliziert.

### III.2.7 FRAP-Assay

Der FRAP-Assay nach Benzie und Strain [156] dient der Messung der antioxidativen Kapazität. Dazu wird die Eisen-Reduktionsfähigkeit (FRAP= Ferric Reducing Ability of Plasma) im Plasma untersucht. Bei der Reduktion von Eisen-Tripyridylkomplex ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) durch im Plasma enthaltenen Antioxidantien (s. Abbildung 13), entsteht eine intensive Blaufärbung, die spektrophotometrisch gemessen werden kann.



**Abbildung 13: Reduktion des  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ durch Antioxidantien.**

(Quelle: Huang et al. [157])

Im vorliegenden Versuch wurde die Modifikation des Protokolls von Firuzi et al. für die 96-Well-Platte verwendet [158]. Um die antioxidative Kapazität der Patienten vor und nach Fruchtsaftaufnahme einzuschätzen, wurden die Plasmaproben zu allen 3 Zeitpunkten gemessen. Parallel zu jeder Messung wurde eine Standardreihe mit 5 verschiedenen Eisen(II)-Sulfat-Lösungen bestimmt. Die Konzentrationen betragen 7 / 14 / 21 / 28 und 35 µM. 20 µl des aufgetauten Plasmas wurden mit 180 µl  $\text{H}_2\text{O}$  zur Probenherstellung verdünnt.

Die FRAP-Lösung wurde frisch hergestellt, gut vermischt und lichtgeschützt bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Je 3 Vertiefungen der 96-Well-Platte wurden mit 25 µl H<sub>2</sub>O (= Blank), 25 µl der Standardkonzentration und 25 µl der Probe befüllt. Nachdem jede Vertiefung mit 175 µl der FRAP-Lösung aufgefüllt wurde, wurde die Platte lichtgeschützt für 25 Minuten bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Die Inkubationszeit wurde in einem Vorversuch ermittelt. Die Absorption wurde mit dem Plate Reader Spektra Max 340 bei 593 nm gemessen und von dem Programm Soft Max Pro erfasst. Die Konzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Jede Probe wurde in 3 unabhängigen Versuchen gemessen.

### **III.3 Statistische Auswertung**

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet. Diese Mittelwerte wurden bei den Zellkulturversuchen aus den Ergebnissen mindestens 3 unabhängiger Versuche gewonnen. Die Unterschiede einzelner Gruppen wurden mit SPSS 21 auf Signifikanz überprüft. Dafür wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser Rangsummentest für nicht normalverteilte und mindestens ordinalskalierte Variablen testet, ob die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben unterschiedlich ist. Als Signifikanzniveau wurde von  $p \leq 0,05$  ausgegangen.

Die Ergebnisse der Fibromyalgie Studie sind als Mittelwerte und Standardabweichungen der beiden Gruppen dargestellt. Zu ihrer Berechnung wurden die Ergebnisse aller Personen der bestimmten Gruppe zu dem zu untersuchenden Zeitpunkt herangezogen. Zur statistischen Einordnung der Messwerte wurden zwei unterschiedliche Signifikanztests durchgeführt. Da es sich bei der Prüfung von Unterschieden zwischen Patienten- und Kontrollgruppe um zwei unabhängige Variablen handelt, wurde der oben beschriebene Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den 3 Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe, muss die Abhängigkeit der nicht normalverteilten Variablen beachtet werden. Hierfür wurde der Rangtest nach Wilcoxon verwendet, der immer 2 gepaarte Stichproben miteinander vergleicht.



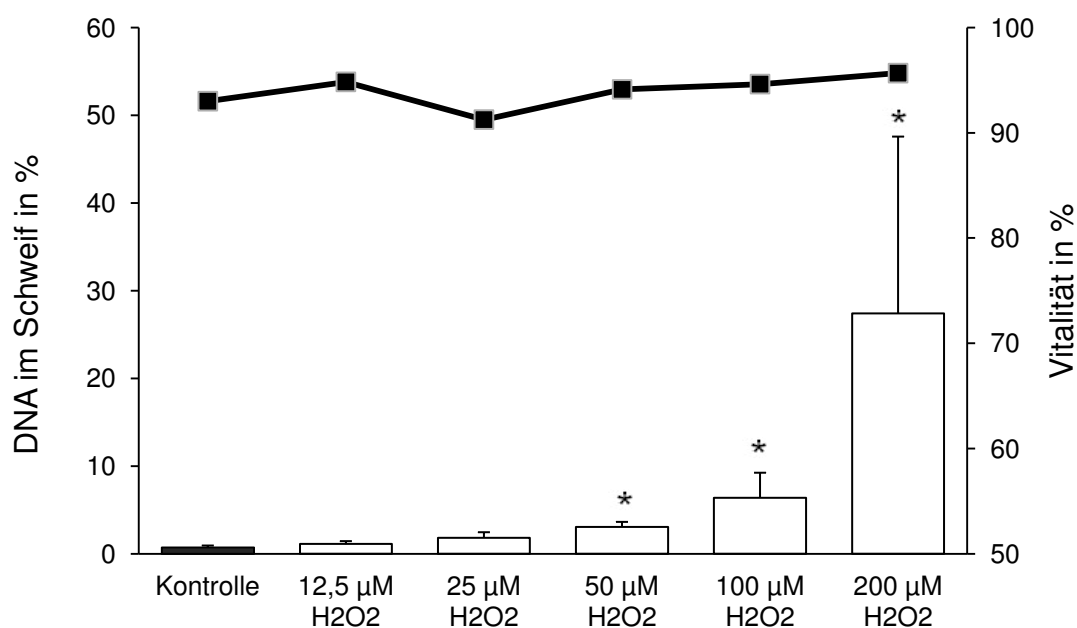
## IV Ergebnisse

### IV.1 In vitro-Testung am HT-29-Zellkulturmodell

#### IV.1.1 Comet-Assay

##### Versuchsreihe mit Wasserstoff

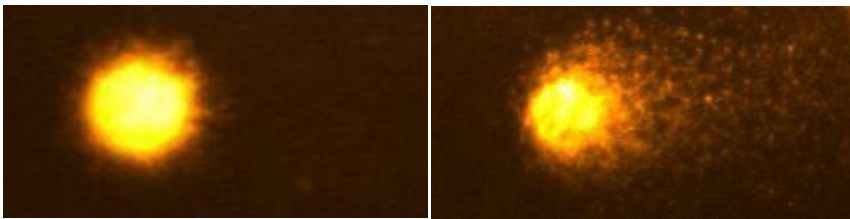
Zunächst wurde die geeignete Konzentration an Wasserstoffperoxid als genotoxisches Agens für die nachfolgenden Versuche ermittelt (s. Abbildung 14). Ab der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigten die Zellen einen signifikanten DNA-Schaden im Vergleich zur mit Wasser (gleiches Volumen, als Lösungsmittelkontrolle) behandelten Negativ-Kontrolle. Ein jeweils durchgeführter Vitalitätstest schloss eine zytotoxische Wirkung der eingesetzten Konzentrationen im getesteten Zeitintervall aus. Der Anzahl der vitalen Zellen betrug  $\geq 91$  %.



**Abbildung 14: Ermittlung der Bedingungen für eine Positivkontrolle der Comet-Assays im HT-29-Modell.**

Ansätze: Negativ Kontrolle und 5 verschiedene Wasserstoffkonzentrationen. Balkendiagramm: DNA im Schweif in %, Punktdiagramm: Vitalität der Ansätze in %. Dargestellt sind M + SD (N=3), \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle).

Die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  führte in den 3 unabhängigen Versuchen zu konstanten und signifikanten DNA-Schäden ( $6,4 \% \pm 2,9$ ) und im Vergleich zu der Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kaum zu stark beschädigten und schlecht auswertbaren Zellen (sogenannten „ghost cells“). Deshalb wurden in den folgenden Comet-Assays 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zur genotoxischen Behandlung gewählt.

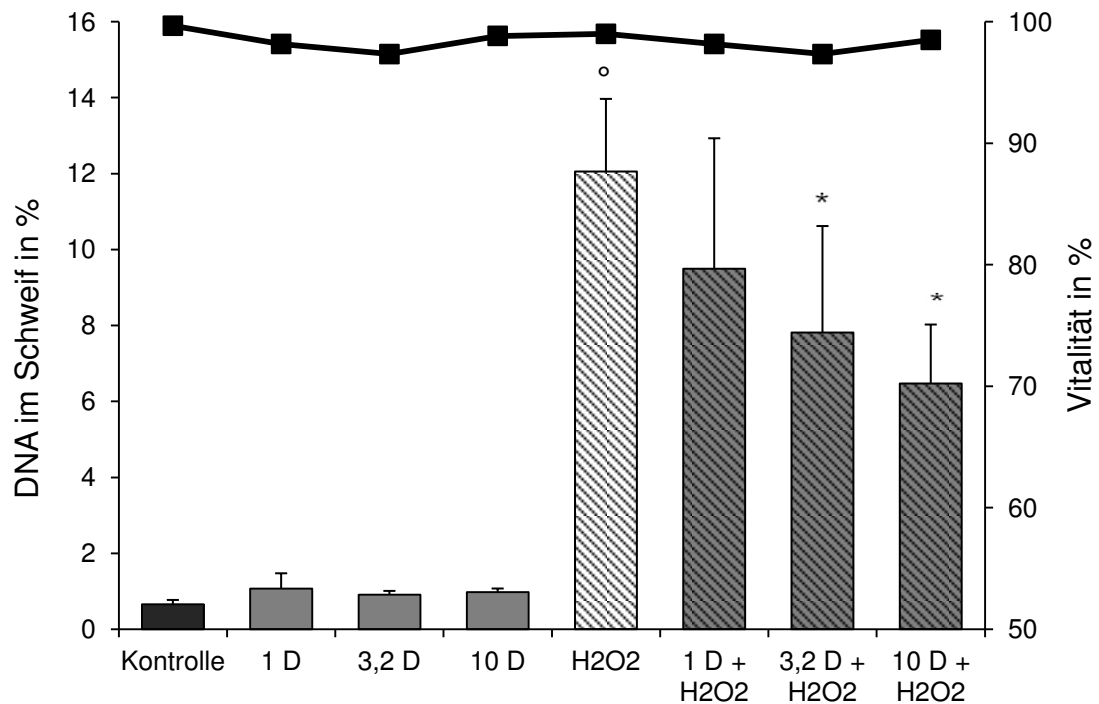


**Abbildung 15: Intakter Zellkern im Comet Assay (links) und beschädigter Zellkern mit DNA-Schweif nach genotoxischer Behandlung (rechts).**

#### Comet-Assay mit Delphinidin

Um die Auswirkung von Anthocyanidinen auf die genotoxische Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an Delphinidin getestet. Nach 20-minütiger Präinkubation mit Delphinidin zeigten die Zellen eine Abnahme der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten DNA-Schädigung (s. Abbildung 16). Die Abnahme korrelierte mit der Konzentration des Delphinidins. Der Unterschied zur Positivkontrolle mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  war bei Präinkubation mit 3,2  $\mu\text{M}$  Delphinidin ( $7,8 \% \pm 2,8$ ) und mit 10  $\mu\text{M}$  Delphinidin ( $6,5 \% \pm 1,6$ ) signifikant. Eine eigene genotoxische Wirkung zeigte die Behandlung mit Delphinidin in den Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  nicht.





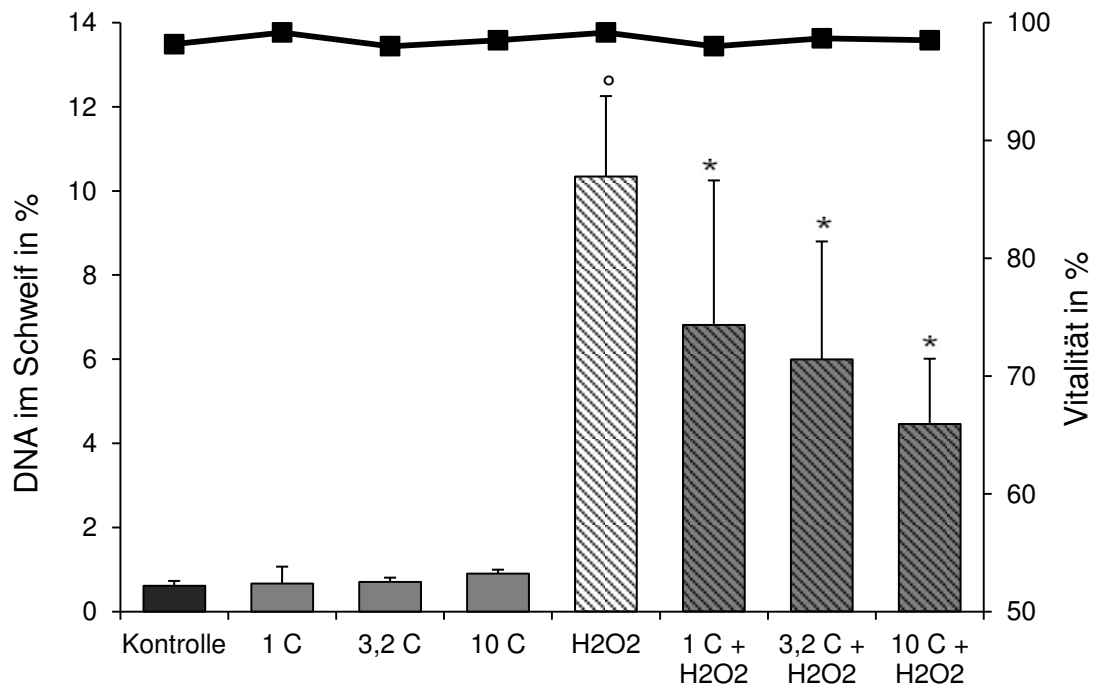
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	-				100	100	100	100
Delphinidin (D; μM)	-	1	3,2	10	-	1	3,2	10

**Abbildung 16: Abnahme eines Wasserstoffperoxid- induzierten DNA-Schadens durch Präinkubation mit Delphinidin im Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell.**

Balkendiagramm: DNA im Schweif in %, Punktdiagramm: Vitalität der Ansätze in %, Tabelle: verwendete Konzentrationen (μM). Dargestellt sind M + SD (N=3), ° p < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle), \* p < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test, vs. 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### Comet-Assay mit Cyanidin

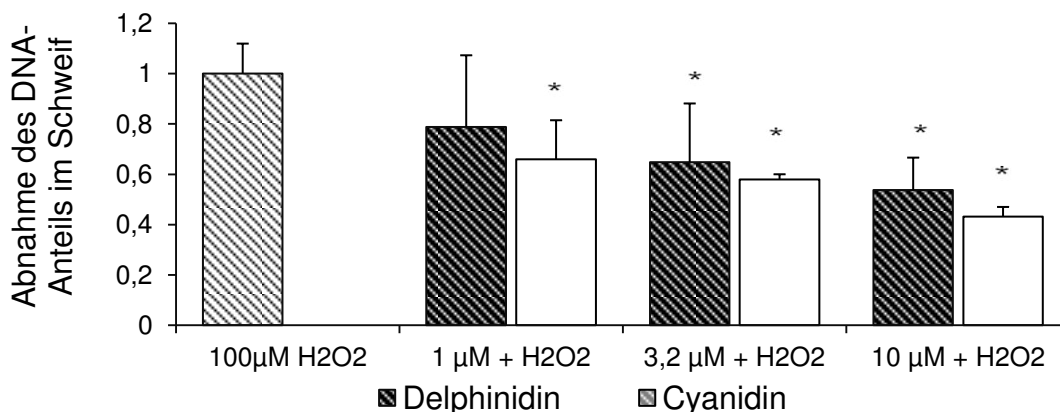
Im Comet-Assay konnte auch die protektive Wirkung von niedrig konzentriertem Cyanidin (1 μM, 3,2 μM, 10 μM) vor DNA-Schäden der HT-29-Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen werden. In allen drei Konzentrationen nahm der DNA-Schaden signifikant im Vergleich zur Positivkontrolle ab (s. Abbildung 17). Wie auch schon Delphinidin zeigte Cyanidin in den getesteten Konzentrationen keine genotoxische Wirkung. Im Vergleich beider Anthocyanidine zeigte Cyanidin im Gegensatz zu Delphinidin bereits bei 1 μM eine signifikante Abnahme des DNA-Schadens.



H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	-				100	100	100	100
Cyanidin (C; µM)	-	1	3,2	10	-	1	3,2	10

**Abbildung 17: Testung von Cyanidin im Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell. Abnahme des Wasserstoff-induzierten DNA-Schaden durch Präinkubation mit Cyanidin.** Balkendiagramm: DNA im Schweif in %, Punktdiagramm: Vitalität der Ansätze in %, Tabelle: verwendete Konzentrationen (µM). Dargestellt sind M + SD (N=3), ° p < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle), \* p < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test, vs. 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Ansonsten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Abnahme des DNA-Schadens zwischen beiden Anthocyanidinen (s. Abbildung 18).

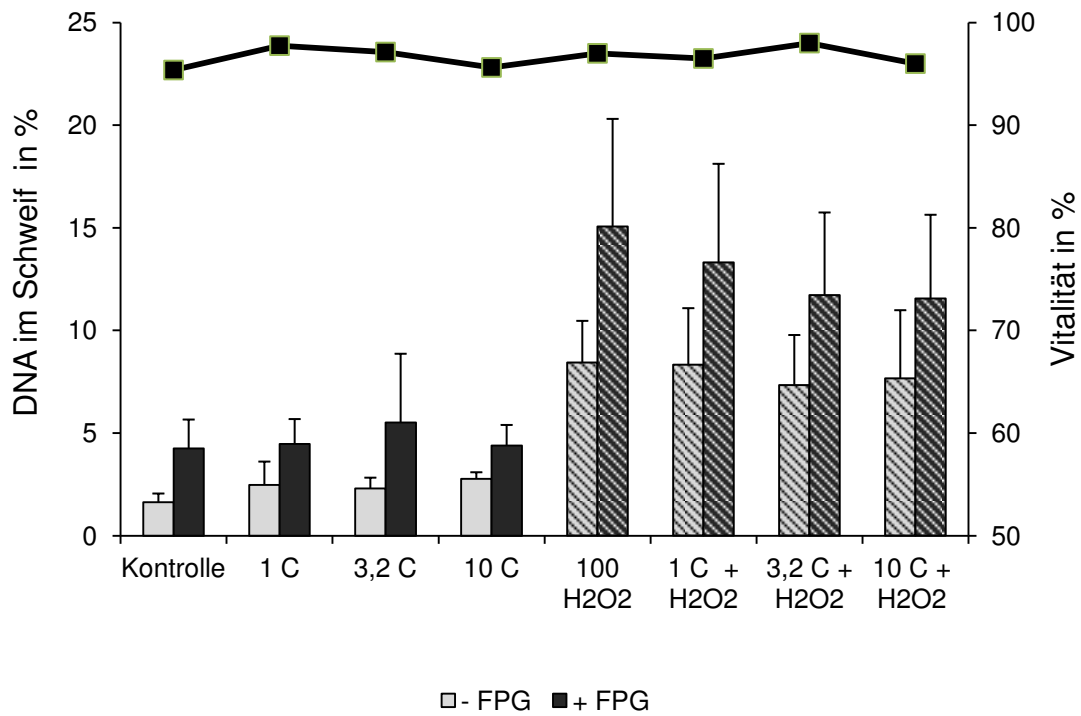


**Abbildung 18: Abnahme des DNA-Schadens im Comet-Assay mit HT-29-Zellen bei Behandlung mit Cyanidin und Delphinidin im Vergleich.**

Anteil der DNA im Schweif normiert auf die eigene Positivkontrolle, \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs.  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ), kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Anthocyanidinen.

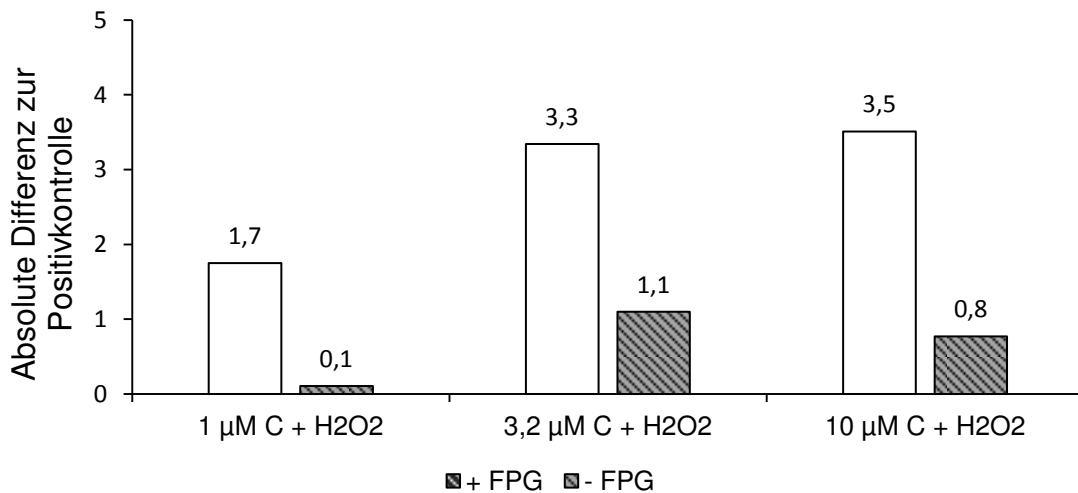
#### IV.1.2 FPG-Comet-Assay

Um die Aussage hinsichtlich des Schutzes vor oxidativem DNA-Schaden zu präzisieren, wurde der Comet-Assay durch eine Behandlung mit dem Reparaturenzym FPG erweitert. Pro Probe wurde ein Objektträger mit und einer ohne FPG-Enzym ausgewertet. Insgesamt wurden 5 unabhängige Versuche durchgeführt. Da in den vorangegangenen Comet-Assays Cyanidin auch in der niedrigsten Konzentration eine signifikante Abnahme bewirkte, wurde es für diesen Versuch verwendet. Die Präinkubationsdauer betrug 20 Minuten. Alle Ansätze zeigten nach der Behandlung mit FPG einen größeren Anteil an DNA im Schweif (s. Abbildung 19). In der Positivkontrolle mit  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  stieg der Anteil von  $8,4 \% \pm 2,0$  auf  $15,0 \% \pm 5,2$  ( $p = 0,076$ , Mann-Whitney-U-Test). Nach Präinkubation mit  $10 \mu\text{M Cyanidin}$  und Behandlung mit  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  nahm der DNA-Anteil im Schweif im FPG-Ansatz auf  $11,6 \% \pm 4,0$  ab, im normalen Comet-Assay nur auf  $7,6 \% \pm 3,3$ . Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 20 die absoluten Differenzen der Mittelwerte zur Positivkontrolle aufgetragen. Im Vergleich zeigt sich bei den Mittelwerten des FPG-Ansatzes tendenziell eine größere Abnahme des DNA-Schadens durch Präinkubation mit Cyanidin im Vergleich zu den normalen Comet-Assay Ansätzen.



H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	-				100	100	100	100
Cyanidin (C; µM)	-	1	3,2	10	-	1	3,2	10

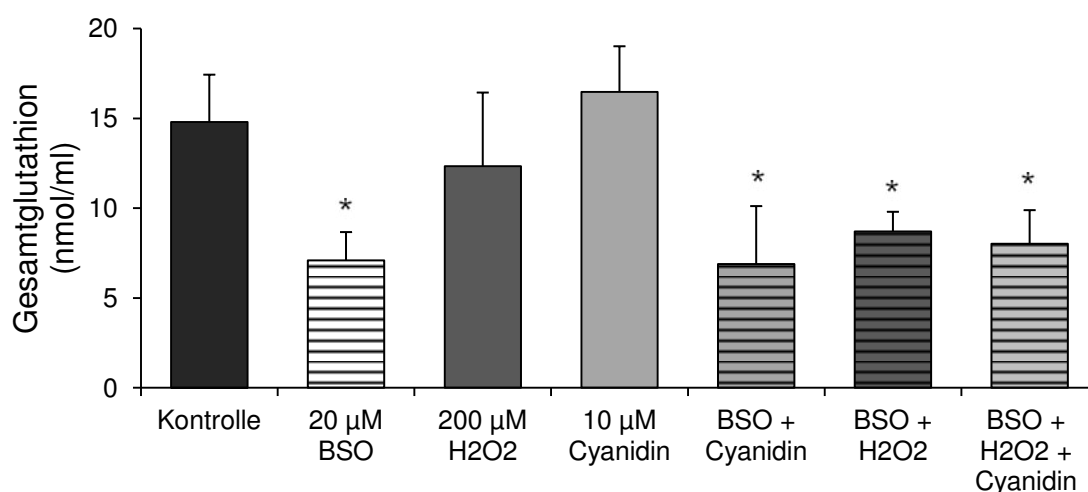
**Abbildung 19: Testung von Cyanidin im FPG-Comet-Assay im HT-29-Zellkulturmodell.**  
 Balkendiagramme: DNA im Schweif in %, Punktdiagramm: Vitalität der Ansätze in %, Tabelle: verwendete Konzentrationen Dargestellt sind M + SD (N=5).



**Abbildung 20: Vergleich der Abnahme des DNA-Schadens durch Präinkubation mit Cyanidin mit und ohne FPG.**  
 Dargestellt ist die absolute Differenz der Mittelwert zur jeweiligen Positivkontrolle.

### IV.1.3 Glutathion-Assay im HT-29-Modell

Um die Auswirkungen von Cyanidin auf den Glutathionhaushalt zu untersuchen, wurde der Glutathion-Recycling-Assay mit HT-29-Zellen durchgeführt. Einige Ansätze wurden zunächst 24 Stunden mit Buthioninsulfoximin (BSO), einem irreversiblen Inhibitor der Glutathionsynthese, behandelt, um die Zellen für oxidativen Stress zu sensibilisieren. Die Menge an Gesamtglutathion zeigte sich in diesen Ansätzen erwartungsgemäß signifikant geringer als in der Kontrolle (s. Abbildung 21). Sowohl die Abnahme der Gesamtglutathionmenge mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (12,3 nmol/ml  $\pm$  4,1) als auch die Zunahme mit 10  $\mu\text{M}$  Cyanidin (16,5 nmol/ml  $\pm$  2,5) war im Vergleich zur Kontrolle (14,8 nmol/ml  $\pm$  2,6) nicht signifikant. Auch das Unterbinden der Glutathionsynthese durch Präinkubation mit BSO führte zu keinem signifikanten Ergebnis.



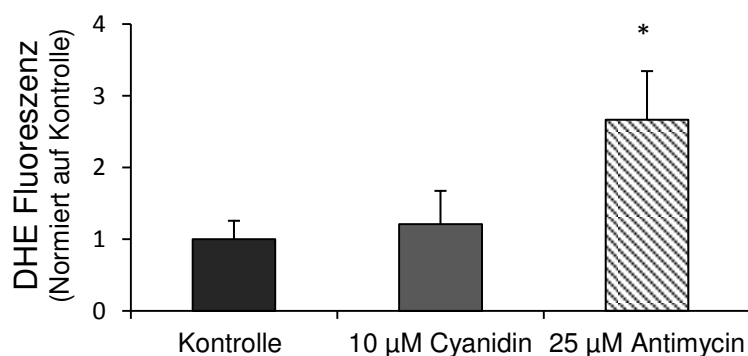
**Abbildung 21: Gemessene Menge an Gesamtglutathion im Glutathion-Recycling-Assay.**

Präinkubation der HT-29-Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  BSO (24 h), 10  $\mu\text{M}$  Cyanidin (50 min) und/oder 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 min). Dargestellt sind M + SD (N=4), \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle).

Nach Bindung der Thiolgruppen durch Zugabe von M2VP wurde zusätzlich das oxidierte Glutathion (GSSG) in den Proben gemessen. Die GSSG-Werte zeigten sich durchschnittlich in einer Größenordnung von 0,7 nmol/ml  $\pm$  0,4. Die einzelnen Werte zeigten eine große Streuung von nicht nachweisbar (< als Blank) bis 4,8 nmol/ml. Signifikante Unterschiede einzelner Behandlungen konnten nicht nachgewiesen werden. Alle Einzelwerte und die errechneten GSH-Werte sind im Anhang einsehbar.

#### IV.1.4 DHE-Assay

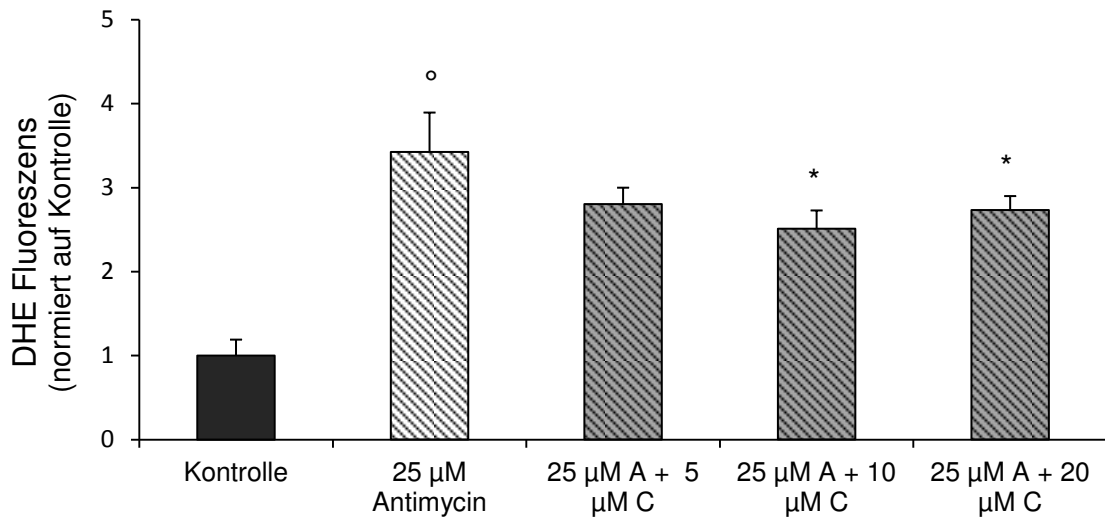
Im DHE-Assay wurde der Einfluss der Anthocyane auf die intrazelluläre ROS-Produktion getestet. In einem Vorversuch wurde zunächst eine eigene ROS-Stimulation durch 10  $\mu\text{M}$  Cyanidin ausgeschlossen (s. Abbildung 22). 25  $\mu\text{M}$  Antimycin A bewirkte hierbei eine signifikant höhere Fluoreszenz und damit ROS-Produktion als die Kontrolle und eignete sich somit als künftige Positivkontrolle.



**Abbildung 22: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell.**

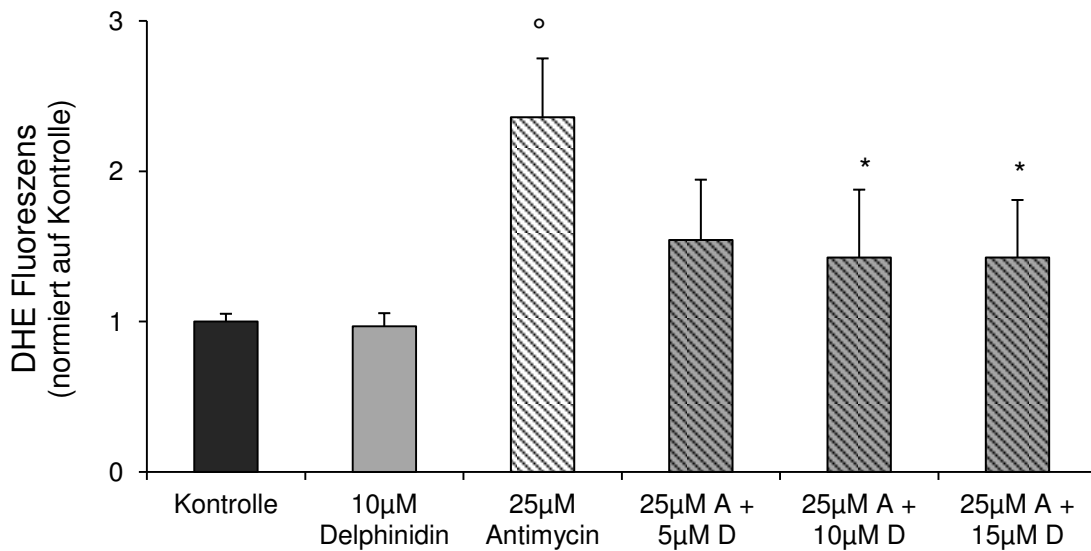
Dargestellt sind M + SD (N=5) normiert auf die Negativkontrolle. \*  $p < 0,01$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle).

Im Anschluss wurden 3 Konzentrationen Cyanidin getestet. Die Zellen wurden mit 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  des Anthocyanidins 20 Minuten präinkubiert und danach 30 Minuten mit Antimycin behandelt. Die Intensität der DHE-Fluoreszenz bezogen auf die Negativkontrolle nahm von 3,5 bei 25  $\mu\text{M}$  Antimycin auf 2,9, 2,6 und 2,8 ab (s. Abbildung 23). Durch Präinkubation durch 10 und 20  $\mu\text{M}$  Cyanidin kam es somit zu einer signifikanten Abnahme der ROS-Produktion. Da bei 20  $\mu\text{M}$  Cyanidin die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu 10  $\mu\text{M}$  einen leichten Anstieg zeigte, wurde für die Untersuchung des Delphinidins 5, 10 und 15  $\mu\text{M}$  Konzentrationen gewählt (s. Abbildung 24). Durch Präinkubation mit 10 bzw. 15  $\mu\text{M}$  Delphinidin nahm die Fluoreszenzintensität signifikant zur Positivkontrolle mit 25  $\mu\text{M}$  Antimycin ab. Tendenziell war die Abnahme der ROS-Produktion bei Delphinidin größer als bei Cyanidin. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Anthocyanidinen bestand nicht (Abbildung 25).



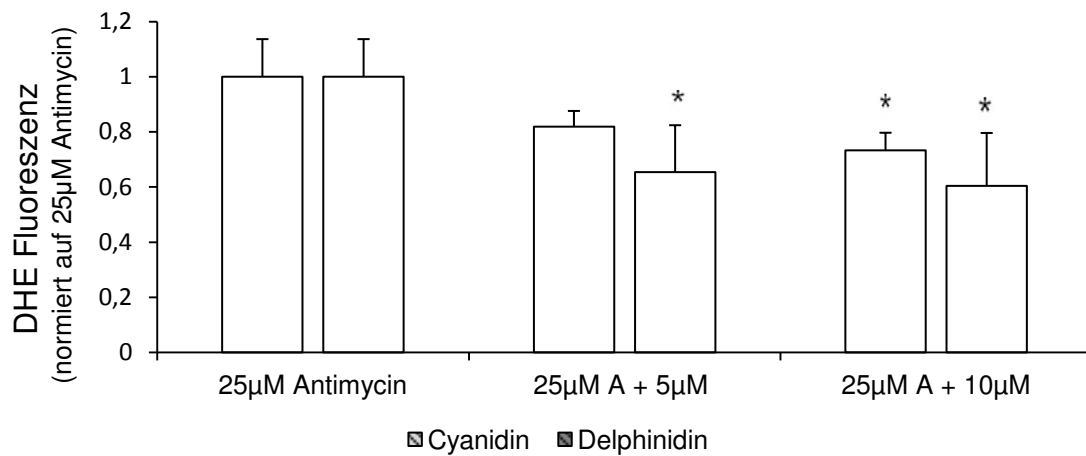
**Abbildung 23: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell.**

A = Antimycin A, C = Cyanidin. Dargestellt sind M + SD (N=3) normiert auf die Negativkontrolle, °  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test vs. Kontrolle), \*  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. 25 µM Antimycin).



**Abbildung 24: Relative DHE-Fluoreszenz als Indikator der intrazellulären ROS-Produktion im HT-29-Zellkulturmodell**

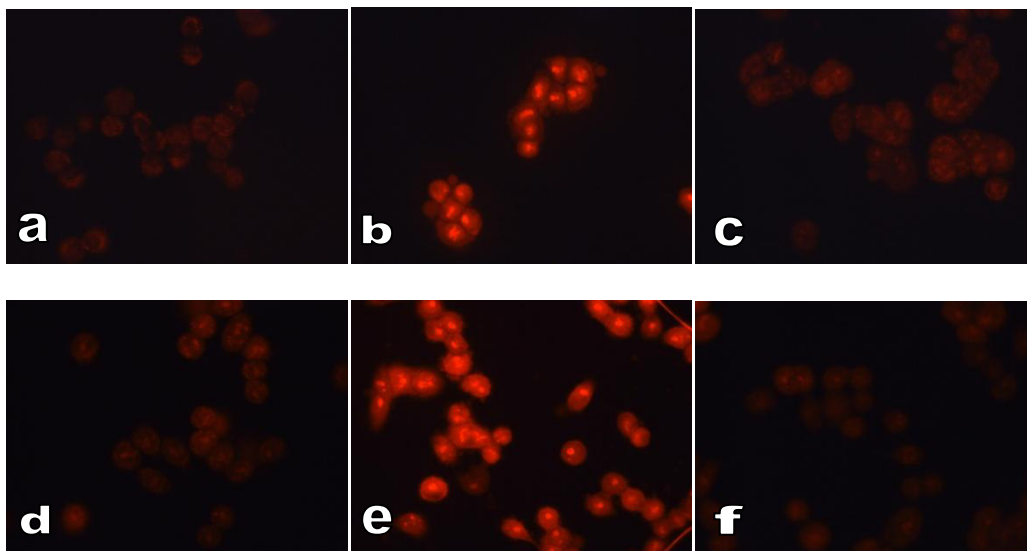
A = Antimycin A, D = Delphinidin. Dargestellt sind M + SD (N=3) normiert auf die Negativkontrolle, °  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. Kontrolle), \*  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test, vs. 25 µM Antimycin).



**Abbildung 25: Vergleich der relativen DHE-Fluoreszenz im HT-29-Zellkulturmodell nach Präinkubation mit Cyanidin bzw. Delphinidin.**

A = Antimycin A. Dargestellt sind M + SD bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle von 25 µM Antimycin A, \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test vs. 25 µM Antimycin). Kein signifikanter Unterschied zwischen Cyanidin und Delphinidin.

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 26 Originalfotographien aus den Zellversuchen.



**Abbildung 26: DHE-Fluoreszenz, Aufnahmen der HT-29-Zellen in 40-facher Vergrößerung jeweils aus einem zusammenhängenden Versuch.**

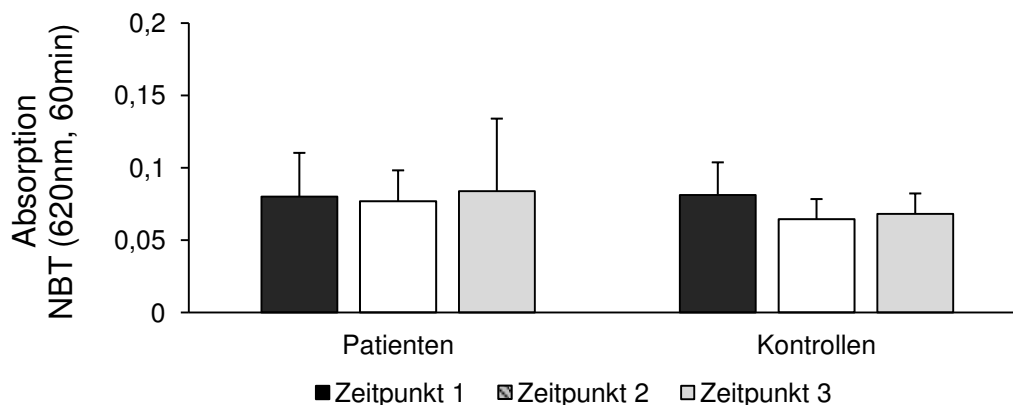
a = Kontrolle, b = 25 µM Antimycin, c = 25 µM Antimycin + 10 µM Cyanidin.  
d = Kontrolle, e = 25 µM Antimycin, f = 25 µM Antimycin + 10 µM Delphinidin.



## IV.2 Ergebnisse der Fibromyalgiestudie

### IV.2.1 NBT

Zur Einschätzung der ROS-Produktion der Patienten und Kontrollen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Studie (1 = nach 2 Wochen Einwaschphase, 2 = nach 4 Wochen Fruchtsaftphase, 3 = nach 4 Wochen Auswaschphase), wurden die Absorption der frischen Leukozyten nach Inkubation mit dem Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid photometrisch gemessen. Nach Ende der Einwaschphase unterschieden sich die Patientengruppe (Mittelwert =  $0,08 \pm 0,03$ ) und die Kontrollgruppe (Mittelwert =  $0,08 \pm 0,02$ ) im Durchschnitt nicht voneinander. Auch die Fruchtsafteinnahme brachte im Durchschnitt keine signifikante Veränderung der ROS-Produktion (s. Abbildung 27). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchsteilnehmer zeigten 10 der 19 Patienten und 7 der 10 Kontrollen eine Abnahme der Absorption nach Fruchtsafteinnahme.



**Abbildung 27: Absorption im NBT-Assay als Korrelat der ROS-Produktion in den frischen Leukozyten der Patienten- und Kontrollgruppe.**

Dargestellt sind M + SD zu den 3 Zeitpunkten der Studie (1 = Einwaschphase, 2 = Fruchtsaftphase, 3 = Auswaschphase).

Jede Probe wurde in 6 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gefüllt. Jeweils 3 dieser Vertiefungen wurden mit Insulin als Induktor der ROS-Produktion behandelt. Die mit Insulin behandelten Proben zeigten alle eine signifikant höhere Absorption als die unbehandelten Proben (Mann-Whitney-U-Test  $p \leq 0,001$ ). Insulin bewirkte im Durchschnitt einen gleich großen Anstieg der ROS-Produktion in beiden Gruppen. Tabelle 13 zeigt die Mittelwerte und

Standardabweichungen der behandelten und unbehandelten Proben. Die Rohdaten der Einzelpersonen können dem Anhang entnommen werden.

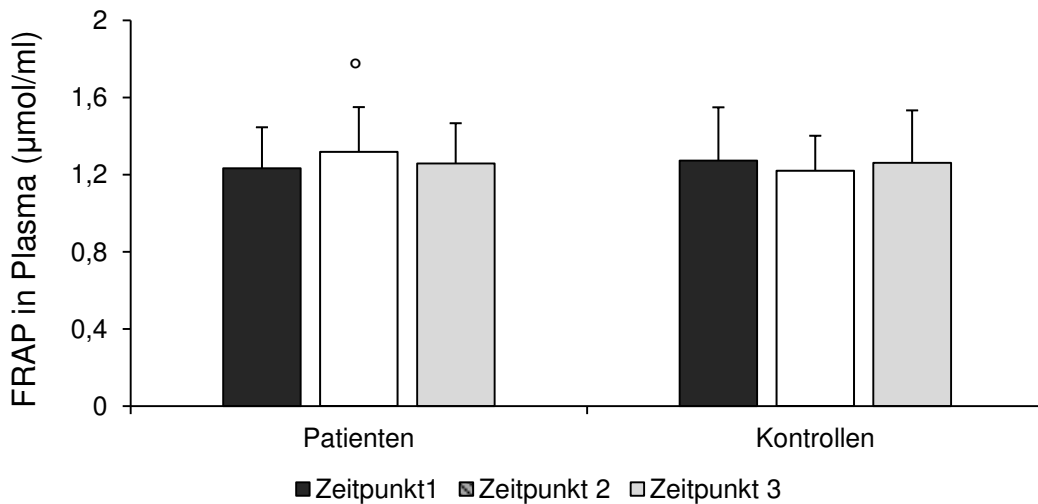
**Tabelle 13: NBT-Assay – Absorption nach 60 Minuten Inkubation bei 620 nm.**

Dargestellt sind M + SD der Patientengruppe (N=19) und der Kontrollgruppe (N=10) jeweils zu den 3 Zeitpunkten der Studie. Zusätzlich angefügt sind die Werte nach Behandlung mit 10 µM Insulin.

NBT	Patienten (N = 19)		Kontrollen (N = 10)	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Zeitpunkt 1 = Einwaschphase	0,0801	± 0,03	0,0813	± 0,02
<i>mit Insulin</i>	0,1965	± 0,09	0,1580	± 0,07
Zeitpunkt 2 = Fruchtsaftphase	0,0768	± 0,02	0,0645	± 0,01
<i>mit Insulin</i>	0,1759	± 0,07	0,2627	± 0,11
Zeitpunkt 3 = Auswaschphase	0,0838	± 0,05	0,0683	± 0,01
<i>mit Insulin</i>	0,1995	± 0,09	0,1578	± 0,04

#### IV.2.2 FRAP-Assay

Zur Messung der antioxidativen Kapazität wurde die Eisen-Reduktionsfähigkeit (FRAP= Ferric Reducing Ability of Plasma) im Plasma untersucht. Jede Probe wurde in 3 unabhängigen Versuchen gemessen und ein Mittelwert daraus gebildet. Abbildung 28 zeigt die Mittelwerte der Patienten- und Kontrollgruppen zu den drei verschiedenen Studienzeitpunkten.



**Abbildung 28: Messung der antioxidativen Kapazität im Plasma mit dem FRAP-Assay.** Dargestellt sind M + SD der Patientengruppe (N=19) und der Kontrollgruppe (N=10) jeweils zu den 3 Zeitpunkten der Studie. ° p=0,03 (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 vs. Zeitpunkt 2).

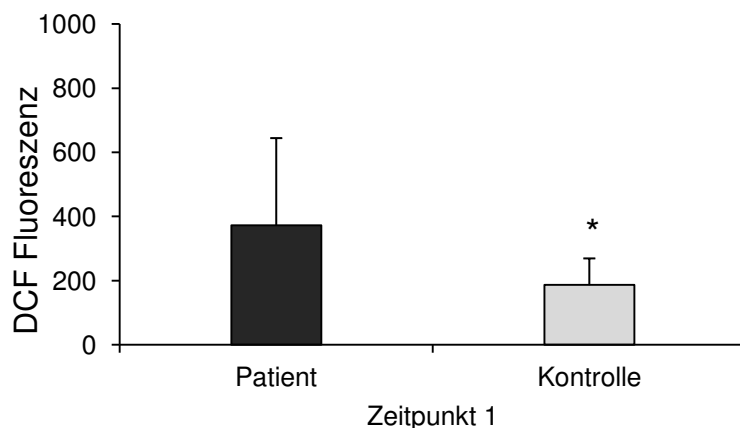
Nach der Einwaschphase zeigten beide Gruppen beinahe die gleiche antioxidative Kapazität. Die Fruchtsaftaufnahme bewirkte im Durchschnitt bei beiden Gruppen nur geringe Veränderungen des FRAPs. Bei den Patienten erhöhte sich die antioxidative Kapazität nach Einnahme leicht, aber signifikant (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 gegenüber Zeitpunkt 2, p=0,03). Bei Betrachtung der einzelnen Versuchspersonen führte die Fruchtsaftaufnahme bei 13 von 19 Patienten zu einer geringen Steigerung der antioxidativen Kapazität. In der Kontrollgruppe lediglich bei 4 von 10. Die genauen Mittelwerte können Tabelle 14, sämtliche Rohdaten dem Anhang entnommen werden.

**Tabelle 14: FRAP-Assay. Mittelwerte in µmol/ml und Standardabweichungen.**

FRAP (mM)	Patienten (N = 19)		Kontrollen (N = 10)	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Zeitpunkt 1 = Eiwaschphase	1,2336	± 0,21	1,2730	± 0,28
Zeitpunkt 2 = Fruchtsaftphase	1,3171	± 0,23	1,2191	± 0,18
Zeitpunkt 3 = Auswaschphase	1,2574	± 0,21	1,2604	± 0,27

### IV.2.3 Durchflusszytometrie mit DCF

Durchflusszytometrisch wurde das oxidative Stresslevel mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffes Dichlorofluorescein gemessen. Nach der Einwaschphase zeigte sich ein signifikant geringeres Stresslevel in der Kontrollgruppe (Mittelwert =  $186,3 \pm 83$ ) im Vergleich zum Patientenkollektiv (Mittelwert =  $373,0 \pm 272$ ) (s. Abbildung 29). Nach 4-wöchiger Fruchtsafteinnahme erbrachten die Mittelwerte des 2. Zeitpunktes keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Zeitpunkt 1. Die interindividuellen Unterschiede führten zu großen Standardabweichungen. Tendenziell blieb das oxidative Stresslevel im Patientenkollektiv nach Fruchtsafteinnahme auf gleichem Niveau, wohingegen die Kontrollgruppe eher einen Anstieg des oxidativen Stresses in der DCF-Fluoreszenz zeigte. Die Einzelwerte des Versuches können dem Anhang entnommen werden.



**Abbildung 29: FACS-Messung des oxidativen Stresslevels mit DCF Farbstoff.**

Dargestellt sind M + SD der Fluoreszenz in Patientengruppe (N=19) und Kontrollgruppe (N=8) nach der Einwaschphase. Signifikant geringere DCF-Fluoreszenz der Kontrollgruppe. \*  $p=0,029$  (Mann-Whitney-U-Test).

### IV.2.4 Glutathion-Assay aus Erythrozyten

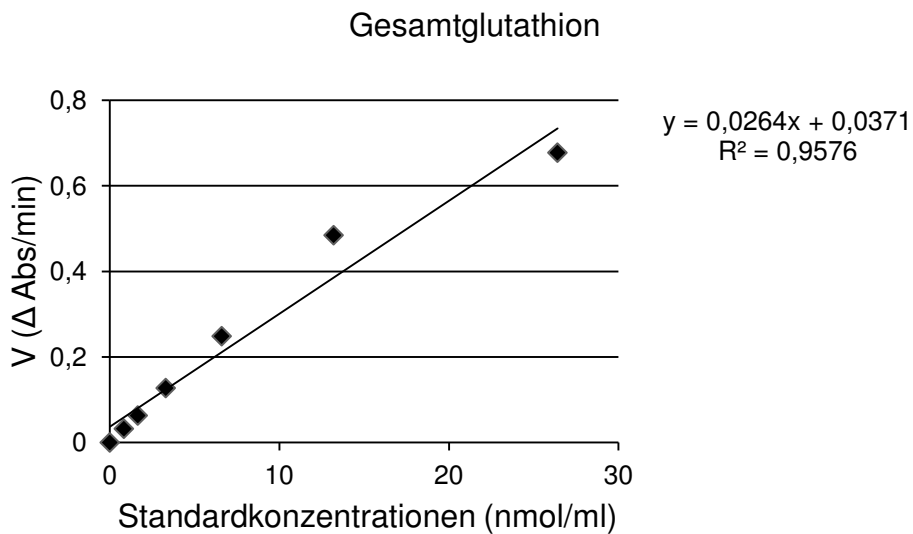
#### Ergebnisse der Vorversuche

Der Glutathion-Recycling-Assay nach Tietze erfordert eine zügige und gleichzeitig vorsichtige Aufarbeitung, da die Bestimmung des oxidierten Glutathions leicht durch Oxidationsprozesse während der Durchführung beeinflusst wird. Bis die Thiolgruppen des GSH irreversibel gebunden sind und

somit das reduzierte Glutathion aus dem Reaktionskreislauf entfernt ist, muss auf ein schnelles Arbeiten und lichtgeschützte und gekühlte Proben geachtet werden. Vor Messung der eigentlichen Proben wurde mit Vorversuchen und Literaturrecherche folgende Abänderungen zum Nature Protocol herausgearbeitet, um artifiziell veränderte Werte zu verringern: Unter den in der Literatur vorgeschlagenen Thiolgruppenbindern NEM, 2-Vinylpyridin und M2VP, verhinderte letzteres am effektivsten zusätzliche Oxidationen während der Versuchsdurchführung. Nach Zellyse mit Metaphosphorsäure wurde außerdem die eingeschränkte Aktivität der Glutathionreduktase bei niedrigem pH-Wert durch einen zusätzlichen Verdünnungsschritt mit KPE-Puffer umgangen. Die Standardkurven wurden den entsprechenden Größenordnungen angepasst. Der Glutathionassay für Erythrozyten wurde im Labor etabliert und eine SOP erstellt.

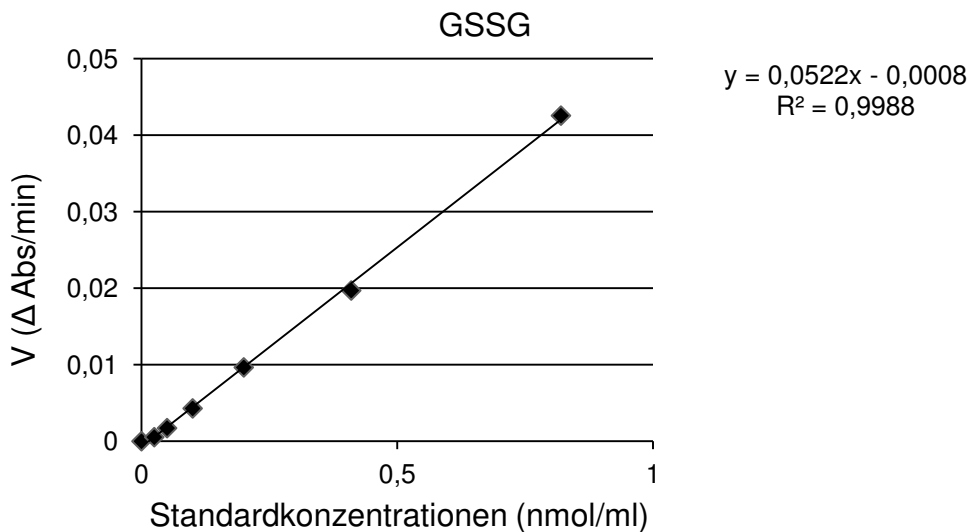
### Standardkurven

Die zur Berechnung der Glutathionwerte verwendeten Standardkurven wurden für jede Messung generiert. Insgesamt zeigten sich die Reaktionsgeschwindigkeiten der Standardkonzentrationen sehr nahe an der linearen Trendlinie. Der Bestimmungskoeffizient  $R^2$  lag durchschnittlich bei den  $GSH_{total}$ -Standardkurven bei  $0,996 \pm 0,008$  und bei den GSSG-Standardkurven bei  $0,988 \pm 0,021$ . Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die Mittelwerte der Reaktionsgeschwindigkeiten aller Standardreihen aufgetragen gegen die Standardkonzentrationen. Die Methode ermöglicht somit die Erstellungen von exakten Standardkurven, deren Trendlinien verlässlich für die Berechnung der Proben herangezogen werden kann.



**Abbildung 30: Standardkurve zur Berechnung des Gesamtglutathions.**

Dargestellt sind die Mittelwerten der Reaktionsgeschwindigkeiten aller Standardreihen (N=11) in Absorptionsdifferenz/min und die linearen Trendlinie mit dem Bestimmungskoeffizienten  $R^2 = 0,9576$ .



**Abbildung 31: Standardkurve zur Berechnung des oxidierten Glutathions.**

Dargestellt sind die Mittelwerten der Reaktionsgeschwindigkeiten aller Standardreihen (N=11) in Absorptionsdifferenz/min und die linearen Trendlinie mit dem Bestimmungskoeffizienten  $R^2 = 0,9988$ .

### Größenordnung der Glutathionwerte

Insgesamt wurden 85 Einzelproben gemessen. Die in den Erythrozyten gemessenen Werte an reduziertem Glutathion lagen durchschnittlich bei 1426

nmol/ml. Der Mittelwert aller Werte des oxidierten Glutathions lag bei 28,5 nmol/ml. Tabelle 15 bietet eine Übersicht aller erfassten Werte. Der Anteil an oxidiertem Glutathion am Gesamtglutathion betrug demnach 1,9 %.

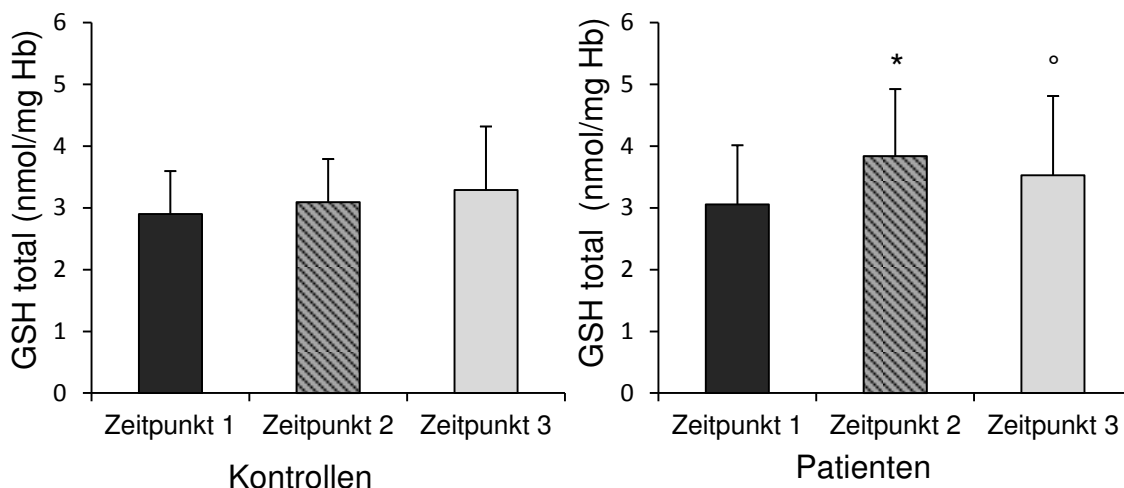
**Tabelle 15: Größenordnung aller ermittelter Glutathionwerte.**

Dargestellt sind M + SD, Standardabweichung, Maximum- und Minimumwert in nmol/ml.

<b>N = 85</b>	<b>Mittelwerte</b>	<b>SD</b>	<b>MAX</b>	<b>MIN</b>
<b>GSH<sub>total</sub></b>	1483,0	± 340,6	2463,7	670,2
<b>GSH</b>	1426,0	± 338,5	2386,7	583,3
<b>GSSG</b>	28,5	± 16,5	83,0	1,5

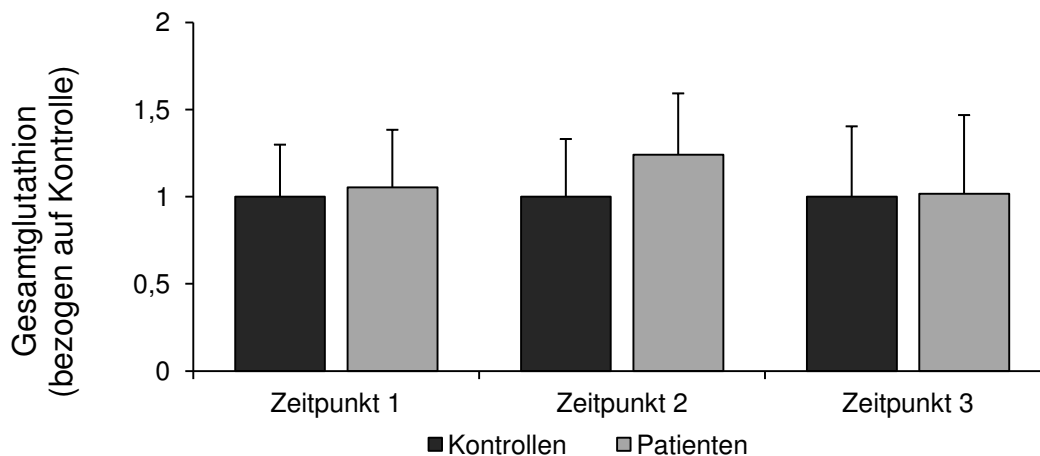
### Gesamtglutathion

Das Gesamtglutathion betrug zu Beginn der Studie im Durchschnitt  $3,06 \pm 0,96$  nmol/mgHb im Patientenkollektiv und  $2,90 \pm 0,69$  nmol/mgHb in der Kontrollgruppe. Die Fruchtsafteinnahme hatte einen signifikanten Einfluss im Patientenkollektiv auf die Gesamtglutathionwerte (Wilcoxon-test, Zeitpunkt 1 gegenüber 2,  $p=0,006$ ; s. Abbildung 32): Bei den Patienten stiegen nach Fruchtsafteinnahme die GSH<sub>total</sub>-Mittelwerte auf  $3,83 \pm 1,09$  nmol/mgHb. Bei Betrachtung der einzelnen Probanden zeigten 14 von 19 Patienten einen Anstieg des GSH<sub>total</sub> nach Fruchtsafteinnahme (Zeitpunkt 1 GSH<sub>total</sub> < Zeitpunkt 2 GSH<sub>total</sub>). In der Kontrollgruppe stiegen die Werte bei 7 von 10 Personen zum Zeitpunkt 2 an. In der Kontrollgruppe unterschieden sich die Gesamtglutathionwerte nicht signifikant voneinander und auch der Vergleich beider Gruppen (s. Abbildung 33) zeigte keine relevanten Unterschiede.



**Abbildung 32: Gesamtglutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.**

Dargestellt sind M (nmol/mg Hb) + SD, \* p=0,006 (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 vs. Zeitpunkt 2), ° p=0,043 (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 vs. Zeitpunkt 3).



**Abbildung 33: Vergleich der Gesamtglutathionmenge zu allen 3 Zeitpunkten in Kontroll- und Patientengruppe.**

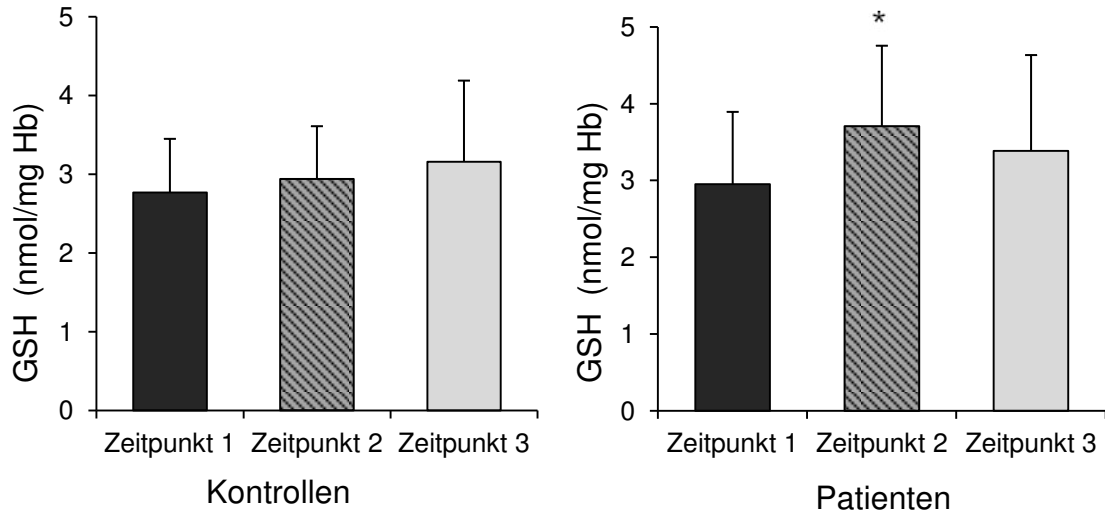
Dargestellt sind M + SD bezogen auf den Mittelwert der Kontrollgruppe.

### Reduziertes Glutathion

Das reduzierte Glutathion wurde aus den gemessenen Werten des Gesamtglutathions und des oxidierten Glutathions berechnet. In der Patientengruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied der GSH-Werte vor und nach Fruchtsaftaufnahme (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 gegenüber Zeitpunkt



2,  $p=0,008$ , s. Abbildung 34). Der Mittelwert stieg in dieser Gruppe von  $2,95 \pm 0,94$  nmol/mgHb auf  $3,71 \pm 1,05$  nmol/mgHb.

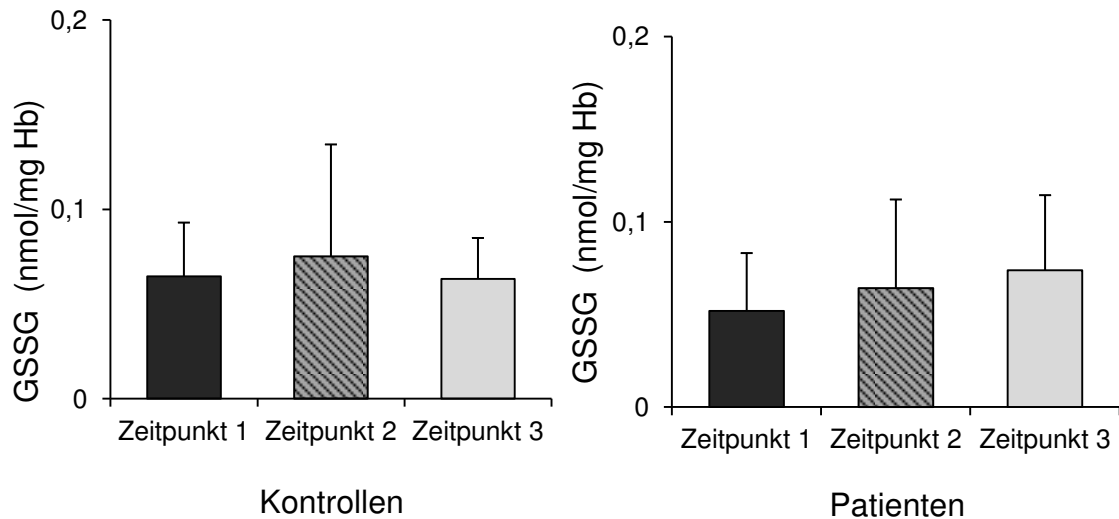


**Abbildung 34: Reduziertes Glutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.**

Dargestellt sind M (nmol/mg Hb) + SD, \*  $p=0,008$  (Wilcoxon-Test, Zeitpunkt 1 vs. Zeitpunkt 2).

#### Oxidiertes Glutathion

Die Messung des oxidierten Glutathions ergab zu allen drei Zeitpunkten sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe beinahe konstante Werte. Die Mittelwerte lagen bei den Patienten bei 0,052 / 0,064 und 0,073 nmol/mgHb. und in der Kontrollgruppe bei 0,064 / 0,075 und 0,063 nmol/mgHb (s. Abbildung 35).

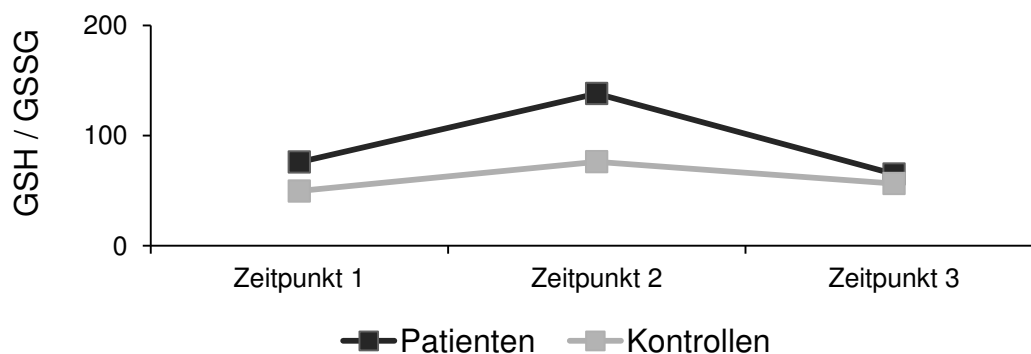


**Abbildung 35: Oxidiertes Glutathion in Kontroll- und Patientengruppe zu den 3 Studienzeitpunkten.**

Dargestellt sind M (nmol/mg Hb) + SD.

### GSH/GSSG-Verhältnis

Der Quotient aus reduziertem und oxidiertem Glutathion gilt als oxidativer Stressparameter. Je größer der Wert ist, desto niedriger ist das Stresslevel. Abbildung 36 zeigt die Quotienten der Mittelwerte der Patienten- und Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 1 lag der Quotient in der Patientengruppe leicht über der Kontrollgruppe. Die Unterschiede lagen allerdings alle unterhalb des Signifikanzniveaus. In beiden Gruppen nahm das Stresslevel tendenziell nach Fruchtsafteinnahme ab und dann nach der Auswaschphase tendenziell wieder zu. Interessant ist der deutlichere Anstieg nach Fruchtsafteinnahme in der Patientengruppe (von 76 zum Zeitpunkt 1 auf 138 zum Zeitpunkt 2) im Vergleich zur Kontrollgruppe (von 49 zum Zeitpunkt 1 auf 76 zum Zeitpunkt 2).



**Abbildung 36: Verhältnis von GSH zu GSSG als oxidativer Stressparameter.**

Dargestellt ist der Quotient aus den Mittelwerten des reduzierten und oxidierten Glutathions.

#### IV.2.5 Zusammenfassung der eigenen Studienergebnisse und Messungen der Projektpartner

Abschließend zeigen Tabelle 16 und Tabelle 17 eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Fibromyalgiestudie. Zur Vervollständigung sind hier auch die von den Studienpartnern erhobenen Daten mit aufgelistet. Alle laborchemischen Messungen untersuchten oxidative Stressparameter. Hierzu zählen die selbst erhobenen Daten (ROS- und RNS-Produktion (NBT, DCF), Antioxidative Kapazität (FRAP), Glutathion), sowie die Daten von Frau Dr. Bankoglu aus der gleichen Arbeitsgruppe (DNA- und RNA-Oxidation (8-oxo-G, 8-oxo-Guo), sowie Produkte der Lipidperoxidation (Malondialdehyd)). In der Patientengruppe zeigte sich nach 4-wöchiger Fruchtsafteinnahme ein Anstieg der antioxidativen Kapazität, des Gesamtglutathions und des reduzierten Glutathions. Außerdem konnte man interessanterweise nach 4-wöchiger Auswaschphase ein signifikant erniedrigtes Malondialdehyd, ein Marker der Lipidperoxidation, im 24h-Urin messen. Die Kontrollgruppe zeigte in keinem der erfassten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den 3 Studienzeitpunkten. Zu Studienbeginn lag die DCF-Fluoreszenz als ROS-Parameter in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Patientengruppe. Außerdem zeigten die Patientengruppe zu allen 3 Zeitpunkten signifikant höhere 8-oxo-7,8-dihydroguanosin-Werte, ein Produkt der RNA-Oxidation [persönliche Mitteilung durch Frau Dr. E. Bankoglu, bisher unveröffentlichte Daten].

**Tabelle 16: Zusammenfassung der laborchemischen Parameter der Fibromyalgie-Studie.** Darstellung der Messmethode, der Patientendaten zu allen 3 Studienzeitpunkten (P1,P2,P3), der Daten der Kontrollgruppe (K1,K2,K3) und des Vergleichs beider Gruppen. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben. 8-oxo-G = 8-oxo-7,8-dihydroguanin; 8-oxo-Guo = 8-oxo-7,8-dihydroguanin; TBARS= Thiobarbituric acid reactive substances.

\* Daten erhoben durch Frau Dr. E. Bangkoglu, Institut für Toxikologie Universität Würzburg

	Messmethode	Patienten	Kontrollen	Vergleich
<b>Laborchemische Parameter</b>				
ROS-Produktion	NBT Assay (Leukozyten)	P1=P2=P3	K1=K2=K3	P=K
	DCF FACS (Leukozyten)	P1=P2=P3	K1=K2=K3	<b>P&gt;K (1)</b>
Antioxidative Kapazität	FRAP Assay (Plasma)	<b>P1&lt;P2=P3</b>	K1=K2=K3	P=K
Glutathion	Recycling Assay (Erythrozyten)	GSH <sub>total</sub> <b>P1&lt;P2=P3</b>	GSH <sub>total</sub> K1=K2=K3	P=K
		GSH <b>P1&lt;P2=P3</b>	GSH K1=K2=K3	P=K
		GSH:GSSG P1=P2=P3	GSH:GSSG K1=K2=K3	P=K
		GSSG P1=P2=P3	GSSG K1=K2=K3	P=K
8-oxod-G * (DNA-Oxidation)	HPLC (24h-Urin)	P1=P2=P3	K1=K2=K3	P=K
8-oxod-Guo * (RNA-Oxidation)	HPLC (24h-Urin)	P1=P2=P3	K1=K2=K3	<b>P&gt;K (1,2,3)</b>
Malondialdehyd * (Lipidperoxidation)	TBARS Assay (24h-Urin)	<b>P1=P2&gt;P3</b>	K1=K2=K3	P=K

Die klinischen Parameter wurden durch Fragebögen zu den einzelnen Studienzeitpunkten durch die Schmerzambulanz der Uniklinik Würzburg erhoben. Obwohl keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs vorlagen, profitierten doch einzelne Versuchsteilnehmer und gaben eine Reduktion (um mind. 2 Punkte der jeweiligen Skala) der Symptome an.

**Tabelle 17: Klinische Parameter der Fibromyalgiepatienten.**

P1 = Patientenparameter vor Fruchtsaftaufnahme, P2 = Patientenparameter nach Fruchtsaftaufnahme. Unterschiedliche Gesamtzahl an Patienten je nach Vollständigkeit der Fragebögen. Bsp: 6/14: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ ) = 6 von 14 Patienten gaben eine Verbesserung um mind. 2 Punkte der NRS-Schmerzskala zum Zeitpunkt 2 an. NRS = Numerische Rating Skala; GSRS-IBS = Gastrointestinal Symptom Rating Scale, modifiziert für Patienten mit Reizdarmsyndrom.

°Erhoben durch Schmerzambulanz Uniklinik Würzburg (Dr. Brede, Dr. Schenk, Samwer).

<b>Klinische Parameter °</b>		
Schmerz	Schmerzskala (NRS)	6/14: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )
Chronisches Fatigue-Syndrom	CFS-Skala nach Bell	1/19: P1>P2 ( $\Delta \geq 20$ )
Reizdarmsyndrom	GSRS-IBS	Schmerz: 1/17: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )
		Obstipation: 4/17: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )
		Diarrhoe: 1/17: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )
		Völlegefühl: 3/17: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )
		Frühe Sättigung: 4/17: P1>P2 ( $\Delta \geq 2$ )



## V Diskussion

### V.1 Zellversuche am HT-29-Modell

Am humanen HT-29-Modell sollten Delphinidin und Cyanidin, als häufigste Vertreter der Anthocyanidine, auf ihre antioxidative Wirkung untersucht werden. Dabei wurden die Reinformen beider Substanzen in Konzentrationen von 1-25  $\mu\text{M}$  getestet und miteinander verglichen.

#### V.1.1 Oxidative DNA-Schäden

HT-29-Zellen zeigten nach Präinkubation sowohl mit Delphinidin als auch mit Cyanidin eine Abnahme des durch 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten DNA-Schadens in der Einzelzellgelelektrophorese. Je höher die eingesetzte Anthocyanidinkonzentration (1, 3,2, 10  $\mu\text{M}$ ) war, desto größer fiel die protektive Wirkung aus. Delphinidin bewirkte eine signifikante Abnahme des DNA-Schadens ab 3,2  $\mu\text{M}$  Endkonzentration, Cyanidin sogar schon ab 1  $\mu\text{M}$ . Im Comet-Assay lassen sich DNA-Schäden (Doppel-, Einzelstrangbrüche, abasische Stellen) quantifizieren. Um genauer zu untersuchen, ob Anthocyanidine gegen oxidativ entstandenen DNA-Schaden schützen, wurde der Comet-Assay mit dem FPG-Enzym erweitert. Die Abnahme des DNA-Schadens nach Präinkubation mit Cyanidin (1, 3,2, 10  $\mu\text{M}$ ) war größer im FPG-Ansatz als im unveränderten Ansatz. Das ist ein Hinweis darauf, dass Cyanidin die DNA-Basen vor  $\text{H}_2\text{O}_2$  bedingter Oxidation schützen kann. Lazzé et al. testete sowohl Cyanidin und Delphinidin als auch deren glykosylierte Verbindungen im Comet-Assay in Kombination mit dem starken Oxidationsmittel Tert-Butylhydroperoxid in Hepatom- und glatten Muskelzellen der Ratte [159]. Dabei nahm der DNA-Schaden in beiden Zelllinien durch die Präinkubation mit Anthocyanidinen deutlich ab. Allerdings wurden in dieser Versuchsreihe höhere Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  Anthocyan bzw. Anthocyanidin verwendet. Im Vergleich zu den glykosylierten Formen boten die Reinformen Cyanidin und Delphinidin einen besseren Schutz. Im FPG und Endonuklease II Comet-Assay konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit trotz höherer Anthocyanidinkonzentration kein Schutz vor Oxidation der DNA-Basen nachgewiesen werden. Schantz et al.

untersuchten mit der gleichen Methode die Auswirkung von anthocyanreichem Heidelbeerextrakt auf Caco-2- und HT-29-Zellen [160]. In Caco-2-Zellen zeigte sich dabei ein signifikanter Schutz bei 5 g/ml Extrakt (24 h Inkubation + FPG Enzym). In einer späteren Studie zeigte sich ein Heidelbeerextrakt in beiden Zelllinien protektiv gegen oxidativen DNA-Schaden. Allerdings wurde bei der Fraktionierung des Extraktes deutlich, dass vor allem die phenolcarbonsäure-reiche Fraktion protektiv wirkte [161].

Hinsichtlich der verwendeten Konzentrationen in dieser Arbeit sind die Untersuchungen von Wilms et al. vergleichbar [162]. Quercetin, ein weiteres Flavonoid und Oxidationsprodukt von Cyanidin, führte dosisabhängig zu einer Abnahme des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schadens in humanen Lymphozyten. Dabei führten Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM und 100 µM zu einer signifikanten Reduktion. Interessanterweise unterschied sich dabei der Effekt von 100 µM nicht mehr signifikant von dem Effekt von 10 µM. Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass die Wirkung von 10 µM Quercetin nahe dem maximal möglichen Schutz liegen muss. In höherer Konzentration wird auch eine mögliche prooxidative Wirkung der Anthocyanidine diskutiert. Beispielsweise zeigte Malvidin in einer Konzentration von 50 µM im Comet-Assay einen Anstieg des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schadens in HT-29-Zellen [163]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen bis 10 µM ergab sich kein Hinweis auf eine prooxidative Wirkung. Die Ansätze, die ausschließlich allein mit dem Anthocyanidinen behandelt worden waren, wiesen keinen höheren DNA-Schaden als die Negativkontrolle auf.

### V.1.2 Glutathion

Cyanidin wurde alleine und in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und BSO im Glutathion-Recycling-Assay getestet. Die Gesamtglutathionmenge stieg zwar tendenziell in den HT-29-Zellen nach Behandlung mit 10 µM Cyanidin an und sank nach vorangegangener H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung ab, allerdings waren bereits diese Unterschiede nicht signifikant. Eine Kombination beider Behandlungen ließ auch keine neuen Schlüsse zu. Desweiteren zeigten auch die Sensibilisierung mit BSO bzw. die Betrachtung der GSSG-Werte und GSH/GSSG-Verhältnisse keine signifikanten Unterschiede. In der Literatur finden sich kontroverse



Hinweise zum Einfluss von Anthocyanidinen auf den Glutathionhaushalt in vitro. Untersuchungen mit reinen Anthocyanidinen zeigten auch in höheren Konzentrationen keinen Effekt auf den Glutathionhaushalt: In Hepatom- und glatten Muskelzellen der Ratte bewirkte eine 2-stündige Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cyanidin bzw. Delphinidin keinen protektiven Effekt auf die Abnahme des zellulären Redox-Status (GSH/GSSG) durch Tert-Butylhydroperoxid [159]. In einer neueren Studie hingegen konnten Lin et al. in einem C6-Gliazellen-Modell für hypoxischen Hirnschaden einen Anstieg der Glutathionkonzentration nach 24-stündiger Inkubation mit Anthocyanidinen im photometrischen Assay beobachten [164]. Unter normalen Bedingungen zeigten Malvidin, Pelargonidin und Peonidin (Konzentration: 25 mg/l) eine signifikante Zunahme des Gesamtglutathions. Unter hypoxischen Bedingungen war auch die Zunahme durch Delphinidin und Cyanidin signifikant. Auch eine Mischung aus unterschiedlichen Anthocyanen (MAF14001) bewirkte in humanen Neuroblastomzellen einen Schutz vor Glutathiondepletion durch Acrolein [165]. Zahlreiche Untersuchungen von Fruchtextrakten in vitro konnten keinen Nachweis einer Modulation des Glutathionhaushaltes erbringen: Polyphenolreicher Apfelsaftextrakt (10-250  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigte beispielsweise im HT-29-Zellkulturmodell nach 24-stündiger Präinkubation keine Modulation des Gesamtglutathions. Quercetin hingegen zeigte in der gleichen Versuchsreihe eine signifikante Steigerung der Glutathionkonzentration (in Caco-2-Zellen mit 30  $\mu\text{M}$ , in HT-29-Zellen mit 10  $\mu\text{M}$ ) [166]. In den kinetischen Glutathionmessungen von Schantz et al. zeigten sich nach 1- und 24- stündiger Inkubation mit niedrigen Konzentrationen von Heidelbeerextrakt (0,01-10  $\mu\text{g/ml}$ ) kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle in Caco-2- und HT-29-Zellen. In Caco-2-Zellen zeigte sich tendenziell nach 24-stündiger Inkubation mit 50-500  $\mu\text{g/ml}$  Extrakt ein leichter Anstieg im Gesamtglutathion, dagegen bewirkte 500  $\mu\text{g/ml}$  nach 1 Stunde Inkubation eine signifikante Abnahme [160]. In einer späteren genaueren Analyse eines Heidelbeerextraktes zeigte sich, dass die anthocyanreiche Fraktion des Extraktes keine Zunahme des Gesamtglutathions in HT-29- und Caco-2- Zellen bewirkte [161]. Bei den teilweise gegensätzlichen Ergebnissen stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Inkubationszeit.

Insgesamt fiel im Vergleich zu anderen Untersuchungen die kürzere Inkubationszeit der Anthocyanidine auf. Sie wurde in Anlehnung an die vermutlich kurze Eliminationshalbwertszeit *in vivo* so gewählt [81]. Die meisten signifikanten Unterschiede wurden allerdings in der Literatur mit einer Inkubation von 24 Stunden erzielt. Möglicherweise war die Präinkubationszeit nicht ausreichend um Effekte z. B. auf die Veränderung der Genexpressionen zu erzielen. Die teilweise kontroversen Ergebnisse bei Betrachtung der Reinformen von Cyanidin und Delphinidin erlauben keine klare Aussage zum Einfluss auf den Glutathionhaushalt *in vitro* und bedürfen weiterer Untersuchungen.

### V.1.3 ROS-Level

Mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs DHE wurde der Einfluss der Anthocyanidine auf die intrazelluläre ROS-Produktion der HT-29-Zellen untersucht. Weder Cyanidin noch Delphinidin regten in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die ROS-Produktion an. In Kombination mit 25  $\mu\text{M}$  Antimycin A senkten sie effektiv den ROS-Spiegel. Der antioxidative Effekt war im Falle des Cyanidins bei einer Konzentration von 10 und 20  $\mu\text{M}$  signifikant. 20  $\mu\text{M}$  zeigte im Vergleich zu 10  $\mu\text{M}$  einen leichten Anstieg, was potentiell als prooxidative Wirkung gedeutet werden kann. Delphinidin zeigte mit 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Rückgang der intrazellulären ROS. In der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  bewirkten beide Anthocyanidine auch eine Abnahme, blieben allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus. Ein signifikanter Wirkunterschied beider Anthocyane konnte nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse decken sich mit den Hinweisen in der Literatur zum Einfluss von Anthocyanen auf die intrazelluläre ROS-Konzentration. Dabei wird die Fähigkeit des Flavonoidmoleküls, ROS direkt durch Elektronenabgabe zu eliminieren, als wichtigster Mechanismus beschrieben [167, 168]. Bei den meisten Zellkultur-Untersuchungen wurde das ROS-Level allerdings mit dem DCF-Farbstoff photometrisch bzw. durchflusszytometrisch gemessen und anthocyanreiche Produkte getestet. Rotwein beispielsweise, und dabei vor allem die anthocyanreiche Fraktion des Rotweins, senkte die ROS-Konzentration in Erythrozyten [40]. In HT-29-Zellen reduzierte 250  $\mu\text{g/ml}$  Heidelbeerextrakt nach

24-stündiger Inkubation signifikant das ROS-Level [160]. Guerra et al. testete den Schutz von Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside auf die durch Aflatoxin B1 und Ochratoxin A induzierte ROS-Produktion. Sowohl in Caco-2-, als auch in Hep-G2-Zellen bewirkte eine 24-stündige Präinkubation mit dem Anthocyan (50  $\mu$ M) eine signifikante ROS-Reduktion. Hierbei wurden die ROS-Level photometrisch mit Hilfe des DCF-Farbstoffes gemessen. Bei Präinkubation mit 25  $\mu$ M Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside war die ROS-Abnahme nicht signifikant. Im Gegensatz dazu lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Interpretation zu, dass sowohl Cyanidin als auch Delphinidin in geringerer Konzentration effektiv gegen intrazelluläre ROS wirken.

## **V.2 Fibromyalgiestudie**

Im Rahmen der Interventionsstudie wurde die Auswirkung eines roten anthocyanreichen Fruchtsaftes auf Fibromyalgiepatienten sowie zur Kontrolle auf gesunde Probanden getestet. Nach 2-wöchiger Einwaschphase erhielten die Studienteilnehmer täglich 750 ml Fruchtsaft für 4 Wochen. Nach 4-wöchiger Auswaschphase erfolgten die letzten Probenahmen. Es galt zu untersuchen, ob der anthocyanreiche Fruchtsaft bei andauernder, konzentrierter Einnahme antioxidativ im Menschen wirkt und messbar oxidative Stressparameter verändert. Außerdem sollte das oxidative Stresslevel der Fibromyalgiepatienten mit demjenigen der Kontrollen verglichen und die Auswirkung der Fruchtsafteinnahme auf die klinischen Parameter kontrolliert werden.

### **V.2.1 ROS-Level**

Die ROS-Produktion wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden in frisch isolierten mononukleären Blutzellen untersucht. Zum einen durchflusszytometrisch mit dem DCF-Farbstoff, zum anderen photometrisch im NBT-Assay, der intrazelluläre Superoxidanionen nachweist. Im Verlauf der Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Zeitpunkten sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Im NBT-Assay zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die zusätzliche Behandlung mit Insulin, das über die Aktivität von NOX-Enzymen als ROS-Induktor fungiert [169], führte zu einem im Durchschnitt gleich großen

Anstieg des ROS-Levels in beiden Gruppen. Die Hypothese, dass Insulin bei Fibromyalgiepatienten durch eine möglicherweise höhere NOX-Aktivität einen stärkeren Anstieg erzeugt, konnte somit nicht belegt werden. Tendenziell nahm bei den mit Insulin behandelten Proben das ROS-Level nach Fruchtsaftaufnahme bei den Kontrollen eher zu, dagegen bei den Patienten eher ab. Im DCF-Assay lag das ROS-Level innerhalb der Patientengruppe vor Fruchtsaftaufnahme signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Cordero et al. untersuchten ebenfalls diesen Endpunkt und verglichen mononukleären Zellen von Fibromyalgiepatienten mit Kontrollzellen. Dabei konnte ein signifikant höheres ROS-Level bei den Patienten beobachtet werden [119]. In dieser durchflusszytometrischen Messung wurde MitoSOX Red, ein für intramitochondriales Superoxidanion spezifisches Fluorochrom, zur ROS-Messung verwendet. Allerdings umfasste die Untersuchung nur die Zellen von 6 Patienten. Der Unterschied wurde in dieser Studie auf die messbar geringere Cytochrom Q10-Konzentration der Fibromyalgiepatienten zurückgeführt. Eine Interventionsstudie zu anthocyanreichen Produkten und einem Endpunkt zur Bestimmung des ROS-Levels konnte nicht zum Vergleich gefunden werden.

### V.2.2 Antioxidative Kapazität

Zur Messung der antioxidativen Kapazität wurde die Eisen-Reduktionsfähigkeit (FRAP= Ferric Reducing Ability of Plasma) im Plasma untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht gemessen werden. Die Patienten wiesen nach Fruchtsaftaufnahme eine höhere antioxidative Kapazität im Plasma auf. Innerhalb der Kontrollgruppe veränderte sich der Parameter während des Studienverlaufs nicht. Die gemessenen FRAP-Werte (Mittelwert: 1,26 mM, Minimum: 0,73 mM, Maximum: 1,98 mM) passen sehr gut zu der durch Benzie et al. ermittelten Größenordnung für FRAP-Werte im Plasma gesunder Erwachsener (Mittelwert: ca. 1 mmol/l; 0,6-1,6 mmol/l) [156]. In unterschiedlichen Untersuchungen wurde der Einfluss anthocyanreicher Produkte auf die antioxidative Kapazität der Studienteilnehmer untersucht. Ein Vergleich der Studien gestaltet sich jedoch schwierig, da sie sich hinsichtlich des getesteten Produkts, der Einnahmemenge, der Einnahmedauer, der Dauer zwischen Einnahme und

Probenentnahme, sowie der Messmethode unterscheiden. Die Ergebnisse sind sehr heterogen. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten nach Aufnahme des anthocyanreichen Produkts einen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma beobachten [46-48, 54]. Netzel et al. gaben 6 gesunden Probanden 400 ml eines anthocyanreichen Fruchtsaftes zu trinken und konnten nach 2 Stunden einen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma auf 130% des Ausgangswertes (gemessen als TEAC, Trolox äquivalente antioxidative Kapazität) beobachten [170]. Interessanterweise war der Wert bereits nach 6 Stunden wieder auf den Ausgangswert gefallen. Möglicherweise ist der Zeitpunkt der Messung beeinflussend. Es ist durchaus denkbar, man bei einer Verkürzung der Zeit zwischen letzter Saftaufnahme und Blutentnahme einen deutlicheren Anstieg des FRAPs messen könnte. Andere Interventionsstudien konnten keine Zunahme der antioxidativen Kapazität nach Einnahme anthocyanreicher Produkte feststellen [51, 53, 171, 172]. Beispielsweise veränderte sich die TEAC bei 21 Hämodialysepatienten nach der Einnahme von 200 ml Rotfruchtsaft für 4 Wochen in der Studie von Spormann et al. nicht [53]. Beide Messmethoden, FRAP und TEAC, zeigten in der Studie von Dragstedt et al. eine gute Korrelation und keine nennenswerten postprandialen Veränderungen nach einer frucht- und gemüsereichen Diät [172]. Die FRAP-Werte der vorliegenden Arbeit veränderten sich gerade in der gesunden Kontrollgruppe kaum. Eine mögliche Erklärung ist hierbei die große Anzahl unterschiedlicher exogener und endogener antioxidativer Mechanismen, deren Gesamtkapazität nicht durch die exogene Zufuhr einzelner Stoffe maßgeblich beeinflusst werden kann. Bei der Betrachtung des Einflusses anthocyanreicher Produkte auf die antioxidativen Mechanismen ist zu beachten, dass die Messmethoden (FRAP, TEAC) lediglich die direkte antioxidative Kapazität des Plasmas darstellt. Ein möglicher Einfluss durch Aktivierung zellulärer und enzymatischer antioxidativer Abwehrmechanismen bleibt bei diesen Messungen unbeachtet [53, 173]. Allerdings stiegen die gemessenen FRAP-Werte nach der Fruchtsaftaufnahme in der Patientengruppe leicht an. Möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die antioxidative Kapazität der

Fibromyalgiepatienten leichter beeinflussbar durch exogene Stoffe ist als bei gesunden Probanden.

### V.2.3 Glutathion

Mit Hilfe der Enzym-Recycling-Methode nach Tietze wurden Gesamtglutathion, sowie oxidiertes und reduziertes Glutathion aus den Erythrozyten der Patienten und Kontrollen bestimmt. In der Literatur finden sich unterschiedliche Glutathionmessungen aus Vollblut bzw. Erythrozyten von gesunden Probanden und Patienten unterschiedlicher Pathologien. Rossi et al. fasste die Größenordnung dieser Messwerte als 1 bis 500  $\mu\text{mol/l}$  für GSSG und 150 – 1500  $\mu\text{mol/l}$  für GSH zusammen [142]. (Bei Daten bezogen auf Erythrozyten wurde der Glutathionengehalt in Leukozyten als unerheblich betrachtet.) Allerdings postulieren die Autoren, die GSSG-Werte seien meist durch artifizielle Oxidationen fälschlich zu hoch gemessen und seien in Realität eher im Bereich von 2 – 6  $\mu\text{mol/l}$  zu finden. Die Mittelwerte aller in dieser Arbeit erhobenen Glutathionwerte lagen innerhalb dieser Größenordnung ( $\text{GSH}_{\text{MW}} = 1426 \mu\text{mol/l}$ ,  $\text{GSSG}_{\text{MW}} = 23,5 \mu\text{mol/l}$ ). Die GSSG-Werte befanden sich zwar im unteren Bereich der Größenskala, sind aber dennoch höher als die postulierten Werte von Rossi et al. Hierbei ist zu beachten, dass jede Probe auf Grund der benötigten Blutmenge, des Versuchsablaufs und der kinetischen Auswertung nur einmal gemessen werden konnte. Einzelne Ausreißer fielen so deutlich mehr ins Gewicht und verursachten zum Teil größere Standardabweichungen. In der Studie von Sendur et al. zeigte sich das erythrozytäre Glutathion-Level in einer Gruppe mit Fibromyalgiepatienten signifikant niedriger als das einer gesunden Kontrollgruppe [174]. Dies konnte mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Die Werte wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Patientengruppe hinsichtlich Gesamtglutathion, GSSG und GSH/GSSG-Quotient auf. Interessanterweise stieg das Gesamtglutathion der Patienten nach der Fruchtsaftaufnahme an, während die Werte der Kontrollgruppe annähernd konstant blieben. Bei ähnlichen Interventionsstudien konnten Anstiege des Gesamtglutathions nach Einnahme anthocyanreicher Produkte sowohl in gesunden Probanden als auch in Hämodialysepatienten beobachtet werden [49, 53]. Die intrazelluläre

Gesamtmenge an Glutathion wird auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Als möglicher Mechanismus für die Wirkung der Polyphenole scheint eine Modulation der Genexpression von Enzymen der Glutathionsynthese und anderer antioxidativer Mechanismen wahrscheinlich. Beispielsweise konnte in vitro eine Aktivierung der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, als erstes Enzym der Glutathion-de-novo-Synthese, durch Flavonoide beobachtet werden [175]. Der leichte Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten, als Marker für geringeren oxidativen Stress, nach Fruchtsafteinnahme war bedingt durch den Anstieg des Gesamtglutathions, da eine Abnahme des GSSG von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 nicht beobachtet werden konnte.

#### V.2.4 Vergleich mit den Ergebnissen der Projektpartner

Bei Betrachtung der restlichen Studienergebnisse sind vor allem die HPLC-Messungen der DNA- und RNA-Oxidationsprodukte interessant. Die Konzentration von 8-oxo-Guo war zu allen 3 Zeitpunkten signifikant höher im 24-h-Urin der Patienten als in dem der Kontrollgruppe. Neben dem erhöhten ROS-Wert zum Zeitpunkt 1 in der DCF-basierten Untersuchung, stellt dieses Ergebnis einen weiteren signifikanten Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe dar. Möglicherweise könnte dies doch ein Hinweis darauf sein, dass Fibromyalgiepatienten einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt sind und zelluläre RNA-Reparaturmechanismen gegen Oxidationsprodukte gehäuft ablaufen. Allerdings zeigte sich diese Tendenz nicht in allen Versuchen. Mit Hilfe von Fragebögen wurden die Auswirkungen der Fruchtsafteinnahme auf die klinischen Parameter der Fibromyalgiepatienten untersucht. Dabei wurden die Hauptsymptome Schmerz, Chronisches Fatigue-Syndrom und Reizdarmsyndrom überwacht. Die Idee, antioxidative Pflanzenstoffe wie Anthocyane in die Therapie der Fibromyalgie zu integrieren, ist nicht neu, aber bisher finden sich in der Literatur keine ausreichenden Belege für deren Nutzen. Vereinzelt zeigten sich in Placebo-kontrollierten Studien positive Auswirkungen auf klinische Symptome wie z. B. Schlafstörungen [129]. Die Auswertung der klinischen Parameter mit Hilfe der Fragebögen ergab, dass die Veränderungen nach Fruchtsafteinnahme zwar unterhalb des Signifikanzniveaus blieben, aber individuell durchaus davon profitiert wurde. Nach der 4-wöchigen Einnahme des

Fruchtsaftes gaben 42 % der Patienten (6/14) bei der Kontrolluntersuchung in der Schmerzzambulanz eine Schmerzreduktion um mindestens 2 Punkte der NRS-Skala an. 59 % der Patienten bemerkten eine Verbesserung von mindestens einem Reizdarmsymptom (10/17: Schmerz 1/17, Obstipation 4/17, Diarrhoe 1/17, Völlegefühl 3/17, frühe Sättigung 4/17) [Promotionsarbeit C.Samwer, bisher unveröffentlicht, persönliche Mitteilung]. Möglicherweise spielt dabei die höhere lokale Konzentration und Absorption der Anthocyane im Darmgewebe eine Rolle [82, 176]. Bei einem Patienten zeigte sich eine Verbesserung hinsichtlich des chronischen Fatigue-Syndroms. Eine Analyse der Subgruppen, d.h. derjenigen Patienten, die klinisch von der Saftaufnahme profitierten, ergab keine neuen Informationen in Bezug auf die Veränderungen der oxidativen Parameter.

### **V.3 Bedeutung, Limitationen und Ausblick**

Mit zunehmenden Erkenntnissen zu oxidativem Stress und seiner Bedeutung für die Gesundheit, sind Untersuchungen im Menschen zu möglichen protektiven Wirkungen natürlich vorkommender Antioxidantien von großem Interesse. Bei der Interpretation der Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen zum antioxidativen Potential der Anthocyane sind einige Aspekte besonders hervorzuheben. Zahlreiche in vitro-Tests stellen natürliche Produkte, wie z. B. Fruchtextrakte, in den Mittelpunkt der Untersuchungen. Zweifelsfrei sind solche Untersuchungen interessant, da die Produkte Teil der menschlichen Nahrung sind und eine Übertragbarkeit in vivo vereinfachen. Allerdings handelt es sich dabei um Mischungen verschiedener Polyphenole, die neben Anthocyanen auch andere potentiell antioxidative Pflanzenstoffe enthalten. Beobachtete Effekte können oft nicht eindeutig zugeordnet werden. Einige Analysen weisen auf eine Wirksteigerung der Anthocyane bei Verabreichung als Mischung hin [177]. Außerdem zeigen Anthocyane und ihre Aglykone eine unterschiedliche antioxidative Aktivität [59]. Eine mögliche Erklärung ist eine starke Struktur-Funktions-Beziehung, die auch die intrazelluläre Lokalisation der Stoffe beeinflusst [159]. Des Weiteren müssen die verwendeten Konzentrationen beachtet werden, besonders hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das



Vorkommen im menschlichen Körper. Noch vor einigen Jahren ließ sich die Mehrheit der *in vitro*-Effekte auf hohe Konzentrationen bis 2 mM zurückführen. Man stellte deshalb eine systemische antioxidative Wirkung im Menschen in Frage, da solche Konzentrationen auf Grund der geringen Bioverfügbarkeit im Menschen nicht zu erwarten sind [27]. Die hier verwendeten Konzentrationen im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich stellen eine weitere Annäherung an realistische Bedingungen *in vivo* dar. Vor allem in Bezug auf den Gastrointestinaltrakt, da Anthocyane in direktem Kontakt mit den Mukosazellen stehen und relativ hohe Konzentrationen erreichen können [176]. Selbst für die im menschlichen Plasma zu erwartenden Konzentrationen im nM-Bereich konnten in einzelnen *in vitro* Untersuchungen zu Anthocyanen aus Heidel- und Blaubeeren bzw. Cyanidin-3-Glucosid antioxidative Effekte in Endothelzellen beobachtet werden [178, 179]. Somit scheinen die *in vitro*-Versuche immer besser mit den Konditionen, wie sie im Menschen vorzufinden sind, vereinbar zu sein. Zur genaueren Einschätzung der beobachteten Effekte von Cyanidin und Delphinidin und ihrer Übertragbarkeit in den menschlichen Körper soll allerdings noch auf die Einschränkung des Zellkulturmodells hingewiesen werden. Auf Grund der bereits erwähnten, relativ hohen Anthocyankonzentration an der Darmmukosa, wurden humane Darmepithelzellen als Modell ausgewählt. Da es sich bei den HT-29-Zellen um Zellen einer Tumorzelllinie (Adenokarzinomzellen) handelt, ist eine absolute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den gesunden menschlichen Darm nicht möglich. Allerdings weisen HT-29-Zellen Charakteristika normaler Darmzellen auf [180], bieten den Vorteil der guten Kultivierbarkeit und sind in der Genotoxizitätsforschung gut etabliert [149]. Daher eigneten sie sich trotz der genannten Einschränkung gut als Zellkulturmodell und wurden deshalb für die Untersuchungen ausgewählt. Die *in vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf eine antioxidative Wirkung der zwei wichtigsten Anthocyanidine, Cyanidin und Delphinidin, in niedrigen Konzentrationen und zeigen einen Schutz vor oxidativen Genomschäden im HT-29-Zellkulturmodell.

Als antioxidatives Präparat wurde in der humanen Interventionsstudie mit Fibromyalgiepatienten und gesunden Probanden ein anthocyanreicher,

hochkonzentrierter roter Fruchtsaft für 4 Wochen verwendet. Die Frage nach Beeinflussung der oxidativen Stressparameter durch den Saft konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht eindeutig beantwortet werden. Einzelne Parameter, z. B. das Gesamtglutathion, zeigten Veränderungen, in anderen Versuchen blieben die Tendenzen auf Grund von interindividuellen Unterschieden und damit größeren Standardabweichungen unter dem Signifikanzniveau. Insgesamt sind die Effekte jedoch als eher gering zu beurteilen und nicht vergleichbar mit den vielversprechenden Ergebnissen der Zellkulturversuche. Gründe dafür könnten im Metabolismus und der geringen Bioverfügbarkeit von Anthocyanen liegen [57]. Möglicherweise ist die systemisch wirksame Konzentration nach oraler Aufnahme zu gering gewesen, um antioxidative Effekte im Plasma und im Urin eindeutig zu detektieren. Überhaupt ist das Wissen um Verteilung und Wirksamkeit der Anthocyane in den unterschiedlichen Geweben und Kompartimenten bislang nicht ausreichend, um die systemische Wirksamkeit und Nachweismöglichkeit im Blut vorzusetzen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die direkte Messung von Anthocyanen im Blut der Patienten z. B. mittels HPLC-Analyse gewesen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Doch selbst bei Messung geringer Serumkonzentrationen der Anthocyane, wäre eine Steigerung der Aufnahmedosis in der Praxis nicht realisierbar gewesen. Bei einer Erhöhung der bereits nicht unerheblichen Tagesmenge des Saftes von 750 ml hätte mit einer nachlassenden Compliance gerechnet werden müssen. Ein höher konzentriertes Präparat ist aus Nahrungsmitteln nicht herstellbar. Es würde folglich auch nicht mehr als Nahrungsmittel gelten und sein Einsatz in einer Interventionsstudie dieser Art wäre auf Grund hoher Auflagen eher unwahrscheinlich. Außerdem könnte auch der Zeitpunkt der Probenentnahme die Ergebnisse beeinflusst haben. Es ist denkbar, dass antioxidative Effekte bei den bisher gemessenen Eliminationshalbwertszeiten der Anthocyane von 1,5 bis 3 Stunden [81] mit größerem zeitlichen Abstand zur Einnahme geringer werden. Ob und inwieweit eine kumulative Wirkverstärkung durch repetitive und längerfristige Einnahme dies auszugleichen vermag, ist dabei unklar. Nach Vergleich der erhobenen Parameter beider Gruppen kann nicht sicher auf

ein erhöhtes oxidatives Stresslevel bei Fibromyalgiepatienten geschlossen werden. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei der Kontrollgruppe, um eine nicht gematchte Gruppe handelt, deren Parameter eine Orientierung bieten können. Andere Einflussmöglichkeiten wie Alter und Geschlecht können nicht ausgeschlossen werden. Auch auf Seiten der Patientengruppe könnten sich Vorerkrankungen oder auch Medikamente (s. Anhang) auf das oxidative Stresslevel ausgewirkt haben. Beispielsweise finden sich in der Literatur Hinweise, dass sich Antidepressiva, die auch im Rahmen der multimodalen Therapie der Fibromyalgie zum Einsatz kommen, positiv auf oxidative Stressparameter auswirken könnten [181]. Gerade bei einer heterogenen Erkrankung wie der Fibromyalgie, die nur bedingt durch objektivierbare Parameter erfasst werden kann und deren Genese vermutlich durch vielfältige Faktoren bedingt ist, verwundern die interindividuellen Schwankungen nicht. Allerdings zeigten sich im Rahmen der Studie positive klinische Auswirkungen des anthocyanreichen Fruchtsaftes vor allem hinsichtlich des Reizdarmsyndroms. Zukünftige Studien könnten sich auf Patienten dieses chronischen Volksleidens konzentrieren, um mit ähnlicher Intervention, jedoch nach Möglichkeit mit größerer Probandenanzahl und Placebo-kontrolliert, die positiven Effekte der Anthocyane zu untermauern. Möglicherweise wäre in einer solchen Folgestudie auch die koloskopische Entnahme von Darmbiopsien realisierbar. Die Untersuchung dieses Gewebes hinsichtlich der oxidativen Parameter wäre auf Grund der bereits erwähnten höheren Anthocyankonzentration im Darm, sowie der klinischen Symptomatik dieses Organs sehr interessant. Eine weitere interessante Fragestellung könnte sich bei Diabetikern ergeben. Hyperinsulinämie erhöht nachweislich das oxidative Stresslevel [169]. Patienten des Diabetes Typs 2 könnten so möglicherweise von der antioxidativen Wirkung anthocyanreicher Produkte, z. B. eines zuckerreduzierten Fruchtsaftes profitieren.



## VI Zusammenfassung

Die menschliche Nahrung enthält antioxidative Stoffe, die den Menschen möglicherweise vor oxidativem Stress und seinen Konsequenzen schützen können. Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen Anthocyane, die als vielversprechende antioxidative Pflanzenstoffe in unterschiedlichen Obst- und Gemüsesorten zu finden sind.

Im ersten Teil der Arbeit wurden in einem HT-29-Zellkulturmodell die zwei wichtigsten Vertreter der Anthocyanidine, Delphinidin und Cyanidin, untersucht. Es galt zu prüfen, ob beide Pflanzenstoffe in geringen Konzentrationen in humanen Zellen antioxidativ wirken und oxidativen Genomschaden verhindern können. Im Comet-Assay reduzierten sowohl Delphinidin (ab 3,2  $\mu\text{M}$ ) als auch Cyanidin (ab 1  $\mu\text{M}$ ) signifikant die durch 100  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid induzierten DNA-Schäden in den HT-29-Zellen. Im Comet-Assays mit FPG-Enzym wurde deutlich, dass eine Präinkubation mit Cyanidin wirksam die Oxidation der DNA-Basen verringert. Die Auswirkungen auf den Glutathionspiegel wurden mit Hilfe des Glutathion-Recycling-Assays nach Tietze untersucht. Die Präinkubation mit Cyanidin führte hierbei zu keinen signifikanten Veränderungen. Um die Auswirkungen der Anthocyanidine auf die intrazelluläre ROS-Produktion zu beobachten, wurde der fluoreszierenden Farbstoffs DHE verwendet. Sowohl Delphinidin (10 und 15  $\mu\text{M}$ ) als auch Cyanidin (10 und 20  $\mu\text{M}$ ) senkten signifikant die durch 25  $\mu\text{M}$  Antimycin A angeregte ROS-Produktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein anthocyanreicher roter Fruchtsaft in einer 10-wöchigen Interventionsstudie am Menschen getestet. Hieran nahmen sowohl 19 Fibromyalgiepatienten als auch 10 gesunde Probanden teil. Es sollte die Hypothese geprüft werden, dass die konzentrierte und andauernde Einnahme des Saftes messbar oxidative Stressparameter im Blut verändert. Außerdem sollten mögliche Unterschiede im oxidativen Stresslevel zwischen Patienten und gesunden Probanden aufgedeckt werden. Nach jeder Studienphase erfolgte eine Befragung nach klinischen Symptomen und die Abgabe einer Urin- und Blutprobe in der Schmerzambulanz der Uniklinik

Würzburg (2 Wochen Einwaschphase, 4 Wochen Fruchtsaftphase mit je 750 ml Saft täglich, 4 Wochen Auswaschphase). Das ROS-Level wurde mit 2 Methoden in den mononukleären Blutzellen untersucht: In der photometrischen NBT-Messung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen oder Zeitpunkten beobachtet werden. Bei der durchflusszytometrischen Messung mit Hilfe des fluoreszierenden DCF-Farbstoffes lag das ROS-Level der Patientengruppe vor Fruchtsafteinnahme signifikant höher als das der Kontrollgruppe. Zur Messung der antioxidativen Kapazität wurde die Eisen-Reduktionsfähigkeit (FRAP) im Plasma untersucht. In der Patientengruppe zeigte sich eine Steigerung der antioxidativen Kapazität nach Einnahme des Fruchtsaftes. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren gering. Sowohl das Gesamtglutathion als auch die oxidierte und reduzierte Form wurden in den Erythrozyten der Probanden mit dem Glutathion-Recycling-Assay gemessen. Nach der Fruchtsafteinnahme stieg die Konzentration des Gesamtglutathions in der Patientengruppe an.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Delphinidin und Cyanidin auch in geringen Konzentrationen ( $1\mu\text{M}$  -  $20\mu\text{M}$ ) einen antioxidativer Effekt in HT-29-Zellen haben und vor oxidativem DNA-Schaden schützen können. Die Ergebnisse der Interventionsstudie unterschieden sich teilweise in den einzelnen Endpunkten. Es war nicht möglich, den Fibromyalgiepatienten ein höheres oxidatives Stresslevel nachzuweisen. Ein Grund für die geringeren Effekte des Fruchtsaftes könnte in der eher geringen Bioverfügbarkeit der Anthocyane liegen. Außerdem könnte die Heterogenität der Fibromyalgieerkrankung genauso wie andere endogene oder exogene Faktoren wie etwa Alter oder Medikamenteneinnahme die teilweise großen interindividuellen Schwankungen der Messergebnisse hinsichtlich der oxidativen Stressparameter bedingen. Klinisch profitierten einige der Fibromyalgiepatienten von der Fruchtsafteinnahme insbesondere hinsichtlich der Reizdarmsymptomatik. Dieses Volksleiden könnte ein interessanter Ansatzpunkt für Folgeuntersuchungen mit einem anthocyanreichen Produkt sein.

## VII Summary

Human diet contains antioxidative components which might be protective against oxidative stress and its consequences. This study concentrates on anthocyanins which are promising antioxidative phytochemicals and can be found in numerous fruits and vegetables.

The first part of this study focused on the two major anthocyanidins, delphinidin and cyanidin, and their effects in vitro (HT-29 cell line). The aim was to investigate whether low concentrations of these anthocyanidins were able to reduce oxidative stress and oxidative DNA damage in this human cell model. The effects on DNA damage and repair were monitored by the comet assay. Delphinidin (3, 2  $\mu\text{M}$ ) as well as cyanidin (1  $\mu\text{M}$ ) reduced significantly DNA damage induced by 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . The comet assay extended by the FPG enzyme clarified that cyanidin was able to reduce the number of oxidized DNA bases. The amounts of total and oxidized glutathione measured by the glutathione recycling assay were not significantly influenced by cyanidin. The intracellular ROS concentration was measured by using the fluorescent ROS-indicator DHE. Delphinidin (10 and 15  $\mu\text{M}$ ) as well as cyanidin (10 and 20  $\mu\text{M}$ ) reduced significantly ROS productions induced by 25  $\mu\text{M}$  antimycin a.

The second part of this thesis was a human intervention study which investigated the effect of an anthocyanin rich fruit juice on patients suffering from fibromyalgia and on a healthy control group. The hypothesis was that the daily intake of 750 ml juice for 4 weeks would change the oxidative stress parameters measured in the blood of the probands. Furthermore, the oxidative stress-level of the fibromyalgia patients should be compared to that of the healthy probands. 19 patients and 10 controls were recruited and were cared for by the pain ambulance of the university hospital of Würzburg. A clinical questionnaire and blood and urine samples were collected after each phase of the study (2 weeks pre-wash phase, 4 weeks fruit juice phase, 4 weeks wash-out phase). The level of ROS was measured by 2 different methods in the fresh mononuclear blood cells. There were no significant differences between groups or time-points in ROS concentration detected in the photometric NBT-Assay.

However, the flow cytometric DCF-Assay showed a higher ROS level in patients than in controls before the fruit juice phase. The antioxidative capacity were measured by investigating the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP). The antioxidative capacity of the patients increased after fruit juice intake. There were no significant differences between both groups. The amount of total, reduced and oxidized glutathione in erythrocytes was detected by the glutathione recycling assay. After fruit juice intake the amount of total glutathione increased in the patient group. The GSH/GSSG quotient, a marker of oxidative stress, were slightly but insignificantly improved in both groups after fruit juice intake.

In summary the results of this thesis demonstrated that low concentrations of delphinidin or cyanidin (1  $\mu\text{M}$  – 20  $\mu\text{M}$ ) have antioxidative effects on HT-29 cells and protect them from oxidative DNA damage. The different endpoints of the fruit juice study showed inconsistent results. There was no clear evidence for a higher oxidative stress level in fibromyalgia patient compared to the control group. One reason for the partially small effects of the red fruit juice could be the low bioavailability of the anthocyanins. The heterogeneity of the fibromyalgia disease as well as other endogenous and exogenous influences such as age or medication may have caused the partially large interindividual differences. However, some of patients gained clinical benefits from drinking the red fruit juice especially regarding the irritable bowel syndrome. It could be interesting to focus on this his common disease in further studies.



## Literaturverzeichnis

1. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
2. Turrens, J.F., *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Biosci Rep, 1997. **17**(1): p. 3-8.
3. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 222-30.
4. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 231-55.
5. Podda, M. and M. Grundmann-Kollmann, *Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing*. Clin Exp Dermatol, 2001. **26**(7): p. 578-82.
6. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-189.
7. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
8. Marklund, N., et al., *Monitoring of reactive oxygen species production after traumatic brain injury in rats with microdialysis and the 4-hydroxybenzoic acid trapping method*. J Neurotrauma, 2001. **18**(11): p. 1217-27.
9. Yamamori, T., et al., *Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(2): p. 260-270.
10. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and K. Fiotakis, *Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles*. Int J Environ Res Public Health, 2009. **6**(2): p. 445-62.
11. Proctor, P.H. and E.S. Reynolds, *Free radicals and disease in man*. Physiol Chem Phys Med NMR, 1984. **16**(3): p. 175-95.
12. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues*. Anal Biochem, 1969. **27**(3): p. 502-22.
13. McCall, M.R. and B. Frei, *Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?* Free Radic Biol Med, 1999. **26**(7-8): p. 1034-53.
14. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
15. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(33): p. 20313-20316.

16. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.
17. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
18. Galli, F., et al., *Oxidative stress and reactive oxygen species*. Contrib Nephrol, 2005. **149**: p. 240-60.
19. Fleschhut, J., *Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen*, in *Fakultät für Chemie und Lebensmittelwissenschaften*. 2004, Universität Karlsruhe: Karlsruhe.
20. Kong, J.M., et al., *Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry, 2003. **64**(5): p. 923-33.
21. Pojer, E., et al., *The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2013. **12**(5): p. 483-508.
22. Prior, R.L. and X. Wu, *Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities*. Free Radic Res, 2006. **40**(10): p. 1014-28.
23. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. The Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-1526.
24. Wu, X., et al., *Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(11): p. 4069-75.
25. Clifford, M.N., *Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1063-1072.
26. Kuhnau, J., *The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World Rev Nutr Diet, 1976. **24**: p. 117-91.
27. Watzl, B., K. Briviba, and G. Rechkemmer, *Anthocyanins*. Ernährungs-Umschau, 2002. **49**(4): p. 148-150.
28. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **20**(7): p. 933-956.
29. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, *Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships*. Free Radical Biology and Medicine, 1997. **22**(5): p. 749-760.
30. Rice-Evans, C., N. Miller, and G. Paganga, *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science, 1997. **2**(4): p. 152-159.
31. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
32. Rice-Evans, C.A. and N.J. Miller, *Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(3): p. 790-5.
33. Beer, D.d., Gelderblom W.C.A., Manley M. , *Phenolic Compounds: A Review of their Possible Role as in vivo Antioxidants of Wine*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2003. **23**(48-61).

34. Hider, R.C., Z.D. Liu, and H.H. Khodr, *Metal chelation of polyphenols*. *Methods Enzymol*, 2001. **335**: p. 190-203.
35. Nijveldt, R.J., et al., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **74**(4): p. 418-25.
36. Haenen, G.R., et al., *Peroxynitrite scavenging by flavonoids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(3): p. 591-3.
37. Hu, J.P., et al., *Structure-activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity*. *Biol Trace Elem Res*, 1995. **47**(1-3): p. 327-31.
38. Kerry, N.L. and M. Abbey, *Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro*. *Atherosclerosis*, 1997. **135**(1): p. 93-102.
39. Noroozi, M., W.J. Angerson, and M.E. Lean, *Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **67**(6): p. 1210-8.
40. Tedesco, I., et al., *Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes*. *J Nutr Biochem*, 2001. **12**(9): p. 505-511.
41. Tarozzi, A., et al., *Protective effects of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes*. *Photochem Photobiol*, 2005. **81**(3): p. 623-9.
42. Guerra, M.C., et al., *Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2)*. *Br J Nutr*, 2005. **94**(2): p. 211-20.
43. Ramirez-Tortosa, C., et al., *Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(9): p. 1033-7.
44. Tsuda, T., et al., *Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **368**(2): p. 361-6.
45. Tsuda, T., F. Horio, and T. Osawa, *The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats*. *Biofactors*, 2000. **13**(1-4): p. 133-9.
46. Whitehead, T.P., et al., *Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum*. *Clinical Chemistry*, 1995. **41**(1): p. 32-35.
47. Cao, G.H., et al., *Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women*. *Journal of Nutrition*, 1998. **128**(12): p. 2383-2390.
48. Mazza, G., et al., *Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(26): p. 7731-7.
49. Weisel, T., et al., *An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands*. *Biotechnol J*, 2006. **1**(4): p. 388-97.
50. Kresty, L.A., et al., *Transitioning from preclinical to clinical chemopreventive assessments of lyophilized black raspberries: Interim results show berries modulate markers of oxidative stress in Barrett's*

- esophagus patients*. Nutrition and Cancer-an International Journal, 2006. **54**(1): p. 148-156.
51. Duthie, S.J., et al., *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, 2006. **45**(2): p. 113-122.
52. Castilla, P., et al., *Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 1053-61.
53. Spormann, T.M., et al., *Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(12): p. 3372-80.
54. Alvarez-Suarez, J.M., et al., *One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans*. J Nutr Biochem, 2014. **25**(3): p. 289-94.
55. Tsuda, T., *Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(1): p. 159-70.
56. Zafrá-Stone, S., et al., *Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 675-83.
57. He, J. and M.M. Giusti, *Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties*. Annual Review of Food Science and Technology, 2010. **1**(1): p. 163-187.
58. Lala, G., et al., *Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats*. Nutr Cancer, 2006. **54**(1): p. 84-93.
59. Wang, L.S. and G.D. Stoner, *Anthocyanins and their role in cancer prevention*. Cancer Lett, 2008. **269**(2): p. 281-90.
60. Rossi, M., et al., *Flavonoids and the risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(8): p. 1621-5.
61. Cesoniene, L., I. Jasutiene, and A. Sarkinas, *Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity*. Medicina (Kaunas), 2009. **45**(12): p. 992-9.
62. Lacombe, A., et al., *Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against Escherichia coli O157:H7*. Int J Food Microbiol, 2010. **139**(1-2): p. 102-7.
63. Lacombe, A., et al., *The effect of American cranberry (Vaccinium macrocarpon) constituents on the growth inhibition, membrane integrity, and injury of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in comparison to Lactobacillus rhamnosus*. Food Microbiol, 2013. **34**(2): p. 352-9.
64. Nohynek, L.J., et al., *Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens*. Nutr Cancer, 2006. **54**(1): p. 18-32.

65. Wang, H., et al., *Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries*. J Nat Prod, 1999. **62**(2): p. 294-6.
66. Rossi, A., et al., *Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation*. Free Radic Res, 2003. **37**(8): p. 891-900.
67. Garcia-Alonso, M., et al., *Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(7): p. 521-9.
68. Erlund, I., et al., *Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(2): p. 323-31.
69. Freedman, J.E., et al., *Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release*. Circulation, 2001. **103**(23): p. 2792-8.
70. Krikorian, R., et al., *Blueberry supplementation improves memory in older adults*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(7): p. 3996-4000.
71. Ghosh, D. and T. Konishi, *Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function*. Asia Pac J Clin Nutr, 2007. **16**(2): p. 200-8.
72. Landrault, N., et al., *Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(1): p. 311-8.
73. Anderson, R.A., et al., *Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(1): p. 65-70.
74. Anderson, R.A. and M.M. Polansky, *Tea enhances insulin activity*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(24): p. 7182-6.
75. Matsui, T., et al., *Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(25): p. 7244-8.
76. Jayaprakasam, B., et al., *Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(1): p. 28-31.
77. Tsuda, T., et al., *Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice*. J Nutr, 2003. **133**(7): p. 2125-30.
78. Tsuda, T., et al., *Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 149-57.
79. Uzunovic, A. and E. Vranic, *Stability of anthocyanins from commercial black currant juice under simulated gastrointestinal digestion*. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2008. **8**(3): p. 254-258.
80. Passamonti, S., U. Vrhovsek, and F. Mattivi, *The interaction of anthocyanins with bilitranslocase*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(3): p. 631-6.
81. Kay, C.D., *Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans*. Nutr Res Rev, 2006. **19**(1): p. 137-46.

82. He, J., et al., *Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(8): p. 3141-8.
83. McGhie, T.K. and M.C. Walton, *The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 702-13.
84. Kroon, P.A., et al., *How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(1): p. 15-21.
85. Yang, M., et al., *Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review*. Curr Med Chem, 2011. **18**(2): p. 291-300.
86. *Twenty-second rheumatism review. Review of the American and English literature for the years 1973 and 1974*. Arthritis Rheum, 1976. **19**(6 suppl): p. 973-1223.
87. Muller, W. and J. Lautenschlager, *[Generalized tendomyopathy. II: Pathogenesis and therapy]*. Z Rheumatol, 1990. **49**(1): p. 22-9.
88. Muller, W. and J. Lautenschlager, *[Generalized tendomyopathy. I: Clinical aspects, follow-up and differential diagnosis]*. Z Rheumatol, 1990. **49**(1): p. 11-21.
89. Yunus, M., et al., *Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls*. Semin Arthritis Rheum, 1981. **11**(1): p. 151-71.
90. Smythe, H.A. and H. Moldofsky, *Two contributions to understanding of the "fibrositis" syndrome*. Bull Rheum Dis, 1977. **28**(1): p. 928-31.
91. W. Eich, W.H., B. Arnold, W. Jäckel, M. Offenbächer, F. Petzke, M. Schiltewolf, M. Settan, C. Sommer, T. Tölle, N. Üçeyler und P. Henningsen, *Das Fibromyalgiesyndrom Definition, Klassifikation, klinische Diagnose und Prognose*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 247-258.
92. Muller, W., *The fibrositis syndrome: diagnosis, differential diagnosis and pathogenesis*. Scand J Rheumatol Suppl, 1987. **65**: p. 40-53.
93. Samborski, W., et al., *Vergleichende Untersuchungen über Häufigkeit, Geschlechts- und Altersverteilung bei generalisierter Tendomyopathie (GTM) und chronischem Lumbalsyndrom*. Akt Rheumatol, 1992. **17**(03): p. 87-89.
94. Yunus, M.B. and A.T. Masi, *Juvenile primary fibromyalgia syndrome. A clinical study of thirty-three patients and matched normal controls*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(2): p. 138-45.
95. Clauw, D.J., *Fibromyalgia: A clinical review*. JAMA, 2014. **311**(15): p. 1547-1555.
96. Lorenz, J., *Hyperalgesia or hypervigilance? An evoked potential approach to the study of fibromyalgia syndrome*. Z Rheumatol, 1998. **57 Suppl 2**: p. 19-22.
97. Gracely, R.H., et al., *Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(5): p. 1333-43.
98. Hauser, W., et al., *[What are the key symptoms of fibromyalgia? Results of a survey of the German Fibromyalgia Association]*. Schmerz, 2008. **22**(2): p. 176-83.

99. Muller, A., M. Hartmann, and W. Eich, [*Health care utilization in patients with Fibromyalgia Syndrome (FMS)*]. *Schmerz*, 2000. **14**(2): p. 77-83.
100. Wolfe, F., et al., *The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(2): p. 160-72.
101. Wolfe, F., et al., *The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2010. **62**(5): p. 600-10.
102. Hauser, W., et al., *Diagnosis of fibromyalgia syndrome-a comparison of Association of the Medical Scientific Societies in Germany, survey, and American College of Rheumatology criteria*. *Clin J Pain*, 2010. **26**(6): p. 505-11.
103. Abeles, A.M., et al., *Narrative Review: The Pathophysiology of Fibromyalgia*. *Annals of Internal Medicine*, 2007. **146**(10): p. 726-734.
104. Sommer, C., et al., *Ätiologie und Pathophysiologie des Fibromyalgiesyndroms*. *Der Schmerz*, 2012. **26**(3): p. 259-267.
105. Neumann, L. and D. Buskila, *Epidemiology of fibromyalgia*. *Curr Pain Headache Rep*, 2003. **7**(5): p. 362-8.
106. Lee, Y.H., et al., *Candidate gene studies of fibromyalgia: a systematic review and meta-analysis*. *Rheumatol Int*, 2012. **32**(2): p. 417-26.
107. Choi, C.J., et al., *The association between incident self-reported fibromyalgia and nonpsychiatric factors: 25-years follow-up of the Adventist Health Study*. *J Pain*, 2010. **11**(10): p. 994-1003.
108. Mork, P.J., O. Vasseljen, and T.I. Nilsen, *Association between physical exercise, body mass index, and risk of fibromyalgia: longitudinal data from the Norwegian Nord-Trøndelag Health Study*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2010. **62**(5): p. 611-7.
109. Weir, P.T., et al., *The incidence of fibromyalgia and its associated comorbidities: a population-based retrospective cohort study based on International Classification of Diseases, 9th Revision codes*. *J Clin Rheumatol*, 2006. **12**(3): p. 124-8.
110. Kivimäki, M., et al., *Work stress and incidence of newly diagnosed fibromyalgia: prospective cohort study*. *J Psychosom Res*, 2004. **57**(5): p. 417-22.
111. Hauser, W., et al., *Emotional, physical, and sexual abuse in fibromyalgia syndrome: a systematic review with meta-analysis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011. **63**(6): p. 808-20.
112. McBeth, J., et al., *Moderation of psychosocial risk factors through dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis in the onset of chronic widespread musculoskeletal pain: findings of a population-based prospective cohort study*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(1): p. 360-71.
113. Uceyler, N., et al., *Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome*. *Brain*, 2013. **136**(Pt 6): p. 1857-67.
114. Hein, G. and S. Franke, *Are advanced glycation end-product-modified proteins of pathogenetic importance in fibromyalgia?* *Rheumatology (Oxford)*, 2002. **41**(10): p. 1163-7.
115. Bagis, S., et al., *Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder?* *Rheumatol Int*, 2005. **25**(3): p. 188-90.

116. Altindag, O. and H. Celik, *Total antioxidant capacity and the severity of the pain in patients with fibromyalgia*. Redox Report, 2006. **11**(3): p. 131-135.
117. Ozgocmen, S., et al., *Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns*. Rheumatology International, 2006. **26**(7): p. 598-603.
118. Chung, C., et al., *Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms*. Clinical Rheumatology, 2009. **28**(4): p. 435-438.
119. Cordero, M.D., et al., *Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia*. Clin Biochem, 2009. **42**(7-8): p. 732-5.
120. Toker, A., et al., *Serum ischemia-modified albumin and malondialdehyde levels and superoxide dismutase activity in patients with fibromyalgia*. Clin Lab, 2014. **60**(10): p. 1609-15.
121. Akbas, A., et al., *Evaluation of some antioxidant enzyme activities (SOD and GPX) and their polymorphisms (MnSOD2 Ala9Val, GPX1 Pro198Leu) in fibromyalgia*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2014. **18**(8): p. 1199-1203.
122. Fatima, G., S.K. Das, and A.A. Mahdi, *Some oxidative and antioxidative parameters and their relationship with clinical symptoms in women with fibromyalgia syndrome*. International Journal of Rheumatic Diseases, 2015: p. n/a-n/a.
123. Wolfe, F., et al., *Mortality in fibromyalgia: a study of 8,186 patients over thirty-five years*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63**(1): p. 94-101.
124. Eich, W., et al., *Das Fibromyalgiesyndrom*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 268-275.
125. Winkelmann, A., et al., *Physiotherapie und physikalische Verfahren beim Fibromyalgiesyndrom*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 276-286.
126. Köllner, V., et al., *Psychotherapie von Patienten mit Fibromyalgiesyndrom*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 291-296.
127. Sommer, C., et al., *Medikamentöse Therapie des Fibromyalgiesyndroms*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 297-310.
128. Langhorst, J., et al., *Komplementäre und alternative Verfahren beim Fibromyalgiesyndrom*. Der Schmerz, 2012. **26**(3): p. 311-317.
129. Edwards, A.M., et al., *Food Supplements in the Treatment of Primary Fibromyalgia: A Double-blind, Crossover Trial of Anthocyanidins and Placebo*. Journal of Nutritional and Environmental Medicine, 2000. **10**(3): p. 189-199.
130. Slater, E.C., *The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin*. Biochim Biophys Acta, 1973. **301**(2): p. 129-54.
131. Othman, E.M., et al., *Insulin-mediated oxidative stress and DNA damage in LLC-PK1 pig kidney cell line, female rat primary kidney cells, and male ZDF rat kidneys in vivo*. Endocrinology, 2013. **154**(4): p. 1434-43.
132. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000. **35**(3): p. 206-21.
133. Rydberg, B. and K.J. Johanson, *Radiation-induced DNA strand breaks and their rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse*. Radiat Res, 1975. **64**(2): p. 281-92.



134. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian-Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **123**(1): p. 291-298.
135. Singh, N.P., et al., *A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells*. Experimental Cell Research, 1988. **175**(1): p. 184-191.
136. Azqueta, A., et al., *Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG*. Mutagenesis, 2013. **28**(3): p. 271-7.
137. Collins, A.R., et al., *Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?* Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 3**: p. 465-9.
138. Rothe, G. and G. Valet, *Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes with Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescin*. Journal of Leukocyte Biology, 1990. **47**(5): p. 440-448.
139. Zhao, H., et al., *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(11): p. 1359-68.
140. Robinson, K.M., et al., *Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(41): p. 15038-15043.
141. Rahman, I., A. Kode, and S.K. Biswas, *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3159-65.
142. Rossi, R., et al., *Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact?* Clin Chem, 2002. **48**(5): p. 742-53.
143. Guntherberg, H. and J. Rost, *The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods*. Anal Biochem, 1966. **15**(2): p. 205-10.
144. Griffith, O.W., *Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine*. Analytical Biochemistry, 1980. **106**(1): p. 207-212.
145. Araujo, A.R., M.L. Saraiva, and J.L. Lima, *Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system*. Talanta, 2008. **74**(5): p. 1511-9.
146. Baehner, R.L., L.A. Boxer, and J. Davis, *The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 1976. **48**(2): p. 309-13.
147. Choi, H.S., et al., *A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells*. J Immunoassay Immunochem, 2006. **27**(1): p. 31-44.
148. Jian, P., et al., *Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 20.
149. Othman, E.M., A. Leyh, and H. Stopper, *Insulin mediated DNA damage in mammalian colon cells and human lymphocytes in vitro*. Mutat Res, 2013. **745-746**: p. 34-9.

150. Rook, G.A., et al., *A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon*. J Immunol Methods, 1985. **82**(1): p. 161-7.
151. Mercado-Pichardo, E., et al., *Reduction capacity of nitroblue tetrazolium (NBT) of sperms from patients with fertility problems*. Arch Invest Med (Mex), 1981. **12**(4): p. 499-503.
152. Gomes, A., E. Fernandes, and J.L. Lima, *Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*. J Biochem Biophys Methods, 2005. **65**(2-3): p. 45-80.
153. Kumar, A., A. Kumar, and S.S. Katiyar, *Activity and kinetic characteristics of glutathione reductase in vitro in reverse micellar waterpool*. Biochim Biophys Acta, 1989. **996**(1-2): p. 1-6.
154. Drabkin, D.L. and J.H. Austin, *SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES: II. PREPARATIONS FROM WASHED BLOOD CELLS; NITRIC OXIDE HEMOGLOBIN AND SULFHEMOGLOBIN*. Journal of Biological Chemistry, 1935. **112**(1): p. 51-65.
155. Moore, G.L., M.E. Ledford, and A. Merydith, *A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl*. Biochem Med, 1981. **26**(2): p. 167-73.
156. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
157. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(6): p. 1841-56.
158. Firuzi, O., et al., *Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1721**(1-3): p. 174-84.
159. Lazze, M.C., et al., *Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells*. Mutat Res, 2003. **535**(1): p. 103-15.
160. Schantz, M., et al., *Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29*. Journal of Berry Research, 2010. **1**(1): p. 25-33.
161. Juadjur, A., et al., *Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and in vitro antioxidative activity testing*. Food Chem, 2015. **167**: p. 418-24.
162. Wilms, L.C., et al., *Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(2): p. 301-7.
163. Patterson, S.J., J.G. Fischer, and R.V. Dulebohn, *DNA damage in HT-29 colon cancer cells is enhanced by high concentrations of the anthocyanin malvidin*. Faseb Journal, 2008. **22**.
164. Lin, Y.-C., P.-F. Tsai, and J.S.-B. Wu, *Protective Effect of Anthocyanidins against Sodium Dithionite-Induced Hypoxia Injury in C6 Glial Cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(24): p. 5603-5608.
165. Belkacemi, A. and C. Ramassamy, *Anthocyanins Protect SK-N-SH Cells Against Acrolein-Induced Toxicity by Preserving the Cellular Redox State*. J Alzheimers Dis, 2016. **50**(4): p. 981-98.

166. Schaefer, S., et al., *Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**(1): p. 24-33.
167. Borkowski, T., et al., *Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(14): p. 5526-34.
168. Fukumoto, L.R. and G. Mazza, *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(8): p. 3597-604.
169. Othman, E.M., H. Hintzsche, and H. Stopper, *Signaling steps in the induction of genomic damage by insulin in colon and kidney cells*. Free Radic Biol Med, 2014. **68**: p. 247-57.
170. Netzel, M., et al., *In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice*. Food Research International, 2002. **35**(2-3): p. 213-216.
171. Arendt, B.M., et al., *Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: a randomized controlled trial (ISRCTN68505294)*. Nutr J, 2005. **4**: p. 33.
172. Dragsted, L.O., et al., *The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(6): p. 1060-72.
173. Collins, A.R., *Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 261S-267S.
174. Sendur, O.F., et al., *Serum antioxidants and nitric oxide levels in fibromyalgia: a controlled study*. Rheumatol Int, 2009. **29**(6): p. 629-33.
175. Myhrstad, M.C.W., et al., *Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(5): p. 386-393.
176. He, J., B.A. Magnuson, and M.M. Giusti, *Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents--impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(8): p. 2859-66.
177. Stintzing, F.C., et al., *Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(21): p. 6172-81.
178. Bornsek, S.M., et al., *Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells*. Food Chem, 2012. **134**(4): p. 1878-84.
179. Ziberna, L., et al., *Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(9): p. 1750-9.
180. Blais, A., P. Aymard, and B. Lacour, *Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers*. Pflugers Arch, 1997. **434**(3): p. 300-5.
181. Jimenez-Fernandez, S., et al., *Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta-analysis*. J Clin Psychiatry, 2015. **76**(12): p. 1658-67.



## Anhang

### Einzelne Messergebnisse der HT-29-Zellkulturversuche

Sowohl die einzelnen Messwerte der Versuche (durchnummeriert mit römischen Zahlen) als auch die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) sind in nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

**Tabelle 18: Einzelwerte im Comet-Assay – Versuchsreihe mit Wasserstoffperoxid.**  
DNA im Schweif in Prozent.

	I	II	III	M	SD
Kontrolle	0,97	0,55	0,60	0,71	0,23
12,5 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	1,18	0,75	1,40	1,11	0,33
25 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	2,00	1,10	2,34	1,81	0,64
50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	3,62	2,47	3,08	3,06	0,58
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	4,54	4,88	9,68	6,36	2,88
200 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	7,47	26,88	47,81	27,39	20,17

**Tabelle 19: Einzelwerte im Comet-Assay – Versuchsreihe mit Delphinidin.**  
DNA im Schweif in Prozent.

	I	II	III	M	SD
Kontrolle	0,68	0,75	0,54	0,66	0,11
Delphinidin 1 $\mu\text{M}$	0,76	1,52	0,94	1,07	0,40
Delphinidin 3,2 $\mu\text{M}$	0,89	1,01	0,81	0,91	0,10
Delphinidin 10 $\mu\text{M}$	0,91	1,08	0,94	0,98	0,09
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	14,12	11,70	10,34	12,05	1,91
Delphinidin 1 $\mu\text{M}$ +100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	11,83	11,10	5,55	9,49	3,44
Delphinidin 3,2 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	9,72	9,13	4,59	7,81	2,80
Delphinidin 10 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	6,88	7,78	4,75	6,47	1,55

**Tabelle 20: Einzelwerte im Comet-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin.**  
DNA im Schweif in Prozent.

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	0,56	0,43	0,85	0,61	0,22
Cyanidin 1 $\mu\text{M}$	0,72	0,59	0,69	0,67	0,07
Cyanidin 3,2 $\mu\text{M}$	0,63	0,64	0,84	0,70	0,12
Cyanidin 10 $\mu\text{M}$	0,83	0,78	1,10	0,90	0,18
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	11,34	9,26	10,42	10,34	1,04
Cyanidin 1 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	7,90	7,57	4,96	6,81	1,61
Cyanidin 3,2 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	5,77	6,19	6,01	5,99	0,21
Cyanidin 10 $\mu\text{M}$ + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	4,23	4,92	4,22	4,46	0,40

**Tabelle 21: Einzelwerte im FPG-Comet Assay - Versuchsreihe mit Cyanidin (C).**  
DNA im Schweif in Prozent.

	I	II	III	IV	V	M	SD
Kontrolle	1,73	1,97	1,13	1,28	2,07	1,64	0,41
Kontrolle + FPG	2,28	4,04	5,85	5,35	3,70	4,24	1,41
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	5,31	7,98	10,59	8,48	9,81	8,43	2,03
100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ + FPG	7,49	11,74	18,08	18,13	19,87	15,06	5,24
1 $\mu\text{M}$ Cyanidin	2,20	2,73	0,64	3,30	3,47	2,47	1,14
1 $\mu\text{M}$ Cyanidin + FPG	3,19	4,50	3,36	5,84	5,49	4,48	1,20
3,2 $\mu\text{M}$ Cyanidin	2,24	2,68	2,02	1,62	2,94	2,30	0,52
3,2 $\mu\text{M}$ Cyanidin + FPG	3,28	10,79	2,57	4,13	6,77	5,51	3,35
10 $\mu\text{M}$ Cyanidin	2,49	2,99	3,03	2,37	2,98	2,77	0,32
10 $\mu\text{M}$ Cyanidin + FPG	3,64	6,07	3,64	4,19	4,43	4,39	1,00
1 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	6,70	5,59	7,04	12,29	10,01	8,33	2,75
1 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ + FPG	10,48	8,82	11,37	20,90	14,98	13,31	4,80
3,2 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	4,29	5,54	7,42	9,93	9,48	7,33	2,44
3,2 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ + FPG	7,91	8,27	10,66	14,70	17,05	11,72	4,03
10 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	5,71	4,56	5,72	12,27	10,04	7,66	3,32
10 $\mu\text{M}$ C + 100 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ + FPG	8,11	7,57	12,82	17,66	11,60	11,55	4,08

**Tabelle 22: Einzelwerte im Glutathion-Recycling-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin (C).**  
 Konzentrationen des Gesamtglutathions (GSH<sub>total</sub>), des oxidierten Glutathions (GSSG) und des reduzierten Glutathions (GSH, berechnet) in nmol/ml in dem HT-29-Zellkulturmodell.

<b>GSH<sub>total</sub></b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	15,37	18,13	11,93	13,78	14,80	2,63
20 µM BSO	8,70	8,19	5,74	5,74	7,09	1,58
200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16,57	15,09	8,38	9,31	12,34	4,10
10 µM Cyanidin	19,52	17,52	14,94	13,90	16,47	2,54
BSO + 10 µM Cyanidin	7,14	10,91	6,46	3,03	6,89	3,23
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,68	9,36	7,86	9,89	8,70	1,10
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 µM C	10,00	9,16	6,88	6,02	8,01	1,87
<b>GSSG</b>						
<b>GSSG</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	0,02	0,06	3,42	0,10	0,90	1,68
20 µM BSO	0,03	-0,93	1,54	0,05	0,17	1,02
200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,00	0,11	4,09	0,10	1,08	2,01
10 µM Cyanidin	0,18	0,17	4,79	0,13	1,32	2,32
BSO + 10 µM Cyanidin	0,05	0,03	1,68	0,14	0,47	0,81
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,02	0,05	2,63	0,21	0,72	1,28
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 µM C	0,13	0,05	1,03	0,24	0,36	0,45
<b>GSH</b>						
<b>GSH</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	15,33	18,01	5,10	13,68	13,03	5,58
20 µM BSO	8,64	10,05	2,65	5,53	6,72	3,30
200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16,57	14,88	0,19	9,05	10,17	7,39
10 µM Cyanidin	19,16	17,18	5,36	13,63	13,83	6,09
BSO + 10 µM Cyanidin	7,05	10,85	3,09	2,60	5,90	3,86
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,72	9,25	2,59	9,41	7,25	3,19
BSO + 200 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 µM C	9,75	9,05	4,81	5,54	7,29	2,47



**Tabelle 23: Einzelwerte im DHE-Assay – Versuchsreihe mit Cyanidin.**

Relative DHE-Fluoreszenz im HT-29-Zellkulturmodell.

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	52,83	35,97	44,56	44,45	8,43
25 µM Antimycin	174,53	148,83	133,27	152,21	20,84
25 µM Antimycin + 5 µM Cyanidin	134,33	121,87	117,65	124,62	8,67
25 µM Antimycin + 10 µM Cyanidin	120,33	113,21	101,20	111,58	9,67
25 µM Antimycin + 20 µM Cyanidin	129,55	115,06	119,80	121,47	7,39

**Tabelle 24: Einzelwerte DHE-Assay – Versuchsreihe mit Delphinidin.**

Relative DHE-Fluoreszenz im HT-29-Zellkulturmodell.

	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
Kontrolle	46,37	50,13	45,57	47,36	2,43
10 µM Delphinidin	46,79	41,36	49,45	45,87	4,12
25 µM Antimycin	90,33	121,06	123,65	111,68	18,53
25 µM Antimycin + 5 µM Delphinidin	69,46	56,06	93,55	73,02	19,00
25 µM Antimycin + 10 µM Delphinidin	66,99	46,38	89,13	67,50	21,38
25 µM Antimycin + 15 µM Delphinidin	64,34	51,18	87,01	67,51	18,13

## Fibromyalgiestudie

Ohne Einschränkung erlaubt sind:	Erlaubt ist ein mäßiger Konsum an:
<b>Getränke</b>	
Koffeinfreie Limonade, Milch, Tees (Anis, Apfel, Fenchel, Orangenschalen, Süßholzwurzel, Zitronengras, Zitronenschalen), Spirituosen (klare), Wasser, Weißwein	Bier, Tees (Früchte, Kräuter, Rooibos), Fruchtsäfte (keine Beerensäfte oder Multivitaminsäfte)
<b>Obst</b>	
Apfel (geschält), Ananas, Aprikose, Avocado, Banane, Birne (geschält), Datteln, Feige, Melone, Mango, Quitte, Rosinen, Zitrone	Apfel ungeschält, Grapefruit, Kiwi, Nektarine, Orange, Pfirsich, Birne ungeschält
<b>Gemüse</b>	
Bohnen (weiß), Blumenkohl, Chinakohl, Eisbergsalat, grüner Salat, Gurke, Karotten, Kartoffeln, Kürbis (gelb), Linsen, Mais, Pilze, Rettich (weiß), Sellerie, Zucchini (geschält), Weißkohl	Bohnen (rot, schwarz), Buchweizen, Broccoli, Knoblauch, Oliven (schwarz, grün), rote Beete, Rotkohl, Salat mit rot gefärbten Blättern (z.B. Lollo Rosso), Sojaprodukte oder -sprossen, Tomaten, Zwiebel
<b>Sonstige Lebensmittel</b>	
Brot, Cashewnüsse, Ei und Ei-Produkte, Erdnüsse, Fisch, Fleisch, Fleischprodukte, Honig, Milchprodukte, Margarine, Nudeln, Rapsöl, Reis (weiß), Salz, Sonnenblumenöl, weiße Schokolade, Wurst, Zucker	Nüsse (Haselnüsse, Mandeln, Pistazien, Walnüsse, Pekannüsse, Olivenöl, Paprika, Pfefferminze, Vollmilchschokolade, sowie alle Produkte die braune Schokolade erhalten)

**Abbildung 37: Ernährungsempfehlungen für eine anthocyanarme Ernährung während der Einwaschphase der Fibromyalgiestudie.**

**Tabelle 25: Zusätzliche persönliche Daten der Fibromyalgiepatienten: Codierung, Alter, Geschlecht, Gewicht, weitere Diagnosen, Medikamenteneinnahme.**

(chron. = chronisch, bds.=beidseitig, Z. n. = Zustand nach)

Patient	Daten	Diagnosen	Medikamente
AA	52 J., w, 102 kg	Hypertonus, Hypothyreose, Neurodermitis, Arthrose	Venlafaxin, Saroten, Topiramal
AB	62 J., w, 67 kg	Struma multinodosa	Lyrica, Amitryptilin
AC	72 J., w, 81 kg	Asthma, Hypertonus, Hyperurikämie, Polyarthrose der Finger, Z.n. Hysterektomie	Amitryptilin
AD	49 J., w, 51 kg	Spannungskopfschmerz, Rosazea, Z.n. Hysterektomie	-
AE	53 J., w, 77 kg	chron. Spannungskopfschmerz, Migräne, DM Typ 2, Hyperlipoproteinämie, Steatosis hepatitis, Sigmadivertikulitis, Jodmangelstruma, Z.n. Hysterektomie, chron. Knieschmerz, Coxarthrose	-
AF	52 J., m, 141 kg	Hypertonus, Z.n. absoluter Arrhythmie bei Vorhofflimmern, Asthma, chron. Sinusitis, AV-Block I	Amitryptilin, Cymbalta
AG	55 J., w, 82 kg	Hypertonus, Faktor V Leiden, Z.n. Strumektomie, selektiver Ig G - Subklassenmangel	-
AH	53 J., w, 77 kg	nicht- entzündliches WS-Syndrom, Z.n. HWS-Spinalkanalstenosen-OP, Spondylolisthese, Levatorensyndrom, GERD	Duloxetin, L-Thyrox
AI	70 J., w, 68 kg	chron. Spannungskopfschmerz, Asthma, Z.n. Hysterektomie	Amitryptilin, Valsartan, Metobeta, Omebeta, Ventolais, Vitamin D
AJ	62 J., w, 90 kg	Migräne, Gesichtsschmerz, Gonarthrose bds., chron. Osteomyelitis Großzehe links	Gabapentin, Venlafaxin, Procain

AK	41 J., w, 65 kg	Hypothyreose, allergische Rhinokonjunktivitis	L-Thyrox, Ibuprofen, Omeprazol
AL	57 J., w, 64 kg	chron. Spannungskopfschmerz, Hypotonieneigung, Skoliose, Z.n. Appendektomie und Tonsillektomie	-
AM	51 J., w, 81,5 kg	Hypertonus, Hypothyreose, Hyperlipidämie, Z.n. Menigeom-OP, Hypakusis	Imipramin, L-Thyrox, Simvastatin, Losartan/MCT
AN	49 J., w, 53 kg	Rizathrose bds, Karpaltunnelsyndrom bds, Hypertonus, COPD, Ig G-mangel	Ramipril, Metoprolol, Ibuprofen, Doxepin
AO	47 J., w, 90 kg	chron. Hüftgelenksschmerzen bei rheumatoider Arthritis, Glaukom bds., Hypothyreose, erosive Antrumgastritis, Skoliose BWS und LWS	Citalopram, Mirtazapin, L-Thyrox, Prednisolon, Sulfasalazin, Pantoprazol, Tramal, Katadolon
AP	60 J., w, 70 kg	Migräne, Hypertonus, Hyperthyreose, Hypercholesterinämie, Rezidivstruma, chron. Lumbalsyndrom	Metoprolol, L-Thyrox, Elontril, Lafamme
AQ	58 J., w, 79 kg	Hypothyreose, kongenitale Hüftgelenkdysplasie	Spiriva
AR	54 J., w, 100 kg	Hypertonus, Cholezystolithiasis, Laktoseintoleranz	Amitryptilin
AS	52 J., w, 71 kg	Ig G-Mangel, Z.n. Hysterektomie, Appendektomie	L-Thyrox, Johanniskraut, Pregabalin, Tilidin/Naloxon, Travoprost

**Tabelle 26: Einzelwerte NBT-Assay - Absorption nach 60 Minuten Inkubation bei 620 nm.**  
 Absorptionswerte der Patientenproben (AX) und der Kontrollgruppe (X) zum Zeitpunkt I, II und III jeweils mit und ohne Insulin. Die Einzelwerte stellen die Mittelwerte der Absorptionen aus jeweils 3 Vertiefungen der Mikrotiterplatte dar. AA, A, B zum Zeitpunkt I nicht mit Insulin gemessen, keine Probe von AQ zum Zeitpunkt III erhalten (Studienabbruch), AS Zeitpunkt II Messfehler.

Patienten	I	II	III	I + Insulin	II + Insulin	III + Insulin
AA	0,123	0,112	0,075		0,210	0,151
AB	0,062	0,065	0,062	0,090	0,245	0,290
AC	0,075	0,063	0,067	0,308	0,149	0,264
AD	0,136	0,069	0,054	0,407	0,272	0,287
AE	0,094	0,056	0,081	0,137	0,340	0,205
AF	0,165	0,058	0,070	0,160	0,263	0,213
AG	0,088	0,072	0,057	0,147	0,171	0,439
AH	0,060	0,085	0,088	0,286	0,111	0,286
AI	0,059	0,114	0,056	0,299	0,185	0,118
AJ	0,055	0,073	0,276	0,335	0,246	0,104
AK	0,062	0,058	0,072	0,186	0,104	0,106
AM	0,083	0,113	0,073	0,160	0,100	0,150
AN	0,060	0,100	0,055	0,098	0,116	0,096
AO	0,057	0,073	0,055	0,099	0,167	0,145
AP	0,073	0,056	0,094	0,162	0,093	0,227
AQ	0,060	0,069		0,179	0,144	
AR	0,079	0,058	0,095	0,130	0,160	0,180
AS	0,070		0,096	0,169	0,125	0,161
AT	0,060	0,059	0,084	0,184	0,140	0,169

Kontrollen	I	II	III	I + Insulin	II + Insulin	III + Insulin
A	0,060	0,088	0,057		0,123	0,139
B	0,063	0,086	0,093		0,145	0,157
C	0,113	0,055	0,071	0,126	0,341	0,127
D	0,072	0,075	0,068	0,307	0,236	0,141
E	0,060	0,060	0,066	0,228	0,439	0,157
F	0,096	0,053	0,057	0,120	0,342	0,167
G	0,124	0,051	0,059	0,115	0,294	0,126
H	0,075	0,064	0,063	0,153	0,318	0,128
J	0,081	0,054	0,056	0,095	0,270	0,193
K	0,069	0,060	0,093	0,121	0,119	0,243

**Tabelle 27: Einzelwerte im FRAP-Assay – FRAP im Plasma in  $\mu\text{Mol/ml}$ .**

Aufgelistet sind die Werte der Patienten (AX) und der Kontrollgruppe (X) zum Zeitpunkt I, II, und III dar. Die Einzelwerte stellen jeweils die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen dar. Keine Probe von AQ zum Zeitpunkt III erhalten (Studienabbruch).

Patienten	I	II	III
AA	1,47	1,33	1,48
AB	1,03	1,01	1,25
AC	1,32	1,37	1,28
AD	1,00	1,30	1,17
AE	1,44	1,24	1,45
AF	1,21	1,38	1,52
AG	1,22	1,16	1,20
AH	1,12	1,63	1,20
AI	1,60	1,61	1,32
AJ	1,74	1,98	1,68
AK	0,91	1,06	0,73
AM	1,13	1,15	1,17
AN	1,08	1,27	1,09
AO	1,31	1,35	1,38
AP	1,25	1,38	1,26
AQ	1,11	1,18	
AR	1,06	1,06	1,27
AS	1,26	1,38	1,15
AT	1,18	1,16	1,05

Kontrollen	I	II	III
A	1,07	1,21	1,47
B	1,37	1,18	1,38
C	1,50	1,47	1,55
D	1,12	1,30	1,23
E	0,94	1,24	1,30
F	1,51	1,43	1,52
G	1,75	1,36	1,47
H	1,09	1,07	0,89
J	1,43	1,04	0,92
K	0,95	0,89	0,87

**Tabelle 28: Einzelwerte DCF - Assay.**

DCF-Fluoreszenz der Patienten (AX) und der Kontrollen (X) zum Zeitpunkt I,II und III. Unterstrichene Werte wurden erst nach 24 Stunden gemessen. A, B zum Zeitpunkt I nicht gemessen, keine Probe von AQ zum Zeitpunkt III erhalten (Studienabbruch).

Patienten	I	II	III
AA		141,9	328,5
AB	220,2	322,2	56,8
AC	159,6	932,6	783,4
AD	183,7	744,1	296,9
AE	338,0	<u>6283,0</u>	793,4
AF	700,0	<u>7237,5</u>	357,7
AG	147,6	205,5	194,2
AH	273,4	234,6	872,2
AI	317,4	223,4	188,4
AJ	338,3	223,9	199,0
AK	694,1	518,4	665,7
AM	168,0	283,4	123,8
AN	1193,6	981,0	283,7
AO	645,8	749,0	370,9
AP	174,8	96,0	159,7
AQ	191,7	153,2	
AR	222,1	105,3	171,4
AS	569,4	81,4	1054,1
AT	313,5	106,9	1140,0

Kontrollen	I	II	III
A		92,0	71,4
B		122,9	93,0
C	159,5	<u>3248,1</u>	101,2
D	147,3	955,0	178,9
E	161,2	126,5	185,5
F	185,1	<u>5697,0</u>	126,8
G	258,8	<u>8192,4</u>	99,0
H	57,0	2052,8	180,7
J	182,7	252,0	110,2
K	339,1	107,2	82,3

**Tabelle 29: Einzelwerte des Glutathion-Recycling-Assays in Erythrozyten.**

Aufgelistet sind die Werte des Gesamtglutathions ( $GSH_{total}$ ), des oxidierten Glutathions (GSSG) und des reduzierten Glutathions (GSH) zu allen drei Zeitpunkten (I,II und III) jeweils für Patienten (AX) und Kontrollen (X). Einheit: nmol/mg HB. Keine Probe von AQ zum Zeitpunkt III erhalten (Studienabbruch).

Patienten	$GSH_{total}$			GSSG			GSH		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
AA	2,33	3,60	3,37	0,03	0,04	0,07	2,26	3,53	3,37
AB	3,57	3,97	3,35	0,05	0,01	0,03	3,48	3,95	3,29
AC	2,67	2,28	3,12	0,05	0,07	0,07	2,57	2,14	2,99
AD	4,13	5,02	3,63	0,14	0,12	0,08	3,85	4,79	3,46
AE	3,58	3,31	2,22	0,05	0,00	0,02	3,49	3,30	2,18
AF	1,60	3,26	2,19	0,10	0,02	0,12	1,40	3,21	1,95
AG	4,45	5,07	7,01	0,09	0,05	0,11	4,28	4,97	6,79
AH	2,29	4,52	3,48	0,01	0,05	0,07	2,26	4,41	3,34
AI	4,98	5,60	5,58	0,04	0,08	0,10	4,90	5,44	5,38
AJ	1,41	3,42	2,14	0,01	0,03	0,01	1,39	3,36	2,12
AK	3,59	4,39	3,53	0,02	0,03	0,06	3,54	4,33	3,40
AM	3,95	3,13	4,11	0,04	0,04	0,06	3,87	3,04	3,99
AN	2,68	5,49	3,90	0,03	0,21	0,16	2,62	5,08	3,58
AO	2,86	2,81	4,97	0,05	0,05	0,11	2,76	2,70	4,74
AP	3,11	3,28	3,44	0,05	0,12	0,11	3,01	3,04	3,22
AQ	3,48	5,46		0,07	0,10		3,34	5,26	
AR	1,97	3,19	2,82	0,05	0,06	0,02	1,88	3,07	2,78
AS	2,43	2,72	2,23	0,06	0,10	0,09	2,31	2,52	2,05
AT	2,97	2,36	2,39	0,05	0,04	0,04	2,87	2,28	2,31

Kontrollen	$GSH_{total}$			GSSG			GSH		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	4,07	4,40	4,56	0,07	0,20	0,07	3,92	4,01	4,41
B	2,85	3,35	2,58	0,05	0,06	0,09	2,75	3,23	2,39
C	3,02	2,64	2,73	0,12	0,02	0,03	2,78	2,59	2,68
D	3,00	2,98	4,01	0,04	0,12	0,08	2,93	2,75	3,86
E	1,71	2,37	1,74	0,04	0,14	0,07	1,62	2,09	1,60
F	2,30	2,50	2,88	0,10	0,05	0,05	2,11	2,41	2,78
G	2,67	2,88	3,89	0,05	0,04	0,05	2,57	2,79	3,79
H	2,98	3,28	2,64	0,07	0,08	0,04	2,84	3,13	2,55
J	3,88	4,09	5,01	0,08	0,01	0,06	3,72	4,06	4,90
K	2,52	2,41	2,82	0,03	0,03	0,09	2,46	2,35	2,65



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Helga Stopper, die mir die Durchführung der Doktorarbeit in ihrem Labor ermöglichte und mich während der gesamten Zeit darin unterstützte.

Vielen Dank an Frau Dr. Malgorzata Burek für die Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Eylül Bankoglu danke ich für die hervorragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit, insbesondere für die Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden und die gute Zusammenarbeit im Fibromyalgieprojekt.

Den Studienpartnern aus der Schmerzambulanz der Uniklinik Würzburg sowie allen Probanden danke ich herzlich für die Realisierung der Rotsaftstudie.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Toxikologie gilt mein Dank für die Unterstützung der praktischen Arbeit und das angenehme Arbeitsklima. Frau Katharina Taichrib danke ich sehr für ihre zahlreichen Anmerkungen zur schriftlichen Ausarbeitung.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Bruder, Nikolai Arnaudov, für die Hilfe bei technischen Fragen (nicht nur bei dieser Arbeit), für das Korrekturlesen und für seine Zuverlässigkeit herzlich bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Freunden in Würzburg für den Austausch und die Unterstützung während des Studiums, Frank Meyer für seine Geduld, Motivation und die gemeinsame Zeit und meiner Familie. Vor allem möchte ich meinen Eltern, Dr. Konstantin und Claudia Arnaudov, danken, auf deren liebevolle Unterstützung ich immer zählen kann. Danke für alles.

