

**Effekte von Bestandteilen und Metaboliten
eines Rindenextraktes von *Pinus maritima* (Pycnogenol®)
auf pathophysiologische Aspekte des
metabolischen Syndroms**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Angelika Ingrid Schäfer
aus Aschaffenburg

Würzburg 2007

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Professor Dr. Petra Högger

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tanja Grimm, Angelika Schäfer, Petra Högger

Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol)

Free Radical Biology and Medicine, 2004, Vol. 36, No. 6, pp. 811–822

Angelika Schäfer, Zuzana Chovanová, Jana Muchová, Katarína Sumegová, Anna Liptáková, Zdeňka Ďuračková, Petra Högger

Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol)

Biomedicine and Pharmacotherapy, 2005, Vol. 60, pp. 5–9

Angelika Schäfer, Petra Högger

Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit α -glucosidase

Diabetes Research and Clinical Practice, 2007, Vol. 77, pp. 41–46

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Zunächst einmal gebührt dieser Dank vor allem Frau Professor Dr. Petra Högger für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, ihre engagierte Betreuung, das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und für zahlreiche Anregungen.

Weiterhin all denjenigen ein herzliches Dankeschön, die mir direkt oder indirekt bei der Durchführung und Vollendung meiner Arbeit geholfen haben. Im Besonderen schulde ich folgenden Personen Dank:

- ◆ Frau Professor Dr. Zdeňka Ďuračková von der Medizinischen Fakultät der Comenius Universität, Bratislava, Slowakei, für die Überlassung der Serumproben der Studienteilnehmer.
- ◆ Dem Arbeitskreis von Frau Professor Dr. Tanja Schirmeister für die Synthese der beiden Metabolite δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton.
- ◆ Frau Schulze Elfringhoff (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster) für die Auftrennung des Kiefernridenextraktes in seine Fraktionen.
- ◆ Herrn Dr. Jörg Slaghuis und Herrn Andreas Götz, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg, für die fachkundige Einweisung in die Durchflusszytometrie und die Möglichkeit, jederzeit das Durchflusszytometer zu benutzen.
- ◆ Frau Doris Moret, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Würzburg, für das Autoklavieren sämtlicher Sterilgüter.
- ◆ Der Firma Horphag Research, Genf, Schweiz, für die Bereitstellung des Rindenextraktes und ihre finanzielle Unterstützung.

- ◆ Meinem lieben Arbeitskreis sowie ehemaligen, bereits promovierten Kollegen für die tolle Zeit, das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit sowie ihre erfahrene Unterstützung; im besonderen Herrn Dr. Anagnostis Valotis und Herrn Dr. Matthias Freiwald für ihre geduldige Hilfestellung bei manch technischem Problem.
- ◆ Meinen Kollegen des Biochemie-Praktikums für die gute Zusammenarbeit bei der „Bändigung“ und „Motivation zur Eigenverantwortlichkeit“ der Studenten.
- ◆ Herrn Dr. Matthias Reichert, Herrn Dipl. Chemiker Martin König und Herrn Dr. Eberhard Heller für angeregte Diskussionen über chemische, synthetische und computertechnische Fragestellungen und für ihre Unterstützung in universitären und außeruniversitären Angelegenheiten.
- ◆ All meinen Freunden für ihre zahllosen Bemühungen, mich bei meiner Promotion zu unterstützen, zu motivieren oder abzulenken.
- ◆ Frau Dr. med. Karin Fiedler für ihre jahrelange Freundschaft, ihren Beistand in allen Lebenslagen, ihre medizinischen Fachkenntnisse und vor allem ihre Aufmunterungen und Anfeuerungen während des Studiums, der Diplomarbeit und meiner Promotion.
- ◆ Meiner Familie, die mich während meines Studiums, meiner Diplomarbeit und nicht zuletzt bei meiner Promotion bestmöglich unterstützt hat.
- ◆ And last but not least Capt. Curt Martin for his patience, understanding, support, and love while I was doing my PhD studies, his constant efforts to cheer me up and to take my mind off everyday stress.

Vielen herzlichen Dank!

Um Fehler zu vermeiden,

braucht man Erfahrung.

Um Erfahrung zu haben,

muss man Fehler machen.

Peter der Große

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| A | EINLEITUNG | 1 |
| 1 | Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus in Deutschland..... | 3 |
| 2 | Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2..... | 4 |
| 3 | Gesundheitsrisiken und Komplikationen des Diabetes mellitus | 5 |
| 4 | Präventive Maßnahmen | 6 |
| 5 | Konventionelle Therapie..... | 8 |
| 5.1 | Basistherapie | 8 |
| 5.2 | Orale Antidiabetika..... | 8 |
| 5.2.1 | Glucoseresorptionshemmer | 9 |
| 5.2.2 | Insulinotrope orale Antidiabetika (Insulin-Sekretagoga) | 9 |
| 5.2.3 | Biguanide..... | 10 |
| 5.2.4 | Insulin-Sensitizer | 10 |
| 5.3 | Insulintherapie..... | 11 |
| 6 | Nahrungsergänzungsmittel und Phytotherapeutika zur glykämischen Kontrolle bei Diabetes mellitus | 11 |
| 6.1 | Ginseng (<i>Panax ginseng</i> , <i>Panax quinquefolius</i>)..... | 12 |
| 6.2 | Efeukürbis (<i>Coccinia indica</i>)..... | 13 |
| 6.3 | Bittermelone (<i>Momordica charantia</i>) | 13 |
| 6.4 | Zimt (<i>Cinnamomum verum</i> , <i>Cinnamomum cassia</i>) | 14 |
| 6.5 | Teufelskralle (<i>Harpagophytum procumbens</i>) | 15 |
| 6.6 | Copalchirinde (<i>Hintonia latiflora</i>) | 15 |
| 6.7 | Bockshornklee (<i>Trigonella foenum graecum</i>)..... | 16 |
| 7 | Pharmakologische Eigenschaften von Pycnogenol | 16 |
| 7.1 | Erniedrigung des Blutzuckerspiegels | 17 |
| 7.2 | Makrovaskuläre Komplikationen und diabetisches Syndrom | 17 |
| 7.3 | Mikrovaskuläre Komplikationen..... | 18 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 7.4 | Ulkus cruris venosum | 18 |
| 7.5 | Diabetische Retinopathie | 19 |
| | Zielsetzung der Arbeit | 20 |
| B | ALLGEMEINER TEIL | 23 |
| 1 | Flavonoide | 25 |
| 1.1 | Klassifizierung der Flavonoide | 25 |
| 1.2 | Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung | 25 |
| 1.3 | Bioverfügbarkeit von Flavonoiden | 27 |
| 1.4 | Absorption und Metabolismus von Flavonoiden | 28 |
| 1.5 | Absorption und Metabolismus von Pycnogenol | 32 |
| 2 | Antioxidative und Radikalfänger-Eigenschaften von phenolischen Verbindungen | 35 |
| 2.1 | Antioxidantien in Nahrungsmitteln und Pflanzen | 35 |
| 2.1.1 | Antioxidantien | 36 |
| 2.1.2 | Reaktive Sauerstoffspezies | 37 |
| 2.1.2.1 | Entstehung freier Radikale | 37 |
| 2.1.2.1.1 | Das Superoxidanionradikal | 38 |
| 2.1.2.1.2 | Wasserstoffperoxid | 39 |
| 2.1.2.1.3 | Das Hydroxylradikal | 39 |
| 2.1.2.2 | Pathologie reaktiver Sauerstoffspezies | 40 |
| 2.1.2.3 | Physiologische Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies | 41 |
| 2.1.3 | Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von polyphenolischen Substanzen | 42 |
| 2.1.4 | Mechanismen der Hemmung von radikalischen Spezies | 43 |
| 2.2 | Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernridenextraktes mittels FRAP-Assay | 44 |
| 2.2.1 | Mechanistische Grundlagen des FRAP-Assays | 44 |
| 2.2.2 | Der EC ₁ - Wert | 44 |
| 2.2.3 | Ergebnisse des FRAP-Assays der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol | 44 |
| 2.2.3.1 | Reaktionskinetiken | 45 |
| 2.2.3.2 | Dosis-Effekt-Beziehung | 46 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.3.3 | EC ₁ -Werte | 46 |
| 2.2.4 | Diskussion der Ergebnisse des FRAP-Assays der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol | 48 |
| 2.2.5 | Ergebnisse des FRAP-Assays der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol | 50 |
| 2.2.6 | Diskussion der Ergebnisse des FRAP-Assays der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol | 52 |
| 2.3 | Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernextraktes mittels DPPH-Assay | 55 |
| 2.3.1 | Allgemeine Grundlagen des DPPH-Assays | 55 |
| 2.3.2 | Mechanismus der zugrundeliegenden Reaktion | 55 |
| 2.3.3 | Ergebnisse des DPPH-Assays | 56 |
| 2.3.3.1 | Reaktionskinetiken | 56 |
| 2.3.3.2 | IC ₅₀ -Werte | 57 |
| 2.3.3.3 | Antiradikalische Aktivität und Stöchiometrie | 59 |
| 2.3.4 | Diskussion der Ergebnisse des DPPH-Assays | 61 |
| 2.3.4.1 | Strukturelle Merkmale der untersuchten Substanzen | 61 |
| 2.3.4.2 | Reaktionskinetiken der untersuchten Verbindungen | 63 |
| 2.3.4.3 | Antiradikalische Aktivität und stöchiometrisches Verhältnis | 64 |
| 2.4 | Vergleich von DPPH-, FRAP- und anderen Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität | 68 |
| 2.4.1 | Gegenüberstellung der Methoden von DPPH- und FRAP-Assay | 68 |
| 2.4.2 | Vergleich verschiedener <i>in vitro</i> Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Nahrungsbestandteilen und Pflanzenextrakten | 68 |
| 2.4.3 | Vergleich diverser <i>ex vivo</i> Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Plasma bzw. Serum | 71 |
| 3 | Antiinflammatorische Eigenschaften von phenolischen Pflanzenwirkstoffen | 73 |
| 3.1 | Inflammation und Diabetes | 73 |
| 3.1.1 | Inflammatorische Mediatoren | 74 |
| 3.1.2 | Entzündungshemmende Eigenschaften von Pflanzenextrakten | 75 |
| 3.2 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA | 77 |
| 3.2.1 | Bedeutung von TNF- α | 77 |
| 3.2.2 | Sekretionskaskade von TNF- α | 78 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.3 | Pathologische Aktivität von TNF- α | 79 |
| 3.2.4 | Physiologische Rolle von TNF α | 80 |
| 3.2.5 | Beeinflussung der TNF- α Produktion durch Pflanzenextrakte | 81 |
| 3.2.6 | Prinzip des TNF- α ELISA..... | 82 |
| 3.2.7 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Serumproben und Metaboliten von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten | 83 |
| 3.2.7.1 | Ergebnisse der Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten | 84 |
| 3.2.7.2 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten | 86 |
| 3.2.7.3 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von M1, M2 und (+)-Catechin auf die TNF- α Sekretion nach Vorinkubation mit TNF- α .. | 87 |
| 3.2.7.4 | TNF- α ELISA der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol..... | 89 |
| 3.2.7.5 | TNF- α ELISA der Serumproben nach Einmalgabe von Pycnogenol ... | 90 |
| 3.2.8 | Diskussion der Ergebnisse des TNF- α ELISA..... | 92 |
| 3.3 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 <i>ex vivo</i> | 97 |
| 3.3.1 | Die Arachidonsäurekaskade – Mechanismus der Enzymkatalyse..... | 98 |
| 3.3.2 | Funktionen der Cyclooxygenase-Enzyme | 100 |
| 3.3.2.1 | Gemeinsamkeiten der COX-Enzyme | 100 |
| 3.3.2.2 | Cyclooxygenase-1 | 101 |
| 3.3.2.3 | Cyclooxygenase-2 | 101 |
| 3.3.2.4 | Cyclooxygenase-3 | 102 |
| 3.3.3 | Molekulare Grundlagen und Struktur der COX-Proteine | 102 |
| 3.3.4 | Bedeutung der durch COX generierten Prostaglandine | 103 |
| 3.3.5 | COX-Inhibitoren | 103 |
| 3.3.6 | Klassifizierung der COX Inhibitoren | 104 |
| 3.3.7 | Prinzip des COX-Assays..... | 105 |
| 3.3.8 | Ergebnisse der Untersuchungen der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 <i>ex vivo</i> | 106 |
| 3.3.8.1 | Auswirkungen der wiederholten Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität <i>ex vivo</i> | 106 |
| 3.3.8.2 | Auswirkungen der einmaligen Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität <i>ex vivo</i> | 108 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.8.3 | Untersuchung der Wirkung von M1 auf die Aktivität von COX..... | 111 |
| 3.3.9 | Diskussion der Ergebnisse des COX-Assays..... | 112 |
| 4 | Blutglucosesenkende Eigenschaften von phenolischen Verbindungen | 116 |
| 4.1 | Verbesserung der metabolischen Kontrolle durch orale Antidiabetika und Pflanzenwirkstoffe | 116 |
| 4.1.1 | Thiazolidindione – die konventionelle Therapie bei Typ 2 Diabetes | 116 |
| 4.1.2 | Antidiabetische Eigenschaften von Pycnogenol..... | 117 |
| 4.2 | Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernextraktes auf die Aktivität der α -Glucosidase..... | 118 |
| 4.2.1 | Das Enzym α -Glucosidase..... | 118 |
| 4.2.2 | α -Glucosidase-Inhibitoren..... | 119 |
| 4.2.3 | Prinzip des α -Glucosidase-Assays..... | 119 |
| 4.2.4 | Ergebnisse des α -Glucosidase-Assays..... | 119 |
| 4.2.4.1 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol und seinen Bestandteilen auf die Aktivität der α -Glucosidase..... | 119 |
| 4.2.4.2 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Fraktionen von Pycnogenol auf die Aktivität der α -Glucosidase | 121 |
| 4.2.5 | Diskussion der Ergebnisse des α -Glucosidase-Assays..... | 122 |
| 4.3 | Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Metaboliten von Pycnogenol auf die Aktivierung von PPAR- γ in humanen Monocyten.. | 126 |
| 4.3.1 | Die Bedeutung der PPARs..... | 126 |
| 4.3.2 | PPAR Isotypen | 126 |
| 4.3.3 | Strukturelle Eigenschaften von PPAR- γ | 127 |
| 4.3.4 | Biologische Effekte durch Aktivierung von PPAR- γ | 127 |
| 4.3.5 | Mechanismus der transskriptionellen Transaktivierung der PPARs..... | 127 |
| 4.3.6 | Subtyp selektive PPAR- γ Agonisten..... | 129 |
| 4.3.6.1 | Endogene PPAR- γ Liganden | 129 |
| 4.3.6.2 | Synthetische PPAR γ Liganden | 129 |
| 4.3.6.3 | Pflanzliche PPAR- γ Liganden | 130 |
| 4.3.7 | Entwicklung des ELISA für PPAR- γ | 130 |
| 4.3.8 | Ergebnisse des PPAR- γ ELISA..... | 132 |
| 4.3.8.1 | Ergebnisse der Vorversuche – Variation von Konzentration und Inkubationszeit der Agonisten..... | 133 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3.8.2 | Ergebnisse der Vorversuche – Untersuchung der cytosolischen Extrakte aus humanene Monocyten auf PPAR- γ | 133 |
| 4.3.8.3 | Ergebnisse der Vorversuche mit Makrophagen und Adipocyten | 134 |
| 4.3.8.4 | Ergebnisse des PPAR- γ ELISAs nach Inkubation der Zellen mit M1 bzw. Rosiglitazon..... | 135 |
| 4.3.9 | Diskussion der Ergebnisse des PPAR- γ ELISA..... | 136 |
| 4.4 | Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Metaboliten von Pycnogenol auf die GLUT-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie | 141 |
| 4.4.1 | Grundlagen der Durchflusszytometrie..... | 141 |
| 4.4.2 | Aufbau eines Durchflusszytometers..... | 142 |
| 4.4.3 | Prinzip der optischen Quantifizierung von Oberflächenbestandteilen oder intrazellulären Proteinen | 143 |
| 4.4.4 | Detektoren und Fluoreszenzfarbstoffe | 144 |
| 4.4.5 | Der Glucose-Transport | 145 |
| 4.4.6 | Klassifizierung der Glucosetransporter..... | 146 |
| 4.4.7 | Der Glucosetransporter GLUT-4 | 147 |
| 4.4.8 | Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen | 148 |
| 4.4.8.1 | Ergebnisse der Vorversuche – Untersuchung der unspezifischen Bindungen | 148 |
| 4.4.8.2 | Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin | 149 |
| 4.4.9 | Diskussion der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Exocytose von GLUT-4..... | 151 |
| 5 | Antiadipogene Eigenschaften von phenolischen Pflanzenwirkstoffen | 155 |
| 5.1 | Adipositas und Diabetes | 155 |
| 5.2 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten..... | 156 |
| 5.2.1 | Mechanismus der Adipogenese..... | 156 |
| 5.2.2 | Wirkungen von Pycnogenol auf Lipolyse und Lipogenese..... | 157 |
| 5.2.3 | Ergebnisse des Oil Red O Assays | 158 |
| 5.2.3.1 | Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung | 158 |
| 5.2.3.2 | Ergebnisse der Hemmung der intrazellulären Lipidakkumulation durch Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol..... | 160 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.4 | Diskussion der Ergebnisse..... | 164 |
| C | EXPERIMENTELLER TEIL | 169 |
| 1 | Häufig verwendete Substanzen und Proben..... | 171 |
| 1.1 | Der Kiefernrintenextrakt: Fraktionen, Bestandteile und Metabolite | 171 |
| 1.2 | Herkunft der Serumproben für <i>ex vivo</i> pharmakodynamische Untersuchungen..... | 172 |
| 1.2.1 | Probandenkollektiv..... | 172 |
| 1.2.2 | Diätvorschriften..... | 172 |
| 1.2.3 | Proben nach einmaliger Einnahme von Pycnogenol | 172 |
| 1.2.4 | Proben nach wiederholter Einnahme von Pycnogenol (<i>steady state</i> Proben)..... | 173 |
| 1.3 | Humane Monocyten für <i>in vitro</i> Untersuchungen | 173 |
| 1.4 | Humane Adipocyten für <i>in vitro</i> Untersuchungen..... | 174 |
| 1.5 | 3T3-Zellen für <i>in vitro</i> Untersuchungen | 174 |
| 2 | Häufig verwendete Lösungen und Medien..... | 175 |
| 2.1 | Herkunft häufig verwendeter Lösungen und Medien..... | 175 |
| 2.2 | Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Medien | 176 |
| 3 | Häufig verwendete Geräte | 177 |
| 4 | Häufig verwendete Methoden..... | 178 |
| 4.1 | Isolierung humaner Monocyten aus Blutzellkonzentraten | 178 |
| 4.1.1 | Geräte und Materialien | 178 |
| 4.1.2 | Umrechnung der relativen Zentrifugalbeschleunigung in Umdrehungen pro Minute..... | 179 |
| 4.1.3 | Protokoll der Isolierung | 179 |
| 4.1.3.1 | Aufkonzentration der Blutzellkonzentrate..... | 179 |
| 4.1.3.2 | Der erste Dichtegradient..... | 180 |
| 4.1.3.3 | Der zweite Dichtegradient..... | 181 |
| 4.2 | Kultivierung humaner Monocyten..... | 181 |
| 4.3 | Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Kulturbedingungen..... | 182 |
| 4.3.1 | Beschreibung der Zählkammer | 182 |
| 4.3.2 | Füllen der Zählkammer | 183 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3.3 | Auszählen der Zellen | 184 |
| 4.4 | Kultivierung humaner Adipocyten..... | 185 |
| 4.5 | Kultivierung und Differenzierung von 3T3-Zellen | 185 |
| 4.6 | Statistische Auswertung..... | 186 |
| 5 | Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels FRAP-Assay | 187 |
| 5.1 | Chemikalien und Reagenzien | 187 |
| 5.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 187 |
| 5.3 | Reduktion von Eisen durch die FRAP-Reaktion..... | 188 |
| 6 | Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels DPPH-Assay.... | 189 |
| 6.1 | Chemikalien und Reagenzien | 189 |
| 6.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 189 |
| 6.3 | Quenching des DPPH-Radikals | 189 |
| 7 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF-α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA | 191 |
| 7.1 | Stimulation humaner Monocyten zur Sekretion von TNF- α | 191 |
| 7.1.1 | Chemikalien und Reagenzien | 191 |
| 7.1.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 191 |
| 7.1.3 | Untersuchung der Wirkung von Serumproben auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten | 191 |
| 7.1.4 | Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten..... | 192 |
| 7.1.5 | Untersuchung der Wirkung der Metabolite sowie (+)-Catechin auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten nach Vorinkubation mit TNF- α .. | 192 |
| 7.1.6 | Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten | 193 |
| 7.2 | Quantitative Bestimmung der humanen TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA | 193 |
| 7.2.1 | Chemikalien und Reagenzien | 193 |
| 7.2.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards..... | 193 |
| 7.2.3 | Protokoll des TNF- α ELISA..... | 194 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 7.2.4 | Berechnung der Ergebnisse des TNF- α ELISA..... | 195 |
| 8 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 ex vivo..... | 196 |
| 8.1 | Geräte und Materialien..... | 196 |
| 8.2 | Chemikalien und Reagenzien | 196 |
| 8.3 | Herstellung der verwendeten Lösungen des Pre-Assays..... | 197 |
| 8.4 | Protokoll der COX-Reaktion (Pre-Assay) | 197 |
| 8.5 | Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards des Enzym-Immuno-Assays (EIA) | 198 |
| 8.6 | Protokoll des Enzym-Immuno-Assays..... | 198 |
| 8.7 | Berechnung der Ergebnisse des COX-Assays..... | 199 |
| 9 | Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernrintenextraktes auf die Aktivität der α-Glucosidase..... | 201 |
| 9.1 | Geräte und Materialien..... | 201 |
| 9.2 | Chemikalien und Reagenzien | 201 |
| 9.3 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 201 |
| 9.4 | Protokoll der Hemmung von α -Glucosidase..... | 202 |
| 9.5 | Berechnung der Ergebnisse des α -Glucosidase Assays | 202 |
| 10 | Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PPAR-γ in humanen Monocyten | 203 |
| 10.1 | Stimulation humaner Monocyten zur Produktion von PPAR- γ | 203 |
| 10.1.1 | Chemikalien und Reagenzien | 203 |
| 10.1.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 203 |
| 10.1.3 | Protokoll der Stimulation | 203 |
| 10.1.3.1 | Vorversuche – Variation der Konzentration und Inkubationszeit der Agonisten | 203 |
| 10.1.3.2 | Inkubation der Zellen mit M1 bzw. Rosiglitazon | 204 |
| 10.1.4 | Geräte und Materialien | 204 |
| 10.1.5 | Chemikalien und Reagenzien | 204 |
| 10.1.6 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 204 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 10.1.7 | Protokoll der Zellkernextrakterstellung | 204 |
| 10.1.8 | Aufkonzentration und Entsalzen der Proben | 205 |
| 10.2 | Quantitative Bestimmung der PPAR- γ Konzentration in Zellkern- extrakten humaner Monocyten..... | 205 |
| 10.2.1 | Geräte und Materialien | 205 |
| 10.2.2 | Chemikalien und Reagenzien | 205 |
| 10.2.3 | Sequenz der Oligonukleotide | 206 |
| 10.2.4 | Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards..... | 206 |
| 10.2.5 | Protokoll des PPAR- γ ELISA..... | 207 |
| 10.2.6 | Schachbretttitration | 207 |
| 11 | Bestimmung der Glucosetransporter-Dichte auf der Oberfläche von Monocyten bzw. Adipocyten mittels Durchflusszytometrie | 209 |
| 11.1 | Geräte und Materialien..... | 209 |
| 11.2 | Chemikalien und Reagenzien | 209 |
| 11.3 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 209 |
| 11.4 | Vorinkubation humaner Adipocyten bzw. muriner 3T3 Adipocyten mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin und Stimulation mit Insulin | 210 |
| 11.5 | Fluoreszenzmarkierung der Glucosetransporter | 210 |
| 11.6 | Messung der GLUT-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie | 211 |
| 11.7 | Analyse und Darstellung der mit FACS generierten Daten | 211 |
| 11.8 | Auswertung der FACS-Analyse..... | 214 |
| 12 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten | 215 |
| 12.1 | Chemikalien und Reagenzien | 215 |
| 12.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen..... | 215 |
| 12.3 | Differenzierung der Präadipocyten mit und ohne Testsubstanzen | 215 |
| 12.4 | Protokoll des Oil Red O Staining..... | 216 |
| D | TABELLARISCHER ANHANG | 217 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernextraktes mittels FRAP-Assay | 219 |
| 1.1 | Ergebnisse des FRAP-Assays in μM | 219 |
| 1.2 | Ergebnisse des FRAP-Assays in $\mu\text{g/ml}$ | 220 |
| 1.3 | Ergebnisse der statistische Auswertung (Werte in μM)..... | 221 |
| 1.4 | Ergebnisse der statistische Auswertung (Werte in $\mu\text{g/ml}$) | 222 |
| 2 | Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernextraktes mittels DPPH-Assay.... | 223 |
| 2.1 | Ergebnisse des DPPH-Assays in μM | 223 |
| 2.2 | Ergebnisse des DPPH-Assays in $\mu\text{g/ml}$ | 224 |
| 2.3 | Ergebnisse der statistischen Auswertung (Werte in μM)..... | 225 |
| 2.4 | Ergebnisse der statistischen Auswertung (Werte in $\mu\text{g/ml}$) | 226 |
| 3 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF-α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA | 227 |
| 3.1 | Ergebnisse der Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten..... | 227 |
| 3.2 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten..... | 228 |
| 3.3 | Ergebnisse des TNF- α ELISA (Mehrfachgabe von Pycnogenol) | 228 |
| 3.4 | Ergebnisse des TNF- α ELISA (Einmalgabe von Pycnogenol) | 229 |
| 4 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 ex vivo..... | 230 |
| 4.1 | Auswirkungen der wiederholten Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität | 230 |
| 4.2 | Auswirkungen der einmaligen Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität | 231 |
| 4.3 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von M1 auf die Aktivität von COX..... | 232 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernextraktes auf die Aktivität der α-Glucosidase..... | 233 |
| 5.1 | Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol und seinen Bestandteilen auf die Aktivität der α -Glucosidase | 233 |
| 5.2 | Untersuchung der Wirkung der Fraktionen von Pycnogenol auf die Aktivität der α -Glucosidase | 234 |
| 6 | Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PPAR-γ in humanen Monocyten | 235 |
| 7 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Glucose-transporter-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie..... | 236 |
| 7.1 | Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen für 2 h mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin | 236 |
| 7.2 | Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen für 24 h mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin | 236 |
| 8 | Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten | 237 |
| 8.1 | Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung | 237 |
| 8.2 | Ergebnisse der Hemmung der intrazellulären Lipidakkumulation durch Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol..... | 237 |
| E | ZUSAMMENFASSUNG..... | 241 |
| | Zusammenfassung | 243 |
| | Summary | 245 |
| F | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 247 |
| G | LITERATURVERZEICHNIS..... | 253 |
| | Curriculum Vitae | 271 |
| | Erklärung | 273 |

A **Einleitung**

1 Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus in Deutschland

Diabetes mellitus Typ 2 hat sich in den letzten Jahren zu einer Volkskrankheit in Deutschland wie auch in anderen Industrienationen entwickelt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass bei Personen im mittleren Lebensalter mit einer Diabetesprävalenz von 15–20 % gerechnet werden muss.¹ Schon heute leben in Deutschland 7.5 Millionen Diabetiker. Bis zum Jahr 2010 wird diese Zahl auf 10 Millionen ansteigen, wie Berechnungen der Deutschen Diabetes-Union (DDU) zeigen, das heisst jeder Achte wird von dieser Krankheit betroffen sein.² Hauptursache hierfür ist der vorwiegend bewegungsarme Lebensstil der Menschen und eine ständig zunehmende Häufung von prädiabetischen Phänomenen wie metabolisches Syndrom, Fettleibigkeit und Insulinresistenz.³

Allgemein ist Diabetes mellitus definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels, die einen signifikanten Einfluss auf Gesundheit, Lebensqualität und Lebenserwartung der betroffenen Personen hat.⁴ Hierbei muss man in erster Linie zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes unterscheiden.

Diabetes mellitus Typ 1 ist gekennzeichnet durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas durch das körpereigene Immunsystem. Die Insulinproduktion sinkt und bleibt schließlich ganz aus. Als Folge tritt ein Insulinmangelsyndrom auf, das durch die klassischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust charakterisiert ist. Diese Form des Diabetes macht etwa 5–10 % aller Diabeteserkrankungen aus und beginnt meist schon im Kindes- oder Jugendalter.

Diabetes mellitus Typ 2 entsteht zum einen durch eine verminderte Empfindlichkeit der Körperzellen für Insulin (Insulinresistenz), zum anderen führt eine jahrelange Überproduktion von Insulin zu einer Erschöpfung der insulinproduzierenden Zellen und somit zu einer gestörten Insulinsekretion.³⁻⁵ Hieraus resultiert eine chronische Hyperglykämie, die mit Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen zahlreicher Organe, insbesondere der Augen, Nieren, Nerven, des Herzens und der Blutgefäße assoziiert wird. Der Typ 2 Diabetes macht etwa 85–95 % aller diagnostizierten Fälle von Diabetes aus.

2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2

Schon lange bevor ein Diabetes mellitus Typ 2 auftritt, liegt über viele Jahre ein sogenanntes metabolisches Syndrom vor, auch als Syndrom X, Insulinresistenz-Syndrom, Wohlstandssyndrom oder „tödliches Quartett“ bezeichnet. Darunter versteht man eine Stoffwechselstörung, die durch die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Risikofaktoren für Typ 2 Diabetes wie auch für Herz-Kreislauf-Erkrankungen charakterisiert ist (Abbildung 1). Hierzu zählen nach der neuen Definition (2005) der International Diabetes Federation (IDF)⁶ abdominelle Adipositas (Taillenumfang > 94 cm bei Männern, > 80 cm bei Frauen), arterielle Hypertonie (systolisch RR > 130 mmHg und diastolisch RR > 85 mmHg), Dyslipoproteinämie (Triglyzeride > 150 mg/dl und HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei Männern und < 50 mg/dl bei Frauen), sowie Hyperglykämie (Nüchtern-Blutglucose > 100 mg/dl). Häufige Begleiterscheinungen sind Hyperurikämie und Gicht.⁴

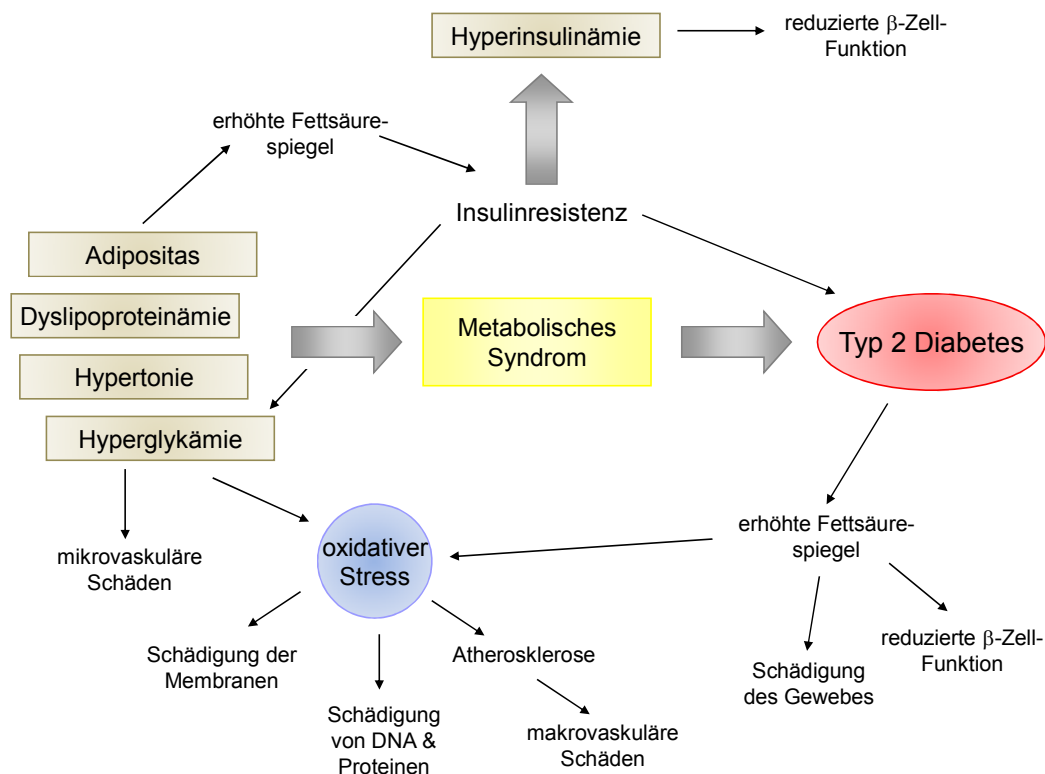


Abbildung 1: Übersichtsschema der vielfältigen Ursachen und Folgen von Diabetes mellitus Typ 2. Risikofaktoren sind abdominelle Adipositas, Hyperglykämie, arterielle Hypertonie und Dyslipoproteinämie. Als Folge einer jahrelang gestörten Insulinsekretion kann es zu Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen zahlreicher Organe kommen.

Die Veranlagung zum metabolischen Syndrom gilt als hochgradig vererblich, vorausgesetzt weitere Risikofaktoren wie Übergewicht sind vorhanden. Man geht davon aus, dass in den Industrienationen ein Viertel bis ein Drittel der Bevölkerung vom metabolischen Syndrom betroffen ist. Ursache sind biochemische Defekte in der Signaltransduktion des Insulins, die letztendlich noch nicht vollständig geklärt sind. Enzyme wie die Tyrosinkinase und die Glycogensynthase sowie die Glucose-transporter GLUT-1 und GLUT-4 stehen dabei im Mittelpunkt der Betrachtung.¹

Des Weiteren gelten Entzündungsprozesse als Folge von Hyperglykämie, Hyperlipidämie und Insulinresistenz. Ein wichtiger an der Entstehung von Entzündungen beteiligter Prozess ist oxidativer Stress. Im Falle von Hyperglykämie hat eine erhöhte Glucoseaufnahme durch die Endothelzellen eine exzessive Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien zur Folge. Diese lösen die inflammatorische Signalkaskade aus und sind für die oxidative Schädigung von Membranen, DNA und Proteinen verantwortlich. Hierdurch können inflammatorische Zellen wie z.B. Makrophagen angelockt werden, die die lokale Entzündung weiter vorantreiben.

3 Gesundheitsrisiken und Komplikationen des Diabetes mellitus

Die chronische Hyperglykämie beim Diabetes mellitus führt über die diabetes-spezifische MIKROANGIOPATHIE zum sogenannten renalen-retinalen Syndrom, das heißt zu Folgeerkrankungen, die sich als Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie und Makroangiopathie manifestieren.

Etwa ein Drittel aller Diabetiker entwickelt im Laufe der Erkrankung eine diabetische NEPHROPATHIE: Die Nieren verlieren dabei langsam ihre Filterfunktion. Schreitet sie fort, müssen sich die Patienten möglicherweise einer Dialyse oder Nierentransplantation unterziehen. Die ersten klinischen Zeichen der Nephropathie sind Mikroalbuminurie, sowie Hypertonie, verursacht durch Veränderungen der Basalmembran, was einen Verschluss der Kapillaren der Glomeruli (Nierenkörperchen) bewirken kann.

Bis zu 40 % aller Typ 2 Diabetiker haben bei Erstdiagnose eine diabetische RETINOPATHIE, eine Erkrankung der Netzhaut des Auges. Ablagerungen von Lipiden und Proteinen in den feinen Blutgefäßen vor allem im Augenhintergrund führen dort

zu Blutungen, was eine Minderung der Sehschärfe sowie Einschränkungen des Gesichtsfeldes verursacht und zu Erblindung führen kann.

Die diabetische NEUROPATHIE ist eine klinisch manifeste oder subklinische Erkrankung der peripheren Nerven (somatisch, autonom). Die Schädigung (Glycosylierung) extra- und intrazellulärer Proteine in den Neuronen führt zu einer gestörten Nährstoffversorgung aufgrund der Umwandlung von Glucose zu Sorbitol, das zu Fructose weiterreagiert. Diese Fructoseakkumulation resultiert in osmotischem Stress, der wiederum Reizleitungsstörungen, Sensibilitätsausfälle und verminderte Schmerzempfindlichkeit bedingt.

Ursachen des diabetischen FUßSYNDROMS sind Polyneuropathien, arterielle Verschlusskrankheiten und Infektionen. Ein Sensibilitätsverlust im Fuß führt oft zu Verletzungen, die aufgrund von Wundheilungsstörungen chronische Infektionen zur Folge haben.

Die diabetesassoziierte MAKROANGIOPATHIE führt zu Folgeerkrankungen vorwiegend an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien. Sie manifestiert sich bei Diabetikern überwiegend als koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Insuffizienz.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigsten Folgeschäden bei Diabetikern und erklären die hohe Mortalität dieser Patienten. Typ 2 Diabetes erhöht das Risiko für koronare Herzerkrankungen (engl.: *coronary heart disease*, CHD) um einen Faktor von zwei bis vier.⁷ In den Industrieländern stellt Diabetes mellitus die vierthäufigste Todesursache dar, wobei kardiovaskuläre Erkrankungen bei Diabetikern für 75 % der Gesamtmortalität verantwortlich sind. Nach den Ergebnissen der Framingham und der Honolulu Heart Studie ist die Inzidenz von Schlaganfällen bei Diabetikern um den Faktor zwei bis drei gesteigert.⁸ Darüber hinaus tragen die assoziierten Comorbiditäten und Folgeerkrankungen erheblich zur Verminderung der Lebensqualität und Verkürzung der Lebenserwartung bei.⁹ So verkürzt das metabolische Syndrom die Lebenserwartung um etwa zehn bis 15 Jahre.^{1,3}

4 Präventive Maßnahmen

Menschen mit Diabetes mellitus sterben heute meist nicht mehr an einer Stoffwechsellentgleisung, sondern an kardiovaskulären Folgen wie Herzinfarkt oder

Schlaganfall. Die konsequente Einstellung des Blutzuckers und die Reduktion aller Risikofaktoren hat daher oberstes Gebot zum Funktionserhalt von Herz und Gefäßen.

Im wissenschaftlichen Kontext unterscheidet man zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention. Hierzu zählt man Maßnahmen zur Verhinderung eines Krankheitsausbruches und von Risikofaktoren, Früherkennungsprogramme sowie Angebote, die sich auf Verhinderung eines chronischen Verlaufs, eines Krankheitsrückfalls und von Folgeschäden konzentrieren. Die Unterscheidung von drei Präventionsebenen geht auf eine Systematisierung von Gerald Caplan¹⁰ (1964) zurück und kann wie folgt beschrieben und auf Diabetes angewendet werden (Abbildung 2):

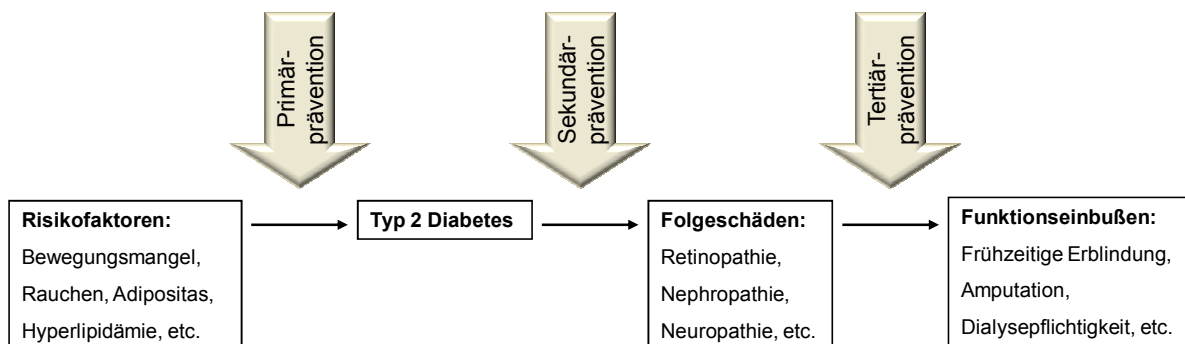


Abbildung 2: Präventionsebenen bei Typ 2 Diabetes. Der Einsatz präventiver Maßnahmen beruht auf der Existenz einer Krankheitskette. Die Maßnahmen setzen dabei am Übergang von einem in das nächste Krankheitsstadium an.

PRIMÄRPRÄVENTION bezeichnet die Vermeidung bzw. Reduktion von Risikofaktoren und eine vorbeugende Beeinflussung, mit dem Ziel, den Krankheitsausbruch zu verhindern. Im Fall von Diabetes kann das eine Umstellung der Lebensgewohnheiten bedeuten, wie z.B. mehr Bewegung, eine ausgewogene Ernährung, Gewichtsreduktion und Stopp des Nikotinkonsums. SEKUNDÄRPRÄVENTION umfasst Maßnahmen, die in einem Frühstadium der Erkrankung ansetzen und eine Verschlechterung zu verhindern versuchen. Auf Diabetes bezogen kann es sich um Maßnahmen handeln, die das Auftreten einer Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie oder Arteriosklerose verhindern sollen. TERTIÄRPRÄVENTION bezeichnet Maßnahmen, die bei einer symptomatisch gewordenen Erkrankung ansetzen mit dem Ziel, einschränkende Funktionseinbußen, insbesondere auch sozialer Natur, zu

verhindern. Konkret handelt es sich hier beispielsweise um frühzeitige Erblindung in Folge einer Retinopathie oder Dialysepflichtigkeit und Transplantation in Folge einer Nephropathie.

5 Konventionelle Therapie

In der Nationalen Versorgungs-Leitlinie Diabetes mellitus Typ 2 vom Mai 2002 wurde ein übergreifender Konsens für die Therapie des Diabetes mellitus geschaffen.¹ Die generellen Therapieziele hängen vom Alter und von den Begleiterkrankungen des Patienten ab. Ziel ist die Erhaltung bzw. Wiederherstellung der Lebensqualität, die Kompetenzsteigerung der Betroffenen im Umgang mit der Erkrankung sowie die Reduktion des Risikos für kardiale, zerebrovaskuläre und sonstige makroangiopathische Morbidität und Letalität. Darüber hinaus gilt es mikrovaskuläre Folgeerkrankungen (Erblindung, Dialyse, Neuropathie) und das diabetische Fußsyndrom zu vermeiden, sowie Symptomen der Erkrankung (Polyurie, Polydipsie, Abgeschlagenheit) vorzubeugen bzw. zu therapieren.

5.1 Basistherapie

Nach der Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 spielt die Schulung des Patienten die entscheidende Rolle. Verschiedene Interventionen zur Verhaltensänderung tragen nachweislich zu Besserung von Selbst-Management, Stoffwechseleinstellung und Wohlbefinden bei. Die Grundlage der Therapie bilden die Schulung des Patienten, eine Ernährungstherapie (fettarme, ballaststoffreiche, energiebilanzierte Kost), Gewichtsreduktion und regelmäßige körperliche Bewegung. Ziel ist es, das Gewicht zu normalisieren. Dies verbessert unter anderem die Empfindlichkeit der Körperzellen für Insulin.¹¹

5.2 Orale Antidiabetika

Patienten, bei denen längstens nach zwölf Wochen trotz Ausschöpfung aller Möglichkeiten der Basistherapie das individuelle Therapieziel nicht zu erreichen ist, erhalten eine adjuvante Therapie. Die zusätzlich verordneten Medikamente haben unterschiedliche Angriffspunkte: Verbesserung der Empfindlichkeit der Körperzellen

für Insulin, Steigerung der Insulinsekretion (solange die Bauchspeicheldrüse noch in der Lage ist, das Hormon zu produzieren) und zeitnahe körpereigene Insulinausschüttung zum Essen (Vermeidung von postprandialer Hyperglykämie).

5.2.1 Glucoseresorptionshemmer

Glucoseresorptionshemmer, die im Magen-Darm-Trakt wirken, hemmen enterale α -Glucosidasen und pankreatische α -Amylasen reversibel und verzögern so die Spaltung und Resorption von Oligosacchariden im Dünndarm. Hierdurch sollen postprandiale Glucosespitzen vermieden werden.

α -Glucosidasehemmstoffe wie ACARBOSE (Glucobay[®]) oder MIGLITOL (Diastabol[®]) bewirken eine Verzögerung der Glucoseresorption und folglich eine Glättung der Glucoseprofile sowie eine Senkung der postprandialen Blutzuckerspitzen. Das Pseudotetrasaccharid Acarbose ist ein kompetitiver, reversibler Inhibitor der pankreatischen α -Amylase sowie von α -Glucosidase im Bürstensaum der Dünndarmmukosa. Demgegenüber hemmt das Pseudomonosaccharid Miglitol in erster Linie die enterale α -Glucosidasen und zusätzlich auch die β -Glucosidase Lactase.¹

GUARMEHL (Guar Verlan[®]) quillt bei der Magendarmpassage aufgrund seines erheblichen Wasserbindungsvermögens zu einem hochviskosen Kolloid, das die Resorption von Kohlenhydraten und anderen Nahrungsbestandteilen verzögert, und führt langfristig zu einer Senkung der Insulinsekretion und der peripheren Insulinspiegel, wie auch zu einer geringfügigen Senkung der Cholesterin- und Triglyceridspiegel.

5.2.2 Insulinotrope orale Antidiabetika (Insulin-Sekretagoga)

Sulfonylharnstoffe wie GLIBENCLAMID (Bastiverit[®]) oder GLIMEPIRID (Amaryl[®]) binden an spezifische Bindungsstellen des ATP-abhängigen Kaliumkanals in den β -Zellen des Pankreas und blockieren diese. Sie ahmen den Effekt einer erhöhten ATP-Konzentration nach, was eine Depolarisation der Zellmembran und eine Aktivierung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle zur Folge hat. Es kommt zu einer erhöhten cytosolischen Calcium-Konzentration und infolgedessen zu einer Insulinaus-

schüttung. Allen Sulfonylharnstoffen gemein ist die insulinotrope Wirkung, die für die blutglucosesenkende Wirkung zentral wichtig ist.

Glinide wie NATEGLINID (Starlix[®]) und REPAGLINID (Novonorm[®]) sind prandiale Glucoseregulatoren, die die exozytotische Insulinsekretion triggern, was sich deutlich bei der Blutzuckersenkung der postprandialen Werte bemerkbar macht.¹²

5.2.3 Biguanide

METFORMIN (Diabesin[®]) zeigt vielfältige Wirkungen, die es zu einem effektiven oralen Antidiabetikum machen. Es zeigt ausschließlich extrapancreatische Wirkungen (nicht insulinotrop). Darüber hinaus nimmt es Einfluss auf die Lipidwerte und die Blutgerinnung. Die blutglucosesenkende Wirkung wird den folgenden Effekten zugeschrieben: es bewirkt die Verlangsamung der enteralen Glucoseresorption, es hemmt die hepatische Gluconeogenese und Glykogenolyse in der Leber, es verbessert die Glucoseverwertung in den peripheren Geweben (verstärkte Translokation und Aktivität von Glucosetransportern) und es besitzt anorektische Wirkung.

5.2.4 Insulin-Sensitizer

Insulin-Sensitizer wie ROSIGLITAZON (Avandia[®]) und PIOGLITAZON (Actos[®]) wirken blutzuckersenkend durch Erhöhung der Insulinempfindlichkeit im Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur, sowie in der Leber. Sie fungieren dabei als selektive Agonisten des nukleären Rezeptors PPAR- γ , einem ligandenkontrollierten Transkriptionsfaktor. Sie verstärken die insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Zellen, steigern die Glykogensynthese und reduzieren die Lipidsynthese und Gluconeogenese. Außerdem steigern sie die Synthese und Translokation von Glucosetransportern. Pioglitazon erhöht die Insulinempfindlichkeit von Leber-, Fett- und Muskelzellen durch Verbesserung der peripheren Glucoseverwertung. Es wirkt darüber hinaus günstig auf das Lipidprofil, senkt die Triglyceride und steigert das kardioprotektive HDL-Cholesterin. Außerdem ist für diesen Wirkstoff beschrieben, dass er die endothelale Dysfunktion verbessert, die Koagulabilität stabilisiert, proinflammatorische Cytokine reduziert und das im Hinblick auf das Übergewicht bedeutsame Adiponektin erhöht.¹³

5.3 Insulintherapie

Der Typ 2 Diabetes ist chronisch und progredient. Wird das individuelle Therapieziel nach Ausschöpfen der Basistherapie und/oder oraler Antidiabetika nicht erreicht, so wird hier eine supplementäre Insulintherapie empfohlen.

Insulin beeinflusst den Kohlenhydratstoffwechsel durch Steigerung der zellulären Glucoseaufnahme in die Zellen, Stimulation der Glykogensynthese, Hemmung des Glykogenabbaus im Muskel und Hemmung der hepatischen Gluconeogenese. Die Wirkung des Insulins auf Elektrolyte und Eiweißstoffwechsel beinhaltet die Förderung der muskelanabolen Wirkung sowie der Hemmung der Proteolyse. Der Fettstoffwechsel wird von Insulin durch Hemmung der Lipolyse und Förderung der Aufnahme freier Fettsäuren und Synthese von Speicherfett beeinflusst.

6 Nahrungsergänzungsmittel und Phytotherapeutika zur glykämischen Kontrolle bei Diabetes mellitus

Neben den chemisch-definierten Antidiabetika mit gut evaluierter Wirksamkeit und Verträglichkeit gibt es eine ganze Reihe von Nahrungssupplementen und pflanzlichen Zubereitungen, für die eine blutzuckersenkende Wirkung nachgewiesen oder vermutet wurde.^{14,15}

Ein wichtiger Arzneistoff, der aus einem prototypischen Molekül aus einer medizinischen Heilpflanze entwickelt wurde, ist Metformin (siehe Abschnitt 5.2.3). Es stammt von Galegin ab, einem Inhaltsstoff von *Galega officinalis*, dem Französischen Flieder, der über hunderte Jahre in der Volksmedizin für verschiedene Leiden Verwendung fand und auch blutzuckersenkende Wirkung besitzt.¹²

Die Volksmedizin umfasst das in der Bevölkerung von einer Generation zur nächsten überlieferte Wissen über Krankheiten, Heilmethoden und Heilmittel. Über Jahrtausende waren Heilpflanzen fast die einzigen Mittel, die für die Behandlung von Krankheiten oder zur Linderung von Schmerzen zur Verfügung standen. Auch heute noch kurieren etwa 80 % der Weltbevölkerung ihre Krankheiten mit Hilfe von Pflanzen. Für diese pflanzlichen Arzneimittel hat sich die Bezeichnung Phytopharmakon bzw. Phytotherapeutikum durchgesetzt. Ein Hauptunterschied zum Reinstoff – ob synthetisch hergestellt oder aus einer Pflanze isoliert – besteht darin,

dass Phytopharmaka immer ein Stoffgemisch darstellen. In diesem natürlichen Gemisch von oft hunderten Substanzen aus der Pflanze finden sich Stoffe, die für die Wirksamkeit ausschlaggebend sind, aber auch andere Begleitstoffe. Ein großer Vorteil für den Patienten liegt oft gerade darin, dass mehrere Stoffe mit unterschiedlichem Wirkmechanismus zur erwünschten Gesamtwirksamkeit beitragen. Die Pflanze liefert also einen therapeutischen „Cocktail“, bei dem unerwünschte Wirkungen im Allgemeinen wenig in Erscheinung treten.

Heute sind mehr als 400 traditionelle pflanzliche Therapieansätze für Diabetes mellitus bekannt, obwohl davon nur eine kleine Zahl medizinische Bewertung zur Bestimmung ihrer Effektivität erfahren haben.^{12,16} Die aussagekräftigsten Beweise für ihre Wirksamkeit liegen für *Panax quinquefolius* (Ginseng) und *Coccinia indica* (Efeukürbis) vor. Für diese Substanzen gibt es die qualitativ besten randomisiert kontrollierten Interventionsstudien, die auf der Jadad-Skala einen Wert ≥ 3 erreichen. Dieser Wert wird in einem validierten Verfahren zur Bewertung von Studien basierend auf Randomisierung, Verblindung und Beschreibung von Studienabbruchern ermittelt.¹⁵

6.1 Ginseng (*Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*)

Seit mehr als 2000 Jahren wird die Ginsengwurzel in Fernost wegen seiner gesundheitsfördernden Eigenschaften eingesetzt und ist auch in Deutschland sehr populär (Ginkobil®). Die meisten der pharmakologischen Effekte werden den Ginsenosiden, einer Familie von steroidalen Triterpensaponinen, mit antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkungen zugeschrieben.^{12,17} Sotaniemie et al.¹⁸ zeigten bei Typ 2 Diabetikern, die mit 100–200 mg Ginseng behandelt wurden, dass Ginsengextrakt eine Reduktion der Nüchtern-Blutglucosespiegel und der HbA_{1c}-Werte bewirken kann. In einer anderen Studie mit zehn nicht-diabetischen Probanden und neun Typ 2 Diabetikern konnte eine signifikante Reduktion von postprandialer Hyperglykämie nach Einnahme von 3 g Ginsengextrakt verzeichnet werden.¹⁹ Von derselben Arbeitsgruppe wurde des Weiteren eine randomisierte *crossover*-Studie mit 12 gesunden Probanden durchgeführt, um die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Ginseng-Einnahme zu untersuchen. Hierbei stellte sich heraus, dass in einem Konzentrationsbereich von 1–3 g Ginseng die gleichen Effekte erzielt wurden. Allerdings war die Reduktion der postprandialen Glucosespiegel nach

Ginsengkonsum zeitabhängig; ein Effekt wurde nur verzeichnet, wenn Ginseng 40 min vor einer Glucose-Stimulation verabreicht wurde.¹⁹ Die Wirkmechanismen umfassen die Erniedrigung der Absorptionsrate von Kohlenhydraten in die hepatische Zirkulation²⁰, einen gesteigerten Glucosetransport aufgrund einer Erhöhung der hepatischen GLUT-2 Dichte und folglich eine Erhöhung der Glucoseaufnahme in die Zellen²¹, sowie Steigerung der Insulinfreisetzung aus dem Pankreas.²²

6.2 Efeukürbis (*Coccinia indica*)

Der Efeukürbis ist eine Kletterpflanze, die wild in vielen Teilen des indischen Subkontinents wächst. Mehrere randomisierte, klinische Studien bestätigen die blutglucosesenkenden Effekte dieser Pflanze.^{23,24} In einer kontrollierten, doppelverblindeten Studie mit 16 Patienten mit unbehandeltem Typ 2 Diabetes und 16 Kontrollen erhielten die Teilnehmer entweder Tabletten aus homogenisierten und gefriergetrockneten Blättern von *C. indica* oder Placebo. Nach einem Zeitraum von sechs Wochen zeigten zehn der mit *C. indica* behandelten Patienten eine deutlich verbesserte Glucoseverwertung gemessen durch einen oralen Glucosetoleranztest (OGTT), wohingegen die Kontrollgruppe unverändert blieb.^{24,25} In einer weiteren klinischen Studie mit 30 Diabetikern bewirkte die sechswöchige orale Verabreichung von 500 mg/kg getrocknetem Extrakt von *C. indica* eine Normalisierung der gesteigerten Aktivität von Lipoproteinlipase sowie der Glucose-6-phosphatase- und LDH-Konzentrationen. Dieser Effekt des Pflanzenextraktes war ähnlich der des Insulins.²³ Sein Wirkungsmechanismus ist bisher noch nicht ganz geklärt, aber es scheint, dass die Pflanze insulin-mimetische Eigenschaften besitzt. Auch Hossain et al.²⁶ schrieben den glucosesenkenden Effekt von *C. indica* zum Teil der Unterdrückung des gluconeogenetischen Enzyms Glucose-6-Phosphatase zu.

6.3 Bittermelone (*Momordica charantia*)

Die Bittermelone oder Karolla ist ein tropisches Gemüse und wird vor allem in Asien, Afrika und Südamerika angebaut. Bittermelonenextrakt (Glukokine[®]) besteht aus verschiedenen Bestandteilen, deren blutglucosesenkende Eigenschaften bei Diabetes in Tierexperimenten und auch humanen klinischen Studien bestätigt

wurden.^{27,28} Ein alkoholischer Extrakt aus *M. charantia* (500 mg/kg) erniedrigte die Plasmagluconespiegel von diabetischen Wistar-Ratten eine Stunde nach oraler Gabe um 10–15 %. Im Vergleich dazu erzielte Tolbutamid (100 mg/kg) unter gleichen Bedingungen nach 1 h eine Reduktion von etwa 40 %. Eine Erhöhung der Insulinsekretion wurde nicht beobachtet.²⁹ Ein glucosesenkendes Peptid, das Polypeptid-p, wurde aus Früchten, Samen und Fasern von *M. charantia* isoliert. Seine blutglucosesenkende Wirkung wurde nach subkutaner Injektion in humanen Probanden beobachtet.³⁰ Des Weiteren werden extrapankreatische Wirkungen wie eine Hemmung der hepatischen Gluconeogenese sowie der hepatischen bzw. muskulären Glucoseaufnahme beschrieben.¹⁵ Shibib et al.³¹ führten Experimente mit normalen und Streptozotocin-diabetischen (STZ) Ratten durch und konnten nachweisen, dass 200 mg/kg eines ethanolischen Extraktes von *M. charantia* blutglucosesenkende Effekte besaßen. Der grundlegende Wirkmechanismus war hier die Hemmung der hepatischen gluconeogenetischen Enzyme Glucose-6-phosphatase und Fructose-1,6-bisphosphatase wie auch die Stimulation der Aktivität von Glucose-6-phosphatdehydrogenase. In einer klinischen Studie reduzierte ein wasserlöslicher Extrakt aus den Früchten von *M. charantia* signifikant die Blutglucosekonzentrationen von neun nicht-insulinabhängigen Diabetes-Patienten. Auch der tägliche, nahrungsergänzende Verzehr von gebratenen Karollafrüchten erzielte eine geringe, aber signifikante Verbesserung der Glucoseverwertung bei Diabetikern, was mit Hilfe eines oralen Glucosetoleranztestes (OGTT) nachgewiesen wurde, ohne einen Anstieg der Serum-Insulinpiegel zu bewirken, wie von Leatherdale et al.³² beschrieben wurde.

6.4 Zimt (*Cinnamomum verum*, *Cinnamomum cassia*)

Zimt ist die gemahlene Rinde von *Cinnamomum verum* bzw. *C. cassia*. Zimtextrakt (Diabetruw[®]) soll die bei insulinresistenten Typ 2 Diabetikern gestörte Signaltransduktion verbessern. Hierbei wird eine gesteigerte Autophosphorylierung der Rezeptor-Kinase bzw. eine Wechselwirkung mit Hemmstoffen der Rezeptor-Kinase vermutet. In einer randomisierten, placebokontrollierten Studie mit Typ 2 Diabetikern (n = 60) erzielte die tägliche Einnahme von 1–6 g Zimtpulver einen signifikanten Effekt auf Blutglucose-, Cholesterin- und Triglyceridwerte. Nach einer Behandlungsdauer von 40 Tagen sanken die Blutglucosespiegel um bis zu 29 %. Das

Gesamtcholesterin ging um 12–26 %, das LDL-Cholesterin um 7–27 % und die Triglyceridwerte um 23–30 % zurück.³³ Die bislang vorliegenden Daten zeigen, dass in ihrer Struktur noch nicht endgültig zuzuordnende Bestandteile von Zimt offenbar Insulinsekretion und Insulinwirkung beeinflussen, und damit die Glucoseaufnahme und Glucoseverwertung bei einer diabetischen Stoffwechsellage verbessern können.

6.5 Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*)

Mahomed et al.³⁴ haben die antiinflammatorischen und antidiabetischen Effekte eines Wurzelextraktes von *Harpagophytum procumbens* (Teufelskralle ratiopharm®) an einem Rattenmodell untersucht. Der Extrakt, der unter anderem Triterpenoide, Flavonoide und Iridoide enthält, bewirkte eine dosisabhängige signifikante Reduktion der Albumin-induzierten akuten Inflammation von Ödemen in den Hinterpfoten von Ratten. Des Weiteren konnten sie eine dosisabhängige, signifikante Senkung der Blutglucosespiegel von diabetischen und nicht-diabetischen Ratten feststellen. Die Ergebnisse zeigten, dass *H. procumbens* antiinflammatorische und glucose-regulierende Eigenschaften besitzt und lieferten einen pharmakologischen Hinweis für den traditionellen Gebrauch der Teufelskralle in einigen Gemeinden Südafrikas bei der Behandlung und/oder Kontrolle von Entzündungen wie auch bei Diabetes mellitus Typ 2.

6.6 Copalchirinde (*Hintonia latiflora*)

Die Copalchirinde stammt von Bäumen der Art *Croton niveum* Jacq., die in Mexiko und Mittelamerika beheimatet sind. Copalchirinde enthält ein komplexes Spektrum an Polyphenolen, Neoflavonoidglykosiden und Triterpenen. Als Adjuvans bei Typ 2 Diabetes wird ein wässrig-ethanolischer Fluidextrakt aus der Wurzel von *Hintonia latiflora* genutzt (Sucontral®). In Tierexperimenten wurde die blutglucosesenkende Wirkung der Rinde bestätigt.³⁵ So konnten Korec et al.³⁶ zeigen, dass Coutareagenin, eine der aktiven Substanzen in der Rinde von *H. latiflora*, eine Reduktion der bei Diabetikern erhöhten Blutglucosespiegel bewirkte.

6.7 Bockshornklee (*Trigonella foenum graecum*)

Trigonella foenum graecum ist sowohl als Heilkraut als auch als Gewürz bekannt. Der sogenannte Bockshornklee wird traditionell in Ayurvedischer und Chinesischer Medizin eingesetzt und dient unter anderem zur Behandlung von Diabetes. Die glucoseregulierenden Effekte der Samen von *T. foenum graecum* werden verschiedenen Mechanismen zugeschrieben. In einer humanen Studie mit Typ 2 Diabetikern konnte nach Einnahme eines Extraktes aus den entfetteten Samen eine Erhöhung der Insulinrezeptordichte auf den Zellen nachgewiesen werden.³⁷ Des Weiteren konnte in einer Tierstudie eine Steigerung der Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen gezeigt werden³⁸, wie auch eine Hemmung der Aktivität von α -Amylase und Sucrase (Synonym: Saccharase, Invertase), zwei intestinalen Enzymen, die beim Kohlenhydrat-Metabolismus involviert sind.³⁹ Sharma et al.⁴⁰ führten zwei randomisierte, kontrollierte, crossover Studien mit Typ 2 Diabetikern durch. Sie beobachteten eine signifikante Verbesserung der Nüchtern-Blutglucosespiegel und eine deutlich verbesserte Glucoseverwertung gemessen durch einen oralen Glucosetoleranztest.

7 Pharmakologische Eigenschaften von Pycnogenol

Pycnogenol[®] ist der Handelsname einer patentierten spezifischen Mischung von Procyanidinen, die aus der Kiefernrinde von *Pinus maritima* nach einem standardisierten Verfahren extrahiert werden.⁴¹ Seit mehr als 2000 Jahren wird die Kiefernrinde zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Schon im 4. Jahrhundert vor Christus wurde sie von Hippokrates bei der Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt. Das „Thesaurus Medicaminum“ des Züricher Apothekers Hans Minner (1479) enthält eine Beschreibung der Kiefernrinde als hilfreiches Mittel bei der Wundbehandlung. Mittlerweile wird Pycnogenol auf der ganzen Welt als Nahrungsergänzungsmittel oder Phytotherapeutikum bei diversen Erkrankungen eingesetzt, angefangen von chronischen Entzündungen bis hin zu zirkulatorischen Dysfunktionen.^{42,43} Neben antiinflammatorischen, antibakteriellen, antiallergischen, antiviralen und vasodilatatorischen Eigenschaften werden Pycnogenol weitere Effekte wie schwach antihypertensive und koronardilatierende Wirkungen sowie die Inhibition der Tumorinitiation zugeschrieben.^{42,44,45}

7.1 Erniedrigung des Blutzuckerspiegels

Pycnogenol besitzt blutglucosesenkende Wirkungen. In einer Studie von Liu et al.⁴⁶ mit 30 Typ 2 Diabetes-Patienten ohne medikamentöse Behandlung, konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 100–300 mg Kiefernridenextrakt eine signifikante Senkung des Nüchtern-Blutzuckerspiegels von 8.64 ± 0.93 auf 7.54 ± 1.64 mmol/l ($P < 0.05$) bewirkte. Bereits eine Dosis von 50 mg Pycnogenol erniedrigte die postprandialen Glucosespiegel signifikant von 12.47 ± 1.06 auf 11.16 ± 2.11 mmol/l ($P < 0.05$). Die HbA_{1c}-Werte nahmen während der Studie kontinuierlich von 8.02 ± 1.04 auf 7.37 ± 1.09 % ab. Während der Studie hielten sich die Patienten an eine strikte Diät sowie ein Sportprogramm. Begründet wurden diese Beobachtungen mit der positiven Wirkung auf zuvor insulinresistente Körperzellen. Die Stimulation der Insulinsekretion als Ursache der niedrigeren Blutglucosespiegel wurde ausgeschlossen, da die Insulinspiegel unbeeinflusst blieben.

Pycnogenol wurde auch in Patienten mit Typ 2 Diabetes getestet, die ihre bisherige, konventionelle antidiabetische Medikation zur Kontrolle der Hyperglykämie weiter einnahmen (Biguanide (Metformin) und/oder Sulfonylharnstoff). Auch hier bewirkte die zusätzliche Einnahme des Kiefernridenextraktes im Laufe der Behandlungszeit eine Senkung der Nüchtern-Blutglucosespiegel.⁴⁷

7.2 Makrovaskuläre Komplikationen und diabetisches Syndrom

Fettleibigkeit, Hypertonie, Hypercholesterolämie, ein prothrombotischer Status und Insulinresistenz sind verantwortlich für eine hohe Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen bei Diabetes.

Liu et al.⁴⁸ haben in einer doppelblind-placebokontrollierten Studie gezeigt, dass Pycnogenol die Endothelfunktion bei hypertensiven Patienten verbessern kann. Die Einnahme von 100 mg Pycnogenol bewirkte eine Senkung der Endothelin-1 Konzentration (Vasokonstriktor), während die Plasmakonzentration von 6-Keto-Prostaglandin F_{1α} (Vasodilator) im Plasma anstieg. Dies führte zur Relaxation des Muskelgewebes und in Folge dessen zu einer Senkung des Blutdrucks. In einer anderen Studie mit Diabetikern, die zusätzlich zu ihrer regulären antidiabetischen Medikation Pycnogenol erhielten, konnten sie nach Einnahme des Kiefernridenextraktes ebenfalls eine Senkung der Konzentration von Vaskular Mediator Endothelin-1, der die Blutgefäßkonstriktion auslöst, sowie gleichzeitig eine Erhöhung

des vasodilatatorischen Prostacyclins feststellen.⁴⁷ Die Arbeitsgruppe um Putter et al.⁴⁹ konnte zeigen, dass bereits eine Einzeldosis von 200 mg Pycnogenol der Thrombozytenaggregation bei Rauchern über einen Zeitraum von sechs Tagen vorbeugen kann. Des Weiteren bewirkte die tägliche Einnahme von 150 mg Pycnogenol eine signifikante Verbesserung des Blutlipidprofils, was sich in einer Reduktion der LDL-Cholesterinspiegel, sowie einer Erhöhung der HDL-Cholesterinspiegel im Plasma äußerte.⁵⁰

7.3 Mikrovaskuläre Komplikationen

Eine doppelblind-placebokontrollierte klinische Studie mit 60 Patienten, die durchschnittlich seit 7.5 Jahren einen diagnostizierten Diabetes hatten, zeigte, dass Pycnogenol effektiv zur Verbesserung der Mikroangiopathie beitrug.⁵¹ Nach einer vierwöchigen Behandlung mit Pycnogenol war die kapillare Permeabilität signifikant erniedrigt worden, und die kapillare Blutperfusionscharakteristik wies eine signifikante Verbesserung auf. Die betrachteten Werte der Placebogruppe blieben während des gesamten Behandlungszeitraums unverändert. Physiologische Parameter wie Blutglucosespiegel, HbA_{1c}, Gesamtcholesterin, HDL und Blutdruck waren nur in der Pycnogenol-Gruppe verbessert.

7.4 Ulkus cruris venosum

Belcaro et al.⁵² konnten bei ihren Studien nachweisen, dass Pycnogenol einen positiven Effekt auf die Heilung von diabetischem Ulkus cruris besitzt. Nach sechswöchiger Behandlung mit dem Kiefernrintenextrakt waren über 80 % der Geschwüre derjenigen Patienten abgeheilt, die eine orale Behandlung, topische Anwendung oder eine Kombination aus beiden Therapien erhielten. In der Kontrollgruppe hingegen waren nur 61 % der Geschwüre verheilt. Die Betrachtung der Blutflußcharakteristiken zeigte eine signifikante Verbesserung der Mikroangiopathie. Folglich ist Pycnogenol für die Verbesserung der kapillaren Funktion verantwortlich und stellt so den Blutfluß ins Gewebe wieder her, was zur Heilung des diabetischen Ulkus cruris beitragen kann.

7.5 Diabetische Retinopathie

In einer Studie mit mehr als 1200 Patienten konnte gezeigt werden, dass Pycnogenol hilfreich bei der Behandlung und Prävention von diabetischer Retinopathie ist. Eine doppelblind-placebokontrollierte Studie mit Retinopathie-Patienten zeigte, dass die zweimonatige Einnahme von Pycnogenol Blutungen aus retinalen Kapillaren signifikant erniedrigen kann und in gewissem Ausmaß auch die Sehkraft wiederherstellen kann.⁵³

Des Weiteren wurde in einer multizentrischen Feldstudie mit 1169 diabetischen Patienten gezeigt, dass die Einnahme von Pycnogenol über einen Zeitraum von sechs Monaten die Progression der Retinopathie stoppen und somit möglicherweise das verbleibende Augenlicht retten kann.⁵⁴

Zielsetzung der Arbeit

Bereits in einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Pycnogenol aufgrund seiner antiinflammatorischen, antioxidativen, antihypertensiven und blutglucosesenkenden Eigenschaften Vorteile für Patienten mit Prädiabetes oder Typ 2 Diabetes haben kann.⁵⁵ Die meisten dieser Beobachtungen wurden in Studien mit Diabetes-Patienten gemacht. Allerdings ist bisher noch wenig über die molekularen Prozesse bekannt, und welche Bestandteile bzw. Metabolite von Pycnogenol für die Effekte verantwortlich sind. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit einige Schlüsselmechanismen, die durch Pycnogenol beeinflusst werden können, etwas genauer untersucht werden.

Oxidativer Stress stellt ein wichtiges Geschehen bei der Pathogenese von Diabetes und diabetischen Komplikationen dar.⁵⁶ Daher sollte die antioxidative Aktivität wie auch die Radikalfängereigenschaften der bekannten Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol untersucht werden, sowie ob nach peroraler Einnahme des Extraktes eine Zunahme der antioxidative Aktivität von Serum erzielt werden kann.

Neben oxidativem Stress wirkt sich eine Überexpression des Tumornekrose-Faktor α negativ auf eine diabetische Stoffwechsellage aus. Studien haben gezeigt, dass TNF- α die Insulinsekretion über seine spezifischen Rezeptoren unterdrücken und folglich die Insulinresistenz verstärken kann.⁵⁷ Auch das Cyclooxygenase Enzym COX-2 ist bei Patienten mit einem erhöhten Glucosespiegel hochreguliert.⁵⁸ Es sollte daher untersucht werden, ob die perorale Einnahme des Kiefernrintenextraktes eine Wirkung auf die Freisetzung von TNF- α und/oder die Aktivität der COX-Enzyme ausübt.

Einer der therapeutischen Ansätze zur Erniedrigung der postprandialen Hyperglykämie ist die Verzögerung der Absorption von Glucose durch Hemmung der Kohlenhydrat-hydrolysierenden Enzymen α -Amylase und α -Glucosidase. In einem *in vitro* Experiment sollte daher untersucht werden, ob und gegebenenfalls welche Bestandteile bzw. Fraktionen von Pycnogenol eine Hemmwirkung auf die α -Glucosidase besitzen.

Glitazone wirken unter anderem blutglucosesenkend und moderat antiinflammatorisch.⁵⁹ Über parakrine Mechanismen können sie die Glucoseaufnahme in die Muskulatur stimulieren, wobei das Cytokin TNF- α , freie Fettsäuren und Leptin

hierbei wichtige Zielmoleküle darstellen.⁶⁰ Sie werden bei adipösen Menschen vermehrt freigesetzt und verstärken die Insulinresistenz. Glitazone können diese Substanzen reduzieren und die Insulinwirkung somit verstärken. Thiazolidindione reduzierten die Serumspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP), einem Marker von unter anderem kardiovaskulären Erkrankungen, in diversen Studien; so bewirkte die tägliche Einnahme von 4 oder 8 mg Rosiglitazon eine nicht dosisabhängige Erniedrigung der CRP-Konzentration um 40 %.⁶¹ Des Weiteren verbessern Glitazone die Sensitivität der Insulinrezeptoren durch Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR- γ wie auch die Glucoseaufnahme in die Zelle durch Erhöhung der Expression des Glucosetransporters GLUT-4.⁶² Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Pycnogenol, das ähnlich wie die Glitazone eine breitgefächerte pharmakologische Aktivität besitzt, ebenfalls eine Aktivierung von PPAR- γ bewirken kann, und ob es die Exocytose von GLUT-4 erhöhen kann.

B Allgemeiner Teil

1 Flavonoide

1.1 Klassifizierung der Flavonoide

Bis zum heutigen Tag konnten bereits mehr als 6500 verschiedene Flavonoide aus Pflanzen isoliert werden. Diese Substanzen zeichnen sich durch eine große Fülle an biochemischen und pharmakologischen Aktivitäten aus. Sie werden aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Eigenschaften in wenigstens zehn Gruppen unterteilt (Abbildung 3). Flavanone, Flavone, Isoflavonoide, Flavane (Flavanole), Anthocyanine und Flavonole zählen hierbei zu den wichtigsten Vertretern in gängigen Nahrungsmitteln.^{63,64}

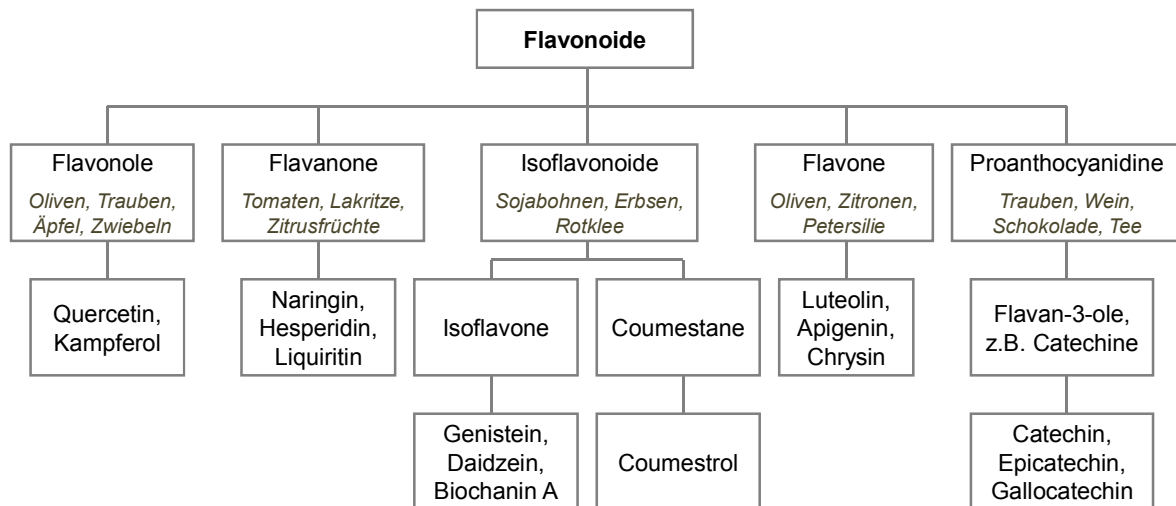


Abbildung 3: Einteilung der Flavonoide aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Eigenschaften in zahlreiche Gruppen. Angabe von wichtigen Vertretern und gängigen Nahrungsmittel als Quellen dieser Substanzen.⁶⁵

In der deutschsprachigen Literatur werden Flavonoide und Tannine der (heterogenen) Klasse der Phytamine oder sekundären Pflanzenstoffe zugeordnet.⁶⁶

1.2 Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung

Polyphenolische Verbindungen sind im Pflanzenreich weit verbreitet und sollten einen essentiellen Bestandteil unserer Ernährung darstellen. Das neuerliche Interesse an diesen Substanzen wurde durch ihre potentiellen gesundheits-

fördernden Eigenschaften angeregt, die vermutlich zum großen Teil auf ihrer antioxidativen Aktivität basieren.⁶⁷⁻⁶⁹

Bereits 1976 hat Kühnau⁷⁰ die tägliche Aufnahme von unterschiedlichen flavonoidischen Substanzen mit der Nahrung in den USA auf 500–1000 mg geschätzt. Ende der 50er Jahre wurde die 7-LÄNDER-STUDIE entworfen, um den Zusammenhang von Ernährung und kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen.⁷¹ Die Studie umfasste 16 Kohorten mit etwa 13000 Männern aus sieben Ländern (USA, Finnland, Niederlande, Italien, ehemaliges Jugoslawien, Griechenland und Japan). Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass die Flavonidaufnahme in Japan im Vergleich zu den anderen an der Studie beteiligten Ländern am größten war, dicht gefolgt von Kroatien. In Finnland hingegen war die Menge an flavonoidischen Verbindungen, die mit der Nahrung aufgenommen wurde, am geringsten.⁷² Auch belegten die gewonnenen Daten der Studie eine inverse Assoziation von durchschnittlich konsumierter Flavonoidmenge und Mortalität aufgrund von koronaren Herzerkrankungen.

Im sogenannten DUTCH NATIONAL FOOD CONSUMPTION SURVEY von 1987/88 wurde die Aufnahme von bestimmten Flavonoiden (Quercetin, Kampferol, Myricetin, Apigenin und Luteolin) an über 4000 Erwachsenen untersucht. Dabei haben Hertog et al.⁷³ die durchschnittliche Flavonoidmenge, die mit der Nahrung aufgenommen wurde, zu 23 mg/Tag bestimmt. Quercetin stellte dabei mit 16 mg/Tag die bedeutendste flavonoidische Verbindung dar. Als wichtigste Quellen der Flavonoide nannten sie Tee (48 %), Zwiebeln (29 %) und Äpfel (7 %).

Die Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL) hat vor fast zwanzig Jahren (1985–1988) die erste NATIONALE VERZEHRSTUDIE (NVS) durchgeführt. Seitdem haben sich das Lebensmittelangebot, das Konsum- wie auch das Freizeitverhalten der Bevölkerung deutlich verändert. Daher erfolgte von November 2005 bis Oktober 2006 die zweite Erhebung der Daten zum Konsumverhalten der Deutschen. Momentan befindet sich die NVS II in der Auswertungsphase; ein Ergebnisbericht mit den Verzehrdaten (Lebensmittelverzehr und Nährstoffaufnahme) wird voraussichtlich im April 2008 veröffentlicht. In der NVS I wurde aus den Daten der bayerischen Gruppe, bestehend aus 119 Teilnehmern der Studie, die durchschnittliche tägliche Flavonidaufnahme aus der Nahrung zu 54 mg/Tag ermittelt.

Die wichtigsten Flavonoidgruppen sind Flavanone (13.2 mg/Tag), Flavonole (12.0 mg/Tag) und Catechin (8.3 mg/Tag). Dabei gelten Obst, Obstprodukte und Obstsäfte als Hauptquellen der Flavonoide.⁷⁴

Konkrete Angaben über die Menge der mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole lassen sich nur schwer machen, da hierbei das Konsumverhalten der Menschen, das durch saisonale und geographische Parameter beeinflusst wird, wie auch Unterschiede in den Ernährungserhebungsmethoden eine entscheidende Rolle spielen. So ist das Interesse an Flavanonen in südeuropäischen Ländern besonders groß, da hier im internationalen Vergleich mehr Zitrusfrüchte verzehrt werden als in anderen Ländern. In Finnland ist der Konsum von Beerenobst vergleichsweise höher, so dass hier vor allem Studien zu Anthocyanen durchgeführt werden. In Asien hingegen ist der pro Kopf Verbrauch von sojahlaltigen Lebensmitteln um ein Vielfaches größer als in Europa oder den USA; hier werden in erster Linie Studien zu Isoflavonen durchgeführt.

1.3 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden

Um die Fähigkeit der Flavonoide, *in vivo* als Antioxidantien agieren zu können, zu evaluieren, muß man ihre Bioverfügbarkeit und Interaktionen im gastrointestinalen Trakt verstehen.⁶⁵ Laut amerikanischer Gesundheitsbehörde FDA (engl.: *Food and Drug Administration*) ist in der Pharmakologie die Bioverfügbarkeit eine Einheit dafür, wie schnell und in welchem Umfang ein Wirkstoff oder ein therapeutischer Wirkstoffanteil resorbiert wird und am Wirkort zur Verfügung steht bzw. aus seiner pharmazeutischen Form in den systemischen Kreislauf abgegeben wird.

Zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit ist im intraindividuellen Vergleich immer eine intravenöse (i.v.) Gabe notwendig, auf die sich die pharmakokinetischen Daten nach z.B. oraler Gabe beziehen. Komplexe Pflanzenextrakte mit hochmolekularen Stoffen stellen dabei eine Ausnahme dar, da beim Menschen keine i.v. Gabe dieser Substanzen möglich ist. Des Weiteren sind bei Gabe eines Gesamtextraktes die für die Wirkung verantwortlichen Verbindungen oft nicht bekannt. Aus diesem Grund wird in der Literatur wie auch in dieser Arbeit der Begriff Bioverfügbarkeit für Pflanzenextrakte nicht im strengen Sinn der FDA gebraucht. Wird im Folgenden der Begriff Bioverfügbarkeit verwendet, so sind die Absorption

und das Vorliegen am Wirkort von zum Teil unbekanntem Bestandteilen des Extraktes gemeint und nicht eine einzelne Wirksubstanz.

Um biologische Effekte erzielen zu können, müssen Pflanzenextrakte oder -bestandteile zu einem gewissen Grad bioverfügbar sein. Bis vor kurzem war das Schicksal von Flavonoiden im menschlichen Organismus noch unbekannt. Jedoch haben neue analytische Techniken es erlaubt, die Aufnahme und den Metabolismus eines komplexen Gemisches von polyphenolischen Verbindungen aus der Nahrung zu untersuchen. Die Konzentration an Monomeren, Dimeren und Trimeren in Nahrungsmittelbestandteilen wird bei weitem von den höher polymerisierten Polyphenolen übertroffen. Neueste Studien zeigen, dass jedoch nur die niedermolekularen Oligomere (Polymerisationsgrad ≤ 3) unverändert in den gastrointestinalen Trakt absorbiert werden.

So konnte z.B. gezeigt werden, dass Quercetin nach Konsum von Zwiebeln⁷⁵, Catechin nach Rotweingenuss⁷⁶ und Isoflavone nach Verzehr einer sojahaltigen Mahlzeit⁷⁷ im Blut Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich erreichen. Diese Forschungsergebnisse haben nicht nur bestätigt, dass polyphenolische Substanzen die intestinale Schranke überwinden können, sondern auch, dass im Blut Konzentrationen erreicht werden, die bereits in zuvor durchgeführten *in vitro* Studien Effekte erzielten. Déprez et al.⁷⁸ haben z.B. bei ihren Untersuchungen festgestellt, dass (+)-Catechin und Proanthocyanidin-dimere und -trimere durch die humane intestinale Zelllinie Caco-2 permeabel sind.

1.4 Absorption und Metabolismus von Flavonoiden

Nicht nur die Bioverfügbarkeit der Flavonoide im humanen Organismus spielt eine Rolle bei der Betrachtung ihrer Aktivitäten, sondern auch Konjugation und Metabolismus müssen in die Untersuchungen mit einbezogen werden. So können nicht alle polyphenolischen Verbindungen in ihrer nativen Form biologische Effekte ausüben. Die Ursache dafür können eine niedrige intrinsische Aktivität, eine geringe Resorption, eine hohe Metabolisierungsrate oder eine schnelle Elimination sein. Darüberhinaus werden die aktiven Wirkkomponenten oft erst *in vivo* gebildet.⁶⁸

Die gegenwärtigen Kenntnisse des Flavonoidmetabolismus rühren von den Pionierarbeiten von Booth et al.⁷⁹ in den 50er Jahren und den weiterführenden Arbeiten von Hackett et al.⁸⁰, die den Katabolismus und die Spaltung der Flavonoid-

ringe in Tierstudien untersucht haben. Pflanzenflavonoide sind im Allgemeinen an Zucker konjugiert. Diese Glycoside werden mit der Nahrung aufgenommen und gelangen so in den gastrointestinalen Trakt. Flavan-3-ole stellen eine Ausnahme dar, da sie in der Nahrung fast immer in nicht-glycosylierter Form vorliegen. Folglich besteht hier nicht wie bei anderen Nahrungsflavonoiden die initiale Voraussetzung der β -Glucosidase-Reaktion vor Absorption der Moleküle.

Bisher existieren nur wenige Studien, die sich eingehender mit der Wirkung von Speichel und Magensaft auf die Flavonoidstruktur beschäftigen. Tsuchiya et al.⁸¹ konnten zeigen, dass Speichel nur einen sehr geringen Effekt auf die Stabilität von in grünem Tee enthaltenen Catechinen besitzt. Flavan-3-ole gelten im Magen generell als stabil, Flavanoligomere (Dimere bis Decamere) hingegen sind bei niedrigen pH-Werten instabil. So wurden bei einem *in vitro* Experiment Procyanidine, die für 0.1–3 h mit künstlicher Magensäure inkubiert wurden, schnell in monomere und dimere Epicatechin-Einheiten zersetzt.⁸² Die Monomere und Oligomere gelangen anschließend in den Dünndarm, wo zahlreiche Faktoren das Ausmaß und die Rate der Absorption der aufgenommenen Verbindungen beeinflussen. Dazu gehören physiochemische Faktoren wie Molekülgröße, Lipophilie, Löslichkeit, pK_a -Wert und biologische Faktoren wie Magen- und Darm-Transitzeit, pH-Wert des Lumen, Membranpermeabilität und *first-pass*-Metabolismus.

Aufgrund von Untersuchungen vermutet man, dass das Ausmaß der Absorption von Nahrungspolyphenolen im Dünndarm relativ gering ist (10–20 %). Beim Übergang vom Magen in das Jejunum (obere zwei Fünftel des Dünndarms) steigt der pH-Wert von 2 auf 7 an. Man weiß, dass polyphenolische Verbindungen in neutraler bis basischer Umgebung oxidiert werden. Die meisten Modifikationen im Dünndarm führen zur Bildung von Glucuronidkonjugaten, die polarer sind als das ursprüngliche Flavanol.⁸³ Andere Phase II Prozesse führen zur Bildung von O-methylierten Formen. Eine Interventionsstudie mit Ileostomie-Probanden, die nach 24-stündiger polyphenolfreier Ernährung 300 g Wildheidelbeeren verzehrten, zeigte, dass durchschnittlich 46 % der aufgenommenen Anthocyanmenge im Ileostoma-Ausfluss wieder gefunden werden konnte. Glucoside wurden dabei am stärksten metabolisiert und aufgenommen, wohingegen Galactoside und Arabinoside stabiler waren. Diese Tendenz wurde auch in Modellversuchen bestätigt.⁸⁴

Weitere signifikante Modifikationen von Flavanolen erfolgen im Dickdarm, wo sie durch die Mikroflora enzymatisch zu kleineren Phenolsäuren degradiert werden,

von denen ein gewisser Teil absorbiert wird.⁸⁵ Die Biotransformation von Flavonoiden im Dickdarm wurde von Labib^{86,87} mit einem Schweine-Caecum-Modell untersucht, da Mensch und Schwein eine große Ähnlichkeit hinsichtlich der Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes aufweisen. Aus der beobachteten Abbaukinetik ergab sich, dass Flavonoide in Abhängigkeit von ihrem Substitutionsmuster unterschiedlich schnell von den Darmbakterien umgesetzt werden. Unabhängig von der Flavonoid-Unterklasse war eine Hydroxylierung in Position 4' des B-Ringes für den Abbau der Flavonoide von Vorteil; bei den Flavonen ermöglichte dieses Substitutionsmuster sogar erst den Abbau. Eine OH-Funktion in 3-Position des C-Ringes war ebenfalls förderlich.

Die meisten Metabolite werden durch die renale Exkretion aus dem Körper eliminiert. Das Ausmaß, zu dem diese Verbindungen in die Zellen und das Gewebe gelangen ist noch weitestgehend unbekannt (Abbildung 4).^{72,85}

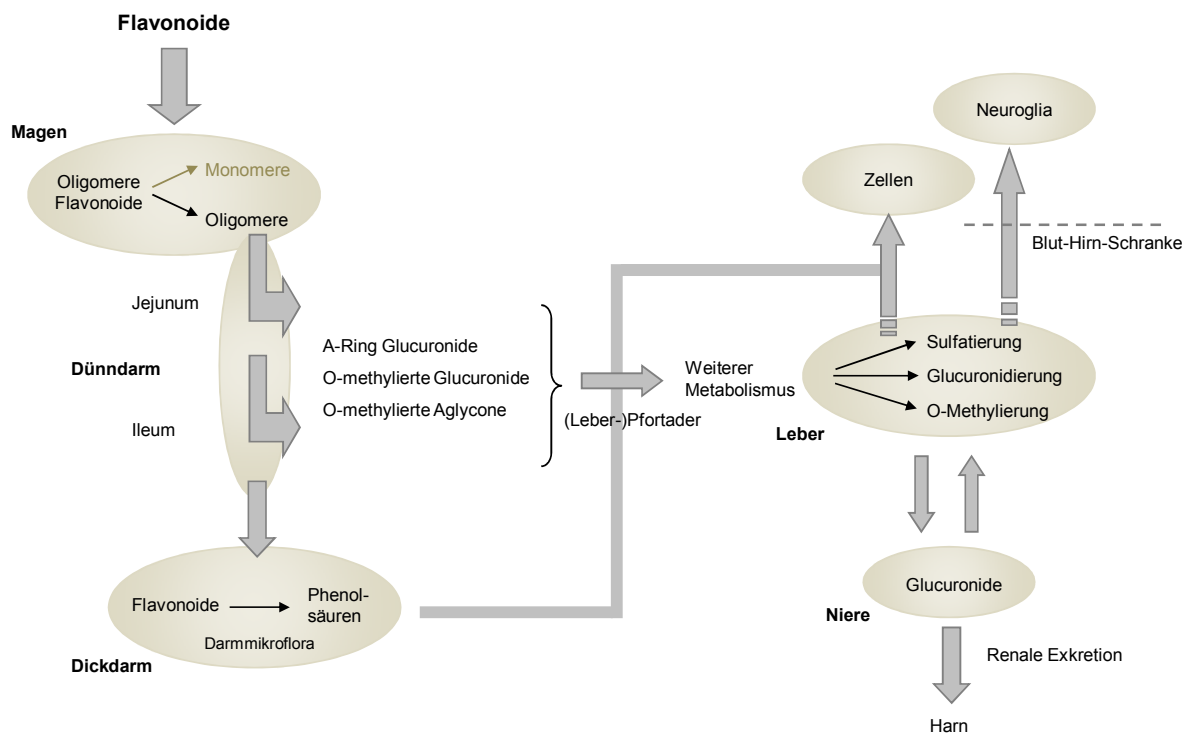


Abbildung 4: Absorbierte Flavonoide unterliegen nach Metabolisierung im Dünndarm verschiedenen Reaktionen in der Leber, wie z.B. Methylierung, Sulfatierung und Glucuronidierung, was zu zahlreichen konjugierten Formen führt, die dann in den systemischen Kreislauf aufgenommen werden. (nach Spencer et al.⁸⁵)

Neueste HPLC-Techniken, die zur Analyse von Flavonoiden und ihren Degradierungsprodukten in humanem Urin und Stuhl eingesetzt wurden, konnten Methylierungs-, Hydroxylierungs-, O-Methylierungs-, Sulfatierungs- und Glucuronidierungsprodukte nachweisen, die hauptsächlich nach Transformation in Leber und intestinaler Mikroflora auftraten (Abbildung 5).⁸⁸

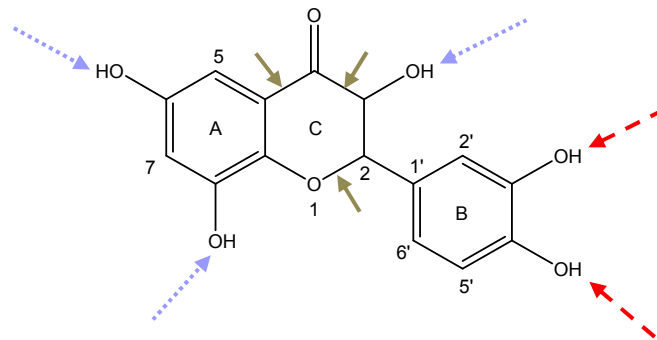


Abbildung 5: Mögliche Angriffspunkte für Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung ($\cdots\rightarrow$), Oxidation ($- \rightarrow$) und/oder Bindungsspaltung (\rightarrow) der Flavonoide.⁸⁸

Bravo et al.⁸⁸ haben die Degradierung der polyphenolischen Verbindungen Catechin und Gerbsäure im intestinalen Trakt von Ratten untersucht. Männliche Wistar Ratten erhielten über einen Zeitraum von drei Wochen 20 g/kg Körpergewicht Catechin und Gerbsäure. Bei ihren Untersuchungen stellten sie nur eine geringe Fermentation durch die Darmflora fest. Weniger als 5 % der aufgenommenen Catechine und Gerbsäure wurden über den Kot der Ratten unverändert ausgeschieden. Daraus schlossen sie, dass die polyphenolischen Verbindungen absorbiert und/oder degradiert wurden.

Die Absorption und den Metabolismus von (+)-Catechin haben Das et al.⁸⁹ an sechs gesunden, männlichen Freiwilligen nach Gabe einer Einzeldosis von 92.3 mg/kg Körpergewicht (+)-Catechin untersucht. Innerhalb von 6 h konnten sie Phenole im Plasma nachweisen. Im Urin wurden elf Metabolite in freier und konjugierter Form, sowie als Sulphatkonjugate detektiert. Als wichtigste Lactonmetabolite identifizierten sie δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton und δ -(3-Hydroxyphenyl)- γ -valerolacton. Im Stuhl wurden etwa 19 % der verabreichten Dosis unverändert ausgeschieden.

Die Konzentration von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und ihren Metaboliten in Plasma und Urin von Ratten nach oraler Verabreichung wurde von Baba et al.⁹⁰ mittels HPLC-Massenspektrometrie bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass absorbiertes (+)-Catechin und (-)-Epicatechin im Plasma hauptsächlich in Form von nicht-methylierten oder 3'-O-methylierten Konjugaten vorhanden war. Des Weiteren schlossen sie aus den Ergebnissen, dass die Bioverfügbarkeit von (-)-Epicatechin in Ratten generell höher ist als die von (+)-Catechin, und dass bei kombinierter Gabe von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin diese Substanzen im gastrointestinalen Trakt von Ratten kompetitiv absorbiert werden.

1.5 Absorption und Metabolismus von Pycnogenol

Virgili et al.⁹¹ haben die Exkretion von Ferulasäure als Marker des Konsums von Pycnogenol untersucht. Elf gesunde Probanden erhielten entweder eine Einzeldosis von 200 mg Pycnogenol oder zwei Gaben von 100 bzw. 200 mg Pycnogenol. Zwei Tage vor und während der Einnahmephase des Extraktes hielten die Teilnehmer der Studie eine polyphenolarme Diät ein. Bei der Untersuchung des 24-h-Gesamturins mittels HPLC konnte ein enger Zusammenhang zwischen Pycnogenoleinnahme und Harnausscheidung festgestellt werden. Eine beträchtliche Menge an Ferulasäure in Form von Glucuroniden und Sulfaten wurde ausgeschieden. Die Ergebnisse dieser Studie beweisen, dass zumindest ein Teil der phenolischen Bestandteile von Pycnogenol im humanen Organismus absorbiert, metabolisiert und eliminiert werden.

δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (im Folgenden M1 genannt) und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (im Folgenden M2 genannt) gehören zu den Hauptmetaboliten, die nach oraler Gabe aus dem Abbau von in Pycnogenol enthaltenen Procyanidinen bzw. Catechinen im humanen Organismus gebildet und im Urin nachgewiesen wurden.^{92,93}

So konnten z.B. Grounewoud et al.⁹⁴ nach fünftägiger Inkubation von Ratten-Mikroflora mit Procyanidin B3 verschiedene hydroxylierte Benzoessäuren und Phenylpropionsäuren sowie den Catechinmetaboliten δ -(3-Hydroxyphenyl)- γ -valerolacton nachweisen. Daraus schlossen sie, dass der Metabolismus der Procyanidine durch den Bindungsbruch des Oligomers in die Monomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin initiiert wird.

Die Untersuchungen von Große Düweler^{93,95} haben gezeigt, dass nach oraler Gabe von 5.28 g bzw. 1.06 g Pycnogenol Metabolite von im Extrakt enthaltenen Procyanidinen im Urin nachweisbar sind. Die beiden an Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugierten Metabolite δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton wurden innerhalb von 28–34 h ausgeschieden, wobei das Maximum der Harnausscheidung 8–12 h nach Einnahme des Extraktes erreicht wurde. Taxifolin und Ferulasäure wurden, ebenfalls in konjugierter Form, innerhalb von 18 h ausgeschieden, mit einem Maximum der Harnausscheidung 2–3 h nach Einnahme. Aus den Daten konnte geschlossen werden, dass Procyanidine im humanen Organismus absorbiert und metabolisiert werden. Da die beiden Metabolite sowohl nach Einnahme von Pycnogenol als auch nach Einnahme einer Procyanidinfraktion nachgewiesen werden konnten, musste die Synthese der Metabolite folglich aus den Procyanidinen erfolgen.

Grimm⁹⁶ hat im Rahmen ihrer Dissertation die Absorption von Inhaltsstoffen des Kiefernrintenextraktes mittels HPLC untersucht. Nach Mehrfachgabe des Extraktes konnte sie die monomeren Bestandteile (+)-Catechin, Ferulasäure und Kaffeesäure, sowie den Metaboliten M1 in humanem Serum nachweisen. Dabei stimmte die Konzentration der identifizierten Substanzen mit dem mengenmäßigen Vorkommen in Pycnogenol überein. M1, der erst im Körper gebildet wird, wies eine sehr niedrige mittlere Konzentration von 3.01 ng/ml auf. Um das Maximum der Serumkonzentration des Metaboliten und einiger unbekannter Verbindungen zu bestimmen, wurden anschließend Proben untersucht, die nach einmaliger Gabe von Pycnogenol zu bestimmten Zeitpunkten (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 h) gewonnen wurden. In den ersten vier Stunden nach Extraktgabe war noch kein M1 im Serum detektierbar. Das Maximum der Serumkonzentration wurde 10 h nach Einnahme des Rindenextraktes erreicht. Somit konnte belegt werden, dass der Metabolit M1 erst im humanen Organismus durch Metabolisierung entsteht. Auch wurde gezeigt, dass die Bestandteile und Metabolite zum Teil an Sulfat und Glucuronsäure konjugiert vorlagen, wobei der Grad der Konjugation signifikante interindividuelle Unterschiede aufwies. So war (+)-Catechin z.B. je nach untersuchter Probe zu 0 bis 100 % konjugiert, wobei der Durchschnitt der Konjugation 56.5 % betrug. Der Metabolit M1 war in freier Form nicht detektierbar, so dass geschlussfolgert werden konnte, dass er zu 100 % konjugiert vorliegt.

Auch Lee et al.⁹⁷ konnten den Metaboliten M1 im Plasma wie auch im Urin nachweisen. Sie untersuchten die Bildung verschiedener Metabolite von Tee-Catechinen nach Einnahme von grünem Tee. Bereits nach 3–5 h waren signifikante Konzentrationen des Metaboliten M1 im Plasma detektierbar. Das Maximum der Plasmakonzentration wurde nach 8–12 h erreicht.

2 Antioxidative und Radikalfänger-Eigenschaften von phenolischen Verbindungen

2.1 Antioxidantien in Nahrungsmitteln und Pflanzen

Das Interesse an den antioxidativen Eigenschaften von Nahrungsmittel- und Arzneipflanzenbestandteilen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Zahlreiche *in vitro* Studien haben belegt, dass von Pflanzen stammende Antioxidantien wie Vitamin E, Vitamin C und Flavonoide gute Radikalfängereigenschaften und hohe antioxidative Aktivitäten besitzen.^{93,98,99}

Verschiedene Ernährungsstudien wie die Zutphen Elderly Studie haben gezeigt, dass eine hohe Flavonoidzufuhr das Risiko einer koronaren Herzerkrankung (engl.: *coronary heart disease*, CHD) reduziert. Auch das sogenannte „French Paradoxon“ ist hiermit zu erklären: in einigen Regionen Frankreichs ist das Risiko für CHD trotz unausgewogener Ernährung (hohe Fettzufuhr) sehr niedrig. Ursache hierfür ist der regelmäßige Konsum von Rotwein, dessen procyanidinhaltige Bestandteile für eine Senkung des Cholesterinspiegels verantwortlich sind und so wiederum die Gefahr einer Arteriosklerose reduzieren.⁹³

Eine erhöhte Einnahme von Antioxidantien mit der Nahrung kann dabei helfen, einen adäquaten Antioxidanz-Status, der als Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien in allen lebenden Organismen definiert ist, und folglich die normale physiologischen Funktionen eines lebenden Organismus aufrecht zu erhalten. Obst und Gemüse stellen die Hauptquellen für Antioxidantien aus Nahrungsmitteln dar, die unter anderem die antioxidative Kapazität von Plasma erhöhen können.¹⁰⁰

So haben z.B. Record et al.¹⁰¹ in einer Studie die Auswirkungen der Einnahme einer obst- und gemüsereichen Ernährung bzw. eines sprühgetrockneten Extraktes aus ausgesuchten Obst- und Gemüsesorten mit einem hohen antioxidativen Gehalt auf Indizes des antioxidativen Status untersucht. Bei ihren Untersuchungen konnten sie eine Änderung der antioxidativen Kapazität von Plasma nach Konsum einer obst- und gemüsereichen bzw. -armen Ernährung sowie nach Einnahme eines Antioxidanzgemisches zur Nahrungsergänzung feststellen.

Eberhardt et al.¹⁰² konnten bei ihren Arbeiten zeigen, dass 100 g frische Äpfel eine antioxidative Aktivität äquivalent der von 1500 mg Vitamin C besitzen, und dass

Extrakte aus ganzen Äpfeln das Wachstum von Darm- und Leberkrebszellen *in vitro* in einer dosisabhängigen Weise inhibieren können.

Mit dem antioxidativen Potential von Rotwein, das vor allem auf polyphenolische Verbindungen wie Tannine und Anthocyane zurückzuführen ist, haben sich Gaulejac et al.¹⁰³ beschäftigt. Diese Substanzen gewähren einen optimalen Einfang freier Radikale. Darüber hinaus konnte sogar eine verbesserte Reaktivität bei Zusammenspiel verschiedener Polyphenole beobachtet werden, die einen synergistischen Effekt bewirkten.

Sogenannte *Functional Foods*, Lebensmittel oder Bestandteile eines Lebensmittels, denen über die Zufuhr von Nährstoffen hinaus ein zusätzlicher Nutzen zugesprochen wird, der in der Steigerung des Wohlbefindens und dem Erhalt der Gesundheit liegt, stellen eine wichtige Quelle für exogene Antioxidantien dar.¹⁰⁴ Ihre Nährwerte werden in der Regel durch den Gesamtgehalt bestimmter Bestandteile wie Fett, Kalorien und Kohlenhydrate quantifiziert, die in den Nährwerttabellen auf der Nahrungsmittelverpackung angegeben sind. Diese Indizes sollen dem Verbraucher nützliche Informationen zur Ernährung liefern.

Obwohl Antioxidantien als wichtige Nahrungsphytochemikalien anerkannt werden, gibt es gegenwärtig auf den Nahrungsmittelverpackungen keinen Nährwertindex „Antioxidanzgehalt“ zur Etikettierung von Nahrungsmitteln, da standardisierte Quantifizierungsmethoden fehlen.¹⁰⁵

2.1.1 Antioxidantien

Ein Polyphenol muß zwei grundlegende Bedingungen erfüllen, um als Antioxidanz zu gelten:¹⁰⁶

- (1) Liegt die polyphenolische Verbindung in einer geringeren Konzentration vor als das zu oxidierende Substrat, kann es Autoxidation oder Radikal-induzierte Oxidation verzögern oder verhindern.
- (2) Das resultierende, nach Abfang gebildete freie Radikal muß gegenüber Oxidation stabil sein, z.B. durch Bildung intramolekularer Wasserstoff-Brückenbindungen.

Diese oxidationsempfindlichen Stoffe wirken, indem sie selbst oxidiert werden und so andere Substrate, wie beispielsweise Proteine oder Lipide vor unerwünschter Oxidation schützen. Die Antioxidantien sind in der Lage reaktive Radikale zu inhibieren, indem sie selbst zu einem Radikal abreagieren, welches jedoch mesomeriestabilisiert und daher zu reaktionsträge ist, um die Radikalkettenreaktion aufrecht zu erhalten. Die strukturelle Voraussetzung zur Mesomeriestabilisierung ist bei den meisten Polyphenolen, wie z.B. den Procyanidinen, gegeben.¹⁰⁷

2.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*; ROS) ist ein Sammelbegriff für Sauerstoffradikale wie auch für bestimmte nicht-Radikale (Tabelle 1), die oxidierende Agenzien darstellen und/oder leicht in Radikale umgewandelt werden können.⁶⁹

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies.

| Radikale | | Nicht-Radikale | |
|------------------|----------------|----------------------|----------------|
| Superoxidanion | $O_2^{\cdot-}$ | Wasserstoffperoxid | H_2O_2 |
| Hydroxyl | HO^{\cdot} | Hypochlorid | $HOCl$ |
| Alkoxy | RO^{\cdot} | Ozon | O_3 |
| Peroxy | ROO^{\cdot} | Singulett Sauerstoff | 1O_2 |
| Stickstoffmonoxy | NO^{\cdot} | Peroxynitrit | $ONOO^{\cdot}$ |

2.1.2.1 Entstehung freier Radikale

Freie Radikale und andere reaktive Substanzen wie Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hypochlorid ($HOCl$) werden *in vivo* vor allem als Folge des aeroben Metabolismus produziert. Über 90 % des Sauerstoffs (O_2), der in humane Zellen gelangt, wird in der Atmungskette umgesetzt und dient zur Energiegewinnung mittels mitochondrialer Cytochromoxidase durch oxidative Phosphorylierung. Während dieses Prozesses wird molekularer Sauerstoff durch Übertragung von vier Elektronen auf ein O_2 -Molekül zu Wasser reduziert.

Etwa 1–4 % des Sauerstoffs, der von den Zellen aufgenommen wird, bildet jedoch teilweise reduzierte O_2 -Spezies, die sogenannten ROS.¹⁰⁸ Dieses Phänomen,

dass die Anwesenheit von Sauerstoff im System aerober Organismen sowohl deren Überleben gewährleistet, als auch in vielen Fällen gleichermaßen zu deren langsamer Zerstörung führen kann, ist unter dem Begriff „Sauerstoff Paradoxon“ bekannt.¹⁰⁹

In Gegenwart von Übergangsmetallionen können Superoxidation und Wasserstoffperoxid interagieren und eine hoch reaktive oxidierende Verbindung, das Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$), bilden (Abbildung 6). Andere Radikale wie Alkyl- ($\text{R}\cdot$), Alkoxy- ($\text{RO}\cdot$) und Peroxylradikale ($\text{ROO}\cdot$) werden zum Teil endogen gebildet. Eine weitere wichtige Quelle für ROS stellt die Lipidperoxidation dar. Darüberhinaus können ROS in der Zelle als Folge von umweltbedingtem Stress entstehen.¹¹⁰

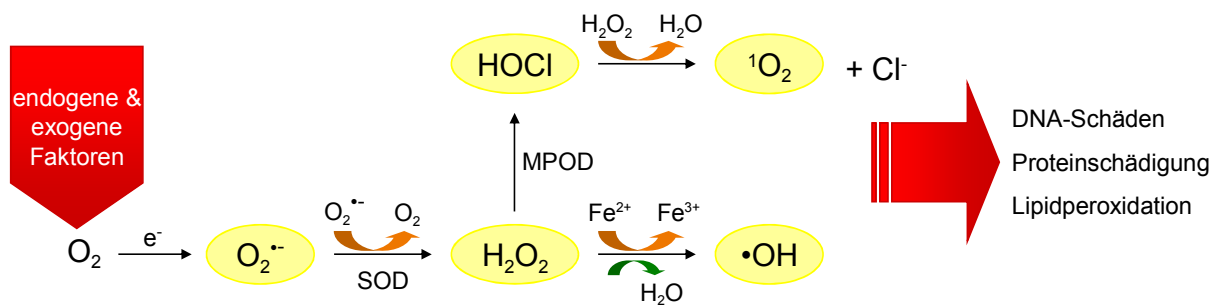
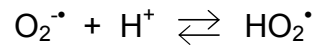


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Reaktionsweges, der zur Bildung von ROS führt. Endogene Faktoren wie die Zellatmung selbst, sowie exogene Faktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum, radioaktive und UV-Strahlung, Umweltgifte und Stress können zur Bildung von hoch reaktivem Superoxidation führen. Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Weiterreaktion zu Wasserstoffperoxid, aus dem in Gegenwart von Übergangsmetallen das Hydroxylradikal bzw. katalysiert von Myeloperoxidase (MPOD) Hypochlorid entstehen.

2.1.2.1.1 Das Superoxidationradikal

In vivo wird das Superoxidationradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) durch Aufnahme eines einzelnen Elektrons durch ein O_2 -Molekül generiert.¹⁰⁸ Dies kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, wie z.B. mittels NADPH-Oxidase in aktivierten Leukocyten an Stellen von Entzündungen und/oder mittels Xanthinoxidase, die bei Ischämie/Reperfusion aktiviert wird. Allgemein gilt das Superoxidationradikal gegenüber biologischen Substraten in einer wässrigen Umgebung als nicht sehr reaktiv.

In Lösung existiert das Superoxidanionradikal im Gleichgewicht mit dem Hydroperoxyradikal HO_2^\cdot :



HO_2^\cdot ist wesentlich lipidlöslicher und ein viel wirksameres Oxidations- oder Reduktionsmittel als $\text{O}_2^{\cdot-}$. Folglich ist die Lipidperoxidation in acidischer Umgebung aufgrund der Reaktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu HO_2^\cdot erhöht.¹¹¹

Entweder spontan oder katalysiert durch Superoxiddismutase, ein wichtiges antioxidatives Enzym, unterläuft das Superoxidanionradikal eine Dismutation und bildet Wasserstoffperoxid.

2.1.2.1.2 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gilt nur als toxisch, wenn es in erhöhter Konzentration in der Zelle vorliegt. Allerdings besitzt das Molekül die Fähigkeit, leicht durch die Zellmembran diffundieren und sich dabei an Stellen verteilen zu können, die weit von seinem Entstehungsort entfernt sind, was ihm toxische Eigenschaft verleiht. Außerdem wird es in Gegenwart von Übergangsmetallen, meist Fe^{2+} , gebildet durch Reduktion von Fe^{3+} durch $\text{O}_2^{\cdot-}$, aber auch Cu^+ , zum Hydroxylradikal via Haber-Weiss- bzw. Fenton-Reaktion reduziert.¹⁰⁸

Ein weiterer Reaktionsweg für Wasserstoffperoxid ist die Bildung von Hypochlorid (HOCl) in aktivierten Leukocyten durch Myeloperoxidase und Chloridionen.¹¹²

2.1.2.1.3 Das Hydroxylradikal

Das Hydroxylradikal (HO^\cdot) ist möglicherweise nicht die einzige schädliche Spezies, die während der Fenton-Reaktion gebildet wird, aber es ist aufgrund seiner hohen Reaktivität und des Fehlens spezieller Enzyme, die es unschädlich machen könnten, das aggressivste und schädlichste Radikal in biologischen Systemen.¹¹³ Seine Entstehung, wie auch seine Fähigkeit benachbarte Moleküle zu oxidieren, sind gut dokumentiert.¹¹²

Einmal gebildet reagiert das Hydroxylradikal schnell mit anderen Molekülen, die innerhalb weniger Ångström seines Entstehungsortes liegen. Aufgrund seiner hohen Reaktivität wird seine Halbwertszeit bei 37 °C auf $1 \cdot 10^{-9}$ sec geschätzt. Das Hydroxylradikal ist in der Lage sehr leicht nukleäre und mitochondrische DNA, Membranlipide und Kohlenhydrate zu zerstören.¹¹²

2.1.2.2 Pathologie reaktiver Sauerstoffspezies

Bei vielen biochemischen Reaktionen, die eine Erkrankung des menschlichen Organismus zur Folge haben, wird die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert.^{69,107} Eine übermäßige Produktion freier Radikale induziert die Peroxidation von polyungesättigten Fettsäuren in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und löst somit eine Kettenreaktion von Lipidperoxidationen aus. Dies führt zur Schädigung der zellulären Membran, weiterhin zur Oxidation der Membranlipide und Proteine und zuletzt zur Schädigung von Zellbestandteilen wie DNA. Die Folge ist oxidativer Stress.

Unter dem Ausdruck „oxidativer Stress“ versteht man im Allgemeinen die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten der prooxidativen Seite. Die Rolle des oxidativen Stresses bei den diversen Krankheiten ist nicht immer dieselbe und kann generell in drei Kategorien eingeteilt werden.⁶⁹

- (1) Oxidativer Stress als Ursache der Erkrankung. Zum Beispiel generiert ionisierende Bestrahlung Hydroxylradikale durch Spaltung von Wassermolekülen. Die Bildung von hoch reaktiven $\cdot\text{OH}$ -Radikalen gilt als eine der möglichen Ursachen von strahlungsbedingter Karzinogenese.
- (2) Oxidativer Stress ist nicht die Ursache der Erkrankung, trägt aber zur Pathologie der Krankheit bei. Zwei ausgiebig untersuchte Beispiele hierfür sind Arteriosklerose und rheumatoide Arthritis.
- (3) Bei der Mehrheit der Erkrankungen tritt oxidativer Stress als Begleiterscheinung auf, trägt aber nicht zur Pathologie der Erkrankung bei.

Unter dem Begriff *Free Radikal Diseases* werden eine Vielzahl von degenerativen oder chronisch-entzündlichen Prozessen zusammengefasst, bei denen eine Überproduktion von ROS eine wichtige Rolle spielt, wie z.B. rheumatische Erkrankungen, Arteriosklerose, Asthma, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, Krebs, AIDS, sowie neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit, aber auch inflammatorische Prozesse.

Eine Entzündung ist ein Prozess, der durch freie Radikale generiert wird, andererseits werden in inflammatorischen Arealen auch freie Radikale produziert. Der Alterungsprozess des Körpers wird ebenfalls der Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies zugeschrieben.^{98,107,110,114}

Es gibt zahlreiche Studien, bei denen nachgewiesen wurde, dass Diabetes-Patienten nicht nur einen erhöhten Spiegel an zirkulierenden Markern für Radikal-induzierte Schäden aufweisen, sondern auch ein vermindertes antioxidatives Abwehrsystem besitzen. Zum Beispiel sind die Plasmaspiegel von Wasserstoffperoxid, einem Marker von oxidativem Stress, bei Patienten mit Typ 2 Diabetes höher als bei nicht-diabetischen Kontrollen. Die H₂O₂-Konzentrationen korrelieren dabei invers mit dem Grad an metabolischer Kontrolle.¹¹⁵ Zu den verschiedenen Mechanismen, über die Hyperglykämie oxidativen Stress induzieren kann, gehören Glucose-Autoxidation, die Bildung von *advanced glycation end-products* (AGE) und die Aktivierung des Polyol-Reaktionsweges.¹¹⁶

2.1.2.3 Physiologische Bedeutung der reaktiven Sauerstoffspezies

Einige ROS gelten allerdings auch als nützliche Verbindungen und sind z. B. bei der Immunantwort, bei hepatischer Cytochrom P-450-initiiertes Detoxifikation und auch bei der Regulation des glatten Muskeltonus unverzichtbar. Auch bei der Energieproduktion, Phagozytose, Regulation des Zellwachstums, intrazellulären Signalwegen wie auch bei der Synthese von biologisch wichtigen Verbindungen spielen ROS eine entscheidende Rolle.¹¹⁷ Ein gewisses Quantum der instabilen Sauerstoffverbindungen braucht der Organismus zur Abwehr von Fremdstoffen und zur Vernichtung von Krankheitserregern.¹¹⁸ Reguliert wird die fragile Balance der Redoxprozesse durch endogene und exogene Antioxidantien. Alle aeroben Organismen besitzen ein körpereigenes Abwehrsystem, um den Folgen von durch ROS verursachten Zellschäden vorzubeugen. Hierzu gehören antioxidative Enzyme

wie Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionreduktase, Glutathionperoxidase sowie das Coenzym Q10, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Glutathion, Transferrin, Ferritin, Melatonin, Harnsäure und Plasmaproteinthiole, die die oxidativen Prozesse regulieren.^{110,119} Darüber hinaus zeigen auch mit der Nahrung aufgenommene Antioxidantien wie Arginin, Citrullin, Taurin, Kreatin, Mineralien wie Selen und Zink, Vitamine wie Vitamin A, C und E, Carotenoide und Teepolyphenole synergistische Reaktionen beim Einfang freier Radikale und Schutz des Körpers vor schädlichen Einflüssen.¹²⁰

2.1.3 Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von polyphenolischen Substanzen

Es gibt zahlreiche Methoden, um die Wirksamkeit von Antioxidantien in der Nahrung sowohl als Reinsubstanzen als auch in Extrakten zu messen, wie auch um die antioxidative Aktivität von Plasma als Index des antioxidativen Status *ex vivo* zu bestimmen und zu bewerten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Substanzen.

| Assay | Abkürzung für | Messung von | Methode |
|-------|--|--|---------|
| DPPH | Diphenylpicrylhydrazyl | Reaktivität der Probe mit einem stabilen Radikal | HAT |
| FRAP | Ferric Reducing Antioxidant Power | eisenreduzierende Fähigkeit einer Probe | SET |
| ORAC | Oxygen Radical Absorbance Capacity | Quenchung von freien ROS | HAT |
| TEAC | Trolox Equivalent Antioxidant Capacity | Quenchung eines Radikalkations (ABTS•+) | SET |
| TRAP | Total Reducing Ability of Plasma | Hemmung von Peroxylradikalen nach thermischem Zerfall von AAPH | HAT |

ABTS = 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat); AAPH = 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-di-hydrochlorid; HAT = Hydrogen Atom Transfer Reaction; SET = Single Electron Transfer Reaction

Diese Modelle fokussieren auf verschiedene Mechanismen des antioxidativen Abwehrsystems, z.B. den Einfang von Sauerstoff- und Hydroxylradikalen, die

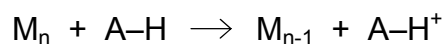
Reduktion von Lipidperoxyradikalen, die Inhibition von Lipidperoxidation oder die Chelatisierung von Metallionen.¹¹⁴

2.1.4 Mechanismen der Hemmung von radikalischen Spezies

Der menschliche Organismus kann sich gegen Radikale über verschiedene Mechanismen, wie spezielle Enzyme, aber auch nicht-enzymatische Antioxidantien (Abschnitt 2.1.2.3) zur Wehr setzen. Man unterscheidet grundsätzlich fünf Mechanismen der antioxidativen Aktivität:⁶⁹

- (1) Einfang freier Radikale
- (2) Chelatisierung von Übergangsmetallen
- (3) Inhibierung von Enzymen
- (4) Enzymatische Aktivität
- (5) Quenchung von Singulett-Sauerstoff.

Mechanistisch basieren diese Methoden entweder auf einer Ein-Elektron-Transfer- (engl.: *single electron transfer*, SET) Reaktion oder einer Wasserstoffatom-Transfer- (engl.: *hydrogen atom transfer*, HAT) Reaktion zwischen einem Oxidanz und einem freien Radikal.¹⁰⁵ Bei den auf SET basierenden Methoden wie dem FRAP-Assay, werden Antioxidantien durch Oxidationsmittel wie Fe(III) oxidiert.



mit M = Metall
A = Antioxidanz

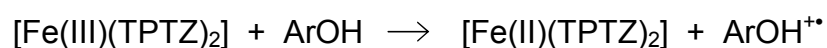
Infolge wird ein einzelnes Elektron vom Antioxidanz-Molekül auf das Oxidanz transferiert. Die Absorptionsänderung von entweder Antioxidanz oder Oxidanz wird durch ein UV-VIS-Spektrometer gemessen und der Absorptionswert zur Quantifizierung für die reduzierende Kapazität des Antioxidanz verwendet.¹⁰⁵

2.2 Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels FRAP-Assay

Das FRAP- (engl.: *ferric reducing antioxidant power*) Assay beurteilt die antioxidative Aktivität von Verbindungen im Hinblick auf ihre eisenreduzierende Kraft.¹¹⁴

2.2.1 Mechanistische Grundlagen des FRAP-Assays

Das FRAP-Assay basiert wie bereits in Abschnitt 2.1.4 erwähnt auf einer SET-Reaktion, bei der ein einzelnes Elektron vom Antioxidanz-Molekül auf das Oxidanz, hier den Ferri-tripyridyl-triazin-Komplex, übertragen wird. Dabei wird dieser zu Ferro-tripyridyltriazin reduziert, wobei eine intensiv blau-violette Farbe entsteht, deren Absorptionsmaximum bei 593 nm liegt.¹⁰⁵



mit Ar = Aromat

2.2.2 Der EC₁- Wert

Der EC₁-Wert (engl.: *equivalent concentration*) ist definiert als diejenige Konzentration an Antioxidanz, die eine Absorptionsänderung und folglich einen reduzierenden Effekt äquivalent dem einer 1 mM Fe(II)-Lösung bewirkt.¹¹⁴ Dieser Parameter wurde aus der korrespondierenden Regressionsgleichung ermittelt, die man durch Auftragen der Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindungen gegen die jeweiligen Absorptionsänderungen erhielt. Der EC₁-Wert ermöglicht die Beurteilung der Effektivität der Testsubstanzen, denn je größer dieser Wert ist, desto geringer ist die reduzierende Kraft bzw. die antioxidative Aktivität der Substanz.

2.2.3 Ergebnisse des FRAP-Assays der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol

Das FRAP-Assay ist das einzige Assay, mit dem Antioxidantien bzw. Reduktionsmittel in einer Probe direkt gemessen werden können. Andere Assays verwenden indirekte Methoden, indem sie die Hemmung von reaktiven Spezies

(freien Radikalen) messen, die zunächst im Reaktionsansatz generiert werden müssen. Die Ergebnisse hängen hierbei stark von der Art der untersuchten Verbindungen ab. Das FRAP-Assay hingegen misst die Antioxidantien als Reduktionsmittel in einer redox-bezogenen kolorimetrischen Reaktion.¹¹⁴

Die Ergebnisse der Metabolite M1 und M2, ihres Vorläufermoleküls (+)-Catechin, des Gesamtextraktes sowie von L-(+)-Ascorbinsäure als Referenzsubstanz wurden bereits in der eigenen Diplomarbeit¹²¹ dargestellt und diskutiert. In diesem Abschnitt werden diese Daten nochmals aufgegriffen, um sie mit den neu erhaltenen Werten von *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure und Protocatechusäure zu vergleichen.

2.2.3.1 Reaktionskinetiken

Zur Bestimmung der FRAP-Werte wurde die Absorptionsänderung ΔA_{593} der zu untersuchenden Substanzen über einen Zeitraum von 4 min gemessen und der Absorptionswert des Blanks (hier wurde Wasser anstatt einer Testsubstanz eingesetzt) anschließend von diesem Wert subtrahiert. Die dabei beobachteten zeitlichen Verläufe ließen sich in drei Gruppen einteilen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der untersuchten Substanzen anhand ihrer Reaktionskinetik.

| | Kinetik | Substanz |
|-----------------|--|--|
| Gruppe 1 | keine Absorptionsänderung | Ascorbinsäure, Kaffeesäure |
| Gruppe 2 | substanzspezifische Absorptionsänderung | (-)-Epicatechin, Gallussäure |
| Gruppe 3 | kontinuierliche Absorptionsänderung | M1, M2, (+)-Catechin, Protocatechusäure |
| keine Zuordnung | keine Reaktion im betrachteten Konzentrationsbereich | <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure, <i>o</i> -Cumarsäure |

Zur ersten Gruppe gehören die Referenzsubstanz Ascorbinsäure sowie der Pycnogenolbestandteil Kaffeesäure. Ihre zeitlichen Verläufe waren sehr ähnlich, ihre Graphen verliefen parallel zueinander mit einer Steigung gleich null. Die Absorption änderte sich während des gesamten Messzeitraums von 4 min nicht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass diese Substanzen keine Änderung ihrer eisenreduzierenden

Fähigkeit mit der Zeit aufweisen, sondern während dieses Intervalls eine konstante reduktive Kraft besitzen. Die Graphen der übrigen Verbindungen zeigten unterschiedliche, substanzspezifische Absorptionsänderung mit der Zeit. Hatten die Substanzen nach 4 min Reaktionszeit ein Plateau erreicht, an dem der Wert für die Absorption konstant blieb, wurden sie zur zweiten Gruppe gezählt ((-)-Epicatechin, Gallussäure). Stieg die Absorption auch nach dem festgelegten Zeitraum noch weiter an und erreichte erst nach etwa einer Stunde ein Plateau, gehörten diese Verbindungen in die dritte Gruppe (M1, M2, (+)-Catechin, Protocatechusäure). *p*-Hydroxybenzoesäure und *o*-Cumarsäure zeigten im betrachteten Konzentrationsbereich keine Reaktion.

2.2.3.2 Dosis-Effekt-Beziehung

Durch Auftragung der Konzentration gegen die Absorptionsänderung erhielt man das Dosis-Effekt-Diagramm für die getesteten Verbindungen. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der diversen Antioxidantien zeigten unterschiedliche Verläufe durch unterschiedliche Steigungen der Geraden. Die Absorptionsänderungen jeder einzelnen untersuchten Substanz waren im betrachteten Konzentrationsbereich linear und zeigten eine konzentrationsabhängige Reaktivität, die sich wie folgt darstellte:

Protocatechusäure > Gallussäure > M1 > Ascorbinsäure > Kaffeesäure ≈
(-)-Epicatechin > M2 ≈ (+)-Catechin > Pycnogenol

2.2.3.3 EC₁-Werte

Zur Berechnung der EC₁-Werte wurde der 4-min-Wert wie im Artikel von Pulido et al.¹¹⁴ beschrieben herangezogen.

Die erhaltenen Absorptionsänderungen der untersuchten Verbindungen wurden mit den Werten von Fe(II)-Lösungen bekannter Konzentration verglichen. Hieraus ergaben sich die EC₁-Werte (Tabelle 14 und Tabelle 15, D Tabellarischer Anhang), die einen Vergleich der untersuchten Substanzen erlaubten. Da das Molekulargewicht von Pycnogenol nicht bekannt ist, wurden die erhaltenen Ergebnisse außer in µM auch in µg/ml berechnet, um den Kiefernrintenextrakt mit den anderen Substanzen vergleichen zu können (Abbildung 7). Besonders

gekennzeichnet sind diejenigen Substanzen, die einen statistisch signifikanten Unterschied zur Referenz Ascorbinsäure aufwiesen (Tabelle 16 und Tabelle 17, D Tabellarischer Anhang).

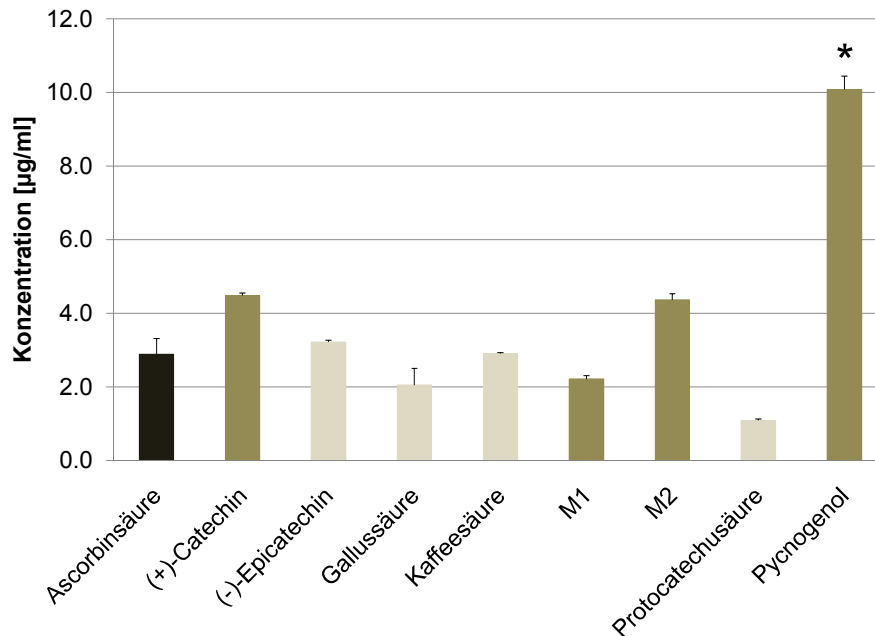


Abbildung 7: EC₁-Werte des FRAP-Assays. Konzentrationen der untersuchten Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol (dunkelbraun) sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz (schwarz) bezogen auf eine 1 mM FeSO₄-Lösung. Ebenfalls in der Graphik mit aufgenommen sind zu Vergleichszwecken die bereits in der Diplomarbeit untersuchten Substanzen (hellbraun). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in µg/ml von 5–8 unabhängigen Experimenten, sowie die von Ascorbinsäure statistisch signifikant verschiedenen Verbindungen (*) (P < 0.05) (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

Die EC₁-Werte der untersuchten Antioxidantien lagen in einem Bereich von 7–20 µM bzw. 1–10 µg/ml.

Protocatechusäure mit einem EC₁-Wert von 1.08 ± 0.04 µg/ml erwies sich gegenüber den anderen Verbindungen als reaktiver und zeigte die höchste reduktive Kraft. An zweiter Stelle stand Gallussäure mit einem EC₁-Wert von 2.05 ± 0.45 µg/ml, gefolgt vom Metaboliten M1 (2.21 ± 0.09 µg/ml). Auch die Verbindungen Ascorbinsäure (2.89 ± 0.42 µg/ml), Kaffeesäure (2.90 ± 0.03 µg/ml) und (-)-Epicatechin (3.22 ± 0.05 µg/ml) wiesen vergleichbare Reaktivitäten auf. Deutlich schlechtere reduktive Fähigkeiten in diesem Assay besaßen der Metabolit M2

($4.36 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$) und (+)-Catechin ($4.48 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$). Den höchsten EC_{50} -Wert mit $10.08 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ und folglich die geringste antioxidative Aktivität im betrachteten Konzentrationsbereich wies Pycnogenol auf.

Auch die im Rahmen der eigenen Diplomarbeit¹²¹ bereits untersuchten monomeren Bestandteile besaßen EC_{50} -Werte in einem Bereich von 1–10 $\mu\text{g/ml}$. So war die Reaktivität von Ferulasäure ($4.45 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$) mit der von M2 und (+)-Catechin vergleichbar und lag im mittleren Bereich der ermittelten Werte für die reduktive Kraft. (\pm)-Taxifolin ($8.79 \pm 1.50 \mu\text{g/ml}$) hingegen zeigte wie der Gesamtextrakt eine sehr schwache antioxidative Aktivität.

Die eisenreduzierende Kraft der monomeren Verbindung Protocatechusäure war zehnmal höher als die des Gesamtextraktes. Auch (+)-Catechin und M2 waren statistisch signifikant schlechter als Protocatechusäure. Wurden nur die Monomere und Metabolite ohne den Kiefernrintenextrakt verglichen, so zeigten (-)-Epicatechin, M1 und Protocatechusäure einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Referenz Ascorbinsäure auf (Tabelle 16 und Tabelle 17, D Tabellarischer Anhang).

2.2.4 Diskussion der Ergebnisse des FRAP-Assays der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol

Das FRAP-Assay ist eine einfache und reproduzierbare Methode, die nicht nur zur Untersuchung von antioxidativer Aktivität von Plasma oder Antioxidantien in Nahrungsextrakten und Getränken angewendet werden kann, sondern auch um die antioxidative Effektivität von reinen Antioxidantien in Nahrungsmitteln zu untersuchen.

Die Arbeitsgruppe von Pulido et al.¹¹⁴ hat im Rahmen ihrer Untersuchungen die eisenreduzierende Kraft von polyphenolischen Nahrungsmittelbestandteilen mit Hilfe des FRAP-Assays beurteilt. Zu den getesteten Verbindungen gehörten Flavonoide (Quercetin, Rutin, Catechin), Resveratrol, Gerbsäure und Phenolsäuren (Gallussäure, Kaffeesäure, Ferulasäure). Als Referenzsubstanzen wurden Carotenoide (β -Caroten, Zeaxanthin), Ascorbinsäure, Trolox und BHA (3-Tertbutyl-4-hydroxyanisol) eingesetzt. Sie erhielten unter anderem die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 4: Ergebnisse des FRAP-Assays von Pulido et al.¹¹⁴ sowie der eigenen Untersuchungen in Gegenüberstellung. Angegeben sind beispielhaft die Äquivalentkonzentrationen einiger der untersuchten Substanzen in μM , das heißt diejenige Menge an Antioxidanz, die die gleiche Absorptionsänderung wie eine 1 mM Fe(II)-Lösung bewirkt, gemessen nach vier Minuten Reaktionszeit.

| Substanz | EC ₁ -Werte [μM] Pulido et al. | EC ₁ -Werte [μM] eigene Untersuchungen |
|---------------|---|---|
| Ascorbinsäure | 392 | 16.40 \pm 2.41 |
| (+)-Catechin | 348 | 15.43 \pm 0.25 |
| Gallussäure | 180 | 12.01 \pm 2.62 |
| Kaffeesäure | 196 | 16.12 \pm 0.16 |

Die Stärke der antioxidativen Aktivität nahm bei Pulido in der Reihenfolge Gallussäure > Kaffeesäure > (+)-Catechin > Ascorbinsäure ab, wobei Gallussäure und Kaffeesäure dicht beieinander lagen. Die untersuchten Polyphenole hatten niedrigere EC₁-Werte und folglich ein größeres reduzierendes Potential als die Referenz Ascorbinsäure. Auch in den eigenen Untersuchungen wurde diese Beobachtung gemacht. Bis auf den Metaboliten M2 hatten alle getesteten Verbindungen eine höhere eisenreduzierende Fähigkeit als Ascorbinsäure.

Gerbsäure und Quercetin zeigten laut Pulido¹¹⁴ die höchste antioxidative Kapazität gefolgt von Gallus- und Kaffeesäure. Resveratrol hatte den geringsten reduzierenden Effekt. Die Carotenoide besaßen keine eisenreduzierende Fähigkeit. Die Tendenz der eigenen Ergebnisse stimmte nicht vollständig mit diesen Angaben überein, sondern stellte sich wie folgt dar: Gallussäure > (+)-Catechin > Kaffeesäure \approx Ascorbinsäure. (+)-Catechin (15.43 \pm 0.25 μM) wies eine geringfügig höhere eisenreduzierende Kraft auf als Kaffeesäure (16.12 \pm 0.16 μM) und Ascorbinsäure (16.40 \pm 2.41 μM).

Die deutlich höheren EC₁-Werte bei Pulido et al.¹¹⁴ sind vermutlich auf das Lösungsmittel zurückzuführen. Sie verwendeten bei ihren Untersuchungen methanolische Lösungen der zu untersuchenden Polyphenole, wohingegen die eigenen Experimente mit wässrigen Antioxidanzlösungen erfolgten. Bereits in Vorversuchen konnten die Forscher zeigen, dass das Lösungsmittel einen Einfluss auf die EC₁-Werte ausübte; so erhielten sie mit methanolischen Lösungen der Testsubstanzen höhere Werte als mit wässrigen Lösungen.¹¹⁴

2.2.5 Ergebnisse des FRAP-Assays der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol

Mit Hilfe des FRAP-Assays wurde untersucht, wie sich die Einnahme von Pycnogenol auf die antioxidative Aktivität von Serum auswirkt. Dazu wurden Serumproben von Probanden verwendet, die fünf Tage lang jeden Morgen 200 mg Pycnogenol eingenommen haben (siehe Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil). Die Durchführung erfolgte analog dem FRAP-Assay der wässrigen Antioxidanz-Lösungen. In einem ersten Schritt wurde die zeitliche Änderung der Absorption der Serumproben (nach Einnahme des Extraktes) bzw. der Serum-Blanks (vor Einnahme des Extraktes) über einen Zeitraum von 60 min dokumentiert.

Die Bedingungen für die Bestimmung der eisenreduzierenden Fähigkeit von Antioxidantien in der Originalmethode von Benzie und Strain¹²² bezeichnete ein 4-Minuten Intervall als geeignet, da die Absorption des reduzierten Ferro-TPTZ-Komplexes nach dieser Zeit in der Regel stabil war. Bei Verwendung dieser Bedingungen in der vorliegenden Untersuchung der Serumproben haben wir allerdings beobachtet, dass die FRAP-Reaktion im Gegensatz zu der Reaktion mit den Einzelsubstanzen noch lange nicht abgeschlossen war und die Reduktion des Eisen-TPTZ-Komplexes noch weiterging. Erst nach 60 min wurde die Absorptionsänderung pro Minute so gering, dass man von einem Ende der FRAP-Reaktion sprechen konnte. Ursache dafür ist die unterschiedliche Matrix, da bei diesen Versuchen statt einer wässrigen Lösung Serumproben verwendet wurden.

Serum besteht zu 91 % aus Wasser und zu 9 % aus löslichen Bestandteilen. Proteine wie Hormone, Enzyme und Enzyminhibitoren stellen hier die mengenmäßig größte Fraktion dar (60–80 g/l). Mit 40 g/l bildet Albumin den Hauptbestandteil der Proteine, der Rest sind Globuline. Viele dieser Verbindungen, wie z.B. Harnsäure, Ascorbinsäure und α -Tocopherol, tragen zur antioxidativen Aktivität des Serums bei.

Die Absorptionswerte der Serumproben nach Einnahme von Pycnogenol lagen in drei von fünf Fällen unter den Werten der entsprechenden Serumproben vor Einnahme von Pycnogenol (Proband B1, B3, B4). In zwei Fällen wurde das gegenteilige Resultat erhalten. Die unterschiedlichen Reaktionskinetiken sind beispielhaft für Praband B1 und B5 in Abbildung 8 dargestellt.

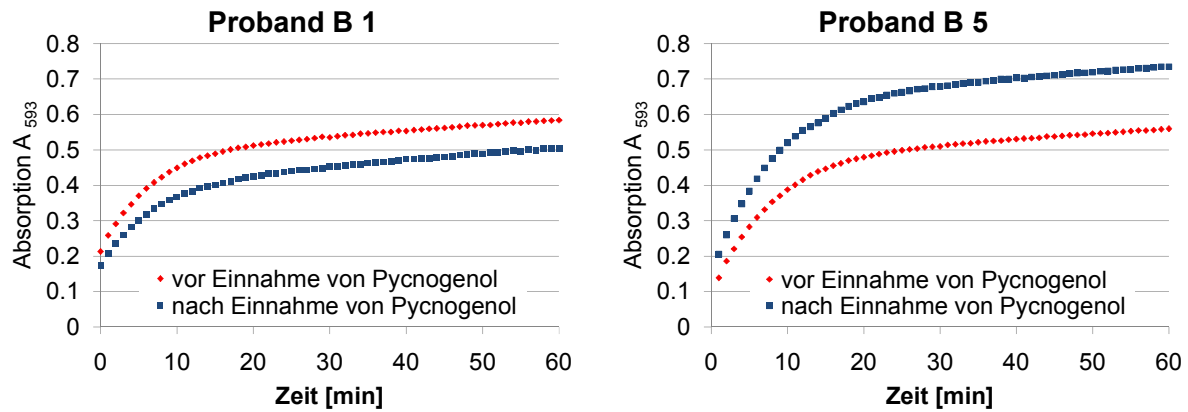


Abbildung 8: Absorptionsänderungen der Serumproben während der ersten 60 min dargestellt am Beispiel von Proband B1 und B5. Proband B1 weist im Gegensatz zu Proband B5 vor Pycnogenol-Einnahme (●) höhere Absorptionswerte auf als nach Pycnogenol-Einnahme (▲).

Von den Absorptionswerten A_{593} der Serumproben nach Pycnogenol-Einnahme zum Zeitpunkt $t = 60$ min wurden die Absorptionswerte der Serumproben vor Pycnogenol-Einnahme subtrahiert. Eine Berechnung der EC_1 -Werte war hier nicht möglich, da die Konzentration des Pycnogenols im Serum nicht bekannt war und folglich auch keine Dosis-Effekt-Charakteristik aufgestellt werden konnte. Durch Auftragung der Konzentrationen der $FeSO_4$ -Lösungen gegen die jeweiligen Absorptionsänderungen erhielt man die Regressionsgleichung der Referenzsubstanz. In diese wurden anschließend die gemessenen Absorptionsänderungen ΔA_{593} (60 min) der Serumproben eingesetzt, und man erhielt diejenige Konzentration an $FeSO_4$, die der entsprechenden Serumprobe äquivalent war (Tabelle 5).

Tabelle 5: Eisenreduzierende Äquivalentkonzentration der Serumproben der Probanden B1–B5 nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme.

| Proband | Konzentration [μM] |
|---------|---------------------------|
| B1 | n.b. |
| B2 | 1.92 |
| B3 | n.b. |
| B4 | n.b. |
| B5 | 8.17 |

n.b. = nicht berechenbar, keine Absorptionszunahme nach Pycnogenol-Einnahme

Da für Proband B1, B3 und B4 keine Zunahme der Absorption nach Pycnogenol-Einnahme verzeichnet wurde, konnte hier auch keine Äquivalentkonzentration berechnet werden. Lediglich bei zwei Personen (B2 und B5) konnte eine Verbesserung der antioxidativen Eigenschaften des Serums festgestellt werden. Die Zunahme der eisenreduzierenden Fähigkeit der untersuchten Proben entspricht dabei Fe(II)-Lösungen mit einer Konzentration von 1.92 bzw. 8.17 μM .

2.2.6 Diskussion der Ergebnisse des FRAP-Assays der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol

Die Untersuchung der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol zeigte, dass das Serum von drei Probanden (B1, B3 und B4) nach Pycnogenol-Einnahme niedrigere Absorptionen und somit eine schlechtere eisenreduzierende Kraft besaßen als vor Einnahme des Kiefernrintenextraktes. Lediglich zwei Probanden (B2 und B5) wiesen nach Einnahme von Pycnogenol eine verbesserte antioxidative Aktivität des Serums auf.

Grimm⁹⁶ hatte im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit gezeigt, dass einige Bestandteile von Pycnogenol nach wiederholter Einnahme des Kiefernrintenextraktes im Serum nachgewiesen werden können. Allerdings waren die ermittelten Konzentrationen sehr gering (unterer ng/ml-Bereich). Somit könnte argumentiert werden, dass die im Serum erreichten Konzentrationen nicht ausreichend waren, um einen signifikanten Anstieg der antioxidativen Aktivität des Serums im FRAP-Assay zu erzielen.

Allerdings wurden in anderen Untersuchungen und auch mit geringeren Dosen Pycnogenol durchaus gegenteilige Erkenntnisse gewonnen. Das Argument, dass die nach Pycnogenol-Einnahme im Plasma erreichten Konzentrationen nicht ausreichend sind, um einen signifikanten Anstieg der antioxidativen Aktivität des Plasmas zu bewirken, kann somit vermutlich nicht als ausreichende Erklärung dienen. Bei den Untersuchungen von Devaraj⁵⁰ und Janisch¹²³, die im Folgenden dargelegt werden, wurden bereits mit geringeren Dosen Pycnogenol Effekte beobachtet.

So haben Devaraj et al.⁵⁰ die Wirkung der Einnahme von Pycnogenol auf die antioxidative Aktivität des Plasma untersucht. 25 gesunde Freiwillige erhielten für sechs Wochen 150 mg Pycnogenol pro Tag. Die Plasmaproben nach Einnahme des

Extrakt zeigte bei einer groben Bestimmung der phenolischen Verbindungen eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Plasmaproben vor Einnahme des Extraktes. Der antioxidative Effekt wurde durch einen signifikanten Anstieg der Sauerstoffradikal-Absorptionskapazität (ORAC) im Plasma verdeutlicht. Nach einer vierwöchigen Wash-Out-Phase gingen die Werte wieder auf das Grundniveau zurück. Diese Studie belegte im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, dass Pycnogenol die antioxidative Fähigkeit von Plasma erhöhen kann. Dies bedeutet, dass im Plasma aktive Verbindungen vorliegen, die z.B. ähnlich wie Ascorbinsäure zum Einfang von freien Radikalen in der Lage sind. Darüber hinaus kann der Rindenextrakt die *de novo* Synthese von antioxidativen Enzymen wie Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathiondisulfidreduktase anregen¹²⁴ und die Oxidation von LDL hemmen¹²⁵. Durch diese Mechanismen wird im Körper ein adäquater Antioxidanz-Status aufrechterhalten, der als Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien im humanen Organismus beschrieben wird. Hierdurch werden folglich die normalen physiologischen Funktionen bewahrt. Als Nachweismethode verwendete Devaraj das ORAC-Assay, das sich in Substrat, Reaktionsmechanismus und Messmethode vom FRAP-Assay unterscheidet. Aufgrund ihres größeren Probandenkollektivs von 25 Personen (statt 5 wie in den eigenen Untersuchungen) ist eine Vorhersage der Tendenz der Ergebnisse leichter zu treffen.

Janisch¹²³ hat im Rahmen ihrer Doktorarbeit die antioxidative Kapazität von humanem Plasma in verschiedenen biochemischen Assays (Xanthin/Xanthinoxidase-Assay, NADH/Diaphorase-Assay, SIN-1-Assay, Fenton-Assay) untersucht. Dabei konnte sie feststellen, dass eine *in vivo* Gabe von zweimal täglich 50 mg Pycnogenol über einen Zeitraum von 14 Tagen die antioxidative Aktivität des Plasma verstärkte. Allerdings zeigte humanes Plasma je nach angewandtem biochemischen Verfahren verschiedene antioxidative Eigenschaften, die sich in unterschiedlichen IC₅₀-Werten widerspiegeln. Auch bei diesen Untersuchungen wurde eine Zunahme der antioxidativen Fähigkeit von Plasma nach wiederholter Einnahme von Pycnogenol bereits bei einer Dosis von 50 mg/d verzeichnet. Allerdings ist das Ergebnis dieser Untersuchung nicht aussagekräftig, da das Probandenkollektiv lediglich aus einer einzigen Person bestand und somit keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann.

Was die biologische Signifikanz und das Auftreten der erhaltenen Ergebnisse der untersuchten Antioxidantien betrifft, so ist dies schwer vorherzusagen. Keine der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Status in Plasma führen solche Bestimmungen bei physiologischen Bedingungen durch. Dies ist auch der Fall beim FRAP-Assay, das bei einem sehr niedrigen pH-Wert von 3.6 durchgeführt wird, ganz im Gegensatz zum pH-Wert in biologischen Flüssigkeiten. Jedoch hat diese Methode den Vorteil, dass die antioxidative Aktivität direkt im Gesamtplasma bestimmt werden kann. Es hängt also nicht von enzymatischen oder nicht-enzymatischen Methoden ab, bei denen freie Radikale vor der Evaluierung der antiradikalen Effektivität von Plasma generiert werden, und es ist auch keine Isolation von Plasmafraktionen wie LDL nötig. Daher besitzt das FRAP-Assay methodisch Vorteile gegenüber anderen, allgemein verwendeten Methoden.¹¹⁴

Ein Vergleich der in verschiedenen Assays gewonnenen Ergebnisse ist nicht möglich, da die Unterschiede in Meßmethode, verwendetem Substrat und Reaktionsmechanismus zu groß sind. Es kann lediglich eine Tendenz formuliert werden.

Obwohl niedrige Dosen Pycnogenol in anderen Untersuchungen zu einem Anstieg der antioxidativen Aktivität des Plasma nach Einnahme von Pycnogenol führten, konnte dies in der eigenen Arbeit nicht gezeigt werden. Als mögliche Ursachen hierfür könnte man eine zu geringe Anzahl an Probanden und/oder ein Nichteinhalten der flavonoidfreien Ernährung anführen. Auch ist keine direkte Vergleichbarkeit der Assays möglich (siehe auch Abschnitt 2.4).

2.3 Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels DPPH-Assay

2.3.1 Allgemeine Grundlagen des DPPH-Assays

Das DPPH-Assay bestimmt die Radikalfängereigenschaften der untersuchten Verbindungen mittels des stabilen Radikals 1,1-Diphenyl-2-pikryl-hydrazyl (DPPH, Abbildung 9).

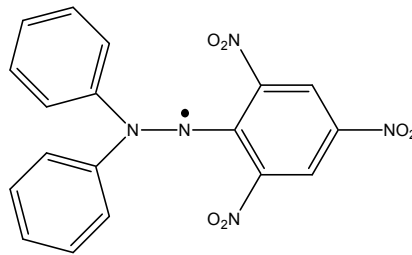
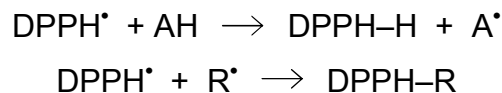


Abbildung 9: Struktur des 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl-Radikals.

Das DPPH-Assay wurde ursprünglich von Blois (1958) entwickelt und ist heute eine gängige Methode zur Messung der Radikalfängereigenschaften in der Lebensmitteltechnologie, Pharmakologie und Toxikologie.¹²⁶

2.3.2 Mechanismus der zugrundeliegenden Reaktion

Das zugrundeliegende Prinzip ist die Reduktion und das Bleaching des violetten DPPHs durch Transfer eines Wasserstoffatoms eines Antioxidanz oder Reaktion mit einem anderen Radikal.¹²⁷



mit AH = Antioxidanz
R = Radikal

Dieses Assay liefert Informationen über die Reaktivität der zu untersuchenden Verbindungen mit einem stabilen, freien Radikal. Aufgrund seines ungepaarten Elektrons zeigt das DPPH-Radikal eine starke Absorptionsbande bei 515 nm (tief

violette Farbe). Die resultierende Entfärbung und somit die Abnahme der Absorption in Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels (Radikalfängers) erfolgt in stöchiometrischer Weise in Abhängigkeit von der Zahl der aufgenommenen Elektronen und kann spektrophotometrisch gemessen werden.^{47,128,129,130} Dieses sogenannte Bleaching der DPPH-Absorption tritt auf, wenn das ungepaarte Elektron des Radikals gepaart vorliegt und spiegelt folglich die Fähigkeit dieser Verbindung wieder, freie Radikale unabhängig von jeglicher Enzymaktivität einzufangen.¹³¹

Ancerewicz et al.¹³² haben bei ihren Untersuchungen festgestellt, dass die Reaktionsrate des DPPH-Radikals stark vom Lösungsmittel beeinflusst wird. So gehorcht die Reaktion in Dioxan oder CCl₄ einer Kinetik zweiter oder dritter Ordnung. Die erhöhte Reaktivität von DPPH in Alkoholen wurde der Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen einem DPPH-Stickstoffatom und dem Alkohol zugeschrieben, wobei die Radikal-Delokalisation eingeschränkt wird und folglich die Reaktivität zunimmt. Aus diesem Grund wurde in der eigenen Arbeit Ethanol als Lösungsmittel der Wahl verwendet.

2.3.3 Ergebnisse des DPPH-Assays

Ist die Struktur des Elektronendonors unbekannt, z.B. bei Pflanzenextrakten wie Pycnogenol, kann diese Methode wichtige Daten zum Reduktionspotential einer Probe liefern. Diese Eigenschaft kann man sich beim Vergleich der Reduktionspotentiale unbekannter Verbindungen zu Nutzen machen.¹³³

Die Ergebnisse der Metabolite M1 und M2, ihres Vorläufermoleküls (+)-Catechin, des Gesamtextraktes sowie von L-(+)-Ascorbinsäure als Referenzsubstanz wurden bereits in der eigenen Diplomarbeit¹²¹ dargestellt und diskutiert. In diesem Abschnitt werden diese Daten nochmals aufgegriffen, um sie mit den neu erhaltenen Werten von *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure und Protocatechusäure zu vergleichen.

2.3.3.1 Reaktionskinetiken

Die Absorptionsänderungen ΔA_{515} der zu untersuchenden Substanzen wurden über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Parallel wurde ein Blank der ethanolischen

DPPH-Lösung ohne Zusatz von Antioxidantien gemessen, um den Zerfall von DPPH während der Messung abschätzen zu können.

Die Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol bewirkten in den ersten zehn Minuten eine substanzspezifische Absorptionsabnahme und näherten sich anschließend asymptotisch einem Plateau an. Es zeigte sich, dass die untersuchten Substanzen einem von drei möglichen Reaktionskinetiktypen folgten:

- (1) Ascorbinsäure, *o*-Cumarsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure und Kaffeesäure reagierten sehr schnell mit DPPH und erreichten innerhalb von fünf Minuten das Ende der Reaktion.
- (2) M1 und Protocatechusäure reagierten langsamer und erreichten nach etwa 5–30 min ein Plateau.
- (3) Die übrigen Verbindungen (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Gallussäure, M2 sowie der Gesamtextrakt reagierten progressiver und zeigten einen hyperbolischen Verlauf, der erst nach 1–6 h endete.

Die Testsubstanzen wiesen unterschiedliche kinetische Verhalten bei unterschiedlichen Konzentrationen auf. Je höher die Konzentration, desto steiler die Steigung und desto niedriger die DPPH-Konzentration. Lediglich *o*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure zeigten keine konzentrationsabhängige Quenchung der Radikale. Ihre Reaktionskinetiken blieben bei Variation der Konzentration unverändert. Beide Substanzen erzielten über den gesamten betrachteten Konzentrationsbereich lediglich eine Hemmung von etwa 7 %.

2.3.3.2 IC₅₀-Werte

Die prozentuale Abnahme der Absorption ΔA_{515} im Vergleich zum Blank wurde nach 60 min aus den erhaltenen Werten ermittelt und steht für die Inhibition der Farbwirkung durch die Antioxidantien. Daraus wiederum konnte das Quenching des DPPH-Radikals durch die getesteten Verbindungen in Prozent berechnet werden.

Der IC₅₀-Wert ist definiert als diejenige Menge an Antioxidanz, die benötigt wird, um die anfängliche DPPH-Konzentration um 50 % zu senken¹³⁴, und wurde mittels linearer Regression aus der entsprechenden Inhibitionskurve bestimmt, wobei

der Korrelationskoeffizient mindestens 0.9 betrug (Tabelle 18 und Tabelle 19, D Tabellarischer Anhang). Je niedriger der IC_{50} -Wert ist, desto höher ist die antioxidative Kraft einer Verbindung.

Da das Molekulargewicht von Pycnogenol nicht bekannt ist, wurden die erhaltenen Ergebnisse nicht nur wie generell üblich in μM sondern auch in $\mu\text{g/ml}$ berechnet, um den Kiefernrintenextrakt mit den anderen getesteten Substanzen vergleichen zu können (Abbildung 10). Besonders gekennzeichnet sind diejenigen Substanzen, die einen statistisch signifikanten Unterschied zur Referenz Ascorbinsäure aufwiesen (Tabelle 20 und Tabelle 21, D Tabellarischer Anhang).

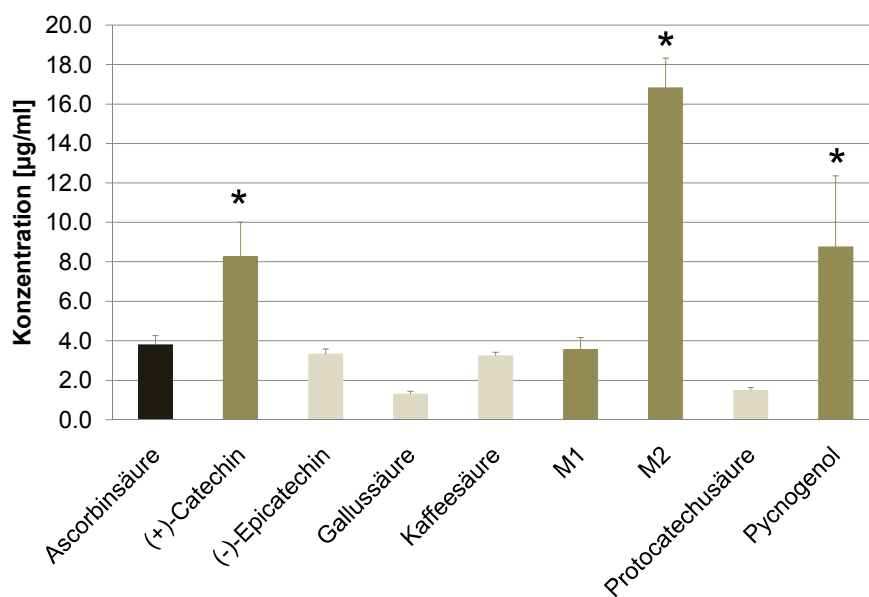


Abbildung 10: Mittlere Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Werte) für das Quenching des stabilen Radikals DPPH durch die Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol (braun) sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz (rot). Ebenfalls in der Graphik mit aufgenommen sind zu Vergleichszwecken die bereits in der Diplomarbeit untersuchten Substanzen (blau). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in $\mu\text{g/ml}$ von 5–9 unabhängigen Experimenten, sowie die von Ascorbinsäure statistisch signifikant verschiedenen Verbindungen (*) ($P < 0.05$) (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

Die IC_{50} -Werte der untersuchten Substanzen lagen in einem Bereich von 7–76 μM bzw. 1–17 $\mu\text{g/ml}$.

Der Metabolit M2 besaß mit $16.83 \pm 1.50 \mu\text{g/ml}$ den mit Abstand höchsten IC_{50} -Wert und hatte folglich im betrachteten Konzentrationsbereich die geringste

Radikalfängeraktivität. Eine doppelt so hohe Kapazität zum Einfang freier Radikale besaßen Pycnogenol mit $8.75 \pm 3.62 \mu\text{g/ml}$ und (+)-Catechin mit $8.26 \pm 1.75 \mu\text{g/ml}$. Deutlich effektiver zeigten sich die Verbindungen Ascorbinsäure ($3.80 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$), M1 ($3.56 \pm 0.61 \mu\text{g/ml}$), (-)-Epicatechin ($3.33 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$) und Kaffeesäure ($3.24 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$) mit leicht zunehmender Tendenz. Die höchste Radikalfangkapazität wiesen Protocatechusäure und Gallussäure auf mit IC_{50} -Werten von $1.48 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ bzw. $1.30 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ und waren somit zwei bis dreizehn Mal niedriger als die der anderen untersuchten Substanzen.

Auch die im Rahmen der eigenen Diplomarbeit¹²¹ bereits untersuchten monomeren Bestandteile besaßen IC_{50} -Werte in einem Bereich von 1–17 $\mu\text{g/ml}$. Ferulasäure ($11.38 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$) und (\pm)-Taxifolin ($12.85 \pm 2.40 \mu\text{g/ml}$) zeigten dabei allerdings nur schwache Radikalfängeraktivität. Ihre Reaktivität lag zwischen der des Pycnogenols und des Metaboliten M2.

Der monomere Bestandteil (+)-Catechin wies hierbei eine mit dem Gesamtextrakt vergleichbare Fähigkeit zum Einfang freier Radikale auf. Auch war der IC_{50} -Wert des Metaboliten M1 statistisch signifikant kleiner als der seiner Vorläufersubstanz (+)-Catechin. Dies zeigt, dass durch Metabolisierung eine Zunahme der Radikalfangaktivität erreicht wurde.

2.3.3.3 Antiradikalische Aktivität und Stöchiometrie

Die effektive Konzentration (engl.: *efficient concentration*; EC) wurde von Brand-Williams¹³⁰ als Menge an Antioxidanz (AH) definiert, die benötigt wird, um ein Mol DPPH^{\bullet} um 50 % zu reduzieren. Sie wird wie folgt dargestellt:

$$\text{EC}_{50} = \frac{[\text{mol/L}] \text{AH}}{[\text{mol/L}] \text{DPPH}^{\bullet}}$$

Die antiradikalische Kraft (engl.: *antiradical power*; ARP) errechnet sich aus dem Kehrwert des EC-Wertes und gibt die Konzentration an DPPH^{\bullet} an, die von einem Mol Antioxidanz reduziert wurde. Je größer ARP, desto effizienter ist das Antioxidanz.

Die Stöchiometrie gibt die theoretische, effektive Konzentration an Antioxidanz wieder, die benötigt wird, um 100 % DPPH^{\bullet} -Radikal zu reduzieren. Hierzu wird der

EC-Wert mit zwei multipliziert. Der Kehrwert der Stöchiometrie spiegelt die Zahl der pro Antioxidanz donierten Wasserstoffatome wieder.

Tabelle 6: Ergebnisse des DPPH-Assays in Zahlen. Ebenfalls in der Graphik mit aufgenommen sind zu Vergleichszwecken die bereits in der Diplomarbeit untersuchten Substanzen (+)-Catechin, Ferulasäure, M1, M2, (±)-Taxifolin und Trolox (gelb unterlegt) sowie die Referenz Ascorbinsäure (rot unterlegt). Die Kinetik der Reaktion beschreibt die Geschwindigkeit, mit der das Ende der Reaktion erreicht wurde. Die antiradikalische Kraft ARP gibt die Zahl der DPPH[•] Mole an, die von einem Mol Antioxidanz reduziert wurden. Stöchiometrie steht für die theoretische, effektive Konzentration an Antioxidanz zur Reduktion von 100 % DPPH[•]. Der Kehrwert dieses Wertes repräsentiert die Zahl der donierten H-Atome pro Antioxidanzmolekül.

| Substanz | Kinetik | ARP | Stöchiometrie | Zahl der donierten H-Atome |
|-------------------|---------|------|---------------|----------------------------|
| (+)-Catechin | langsam | 1.90 | 1.05 | 0.95 |
| (-)-Epicatechin | langsam | 4.71 | 0.42 | 2.36 |
| M2 | langsam | 0.71 | 2.81 | 0.36 |
| Ferulasäure | mittel | 0.92 | 2.17 | 0.46 |
| Gallussäure | mittel | 7.09 | 0.28 | 3.54 |
| M1 | mittel | 3.16 | 0.63 | 1.58 |
| Protocatechusäure | mittel | 5.63 | 0.36 | 2.81 |
| (±)-Taxifolin | mittel | 1.28 | 1.56 | 0.64 |
| Ascorbinsäure | schnell | 2.51 | 0.80 | 1.25 |
| Kaffeensäure | schnell | 3.00 | 0.67 | 1.50 |
| Trolox | schnell | 1.80 | 1.11 | 0.90 |

Die Interaktion eines potentiellen Antioxidanz mit DPPH[•] hängt von seiner strukturellen Konformation ab. Zahlreiche Verbindungen wie Ascorbinsäure, Kaffeensäure und Trolox reagieren sehr schnell mit DPPH[•]. Gallussäure und Protocatechusäure zeichnen sich durch die höchste antiradikalische Aktivität aus. Einige der Substanzen reduzieren eine bestimmte Anzahl an DPPH[•]-Molekülen entsprechend ihrer Zahl an verfügbaren Hydroxylgruppen. So besitzt Trolox nur eine OH-Gruppe und kann folglich ein DPPH[•]-Molekül reduzieren. Der Metabolit M1 wie auch Kaffeensäure mit jeweils zwei OH-Gruppen reagieren mit je zwei DPPH[•]-Molekülen. Jedoch für die Mehrzahl der Testsubstanzen ist der Reaktionsmechanismus weit komplizierter.

2.3.4 Diskussion der Ergebnisse des DPPH-Assays

2.3.4.1 Strukturelle Merkmale der untersuchten Substanzen

Flavonoide besitzen eine Phenyl-benzo- γ -pyran-Struktur (Abbildung 11), die eine oder mehrere Hydroxygruppen trägt und daher potentiell in der Lage ist, freie Radikale durch Bildung resonanzstabilisierter Phenoxyradikale zu quenchen.

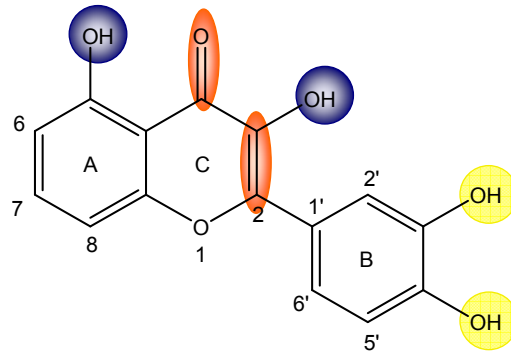


Abbildung 11: Die Grundstruktur der Flavonoide bildet ein Phenyl-benzo- γ -pyran-Gerüst. Wichtige Voraussetzungen für wirkungsvolle Radikalfänger sind die Struktur, das Substitutionsmuster und der Grad der Polymerisation.

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen für effektiven Radikalfang werden wie folgt beschrieben:^{99,135,136}

- Hydroxygruppen in 3- und 5-Position am Ring A und C sind für eine hohe Radikalfangaktivität verantwortlich und ermöglichen Wasserstoffbrückenbindungen zur Ketogruppe am C-Ring.
- Eine 2,3-Doppelbindung in Konjugation zu einer 4-Keto-Funktion am C-Ring ermöglicht Elektronen-Delokalisation im Ring B und somit Stabilisierung des Radikals.
- Das wichtigste Kriterium ist ein *ortho*-Dihydroxy-Substitutionsmuster (Catecholstruktur) am B-Ring, das zu einer höheren Stabilität der radikalischen Form sowie zur Elektronen-Delokalisation beiträgt.

Gallussäure zeigte bei diesem Experiment die höchste Aktivität beim Einfang freier Radikale, was durch die Anwesenheit von drei Hydroxylgruppen erklärt werden kann. Der Grad der Hydroxylierung ist bekanntermaßen ein entscheidendes Kriterium beim

Einfang freier Radikale. Die OH-Gruppen donieren ein Wasserstoffatome und ein Elektron an DPPH[•] und stabilisieren es dadurch. Das Flavonoid selbst wird zu einem stabilen *o*-Semichinon-Radikal oxidiert. Allgemein gelten Polyphenole als bessere Radikalfänger als Monophenole. So zeigte auch Gallussäure in den eigenen Untersuchungen bessere antioxidative Eigenschaften als sein diphenolisches Analogon Protocatechusäure und sein monophenolisches Analogon *p*-Hydroxybenzoesäure, das im DPPH-Assay keine antiradikalische Aktivität aufwies.

Auch (-)-Epicatechin zeichnete sich durch einen niedrigen IC₅₀-Wert aus, was vor allem dem *o*-Dihydroxy-Substitutionsmuster am Ring B zugeschrieben werden kann. Die Catecholstruktur trägt zu einer höheren Stabilität der radikalischen Form sowie zur Elektronen-Delokalisation bei. Desweiteren sind die Hydroxygruppen in 3- und 5-Position an Ring A und C für eine hohe Radikalfangaktivität verantwortlich. Der Flavonoid-Heterozyklus kann zur antioxidativen Aktivität durch die Anwesenheit einer freien 3-OH-Gruppe und Konjugation zwischen den aromatischen Ringen beitragen. Der Torsionswinkel des B-Rings in Bezug zum Rest des Moleküls beeinflusst die freie Radikalfangfähigkeit stark. Flavonole und Flavanole mit einer Hydroxylfunktion in 3-Position sind planar gebaut, wohingegen die Flavone und Flavanone, die diese Eigenschaft missen, leicht verdreht sind. Planarität wiederum erlaubt Konjugation und resultiert folglich in einem Anstieg der Stabilität des Flavonoid-Phenoxy-Radikals und somit auch der Radikalfangaktivität. Zusätzlich verfügt (-)-Epicatechin über eine weitere OH-Gruppe in Position 7, die die Fähigkeit des Moleküls zum Einfang freier Radikale zusätzlich erhöht. (+)-Catechin hingegen zeigte eine deutlich schlechtere antiradikalische Effektivität als sein Epimer. Dies ist mit der unterschiedlichen Stereochemie in Position 3 zu erklären. Die *trans*-Konfiguration bewirkt eine Abnahme der Radikalfängereigenschaften und folglich eine Erniedrigung der antioxidativen Kapazität.

δ-(3,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolacton besitzt ebenfalls ein *ortho*-Dihydroxylierungsmuster. Da es sich bei M1 um ein Lacton handelt, fehlen diesem Molekül die typischen Strukturmerkmale eines Flavonoids wie das Benzo-γ-pyran-Grundgerüst mit Hydroxygruppen in 3- und 5-Position oder eine 2,3-Doppelbindung und 4-Carbonylfunktion. Trotz des Fehlens dieser charakteristischen Strukturkriterien, war seine Reaktivität im DPPH-Assay etwa eineinhalbmal so groß wie die von Ascorbinsäure oder (+)-Catechin. Interessanterweise ist der IC₅₀-Wert des Metaboliten M1 statistisch signifikant kleiner ($P < 0.01$) als der seiner metabolischen

Vorläufersubstanz, (+)-Catechin. Dies zeigt, dass durch Metabolisierung eine Zunahme der Radikalfangaktivität erzielt werden kann.

Auch Kaffeesäure verfügt über ein *o*-Dihydroxy-Substitutionsmuster, das wichtigste Merkmal eines guten Radikalfängers. Es liegt im mittleren Bereich der antiradikalischen Aktivität von allen untersuchten Substanzen.

δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton besitzt keine der strukturellen Voraussetzungen, um als effektiver Radikalfänger zu agieren. Die positiven Eigenschaften, die einem *ortho*-Substitutionsmuster zugeschrieben werden, werden durch Alkylierung einer der beiden OH-Gruppen aufgehoben. Durch sterische Hinderung aufgrund der O-Methylierung und der herabgesetzten Reaktivität ist der Metabolit M2 deutlich M1 wie auch den anderen untersuchten Verbindungen unterlegen, was sich in den schlechteren Ergebnissen (IC_{50} -Werten) und folglich in seinen deutlich schwächeren antioxidativen Eigenschaften widerspiegelt. Die Methylierung einer OH-Gruppe verringert die Radikalfängereigenschaften des Moleküls signifikant. Diese Beobachtungen wurden auch von Kato et al.¹³⁷ gemacht, der die Unterschiede zwischen polyhydroxylierten und polymethylierten Flavonoiden der unterschiedlichen Hydrophobie und molekularen Planarität zuschrieb.

Die schlechte Reaktivität der Monophenole *o*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure kann durch die Anwesenheit einer elektronenziehenden Gruppe erklärt werden (COOH) bzw. durch die Abwesenheit einer elektronendonierenden Gruppe. Diese schlechte aromatische Ringresonanz des Phenoxyradikals erniedrigt die antiradikalische Effektivität beträchtlich.

2.3.4.2 Reaktionskinetiken der untersuchten Verbindungen

Brand-Williams et al.¹³⁰ haben die antioxidative Aktivität verschiedener Antioxidantien mit Hilfe des freien Radikals DPPH[•] bestimmt. Sie teilten die Substanzen anhand ihrer Reaktionskinetiken in drei Kategorien ein. So zählte Ascorbinsäure zu den Verbindungen, die sehr schnell, das heisst innerhalb einer Minute, das Ende der Reaktion erreichten. δ -Tocopherol reagierte moderater und erreichte das Plateau innerhalb von 30 min. Verbindungen mit Absorptionsänderungen zwischen 1–6 h wurden als langsam eingestuft. Analog dieser Einteilung erfolgte auch eine Klassifizierung der in der eigenen Arbeit untersuchten Pycnogenol-Bestandteile und -Metabolite. Dabei zeigten Ascorbinsäure und Gallussäure gute Übereinstimmung

mit den Literaturangaben. Protocatechusäure erreichte nach etwa 30 min ein Plateau und wurde daher der zweiten Gruppe zugeordnet, anstatt der Kategorie „langsame Reaktionskinetik“ wie von Brand-Williams beschrieben. Auch bei Kaffeesäure gingen die Ergebnisse auseinander; bei den eigenen Untersuchungen ergab sich eine schnelle Kinetik, wohingegen in der Literatur von einem langsamen, hyperbolischen Verlauf der Reaktion gesprochen wird.

Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Beobachtungen könnte die zur Bestimmung der Reaktionskinetiken verwendete Konzentration der untersuchten Substanzen sein. Je höher die Konzentration, desto steiler die Steigung des Graphen, und umso schneller wird ein Plateau erreicht. In den eigenen Versuchen wurden die 0.1 mM Lösungen herangezogen, um den kinetischen Verlauf der Reaktion zu analysieren. In der Literatur konnte hierzu keine entsprechende Angabe gefunden werden.

2.3.4.3 Antiradikalische Aktivität und stöchiometrisches Verhältnis

In einem weiteren Schritt haben Brand-Williams et al.¹³⁰ auch die antiradikalische Aktivität, die Zahl der donierten Wasserstoffatome pro Mol Antioxidanz, sowie die theoretisch effektive Konzentration an Antioxidanz zur Reduktion von 100 % DPPH[•] (Tabelle 7) berechnet.

Tabelle 7: Ergebnisse des DPPH-Assays einiger Antioxidantien von Brand-Williams et al.¹³⁰. Angegeben ist die antiradikalische Aktivität (ARP), die Zahl der pro Antioxidanz-Molekül donierten Wasserstoffatome, sowie das stöchiometrische Verhältnis der Reaktionspartner. Zu Vergleichszwecken sind hier ebenfalls die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen aufgeführt (gelb unterlegt).

| Substanz | ARP | | Zahl der donierten H-Atome | | Stöchiometrie | |
|-------------------|-------|------|----------------------------|------|---------------|------|
| Ascorbinsäure | 3.70 | 2.51 | 1.85 | 1.25 | 0.54 | 0.80 |
| Ferulasäure | 2.33 | 0.92 | 1.16 | 0.46 | 0.86 | 2.17 |
| Gallussäure | 12.50 | 7.09 | 6.25 | 3.54 | 0.16 | 0.28 |
| Kaffeesäure | 9.10 | 3.00 | 4.54 | 1.50 | 0.22 | 0.67 |
| Protocatechusäure | 6.95 | 5.63 | 3.60 | 2.81 | 0.28 | 0.36 |

Gallussäure, Kaffeesäure und Protocatechusäure besaßen mit einem Verhältnis von etwa 3–6 Mol reduziertem DPPH[•] pro Mol Antioxidanz die höchste antiradikalische

Aktivität. Abgesehen von Kaffeesäure stimmte die allgemeine Tendenz für die ARP gut mit den eigenen ermittelten Daten überein. Gallussäure und Protocatechusäure wiesen ebenfalls das höchste Radikalfängerpotential mit einem Verhältnis von 3.54 bzw. 2.81 donierten Wasserstoffatomen pro Antioxidanz-Molekül auf. Da diese beiden Verbindungen jedoch jeweils nur zwei zur Reduktion verfügbare OH-Gruppen besitzen, erfolgt hier vermutlich eine Dimerisierung von zwei Antioxidanz-Radikalen, so dass die neue Verbindung in der Lage ist, ein weiteres DPPH-Molekül zu reduzieren. Diese These wurde von Brand-Williams für das δ -Tocopherol aufgestellt, das eine Hydroxylgruppe besitzt, aber zwei DPPH \cdot reduzieren kann.

Kaffeesäure zeigte bei den eigenen Untersuchungen eine deutlich schwächere antiradikalische Aktivität von 3.00 und war lediglich in der Lage zur Reduktion von 1.5 DPPH \cdot -Molekülen. Trolox zeigte ein Verhältnis DPPH \cdot zu Antioxidanz von 0.9 und war somit in der Lage ein Wasserstoffatom zu donieren, was exakt mit der Anzahl der verfügbaren H-Atome im Molekül übereinstimmte. Auch bei dem Metaboliten M1 war eine gut Übereinstimmung von abspaltbaren H-Atomen (zwei) mit der tatsächlich Anzahl an übertragenen H-Atomen (ebenfalls zwei) zu erkennen.

Tourino et al.¹³⁸ untersuchten diverse Fraktionen der Rinde von *Pinus pinaster* in Lösung und Emulsion auf ihre antioxidative Aktivität hin gegenüber den freien Radikalen DPPH, ABTS \cdot^- und HNTTM (Tris-(2,3,6-trichloro-3,5-dinitrophenyl)-methyl). Das DPPH-Assay führten sie analog Brand-Williams durch und erhielten unter anderem folgende Werte:

Tabelle 8: Zwei beispielhaft ausgewählte Ergebnisse des DPPH-Assays von Tourino et al.¹³⁸. Angegeben ist die antiradikalische Aktivität (ARP), die Zahl der pro Antioxidanz-Molekül donierten Wasserstoffatome, sowie das stöchiometrische Verhältnis der Reaktionspartner.

| Substanz | ARP | Zahl der donierten H-Atome | Stöchiometrie |
|-------------|------|----------------------------|---------------|
| Trolox | 3.95 | 2.00 | 0.51 |
| Epicatechin | 6.00 | 3.00 | 0.33 |

Die antiradikalische Aktivität (ARP) von Epicatechin stimmt recht gut mit dem im eigenen Experiment ermittelten Wert von 4.71 überein. Folglich wichen auch die Werte für die Stöchiometrie (0.42) und die Zahl der donierten Wasserstoffatome

(2.36) nur geringfügig voneinander ab. Die Messergebnisse der Referenzsubstanz Trolox allerdings zeigten deutlich unterschiedliche Werte. So war die ARP im Vergleich zu Tourino mit 1.80 nur halb so groß und die Stöchiometrie folglich mit 1.11 doppelt so groß wie der Literaturwert. Trolox verfügt nur über eine OH-Gruppe und kann somit auch nur ein Wasserstoffatom donieren, was die eigenen Ergebnisse widerspiegeln. Allerdings liegen auch andere Literaturstellen vor, bei denen die Forscher ebenfalls einen geringeren IC_{50} -Wert für Trolox erhielten, was sich folglich in einer größeren antiradikalische Kraft ausdrückt.

So haben z.B. Fauconneau et al.¹³¹ das DPPH-Assay angewendet, um die antiradikalische Effektivität von diversen phenolischen Verbindungen zu untersuchen. Die dabei eingesetzte DPPH-Lösung wurde ebenfalls in Ethanol bereitet, jedoch in einer höheren Konzentration (100 μ M). Ihre dabei ermittelten IC_{50} -Werte für (+)-Catechin ($20.2 \pm 1.6 \mu$ M) und (-)-Epicatechin ($15.7 \pm 1.5 \mu$ M) stimmten dabei gut mit den eigenen berechneten Werten überein ($28.45 \pm 6.04 \mu$ M bzw. $11.46 \pm 0.91 \mu$ M). Lediglich für den IC_{50} -Wert von Trolox erhielten die Forscher einen dreimal geringeren Wert ($10.1 \pm 0.5 \mu$ M) als die eigene Untersuchung ergab ($29.97 \pm 6.57 \mu$ M). Abgesehen von Trolox werden somit die Ergebnisse der eigenen Arbeit bestätigt.

Edenharder et al.¹²⁷ haben in ihren Experimenten unter anderem die IC_{50} -Konzentrationen für (+)-Catechin (9.7 μ M) und (-)-Epicatechin (4.65 μ M) bestimmt. Ihre Ergebnisse lagen damit sowohl unter den Werten der eigenen Versuche als auch unter den von Fauconneau berechneten Daten. Allerdings konnte dieselbe Tendenz wie bei den eigenen IC_{50} -Werten beobachtet werden. So ist der IC_{50} von (+)-Catechin doppelt so groß wie derjenige von (-)-Epicatechin. Der einzige Unterschied, der beim Vergleich der Arbeiten festgestellt werden konnte, bestand in der Bereitung der DPPH[•]-Lösung. Edenharder verwendete statt einer 60 μ M Lösung in Ethanol eine 100 μ M Lösung wie Fauconneau. Allerdings stellte er die Lösung in Methanol statt in Ethanol her. Wahrscheinlich ist die höhere Konzentration des Radikals und das unterschiedliche Lösungsmittel für die geringfügig abweichenden Ergebnisse verantwortlich.

Die Arbeitsgruppe von Sánchez-Moreno et al.¹³⁹ haben das kinetische Verhalten von Polyphenolen gängiger Obstsorten als Fänger freier Radikale mittels DPPH-Assay analog der Methode von Brand-Williams¹³⁰ untersucht. Ihre ermittelten Daten haben sie in Gramm Antioxidanz pro Kilogramm DPPH angegeben, wobei

folgende Reihenfolge der antiradikalischen Aktivität zu erkennen war: Gallussäure > Kaffeesäure > Ascorbinsäure > Ferulasäure. Diese Abstufung der Substanzen wurde sowohl von Brand-Williams¹³⁰ auch von den eigenen Ergebnissen widerspiegelt.

Yokozawa et al.¹⁴⁰ haben die antioxidativen Eigenschaften von Tanninen und Flavonoiden untersucht, die aus orientalischen Heilkräutern isoliert wurden. Sie haben dazu ein DPPH-Radikal generierendes System in Anlehnung an die Methode von Hatano et al.¹⁴¹ verwendet und wässrige Testlösungen mit einer 60 µM ethanolischen DPPH-Lösung inkubiert. Hierbei erhielten sie unter anderem folgende IC₅₀-Werte: Gallussäure 8.14 ± 0.26 µM, Kaffeesäure 13.56 ± 0.47 µM, Catechin 12.90 ± 0.35 µM. Der selbst ermittelte IC₅₀-Wert von (+)-Catechin (28.45 ± 6.04 µM) war doppelt so groß wie in dieser Literaturangabe. Die übrigen Werte zeigten jedoch sehr gute Übereinstimmung mit den eigenen berechneten IC₅₀-Werten von 7.6 ± 0.89 µM für Gallussäure bzw. 17.99 ± 0.99 µM für Kaffeesäure.

2.4 Vergleich von DPPH-, FRAP- und anderen Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität

2.4.1 Gegenüberstellung der Methoden von DPPH- und FRAP-Assay

Die in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Assays zur Bestimmung der Radikalfängereigenschaften der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol gegenüber dem stabilen DPPH-Radikal sowie zur Bestimmung der eisenreduzierenden Fähigkeit sollten einen Beitrag zum Verständnis der antioxidativen Eigenschaften des untersuchten Kiefernrintenextraktes liefern. Die ermittelten antioxidativen Aktivitäten wurden durch die IC₅₀- bzw. EC₁-Werte ausgedrückt.

Im DPPH-Assay nahm die Radikalfangaktivität der Substanzen in der Reihenfolge Gallussäure > Protocatechusäure > (-)-Epicatechin > M1 > Kaffeesäure > Ascorbinsäure > (+)-Catechin > M2 ab. Die eisenreduzierende Fähigkeit der Verbindungen im FRAP-Assay stellte sich wie folgt dar: Protocatechusäure > M1 > (-)-Epicatechin > Gallussäure > (+)-Catechin > Kaffeesäure > Ascorbinsäure > M2.

Die Ergebnisse der beiden Assays zeigen, dass je nach verwendeter Methode die antioxidative Aktivität der untersuchten Verbindungen variierte, was auf unterschiedliche Substrate, Reaktionsmechanismen und Messmethoden zurückgeführt werden kann.

2.4.2 Vergleich verschiedener *in vitro* Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Nahrungsbestandteilen und Pflanzenextrakten

Luximon-Ramma et al.⁹⁸ haben die Konzentration von Phenolen, Proanthocyanidinen und Flavonoiden in vegetativen und reproduktiven Pflanzenteilen von *Cassia fistula* (Goldregen) bestimmt und deren antioxidative Eigenschaften mittels TEAC- und FRAP-Assay erforscht. Dabei korrelierte die antioxidative Aktivität stark mit dem Phenol- und Proanthocyanidingehalt. Die Daten des FRAP-Assays bestätigten die Ergebnisse des TEAC-Assays, und beide Assays belegten, dass in den vegetativen Pflanzenteilen die Rinde das höchste antioxidative Potential besaß, gefolgt von Blättern und Zweigen.

Zum einen zeigt diese Untersuchung, dass die Rinde von *Cassia fistula* aufgrund ihres großen Polyphenolgehaltes genau wie die Rinde von *Pinus maritima*

starke antioxidative Aktivität besitzt. Zum anderen konnte Luximon-Ramma darlegen, dass das FRAP-Assay gut zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Pflanzenextrakten geeignet ist.

Die Arbeitsgruppe um Davalos¹⁴² hat sieben kommerziell erhältliche antioxidative Nahrungsergänzungsmittel untersucht und ihre antioxidativen Fähigkeiten anhand verschiedener Testmodelle (antiradikalische Aktivität gegenüber DPPH*, Hemmung der Methylinoleat-Autoxidation, Resistenz gegenüber ionenabhängiger Oxidation von humanem LDL) evaluiert. Die antioxidative Aktivität einer Verbindung hing dabei stark von verwendeter Methode und Substrat ab. Bei der Methylinoleat-Autoxidations- und der LDL-induzierten Oxidationsmethode ergab sich die gleiche Reihenfolge der antioxidativen Aktivität der Testsubstanzen. Das DPPH-Assay hingegen zeigte abweichende Ergebnisse. Diese Beobachtung schrieben die Forscher vor allem dem Vitamin C zu, das im DPPH-Assay eine starke antiradikalische Reaktion aufwies, aber in Lipidsystemen fast unlöslich ist und somit hier eine drastisch reduzierte Reaktivität besaß. Auch bei den eigenen Untersuchungen ergaben sich im FRAP- und DPPH-Assay unterschiedliche Tendenzen für die antioxidativen Aktivitäten der untersuchten Substanzen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, ist es daher entscheidend, bei der Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften von Verbindungen immer auf die gleiche Messmethode zu achten.

Eine Vielzahl von in Italien gängigen Nahrungsmitteln (34 Gemüsesorten, 30 Obstsorten, 34 Getränke, 6 Gemüseöle) war Gegenstand der Untersuchungen von Pellegrini et al.¹⁴³, die drei verschiedene Assays (TEAC, TRAP, FRAP) verwendeten. Auch hier wiesen die Nahrungsmittlextrakte je nach verwendeter Methode unterschiedliche antioxidative Aktivitäten auf. Die Assays unterschieden sich zum einen in ihrer Chemie (Bildung von verschiedenen Radikalen und/oder Zielmolekülen) und zum anderen in der Art, in der Endpunkte gemessen wurden.

Diese Ergebnisse von Pellegrini¹⁴³ bestätigen nochmals die oben aufgeführten Ergebnisse von Davalos¹⁴² wie auch der eigenen Untersuchungen. Alle Assays können zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Nahrungsbestandteilen, Nahrungsergänzungsmitteln oder einfacher polyphenolischer Verbindungen verwendet werden. Auf die Frage, welches Assay das Beste sei zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Substanzen, fanden weder diese Forscher noch andere Arbeitsgruppen bisher eine Antwort. Aufgrund der unterschiedlichen Substrate, der

unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und der unterschiedlichen Messmethoden ist ein direkter Vergleich der Assays nicht möglich.

Wood et al.¹⁴⁴ untersuchten die antioxidative Aktivität von procyanidin-enthaltenden Pflanzenextrakten (Rindenextrakt von *Pinus radiata*, Rindenextrakt von *Pinus maritima*, zwei Traubenkernextrakte, drei Traubenschalenextrakte) sowie von Catechin, Trolox und Ascorbinsäure. Als Testsysteme dienten NBT- (Nitrotetrazolium Blau) und WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulphonat) Assay, die die Fähigkeit, Superoxidationradikale einzufangen, analysieren. Im NBT-Assay erwiesen sich beide Rindenextrakte als dreizehnmal effektivere Antioxidantien als Ascorbinsäure und auch wirksamer als alle anderen Substanzen. Catechin war im WST-1 Assay das stärkste Antioxidanz, wohingegen Trolox die schwächste Radikalfangaktivität besaß. Auch hier erklärten die Forscher die abweichenden Ergebnisse mit den unterschiedlichen verwendeten Methoden.

In den eigenen Untersuchungen hingegen wies der Rindenextrakt sowohl im FRAP- als auch im DPPH-Assay geringere antioxidative Aktivität auf als die Referenzsubstanz Ascorbinsäure. Vermutlich sind hier die unterschiedlichen Messmethoden und Substrate für die völlig verschiedenen Ergebnisse verantwortlich. Das NBT-Assay ist ein enzymatisches Assay, bei dem die radikalische Spezies durch Reaktion von Hypoxanthin mit Xanthinoxidase entsteht. Auch das WST-1-Assay ist ein enzymatisches Assay basierend auf Katalase und Xanthinoxidase. Somit unterscheiden sich die von Wood gewählten Messmethoden deutlich von denjenigen der eigenen Arbeit und erlauben keine direkte Vergleichbarkeit.

Die antioxidative Aktivität der finnischen Kiefer *Pinus sylvestris* L. wurde von Saleem et al.¹⁴⁵ mit Hilfe eines modifizierten *in vitro* Lipidperoxidations-Hemmungs-Assays mittels Chemilumineszenz erforscht. Die Ergebnisse zeigten, dass Protocatechusäure und Taxifolin-3-O- β -glucopyranosid die größte antioxidative Kraft besaßen. Ihre IC₅₀-Werte im Vergleich zur Referenz Trolox waren: Trolox (1.78 \pm 0.56 μ M) < Protocatechusäure (5.77 \pm 1.63 μ M) < Taxifolin-3-O- β -glucopyranosid (16.30 μ M \pm 1.98 μ M). Die eigenen Ergebnisse zeigten ebenfalls sehr geringe IC₅₀-Werte für Protocatechusäure (7.03 \pm 0.27 μ M im FRAP-Assay bzw. 9.59 \pm 0.97 μ M im DPPH-Assay), und auch die IC₅₀-Werte von Taxifolin zeigten interessanterweise eine gute Übereinstimmung mit dem Wert des Glucopyranosids von Saleem (28.89 \pm 4.94 μ M im FRAP bzw. 42.22 \pm 7.87 μ M im DPPH). Allerdings waren die IC₅₀-Werte der eigenen Untersuchung für Trolox deutlich höher

($22.18 \pm 0.95 \mu\text{M}$ im FRAP bzw. $29.97 \pm 6.57 \mu\text{M}$ im DPPH), was auf die unterschiedlichen Methoden der Assays zurückgeführt werden kann.

2.4.3 Vergleich diverser *ex vivo* Assays zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Plasma bzw. Serum

Cao et al.¹⁴⁶ haben drei Assays zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von humanem Serum verglichen: ORAC, TEAC und FRAP. Sie sahen eine schwache, aber signifikante lineare Korrelation zwischen ORAC- und FRAP-Assay, aber keine zum TEAC-Assay. Aus den Ergebnissen schlossen sie, dass die antioxidative Kapazität von Serum in der Physiologie des menschlichen Körpers fortlaufend durch Selbstregulation gesteuert wird. Vergleichbar mit der Homöostase von Blutdruck, Herzfrequenz und Atmung versucht der humane Organismus bei Stress durch bestimmte Regulationsmechanismen das Gleichgewicht im Körper zu erhalten bzw. wieder herzustellen. Eine schwache oder keine Übereinstimmung der Daten bezeichneten sie als nicht verwunderlich, da die angewandten Methoden diverse Unterschiede in Reaktionsmechanismus, verwendetem Substrat und Messmethode aufwiesen.

Wie bereits in Abschnitt 2.2.6 erwähnt, hat Janisch¹²³ die antioxidativen Eigenschaften von humanem Blutplasma mit Hilfe von sechs verschiedenen Testsystemen (HOCl/ACC-Assay, SIN-1-Assay, Fenton-Assay, ABTS-Assay, NADH/Diaphorase-Assay, Xanthin/Xanthinoxidase-Assay) analysiert. Hierbei stellte sie fest, dass je nach verwendeter Methode die antioxidative Kapazität von humanem Blutplasma variierte. Im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen mit dem FRAP-Assay lässt sich allerdings feststellen, dass alle von Janisch verwendeten Methoden die antioxidative Aktivität der Probe nicht direkt messen. Die Assays verwenden indirekte Methoden, indem sie die Hemmung von reaktiven Spezies betrachten, die zunächst im Reaktionsansatz generiert werden müssen. Das FRAP-Assay hingegen misst die Antioxidantien als Reduktionsmittel in einer redox-bezogenen kolorimetrischen Reaktion.

Auch die Arbeitsgruppe um Devaraj et al.⁵⁰ untersuchten die Auswirkungen der Einnahme von Pycnogenol (150 mg/Tag) auf Messwerte des oxidativen Stresses. Nach sechswöchiger Gabe des Extraktes war auch hier ein signifikanter Anstieg der Plasma-Polyphenol-Spiegel zu vermerken. Der antioxidative Effekt von

Pycnogenol wurde durch einen starken Anstieg der Werte im ORAC-Assay angezeigt. Während der gesamten Einnahmeperiode von Pycnogenol war die antioxidative Kapazität um etwa 40 % erhöht.

Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser beiden Forschergruppen bewirkte die nahrungsergänzende Einnahme von täglich 200 mg Pycnogenol über einen Zeitraum von fünf Tagen bei den eigenen Untersuchungen nur bei zwei von fünf Probanden eine Zunahme der antioxidativen Aktivität des Serums. Die Formulierung einer Tendenz aus diesen Daten ist schwierig, da das Probandenkollektiv sehr klein war ($n = 5$). Zudem besteht, wie schon erwähnt, die Möglichkeit, dass die Probanden sich nicht an die flavonoidfreie Diät gehalten haben. Weiterhin ist denkbar, dass eine Zunahme der antioxidativen Kapazität bevorzugt dann messbar ist, wenn die Versuchsteilnehmer nicht gesund sind, sondern eine Erkrankung haben, die mit einer verstärkten Inanspruchnahme des körpereigenen antioxidativen Systems einhergeht.

Silliman et al.¹⁴⁷ erhielten bei ihren Untersuchungen hingegen Ergebnisse, die den eigenen in gewisser Weise ähnelten. Sie führten eine Studie durch, um festzustellen, ob nach 14-tägiger Einnahme von täglich 200 mg Pycnogenol die antioxidative Aktivität von Serum und Urin zunimmt. Die Blut- und Urinproben wurden mittels FRAP- und ORAC-Assay analysiert. Nach Pycnogenoleinnahme konnten die Forscher keine signifikante Zunahme der antioxidativen Kapazität von Serum oder Urin feststellen. Zu einer ähnlichen Erkenntnis sind auch Simonetti et al.¹⁴⁸ gekommen. Sie haben die Wirkung der Einnahme von Procyanidinen aus *Vitis vinifera* auf Marker des oxidativen Stresses untersucht. Zehn gesunde Probanden nahmen über einen Zeitraum von 30 Tagen täglich 110 mg Procyanidine ein. Diese Nahrungsergänzung hatte nur einen geringen Effekt auf das antioxidative Potential des Plasmas, das mittels TRAP-Assay gemessen wurde.

Sowohl Silliman¹⁴⁷ als auch Devaraj⁵⁰ haben die Wirkung von Pycnogenol auf die antioxidative Aktivität von Plasma mit Hilfe des ORAC-Assays untersucht, kamen aber zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Resultate von Simonetti¹⁴⁸ und Silliman¹⁴⁷ wiederum, die das TRAP- bzw. ORAC-Assay verwendet haben, stehen im Einklang mit den eigenen Ergebnissen des FRAP-Assay. Hier konnte gezeigt werden, dass eine mittelfristige Einnahme von Antioxidanz-reichen Nahrungsmitteln oder Getränken nur einen geringen Einfluß auf den antioxidativen Status des Blutes hat. Und wie bereits von Cao et al.¹⁴⁶ dargelegt wurde, besteht eine signifikante lineare Korrelation zwischen ORAC- und FRAP-Assay.

3 Antiinflammatorische Eigenschaften von phenolischen Pflanzenwirkstoffen

3.1 Inflammation und Diabetes

Entzündungsprozesse spielen eine wichtige Rolle bei Diabetes mellitus. Sie treten als Folge von Insulinresistenz, Hyperglykämie und Hyperlipidämie auf, die allesamt eng mit dem Symptom Fettleibigkeit verknüpft sind (Abbildung 12). Darüber hinaus wird diskutiert, ob inflammatorische Prozesse auch als Ursache dieser Risikofaktoren gelten können.¹⁴⁹ Ein wichtiger Mechanismus, der an der Initiierung von Entzündungen beteiligt ist, ist oxidativer Stress. Im Falle von Hyperglykämie bedeutet eine erhöhte Glucoseaufnahme durch die Endothelzellen eine exzessive Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien. Diese lösen die inflammatorische Signalkaskade in den Endothelzellen aus und verursachen oxidativen Schaden. Hierdurch können inflammatorische Zellen wie z.B. Makrophagen angezogen werden, die die lokale Entzündung weiter vorantreiben.¹⁴⁹

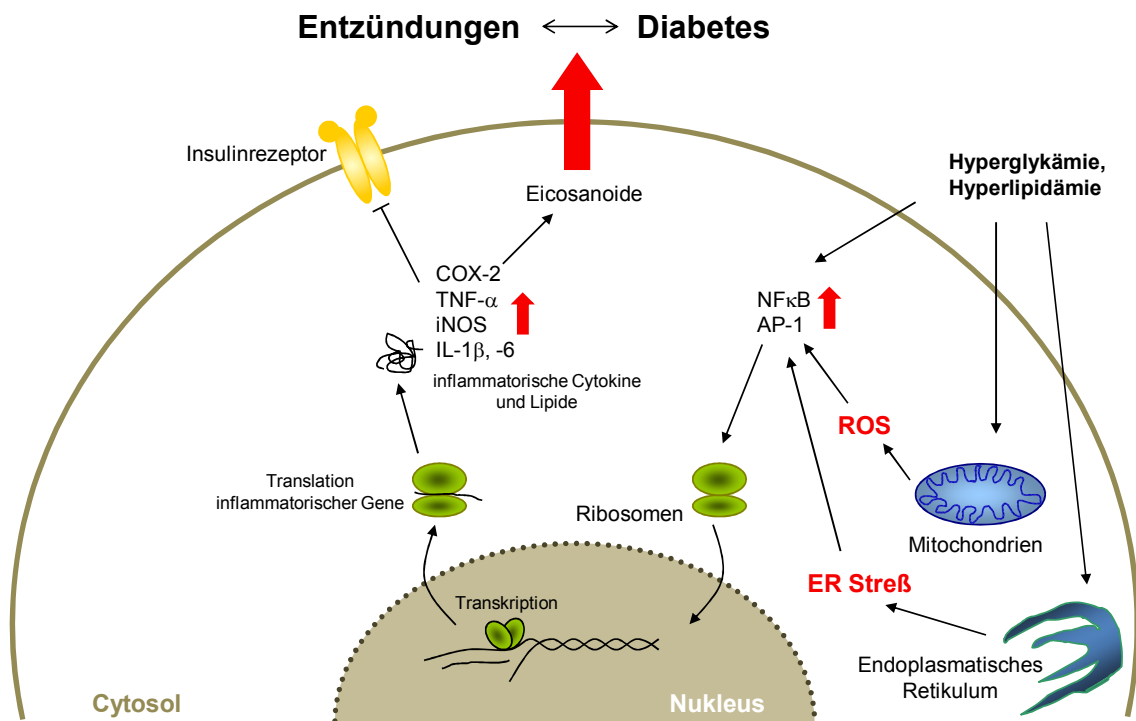


Abbildung 12: Modell der überlappenden metabolischen und inflammatorischen Signalwege. Hyperglykämie und Hyperlipidämie sind an der Entstehung von oxidativem Stress und der Überexpression inflammatorischer Cytokine und Lipide wie z.B. TNF- α und COX-2 ursächlich beteiligt. (nach Kim et al.¹⁵⁰)

Neben oxidativem Stress wirkt sich auch eine Überexpression des Tumornekrosefaktor (TNF-) α negativ auf die Entstehung und Entwicklung von Diabetes aus.^{151,152}

So entwickeln z.B. etwa ein Drittel aller Patienten mit chronischer Hepatitis C im Laufe ihrer Erkrankung einen Typ 2 Diabetes; hierbei werden erhöhte Konzentrationen an TNF- α beobachtet.^{153,154} Guha et al.¹⁵⁵ konnten bei ihren Untersuchungen belegen, dass chronisch erhöhte Glucosespiegel einen dramatischen Anstieg der Freisetzung von TNF- α bewirken. Dieses wiederum kann dann über spezifische Rezeptoren die Insulinsekretion unterdrücken und somit eine Insulinresistenz vorantreiben.^{57,156}

Die durch Hyperglykämie stimulierte mitochondriale Produktion von ROS führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, wodurch zum einen die TNF- α mRNA Transkription verstärkt wird, aber auch die Induktion von Cyclooxygenase (COX-) 2 mRNA, die Produktion von COX-2 Protein und die Synthese von Prostaglandinen (PG) wie PGE₂ ausgelöst wird.^{58,157} Diese Signalkaskade ist bei der Pathogenese von Folgeerkrankungen, wie z.B. diabetischer Nephropathie und Retinopathie, involviert. Auch gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Arteriosklerose und metabolisches Syndrom in einem engen Zusammenhang stehen.¹⁵⁸

Die Hemmung von TNF- α durch antioxidative Substanzen stellt einen überaus wichtigen Mechanismus der Chemoprotektion durch Antioxidantien dar und ist von großer Bedeutung, da so der Beginn oder das Fortschreiten einer Entzündungsreaktion unterbunden werden kann. Durch Messung von Cyclooxygenase- oder Cytokin-induzierten Produkten können inflammatorische Prozesse untersucht werden. Prostaglandine und Thromboxane sind Verbindungen, die aus Arachidonsäure durch Katalyse mittels COX-Enzymen gebildet werden und wichtige Mediatoren des Entzündungsgeschehens darstellen.¹⁵⁹

3.1.1 Inflammatorische Mediatoren

Inflammatorische Mediatoren sind lösliche, diffusionsfähige Moleküle, die lokal an Stellen von Infektionen und geschädigtem Gewebe, aber auch weiter entfernt agieren können. Sie werden allgemein in exogene und endogene Mediatoren unterteilt. Bakterielle Produkte und Toxine wie Lipopolysaccharid (LPS; integraler Bestandteil von Gram-negativ Bakterienzellwänden) agieren als exogene Mediatoren

von Entzündungen. Endogene Mediatoren werden vom Immunsystem gebildet oder stammen von Molekülen ab, die normalerweise in inaktiver Form im Plasma vorliegen. Diese Mediatoren werden bei der inflammatorischen Antwort in verschiedenen Phasen des Entzündungsprozesses durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen produziert und triggern eine große Bandbreite an zellulären Reaktionen, zu der die Produktion von Cytokinen und Chemokinen, die Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten und die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Intermediaten gehören, die für die pathophysiologischen Reaktionen verantwortlich sind.¹⁶⁰

In der frühen Phase der Entzündung kommen in Vesikeln enthaltene Moleküle wie Histamin, Serotonin und andere vasoaktive Substanzen zum Einsatz, die von Granulocysten und Thrombocysten freigesetzt oder bei Bedarf schnell synthetisiert werden können. Diese Substanzen sind vor allem bei einer akuten Entzündung von Bedeutung. Hierzu gehören auch chemotaktische Verbindungen und Cytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α . Mediatoren der späten Phase sind verantwortlich für die Regulation von vaskulären Ereignissen (z.B. Vasokonstriktion bzw. Vasodilation, Permeabilität), die etwa 6–12 h nach Initiierung der Entzündung ablaufen. Diese Prozesse werden unter anderem von Produkten der Arachidonsäure in Gang gesetzt.¹⁶¹

3.1.2 Entzündungshemmende Eigenschaften von Pflanzenextrakten

Flavonoide gelten aufgrund ihrer *in vivo* Aktivitäten und einzigartiger Reaktionsmechanismen als potentielle Kandidaten für antiinflammatorische Medikamente.¹⁶² Neueste Studie haben gezeigt, dass bestimmte Flavonoide und vor allem Flavon-Derivate ihre antientzündliche Wirksamkeit zumindest zum Teil durch Modulation proinflammatorischer Genexpression von Cyclooxygenase-2, induzierbarer NO-Synthase und einigen anderen wichtigen Cytokinen ausüben.¹⁵⁰

Die Arbeitsgruppe von Ojewole¹⁶³ hat an einem Rattenmodell die entzündungshemmenden Eigenschaften eines Pflanzenextraktes untersucht. Der Extrakt aus Blättern von *Bryophyllum pinnatum* (Goethe-Pflanze) zeigte eine signifikante Hemmung der Albumin-induzierten akuten Entzündung in Ratten. Die antiinflammatorische Wirkung der Pflanze wurde ihren Bestandteilen, den Flavonoiden, Polyphenolen und Triterpenoiden, zugeschrieben.

Blazso et al.¹⁶⁴ konnten bei ihren Untersuchungen darlegen, dass oral verabreichte, procyanidinreiche Extrakte von *Pinus pinaster Ait.* das Crotonöl-induzierte Ohrödem in Mäusen und das Hinterpfotenödem in Ratten statistisch signifikant reduzierten. Die größten Effekte erzielten diejenigen Extrakte, die oligomere Procyanidine mit einem Polymerisationsgrad größer vier enthielten.

Die Wirkung der Flavonoide des Rindenextraktes von *Pinus maritima* auf die Entstehung freier Radikale, Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren und die Produktion von Interleukin-1 β haben auch Cho et al.¹⁶⁵ beschäftigt. Sie nutzten zwei murine Makrophagen-Zelllinien, RAW 265.7 und IC-21, und belegten die starke Radikalfängeraktivität von Pycnogenol gegenüber ROS, die mittels H₂O₂ oder PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) generiert wurden. Die Ergebnisse von *in situ* ELISA, Immunoblot-Analyse und kompetitiver RT-PCR veranlassten die Forscher zu der Schlussfolgerung, dass der Kiefernridenextrakt die Expression des proinflammatorischen Cytokins IL-1 β durch Hemmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Aktivatorprotein-1 reduziert.

Grimm¹⁶⁶ beschäftigte sich mit der Frage, ob humanes Serum nach oraler Einnahme von Pycnogenol eine ausreichende Konzentration an aktiven Bestandteilen enthält, um Schlüsselmediatoren von Entzündungen zu inhibieren. Blutproben von sieben gesunden Probanden wurden vor und nach fünftägiger Einnahme von 200 mg/d Pycnogenol abgenommen und mittels ELISA untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Serumproben signifikant die MMP-9 Freisetzung aus LPS-stimulierten humanen Monocyten und die NF- κ B-Aktivierung hemmten. Folglich konnte nachgewiesen werden, dass bioverfügbare aktive Bestandteile von Pycnogenol im Serum vorhanden sind und folglich antiinflammatorische Effekte durch Hemmung der proinflammatorischen Genexpression ausüben können.

3.2 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA

Um die antiinflammatorischen Wirkungen von Pycnogenol und seinen Metaboliten auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde im Folgenden getestet, ob diese Substanzen einen inhibitorischen Einfluß auf die Sekretion des Tumornekrosefaktors α (engl.: *tumor necrosis factor*, TNF) ausüben. Aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften wurden humane Monocyten bei den folgenden Untersuchungen als Modell für periphere Entzündungsprozesse eingesetzt. Die mononukleären Zellen dienten dabei nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) als Produzenten dieses wichtigen proinflammatorischen Cytokins.

In einem ersten Versuchsansatz wurde *in vitro* der Sekretionsverlauf von TNF- α , sowie der Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Freisetzung des Entzündungsmediators in Zellkultur untersucht. In einem weiteren Versuchsansatz sollte eine mögliche *ex vivo* Hemmwirkung von Serumproben der Pycnogenol-Studie untersucht werden. Hierzu wurden humane Monocyten mit den Serumproben der Mehrfachgabe des Extraktes vorinkubiert und anschließend mit Lipopolysaccharid stimuliert. Das Serum stammte von fünf gesunden Probanden (3 ♀, 2 ♂) im Alter von 18–30 Jahren, die fünf Tage lang jeden Morgen 200 mg Pycnogenol eingenommen haben. Die Teilnehmer der Studie mußten am Tag vor der Pycnogenol-Gabe und am ersten, vierten und fünften Tag der Studie eine strikte flavonoidfreie Ernährung einhalten (siehe Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil).

Ziel dieser Untersuchungen war es, herauszufinden, ob nach peroraler Einnahme des Kiefernridenextraktes eine ausreichende Konzentration an potentiell inhibitorischen Substanzen im Blut vorliegt, die eine Hemmung der TNF- α Sekretion bewirken kann.

3.2.1 Bedeutung von TNF- α

Zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehören zwei strukturell und funktional ähnliche Proteine, TNF- α , auch Cachectin genannt, und TNF- β , auch unter dem Begriff Lymphotoxin bekannt.¹⁶⁷ TNF- α wurde zum ersten Mal 1975 von Carswell et al.¹⁶⁸ bei dem Versuch isoliert, Tumornekrosefaktoren zu identifizieren, die verantwortlich für die Nekrose der Sarcoma Meth A (*3-methylcholanthren-induced*

ascitic sarcoma) sind. TNF wird heute oft als zweischneidiges Schwert bezeichnet, da es sowohl bei normalen Zellreaktionen wie der Stimulation des Immunsystems beteiligt ist, aber bei unkontrollierter Sekretion auch schädliche Wirkungen haben kann. Es gehört zu den endogenen Pyrogenen, die direkt oder über die Freisetzung von Prostaglandin E₂ auf das Temperatur-Regulationszentrum im Gehirn wirken und so Fieber induzieren. TNF- α gilt als wichtiges pleiotropes Cytokin, das sowohl zelluläre Proliferation, Überleben, Differenzierung, aber auch Apoptose induzieren kann.¹⁶⁹

3.2.2 Sekretionskaskade von TNF- α

TNF- α ist ein homotrimeres Protein, das innerhalb des großen Histokompatibilitätskomplexes verschlüsselt vorliegt. Es wurde zum ersten Mal in seiner 17 kDa sekretierten Form identifiziert, aber weitere Untersuchungen zeigten bald, dass darüber hinaus eine 27 kDa Precursor-Form in transmembraner Form existiert.¹⁷⁰

Nach der Stimulation von Makrophagen beginnt innerhalb weniger Minuten die *de novo* Synthese von pro-TNF- α (27 kDa Form), einem sogenannten Typ II integralen Membranprotein (*mem*TNF), das direkt an die beiden Rezeptoren TNFR-55 und TNFR-75 binden kann. Das pro-TNF- α wird an die Zelloberfläche transportiert und proteolytisch gespalten, um eine 17-kDa lösliche Form freizusetzen (*so*TNF). Diese proteolytische Prozessierung wird von einer spezifischen Metalloprotease, dem TNF- α *converting enzyme* (TACE), verrichtet.¹⁷¹ Beide Formen von TNF- α sind biologisch aktiv, wobei das 27-kDa pro-TNF- α nur an bestimmten Stellen des Organismus gegenwärtig ist, das 17-kDa TNF- α hingegen in geringer Konzentration im Blut zirkuliert und im parakrinen und autokrinen Modus agiert.¹⁷²

Die Synthese von TNF- α wird auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und Translationsebene reguliert. Bei Stimulation mit z.B. LPS steigt die TNF- α mRNA-Konzentration sowie die Translationsrate des TNF- α Proteins in aktivierten Makrophagen an. Das synthetisierte TNF- α -Protein akkumuliert anfänglich vorzugsweise im Golgi-Komplex und bewegt sich dann weiter entlang des Sekretionsweges zur Zelloberfläche. Die resultierende kurzlebige Form von TNF- α unterliegt Degradierung oder Endocytose, jedoch ist der genaue Mechanismus der

TNF- α Sekretionskaskade in den Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit LPS noch nicht vollständig aufgeklärt.¹⁷²

3.2.3 Pathologische Aktivität von TNF- α

TNF- α ist eine Schlüsselsubstanz im Entzündungsgeschehen und wird vor allem von Monocyten/Makrophagen freigesetzt; daher auch seine Bezeichnung Monokin. Es ist verantwortlich für die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von Endothelzellen, Induktion der Produktion und Sezernierung von Interleukinen (IL-1 und IL-6) sowie Erhöhung der vaskulären Permeabilität.¹⁷³ Seine unkontrollierte Sekretion kann z.B. die Zerstörung der Gelenke bei rheumatoider Arthritis einleiten oder die Entzündung bei Morbus-Crohn-Patienten immer wieder anfachen.¹⁷⁴ Es ist bei der Pathogenese und Entwicklung von septischem Schock, Tumorgenese, Krebs, viraler Replikation, Knochenresorption, rheumatoider Arthritis, AIDS, Alzheimer wie auch Typ 2 Diabetes beteiligt.¹⁶⁹

Ursprünglich nahm man an, dass Sepsis direkt durch das Eindringen von Bakterien verursacht wird. Später erkannte man jedoch, dass Proteine wie TNF- α Sepsis als Antwort auf exogene und endogene Faktoren wie Bakterien, Viren und Parasiten induzieren. Wird die Produktion der Cytokine in einem solchen Ausmaß erhöht, dass sich eine lokale Infektion weiter ausbreitet, so kann sie auf den Blutkreislauf übergreifen und eine Sepsis hervorrufen.¹⁷⁵

Zahlreiche Untersuchungen haben belegt, dass die TNF- α Konzentration nach akutem Trauma, Entzündungen und Infektion rasch ansteigt, und dass die Hemmung der TNF- α Aktivität deren Ausmaß eindämmt.^{176,177} Erhöhte TNF-Spiegel wurden in Blut und Myocardium von Patienten mit chronischem Herzversagen gefunden. Auch besitzt TNF eine entscheidende Rolle bei der Knochendestruktion.¹⁶⁹ Der Anstieg der Cytokine nach einer Stimulation durch inflammatorische Mediatoren ist das Ergebnis von erhöhter Genexpression und *de novo* Synthese.¹⁶² Des Weiteren gilt TNF als autokriner Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Tumoren und trägt durch Initiierung von Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen zur Tumorgenese bei. Durch die Aktivierung von NF- κ B induziert TNF die Expression verschiedener Gene von Adhäsionsmolekülen, Urokinase-Plasminogen-Aktivator (UPA), Matrixmetalloproteinase 9, Cyclooxygenase 2 und vaskulären endothelen Wachstumsfaktoren (VEGF), die bei Invasion und Metastasierung involviert sind. Desweiteren

kann die Aktivierung von NF- κ B die Unterdrückung von Apoptose zur Folge haben, was ebenfalls zur Tumorgenese beiträgt.¹⁶⁹

Der Tumornekrosefaktor α spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2. Er interveniert mit dem Insulin-Signal-Mechanismus durch Inhibierung der Tyrosinkinaseaktivitäten des Insulinrezeptors und Serin-Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrates 1. Diese Hemmwirkungen von TNF auf die Insulin-Signal-Kaskade scheinen durch die Hochregulierung der Expression von *Suppressor of Cytokine Signalling 3* (SOCS3) initiiert zu werden.¹⁶⁹ Dies hat zur Folge, dass die Insulinsekretion unterdrückt wird und die Insulinresistenz weiter voranschreitet.

Ein mögliches Therapieprinzip bei inflammatorischen Erkrankungen ist die Hemmung von TNF- α durch spezifische monoklonale Antikörper gegen TNF- α . So hat der chimäre, monoklonale Antikörper Infliximab[®] die Therapiestrategien chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis oder Morbus Bechterew erweitert.¹⁷⁸

3.2.4 Physiologische Rolle von TNF α

Tracey und Cerami¹⁷⁵ haben 1990 der fortwährenden Expression von TNF- α zwei nützliche Eigenschaften zugeschrieben. Zum gehören geringe Cytokinspiegel zum Erhalt der Homöostase im humanen Organismus dazu und zum anderen bewirken niedrige TNF- α -Konzentrationen die Erneuerung von verletztem und alterndem Gewebe durch Stimulation des Fibroblasten-Wachstums.

Darüber hinaus ist TNF- α an der lokalen inflammatorischen Immunantwort auf Bakterien- und bestimmte Pilz-, Viren- und Parasiten-Invasionen beteiligt.¹⁷⁵ Das Immunsystem wird nicht nur von Zellproliferation und -differenzierung, sondern auch von Apoptose reguliert. Liganden der TNF-Familie kontrollieren und dirigieren die Immunantwort auf verschiedenen Ebenen.

Neben der Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen am Infektionsherd, ist TNF- α auch an der Blutgerinnung beteiligt, was folglich eine Eingrenzung der Infektion bewirkt.¹⁷⁵ Denn wenn Endothelzellen TNF- α ausgesetzt werden, bilden sie Thromboplastin aus, das zur Gruppe der Gerinnungsfaktoren gezählt wird. Es leitet die Bildung von Thrombin aus Prothrombin ein und gibt damit den ersten Anstoß für die Blutgerinnung.

Der Tumornekrosefaktor besitzt auch eine entscheidende Rolle beim Schutz vor mikrobieller Infektionen. Bei einer anti-TNF Therapie, wie z.B. bei der Behandlung von Morbus Crohn mit monoklonalen TNF-Antikörpern, besteht für den Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von bestimmten Erkrankungen wie Tuberkulose.¹⁶⁹

3.2.5 Beeinflussung der TNF- α Produktion durch Pflanzenextrakte

In Interventionsstudien, bei denen TNF- α oder sein Rezeptor ausgeschaltet oder mittels neutralisierender Agenzien gehemmt wurden, konnte die Überexpression von TNF- α bei einer Reihe von Erkrankungen wie endotoxiner Sepsis, rheumatoider Arthritis, Asthma, Morbus Crohn, Parkinson und Typ-2 Diabetes nachgewiesen werden.^{172,174}

Ma et al.¹⁷⁴ zeigten in *in vitro* Experimenten mit einem wässrigen Extrakt von *Uncaria tomentosa* (Katzenkrallen), dass LPS die Synthese von TNF- α Protein stimuliert, wohingegen phenolische Antioxidantien (z.B. tert-Butylhydroquinon und 1,4-Dihydroquinon) die LPS-induzierte Produktion des TNF- α Proteins in einer zeit- und dosisabhängigen Weise inhibierten. Die Antioxidantien blockierten den LPS-induzierten Anstieg der *steady state* mRNA, aber besaßen keinen Einfluß auf die Halbwertszeit der TNF- α mRNA. Die Ergebnisse zeigen, dass phenolische Wirkstoffe aus *Uncaria tomentosa* die LPS-induzierte TNF- α Transkription hemmen können und lassen einen antiinflammatorischen Mechanismus der Antioxidantien durch Kontrolle der Cytokin-Induktion während der Entzündung vermuten.¹⁷⁹

Yang et al.¹⁶² konnten in ihren Untersuchungen belegen, dass (-)-Epigallocatechingallat (EGCG), ein phenolischer Hauptbestandteil in grünem Tee, die LPS-induzierte TNF- α Produktion in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 in einer dosisabhängigen Weise senkte ($IC_{50} = 100 \mu M$). Ebenso inhibierte EGCG die LPS-induzierte TNF- α mRNA Expression und NF- κB Bindungsaktivität. Desweiteren erniedrigten Grüntee-Polyphenole die LPS-induzierte TNF- α Produktion im Serum von BALB/c Mäusen. 0.5 g Polyphenole pro kg Körpergewicht reduzierten die Serum TNF- α Spiegel um 80 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

Diese Beobachtungen ließen die Frage aufkommen, ob auch Pycnogenol, dessen antiinflammatorische Eigenschaften bekannt sind, bzw. seine Bestandteile die Freisetzung von TNF- α hemmen kann.

3.2.6 Prinzip des TNF- α ELISA

Das ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*) wurde 1971 zum ersten Mal von Engvall und Perlmann¹⁸⁰ zur Quantifizierung von spezifischen Antikörpern durch enzymmarkierte anti-Immunglobuline in Antigen-beschichteten Gefäßen vorgestellt.

ELISAs kombinieren die Spezifität spezieller Antikörper mit der Sensitivität von einfachen Enzym-Assays mit Hilfe von Antikörpern oder Antigenen, die an ein einfach zugängliches Enzym mit einer hohen Wechselzahl gekoppelt sind. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, die als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient. Mittlerweile gibt es zahlreiche Variationen, die sich in der Durchführung, der Meßmethode und dem Substratumsatz unterscheiden. Bei den eigenen Versuchen wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA-Kit verwendet, der auf dem Sandwichprinzip basiert.

Das Sandwich-ELISA¹⁸¹ (Abbildung 13) verwendet zwei Antikörper, die beide hoch spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Dabei müssen die beiden Antikörper an zwei unterschiedliche Epitope auf dem Antigen binden, die nicht überlappen dürfen. Dies kann entweder durch zwei monoklonale Antikörper erreicht werden, die verschiedene Oberflächenstrukturen der Antigene erkennen, oder durch aufgereinigte polyklonale Antikörper.

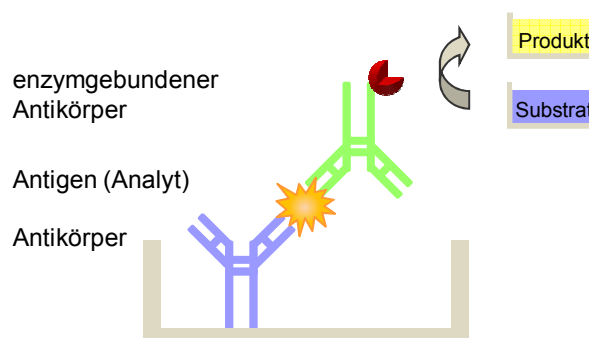


Abbildung 13: Prinzip des sogenannten direkten Sandwich-ELISA. Ein Fangantikörper, gekoppelt an eine feste Phase, komplexiert mit dem Antigen. Ein zweiter enzymmarkierter Antikörper (Detektionsantikörper) bindet an ein weiteres Epitop des Antigens. Nach Substratzugabe entwickelt sich die Farbe proportional zur Menge an Antigen.

Ein Antikörper („Fangantikörper“) wird an eine feste Phase gekoppelt; in der Regel ist dies der Boden einer Mikrotiterplatte. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe bildet das Antigen einen Komplex mit dem Antikörper aus. Ungebundene Bestandteile der Probe werden durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt bindet ein enzymmarkierter zweiter Antikörper („Detektionsantikörper“) an das Antigen und es ergibt sich ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, das sogenannte Sandwich. Durch erneutes Waschen wird überschüssiger zweiter Antikörper entfernt.

Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Konzentration an markiertem, an die Matrix gebundenem zweiten Antikörper mit Hilfe eines Farbsubstrats. Die Stärke der Farbreaktion ist mit einem Spektralphotometer messbar und ihre Intensität ist proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe. Oft verwendete Substrate sind *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP), *o*-Phenylendiamin (*o*PD), 2,2'-Azo-bis(3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), die von Enzymen wie Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase umgesetzt werden.

Einen Nachteil hat diese Methode allerdings: es können nicht alle Antikörper verwendet werden. Monoklonale Antikörper müssen unterschiedliche Epitope auf dem Antigen erkennen, um sich nicht gegenseitig bei der Bindung zu hindern.

3.2.7 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Serumproben und Metaboliten von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Ziel der folgenden Untersuchung war es, die antiinflammatorischen Wirkungen von Pycnogenol und seinen Metaboliten auf zellulärer Ebene zu studieren. Hierzu wurde zunächst in einem *in vitro* Ansatz der Sekretionsverlauf von TNF- α untersucht, sowie die Wirkung von M1, M2 und (+)-Catechin auf die Konzentration des Tumornekrosefaktors im Zellkulturüberstand humaner Monocyten. In einem weiteren *ex vivo* Versuchsansatz sollte herausgefunden werden, ob nach peroraler Einnahme des Kiefernrintenextraktes eine ausreichende Konzentration an bioverfügbaren aktiven Bestandteilen im Blut vorliegt, die eine inhibitorische Wirkung auf die TNF- α Sekretion ausüben kann.

3.2.7.1 Ergebnisse der Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Zur Bestimmung des Sekretionsmaximums von TNF- α wurden die Zellen für 1, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Um einen möglichen inhibitorischen Effekt von M1, M2 und (+)-Catechin – Metabolite bzw. Bestandteile des als antiinflammatorisch bekannten Pycnogenols – auf die Freisetzung von TNF- α zu untersuchen, wurden humane Monocyten parallel dazu mit 0.5 μ M Testsubstanz für 1 h vorinkubiert und anschließend ebenfalls für 1, 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass in allen Ansätzen ein ähnlicher Sekretionsverlauf auftrat (Abbildung 14).

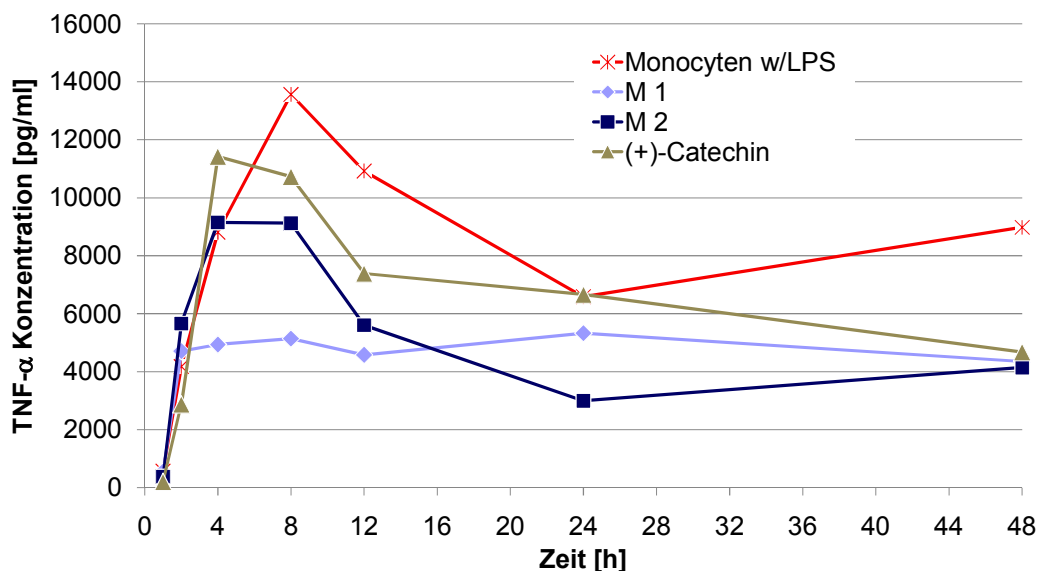


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der TNF- α Sekretion der mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten nach Vorinkubation mit 0.5 μ M M1, M2 oder (+)-Catechin bzw. ohne Vorinkubation (Monocyten w/LPS). (Einzelversuch)

Im Anfangsverlauf der Kurve war ein rascher Anstieg der TNF- α Konzentration zu erkennen. Sowohl die stimulierten Zellen ohne Zusatz wie auch die stimulierten Zellen mit Zusatz erreichten nach etwa 4–8 h ein Maximum der TNF- α Sekretion. Anschließend nahm die TNF- α Konzentration langsam ab und näherte sich einem Plateauwert an (siehe Tabelle 22, D Tabellarischer Anhang).

Die mit LPS-stimulierten Monocyten ohne Zusatz (Kontrolle) setzten die größten Mengen an TNF- α frei. Das Maximum der Sekretion lag bei etwa 8 h. Die mit M1 vorinkubierten Zellen sekretierten die geringsten TNF- α Mengen ins Zellkulturmedium. Hier wurde kein explizites Maximum ausgebildet, sondern nach etwa 3 h ein Plateau erreicht. M2 und (+)-Catechin zeigten zwischen Stunde 4 und 48 einen fast parallelen Verlauf, wobei M2 lediglich etwas geringere Konzentrationen aufwies. Das Maximum von M2 und (+)-Catechin lag zwischen 4 und 8 h; die TNF- α Konzentrationen lagen tendenziell zwischen denen der mit M1 vorinkubierten Zellen und der Kontrolle.

Aus den erhaltenen Daten der pharmakodynamischen Untersuchung wurde die Hemmung der TNF- α Konzentration in Prozent berechnet, indem die stimulierten Zellen ohne Zusatz (Monocyten w/LPS) auf 100 % gesetzt wurden (Abbildung 15 und Tabelle 23, D Tabellarischer Anhang).

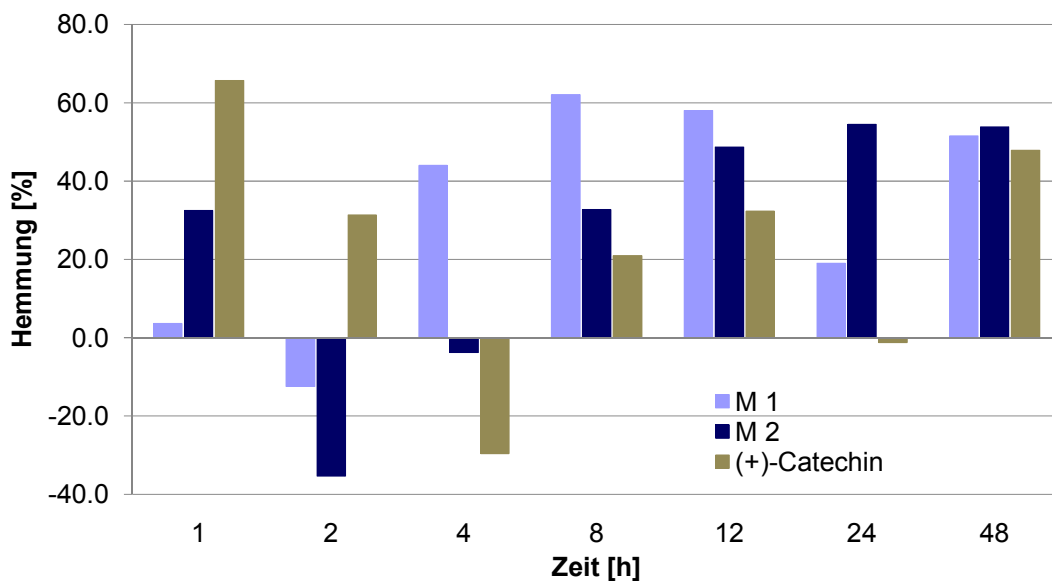


Abbildung 15: Hemmung der TNF- α Sekretion durch die Metabolite M1 und M2 sowie das Vorläufermolekül (+)-Catechin in Prozent in einem Zeitraum von 48 h. (Einzerversuch)

Der Metabolit M1 zeigte abgesehen vom Zeitpunkt 2 h immer eine Hemmung der TNF- α Sekretion in variierender Stärke (3.61–62.09 %); wobei das Maximum der Inhibition nach 8 h erreicht war. Beim Metaboliten M2 ist zum Zeitpunkt 2 h und 4 h eine Stimulation der TNF- α Sekretion zu verzeichnen. Im Zeitraum davor und danach fand eine Hemmung statt, die zwischen 32.49 und 54.48 % betrug und nach 24 h in

einem Maximum gipfelte. Auch bei (+)-Catechin gab es zu zwei Zeitpunkten eine leichte Stimulation der TNF- α Sekretion (4 h und 24 h); zu allen anderen Zeitpunkten konnte jedoch wie erwartet eine Hemmung der Freisetzung von TNF- α aus LPS-stimulierten Monocyten beobachtet werden (20.93–65.70 %). Das Maximum war hier bereits nach 1 h erreicht.

3.2.7.2 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Bei diesem Versuchsansatz sollte gezielt die Wirkung der beiden Metabolite δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton auf die Sekretion von TNF- α in Zellkultur untersucht werden. Die humanen Monocyten wurden hierzu mit 0.5 μ M M1 bzw. M2 für 1 h vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS für 48 h stimuliert, da im vorherigen Experiment (Abschnitt 3.2.7.1) gezeigt werden konnte, dass zu diesem Zeitpunkt eine etwa 50%-ige Hemmung der TNF- α Sekretion durch alle drei Testsubstanzen erzielt werden konnte.

Die Metabolite bewirkten eine substanzspezifische Erniedrigung der TNF- α Konzentration in den Zellkulturüberständen. Dargestellt ist exemplarisch das Ergebnis eines Einzelversuchs (Abbildung 16), da die TNF- α Konzentrationen bei den diversen Wiederholungen des Experimentes wie auch die berechneten prozentualen Hemmleistungen der untersuchten Substanzen stark schwankten (siehe Tabelle 24, D Tabellarischer Anhang). Dies ist auf Unterschiede in den Blutzellkonzentrationen zurückzuführen, aus denen die Monocyten isoliert wurden, da diese von unterschiedlichen Donoren stammten, die unterschiedliche basale TNF- α Konzentrationen aufwiesen.

Die TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand der mit M1 vorinkubierten und mit LPS-stimulierten Monocyten betrug bei diesem Versuchsansatz 1115 pg/ml, im Fall von M2 1220 pg/ml. Im Vergleich dazu war die Freisetzung von TNF- α in der Kontrolle (nur mit LPS-stimulierte Monocyten) um das Dreifache erhöht. Hier betrug die TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand 3672 pg/ml.

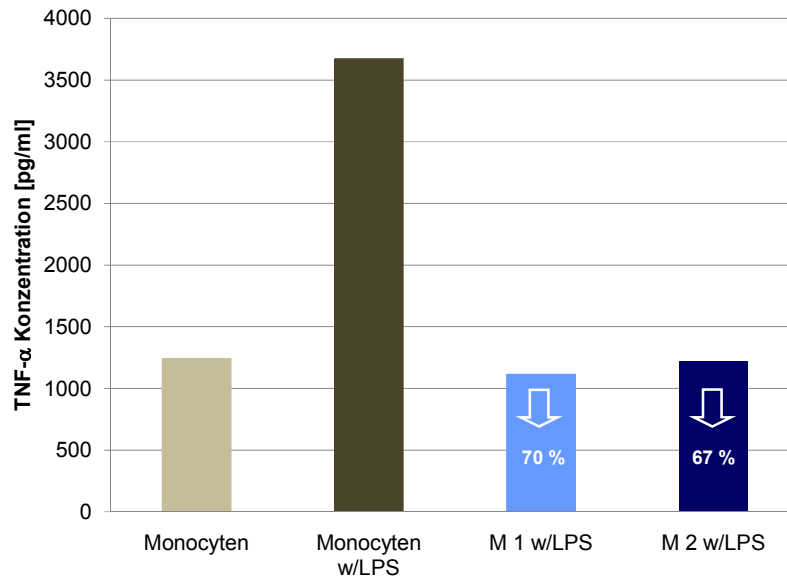


Abbildung 16: *In vitro* Untersuchung der Wirkung der Metabolite von Pycnogenol auf die Sekretion von TNF- α in humanen Monocyten. M1 bewirkte eine Reduktion der TNF- α Freisetzung aus LPS-stimulierten Monocyten um 70 %, M2 um 67 %. Exemplarisch dargestellt ist das Ergebnis eines Einzelversuchs.

Trotz der variierenden TNF- α Konzentrationen in den verschiedenen Versuchsansätzen konnte eine einheitliche Tendenz abgelesen werden. Der Metabolit M1 zeichnete sich durch die größte Hemmwirkung auf die Sekretion von TNF- α in LPS-stimulierten Monocyten aus. Auch der Metabolit M2 konnte eine deutliche Reduktion der TNF- α Konzentration im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Monocyten bewirken.

3.2.7.3 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von M1, M2 und (+)-Catechin auf die TNF- α Sekretion nach Vorinkubation mit TNF- α

Um einen inflammatorischen Zustand zu simulieren wurden die humanen Monocyten zunächst für 1 h mit 10 ng/ml TNF- α vorbehandelt, dann wieder für 1 h mit 0.5 μ M Testsubstanz inkubiert und anschließend für 48 h mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Diese Hemmversuche mit den beiden Metaboliten M1 und M2 sowie dem Vorläufermolekül (+)-Catechin lieferten vergleichbare Ergebnisse wie unter Abschnitt 3.2.7.2 beschrieben, jedoch waren die TNF- α Konzentrationen aufgrund der zuvorigen TNF- α Vorinkubation allgemein viel höher.

Hier wurde nur ein Einzelversuch durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 17 dargestellt sind. Die TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand der mit TNF- α und M1 vorinkubierten und mit LPS-stimulierten Monocyten betrug 6810 pg/ml, für M2 8204 pg/ml und für (+)-Catechin 10619 pg/ml. In der Kontrolle (nur mit TNF- α vorinkubierte und mit LPS-stimulierte Monocyten) war die Freisetzung von TNF- α am stärksten. Hier betrug die TNF- α Konzentration im Zellkulturüberstand 10999 pg/ml.

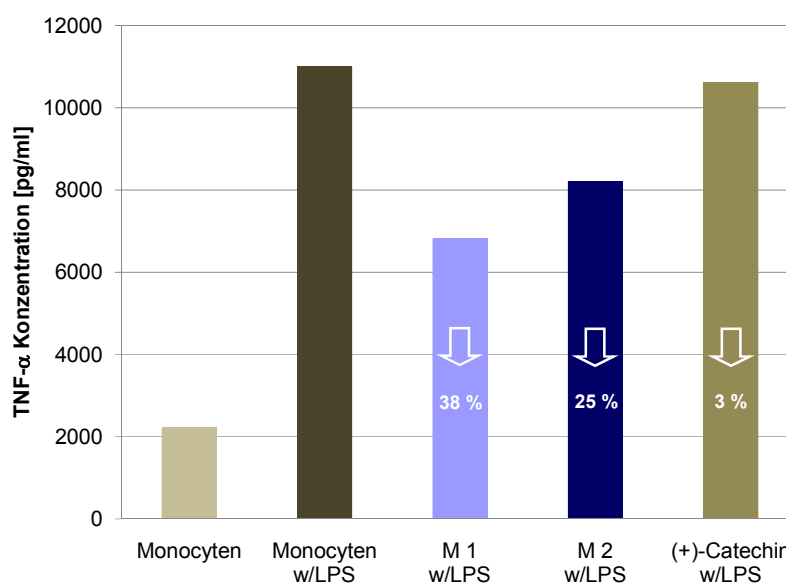


Abbildung 17: *In vitro* Untersuchung der Wirkung von M1, M2 und (+)-Catechin auf die Sekretion von TNF- α in humanen Monocyten nach Simulation eines inflammatorischen Zustandes durch Vorinkubation mit TNF- α . M1 bewirkte eine Reduktion der TNF- α Konzentration um 38 %, M2 um 25 %, (+)-Catechin um 3 %. Dargestellt ist das Ergebnis eines Einzelversuches.

Der Metabolit M1 hatte mit 38.1 % wie im Versuchsansatz zuvor die größte Hemmwirkung auf die Sekretion von TNF- α . Auch der Metabolit M2 zeigte eine deutliche Erniedrigung der TNF- α Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (25.4 %). (+)-Catechin dagegen wies mit 3.5 % nur eine sehr geringe Reduktion von TNF- α im Zellkulturüberstand auf. Dies zeigte, dass durch die Metabolisierung von (+)-Catechin zu δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton eine deutliche Erhöhung der inhibitorischen Aktivität erzielt wurde. Die Methylierung des Dihydroxy-Metaboliten zum Methoxyhydroxy-Metaboliten jedoch bedeutete einen kleinen Aktivitätsverlust.

Die Hemmwirkung von M2 ist zwar immer noch deutlich größer als die seines Vorläufermoleküls, jedoch ist sie geringer als die von M1.

3.2.7.4 TNF- α ELISA der Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol

In diesem Versuchsansatz sollte die *ex vivo* Hemmwirkung von Serumproben der Pycnogenol-Studie nach Mehrfachgabe des Rindenextraktes (siehe Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil) auf die Sekretion von TNF- α in Zellkultur untersucht werden.

Die TNF- α Konzentrationen vor Pycnogenol-Einnahme lagen in einem Bereich von 1224 bis 2971 pg/ml mit einem Mittelwert von 2335 ± 660 pg/ml. Nach Pycnogenol-Einnahme bewegten sich die Werte zwischen 1600 bis 3018 pg/ml mit einem Mittelwert von 2526 ± 565 pg/ml (Abbildung 18 bzw. Tabelle 25, D Tabellarischer Anhang).

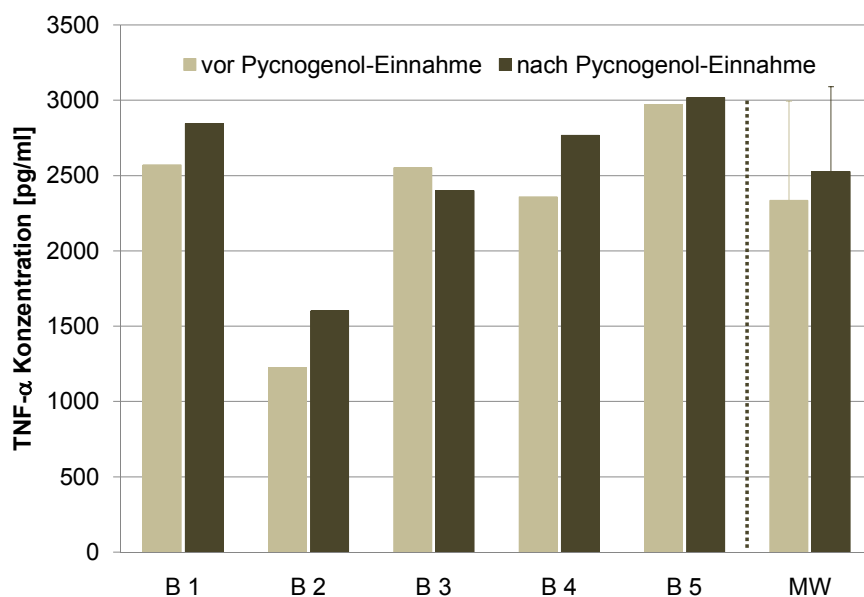


Abbildung 18: TNF- α Konzentrationen der Zellkulturüberstände von humanen Monocyten, die mit den Serumproben der Mehrfachgabe der Pycnogenol-Studie vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden. Dargestellt sind die Konzentrationen vor Einnahme des Extraktes bzw. nach fünftägiger Einnahme von täglich 200 mg Pycnogenol (Probanden bezeichnet mit B1–B5), sowie der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung.

Vier der fünf Serumproben (B1, B2, B4, B5) nach fünftägiger Einnahme von jeweils 200 mg Pycnogenol bewirkten eine Erhöhung der TNF- α Sekretion in den LPS-

stimulierten Monocyten, wobei die prozentuale Zunahme zum Wert vor Pycnogenol-Einnahme 10.6, 30.7, 17.3 bzw. 1.6 % betrug. Lediglich bei einer Serumprobe (B3) war die TNF- α Proteinkonzentration nach Einnahme des Kiefernrintdenextraktes um 6.0 % erniedrigt.

3.2.7.5 TNF- α ELISA der Serumproben nach Einmalgabe von Pycnogenol

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Serumproben von Probanden untersucht, denen vor und nach Einnahme einer einzigen Dosis Pycnogenol in bestimmten Zeitintervallen Blut abgenommen wurde (siehe Abschnitt 1.2.3, C Experimenteller Teil). Da die Serumproben zum Teil stark hämolytisch und daher für das Experiment nicht geeignet waren, wurden bei der Auswertung der Daten nur die nicht-hämolytischen Proben der Probanden C, F, J und L berücksichtigt, für die auch der Nullwert vorlag. Für Proband C standen daher nur die Proben zum Zeitpunkt 0, 0.5, 8 und 14 h, für Proband F nur die Proben zum Zeitpunkt 0, 1, 4, 8 und 14 h, für Proband J nur die Proben zum Zeitpunkt 0, 4 und 10 h und für Proband L nur die Proben zum Zeitpunkt 0, 12 und 14 h zur Verfügung (Abbildung 19 bzw. Tabelle 26, D Tabellarischer Anhang).

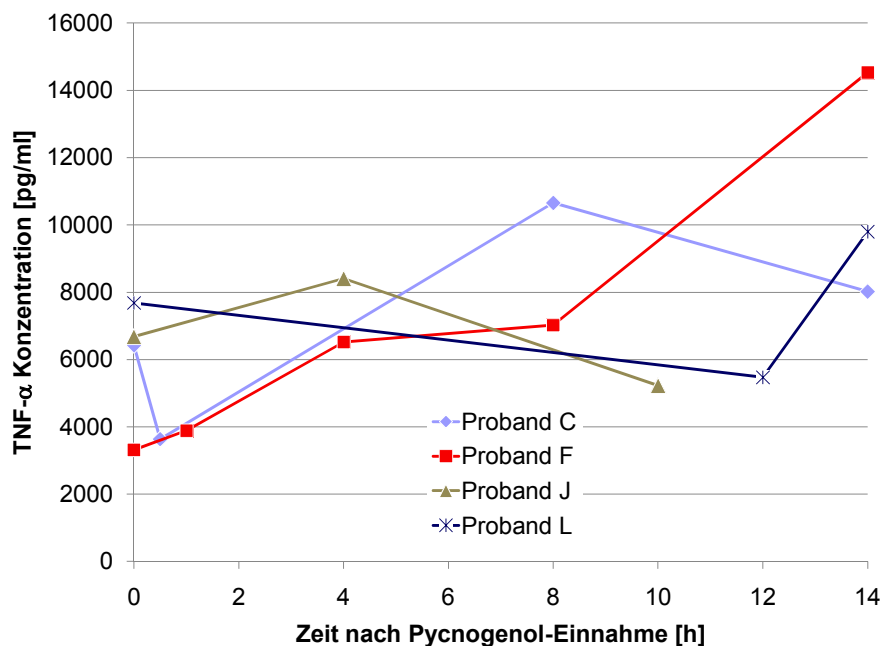


Abbildung 19: TNF- α Konzentrationen der Monocyten-Zellkulturüberstände unter Zusatz der Serumproben der Probanden C, F, J und L nach Einmalgabe von 300 mg Pycnogenol und Blutabnahme zu definierten Zeitpunkten.

Die TNF- α Konzentrationen vor Einnahme von Pycnogenol lagen in einem Bereich von 3311 bis 7683 pg/ml. Zum Zeitpunkt der letzten Blutabnahme (14 h nach Einnahme des Extraktes) lagen die TNF- α Konzentrationen in einem Bereich von 5227 bis 14525 pg/ml, waren also im Vergleich zu den Ausgangswerten erhöht.

Bildet man aus den TNF- α Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt den Mittelwert der untersuchten Proben (vorausgesetzt $n \geq 2$) und trägt die erhaltenen Werte wieder in ein Konzentrations-Zeit-Diagramm ein, erhält man interessanter Weise eine (fast) linear ansteigende Gerade (Korrelationskoeffizient $R^2 = 0.99$) (Abbildung 20 bzw. Tabelle 26, D Tabellarischer Anhang).

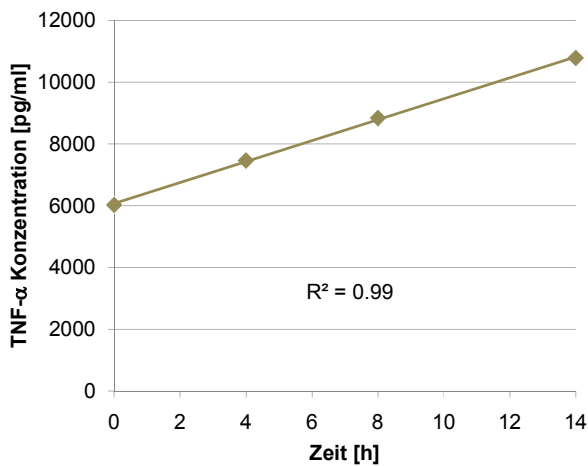


Abbildung 20: Mittelwerte der gemessenen TNF- α Konzentrationen der Proben von Probanden C, F, J, L vor Einnahme des Extraktes, sowie 4, 8 und 14 h nach Einnahme von Pycnogenol (Voraussetzung war, dass mindestens zwei Werte pro Zeitpunkt vorhanden waren).

Die Ergebnisse zeigten, dass mit zunehmender Verweilzeit des Kiefernridenextraktes im humanen Organismus die Konzentration an Substanzen, die die Sekretion von TNF- α aus kultivierten humanen Monocyten beeinflussen, im Serum der Probanden zunimmt. Die gemittelten Werte der TNF- α Konzentrationen von vier Probanden wiesen tendenziell im Mittel einen linearen Anstieg auf, wobei sich die TNF- α Konzentration innerhalb von 14 h von 6025 auf 10781 pg/ml fast verdoppelte. Dies bedeutete, dass TNF- α , ein wichtiges proinflammatorisches Cytokin, nicht wie erwartet durch eine Einmalgabe Pycnogenol gehemmt werden konnte. Der Kiefernridenextrakt schien bei diesem Versuchsansatz keinen inhibierenden Einfluß auf die Sekretion von TNF- α zu besitzen.

Allerdings waren sowohl das Probandenkollektiv ($n = 4$ Probanden) als auch die Probenzahl der einzelnen Personen ($n = 3-5$ Zeitpunkte) zu gering, um aussagekräftige Rückschlüsse ziehen zu können. Da ein Großteil der zu untersuchenden Serumproben hämolytisch war, konnten die Proben der übrigen

Studienteilnehmer nicht im ELISA vermessen werden. Durch die Hämolyse ist die Hämoglobin-Konzentration der Proben erhöht und bewirkt eine Erhöhung der TNF- α Konzentration durch den zusätzlichen pro-inflammatorischen Stimulus.

3.2.8 Diskussion der Ergebnisse des TNF- α ELISA

TNF- α gilt als wichtigster Mediator von Entzündungen und ist ein eindeutiger Faktor bei der Bestimmung von inflammatorischen Prozessen *ex vivo*. Eine fünftägige perorale Einnahme von Pycnogenol, einem potentiell antiinflammatorisch wirkenden Pflanzenextrakt, konnte nicht, wie erwartet, eine Erniedrigung des TNF- α Spiegels im humanen Organismus bewirken. Die durchschnittlich gemessene TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen, die mit den Serumproben nach fünftägiger Einnahme des Extraktes inkubiert wurden, war höher als in jenen Zellkulturüberständen, die mit den Serumproben vor Einnahme des Extraktes inkubiert wurden. Der Sekretionsverlauf der TNF- α Freisetzung aus humanen Monocyten wurde auch nach Gabe einer Einzeldosis Pycnogenol betrachtet. Hierbei zeichnete sich ein konstanter zeitabhängiger Anstieg der TNF- α Konzentration ab. Das heisst, auch hier zeigte sich, dass Monocyten, die mit den Serumproben nach Einnahme des Extraktes inkubiert wurden, höhere TNF- α Konzentrationen sekretieren, als Monocyten, die mit den Serumproben vor Einnahme des Extraktes inkubiert wurden.

Die Arbeitsgruppe von Munoz et al.¹⁶¹ hat Plasmaproben sowie Zellüberstände und Zelllysate frisch isolierter humaner Monocyten auf Cytokine wie TNF- α hin untersucht. Dabei interessierten sie sich für die Fähigkeit dieser Zellen *in vitro* jene Cytokine nach endotoxiner Stimulation bzw. ohne Stimulation freizusetzen. Sie kamen zu dem Schluss, dass die TNF- α Konzentrationen in den Monocyten-Lysaten nicht mit den entsprechenden Spiegeln im Plasma korrelierten. Die Cytokinkonzentrationen im Plasma gesunder Kontrollen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die TNF- α Konzentrationen der Monocyten-Lysate gesunder Probanden lagen bei 50 ± 29 pg/ml, in septischen Patienten betragen sie 625 ± 126 pg/ml. Die Forscher konnten nach Stimulation der Zellen mit LPS eine deutliche Erniedrigung der TNF- α Konzentrationen in den Monocyten-Lysaten in Sepsis-Patienten feststellen (1759 ± 271 pg/ml) im Vergleich zu gesunden Kontrollen

(4852 ± 539 pg/ml). Diese reduzierte *in vitro* Produktion von Cytokinen durch Monocyten war bei Patienten mit Gramnegativ-Infektionen am stärksten ausgeprägt.

Die in den eigenen Untersuchungen gemessenen TNF- α Konzentrationen im Zellüberstand unbehandelter Monocyten lagen durchschnittlich bei 780 pg/ml (Einzelwerte siehe Tabelle 25, D Tabellarischer Anhang) und waren höher als die von Munoz et al.¹⁶¹ gefundenen TNF- α Konzentrationen im Zelllysate kultivierter humaner Monocyten von gesunden Probanden (50 ± 29 pg/ml). Die TNF- α Konzentrationen im Zellüberstand der mit LPS-stimulierten Monocyten betragen in den eigenen Untersuchungen durchschnittlich 2820 pg/ml (Einzelwerte siehe Tabelle 25, D Tabellarischer Anhang) und waren somit geringer als die von Munoz et al.¹⁶¹ gefundenen Konzentrationen von 4852 ± 539 pg/ml im Monocyten-Lysat.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Munoz¹⁶¹ mit den eigenen ist hier nicht möglich. Zum einen unterscheiden sich die untersuchten Proben, denn in den eigenen Untersuchungen wurden die TNF- α Konzentration der Zellüberstände gemessen, das heißt das von den Monocyten sekretierte TNF- α ; im Gegensatz dazu führte Munoz die Bestimmung in den Zelllysaten durch. Zum anderen unterscheiden sich die bei den Versuchen verwendeten Zellzahlen zur Bestimmung der TNF- α Konzentration; in den eigenen Untersuchungen wurden $2.5 \cdot 10^5$ Monocyten verwendet, Munoz arbeitete mit der doppelten Menge ($5 \cdot 10^5$ Monocyten). Allerdings ist sowohl bei den eigenen Experimenten wie auch bei denen von Munoz¹⁶¹ erwartungsgemäß ein klarer Trend zu höheren TNF- α Konzentrationen nach LPS-Stimulation zu erkennen.

Das gleiche Fazit lässt sich auch beim Vergleich der Werte der Untersuchung nach Vorinkubation der Monocyten mit TNF- α (Abschnitt 3.2.7.3) und den Ergebnissen der septischen Patienten im Artikel von Munoz et al.¹⁶¹ ziehen. Die Monocyten der eigenen Experimente sekretierten wieder tendenziell höhere TNF- α Konzentrationen (ca. 3500 pg/ml ohne bzw. 11000 pg/ml nach LPS-Stimulation) als die Monocyten-Lysate septischer Patienten enthielten (625 ± 126 pg/ml ohne bzw. 1759 ± 271 pg/ml nach LPS-Stimulation)¹⁶¹, jedoch ist eine Zunahme der TNF- α Konzentrationen nach LPS-Reizung in beiden Fällen zu beobachten. Darüber hinaus kann festgestellt werden, dass der durch TNF- α Zugabe simulierte inflammatorische Zustand in den eigenen Untersuchungen wie erwartet höhere TNF- α Spiegel im Zellüberstand aufwies, vergleichbar mit den von Munoz et al.¹⁶¹ gefundenen höheren

TNF- α Konzentrationen in Zelllysaten septischer Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden.

Wie bereits im Abschnitt 3.2.5 dargelegt wurde, konnten Ma¹⁷⁴ sowie Yang¹⁶² bei ihren Studien zeigen, dass phenolische Antioxidantien die Endotoxin-induzierte Produktion von TNF- α in einer zeit- und dosisabhängigen Weise inhibieren. Die eigenen *in vitro* Untersuchungen mit den Metaboliten M1 und M2, sowie dem Vorläufermolekül (+)-Catechin ergaben ebenfalls eine zeitabhängige Hemmung der TNF- α Sekretion, die insbesondere nach 48 h für alle drei Testsubstanzen bei etwa 50 % lag. Bei Betrachtung der Sekretionsverläufe dieser *in vitro* Hemmversuche zeigte sich, dass die TNF- α Konzentrationen zunächst rasch anstiegen, bis sie nach etwa 4–8 h ein Maximum erreichten. Danach sank der TNF- α Spiegel wieder langsam ab.

Die Arbeitsgruppe von Park et al.¹⁸² untersuchte den Effekt von Flavonoiden (Monomere: Catechin, Epicatechin und Taxifolin; Dimere: Procyanidin B1 und B2; Trimere: Procyanidin C2) sowie Pycnogenol auf die NO-Produktion, TNF- α Sekretion und NF κ B Aktivität. Monomere und Dimere unterdrückten die NO-Produktion, TNF- α Sekretion und NF κ B-abhängige Genexpression, induziert durch Interferon γ , wohingegen das trimere Procyanidin C2 und Pycnogenol diese Parameter verstärkten. Unstimulierte Makrophagen sekretierten nur geringe Mengen an TNF- α ins Medium. Bei Vorbehandlung mit Pycnogenol stiegen die TNF- α Spiegel signifikant an. Die Stimulation von RAW 264.7 Zellen mit Interferon γ führte zu einem vielfachen Anstieg der TNF- α Sekretion 24 h nach Vorinkubation mit dem Extrakt. Catechin, Epicatechin und Taxifolin erniedrigten die TNF- α Sekretion fast zum basalen Wert (\sim 0.5 ng/ml). Pycnogenol hingegen verstärkte den Effekt von Interferon γ auf die TNF- α Sekretion (\sim 6 ng/ml). In unstimulierten RAW 264.7 Makrophagen erhöhten Procyanidin C2 und Pycnogenol die TNF- α Sekretion in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise.

Park¹⁸² kam bei seinen Untersuchungen mit dem Kiefernrendenextrakt und den monomeren Bestandteilen zu vergleichbaren Ergebnissen wie in den eigenen Untersuchungen. Die Vorbehandlung der Zellen mit Catechin bewirkte eine Reduktion der TNF- α Sekretion. Der beobachtete Effekt von Catechin in den eigenen Versuchen (Abnahme der TNF- α Konzentration um 3 %) war nicht so ausgeprägt wie bei Park (Abnahme bis fast auf basales Niveau), allerdings setzte Park die Substanz

in einer extrem hohen Konzentration von 344 μM ein, die im humanen Organismus vermutlich niemals erreicht werden könnte, wohingegen bei den eigenen Experimenten nur eine Konzentration von 0.5 μM verwendet wurde. Des Weiteren bestätigen die *in vitro* Ergebnisse von Park¹⁸² mit Pycnogenol die beobachteten Effekte des Kiefernextraktes in den eigenen *ex vivo* Untersuchungen in den mit Serumproben behandelten Monocyten (Abschnitt 3.2.7.4 und 3.2.7.5). Der Gesamtextrakt bewirkte ganz im Gegensatz zu seinen monomeren Bestandteilen eine Steigerung der TNF- α Sekretion. Die gleichen Effekte beobachtete Park¹⁸² auch auf die NF κ B-abhängige Genexpression; monomere Flavonoide bewirkten eine Reduktion, Pycnogenol hingegen eine Stimulation. Die zugrundeliegenden Mechanismen der durch die verschiedenen Flavonoide bewirkten Effekte auf die TNF- α Sekretion sind noch unklar, allerdings konnte gezeigt werden, dass sie zum Teil auf die Aktivierung bzw. Hemmung von NF κ B zurückzuführen sind.

Bisher konnte noch kein *second messenger* in der inflammatorischen Signalkaskade identifiziert werden, der in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B involviert ist, aber es ist erwiesen, dass viele NF κ B-aktivierenden Signale durch Antioxidantien inhibiert werden.^{183,184} In den eigenen Untersuchungen (Abschnitt 2.2 und 2.3) konnte gezeigt werden, dass monomere Bestandteile von Pycnogenol wie (-)-Epicatechin, Gallussäure und Protocatechusäure effektive Radikalfänger und Wasserstoff-Donoren sind, wohingegen der Gesamtextrakt nur geringe antioxidative Aktivität in den *in vitro* Assays zeigte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Grad der Polymerisation der Flavonoide einen wichtigen Einfluss auf den Mechanismus besitzen, durch den die Substanzen ihre immunologische und antiinflammatorische Aktivität ausüben.

Die *in vitro* Untersuchungen mit den Metaboliten M1 und M2 sowie deren Vorläufermolekül (+)-Catechin zeigten zwar eine Hemmung der TNF- α Sekretion aus LPS-stimulierten Monocyten, jedoch konnten diese Ergebnisse nicht in den *ex vivo* Untersuchungen mit den Serumproben bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass nach peroraler Einnahme von Pycnogenol keine ausreichenden Konzentrationen an potentiell inhibitorischen Substanzen im Blut vorlagen, die eine Hemmung der TNF- α Sekretion hätten bewirken können.

Eine leichte Stimulation der TNF- α Sekretion könnte möglicherweise auch positive Bedeutung besitzen im Hinblick auf eine Stimulation des Immunsystems. Cytokine wie TNF- α bedingen in der frühen Phase von Entzündungen eine große

Breite an Reaktionen: sie modulieren die Aktivität und Funktion anderer Zellen, um die inflammatorische Antwort zu koordinieren und kontrollieren; sie mobilisieren und aktivieren Leukocyten; sie verbessern die Proliferation von B- und T-Zellen und sind somit z.B. involviert in der biologischen Reaktion auf Endotoxine; und sie stimulieren die Produktion von NO, das in geringen Mengen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des ruhenden Muskeltonus, Vasodilation und Hemmung der Thrombocytenaggregation spielt.^{185,186} Somit könnte eine kontrollierte Stimulation von TNF- α auch einen positiven Effekt bei der Erhaltung bzw. Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichts im humanen Organismus darstellen.

3.3 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 *ex vivo*

Wie schon erwähnt (Abschnitt 3.1), können chronisch erhöhte Glucosespiegel, wie sie bei Diabetes mellitus Typ 2 vorkommen, durch Stimulation der mitochondrialen Produktion von freien Sauerstoffradikalen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führen, wodurch die Induktion von Cyclooxygenase 2 und die Synthese von Prostaglandin (PG) E₂ ausgelöst wird. Diese Signalkaskade ist bei der Pathogenese von einigen Folgeerkrankungen, wie z.B. diabetischer Nephropathie und Retinopathie, involviert.¹⁵⁸ Im Gegensatz dazu wird die COX-1 Isoform hiervon nicht beeinflusst.

Antiinflammatorische Agenzien werden seit Jahrhunderten zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt, aber erst in den letzten Jahrzehnten hat die Medizin Einblick gewonnen in die komplexen biologischen Aufgaben der primären Mediatoren der Inflammation, den sogenannten Eicosanoiden und ihren Derivaten. Ein detailliertes Verständnis der Prostaglandine und Leukotriene bildet das Grundgerüst für die Behandlung von Schmerz, Entzündung und Fieber mit Medikamenten wie Acetylsalicylsäure und anderen NSAIDs (engl.: *nonsteroidal antiinflammatory drugs*). Allerdings werden diesen Agenzien auch zahlreiche unerwünschte Nebeneffekte zugeschrieben.¹⁸⁷

Die Hemmwirkung verschiedener Flavonoidderivate auf Arachidonsäure-metabolisierende Enzyme wurde zum ersten Mal 1980 berichtet. Danach haben zahlreiche Forscher die Wirkung von Flavonoiden auf diese Enzyme untersucht. Arachidonsäure, ein Vorläufer der Eicosanoide wird meist von den Membranlipiden in Zellen freigesetzt.¹⁸⁸ Einige Flavonoide wie Luteolin, 3',4'-Dihydroxyflavon, Galangin und Morin gelten als die ersten Inhibitoren der Cyclooxygenase.¹⁸⁸

In vivo Studien haben gezeigt, dass Pycnogenol inflammatorische Symptome verbessern kann, jedoch ist bisher wenig über die pharmakologischen Hintergründe dieser beobachteten Effekte bekannt. Ziel der folgenden Untersuchung war es, herauszufinden, ob durch perorale Einnahme von Pycnogenol eine ausreichende *in vivo* Konzentration an bioaktiven Verbindungen im Blut erreicht werden kann, die eine Hemmung der Aktivität von Cyclooxygenase (COX) -1 und -2 bewirkt.

3.3.1 Die Arachidonsäurekaskade – Mechanismus der Enzymkatalyse

Die Wirkung der COX-Enzyme besteht in der Umwandlung von Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandinen (PGs) und Thromboxanen (TXs) (Abbildung 21).

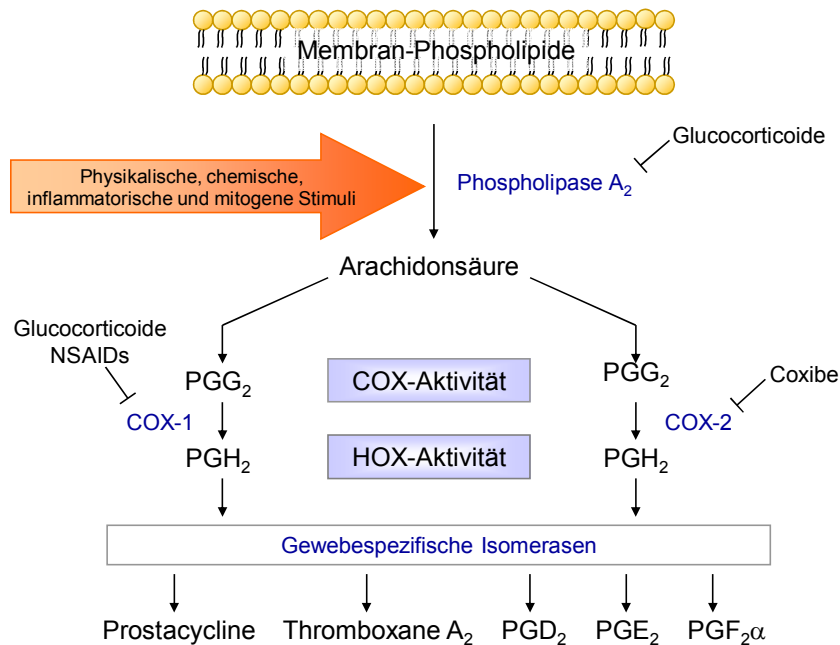


Abbildung 21: Umwandlung von Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandinen und Thromboxanen. Unspezifische physikalische und chemische Stimuli mobilisieren die Freisetzung von AA von Membranphospholipiden. Cyclooxygenase (COX) und Hydroperoxidase (HOX) Enzyme katalysieren die Bildung von Prostaglandin-Endoperoxiden, die dann weiter metabolisiert werden durch gewebespezifische Isomerasen und Synthesen. Die biosynthetische Reaktionskaskade kann an verschiedenen Stellen durch Glucocorticoide, NSAIDs oder spezifische COX-Inhibitoren unterbrochen werden.

Der erste Schritt bei der Biosynthese der Prostaglandine ist die Freisetzung von Arachidonsäure von den Phospholipiden der Zellmembran katalysiert durch Phospholipase A₂. Der folgende entscheidende Schritt ist die Biotransformation von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase-Enzyme.

Bei der Enzymkatalyse wird ein Ringschluss zwischen den Kohlenstoffatomen C₈ und C₁₂ erreicht, sowie zwei Sauerstoffatome an C₉ und C₁₁ eingefügt, die anschließend eine kovalent Bindung miteinander eingehen, wobei eine Epoxidstruktur entsteht (Abbildung 22).

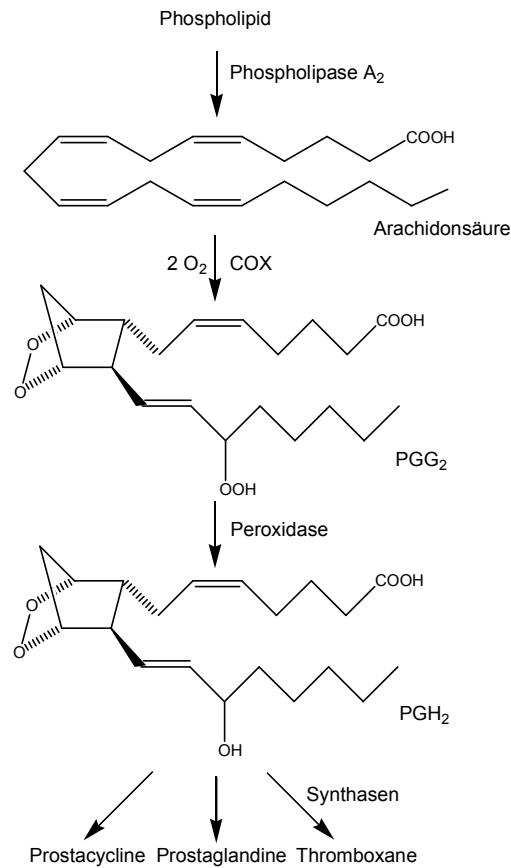


Abbildung 22: Arachidonsäurekaskade; Mechanismus der sogenannten COX-Reaktion. Zwischen den Kohlenstoffatomen C₈ und C₁₂ wird ein Ringschluß erreicht, sowie zwei Sauerstoffatome an C₉ und C₁₁ eingefügt, die anschließend eine kovalent Bindung miteinander eingehen, wobei eine Epoxidstruktur entsteht.

Der erste Schritt findet im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase statt und involviert die Addition eines O₂-Moleküls an C₁₁ und C₁₅ (Oxidation von AA), wodurch ein cyclisches Peroxiderivat (PGG₂) entsteht. Da dies in der Cyclisierung der Fettsäure resultiert, bezeichnet man dies als Cyclooxygenase-Aktivität. Das instabile PGG₂ diffundiert anschließend sofort zum Peroxidasezentrum, welches an der gegenüberliegenden Seite des Enzyms liegt. Die 15-Hydroperoxygruppe von PGG₂ wird dort zu einem Alkohol reduziert und bildet durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms Prostaglandin H₂ (PGH₂). Dieses kann durch verschiedene andere Enzyme zu unterschiedlichen Substanzen wie Thromboxanen (TXA₂, TXB₂), Prostaglandinen (PGE₂, PGF_{2a}, PGD₂) sowie Prostacyclin (PGI₂) durch spezifische zelluläre Synthasen und Isomerasen umgewandelt werden.

Diese Produkte wirken gefäßerweiternd (PGE₂, PGI₂) oder -verengend (TXA₂, TXB₂), schmerzauslösend, entzündungsfördernd (PGD₂) und stimulierend oder

inhibierend auf die Thrombocytenaggregation (TXA₂ und TXB₂ bzw. PGI₂). Weitere Wirkungen betreffen unter anderem den Schutz der Magenschleimhaut vor der Magensäure, die Entstehung von Fieber, die Regulation des Blutdrucks und der Nierenfunktion. Außerdem wirken sie auch als Transmitter im Zentralnervensystem.¹⁸⁷

3.3.2 Funktionen der Cyclooxygenase-Enzyme

Kleine Unterschiede in der Struktur der beiden COX-Isoformen führen zu ihren wichtigen biologischen und pharmakologisch nutzbaren Unterschieden. COX-1 wird als konstitutiv, COX-2 als induzierbar bezeichnet.¹⁸⁹ Die meisten bekannten Stimuli, die COX-2 induzieren, sind jene, die mit Entzündungen assoziiert werden, z.B. bakterielles Lipopolysaccharid und Cytokine wie Interleukin IL-1, IL-2 und TNF- α . Die positiven antiinflammatorischen und analgetischen Wirkungen der Cytokine IL-4, IL-10 und IL-13 sowie der Corticosteroide basieren auf der Hemmung der Induktion von COX-2. Die physiologische Rolle von COX-1 wurde von den unerwünschten Nebeneffekten der NSAIDs hergeleitet, die, während sie die Prostaglandin-Biosynthese an Stellen von Entzündungen hemmen, auch die konstitutive Biosynthese inhibieren. So führt die kontinuierliche Hemmung von COX-1 zu gastrointestinaler Toxizität, Blutungen und Magengeschwüren.^{187,190}

3.3.2.1 Gemeinsamkeiten der COX-Enzyme

COX-Enzyme, sogenannte Prostaglandin H Synthasen oder Prostaglandin Endoperoxid-Synthasen, katalysieren die geschwindigkeitsbestimmenden ersten beiden Schritte der Biosynthese von Prostaglandinen (PG) und Thromboxanen (TX) aus Arachidonsäure.^{187,191} 1972 haben Flower und Vane¹⁹² die Hypothese aufgestellt, dass mehr als ein Isoenzym von COX existiert. Dies konnte erst 1991 von Xie et al.¹⁹³ definitiv bewiesen werden. Seit 2002 wird die Existenz einer dritten Variante heftig diskutiert.¹¹

COX-1 und COX-2 sind Isoenzyme und somit genetisch unabhängige Proteine. Die Gene der beiden Enzyme sind beim Menschen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und zeigen verschiedene Eigenschaften. Das Gen für COX-1 ist auf Chromosom 9 lokalisiert, COX-2 wird durch ein Gen auf Chromosom 1

codiert. Die COX-Isoenzyme sind membrangebundene Enzyme im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Posttranslationale Modifikation, Bindungsbruch des Signalpeptids und Insertion in die Membran des ER produzieren das ausgereifte, glycosylierte COX-Protein. Das Molekulargewicht von COX-1 beträgt 67 kDa, das von COX-2 72 kDa.¹⁹⁰

3.3.2.2 Cyclooxygenase-1

Cyclooxygenase-1 wurde 1976 zum ersten Mal aufgereinigt und charakterisiert; 1988 wurde das Gen dann lokalisiert und kloniert.¹⁸⁹

COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert, obgleich in verschiedenen Konzentrationen und nicht unbedingt in allen Zellen eines bestimmten Gewebes. Es wird von Hormonsignalen reguliert, die bei der physiologischen Homöostase involviert sind. Es ist verantwortlich für die sogenannten *housekeeping*-Funktionen des Enzyms, das heißt für den Erhalt normaler physiologischer Funktionen. Seine Aktivität sorgt für die Produktion cytoprotektiver Prostaglandine und Thromboxane.¹⁸⁷ So wird COX-1 z.B. im Magen konstitutiv exprimiert, wo es am Schutz und der Reparatur der Mucosa beteiligt ist.¹⁸⁷ Außerdem beeinflusst es den renalen Blutfluss und die Thrombocytenaggregation.¹⁹⁰

3.3.2.3 Cyclooxygenase-2

Die Entdeckung und Klonierung des zweiten COX-Isoenzym, Cyclooxygenase-2, 1991 initiierte eine Revolution im Verständnis von Prostaglandinen und ihrer Funktion sowohl in normaler Physiologie wie auch in Krankheit.¹⁸⁹

Im Gegensatz zu COX-1 wird COX-2 in den meisten Geweben nicht permanent exprimiert. Eine Ausnahme stellen Gehirn und Niere dar, in denen COX-2 auch konstitutiv vorkommen kann.¹⁸⁷ Die Expression und Aktivität von COX-2 kann *in vitro* durch proinflammatorische Agenzien wie Lipopolysaccharid induziert werden. *In vivo* z.B. in Makrophagen, Endothelzellen und Mastzellen gelten eine Vielzahl von extra- und intrazellulären Stimuli wie proinflammatorische Cytokine (IL-1 β , TNF- α), Mitogene und Oncogene (Phorbolester) sowie Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor*, FGF; *platelet derived growth factor*, PDGF; *epidermal growth factor*, EGF) als Induktoren von Entzündungen.^{187,190}

Von COX-2 produzierte Prostaglandine werden oft als unerwünscht angesehen, da sie hauptsächlich an Stellen von Entzündungen (akut und chronisch) gefunden werden und inflammatorische Prozesse triggern, daran teilhaben oder verschlechtern können.¹⁵⁰ Eine selektive COX-2 Hemmung würde demzufolge eine Vermeidung der gastrointestinalen Nebenwirkungen bedeuten.

3.3.2.4 Cyclooxygenase-3

2002 haben Forscher der Brigham Young Universität in einem Artikel verkündet, eine neue Isoform, das COX-3, identifiziert zu haben. Diese Entdeckung wurde später von anderen Forschern bestätigt.^{194,195}

Untersuchungen belegen, dass es sich bei dem kürzlich entdeckten Subtyp COX-3 um eine Variante der COX-1 Isoform handelt, die ähnlich wie COX-1 konstitutiv exprimiert wird. Die COX-3 mRNA wird vor allem im cerebralen Cortex gefunden. Das COX-3 Protein konnte immunologisch als 65 kDa-Protein in der humanen Aorta nachgewiesen werden. Da COX-3 durch Paracetamol gehemmt werden kann, wird es somit als biologische Zielstruktur für zentral wirksame Anilid-NSAIDs betrachtet. Die genaue physiologische Funktion ist bisher noch nicht bekannt. Man weiß lediglich, dass die Aktivität dieses Enzyms nur ein Viertel so groß ist wie die von COX-1.

3.3.3 Molekulare Grundlagen und Struktur der COX-Proteine

Bei den COX-Enzymen handelt sich um homodimere, hämhaltige, glycosylierte Proteine mit zwei aktiven Zentren. COX-1 und COX-2 stimmen zu etwa 65 % in ihrer Aminosäuresequenz überein, wobei COX-1 599 Aminosäuren umfasst und COX-2 604. Die letzten beiden Aminosäuren im C-Terminus beider Enzyme sind identisch. Die dreidimensionalen Strukturen der COX-Enzyme sind sich erstaunlich ähnlich und auch die aktiven Zentren der Isoenzyme besitzen ähnliche Strukturen, so dass sie sich in ihrer enzymatischen Aktivität kaum unterscheiden.

Beide Isoenzyme sind integrale Membranproteine, verfügen jedoch über keine Transmembraneinheiten. Sie besitzen einen langen, engen Kanal mit einer Haarnadelschleife an einem Ende und einer hydrophoben Öffnung am anderen Ende. Die Aminosäuren in dieser Region sind fast identisch. Jedoch führen drei

Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu einem größeren und zugänglicheren aktiven Zentrum in COX-2. Im Inneren des hydrophoben Kanals bewirkt die Substitution von Isoleucin in COX-1 durch ein Valin in COX-2 in Position 523 des Enzyms die Bildung einer Seitentasche, die selektiv die Bindung von bestimmten Substraten erlaubt und die Hemmung des Enzym bewirken kann.¹⁸⁷

Reguläre NSAIDs inhibieren beide Isoformen durch Bindung an das polare Arginin in Position 120 durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Blockierung des COX-Enzym-Kanals etwa bei der Hälfte.

3.3.4 Bedeutung der durch COX generierten Prostaglandine

Die außergewöhnlichen Effekte der Prostaglandine umfassen ihre cytoprotektiven Eigenschaften im gastrointestinalen Trakt und die Kontrolle der renalen Funktion der Niere. PGE₂ ist das wichtigste Prostaglandin, das die typischen Symptome einer Entzündung induziert. Dilatation von kleinen Blutgefäßen führt zur Entstehung von Rötung (*rubor*) und Hitze (*calor*); der Anstieg der vaskulären Permeabilität bewirkt die charakteristische Schwellung des Gewebes (*tumor*). Darüber hinaus sensitivieren PGs Nervenenden und Nociceptoren, um Schmerzsignale ans Gehirn und das Rückenmark zu übermitteln (*dolor*).¹⁹⁰ Außerdem gilt PGE₂ als potenter Inhibitor der Glucose-induzierten Insulinsekretion (*functio laesa*).¹⁹⁶ Prostaglandin PGF_{2α} ist ein weiteres überaus wichtiges Prostaglandin, das in Entzündungsarealen gebildet wird.¹⁵⁹

3.3.5 COX-Inhibitoren

1971 hat Vane gezeigt, dass eine Reihe von NSAIDs, zu denen Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin) gehört, die Cyclooxygenase-Enzyme inhibieren können.^{187,197} ASS modifiziert die COX-Enzyme kovalent, sodass die Cyclooxygenase-Aktivität irreversibel gehemmt wird. In COX-1 acetyliert Aspirin das Serin der Position 530, bei COX-2 ist es das Serin 516, wodurch es die Annäherung von Fettsäuresubstraten ans aktive Zentrum blockiert. Obwohl Acetylsalicylsäure beide Isoformen acetyliert, ist es 10–100 mal potenter gegenüber der COX-1 Isoform als gegenüber der COX-2 Isoform.¹⁸⁷

Alle klassischen NSAIDs inhibieren sowohl COX-1 als auch COX-2 in regulären antiinflammatorischen Dosen.¹⁹⁰ Die NSAIDs binden im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase ohne die Peroxidaseaktivität wesentlich zu beeinflussen. Selektive Hemmstoffe von COX-2 bilden stabile, nur langsam wieder dissoziierende Komplexe mit diesem Isoenzym, während die Bindung an COX-1 meist kompetitiv und leicht reversibel ist. Der feste Bindungsmodus wird auch als zeitabhängiger Bindungsmodus bezeichnet. Unselektive Inhibitoren der Cyclooxygenasen binden meist beide Isoenzyme in einem zeitabhängigen Modus.

Neben der gastrointestinalen Toxizität aufgrund der Hemmung von COX-1 (siehe Abschnitt 3.3.2) besteht auch ein erhöhtes kardiovaskuläre Risiko. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass hoch selektive COX-2 Inhibitoren, die zwar eine Reduktion von Entzündung und Schmerz bewirken können, vermutlich durch Bildung von Thromboxanen via COX-1 Katalyse einen negativen Effekt auf das kardiovaskuläre System bewirken.¹⁵⁰

3.3.6 Klassifizierung der COX Inhibitoren

Biochemische, pharmakologische und klinische Studien haben zur Einteilung der COX Inhibitoren in folgende vier Kategorien geführt:¹⁹⁸

1. Selektive COX-1 Inhibitoren. Diese Agenzien zielen auf die COX-1 Aktivität ab ohne einen messbaren Effekt auf die COX-2 Aktivität auszuüben. Hierzu gehört Acetylsalicylsäure, das eine kovalente Modifikation im aktiven Zentrum von COX-1 bewirkt.
2. Unselektive COX Inhibitoren. Diese Substanzen weisen keine bedeutenden biologischen oder klinischen Unterschiede in der Hemmung der COX-1 und COX-2 Aktivität auf. Hierzu gehören die NSAIDs Ibuprofen, das eine reversible, kompetitive Hemmung bewirkt, und Indomethacin, das eine langsame, zeitabhängige Hemmung veranlasst.
3. Unselektive COX-2 Inhibitoren. Diese Gruppe von Medikamenten besitzt analgetische oder antiinflammatorische Aktivitäten bei Dosierungen, die eine Hemmung von COX-2 bewirken, aber nur eine

geringe Wirkung auf COX-1 haben. In biochemischen Assays weisen diese Agenzien generell eine 2- bis 100-fach stärkere *in vitro* Hemmwirkung von COX-2 auf. In diese Kategorie fallen Meloxicam und Nimesulid.

4. Selektive COX-2 Inhibitoren. Diese Agenzien inhibieren die COX-2 Isoform, haben aber über den gesamte Bereich der therapeutischen Serum-konzentrationen keinen Effekt auf COX-1. Biochemische Assays zeigen generell eine mehr als 100-fache Differenz der benötigten Konzentration zur Hemmung von COX-2 gegenüber COX-1. Celecoxib und Rofecoxib sind zwei dieser Medikamente, die eine zeitabhängige Hemmung verursachen.

3.3.7 Prinzip des COX-Assays

Zur Bestimmung der Hemmung der Aktivität von COX-1 und COX-2 durch Serumbestandteile gewonnen nach peroraler Einnahme von Pycnogenol wurde der COX Inhibitor Screening Assay Kit der Firma Cayman Chemicals verwendet. Der Test beruht auf dem Kompetitionsprinzip, bei dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ und ein $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Acetylcholinesterase (AChE-) Konjugat um eine begrenzte Menge eines monoklonalen Antikörpers gegen $\text{PGF}_{2\alpha}$ konkurrieren. Das $\text{PGF}_{2\alpha}$ wird dabei durch SnCl_2 -Reduktion des COX-Produktes PGH_2 gebildet. Da die Menge an Konjugat konstant gehalten wird, während die Menge an $\text{PGF}_{2\alpha}$ variiert, ist die Menge des gebundenen Konjugats indirekt proportional zur Menge an $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Der Antikörper- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Komplex bindet an ein am Boden der Vertiefungen (*wells*) einer 96-Lochplatte fixiertes Immunglobulin. Nach dem Waschen der Platte wird Ellmans Reagenz zugesetzt, welches das AChE-Substrat Acetylthiocholin enthält. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, Thiocholin, reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (Abbildung 23), die photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert wird.

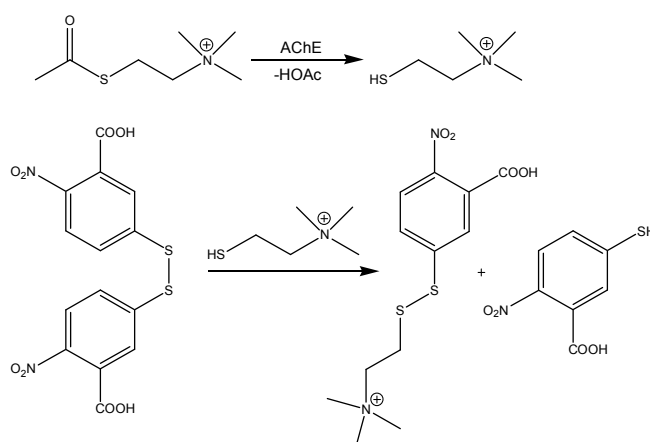


Abbildung 23: Bildung von 5-Thio-2-nitrobenzoesäure aus 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure und Thiocholin, das nach enzymatischer Reaktion aus Acetylthiocholin entsteht.

3.3.8 Ergebnisse der Untersuchungen der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 *ex vivo*

3.3.8.1 Auswirkungen der wiederholten Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität *ex vivo*

In diesem Versuchsansatz sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die wiederholte Einnahme von Pycnogenol auf die Aktivität von COX-1 und COX-2 hat. Hierzu wurden die Serumproben der Studienteilnehmer, die fünf Tage lang den Rindenextrakt eingenommen haben (siehe Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil), *in vitro* mit den COX-Enzymen inkubiert und die Hemmung der COX-Aktivität beobachtet.

Die dabei mit COX-1 durchschnittlich gebildete Prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ -Konzentration der Proben vor Pycnogenol-Gabe betrug 315 ± 122 ng/ml (Einzelwerte siehe Tabelle 27, D Tabellarischer Anhang). Bei den Proben nach Einnahme des Extraktes war die Konzentration leicht gesunken auf 243 ± 76 ng/ml. Bei den Experimenten mit COX-2 wurden generell höhere Werte (etwa um den Faktor zehn erhöht) erreicht, was darauf schließen lässt, dass die enzymatische Aktivität von COX-2 weniger durch Bestandteile oder Metabolite von Pycnogenol beeinflusst wird. Die durchschnittlich gebildete $PGF_{2\alpha}$ -Konzentration lag für die Proben vor Extrakt-Gabe bei 3761 ± 4750 ng/ml. Für die Proben nach Einnahme von Pycnogenol war die Konzentration erniedrigt und betrug 2021 ± 1378 ng/ml. Diese Werte dienen

dann als Grundlage zur Berechnung der Hemmung der COX-Aktivität in Prozent (Abbildung 24 und Tabelle 28, D Tabellarischer Anhang).

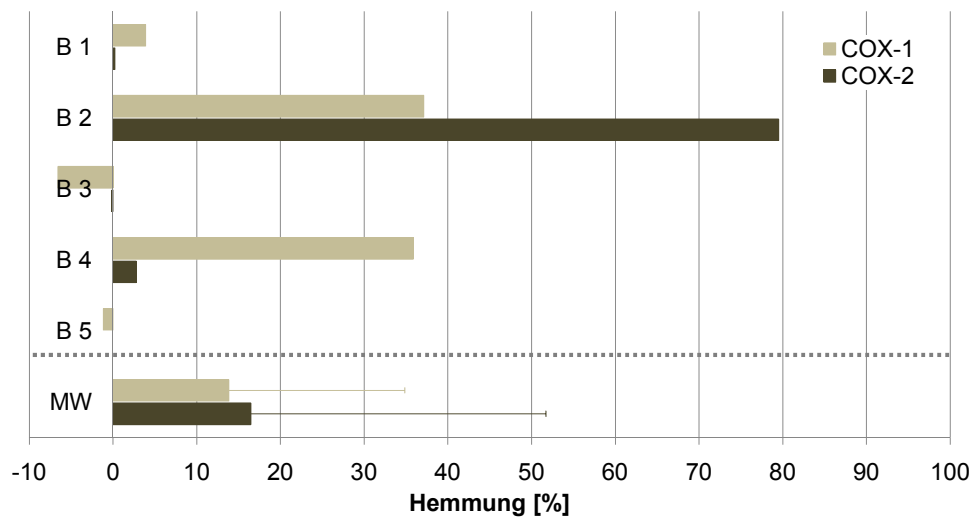


Abbildung 24: Zunahme der Hemmung der enzymatischen Aktivität von COX-1 und COX-2 durch Serumproben von fünf Probanden (B1–B5), die fünf Tage lang 200 mg Pycnogenol eingenommen haben. Dargestellt ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung der berechneten Hemmwirkungen auf jedes Enzym (COX-1: 13.83 ± 21.03 %; COX-2: 16.47 ± 35.25 %). Die Zunahme der Hemmaktivität gegenüber COX-1 wurde bei drei Probanden festgestellt, gegenüber COX-2 war sie bei zwei Probanden zu verzeichnen. Die Mittelwerte waren nicht statistisch signifikant verschieden (Wilcoxon matched pairs signed rank test).

Nach wiederholter Einnahme von 200 mg Pycnogenol über einen Zeitraum von fünf Tagen zeigten die Serumproben der Studienteilnehmer einen moderaten inhibitorischen Effekt auf die Cyclooxygenase-Aktivität gegenüber Proben vor Einnahme des Extraktes. Bei drei von fünf Probanden (B1, B2, B4) konnte eine Erniedrigung der Prostaglandinkonzentration und somit eine Hemmung von COX-1 verzeichnet werden. Die durchschnittliche Zunahme der COX-Hemmung nach Pycnogenol-Gabe lag bei 13.83 ± 21.03 %; sie war nicht statistisch signifikant (Wilcoxon matched pairs signed rank test). Wie aus der Graphik zu erkennen ist, machten sich starke interindividuelle Schwankungen bei den diversen Probanden bemerkbar. Eine Zunahme der Hemmung von COX-2 war nach Inkubation mit Serum von zwei von fünf Probanden (B2, B4) nach Pycnogenol-Gabe zu erkennen; das Serum eines weiteren Studienteilnehmer lies den Prostaglandinspiegel unverändert (B5). Durchschnittlich lag die Zunahme der COX-2 Hemmung nach Inkubation mit

Serum, das nach Einnahme des Rindenextraktes gewonnen wurde, bei 16.47 ± 35.25 % (nicht statistisch signifikant; Wilcoxon matched pairs signed rank test). Auch hier waren die interindividuellen Unterschiede ausgeprägt.

Aus diesen Werten ließ sich dann das Verhältnis der Hemmung (*ratio*) von COX-2 zu COX-1 berechnet (Berechnung siehe Abschnitt 8.7, C Experimenteller Teil), das eine Aussage über die Selektivität der absorbierten Bestandteile und Metabolite des Kiefernridenextraktes bezüglich der Hemmwirkung auf die beiden Isoformen des COX-Enzyms macht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verhältnis (*ratio*) der Hemmung von COX-2 zu COX-1 basierend auf den $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen, die nach Inkubation der Enzyme mit den Serumproben vor bzw. nach Pycnogenol-Gabe *in vitro* gebildet wurden. Ebenfalls angegeben ist der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (STABW).

| Proband | <i>ratio</i> COX-2/COX-1 | |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | vor Pyc-Einnahme | nach Pyc-Einnahme |
| B 1 | 4.73 | 12.85 |
| B 2 | 35.87 | 8.28 |
| B 3 | 7.35 | 6.27 |
| B 4 | 3.00 | 3.61 |
| B 5 | 9.92 | 9.64 |
| MW \pm STABW | 12.17 \pm 13.50 | 8.13 \pm 3.48 |

Die berechneten *ratio*-Werte lagen für alle Probanden über 1, wobei der Mittelwert 8.13 ± 3.48 betrug. Dies beschreibt eine unselektive Hemmung beider COX-Enzyme, die mit derjenigen der klassischen NSAIDs Diclofenac (*ratio* 5.1), Piroxicam (*ratio* 8.2) und Flurbiprofen (*ratio* 11.2) vergleichbar ist.¹⁹⁹ Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass nach Einnahme des Kiefernridenextraktes biologisch aktive Verbindungen und/oder Metabolite im Serum einiger Probanden vorhanden waren, die eine Hemmung von COX-1 und COX-2 bewirkten. Dies sollte in einem weiteren Versuchsansatz mit einer größeren Probandenzahl verifiziert werden.

3.3.8.2 Auswirkungen der einmaligen Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität *ex vivo*

Zunächst wurden die Serumproben der Einmalgabe von Pycnogenol (siehe Abschnitt 1.2.3, C Experimenteller Teil) eines einzelnen Probanden (Proband U) auf ihre

frühest eintretende inhibitorische Wirkung hin untersucht. Bereits nach 30 min konnte hier ein Hemmeffekt auf die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenase-Enzyme beobachtet werden. Anschließend wurden die Serumproben aller Probanden zum Zeitpunkt 30 min nach Pycnogenol-Gabe auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht. Auch hier traten starke interindividuelle Schwankungen auf.

Die durchschnittliche $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration bei den Hemmversuchen mit COX-1 vor Pycnogenol-Gabe betrug 305 ± 135 ng/ml. 30 min nach Einnahme des Extraktes war die Konzentration leicht gesunken auf 253 ± 122 ng/ml. Bei den Experimenten mit COX-2 wurden wie auch im vorangegangenen Abschnitt (3.3.8.1) um den Faktor zehn höhere Werte gemessen. Die durchschnittliche $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration lag vor Extrakt-Gabe bei 1906 ± 590 ng/ml, 30 min nach Einnahme von Pycnogenol bei 2033 ± 196 ng/ml (Einzelwerte siehe Tabelle 29, D Tabellarischer Anhang). Aus diese Werten wurde wiederum die Hemmung der COX-Aktivität in Prozent berechnet (Abbildung 25 und Tabelle 30, D Tabellarischer Anhang).

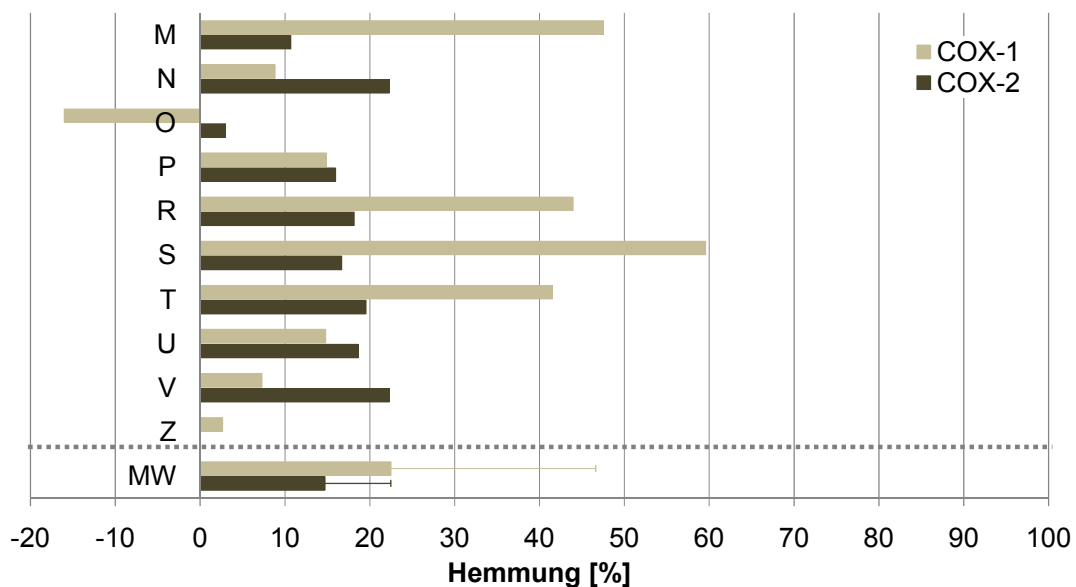


Abbildung 25: Änderung der Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX-Enzyme durch Serumproben von Probanden (M–P, R–V, Z), die eine Einzeldosis von 300 mg Pycnogenol eingenommen haben. Dargestellt ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung der berechneten Hemmwirkungen auf jedes Enzym. Eine Zunahme der *ex vivo* Hemmaktivität gegenüber COX-1 wurde nach Extraktgabe bei neun von zehn Probanden verzeichnet, gegenüber COX-2 bei allen Probanden. Die Ergebnisse waren statistisch signifikant (COX-1: $P < 0.02$; COX-2: $P < 0.002$; Wilcoxon matched pairs signed rank test).

Wie bereits im vorherigen Experiment mit den Serumproben der Mehrfachgabe beobachtet wurde (Abschnitt 3.3.8.1), konnte auch mit den Serumproben der Einmalgabe ein direkter inhibitorischer Effekt auf die Aktivität von COX-1 und COX-2 festgestellt werden. Eine Zunahme der Hemmung gegenüber der COX-1 Isoform war nach Inkubation mit Serum von neun von zehn Probanden nach Pycnogenol-Gabe zu verzeichnen. Gegenüber COX-2 haben alle Serumproben eine Zunahme der Hemmung bewirkt. Der Mittelwert der Änderung der Hemmung betrug 22.49 ± 24.12 % im Fall von COX-1 und 14.72 ± 7.75 % im Fall von COX-2. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant ($P < 0.02$ für COX-1 und $P < 0.002$ für COX-2; Wilcoxon matched pairs signed rank test). Aus den Prostaglandinkonzentrationen konnte dann wieder das Verhältnis der Hemmung von COX-2 zu COX-1 berechnet werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verhältnis (*ratio*) der Hemmung von COX-2 zu COX-1 basierend auf den $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen, die nach Inkubation der Enzyme mit den Serumproben vor Einnahme von Pycnogenol, sowie 30 min nach Extraktgabe *in vitro* gebildet wurden. Ebenfalls angegeben ist der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (STABW).

| Proband | ratio COX-2/COX-1 | |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | vor Pyc-Einnahme | nach Pyc-Einnahme |
| M | 2.60 | 5.35 |
| N | 4.48 | 5.40 |
| O | 4.71 | 4.82 |
| P | 13.93 | 14.29 |
| R | 6.54 | 9.50 |
| S | 5.28 | 11.11 |
| T | 7.76 | 18.23 |
| U | 11.41 | 20.13 |
| V | 8.57 | 7.32 |
| Z | n.b. | 6.48 |
| MW \pm STABW | 7.25 \pm 3.61 | 10.26 \pm 5.56 |

n.b. = nicht berechenbar, keine Werte vorhanden

Die berechneten *ratio*-Werte lagen für alle Probanden über 1, wobei der Mittelwert 10.26 ± 5.56 betrug. Dies bestätigte eine unselektive Hemmung der beiden COX-Enzyme. Da bereits 30 min nach Einnahme von Pycnogenol die Serumproben eine statistisch signifikante Zunahme der inhibitorischen Aktivität von COX-1 und COX-2

bewirkten, kann man auf eine sehr schnelle Resorption von biologisch aktiven Verbindungen aus dem Rindenextrakt schließen.

3.3.8.3 Untersuchung der Wirkung von M1 auf die Aktivität von COX

Wie in den beiden vorherigen Versuchen (Abschnitt 3.3.8.1 und 3.3.8.2) gezeigt werden konnte, waren nach Einnahme von Pycnogenol biologisch aktive Verbindungen und/oder Metabolite im Serum einiger Probanden vorhanden, die eine Hemmung von COX-1 und COX-2 bewirkten. Daher sollte nun gezielt untersucht werden, ob der Metabolit M1 eine Hemmwirkung auf die Aktivität der COX-Enzyme *in vitro* besitzt. Hierzu wurde statt der Serumproben eine wässrige Lösung des Metaboliten in drei verschiedenen Konzentrationen (0.5, 5, 50 μM) im COX Inhibitor Screening Assay eingesetzt und vermessen.

Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen in den Hemmversuchen mit M1 lagen für COX-1 zwischen 1079 und 1290 ng/ml, für COX-2 zwischen 1526 und 1818 ng/ml (Einzelwerte siehe Tabelle 31, D Tabellarischer Anhang). Da die Prostaglandinkonzentrationen für COX-2 im Vergleich zu COX-1 etwas höher liegen, kann man daraus folgern, dass der Metabolit M1 die enzymatische Aktivität der COX-2 Isoform in geringerem Maße beeinflusst. Aus diesen Werten wurde das Verhältnis der Hemmung von COX-2 zu COX-1 berechnet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verhältnis (*ratio*) der Hemmung von COX-2 zu COX-1 basierend auf den $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentrationen, die nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an M1 *in vitro* gebildet wurden.

| M 1 | ratio COX-2/COX-1 |
|-------------------|-------------------|
| 0.5 μM | 1.46 |
| 5 μM | 1.41 |
| 50 μM | 1.41 |

Die *ratio*-Werte für alle drei Konzentrationen von M1 waren gleich. Das Verhältnis der Hemmung von COX-2 zu COX-1 macht eine Aussage über die Selektivität des Metaboliten bezüglich seiner Hemmwirkung auf die beiden Isoformen des Enzyms und sollte aufgrund der großen Strukturähnlichkeit von COX-1 und COX-2 von der eingesetzten Konzentration unabhängig sein. Dies beschreibt eine unselektive

Hemmung beider COX-Enzyme, die mit derjenigen von klassischen NSAIDs wie Indomethacin (ratio 1.3) und Meloxicam (*ratio* 1.5) vergleichbar ist.^{199,200} Aus den Prostaglandinkonzentrationen wurde des Weiteren die Hemmung der COX-Aktivität in Prozent berechnet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Änderung der Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX-Enzyme durch unterschiedliche Konzentrationen an M1. Angegeben sind die Messwerte in Prozent eines Einzelversuchs.

| M 1 | Δ Hemmung [%] | |
|--------|---------------|-------|
| | COX-1 | COX-2 |
| 0.5 µM | 21.82 | 51.79 |
| 5 µM | 26.59 | 45.93 |
| 50 µM | 21.40 | 53.75 |

Die drei unterschiedlichen Konzentrationen von M1 bewirkten einen moderaten, konstanten inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von COX-1 und COX-2. Trotz steigender Konzentration an Metabolit blieb die Hemmwirkung gleich. Die durchschnittliche Zunahme der Cyclooxygenase-Hemmung betrug für COX-1 23.27 ± 2.88 % und für COX-2 50.49 ± 4.07 %. Da hier keine Dosis-Effekt-Beziehung zu erkennen war, kann man daraus schließen, dass es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt handelt.

3.3.9 Diskussion der Ergebnisse des COX-Assays

Durch Untersuchung der Wirkung von Serumproben, die nach Pycnogenol-Einnahme gewonnen wurden, auf die Aktivität der Cyclooxygenase-Enzyme *in vitro* sollte die klinisch beobachtete antiinflammatorische Aktivität des Extraktes²⁰¹ auf molekularer Ebene beleuchtet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten zeigen, dass in humanem Serum bioaktive Verbindungen nach peroraler Einnahme des Kiefern-rindenextraktes vorliegen, die eine statistisch signifikante Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX-Enzyme bewirken. Bereits 30 min nach Gabe des Kiefern-rindenextraktes war ein Effekt zu verzeichnen.

Die Rinde von *Pinus sylvestris* gilt im Pflanzenreich als eine der potentesten Quellen für natürlich vorkommende phenolische Antioxidantien. Karonen et al.¹⁹¹ haben die Wirkung von drei verschiedenen Rindenextrakten von *Pinus sylvestris* auf

die Synthese von zwei proinflammatorischen Mediatoren (NO, PGE₂) hin untersucht. Bei ihren *in vitro* Versuchen mit stimulierten Makrophagen konnten sie zeigen, dass die Kiefernrinde Verbindungen enthält, die die Produktion von NO und Prostaglandin E₂ hemmen. Die Extrakte von *Pinus sylvestris* und *Pinus maritima* besitzen alle eine nachgewiesene inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der Arachidonsäure-metabolisierenden Enzyme.¹⁹¹ Da diese Extrakte eine ähnliche Zusammensetzung besitzen, ist zu vermuten, dass die selben Verbindungen für die beobachteten Effekte verantwortlich sind.

Auch Noreen et al.²⁰² beschäftigten sich mit der Hemmwirkung von vier Pflanzenextrakten von *Atuna racemosa Raf. ssp. racemosa*, *Syzygium corynocarpum*, *Syzygium malaccense* und *Vantanea peruviana*, die traditionell bei der Behandlung von Entzündungen eingesetzt werden, auf die COX-1 und COX-2 katalysierte Prostaglandin-Biosynthese in einem *in vitro* Assay. Dabei identifizierten sie verschiedene Flavan-3-ol Derivate als die aktiven, für die Hemmung verantwortlichen Verbindungen, wie z.B. (+)-Catechin mit einem IC₅₀-Wert von 80 µM für COX-1 und 130 µM für COX-2, was einem *ratio* von 1.6 entspricht. Allerdings sind diese ermittelten Konzentrationen an (+)-Catechin *in vivo* eher unrealistisch, da diese Werte im humanen Organismus nie erreicht werden. Die nach wiederholter Pycnogenol-Einnahme bestimmte Plasmakonzentration von (+)-Catechin beträgt lediglich 0.2 µM (60 ng/ml).⁹⁶ Nach Gabe von 2 g reinem Catechin konnten Balant et al.²⁰³ immerhin Plasmaspiegel von 7.8 µM nachgewiesen, also deutlich höhere Konzentrationen als nach Einnahme des Kiefernrindeextraktes, aber immer noch um den Faktor 10 kleiner als der von Noreen²⁰² ermittelte IC₅₀-Wert von 80 µM.

Den Zusammenhang von antiinflammatorischer Aktivität und Struktur untersuchten Kim et al.¹⁵⁰ an zahlreichen Flavonoid-Derivaten in einem Modell mit Arachidonsäure-induzierten Ödemen bei Mäusen nach topischer Anwendung. Dabei stellten sie fest, dass die meisten Flavanole bei oraler Gabe nur relativ schwache antientzündliche Fähigkeiten besitzen. So zeigte Catechin erst bei einer Konzentration > 100 µM einen Effekt, wobei es COX-1 stärker hemmte als COX-2. Flavone hingegen stellen potente Inhibitoren der Cyclooxygenase und Flavonole der Lipxygenase dar. Aus den Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass die 2,3-Doppelbindung essentiell für die antiinflammatorische Wirkung der Flavonoide *in vivo* ist. Auch spielt das Hydroxylierungsmuster sowie die Zahl der OH-Gruppen am Ring A und B eine wichtige Rolle. Folglich wirken sich Hydroxygruppen in 5 und 7 Position

am A-Ring und eine 4'-Hydroxylierung am B-Ring günstig aus. Bei den Bestandteilen von Pycnogenol handelt es sich um mehrfach hydroxylierte Catechol-Derivate (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Zwar besitzt keine der uns bekannten und in den diversen Assays untersuchten Bestandteile des Kiefernridenextraktes (+)-Catechin, *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Ferulasäure, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure oder (\pm)-Taxifolin eine Doppelbindung in 2,3-Position, jedoch verfügen die Substanzen über zahlreiche OH-Funktionen, die laut Kim¹⁵⁰ für die Hemmung der COX-Enzyme von entscheidender Wichtigkeit sind.

Des Weiteren ist es sehr unwahrscheinlich, dass nach Einmalgabe von Pycnogenol die Metabolite für die Inhibition der enzymatischen Aktivität von COX-1 und COX-2 verantwortlich sind, da die Effekte bereits nach 30 min nach Pycnogenol-Gabe sichtbar waren. Demgegenüber brauchen die Metabolisierung und Anflutung von Substanzen wie M1 und M2 im humanen Organismus einige Zeit. Zu späteren Zeitpunkten konnte in den eigenen Untersuchungen bisher keine Hemmung der enzymatischen Aktivität von COX-1 und COX-2 nachgewiesen werden. Nach Mehrfachgabe war tendenziell eine, wenn auch schwache, Hemmung zu sehen, die durchaus von Metaboliten verursacht werden kann. Auch ist denkbar, dass die Hemmung in der frühen Phase (nach 30 min, Einmalgabe) von anderen Verbindungen verursacht wird als in der späten Phase (Mehrfachgabe).

Nach Einnahme von Pycnogenol wurde in den *ex vivo* Untersuchungen der Serumproben eine durchschnittlich achtfach stärkere Hemmwirkung auf die COX-1 Isoform verzeichnet als auf COX-2. Es gibt viele NSAIDs, die beide Isoformen inhibieren, jedoch hemmen sie meist eine Isoform stärker als die andere. Zu den COX-1 selektiven NSAIDs gehören Flurbiprofen und Ketoprofen, zu den unselektiven NSAIDs zählen Ibuprofen und Naproxen, wohingegen Diclofenac und Mefenaminsäure COX-2 selektiv sind.²⁰⁴

Da die *ex vivo* Untersuchungen gezeigt haben, dass nach Einnahme von Pycnogenol biologisch aktive Verbindungen und/oder Metabolite im Serum einiger Probanden vorhanden waren, die innerhalb kürzester Zeit eine Hemmung von COX-1 und COX-2 bewirkten, wurde in einem *in vitro* Ansatz die Wirkung von M1 auf die Aktivität der COX-Enzyme untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle drei untersuchten Konzentrationen von M1 (0.5, 5, 50 μ M) den gleichen moderaten inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der beiden COX-Isoformen ausübten. Es

konnte keine Dosis-Effekt-Beziehung festgestellt werden, so dass hier von einem unspezifischen Effekt des Metaboliten gesprochen werden kann.

4 Blutglucosesenkende Eigenschaften von phenolischen Verbindungen

4.1 Verbesserung der metabolischen Kontrolle durch orale Antidiabetika und Pflanzenwirkstoffe

4.1.1 Thiazolidindione – die konventionelle Therapie bei Typ 2 Diabetes

Die Thiazolidindione (TZDs) oder Glitazone wie z.B. Rosiglitazon, Pioglitazon, Ciglitazon und Troglitazon gehören zu den oralen Antidiabetika (siehe auch Abschnitt 5.2.4, A Einleitung), die die metabolische Kontrolle von Typ 2 Diabetikern durch Erhöhung der Insulinempfindlichkeit in Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Leber verbessern, wobei zur Zeit nur Rosiglitazon und Pioglitazon eine Zulassung in Europa haben.⁶² TZDs zeigen ihre antidiabetischen Effekte durch Aktivierung des nukleären Rezeptors PPAR- γ , einem ligandenkontrollierten Transkriptionsfaktor. Hierdurch wird die Transkription von zahlreichen Genen beeinflusst, die im Glucose- und Lipidmetabolismus sowie der Energiebilanz involviert sind.^{62,205,206}

Klinische Studien haben gezeigt, dass TZDs blutglucosesenkende Wirkung in Typ 2 Diabetikern besitzen, und dass sie bei Hyperinsulinämie eine Reduktion der Plasma-Insulinkonzentrationen erreichen können.^{207,208} Diese Verbindungen verbessern die insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Zellen, steigern die Glykogensynthese und hemmen Lipidsynthese und Gluconeogenese. Außerdem steigern sie die Synthese und Translokation von Glucosetransportern (GLUT).¹³

Das wohl bekannteste Thiazolidindion mit einer breiten pharmakologischen Aktivität ist Rosiglitazon. Es weist in einem Dosisbereich von 0.2 bis 20 mg eine lineare Pharmakokinetik auf. Seine absolute Bioverfügbarkeit beträgt 99 %. Nach einer einzelnen oralen Gabe werden innerhalb einer Stunde Spitzenplasmakonzentrationen erreicht. Die maximale Konzentration (C_{\max}) liegt in einem Bereich von 76–598 ng/ml nach einer einzelnen Dosis von 1–8 mg.²⁰⁵ Dies entspricht 0.21–1.67 μM .

4.1.2 Antidiabetische Eigenschaften von Pycnogenol

In zahlreichen klinischen Studien mit zusammen über 1000 Probanden konnte eine antidiabetische Wirkung von Pycnogenol nach oraler Einnahme nachgewiesen werden.⁵⁴

So konnten Liu et al.^{46,47} zeigen, dass Pycnogenol den Nüchtern-Blutglucosespiegel bei Diabetes mellitus senken kann. Sie führten eine Placebo-kontrollierte, doppelt-verblindete, randomisierte, multizentrische Studie mit 77 Diabetes Typ 2 Patienten durch, um die glucosesenkende Wirkung von Pycnogenol zu untersuchen. Die tägliche Gabe von 100 mg Pycnogenol über einen Zeitraum von zwölf Wochen, während dem eine standardisierte anti-Diabetes-Behandlung fortgesetzt wurde, erniedrigte die Nüchtern-Plasmaglucosespiegel signifikant im Vergleich zum Placebo. Der HbA_{1c}-Wert wurde ebenfalls gesenkt, jedoch war der Unterschied im Vergleich zum Placebo nur für den ersten Monat statistisch signifikant. Die Insulinsekretion wurde auch bei Steigerung der Pycnogenoldosis von 100 mg auf 200 bzw. 300 mg nicht beeinflusst⁴⁶, somit können die glucosesenkenden Effekte des Rindenextraktes nicht mit einer Stimulation der Insulinsekretion erklärt werden, sondern müssen andere Ursachen haben.

Aufgrund der Tatsache, dass der Kiefernridenextrakt einen blutglucose-senkenden Effekt bei Diabetes mellitus Patienten aufweist, und ähnlich wie Rosiglitazon eine breite pharmakologische Aktivität besitzt, sollten in den folgenden Untersuchungen die dabei auf molekularer Ebene ablaufenden Mechanismen genauer untersucht werden.

4.2 Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernrintenextraktes auf die Aktivität der α -Glucosidase

Einer der therapeutischen Ansätze zur Erniedrigung von postprandialer Hyperglykämie ist die Verzögerung der Absorption von Glucose durch Inhibierung von Kohlenhydrat-hydrolysierenden Enzymen, wie z.B. α -Amylase und α -Glucosidase, in den Verdauungsorganen.¹¹ In einem *in vitro* Experiment sollte untersucht werden, durch welche monomeren Bestandteile bzw. Fraktionen von Pycnogenol eine Hemmung des Enzyms α -Glucosidase erzielt werden kann.

4.2.1 Das Enzym α -Glucosidase

α -Glucosidase, auch bekannt unter dem Begriff Maltase, ist ein Schlüsselenzym bei der Glucoseverwertung im Darm, das den letzten Schritt im digestiven Prozeß der Kohlenhydrate katalysiert (Abbildung 26). Kohlenhydrate sind wesentliche Bestandteile unserer Nahrung, die im Magen und Darm zu D-Glucose abgebaut und rasch ins Blut aufgenommen werden, was einen Anstieg des Blutglucosespiegels zur Folge hat.

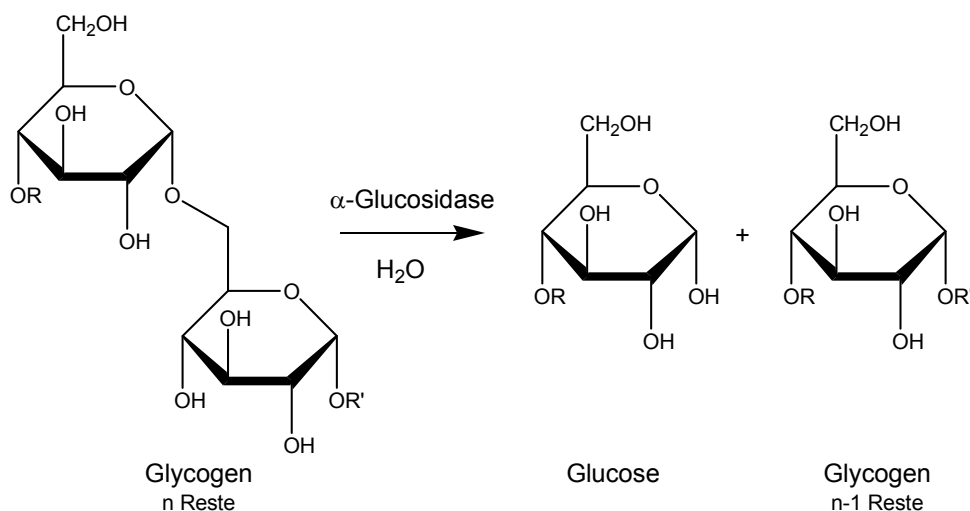


Abbildung 26: Abbau von Poly- und Oligosacchariden im Darm zu absorbierbaren Monosacchariden katalysiert durch das Enzym α -Glucosidase. Die dabei entstehende Glucose wird rasch ins Blut aufgenommen und bewirkt einen Anstieg des Blutglucosespiegels.

4.2.2 α -Glucosidase-Inhibitoren

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die nicht in der Lage sind durch ausgewogene Ernährung, Gewichtsverlust und körperliche Betätigung ihren Blutzuckerspiegel in einem normalen Bereich zu halten und/oder an postprandialer Hyperglykämie leiden, bekommen α -Glucosidasehemmstoffe wie Acarbose, Miglitol und Voglibose verschrieben. Diese Substanzen intervenieren im Dünndarm mit Kohlenhydrat-verdauenden Enzymen und verzögern so die Umsetzung von Poly- und Oligosacchariden zu absorbierbaren Monosacchariden.¹¹ Die α -Glucosidase-Inhibitoren hemmen in erster Linie die enterale α -Glucosidase kompetitiv, die vor allem in der proximalen Hälfte des Dünndarms vorkommt. Aber sie sind auch in der Lage, pankreatische α -Amylasen reversibel zu inhibieren. Die intestinale Absorption von Kohlenhydraten wird somit verzögert, was den Glucoseeintritt in den systematischen Kreislauf verlangsamt und postprandiale Glucosespiegel erniedrigt.

4.2.3 Prinzip des α -Glucosidase-Assays

Mit Hilfe des α -Glucosidase-Assays sollten die glucosesenkenden Eigenschaften von Bestandteilen und Fraktionen von Pycnogenol untersucht werden. Hierbei wurde die Hemmwirkung der getesteten Substanzen auf das Enzym α -Glucosidase betrachtet, das ein Schlüsselenzym bei der Glucoseverwertung im Darm darstellt.

Die zu untersuchenden wässrigen Testlösungen wurden mit α -Glucosidase gemischt und die enzymatische Reaktion durch Zugabe des Substrates *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid gestartet. Die Katalyse wurde durch eine Natriumcarbonat-Lösung beendet und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm bestimmt.

4.2.4 Ergebnisse des α -Glucosidase-Assays

4.2.4.1 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol und seinen Bestandteilen auf die Aktivität der α -Glucosidase

In diesem *in vitro* Versuch sollte die Wirkung des Kiefernrintenextraktes und einiger seiner Monomere auf die Aktivität des Enzyms α -Glucosidase untersucht werden.

Dabei wurde hier der Gesamtextrakt eingesetzt, statt wie bei den vorherigen Untersuchungen Serumproben, da das Enzym α -Glucosidase im Dünndarm aktiv ist und Pycnogenol somit noch nicht von den Darmbakterien, die erst in tieferen Darmabschnitten zu finden sind, metabolisiert vorliegt. Außerdem kann das Enzym mit allen Bestandteilen des peroral aufgenommenen Extraktes in Kontakt kommen, so dass sämtliche Bestandteile von Pycnogenol, also auch die nicht resorbierbaren Fraktionen, theoretisch zum Effekt beitragen können. Ebenfalls in diesem Assay eingesetzt wurden Acarbose (Glucobay[®]) als Referenzsubstanz, die als kompetitiver, reversibler Inhibitor der α -Glucosidase bei Diabetes als Resorptionshemmer verschrieben wird, sowie Grüntee-Extrakt, dessen Wirkung auf α -Glucosidase literaturbekannt ist.²⁰⁹

Der IC_{50} -Wert, definiert als diejenige Menge an Substanz, die benötigt wird, um die Aktivität des Enzyms um 50 % zu senken¹³⁴, wurde mittels linearer Regression aus den Dosis-Wirkungs-Diagrammen bestimmt, wobei der Korrelationskoeffizient mindestens 0.9 betrug (Tabelle 32, D Tabellarischer Anhang). Je niedriger der IC_{50} -Wert ist, desto höher ist die inhibitorische Wirkung der Verbindung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt; besonders gekennzeichnet (*) sind diejenigen Substanzen, die einen statistisch signifikanten Unterschied zur Referenz Acarbose aufwiesen (Tabelle 33, D Tabellarischer Anhang).

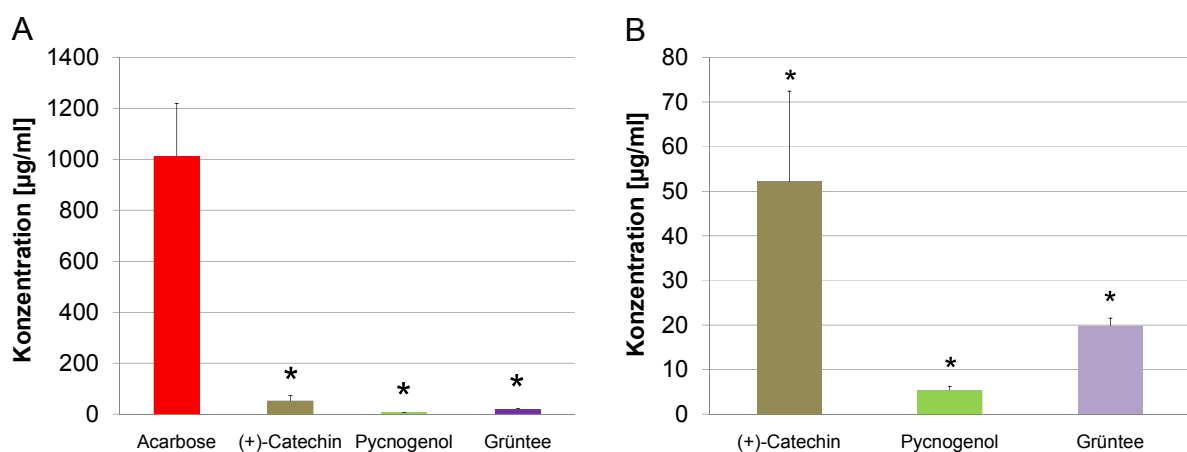


Abbildung 27: *In vitro* Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol, (+)-Catechin und Grüntee-Extrakt auf die Aktivität der α -Glucosidase im Vergleich zur Referenzsubstanz Acarbose. (A): Darstellung aller Substanzen, (B): vergrößerte Darstellung der Testsubstanzen ohne Acarbose. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen in $\mu\text{g/ml}$ von 5–9 unabhängigen Experimenten, sowie die von Acarbose statistisch signifikant verschiedenen Verbindungen (*) ($P < 0.05$) (One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

Die Referenz Acarbose hemmte die Aktivität der α -Glucosidase in einer konzentrationsabhängigen Weise. Der IC_{50} -Wert von Acarbose betrug $1012.25 \pm 211.54 \mu\text{g/ml}$. Pycnogenol zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der α -Glucosidase Aktivität. Für den IC_{50} von Pycnogenol ergab sich ein Wert von $5.34 \pm 0.91 \mu\text{g/ml}$. Die Hemmwirkung des Rindenextraktes auf die Aktivität des Enzyms war um das 190-fache stärker als die der Referenz Acarbose.

Von den untersuchten monomeren Bestandteilen bewirkte nur (+)-Catechin eine Hemmung der α -Glucosidase. Der IC_{50} -Wert betrug $52.14 \pm 20.30 \mu\text{g/ml}$ und war somit um eine Zehnerpotenz höher als der IC_{50} -Wert des Gesamtextraktes. Keine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der α -Glucosidase besaßen *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Ferulasäure, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure, Sinapinsäure und (\pm)-Taxifolin.

Des Weiteren wurde auch die Wirkung von Grüntee-Extrakt in diesem Assay untersucht. Hierbei ergab sich eine IC_{50} -Konzentration von $19.74 \pm 1.80 \mu\text{g/ml}$. Die Hemmwirkung des Extraktes war um das 51-fache höher als die der Referenz Acarbose, aber nur etwa ein Viertel so stark wie die von Pycnogenol.

Sowohl der Gesamtextrakt wie auch (+)-Catechin und der Grüntee-Extrakt wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Acarbose auf; sie besaßen eine deutlich stärkere Hemmwirkung auf das Enzym als die Referenz. Wird der berechnete IC_{50} -Wert von Pycnogenol auf 100 % gesetzt, so entsprechen die Hemmaktivitäten von Grüntee-Extrakt 27.05 %, von (+)-Catechin 10.24 % und von Acarbose lediglich 0.53 %.

4.2.4.2 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Fraktionen von Pycnogenol auf die Aktivität der α -Glucosidase

In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, welche der vier Fraktionen von Pycnogenol für die zuvor beobachtete Hemmwirkung des Extraktes verantwortlich ist. Diese Fraktionen, die Bestandteile mit verschiedenen Molekulargewichten enthalten, können durch Größenausschlusschromatographie des Rindenextraktes erhalten werden²¹⁰ (siehe auch Abschnitt 1.1, C Experimenteller Teil). Die Fraktionen wurden dann in der für Pycnogenol ermittelten IC_{50} -Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt und die Hemmung des Enzyms in Prozent berechnet (Abbildung 28 und Tabelle 34, D Tabellarischer Anhang).

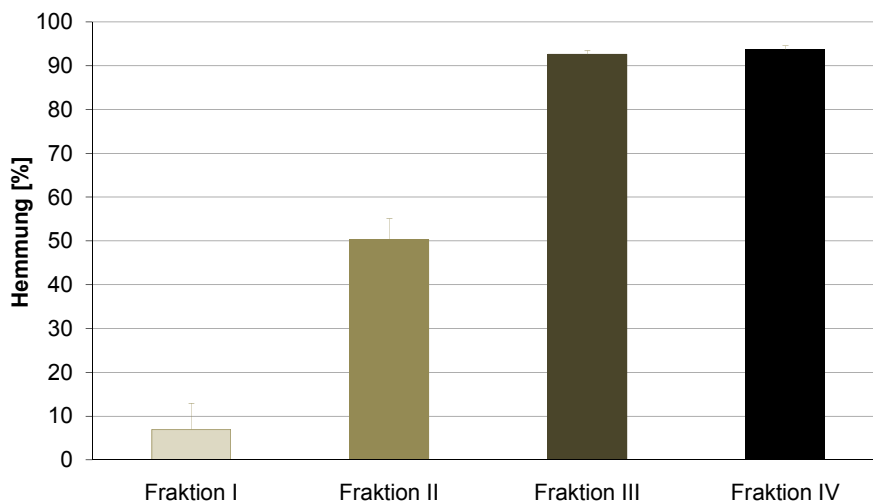


Abbildung 28: *In vitro* Untersuchung der Wirkung der Fraktionen I–IV von Pycnogenol auf die Aktivität der α -Glucosidase. Fraktion I bewirkte eine Reduktion der Enzymaktivität um 7 %, Fraktion II um 50 %, Fraktion III und IV um 93 bzw. 94 %. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Experimenten.

Fraktion I enthält Phenolcarbonsäuren, frei und in glucosidischer Form, sowie die monomeren Polyphenole (+)-Catechin und (\pm)-Taxifolin.^{210,211} Diese Fraktion bewirkte lediglich eine Hemmung der α -Glucosidase um 6.92 ± 5.90 %. Fraktion II beinhaltet die dimeren und trimeren Procyanidine. Hier zeigte sich eine Hemmung von 50.26 ± 4.78 %. Fraktion II besteht aus tetrameren bis hexameren Procyanidinen und erzielte eine starke Hemmung der α -Glucosidase Aktivität von 92.59 ± 0.82 %. Auch Fraktion IV, die alle höher oligomeren Procyanidine einschließt, zeigte eine überaus starke Hemmwirkung von 93.63 ± 0.85 %.

Das heisst, mit Zunahme des Polymerisationsgrades der Procyanidine nimmt auch deren Hemmwirkung auf die Aktivität der α -Glucosidase zu. Die besten Ergebnisse erzielten die tetrameren und höher oligomeren Procyanidine mit einer über 90 %igen Reduktion der Enzymaktivität.

4.2.5 Diskussion der Ergebnisse des α -Glucosidase-Assays

Die inhibitorische Wirkung verschiedener Pflanzenextrakte auf die Aktivität des Enzyms α -Glucosidase wurde schon von zahlreichen Forschergruppen untersucht. Dabei verglichen sie nicht nur die Reaktivität der Testsubstanzen, sondern auch die

Aktivität von Enzymen unterschiedlicher Herkunft. Onal et al.²¹² haben sich mit der Hemmwirkung einiger medizinisch genutzter Heilkräuter (*Urtica dioica*, *Taraxacum officinale*, *Visum album* und *Myrtus communis*) beschäftigt. Alle Pflanzenextrakte besaßen unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeiten zur Inhibition der α -Glucosidase, wobei *Myrtus communis* das Enzym am stärksten hemmte mit einer IC_{50} -Konzentration von 38 $\mu\text{g/ml}$. Auch fielen die beobachteten Hemmeffekte je nach verwendeter Quelle des Enzyms (Bäckerhefe, Kaninchenleber oder Kaninchen-dünndarm) unterschiedlich aus. Über die aktiven Bestandteile der Extrakte ist allerdings nichts bekannt.

Von Matsui et al.²⁰⁹ wurde der IC_{50} -Wert von Grünem Tee gegenüber α -Glucosidase aus Bäckerhefe mit 111 $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Dieser Wert wird bei den eigenen Untersuchungen deutlich unterschritten; die ermittelte IC_{50} -Konzentration betrug lediglich 19.7 $\mu\text{g/ml}$. Mögliche Ursachen für diese stark abweichenden Ergebnisse können eine unterschiedliche Zusammensetzung der Teeextrakte oder ein anderes Herstellungsverfahren sein, so dass möglicherweise die Bestandteile des in den eigenen Versuchen verwendeten Grüntee-Extraktes eine andere Zusammensetzung und/oder andere Eigenschaften besitzen als die des Extraktes von Matsui²⁰⁹.

In Tierversuchen mit diabetischen Mäusen untersuchten Kim et al.²¹³ die inhibitorischen Effekte eines Kiefernrintenextraktes (PBE) und eines Nadelextraktes von *Pinus spermatophyta* auf Kohlenstoff-hydrolysierende Enzyme. PBE war in der Lage, effektiv den Anstieg von postprandialen Blutglucosespiegel durch Verzögerung der Absorption der Nahrung zu unterdrücken. In einem *in vitro* Assay, dessen Versuchsaufbau dem eigenen ähnelte, erforschten sie die Wirkung des Extraktes bei verschiedenen Konzentrationen und unter Verwendung verschiedener Enzyme. Wurde der Versuch mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, so erhielten sie für PBE einen IC_{50} -Wert von 0.025 $\mu\text{g/ml}$, jedoch erzielten sie keine Hemmung des Enzyms durch Acarbose. Stammte α -Glucosidase aus Schweinedünndarm, so betrug der IC_{50} -Wert für PBE 155 $\mu\text{g/ml}$ und für Acarbose 35 $\mu\text{g/ml}$. In den eigenen Versuchen wurde ebenfalls das Enzym aus Bäckerhefe verwendet. Die mittleren Hemmkonzentrationen waren 5.34 ± 0.91 $\mu\text{g/ml}$ für Pycnogenol und 1012.25 ± 211.54 $\mu\text{g/ml}$ für Acarbose. Die Referenzsubstanz Acarbose erzielte bei Kim²¹³ keine Hemmung des Enzyms; möglicherweise wurde hier nur ein kleiner, außerhalb der Effektivität der Substanz liegender Bereich getestet. Der um ein Vielfaches höhere

IC₅₀-Wert von Pycnogenol im Vergleich zum Kiefernrintenextrakt PBE kann vermutlich mit der unterschiedlichen Zusammensetzung und Herstellung der Extrakte erklärt werden. Da in der eigenen Untersuchung gezeigt wurde, dass die höher oligomeren Verbindungen eine stärkere Hemmwirkung ausüben, kann daraus geschlossen werden, dass PBE vermutlich einen höheren Anteil an Oligomeren besitzt als Pycnogenol.

In zahlreichen *in vitro* Assays untersuchten Kim et al.²¹⁴ die Hemmwirkung von über 1400 koreanischen Pflanzenspezies auf diverse Kohlenhydrat-hydrolysierende Enzyme, wie z.B. α -Glucosidase von *S. cerevisiae*. Die Kiefernextrakte, und hier vor allem der Rindenextrakt *Pinus densiflora*, erwiesen sich als am effektivsten. (+)-Catechin besaß ebenfalls die Fähigkeit zur Hemmung der Aktivität von α -Glucosidase aus *S. cerevisiae*, allerdings wurde in diesem Artikel kein IC₅₀-Wert angegeben, daher ist ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nicht möglich. Auch ist nichts über die genaue Zusammensetzung des Rindenextraktes bekannt. Jedoch bestätigt die Untersuchung von Kim²¹⁴, dass Rindenextrakt ein effektiver Inhibitor der α -Glucosidase ist, und dass (+)-Catechin einer der aktiven Bestandteile zu sein scheint, wenn auch weniger potent im Vergleich zu den höheren Oligomeren.

Eine andere Forschergruppe¹¹ hatte 21 natürlich vorkommende Flavonoide auf ihre Hemmwirkung gegenüber α -Glucosidase aus Bäckerhefe geprüft. Dabei zeigte Luteolin ein größeres Potential zur Hemmung des Enzyms als Acarbose. Den IC₅₀-Wert von Acarbose gaben sie mit 5 mg/ml an. Trotz der Tatsache, dass die Versuchsbedingungen von den eigenen abwichen (Enzym gelöst in Phosphatpuffer mit BSA und NaN₃, Testverbindungen in DMSO statt Wasser, 5 min Inkubationszeit statt 30 min), stimmte diese Angabe relativ gut mit der eigenen berechneten IC₅₀-Konzentration von 1012.25 ± 211.54 µg/ml für Acarbose überein.

In den Experimenten von Moini et al.²¹⁵ erwies sich (+)-Catechin als guter Inhibitor der α -Glucosidase von Bäckerhefe mit einem IC₅₀-Wert von 130 µM. Jedoch zeigte Acarbose keine Hemmwirkung. In den eigenen Untersuchungen wurde für (+)-Catechin ein IC₅₀-Wert von 179.60 ± 69.93 µM ermittelt, der in etwa der gleichen Größenordnung wie der von Moini²¹⁵ berechnete Wert liegt. Allerdings konnte für Acarbose sowohl im Rahmen der eigenen Arbeit wie auch von anderen Autoren berichtet eine Hemmwirkung auf das Enzym α -Glucosidase von Bäckerhefe festgestellt werden. Warum Moini unter vergleichbaren Versuchsbedingungen wie in

den eigenen Experimenten keine Enzymhemmung mit Acarbose erzielen konnte, ist nicht eindeutig nachvollziehbar. Möglicherweise hat er eine Konzentration nahe oder über 1 mg/ml als „keine Hemmung“ definiert.

Erstmals konnte in den eigenen Untersuchungen eine Korrelation zwischen dem Polymerisationsgrad der Procyanidine und der Hemmwirkung von Pycnogenol gegenüber α -Glucosidase aufgezeigt werden. Fraktion II, die dimere und trimere Procyanidine umfasst, besaß eine Hemmaktivität, die mit dem IC_{50} des Gesamtextraktes übereinstimmte. Fraktionen III und IV, die die tetrameren und höher oligomeren Procyanidine beinhalten, zeigten die stärkste Inhibition der α -Glucosidase-Aktivität. Die oligomeren Procyanidine des Kiefernrintenextraktes werden aufgrund ihres höheren Molekulargewichts nicht absorbiert und können somit im gastrointestinalen Trakt durch Hemmung der α -Glucosidase lokale Effekte erzielen. Somit können die in klinischen Studien mit diabetischen Patienten beobachteten antidiabetischen Effekte von Pycnogenol erklärt werden.

Dass bis auf (+)-Catechin keine der untersuchten Pycnogenol-Bestandteile eine Hemmung des Enzyms bewirken konnte, kann damit erklärt werden, dass diese Substanzen vermutlich zu klein sind, um ein adäquates Substrat für die α -Glucosidase darzustellen. Mit Ausnahme von Catechin sind alle bisher gefundenen Inhibitoren polyhydroxylierte Moleküle mit einem größeren Molekulargewicht wie Acarbose oder diacetylierte Anthocyanidine.²¹⁶

Der genaue Mechanismus der Enzymhemmung wurde in der eigenen Arbeit nicht näher untersucht und bleibt noch zu klären. Aufgrund der geringen Menge des eingesetzten Rindenextraktes, und der Tatsache, dass Pycnogenol eine hohe Bindungsaffinität an Matrixproteine wie Collagen und Elastin, aber nicht an andere Proteine wie z.B. Ovalbumin besitzt²¹⁷, spielt eine unspezifische Hemmung oder Denaturierung des Enzyms wahrscheinlich eine eher nebensächliche Rolle.

4.3 Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Metaboliten von Pycnogenol auf die Aktivierung von PPAR- γ in humanen Monocyten

Das zur Klasse der Thiazolidindione gehörende Antidiabetikum Rosiglitazon wird zur Verbesserung der glykämischen Kontrolle bei Diabetes mellitus, zum Teil auch in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen, verordnet.²⁰⁵ Es besitzt eine breite pharmakologische Aktivität und verbessert die Sensitivität der Insulinrezeptoren unter anderem durch Aktivierung von Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR- γ).⁶²

In einem *in vitro* Experiment sollte untersucht werden, ob ein Bestandteil oder Metabolit von Pycnogenol, das eine ähnlich breite pharmakologische Aktivität wie Rosiglitazon besitzt, auch eine Aktivierung von PPAR- γ bewirken kann. Zu diesem Zweck sollte ein ELISA entwickelt werden, mit dem PPAR- γ in Zellkernextrakten von kultivierten, humanen Monocyten nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

4.3.1 Die Bedeutung der PPARs

Die nukleären Hormon-Rezeptoren Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die entscheidend für die Energiehomöostase des gesamten Körpers sind. Sie sind an der Regulation der Expression von zahlreichen Genen beteiligt und beeinflussen physiologische Prozesse wie Lipid- und Glucosemetabolismus, Zellproliferation, Adipogenese und Entzündungsprozesse.⁶²

4.3.2 PPAR Isotypen

Es sind drei PPAR Isotypen bekannt, die von verschiedenen Genen codiert werden, und die mit PPAR- α , PPAR- β (gleichbedeutend mit PPAR- δ) und PPAR- γ bezeichnet werden.²¹⁸ Alle drei PPAR Isoformen besitzen ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften.²¹⁹ Jeder dieser Rezeptoren weist eine andere Gewebeexpression auf und wird durch strukturell unterschiedliche Verbindungen aktiviert.

4.3.3 Strukturelle Eigenschaften von PPAR- γ

Das PPAR- γ Gen besitzt drei Promotorregionen, die für die Entstehung von drei Isoformen, PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 und PPAR- γ 3, zuständig sind. PPAR- γ 1 und PPAR- γ 3 mRNA-Transkripte werden beide in das identische PPAR- γ 1 Protein übersetzt, PPAR- γ 2 mRNA in das PPAR- γ 2 Protein. PPAR- γ 2 besitzt im Gegensatz zu PPAR- γ 1 28 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus und wird nur in Adipocyten exprimiert, wohingegen PPAR- γ 1 ubiquitär verteilt ist und auch in Makrophagen, Colonepithel und Endothel exprimiert wird.^{62,220} In subkutanem Fettgewebe sowie in isolierten Adipocyten macht die PPAR- γ 1 mRNA mehr als 80 % des PPAR- γ Transkripts aus, die PPAR- γ 2 mRNA lediglich etwa 15 %.²²¹

4.3.4 Biologische Effekte durch Aktivierung von PPAR- γ

Die Aktivierung von PPAR- γ verbessert die Insulinsensitivität über verschiedene Mechanismen:

- (1) Reduktion der hepatischen Glucoseproduktion und Erhöhung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in Fett- und Skelettgewebe durch Stimulation der Exocytose von GLUT 4^{205,222},
- (2) Freisetzung von Adipocyten-abstammenden Signalfaktoren, die die Insulinsensitivität im Muskel bestimmen²²³, und
- (3) Induktion der Differenzierung von Adipocyten und Apoptose von Lipid-gefüllten Adipocyten^{62,219}.

4.3.5 Mechanismus der transkriptionellen Transaktivierung der PPARs

Der Mechanismus der Gentranskription ist für alle PPAR Subtypen identisch. Der Prozeß der Transkription beginnt mit der Bindung von endogenen oder exogenen Liganden an den PPAR Rezeptor und anschließender Heterodimerisierung mit dem 9-*cis*-Retinsäurerezeptor (RXR) (Abbildung 29). Dieser Komplex bindet an sequenz-spezifische PPAR- γ *Response Elements* (PPREs) in der Promoterregion von Zielgenen. Dies geht mit einer Konformationsänderung von PPAR einher und

veranlasst die Rekrutierung von Co-Aktivatoren, was schließlich den Anstieg der Transkriptionsaktivität verschiedener Gene bewirkt, die in zahlreichen biologischen Prozessen involviert sind.^{219,220}

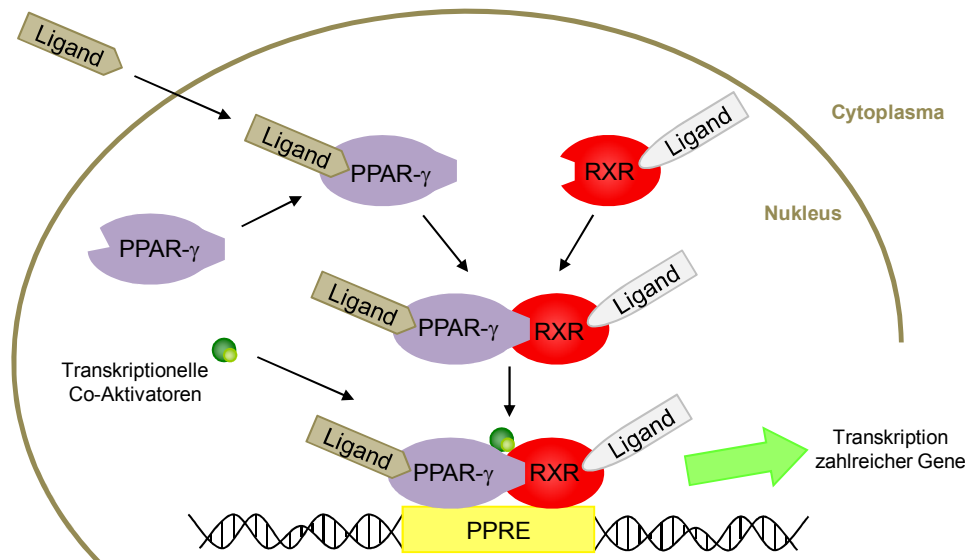


Abbildung 29: Aktivierung von PPAR- γ . Nach der Bindung von Liganden an PPAR- γ erfolgt die Heterodimerisierung mit RXR, was den aktiven Transkriptionskomplex ausbildet. Dieser assoziiert mit transkriptionellen Co-Aktivatoren und bindet an ein sequenzspezifisches PPRE (PPAR- γ Response Element), lokalisiert auf den Zielgenen.

PPARs können weder als Homodimer noch als Monomer gebunden werden, sie benötigen immer RXR als DNA-bindenden Partner. Die PPAR *Response Elements* sind eine direkte Wiederholungseinheit aus zwei Erkennungsmotiven (AGGTCA), die durch ein Nukleotid getrennt sind, und werden folglich auch als *Direct Repeat 1* (DR1) bezeichnet. Hieraus ergibt sich folgende Sequenz: 5'-NNN AGGTCA A AGGTCA-3'.²¹⁸ PPAR interagiert dabei mit dem *upstream* verlängerten Hexamer von DR1, wohingegen RXR die *downstream* Erkennungssequenz besetzt.^{206,218}

4.3.6 Subtyp selektive PPAR- γ Agonisten

4.3.6.1 Endogene PPAR- γ Liganden

PPAR- γ wird von diversen lipophilen Liganden gebunden und aktiviert, darunter langkettige, polyungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure und einige Eicosanoide. Die essentiellen Fettsäuren Arachidonsäure, Gamolensäure (γ -Linolensäure) und Docosahexaensäure gelten ebenfalls als endogene Liganden von PPAR- γ . Auch Prostaglandin-verwandte Verbindungen wie 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂) zählen zu den natürlich vorkommenden PPAR- γ Agonisten.^{62,219}

4.3.6.2 Synthetische PPAR γ Liganden

Zusätzlich zu den natürlichen Liganden wurde eine große Vielzahl an synthetischen PPAR- γ Agonisten entwickelt. Hierzu gehören in erster Linie die Thiazolidindione (TZDs) oder Glitazone wie Rosiglitazon, Pioglitazon, Ciglitazon und Troglitazon (siehe auch Abschnitt 4.1).⁶² Die strukturellen Anforderungen an PPAR- γ Agonisten sind unter anderem eine acidische Kopfgruppe (Thiazolidindion-Kopfgruppe), ein zentraler Aryl-Spacer und ein lipophiler Rest (Abbildung 30), eine Grundstruktur, die von allen TZDs aufgewiesen wird. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass ein heterozyklisches N-Atom im Bereich des lipophilen Restes eine drastische Erhöhung der PPAR- γ Affinität bewirkt, was am Beispiel von Rosiglitazon veranschaulicht werden kann.²²⁴

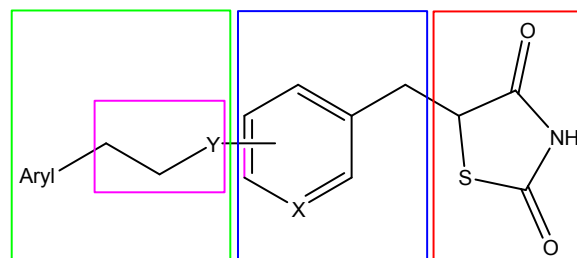


Abbildung 30: Grundstruktur selektiver Thiazolidindion-PPAR- γ -Agonisten. In rot dargestellt ist die acidische Kopfgruppe, in blau der zentrale Spacer, in grün der lipophile Rest und in pink der Linker.

Fenofibrat, ein schwacher PPAR- γ Ligand, der vor allem an PPAR- α bindet, gehört zur Arzneimittel-Klasse der Fibrate. Diese senken die Cholesterin- und Triglyceridspiegel im Blut und werden vor allem bei Hyperlipidämie verschrieben.

Fmoc-Leucin ist ein N-geschütztes Analogon, das als selektiver Modulator von PPAR- γ agiert. Zwei Moleküle Fmoc-Leucin binden an die ligandenbindende Domäne eines einzelnen PPAR- γ Moleküls. Die Aktivierung von PPAR- γ erfolgt mit einer ähnlichen maximalen Effektivität wie bei Rosiglitazon. Fmoc-L-Leu verbessert somit auch die Insulinsensitivität in Tierstudien, jedoch mit einer geringeren Wirkung auf die Adipogenese.²²⁵

4.3.6.3 Pflanzliche PPAR- γ Liganden

Außer den endogenen und synthetischen Liganden wurden auch einige pflanzliche Verbindungen als PPAR- γ Agonisten identifiziert. So erwies sich Saurufuran A, ein Furanoditerpen von *Saururus chinensis*, einem chinesischen Heilkraut, in einem *in vitro* Assay als Aktivator von PPAR- γ mit einem EC₅₀-Wert von 16.7 μ M.²²⁶

Kuroda et al.²²⁷ zeigten in ihren Arbeiten, dass ein ethanolischer Extrakt aus Lakritze (*Glycyrrhiza uralensis*) beachtliche PPAR- γ Ligand-Bindungsaktivität besitzt. Nach Fraktionierung des Extraktes konnten die Forscher zwei Isoflavene, zwei 3-Arylcumarine und ein Isoflavanon als die aktiven Bestandteile hierbei identifizieren.

Aufgrund der Erkenntnis, dass bereits andere flavonoidhaltige Pflanzenextrakte eine Wirkung auf die Aktivität von PPAR- γ gezeigt haben, und da Pycnogenol ein ähnliches Wirkprofil wie der PPAR- γ Ligand Rosiglitazon aufweist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob auch Pycnogenol eine Aktivierung von PPAR- γ bewirken kann.

4.3.7 Entwicklung des ELISA für PPAR- γ

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von PPAR- γ in humanen Monocyten wurde ein indirekter Sandwich-ELISA entwickelt (Abbildung 31).

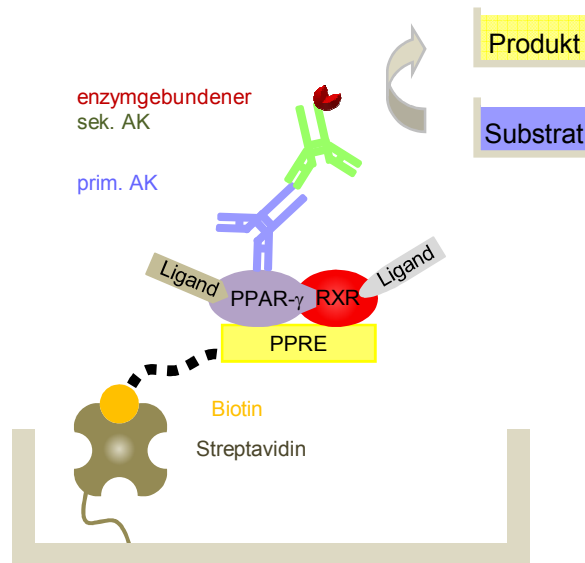


Abbildung 31: Schematische Darstellung des ELISA zur Quantifizierung von PPAR- γ . Das Biotin-gekoppelte PPRE Segment bindet an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte. Das im Zellkernextrakt enthaltene PPAR-RXR Heterodimer koppelt an das *Response Element* PPRE. Ein *anti-PPAR- γ* Antikörper bindet an den Rezeptor. Ein enzymmarkierter sekundärer Antikörper erkennt den Primärantikörper und bewirkt die Katalyse des Substrats TMB zum Produkt.

Die Sensitivität des Sandwich-ELISA hängt von vier Faktoren ab:

- (1) Die Zahl der Moleküle des Biotin-gekoppelten PPRE Fragments, die an Streptavidin-Moleküle binden.
- (2) Die Bindungsfähigkeit von PPAR- γ an PPRE.
- (3) Die Bindungsfähigkeit des primären Antikörpers (*anti-PPAR- γ*) an PPAR- γ .
- (4) Die Bindungsfähigkeit bzw. spezifische Aktivität des sekundären Antikörpers an *anti-PPAR- γ* .

Die Vertiefungen (*wells*) einer Polystyren-Mikrotiterplatte waren mit Streptavidin, einem 60 kDa Protein aus *Streptomyces avidinii*, beschichtet. Die Bindungskapazität für D-Biotin beträgt laut Herstellerangaben 25 pmol pro *well*. Die Menge an Biotin-markiertem PPRE wurde so gewählt, dass von der maximal möglichen Konzentration an Biotin-Molekülen, die an Streptavidin binden können, ausgegangen wurde. Darum wurde das synthetisierte und mit Biotin gekoppelte PPAR- γ *Response Element* in

einer Konzentration von 25 pmol pro *well* eingesetzt. Zwischen Biotin und PPRE wurde ein Spacer eingebaut, um sterische Hinderung bei der Bindung von PPAR- γ an PPRE zu vermeiden und die Sensitivität im Immunoassay zu erhöhen. Die Variation der Spacerlänge hatte allerdings keinen Einfluss auf das Resultat des ELISA; die gemessenen Konzentrationen an gebundenem PPAR- γ waren in beiden Fällen gleich.

Durch Aufkonzentration und Entsalzen der verwendeten Zellkernextrakt-Proben durch Ultrafiltration mittels Zentrifugation wurde eine Steigerung der Bindungsfähigkeit von PPAR- γ erzielt, was sich in deutlich höheren Absorptionen ausdrückte. Als primärer Antikörper wurde ein spezieller anti-PPAR- γ Antikörper gewählt, der die gewünschte Bindungsfähigkeit an PPAR- γ besaß. Der sekundäre Antikörper wurde aufgrund seiner Bindungsfähigkeit an den anti-PPAR- γ Antikörper ausgewählt. Die optimalen Konzentrationen der beiden Antikörper wurden mittels Schachbretttitration ermittelt (Abschnitt 10.2.6, C Experimenteller Teil). Dies diente zum einen dazu, unspezifische Bindung der Antikörper zu eliminieren, um falsch positive Werte ausschließen zu können, zum anderen sollte eine unnötig hohe Konzentration an Antikörper, die im Waschschrift entfernt wird, vermieden werden.

Neu an dieser Methode war, dass die PPAR- γ Konzentration in der Zelle direkt gemessen wurde, denn bisher konnte PPAR- γ nur indirekt über die Messung von Reporter genen bestimmt werden.

4.3.8 Ergebnisse des PPAR- γ ELISA

Ziel der folgenden Untersuchung war es, herauszufinden, ob ein Bestandteil oder Metabolit von Pycnogenol, der nach Absorption im humanen Organismus verfügbar ist, ein Ligand von PPAR- γ darstellen kann. Hierzu wurde ein ELISA zur Quantifizierung von PPAR- γ , das durch einen Liganden aktiviert und damit in eine DNA-bindungsfähige Konformation gebracht wurde, in Zellkernextrakten entwickelt. Anschließend konnte dann in einem *in vitro* Ansatz der Verlauf der PPAR- γ Aktivierung untersucht werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Wirkung von Rosiglitazon bzw. M1, sowie die Kombination beider Substanzen auf die Aktivierung von PPAR- γ untersucht.

4.3.8.1 Ergebnisse der Vorversuche – Variation von Konzentration und Inkubationszeit der Agonisten

Zunächst sollte in Vorversuchen untersucht werden, welchen Einfluss die Variation der Konzentration der Agonisten sowie der Inkubationszeit auf die Aktivierung von PPAR- γ besitzen. Hierzu wurden humane Monocyten mit 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M Rosiglitazon, Fenofibrat, Fmoc-Leucin sowie M1 für 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 h inkubiert.

Fenofibrat und Fmoc-Leucin bewirkten zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung von PPAR- γ im betrachteten Konzentrationsbereich; die gemessenen Absorptionen waren nicht von den unbehandelten Zellen (Monocyten ohne Zugabe eines Liganden) zu unterscheiden. Daher wurden diese Agonisten in den weiteren Versuchen nicht mehr eingesetzt.

Sowohl Rosiglitazon als auch M1 zeigten eine zeit- und dosisabhängige Aktivierung von PPAR- γ . Das Maximum war für beide Substanzen nach etwa 2–4 h und einer Konzentration zwischen 0.01 und 0.1 μ M erreicht. Nach 6 h ging die in den Zellkernextrakten gemessene PPAR- γ Konzentration wieder auf das Niveau unbehandelter Zellen zurück.

4.3.8.2 Ergebnisse der Vorversuche – Untersuchung der cytosolischen Extrakte aus humanene Monocyten auf PPAR- γ

Des Weiteren sollte überprüft werden, wie hoch die Konzentration des ligandengebundenen und somit DNA-bindungsfähigen PPAR- γ im Cytosol humaner Monocyten ist. Hierzu wurden die Monocyten mit 0.5 μ M Rosiglitazon für 4 h inkubiert und anschließend wie in Abschnitt 10.1.7 (C Experimenteller Teil) beschrieben mit High Salt Buffer lysiert. Die so gewonnenen cytosolischen Extrakte wurden anschließend auf ihren Gehalt an PPAR- γ hin untersucht.

Die mittels ELISA gemessenen Absorptionen lagen unterhalb der Nachweisgrenze (OD < 0.1). Somit konnte geschlussfolgert werden, dass der nukleäre Rezeptor PPAR- γ erwartungsgemäß wie in der Literatur²²⁸ beschrieben in cytosolischen Extrakten nicht vorhanden, sondern nur im Zellkern lokalisiert ist.

4.3.8.3 Ergebnisse der Vorversuche mit Makrophagen und Adipocyten

In Vorversuchen wurde auch die Konzentration des ligandengebundenen und somit DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ in Zellkernextrakten von humanen Makrophagen und murinen Adipocyten untersucht. Humane Makrophagen (differenziert aus 5 Tage alten Monocyten) und 3T3-Adipocyten wurden analog dem bekannten Protokoll (Abschnitt 10.1.7, C Experimenteller Teil) für 4 h mit 0.5 μ M Rosiglitazon inkubiert und anschließend Zellkernextrakte gewonnen und auf ihren Gehalt an PPAR- γ hin analysiert.

In den Zellkernextrakten der 3T3-Adipocyten war kein PPAR- γ nachweisbar. Obwohl PPAR- γ auch in Adipocyten exprimiert wird²²¹, scheint die Konzentration in diesem Fall nicht ausreichend zu sein, um entsprechende Absorptionen im ELISA zu erreichen. Die in den Makrophagen nachgewiesenen Konzentrationen von PPAR- γ waren mit denen der Monocyten vergleichbar; hier wurden die gleichen Absorptionen bestimmt und somit die gleiche Menge an PPAR- γ . Daher wurden in den folgenden Versuchen humane Monocyten verwendet, da hier auf einen zusätzlichen Zeitaufwand durch Differenzierung der Monocyten in Makrophagen verzichtet werden konnte.

Die gemessenen Plasmakonzentrationen von Rosiglitazon nach oraler Gabe von 1–8 mg liegen zwischen 0.21 und 1.67 μ M, je nach verabreichter Dosis.²⁰⁵ Aus diesem Grund wurden die Experimente im Folgenden mit 0.5 μ M Rosiglitazon durchgeführt, der Plasmakonzentration nach oraler Gabe von 4 mg. Die gemessene Plasmakonzentration von M1 nach oraler Gabe von 200 mg Pycnogenol beträgt 3 ng/ml (entspricht 14 nM).⁹⁶ Um realisierbare Konzentrationen im humanen Organismus nach oraler Applikation von Pycnogenol zu simulieren, wurde in den weiteren Versuche daher diese Konzentration verwendet. In Vorversuchen mit Rosiglitazon, bei denen die Inkubationszeit variiert wurde, zeigte sich, dass die höchsten PPAR- γ Konzentrationen nach 2–4 h erreicht wurden. Auch für M1 wurden die höchsten PPAR- γ Konzentrationen nach 2–4 h erreicht. Daher wurden die Zellen bei den weiteren Experimenten für 4 h mit dem jeweiligen Agonisten inkubiert.

4.3.8.4 Ergebnisse des PPAR- γ ELISAs nach Inkubation der Zellen mit M1 bzw. Rosiglitazon

Humane Monocyten wurden für 4 h mit 14 nM M1 oder 0.5 μ M Rosiglitazon oder beiden Substanzen zusammen inkubiert. Diese Konzentrationen repräsentieren die entsprechenden Plasmakonzentrationen der Testsubstanzen nach oraler Applikation einer Standarddosis.^{96;205} Anschließend wurden aus den Zellen Zellkernextrakte gewonnen und mit Hilfe des selbst entwickelten ELISA auf ihren Gehalt an PPAR- γ hin untersucht. Hierdurch sollte herausgefunden werden, ob der Pycnogenol-Metabolit M1 ebenfalls wie Rosiglitazon eine Aktivierung von PPAR- γ bewirken kann und/oder ob eine synergistische Wirkung nach Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen zu erkennen ist.

Sowohl Rosiglitazon als auch M1 bewirkten eine Zunahme der Konzentration des ligandenaktivierten und somit DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ in den Zellkernen humaner Monocyten (Abbildung 32 und Tabelle 35, D Tabellarischer Anhang), wobei der beobachtete Effekt für Rosiglitazon stärker ausgeprägt war als für M1.

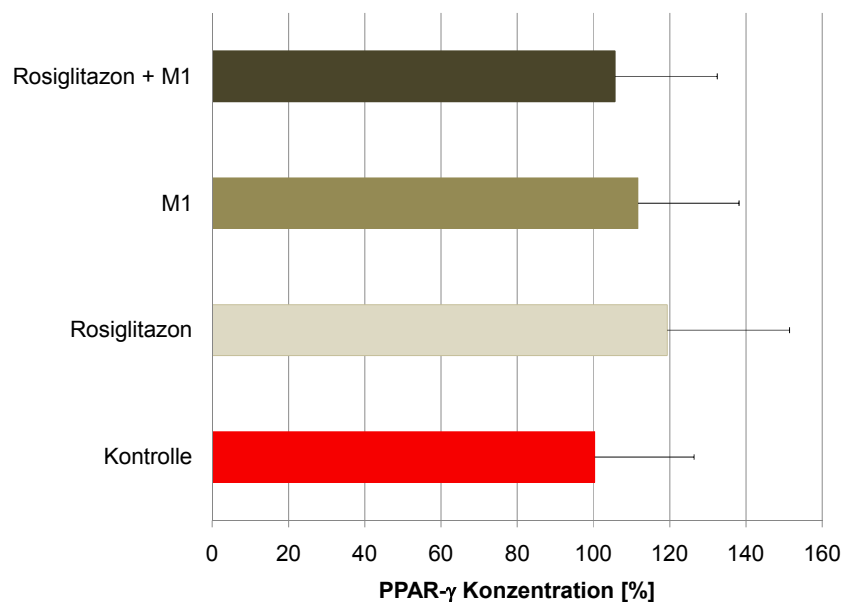


Abbildung 32: Konzentrationen des ligandenaktivierten und DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ humaner Monocyten, die für 4 h mit 0.5 μ M Rosiglitazon, 14 nM M1 oder beiden Substanzen gemeinsam inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen in Prozent von 5 unabhängigen Experimenten bezogen auf die Kontrolle (Zellen ohne Agonist; 100 %). Die Substanzen waren nicht statistisch signifikant verschiedenen von der Kontrolle (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

Der PPAR- γ Gehalt der Kontrolle (Zellen ohne Agonist) wurde auf 100 % gesetzt und die PPAR- γ Konzentration in den mit Agonisten inkubierten Zellen darauf bezogen. Die Inkubation der Zellen mit Rosiglitazon bewirkte eine an die DNA-gebundene PPAR- γ Konzentration von 119.37 ± 32.03 %; im Fall von M1 waren es 111.65 ± 26.54 %. Wurden beide Substanzen gemeinsam mit den Monocyten inkubiert, dann betrug die ligandenaktivierte und DNA-bindungsfähig gemachte PPAR- γ Konzentration 105.67 ± 26.77 %.

Da die im ELISA gemessenen Absorptionen stark schwankten und zum Teil trotz Entsalzen und Aufkonzentrieren der Zellkernextrakte unter einem OD von 0.1 lagen, wurde für die Berechnung dieser Ergebnisse nur eine Versuchsreihe herangezogen. Hierfür wurden Monocyten verwendet, die lediglich aus Buffy Coats zweier Spender isoliert und gepoolt wurden (nicht wie sonst üblich aus mehreren), um die Schwankungen der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Spender zu minimieren. Des Weiteren wurden die Zellkernextrakte nach deren Gewinnung sofort weiterverarbeitet, entsalzt, aufkonzentriert und direkt im ELISA eingesetzt, ohne die Proben zwischendurch einzufrieren. Diese Vorgehensweise hatte in Vorversuchen gezeigt, dass höhere PPAR- γ Konzentration nachweisbar waren im Vergleich zu Proben, die eingefroren wurden.

4.3.9 Diskussion der Ergebnisse des PPAR- γ ELISA

In diesem *in vitro* Experiment sollte die antidiabetische Wirkung von Pycnogenol auf zellulärer Ebene untersucht werden. Hierzu wurde zunächst ein auf PPAR- γ spezifischer ELISA entwickelt, da bisher PPAR- γ nur indirekt durch Messung von Reportergenen bestimmt wurde. Vorversuche zeigten, dass die PPAR- γ Konzentration in Adipocyten nicht nachweisbar war, dass aber sowohl in Zellkernen humaner Monocyten wie auch humaner Monocyten-abstammender Makrophagen PPAR- γ in etwa gleichen Mengen vorkam. Im Cytosol der Monocyten konnte kein PPAR- γ festgestellt werden. Diese Ergebnisse können auch durch einige Literaturstellen bestätigt werden. So haben Marx et al.²²⁸ mittels RT-PCR bzw. Western Blot nachgewiesen, dass Zellkernextrakte von frisch isolierten humanen Monocyten und Monocyten-abstammenden Makrophagen PPAR- γ mRNA bzw. Protein enthalten, die untersuchten cytosolischen Extrakte hingegen nicht. Auch Tontonoz et al.²²⁹ konnten die Expression von PPAR- γ mittels Immunfluoreszenz-

mikroskopie nachweisen, sowohl in humanen Monocyten, in Gewebe-Makrophagen, als auch in 3T3-L1 Adipocyten. Vermutlich waren die PPAR- γ Protein-Konzentrationen in den Adipocyten der eigenen Untersuchungen zu niedrig, als dass sie mittels ELISA erfasst werden konnten.

In den anschließenden Untersuchungen sollte getestet werden, ob der Metabolit M1 eine Aktivierung von PPAR- γ in humanen Monocyten bewirken kann, und ob eine parallele Inkubation von Rosiglitazon, das als PPAR- γ Agonist bekannt ist, mit M1 eine weitere Aktivitätssteigerung erzielen kann. Die Kontrolle (Zellen ohne Agonist) wurde auf 100 % gesetzt und die Testsubstanzen darauf bezogen. Es zeigte sich hier, dass M1 eine Zunahme der Konzentration des ligandenaktivierten und DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ im Vergleich zur Kontrolle erreichte (111.65 ± 32.03 %), die aber geringer war als die von Rosiglitazon (119.37 ± 32.03 %) und nicht statistisch signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurden in den Versuchen keine äquimolaren Mengen der Substanzen eingesetzt, sondern die im Plasma nachgewiesenen Konzentrationen nach oraler Gabe von Standarddosen. Daher ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen betrug die Zunahme der DNA-gebundenen PPAR- γ Konzentration 105.67 ± 26.77 % und war demzufolge geringer als bei Verwendung der Einzelsubstanzen.

Rieusset et al.²²¹ haben frisch isolierte humane Adipocyten adipöser Patienten mit 1 μ M Rosiglitazon für 4 h inkubiert und die Änderungen in der mRNA Expression unter anderem von Insulinrezeptoren, IRS-1, Lipoproteinlipase, GLUT 4, PPAR- γ 1 und PPAR- γ 2 untersucht. Hierbei konnten sie feststellen, dass die mRNA Spiegel von GLUT 4 um etwa 30 % und von PPAR- γ um etwa 12 % erhöht waren, aber nicht statistisch signifikant. Auch die mRNA Spiegel von IRS-1, Insulinrezeptoren und Lipoproteinlipase blieben unbeeinflusst. In den eigenen Untersuchungen wurde nach Inkubation der Monocyten mit 0.5 μ M Rosiglitazon für 4 h eine Zunahme der Konzentration an ligandenaktiviertem und an die DNA-gebundenem PPAR- γ von fast 20 % beobachtet. Das heisst, eine um die Hälfte geringere Konzentration an Rosiglitazon wie in den Untersuchungen von Rieusset²²¹ bewirkte bei vergleichbaren Versuchsbedingungen eine fast doppelt so hohe Zunahme der DNA-gebundenen PPAR- γ Konzentration in humanen Monocyten wie im Vergleich zu humanen Adipocyten.

Die Aktivierung von PPAR- γ durch Flavonoide in murinen Makrophagen war Gegenstand der Untersuchungen von Liang et al.²³⁰. Von den getesteten Verbindungen stimulierten Apigenin ($EC_{50} = 5 \mu\text{M}$), Chrysin ($EC_{50} = 10 \mu\text{M}$) und Kampferol ($EC_{50} = 10 \mu\text{M}$) die PPAR- γ Transkriptionsaktivität signifikant. Hingegen Flavanone und Flavan-3-ole erwiesen sich als ineffektiv. Dies veranlasste die Arbeitsgruppe zu der Schlußfolgerung, dass die C2-C3 Doppelbindung des C-Rings entscheidend für die Aktivierung von PPAR- γ sei. Auch die Position der Hydroxylgruppen hielten sie für ein wichtiges Kriterium. So waren OH-Gruppen in 5- und 7-Position am Ring A und 4'-Position am Ring B wie in Apigenin, Chrysin und Kampferol für die Stimulation der Transkriptionsaktivität von Bedeutung. Eine Hydroxylgruppe in 3'-Position des B-Rings hingegen erniedrigte die Aktivität von PPAR- γ , wie bei Luteolin und Quercetin zu beobachten war.

Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass die von Liang²³⁰ ermittelten hohen Konzentrationen von 5–10 μM der pflanzlichen polyphenolischen Verbindungen nach oraler Einnahme von z.B. Obst, Gemüse oder Tee im Plasma erreicht werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Plasmakonzentrationen von Pycnogenol-Bestandteilen und Metaboliten wesentlich geringer sind.⁹⁶ Nach oraler Einnahme von 200 mg Pycnogenol lagen die nachgewiesenen Plasmakonzentrationen im nanomolaren Bereich (z.B. (+)-Catechin: 207 nM, M1: 14 nM).

Da noch nicht alle Bestandteile von Pycnogenol bzw. Metabolite identifiziert wurden, die nach oraler Gabe des Kiefernrintenextraktes im humanen Organismus entstehen, ist es durchaus möglich, dass Verbindungen mit den oben genannten Kriterien existieren, die eine Aktivierung von PPAR- γ bewirken und folglich auch die klinisch beobachteten antidiabetischen Effekte von Pycnogenol erklären könnten. Daher wäre ein sinnvoller Ansatz für weitere Untersuchungen, die Inkubation der humanen Monocyten mit den Serumproben nach Mehrfachgabe des Extraktes (Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil) und anschließende Quantifizierung des PPAR- γ Gehalts in den Zellkernen mittels ELISA. Des Weiteren sollte ebenfalls eine Untersuchung mit einem PPAR- γ Antagonisten (z.B. GW 9662) parallel dazu erfolgen, bei der der Antagonist 1 h vor Zugabe der Positivkontrolle bzw. der Testsubstanzen mit den Zellen inkubiert wird. Der Antagonist bewirkt die Aufhebung der Wirkung der Positivkontrolle (keine Zunahme der PPAR- γ Konzentration). So kann überprüft werden, ob die Aktivierung von PPAR- γ durch Testsubstanzen ebenfalls rückgängig gemacht werden kann.

Dieser Versuch mit dem Antagonisten könnte möglicherweise auch einen Hinweis darauf geben, warum die Kombination aus M1 und Rosiglitazon zu einer verminderten Aktivierung von PPAR- γ im Vergleich zu den Einzelsubstanzen führt, je nachdem, ob der Antagonist nur die Wirkung von Rosiglitazon aufhebt oder auch die des Metaboliten M1. Vermutlich liegt hier eine gegenseitige Beeinflussung von Rosiglitazon und M1 bei der Bindung an PPAR- γ vor. Auch besteht eine gewisse Strukturähnlichkeit zwischen M1 und Rosiglitazon (siehe Abbildung 33), so dass möglicherweise auch eine kompetitive Bindung an die Ligandbindungsstelle vorliegt.

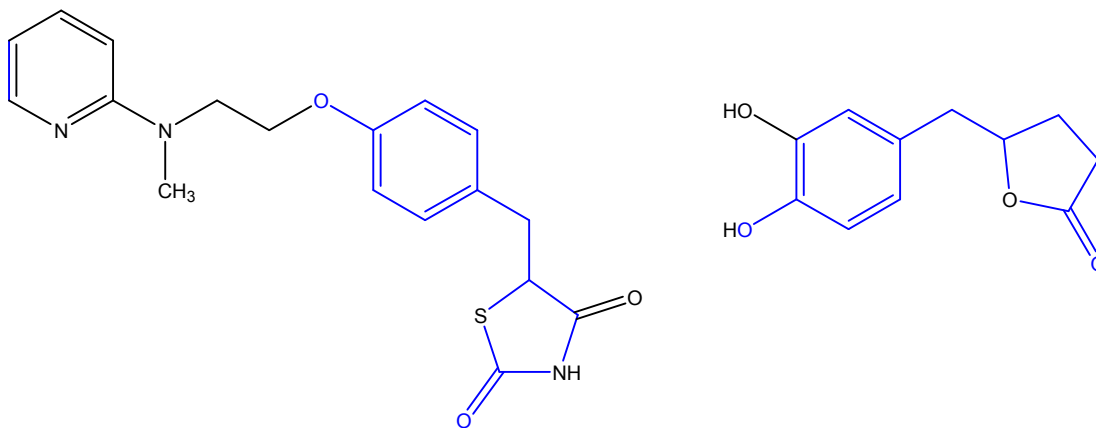


Abbildung 33: Strukturformel von Rosiglitazon (links) und Metabolit M1 (rechts). Die strukturell ähnlichen Bausteine der beiden Verbindungen sind blau hervorgehoben.

Huang et al.²³¹ zeigten, dass eine sechswöchige Gabe eines methanolischen Extraktes von *Punica granatum* die Plasmagluconespiegel in diabetischen Zucker Ratten senkte, einem genetischen Tiermodell für Typ 2 Diabetes. Mittels RT-PCR bestätigten sie die Ergebnisse anhand einer verbesserten PPAR- γ mRNA Expression. Auch *in vitro* Untersuchungen bekräftigten eine erhöhte Expression von PPAR- γ mRNA und Protein in humanen THP-1 differenzierten Makrophagen. Phytochemische Untersuchungen identifizierten den *Punica granatum* Bestandteil Gallussäure als Hauptverantwortlichen für diese beobachteten Aktivitäten. 5 $\mu\text{g/ml}$ Gallussäure bewirkten eine Zunahme der PPAR- γ Proteinexpression um das 1.68-fache nach Inkubation der Zellen für 48 h. Strukturell unterscheidet sich Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure), die auch ein Bestandteil von Pycnogenol ist, stark von bekannten TZDs, die sich durch ihren Thiazolidindionring mit daran gebundenen divergierenden molekularen Untereinheiten auszeichnen (vgl. Abschnitt 4.3.6.2). Der genaue Mechanismus der PPAR- γ Aktivierung durch

Gallussäure ist noch nicht geklärt. Allerdings geben auch diese Ergebnisse von Huang²³¹ einen Hinweis darauf, dass neben den bekannten PPAR- γ Agonisten mit den charakteristischen Strukturmerkmalen noch weitere Verbindungen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors bewirken können.

4.4 Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Metaboliten von Pycnogenol auf die GLUT-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie

Wie schon erwähnt (Abschnitt 4.1.1) üben Thiazolidindione ihre blutglucosesenkende Wirkung auch durch Steigerung der Translokation von Glucosetransportern (GLUT) aus.¹³ Auch grünem Tee wird eine positive Wirkung auf metabolische Defekte und Insulinresistenz nachgesagt. So konnten Wu et al.²³² in ihren Untersuchungen mit diabetischen Sprague-Dawley Ratten nachweisen, dass die zwölfwöchige Gabe von grünem Tee Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und erhöhten Blutdruck senken kann. Ihre Beobachtungen begründeten sie dabei mit einer durch grünen Tee verursachten erhöhten Expression von GLUT-4 auf den Adipocyten.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollte untersucht werden, ob ein Bestandteil und/oder Metabolit von Pycnogenol, der nach Absorption im humanen Organismus verfügbar ist, ebenfalls eine Steigerung der Exocytose des Glucosetransporter-4 auf der Oberfläche von Adipocyten bewirken kann.

4.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Grundlagen der Durchflusszytometrie wurden 1949 von Wallace Coulter²³³ gelegt. Er beantragte ein Patent zur Zählung von gelösten Partikeln und erleichterte damit die Leukocytenzählung bei der Blutanalyse. Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung durch Van Dilla²³⁴. Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen, etc.) in einem Flüssigkeitsstrom. Die gebräuchlichste Anwendung besteht darin, mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Proben (Antikörpern, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte strukturelle Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen, auf Einzelzellebene zu analysieren.

4.4.2 Aufbau eines Durchflusszytometers

Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers (Abbildung 34) besteht aus einem Flüssigkeitssystem (Trägerflüssigkeit), das die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben in der Flusskammer an einem Laserstrahl vorbeileitet. Als Lichtquelle werden ein oder mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlängen verwendet, um damit mehrere Zelleigenschaften parallel zu erfassen. Das von der Probe emittierte Licht wird zu Photodetektoren und Photomultipliern gelenkt, die die Signale detektieren und digitalisieren.

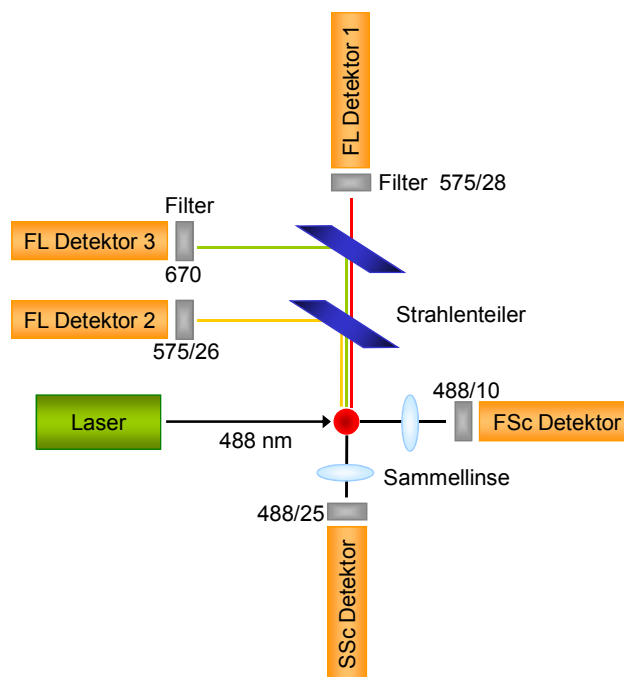


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Strahlenganges eines Durchflusszytometers. Der Argon-Laser emittiert Licht der Wellenlänge 488 nm. Die Zellen streuen das Licht und emittieren Fluoreszenzlicht analog ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften. Diese Lichtsignale werden von den Detektoren in elektrische Signale und anschließend von einem Analog/Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt.

Die Bestimmung der Glucosetransporter-Dichte auf der Oberfläche der Adipocyten wurde mit Hilfe des Coulter Epics XLTM Flow Cytometers durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen Argonlaser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert.

4.4.3 Prinzip der optischen Quantifizierung von Oberflächenbestandteilen oder intrazellulären Proteinen

Die Fokussierung der Einzelzellsuspension zu einem dünnen Strahl, der nur eine Zelle im Querschnitt des Messbereichs enthält (monodisperse Lösung), ist eine Grundvoraussetzung für die Durchflusszytometrie. Dies wird durch eine sogenannte hydrodynamische Fokussierung erreicht, bei der die Zellen umgeben von einer Trägerflüssigkeit (engl.: *sheath fluid*) in laminarer Strömung durch eine geometrische Verengung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet werden. Der Laserstrahl trifft im rechten Winkel in der Photoküvette auf den Partikelstrom und wird an den Partikeln gestreut. Sammellinsen bündeln die in einem engen Winkel (1° – 20°) aufgefangene Vorwärtsstreuung (engl.: *forward scatter*, FSc) und die im 90° -Winkel registrierte Seitwärtsstreuung (engl.: *side scatter*, SSc) sowie emittierte Fluoreszenzsignale.

Vorwärts und seitlicher Scatter werden für die vorlimitierende Identifikation von Zellen verwendet. Dabei korreliert die Vorwärtsstreuung mit dem Zellvolumen, und die orthogonal gestreute Lichtintensität hängt von der internen Komplexität des Partikels (z.B. Größe des Nukleus, Granularität des Zytoplasmas oder Beschaffenheit der Membran) ab (Abbildung 35).

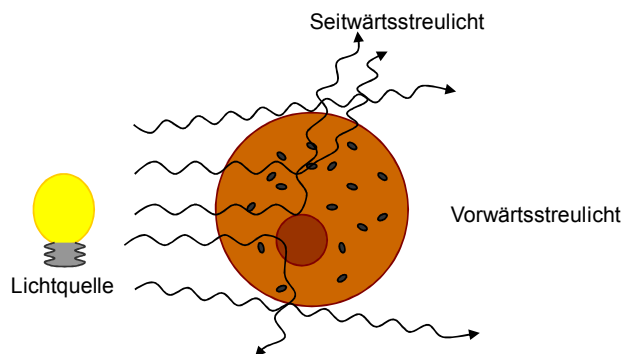


Abbildung 35: Darstellung der Lichtstreuung an einer Zelle. Das Vorwärtsstreulicht ist proportional zur Zellgröße bzw. -oberfläche und entspricht dem gebeugtem Licht. Es wird entlang der Achse des einfallenden Lichts mittels einer Photodiode detektiert. Das Seitwärtsstreulicht ist proportional zur Zellgranularität und entsteht aus der Messung des gebrochenen und reflektierten Lichts, das bei jedem Berührungspunkt in der Zelle durch Änderung des refraktären Index auftritt.

Voraussetzung für die optische Quantifizierung von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zelloberflächenbestandteilen ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photonendetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. In einer Blutprobe können so z.B. Lymphocyten, Monocyten und Granulocyten auf Basis des Vorwärts- und seitlichen Scatters definiert und Debris sowie tote Zellen ausgeschlossen werden.

Die vom optischen System fokussierten und getrennten Lichtsignale treffen auf die Detektoren, wobei elektrische Signale proportional zur Intensität des einfallenden Lichts erzeugt werden. Diese elektrischen Signale werden entweder linear (Scatter) oder logarithmisch (Fluoreszenzen) verstärkt und über einen Analog/Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt, die am Computer weiterverarbeitet werden können.

4.4.4 Detektoren und Fluoreszenzfarbstoffe

In der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenzfarbstoffe zumeist in Form von an Antikörper konjugierte Markern genutzt. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes kann mit drei Fluoreszenz- (FL) bzw. zwei Streudetektoren mit fest eingestellten Filtersets erfolgen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Detektoren mit zugehörigen Filtern und detektiertem Fluoreszenzfarbstoff.

| Detektor | Absorption | Emission | Fluoreszenzfarbstoff |
|----------|------------|-----------|----------------------|
| SSc | 488 nm | 425 nm | — |
| FSc | 488 nm | 410 nm | — |
| FL-1 | 490 nm | 520 nm | FITC |
| FL-2 | | 575/26 nm | Propidiumiodid |
| FL-3 | 550 nm | 650 nm | Propidiumiodid |

Fluorescein, das irrtümlicherweise mit seiner allgemein verwendeten reaktiven Isothiocyanat-Form, FITC, abgekürzt wird, ist zurzeit der am meisten verwendete Fluoreszenzfarbstoff für die Durchflusszytometrie. FITC ist ein kleines, organisches Molekül und wird typischerweise an Proteine über primäre Amine (wie z.B. Lysin) konjugiert. Der Antikörper reagiert mit der schweren und der leichten Kette des Maus-Immunglobulin G, die den meisten Maus-IgGs gemein ist. Generell konjugieren drei bis sechs FITC-Moleküle an einen Antikörper. Höhere Konjugationen können in Löslichkeitsproblemen wie auch internem Quenching und damit auch in reduzierter Lichtintensität resultieren. Fluorescein wird bei einer Wellenlänge von 490 nm durch einen Argonlaser angeregt und seine Emission bei 520 nm bestimmt.

Propidiumiodid, dessen Maximum bei 617 nm liegt, wird zur Markierung von totem Material eingesetzt. Dieser kationische Farbstoff dringt in nekrotische Zellen durch die geschädigte Zell- und Kernmembran ein, interkaliert in die DNA und macht somit tote Zellen im Durchflusszytometer detektierbar.

4.4.5 Der Glucose-Transport

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Lipiddoppelschicht können die hydrophilen Zuckermoleküle diese nicht durchdringen. Der Transport in das Cytosol wird durch aktive oder passive Transportsysteme realisiert, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Der Energie-unabhängige Transport der Glucose entlang eines Konzentrationsgradienten erfolgt durch zwei Familien von Hexosetransporterproteinen: Glucosecarrier (Glucosetransporter, GLUT) und Natrium-Glucose-Cotransporter (Symporter, SGLT).⁵ Aufgabe dieser Glucosetransportproteine ist es, die Zellen mit Energie zu versorgen und dabei die Glucosekonzentration im Blut in einem engen Rahmen zu halten, der etwa bei 5 mM liegt.

Der erste Schritt des Glucosemetabolismus ist der Transport in die Zelle, wo die Glucose umgehend durch Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird. Hierdurch wird zum einen die Diffusion aus der Zelle verhindert, und zum anderen dient die Phosphorylierung gleichzeitig zur Aktivierung des Glucosemoleküls, die nötig ist, um sie in den Energiegewinnungskreislauf einzuschleusen (Abbildung 36). Die reverse Reaktion wird durch das Enzym Glucose-6-phosphatase katalysiert.⁵

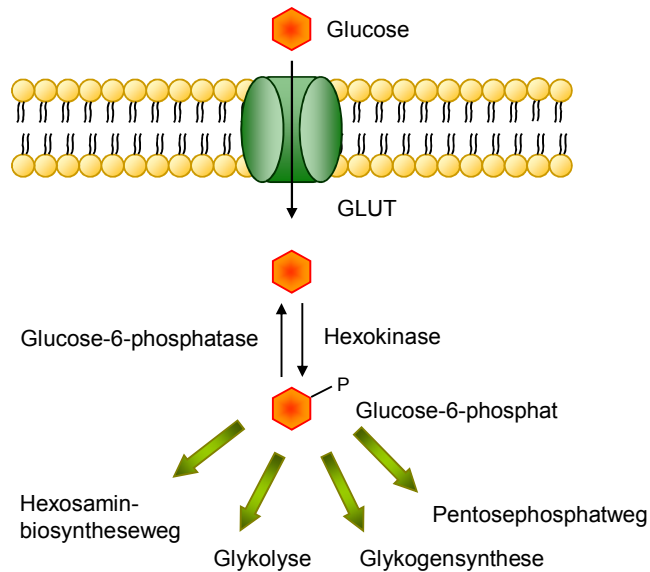


Abbildung 36: Schematische Darstellung der metabolischen Reaktionswege der Glucose: Glucosetransport in die Zelle, Phosphorylierung (Aktivierung) und Verwertung der Glucose in Glykolyse, Glykogensynthese, Pentosephosphatweg und Hexosaminbiosyntheseweg.

In der Zelle umfasst die Glucoseverwertung verschiedene Mechanismen wie die Glykolyse, die Glykogenbildung und die Umwandlung zu anderen Intermediaten z.B. im Pentosephosphatweg oder Hexosaminbiosyntheseweg.⁵

4.4.6 Klassifizierung der Glucosetransporter

Die zelluläre Glucoseaufnahme wird durch eine Familie von Glucosetransportern geregelt, die Unterschiede in ihrer Kinetik, Substratspezifität und gewebespezifischen Expression aufweisen. Bis heute wurden 13 funktionelle Hexosecarrier durch molekulares Klonen charakterisiert. Strukturell besitzen diese Proteine zwölf membrandurchspannende Helices, mit einer relativ großen intrazellulären Schleife, die die sechste und siebente Helix verbindet. Der Transport der Glucose ist sättigbar und verläuft stereoselektiv sowie in zwei Richtungen.⁵

Entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit wurden drei Klassen von Glucosetransportern definiert. Klasse I beinhaltet die hoch affin bindenden Proteine GLUT-1, GLUT-3 und GLUT-4 und die niedriger affinen Transporter GLUT-2. Zu Klasse II gehören GLUT-5, GLUT-7, GLUT-9 und GLUT-11 sowie die Myoinositoltransporter (HMIT-1), die eine sehr niedrige Affinität zu Glucose haben und

vorzugsweise Fructose transportieren. Klasse III umfasst GLUT-6, GLUT-8, GLUT-10 und GLUT-12.⁵

4.4.7 Der Glucosetransporter GLUT-4

In den eigenen Experimenten wurde der Glucosetransporter-4 untersucht, da es sich hierbei um einen gängigen Transporter auf Adipocyten handelt. GLUT-4 ist ein insulinregulierter Glucosetransporter und somit hormonell gesteuert. Er wird vor allem in Skelettmuskeln, dem Herzmuskel und braunem und weißem Fettgewebe exprimiert. Es handelt sich hierbei um einen hoch affinen Transporter, der einen geringen K_m -Wert besitzt, das heisst der Transporter funktioniert bei Geschwindigkeiten nahe der Maximalgeschwindigkeit v_{max} . Folglich beeinflusst seine Konzentration und seine Präsentation an der Zelloberfläche stark die Glucoseaufnahme in die Zelle.

Unter basalen Bedingungen ist die GLUT-4 vermittelte Glucoseaufnahme innerhalb der entsprechenden Gewebe recht gering, da die Mehrheit von GLUT-4 in intrazellulären Speicherkompartimenten (Vesikeln) vorliegt. Insulin jedoch steigert den Glucosetransport pro Zelle innerhalb von zehn Minuten bis um den Faktor 40. Der Glucosetransport beruht dabei auf dem schnellen Einbau von GLUT-4 Molekülen in die Plasmamembran, der über einen komplizierten Mechanismus einer Signalkette gelenkt wird, deren Ursprung auf der Reaktion des Insulinrezeptors mit seinem Liganden beruht. Hierdurch werden die Oberflächenexpressionsspiegel von GLUT-4 durch Erhöhung der Rate von Externalisierung und Reduktion der Rate von Internalisierung gesteigert, so dass in Adipocyten der Anteil von GLUT-4 auf der Zelloberfläche von < 10 % in Abwesenheit von Insulin auf 35–50 % in Gegenwart von Insulin ansteigt.^{205,235-237}

Der Verlauf der Umverteilung von GLUT-4 aus den intrazellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche von 3T3-Adipocyten wurde von Bogan et al.²³⁸ als biphasig beschrieben. Nach Insulingabe erfolgt eine initiale schnelle Externalisierung von GLUT-4, so dass der Anteil von GLUT-4 innerhalb von 4–5 min auf der Plasmamembran um das Fünffache ansteigt. Anschließend nimmt die Glucosetransporterichte auf der Plasmamembran um 20–40 % ab und erreicht etwa 15–20 min nach Insulingabe einen *steady state*.²³⁸

4.4.8 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen

In dieser *in vitro* Untersuchung sollten die in klinischen Studien beobachteten glucosesenkenden Effekte von Pycnogenol auf molekularer Ebene genauer beleuchtet werden. Hierbei interessierte die Wirkung des Pycnogenol-Bestandteils (+)-Catechin und des Metaboliten M1, die nach Absorption im humanen Organismus verfügbar sind, auf die Exocytose des Glucosetransporter 4. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie sollte untersucht werden, ob ein dieser Metabolit von Pycnogenol eine Erhöhung der GLUT-4 Dichte auf der Plasmamembran von Adipocyten erzielen kann. In den ersten Ansätzen wurden humane Adipocyten verwendet, später aus Kostengründen und aufgrund der etwas einfacheren Handhabung murine 3T3 Adipocyten.

4.4.8.1 Ergebnisse der Vorversuche – Untersuchung der unspezifischen Bindungen

Um die spezifische Bindung der Antikörper von unspezifischen zu unterscheiden, erfolgte vor Messung der eigentlichen Proben die Untersuchung der Negativkontrolle. Die Adipocyten dieser Probe wurden lediglich mit dem Sekundärantikörper (FITC-markiert) inkubiert, aber nicht mit dem Primärantikörper (anti-GLUT-4). Zellen besitzen freistehende Proteinbrücken, welche unspezifisch mit Antikörpern interagieren können. Diese unspezifischen Bindungen müssen zunächst definiert werden, um im Folgenden von der spezifischen Antikörper-Fluoreszenz unterschieden werden zu können. Alle Fluoreszenzsignale oberhalb dieses definierten Negativbereichs wurden als „positiv“ betrachtet. Der Anteil der Fluoreszenzintensität aufgrund unspezifischer Bindungen lag bei allen Versuchen unter 0.1 %. Die Negativkontrolle wird oft auch als sekundäre Kontrolle bezeichnet.

Bei allen folgenden Ansätzen wurde stets eine Isotypkontrolle und eine sekundäre Kontrolle parallel zu den zu analysierenden Proben mitvermessen.

4.4.8.2 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin

8–10 Tage alte ausdifferenzierte Adipocyten wurden für 2 bzw. 24 h mit 0.5 μ M Rosiglitazon, 14 nM Metabolit M1 oder 207 nM (+)-Catechin vorinkubiert und anschließend für 30 min mit 0.1 U/L Insulin (entspricht 0.6 nM) stimuliert. Die für Rosiglitazon, M1 und (+)-Catechin gewählten Konzentrationen entsprechen den im Plasma nachgewiesenen Konzentrationen nach oraler Gabe der Substanzen.^{96,205} Die Zellen wurden anschließend mit anti-Glut-4 und einem FITC-markierten Sekundärantikörper markiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

Die Nüchtern-Plasmainsulinkonzentration beträgt in Diabetikern etwa 0.31 nM, in nicht-Diabetikern etwa 0.29 nM.²³⁹ Daneman et al.²⁴⁰ konnten in ihren Experimenten mit humanen zirkulierenden mononukleären Zellen (CMCs) zeigen, dass physiologische Konzentrationen an Insulin einen raschen Anstieg der Glucosetransportrate bewirken, wobei bereits innerhalb von 30 min ein Plateau erreicht wurde. Die maximale Stimulation der Hexoseaufnahme lag hier bei 1–2 nM Insulin. Auch Estrada et al.²⁴¹ untersuchten den zeitlichen Verlauf der Glucoseaufnahme und kamen zu demselben Schluss, dass innerhalb von 30 min nach Insulinstimulation ein Plateau in CMCs erreicht ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde daher die in den eigenen Versuchen eingesetzte Insulinkonzentration von 0.1 U/L sowie eine Inkubationszeit von 30 min gewählt.

Aufgrund von immer wieder auftretenden technischen Problemen des Durchflusszytometers sowie des damit verbundenen Computers war die Reproduktion der Messungen schwierig und die Menge an auswertbaren Ergebnissen sehr begrenzt. Daher konnten leider nur drei Versuchsansätze als geeignet angesehen und im Folgenden analysiert werden.

Bei Vorinkubation der murinen Adipocyten für 2 h mit den entsprechenden Testsubstanzen zeigte sich, dass bei allen drei Proben eine Zunahme der GLUT-4 Dichte auf der Adipocytenoberfläche im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu erkennen war. Allerdings war die Anzahl der gemessenen Glucosetransporter geringer als bei Stimulation der Zellen mit Insulin alleine (Abbildung 37 und Tabelle 36, D Tabellarischer Anhang). Nach Inkubation der Adipocyten mit Insulin betrug der Anteil GLUT-4 positiver Zellen auf der Plasmamembran 12.90 ± 2.10 %; nach Vorbehandlung mit Rosiglitazon waren es 12.40 ± 1.18 %, nach Vorbehandlung mit M1 11.83 ± 1.31 % und nach Vorbehandlung mit (+)-Catechin 12.50 ± 0.17 %.

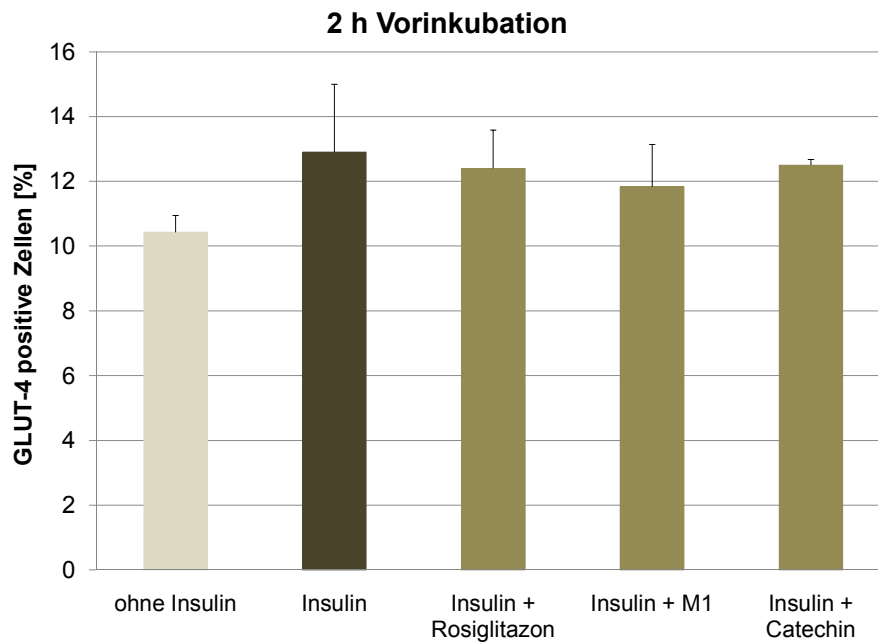


Abbildung 37: Anteil GLUT-4 positiver Zellen auf der Plasmamembran von murinen Adipocyten nach Vorinkubation der Zellen mit 0.5 μ M Rosiglitazon, 14 nM M1 bzw. 207 nM (+)-Catechin für 2 h und anschließender Stimulation mit Insulin für 30 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen in Prozent von drei unabhängigen Experimenten.

Insulin bewirkte eine deutliche Zunahme der Exocytose von GLUT-4 auf den murinen Adipocyten, die allerdings durch Vorinkubation der Zellen für 2 h mit den Testsubstanzen geringfügig reduziert wurde.

Bei Vorinkubation der Zellen für 24 h mit denselben Testsubstanzen zeigte sich ein etwas anderes Bild. Wiederum bewirkte Insulin eine Zunahme der GLUT-4 Dichte auf der Adipocytenoberfläche von 8.30 ± 1.67 % (unstimulierte Zellen) auf 10.13 ± 2.58 %, doch hier bewirkten sowohl Rosiglitazon als auch M1 eine weitere Erhöhung auf 12.10 ± 1.45 % bzw. 12.93 ± 1.00 %. Die Vorbehandlung der Zellen mit (+)-Catechin lieferte lediglich einen GLUT-4 Anteil von 9.36 ± 0.75 %, der somit geringer war als die mit Insulin stimulierten Zellen (Abbildung 38 und Tabelle 37, D Tabellarischer Anhang).

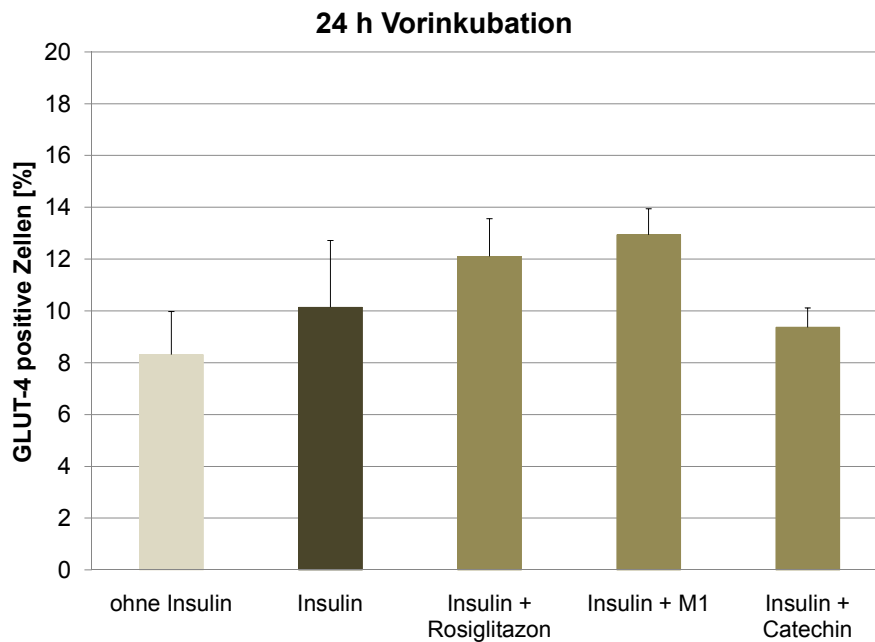


Abbildung 38: Anteil GLUT-4 positiver Zellen auf der Plasmamembran von murinen Adipocyten nach Vorinkubation der Zellen mit 0.5 μ M Rosiglitazon, 14 nM M1 bzw. 207 nM (+)-Catechin für 24 h und anschließender Stimulation mit Insulin für 30 min. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen in Prozent von drei unabhängigen Experimenten.

4.4.9 Diskussion der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Exocytose von GLUT-4

Eine reduzierte Expression von GLUT-4 auf der Zelloberfläche ist die vorherrschende Veränderung, die für die Entwicklung der Insulinresistenz verantwortlich ist.²⁰⁵ Eine Steigerung der Exocytose von GLUT-4 könnte einer Insulinresistenz und somit einem Symptom des metabolischen Syndroms entgegenwirken.

Von den Effekten der Thiazolidindione (TZDs) auf die Aktivität und Expression von Glucosetransportern in Adipocyten wurde seit Entwicklung dieser Agenzien berichtet. Allen TZDs gemein ist die Beobachtung (unabhängig von verwendetem Tiermodell oder Substanz), dass sie die Glucosetransporteraktivität wie auch deren Expression erhöhen.²⁴²⁻²⁴⁴ Diese Änderungen werden begleitet von einer Reduktion der Nüchtern-Blutglucose- und Insulinspiegel. Daher war bisher unklar, ob die beobachteten Effekte der Thiazolidindione auf den Glucosetransport bzw. Transporter direkt erfolgen oder aufgrund von Änderungen der metabolischen Umgebung entstehen.²⁴⁵

In einem *in vitro* Experiment sollte daher untersucht werden, ob ein Bestandteil oder Metabolit von Pycnogenol, der nach Absorption im humanen Organismus verfügbar ist, eine Steigerung der Exocytose von GLUT-4 bewirken kann. Hierbei zeigte sich, dass eine 30-minütige Inkubation von Adipocyten mit Insulin eine Zunahme der GLUT-4 Menge auf der Membran um rund 23 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen bewirkte. Die Vorinkubation der Adipocyten mit Rosiglitazon für 2 h erniedrigte die durch das Hormon erzielte Erhöhung der GLUT-Dichte, wohingegen nach 24 h eine deutlich synergistische Wirkung von Insulin und Rosiglitazon zu erkennen ist, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Den gleichen Effekt konnte man auch bei Vorinkubation der Zellen mit dem Metaboliten M1 sehen, der nach 2 h eine Reduktion der durch Insulin hervorgerufenen gesteigerten Exocytose bewirkte, nach 24 h jedoch eine zusätzliche Steigerung dieser, die sogar die Wirkung von Rosiglitazon geringfügig übertraf. (+)-Catechin bewirkte in beiden Fällen eine Senkung der Glucosetransporterichte im Vergleich zu den Hormon-stimulierten Zellen.

Auch Nugent et al.²⁴⁶ behandelten 3T3-L1 Adipocyten 7–9 Tage nach Induktion der Differenzierung für verschiedene Zeitspannen (1, 2, 4, 6, 24 und 48 h) mit 1 μ M Rosiglitazon. Dabei stellten sie nur nach 48 h eine statistisch signifikant erhöhte Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme um das 1.7-fache fest ($P < 0.001$). Die basale Glucoseaufnahme wurde 24 und 48 h nach Rosiglitazon-Behandlung statistisch signifikant verstärkt. Insulin bewirkte dabei eine 4.5-fache Zunahme von GLUT-4 auf der Plasmamembran der Zellen; Rosiglitazon hingegen hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Exocytose des Glucosetransporters. Diese Ergebnisse decken sich mit den in den eigenen Untersuchungen gemachten Beobachtungen. Eine kurzfristige Behandlung der Zellen mit Rosiglitazon oder den anderen Testsubstanzen bewirkte keine gesteigerte Expression von GLUT-4. Aber nach 24-stündiger Vorinkubation erzielten sowohl Rosiglitazon als auch M1 eine im Vergleich zu den Insulin-stimulierten Zellen erhöhte Zahl der Glucosetransporter auf der Adipocytenoberfläche, die allerdings auch hier nicht statistisch signifikant war. Diese Beobachtungen zeigten, dass eine kurzfristige Behandlung der muren Adipocyten keine Auswirkungen auf die Umverteilung des Glucosetransporters hat, sondern erst bei langfristiger Behandlung der Zellen das Gleichgewicht aus Internalisierung und Externalisierung zugunsten der Exocytose verschoben wird. Eine gesteigerte Expression von GLUT-4 konnte ausgeschlossen werden, da von

anderen Forschern²⁴⁷ belegt wurde, dass TZDs nur in reifenden Adipocyten, aber nicht in ausdifferenzierten Zellen die Expression erhöhen können. Vermutlich waren die Konzentrationen der Substanzen in den eigenen Versuchen zu gering, um einen signifikanten Effekt zu erzielen. Andere Forscher^{246,248} verwendeten bei ihren Experimenten 2–20-fach höhere Rosiglitazonkonzentrationen, wohingegen in den eigenen Untersuchungen die Plasmakonzentrationen der Substanzen nach oraler Gabe von Pycnogenol eingesetzt wurden.

Einen ähnlichen Versuchsaufbau und vergleichbare Resultate wie Nugent²⁴⁶ beschrieben Hernandez et al.²⁴⁸. Sie zeigten, dass eine 24-stündige Inkubation von Rattenadipocyten mit 10 µM Rosiglitazon einen Anstieg der Insulin-stimulierten (10 nM für 5 min) Glucoseaufnahme um 40 % im Vergleich zu den nur mit Insulin behandelten Zellen bewirkte. Die Expression von GLUT-4 mRNA und Protein blieb allerdings unverändert. Daher erklärten sie diese Beobachtungen mit einer gesteigerten Translokation von GLUT-4 an die Plasmamembran. Rosiglitazon alleine konnte diesen Effekt nicht erzielen und bewirkte lediglich eine geringfügig erhöhte Glucoseaufnahme im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen. Diese Ergebnisse veranlassten die Forscher zu dem Schluß, dass Thiazolidindione die GLUT-4 Konzentration einer Zelle nicht beeinflussen, sondern lediglich die Umverteilung der Glucosetransporter aus den intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran beschleunigen.

Ganz im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Sandouk et al.²⁴⁷, die 3T3-F442A Präadipocyten 7 Tage lang mit 1 µg/ml Insulin und 1 µM Pioglitazon während der Differenzierung in Adipocyten behandelt haben. Mittels Northern Blot und Western Blot analysierten sie den GLUT-4 mRNA und Protein Gehalt der ausdifferenzierten Adipocyten. Eine Inkubation der Zellen nur mit Insulin bewirkte eine Erhöhung der GLUT-4 Proteinkonzentration um das 2.2-fache im Vergleich zu den undifferenzierten Präadipocyten; die Pioglitazonbehandlung alleine erzielte eine Zunahme um das 6.6-fache und bei Kombination von Insulin und Pioglitazon war eine Steigerung um das 4-fache zu verzeichnen. Aus dem Vergleich der Ergebnisse von Hernandez²⁴⁸, Sandouk²⁴⁷ wie auch anderer Forscher²⁴²⁻²⁴⁴ kann man schließen, dass TZDs die Glucoseaufnahme in die Zellen über zwei Mechanismen verbessern. Zum einen bewirken sie eine Erhöhung der mRNA und Proteinexpression von GLUT-4 während der Differenzierung der Präadipocyten in Adipocyten und zum anderen normalisieren sie die bei Typ 2 Diabetikern reduzierte Externalisierung von

GLUT-4 in die Plasmamembran in ausgereiften Adipocyten. Allerdings können mRNA und Proteinspiegel der Glucosetransporter in den muren Zellen nicht weiter durch TZD-Behandlung gesteigert werden.

Ob auch (+)-Catechin bzw. der daraus entstehende Metabolit M1 einen Einfluss auf die Exocytose von GLUT-4 haben, geht aus den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen nicht eindeutig hervor. Da nur drei auswertbare Experimente zur Verfügung standen ist eine aussagekräftige Schlussfolgerung nicht möglich und es lässt sich nur eine Tendenz vermuten. So scheint die Behandlung von ausgereiften Adipocyten mit dem Metaboliten M1 eine durchaus mit Rosiglitazon vergleichbare Wirkung auf die Translokation des Glucosetransporters zu besitzen. Daher wäre es sinnvoll, weitere Wiederholungen dieses Experimentes zu machen, wobei in erster Linie eine längere Vorinkubation (24 oder 48 h) der Adipocyten mit den Testsubstanzen zu empfehlen wäre. Als Alternative zur Durchflusszytometrie liese sich der Glucosetransporter auch mittels Western Blot nachweisen, wobei hier der Gesamtgehalt von GLUT-4 in der Zelle gemessen wird. In einem weiteren Versuchsansatz könnten dann die Adipocyten mit den Serumproben nach Mehrfachgabe von Pycnogenol (Abschnitt 1.2.4, C Experimenteller Teil) inkubiert und die Glucosetransporterichte auf den Zellen analysiert werden. Da noch nicht alle Bestandteile von Pycnogenol bzw. Metabolite identifiziert wurden, die nach oraler Gabe des Kiefernridenextraktes im humanen Organismus entstehen, ist es durchaus möglich, dass weitere Verbindungen existieren, die eine Steigerung der Exocytose bewirken können.

5 Antiadipogene Eigenschaften von phenolischen Pflanzewirkstoffen

5.1 Adipositas und Diabetes

Adipositas stellt sowohl in den industrialisierten als auch in den nicht-industrialisierten Ländern ein großes Gesundheitsrisiko dar und gilt als entscheidender Risikofaktor für eine Reihe verschiedener Erkrankungen. Zu den pathophysiologischen Veränderungen bei Adipositas gehören Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie, Hypertonie, sowie Hyperlipidämie und Hyperurikämie,²⁴⁹ Veränderungen, die unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefaßt werden.

Viele Antidiabetika wie die Thiazolidindione, die eine blutglucosesenkende Wirkung besitzen, begünstigen leider auch eine Gewichtszunahme. Somit helfen sie zwar, ein Symptom des Diabetes mellitus Typ 2 zu reduzieren, aber fördern im Gegenzug auch einen entscheidenden Hauptrisikofaktor.²⁵⁰ Somit sind Fettleibigkeit und Typ 2 Diabetes eng miteinander verknüpft.

Adipogenese, die Differenzierung und Proliferation von Adipocytten, ist ein wichtiger Mechanismus der zu Gewichtszunahme und Fettleibigkeit führt. Aber Fettgewebe dient nicht nur als inerter Fettspeicher, sondern ist vielmehr ein Organ mit vielfältigen metabolischen, endokrinen, parakrinen und autokrinen Funktionen.²⁵¹ Eine der bedeutendsten Entdeckungen in diesem Zusammenhang war die des Leptins, einem nur vom Fettgewebe gebildetem Hormon, das an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase beteiligt ist, und das als Maß des Körperfettgehalts gilt.²⁵² Darüber hinaus exprimieren Adipocytten verschiedene Cytokine (Interleukine, TNF- α) und Transkriptionsfaktoren (PPARs), die an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt sind oder die Fettzellendifferenzierung beeinflussen.^{156,253}

Eine mögliche Strategie zur Behandlung von Adipositas und damit verbundenen metabolischen Erkrankungen ist die Entwicklung von therapeutischen Agenzien, die die Adipogenese reduzieren bzw. hemmen oder den Zelltod durch Apoptose bewirken können.

5.2 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten

5.2.1 Mechanismus der Adipogenese

Adipocyten stellen den Hauptbestandteil des Fettgewebes dar. Es handelt sich hierbei um hoch spezialisierte Zelltypen, die Lipide (Triglyceride) in Zeiten von Nährstoffüberfluss speichern und diese Reserven in Zeiten von Nährstoffmangel mobilisieren können als Antwort auf die metabolischen Bedürfnisse eines Organismus.²⁵³⁻²⁵⁵

Das Adipocytenvolumen hängt von der Menge an Fett ab, das in der individuellen Fettzelle gespeichert ist, wohingegen die Adipocytenzahl das Resultat der Differenzierung von Präadipocyten zu Adipocyten ist. Da reife Adipocyten keine Zellteilung durchlaufen und ihre Fähigkeit verlieren, sich zu vermehren, reflektiert jede Zunahme ihrer Anzahl den Mechanismus der Differenzierung. Dieser Prozess gipfelt in einer erhöhten Transkription von bestimmten Genen und der Expression von spezifischen Proteinen wie GLUT-4, Fettsäuresynthase und Glycerol-2-phosphatdehydrogenase.²⁵⁴ Bei Adipositas ist nicht nur der Füllungszustand der Adipocyten (Adipocytenvolumen), sondern auch die Zahl der Adipocyten durch Differenzierung der Vorläuferzellen erhöht. Um die Pathogenese der Fettleibigkeit zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis des Mechanismus der Adipocytendifferenzierung entscheidend.²⁵⁴

Die Differenzierung von Präadipocyten zu Adipocyten wird *in vitro* durch adipogene und lipogene Hormone induziert. Insulin ist ein potentes adipogenes Hormon, das die Induktion einer Reihe von Transkriptionsfaktoren triggert, die die Differenzierung von Präadipocyten in reife Adipocyten beeinflusst. Dabei agiert es durch den *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) Rezeptor. Jedoch ist der exakte Link zwischen Insulin-Signalkaskade und der intrinsischen Kaskade der Adipogenese noch nicht vollständig aufgeklärt.²⁵⁴ Dexamethason, ein synthetischer Glucocorticoid-Agonist, wird standardmäßig *in vitro* in der Adipocytendifferenzierung eingesetzt, um den Glucocorticoid-Rezeptorweg zu stimulieren. Isobutylmethylxanthin (IBMX), ein cAMP-Phosphodiesterase-Inhibitor, wird *in vitro* verwendet, um den cAMP-abhängigen Proteinkinaseweg anzuregen.²⁵⁶

Die Vorläuferzellen der Adipocyten zeigen anfänglich ein spindelförmiges Aussehen mit langen Ausläufern, die Fibroblasten sehr ähneln.²⁵³ Nach Erreichen

der Konfluenz führt die Induktion der Differenzierung durch einen adipogenen Cocktail *in vitro* zu drastischen Änderungen in der Zellform.²⁵⁷ Etwa 24 h nach Zugabe der Stimulantien durchlaufen die Präadipocyten eine postkonfluente Mitose, die in einem Wachstumsstopp endet. Danach sind die Zellen bereit für ihre Umwandlung in Adipocyten. Am Tag 3 beginnen die Zellen Marker der Differenzierung zu exprimieren. Diese umfassen lipogene und lipolytische Enzyme und andere Proteine, die für die Modulierung des charakteristischen Adipocyten-Phenotyps verantwortlich sind. Die Zellen erhalten fortschreitend die Morphologie und biochemischen Charakteristika der reifen Adipocyten, so dass etwa 5–7 Tage nach Induktion der Differenzierung eine deutliche Zunahme der Größe und Anzahl der Lipidtröpfchen zu erkennen ist.^{253,256}

5.2.2 Wirkungen von Pycnogenol auf Lipolyse und Lipogenese

Hasegawa et al.²⁵⁸ fanden bei ihren Untersuchungen heraus, dass Pycnogenol in einer Konzentration von 50 µg/ml die Lipolyse in 3T3-L1 Zellen stimulieren kann. Über die Wirkung des Rindenextraktes auf die Adipocytendifferenzierung und Lipidakkumulation war zum damaligen Zeitpunkt nichts bekannt. Die Forscher vermuteten, dass Pycnogenol die Differenzierung der Adipocyten nicht durch Konkurrenz um den Insulinrezeptor hemmte, sondern vielmehr durch Verhinderung von Radikal-induzierten Prozessen. Insulin gilt als Aktivator der NADPH-Oxidase auf der Plasmamembran und bewirkt eine durch H₂O₂ beschleunigte Konversion der Präadipocyten in Adipocyten.²⁵⁸ Dabei agiert H₂O₂ als sogenannter *second messenger*. Wurden ausdifferenzierte Adipocyten mit Pycnogenol kultiviert, so verschwanden selektiv kleinere intracytoplasmische Lipidtröpfchen. Die Ergebnisse ließen den Schluß zu, dass Pycnogenol sowohl die Lipogenese inhibiert wie auch die Lipolyse stimuliert.²⁵⁹

In einer späteren Untersuchung stellte dieselbe Forschergruppe eine signifikante Hemmung der Expression von cytosolischer Glycerolphosphatdehydrogenase (GPDH) ($p < 0.01$) durch Pycnogenol fest. Die Anwesenheit dieses Enzyms ist charakteristisch für die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipocyten in Adipocyten, das heisst eine hohe GPDH-Konzentration steht für eine hohe Differenzierungsrate. Somit wurde der antiadipogene Effekt von Pycnogenol auf die

Adipocytenkonversion von 3T3-L1 Zellen indirekt durch Messung der Aktivität des Differenzierungsmarkers GPDH nachgewiesen.

In einem *in vitro* Experiment sollte die antiadipogene Wirkung von Pycnogenol auf molekularer Ebene genauer betrachtet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob Bestandteile und/oder Metabolite von Pycnogenol, die nach Absorption im humanen Organismus verfügbar sind, eine Hemmung der Adipogenese in 3T3 Zellen bewirken können. Daher wurden neben der Fraktion I, die Phenolcarbonsäuren sowie monomere Polyphenole enthält, auch monomere Bestandteile und der Metabolit M1 in diesem Assay eingesetzt.

5.2.3 Ergebnisse des Oil Red O Assays

5.2.3.1 Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung

In einem Vorversuch wurde der zeitliche Verlauf der Adipocytenkonversion beobachtet, um herauszufinden, nach wievielen Tagen eine optimale Adipocyten-dichte in Kultur erreicht ist. Hierzu wurden die Präadipocyten für unterschiedliche Zeitspannen mit Methylisobutylxanthin, Dexamethason und Insulin inkubiert, Stimulantien, die standardmäßig zur Adipocytendifferenzierung eingesetzt werden^{238,257}, und die ausgereiften Adipocyten anschließend mit Oil Red O angefärbt.

Die Differenzierung wurde über zwölf Tage hinweg betrachtet. Eine Zunahme der intrazellulären Lipidakkumulation aufgrund der Zunahme der Größe und Anzahl der Adipocyten war durch einen Anstieg der gemessenen Absorptionen mit der Zeit zu erkennen (Abbildung 39 und Tabelle 38, D Tabellarischer Anhang).

Die kultivierten 3T3 Zellen (Mäuseembryo-Fibroblasten) lagen als adhärenente Monolayerkultur vor und zeigten bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop ein spindelförmiges Aussehen mit langen Ausläufern. Bereits die Präadipocytenkultur wies einige Lipidtröpfchen auf, die vermutlich durch sogenannte Kontaktstimulation (Zell-Zell-Kontakt)^{260,261} entstehen, dessen Mechanismus aber bisher noch unklar ist. Dies wird auch durch die leicht erhöhten Absorptionswerte im Oil Red O Assay in den ersten 1–2 Tagen wiedergespiegelt.

Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz (Tag 0) wurden die Zellen durch Zugabe von Differenzierungsmedium stimuliert. Unter dem Einfluss der adipogenen Wirkstoffe konnten die typischen morphologischen Veränderungen unter dem

Mikroskop beobachtet werden. Zwischen Tag 4 und 8 nach Induktion der Differenzierung war ein linearer Anstieg der Absorption und somit eine lineare Zunahme der Lipidakkumulation zu verzeichnen. Danach nahm die Bildung der Fetttropfchen nur noch geringfügig zu. Nach etwa 10 Tagen zeigten 60–80 % der Zellen den charakteristischen lipid-gefüllten Adipocyten-Phenotyp, wie er auch in der Literatur beschrieben wird (siehe Abschnitt 5.2.1).^{238,262}

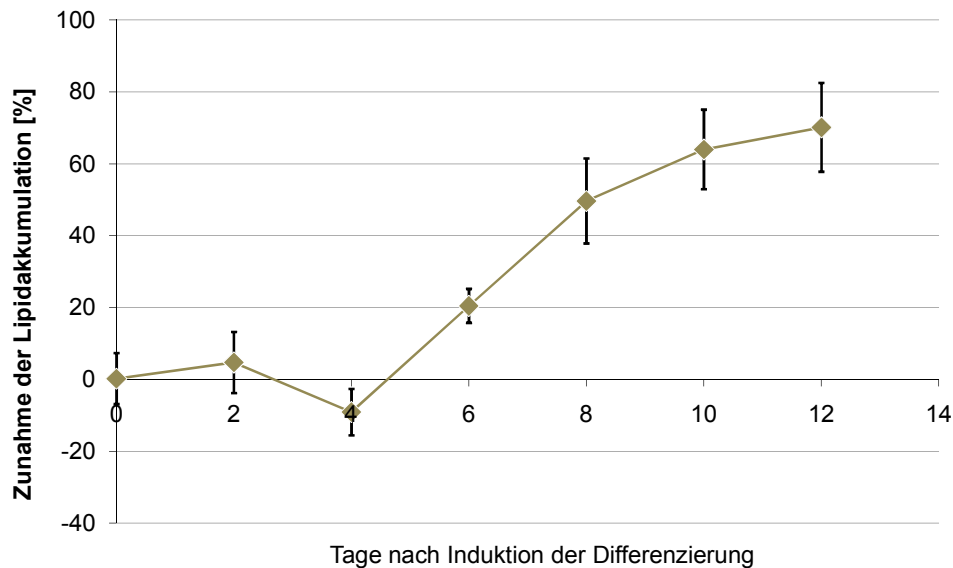


Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der Differenzierung. Die Zunahme der Lipidakkumulation ist in Prozent dargestellt, wobei die Färbung der postkonfluenten Präadipocyten (vor Induktion der Differenzierung, Tag 0) auf Null gesetzt wurde. Zwischen Tag 4 und 8 ist eine lineare Zunahme der Lipidakkumulation zu erkennen, die danach abflacht. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten.

Damit konnte gezeigt werden, dass der hier gewählte adipogene Cocktail aus Methylisobutylxanthin, Dexamethason und Insulin die Differenzierung der 3T3-Zellen induziert, und dass 10 Tage nach Induktion eine für die folgenden Versuche optimale Adipocytendichte in Kultur erreicht ist.

5.2.3.2 Ergebnisse der Hemmung der intrazellulären Lipidakkumulation durch Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol

In diesem *in vitro* Experiment sollte die Wirkung von verschiedenen Testsubstanzen auf die Differenzierung von Präadipocyten in reife Adipocyten untersucht werden. Durch Anfärben der intrazellulären Lipide mittels Oil Red O konnte die Zunahme der Größe und Anzahl der Adipocyten bestimmt werden. Als Referenzsubstanz wurde Rosiglitazon gewählt, da von diesem PPAR- γ Agonisten bekannt ist, dass er die Adipocytendifferenzierung und damit verbunden die Lipidakkumulation induziert.^{205,206} Des Weiteren wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen von Pycnogenol und Fraktion I, die Phenolcarbonsäuren sowie monomere Polyphenole enthält, verwendet. Die Fraktionen II–IV sind bei diesen Versuchen auf Zellebene nicht von Interesse, da sie Oligomere höherer Polymerisationsgrade beinhalten, die vom humanen Organismus nicht absorbiert werden. Die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen (+)-Catechin, Ferulasäure, Kaffeesäure und M1 entsprachen den Plasmakonzentrationen nach wiederholter Einnahme von 200 mg bzw. im Fall von (\pm)-Taxifolin der Plasmakonzentrationen nach Einmalgabe von 300 mg Pycnogenol.⁹⁶ Protocatechusäure wurde ebenfalls in diesem Assay untersucht, da bereits bei diversen anderen Assays ihre Effektivität dargelegt wurde (Abschnitt 2.2 und 2.3). Da die Plasmakonzentration von Protocatechusäure nach Einnahme des Kiefernrintenextraktes unbekannt war, wurde sie daher zu 60 ng/ml eingesetzt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden vom ersten Tag der Differenzierung an (Tag 0) dem entsprechenden Kulturmedium beigelegt (siehe Abschnitt 12.3, C Experimenteller Teil). Die Bestimmung der intrazellulären Lipidakkumulation erfolgte 10 Tage nach Beginn der Differenzierung.

Es zeigte sich, dass das Standard-Antidiabetikum Rosiglitazon tendenziell eine dosisabhängige Reduktion der Lipidakkumulation bewirkte, die allerdings nicht statistisch signifikant war (Abbildung 40 und Tabelle 39, D Tabellarischer Anhang).

Die stärkste Hemmung der Adipogenese erzielte Rosiglitazon in einer Konzentration von 0.5 μ M, der gemessenen Plasmakonzentration nach oraler Einmalgabe von 4 mg Rosiglitazon.²⁰⁵ Hier wurde eine Reduktion der Lipidakkumulation um 6.79 ± 9.88 % erzielt. 0.05 μ M Rosiglitazon führten zu einer Erniedrigung um 3.84 ± 13.01 %, 0.005 μ M Rosiglitazon um 1.16 ± 14.95 %.

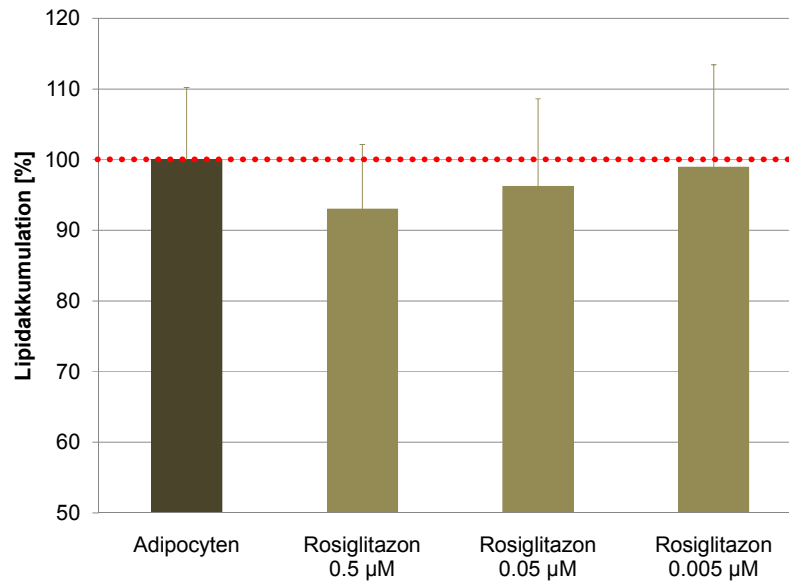


Abbildung 40: Untersuchung der Wirkung von Rosiglitazon auf die Adipocyten-Differenzierung. Dargestellt ist die intrazelluläre Lipidakkumulation in % von Rosiglitazon im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (Referenz). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von sechs unabhängigen Versuchen. Die Reduktion der Lipidakkumulation durch Rosiglitazon im Vergleich zur Referenz war dosisabhängig, aber nicht statistisch signifikant (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

In den Versuchen mit Pycnogenol riefen die beiden höchsten Konzentrationen höhere Absorptionen hervor, als die differenzierte Kontrolle, was bei der Berechnung in höheren Werten für die Lipidakkumulation resultierte (Abbildung 41 und Tabelle 40, D Tabellarischer Anhang). Allerdings konnte unter dem Lichtmikroskop keine stärkere Ausbildung der Fetttröpfchen im Vergleich zu den ausdifferenzierten Adipocyten gesehen werden. Im Gegenteil: die Lipidakkumulation in den mit Pycnogenol behandelten Ansätzen war im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Allerdings scheint die leicht bräunliche Eigenfarbe der Pycnogenollösungen höherer Konzentrationen eine Färbung der Zellen zu verursachen, die falsche Absorptionswerte implizierte. Daher sollte bei folgenden Experimenten mit Pycnogenol darauf geachtet werden, dass keine Lösungen höherer Konzentrationen mehr eingesetzt werden. Die niedrigste Pycnogenolkonzentration zeigte im Vergleich zu den ausdifferenzierten Adipocyten eine Reduktion der Lipidakkumulation um 8.09 ± 7.27 %, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

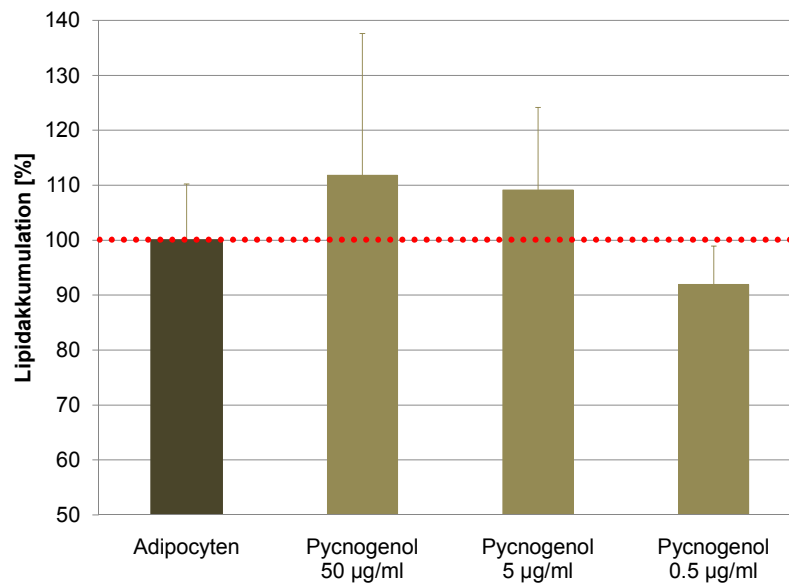


Abbildung 41: Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Adipocyten-Differenzierung. Dargestellt ist die intrazellulären Lipidakkumulation in % von Pycnogenol im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (Referenz). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von sechs unabhängigen Versuchen. Die kleinste Pycnogenolkonzentration zeigte eine Reduktion der Lipidakkumulation im Vergleich zur Referenz, die allerdings nicht statistisch signifikant war (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

Alle drei getesteten Konzentrationen von Fraktion I bewirkten eine Reduktion der intrazellulären Lipidakkumulation, allerdings lag hier weder eine statistische Signifikanz vor (Abbildung 42 und Tabelle 41, D Tabellarischer Anhang), noch konnte eine Dosis-Effekt-Beziehung erkannt werden. Somit liegt hier höchstwahrscheinlich nur ein unspezifischer Effekt vor. Die höchste eingesetzte Konzentration (50 µg/ml) bewirkte die geringste Hemmung der Adipogenese von lediglich 1.37 ± 31.74 %. In einer Konzentration von 5 µg/ml erzielte Fraktion I eine Reduktion der Lipidakkumulation um 12.07 ± 10.77 %, in einer Konzentration von 0.5 µg/ml um 10.35 ± 11.81 %.

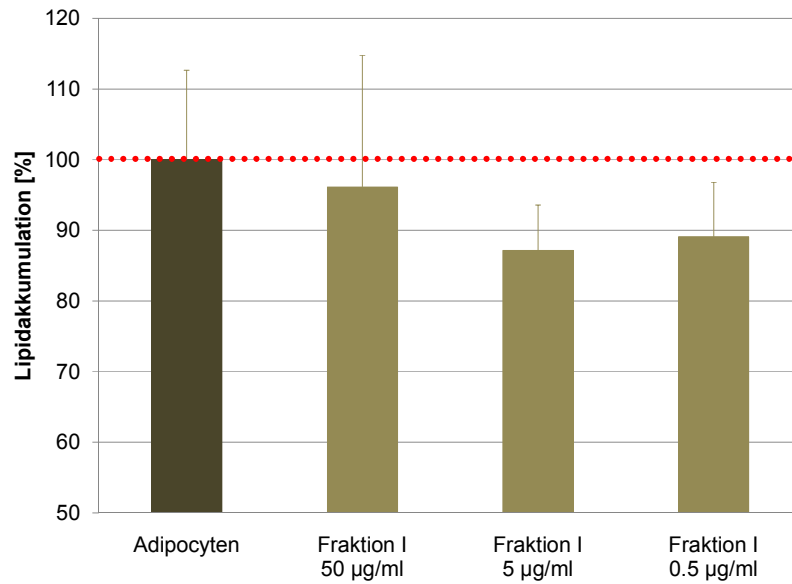


Abbildung 42: Untersuchung der Wirkung von Fraktion I auf die Adipocyten-Differenzierung. Dargestellt ist die intrazellulären Lipidakkumulation in % von Fraktion I im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (Referenz). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von sechs unabhängigen Versuchen. Alle drei getesteten Konzentrationen zeigten eine Reduktion der Lipidakkumulation im Vergleich zur Referenz, die allerdings nicht statistisch signifikant (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test) und unspezifisch war.

Die Pycnogenolbestandteile (+)-Catechin, Ferulasäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure, (±)-Taxifolin und der Metabolit M1 zeigten alle bis auf Kaffeesäure eine Reduktion der Lipidakkumulation im Vergleich zu den ausdifferenzierten Adipocyten (Abbildung 43 und Tabelle 42, D Tabellarischer Anhang). Allerdings war auch hier die statistische Signifikanz nicht gegeben. Den stärksten Effekt auf die Bildung der Lipidtröpfchen zeigte (+)-Catechin (14.81 ± 8.76 %), gefolgt von Protocatechusäure (4.80 ± 16.46 %), M1 (4.17 ± 10.03 %), Ferulasäure (3.71 ± 9.92 %), und (±)-Taxifolin (0.79 ± 7.95 %).

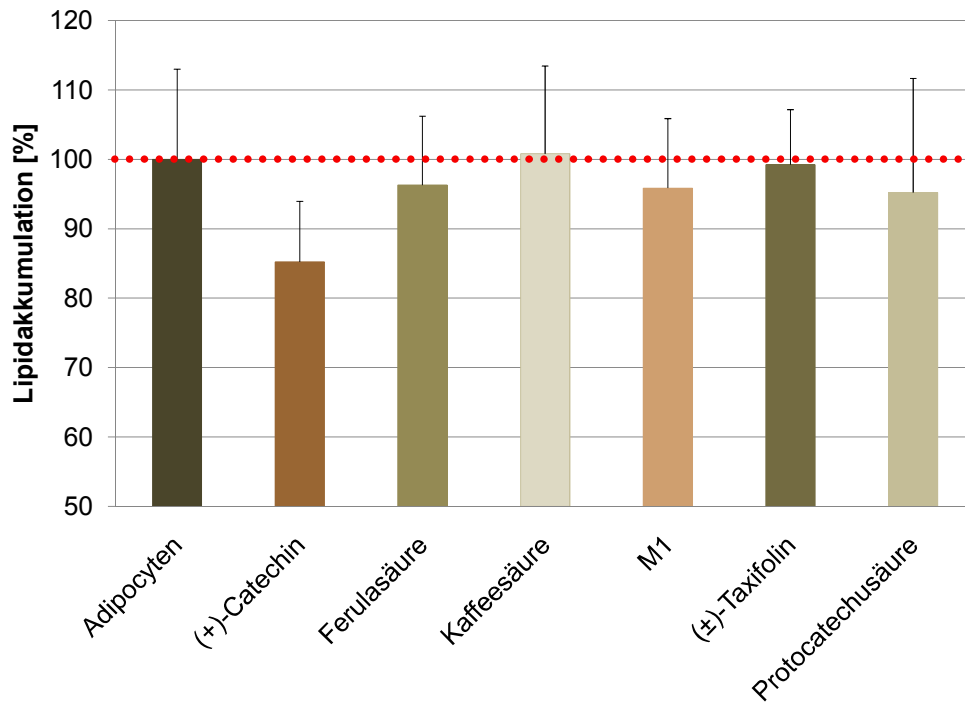


Abbildung 43: Untersuchung der Wirkung der Bestandteile von Pycnogenol und des Metaboliten M1 in ihren zuvor bestimmten jeweiligen Plasmakonzentrationen⁹⁶ auf die Adipocyten-Differenzierung. Dargestellt ist die intrazellulären Lipidakkumulation der Substanzen in % im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (Referenz). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 5–10 unabhängigen Versuchen. Die getesteten Substanzen zeigten alle bis auf Kaffeesäure eine Reduktion der Lipidakkumulation im Vergleich zur Referenz, die allerdings nicht statistisch signifikant war (one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test).

5.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Durch Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol, seinen Bestandteilen und Metaboliten auf die Differenzierung von Adipocyten *in vitro* sollte festgestellt werden, ob der Kiefernrintenextrakt, der die Lipolyse stimulieren²⁵⁹ und die Lipogenese hemmen²⁵⁸ kann, auch eine antiadipogene Wirkung besitzt. Dabei zeigte sich, dass Pycnogenol, (+)-Catechin, Ferulasäure, Protocatechusäure, (±)-Taxifolin, Fraktion I und der Metabolit M1 eine Erniedrigung der intrazellulären Lipidakkumulation aufgrund der Hemmung der Adipogenese bewirken können. Allerdings waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Adipocyten.

Die Wirkung von Epigallocatechingallat (EGCG), einem Hauptbestandteil von grünem Tee, auf die Adipogenese und Apoptose in 3T3-L1 Zellen wurde von Lin et al.²⁶³ untersucht. Sie inkubierten die Zellen mit 0–200 µM EGCG für unterschiedliche Zeitintervalle. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Lipidakkumulation in den reifenden Präadipocyten, die mittels Oil Red O Färbung nachgewiesen wurde. Allerdings verwendeten die Forscher bei ihren Versuchen Konzentrationen, die im humanen Organismus nicht erreicht werden können (siehe Abschnitt 3.3.9). In den eigenen Untersuchungen konnte man sehen, dass (+)-Catechin schon in einer weit geringeren Konzentration von 0.21 µM (Plasmakonzentration⁹⁶ nach oraler Einnahme von Pycnogenol) eine Inhibition der Adipogenese um 13.57 % im Vergleich zu den ausgereiften Adipocyten erzielte.

Chien et al.²⁶² untersuchten unter gleichen Bedingungen²⁶³ Catechin, Quercetin und Kampferol (100 µM) auf die Differenzierung von 3T3-L1 Adipocyten und stellten eine signifikante Reduktion der intrazellulären Triacylglycerol-Akkumulationen in den Zellen fest (Catechin 54.4 %, Quercetin 45.7 %, Kampferol 29.9 %). In den eigenen Untersuchungen wurde bereits bei einer Catechin-Konzentration von 207 nM eine fast 14 %-ige Reduktion der Adipogenese beobachtet. Chien²⁶² setzte bei seinen Versuchen eine fast 500-fach höhere Konzentration ein und erzielte im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen eine demgegenüber gering erscheinende Reduktion von 54.4 %.

Die deutlich höheren Konzentrationen bei den Versuchen von Lin²⁶³ und Chien²⁶² erzielten zwar wesentlich ausgeprägtere Effekte, doch ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Konzentrationen auch im humanen Organismus nach oraler Applikation erreicht werden können. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass der Kiefernrintenextrakt aktive Bestandteile enthält, die in den im Plasma möglichen Konzentrationen nach oraler Applikation eine leichte Hemmung der Adipogenese bewirken können.

Das als Referenz eingesetzte Rosiglitazon bewirkte bei den eigenen Untersuchungen ebenfalls eine leichte, aber nicht statistisch signifikante Erniedrigung der Lipidakkumulation im Vergleich zu den unbehandelten, ausgereiften Adipocyten (6.99 ± 9.14 % bei einer Konzentration von 0.5 µM). Wie bereits erwähnt (Abschnitt 5.2.3.2) ist bekannt, dass Rosiglitazon die Adipocytendifferenzierung und damit verbunden die Lipidakkumulation induziert.^{205,206} Dies steht scheinbar im Gegensatz zu den glucosesenkenden, insulinsensitivierenden Effekten von

Rosiglitazon, und auch zu den Beobachtungen der eigenen Untersuchungen. Doch konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass Rosiglitazon keine Zunahme der Lipidmenge in ausgereiften Adipocyten bewirkt, sondern vielmehr eine Erniedrigung dieser.²⁶⁴ RT-PCR Untersuchungen und Messungen der Lipolyse lassen vermuten, dass dieser Beobachtung ein veränderter Energie-Metabolismus zugrunde liegt. So regulieren TZDs z.B. die Proteinbiosynthese von Genen hoch, die mitochondriale-ribosomale Proteine codieren. Dies ist gleichbedeutend mit einem Anstieg der mitochondrialen Biogenese.²⁶⁴ Wahrscheinlich wird für die Aufrechterhaltung der gestiegenen mitochondrialen Funktionen aufgrund der Zunahme der mitochondrialen Masse jene Energie genutzt, die die Zellen nicht länger für die Lipidsynthese unter einer Rosiglitazon-Behandlung benötigen. Eine erhöhte Zahl an kleinen Adipocyten, die durch eine Behandlung mit TZDs hervorgerufen wird, ist nicht nur eine Folge des Auftretens neuer Adipocyten, sondern entsteht auch aufgrund des Schrumpfens und/oder Verschwindens von bereits existierenden reifen Adipocyten wie deSouza et al.²⁶⁵ bei ihren Studien herausgefunden haben. Eine durch TZDs induzierte Gewichtszunahme *in vivo* reflektiert eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Effekten der TZDs auf Präadipocyten und reife Adipocyten. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass dies auch eine Folge der Flüssigkeitsretention sein könnte, und somit der Fettanteil unbeeinflusst oder sogar erniedrigt sein könnte.²⁶⁶ Wilson-Fritsch et al.²⁶⁷ haben bei ihren Experimenten mit *ob/ob* Mäusen nach Behandlung mit Rosiglitazon eine Erhöhung des Gesamtkörpergewichts festgestellt, wobei aber das Gewicht der Fettpolster der Tiere unbeeinflusst blieb. Auch in einer klinischen Studie mit Typ 2 Diabetikern von Miyazaki et al.²⁶⁸ konnte nachgewiesen werden, dass nach einer Behandlung mit Pioglitazon zwar eine Zunahme des Körpergewichts zu verzeichnen war, dass aber der viscerale Fettanteil abgenommen hatte (statistisch signifikant; $P < 0.05$).

Auch *in vitro* konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden. Die Behandlung von ausgereiften Adipocyten mit 0.5 μM Rosiglitazon und hohen Glucose- und Insulinkonzentrationen (15.75 mM Glucose und 1 μM Insulin) für zwei Tage bewirkte eine 10 %-ige Abnahme der Lipidakkumulation im Vergleich zu unbehandelten Adipocyten. Bei Verwendung von 0.5 μM Rosiglitazon mit niedrigen Glucosekonzentrationen (4.5 mM) war im Gegensatz dazu kein Effekt zu sehen.²⁶⁴ In den eigenen Untersuchungen wurde Rosiglitazon (0.5, 0.05 und 0.005 μM) bereits von Anfang an dem Differenzierungsmedium der Präadipocyten, das 1.74 μM Insulin

enthielt, zugesetzt, und bis zum Ende des Versuchszeitraums (10 Tage) auch dem regulären Adipocytenmedium. Hier war eine durchschnittliche Reduktion der Lipidakkumulation von 6.79, 3.84 bzw. 1.16 % je nach eingesetzter Konzentration zu verzeichnen. Dass heisst, bei vergleichbaren Versuchsbedingungen und gleicher Rosiglitazon-Konzentration wurden in den eigenen Untersuchungen wie auch in den Experimenten von Wang²⁶⁴ vergleichbare Reduktionen der Lipidakkumulation beobachtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Pycnogenol bzw. seine Bestandteile zwar einen geringen Einfluss auf die Adipogenese ausüben, aber dass die beobachteten Reduktionen der Lipidakkumulation keine statistische Signifikanz aufweisen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die im humanen Organismus erreichten Konzentrationen nach Einnahme des Extraktes vermutlich nicht ausreichen, um eine signifikante Hemmung der Adipocyten-Differenzierung zu bewirken.

C Experimenteller Teil

1 Häufig verwendete Substanzen und Proben

1.1 Der Kiefernrintenextrakt: Fraktionen, Bestandteile und Metabolite

Der sprühgetrocknete Extrakt Pycnogenol[®] aus der Rinde der französischen, maritimen Kiefer (*Pinus pinaster Ait. subsp. atlantica*), der die Basis unserer Untersuchungen darstellte, wurde von Horphag Research Ltd. (Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Qualität des Extraktes entspricht der Monographie *Maritime pine extract*, die 2005 in das Arzneibuch der Vereinigten Staaten, die United States Pharmacopeia (USP) 28, National Formulary (NF) 23, in die Monographiesektion *Dietary supplements* aufgenommen wurde.²⁶⁹ Der Rindenextrakt kann durch Größenausschlusschromatographie mit Sephadex LH-20 in vier Fraktionen aufgetrennt werden:²¹⁰

Fraktion I: Phenolcarbonsäuren, frei und als Glucoside, sowie monomere Polyphenole wie (+)-Catechin und (±)-Taxifolin

Fraktion II: dimere und trimere Procyanidine

Fraktion III: tetramere bis hexamere Procyanidine

Fraktion IV: höher oligomere Procyanidine

Diese Arbeit wurde von Frau Schulze Elfringhoff (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster) durchgeführt.

(+)-Catechin, *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Ferulasäure, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure, Sinapinsäure und (±)-Taxifolin wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Die Metabolite δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (im Folgenden M1 genannt) und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (im Folgenden M2 genannt) wurden im Arbeitskreis von Frau Professor Dr. Schirmeister (Julius-Maximilians-Universität, Würzburg) nach der Arbeitsvorschrift von Frau Große Düweler⁹³ mit einigen Änderungen²⁷⁰ synthetisiert.

1.2 Herkunft der Serumproben für ex vivo pharmakodynamische Untersuchungen

Die untersuchten Serumproben erhielten wir von Frau Professor Dr. Ďuračková (Comenius Universität, Bratislava, Slowakei).

1.2.1 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv bestand aus freiwilligen jungen, gesunden Frauen und Männern im Alter von 18–30 Jahren. Vor Beginn der Studie wurden die Probanden zur Dokumentation eines gesunden Körperstatus einer ärztlichen Untersuchung unterzogen. Nach eingehender Aufklärung der Probanden über den Studienverlauf, über die Wirkungen und Nebenwirkungen des verwendeten Kiefernrintenextraktes, sowie über die Vertraulichkeit der Studiendaten unterzeichneten die freiwilligen Testpersonen eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Probanden konnten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie jederzeit ohne Nennung von Gründen widerrufen.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Comenius Universität, Bratislava, Slowakei, geprüft und als unbedenklich bewertet.

1.2.2 Diätvorschriften

Die Probanden mussten mindestens 24 Stunden vor Einnahme von Pycnogenol eine strikte flavonoidfreie Diät einhalten. Es war ihnen untersagt Tee, Kaffee, Kakao, alkoholische Getränke wie Wein und Bier, Softdrinks, Fruchtsäfte, Schokolade, Gemüse, Marmelade oder Obst zu konsumieren. Als Getränke waren ausschließlich Wasser und Milch zugelassen.

1.2.3 Proben nach einmaliger Einnahme von Pycnogenol

Elf Probanden (5 ♀, 6 ♂) im Alter von 18–30 Jahren wurden für die Untersuchung der Effekte einer einmaligen Extraktgabe rekrutiert. Nach einer 24-stündigen strikten flavonoidfreien Ernährung wurde den Probanden ein Venenkatheter gelegt.

Direkt vor Einnahme von Pycnogenol (Zeitpunkt 0) erfolgte die erste Blutabnahme (jeweils 13 ml) in nüchternem Zustand zur Gewinnung des Basalwertes. Nach anschließender Einmal-Dosis von 300 mg Pycnogenol wurde den Testpersonen jeweils nach 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 h Blut abgenommen. Von den erhaltenen Blutproben wurde umgehend nach einem Standardprotokoll Serum gewonnen. Das Serum der Probanden (A und C–L) wurde aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

Da die Serumproben zum Teil stark hämolytisch und daher für bestimmte Experimente nicht geeignet waren, wurde dieser Teil der Studie mit weiteren zehn Probanden wiederholt (M–P, R–V, Z). Die Durchführung erfolgte wie bereits oben beschrieben.

1.2.4 Proben nach wiederholter Einnahme von Pycnogenol (*steady state* Proben)

Fünf Probanden (3 ♀, 2 ♂) im Alter von 18–30 Jahren nahmen an der Studie zur Untersuchung der Effekte einer mehrfachen Extraktgabe teil. Fünf Tage lang nahmen sie jeden Morgen 200 mg Pycnogenol ein. Die Teilnehmer der Studie mussten am Tag vor der Pycnogenol-Einnahme, am ersten, vierten und fünften Tag der Studie eine strikte flavonoidfreie Ernährung einhalten.

Direkt vor Einnahme der ersten Dosis, sowie am fünften Tag der Pycnogenol-Einnahme, vier Stunden nach der letzten Einnahme wurde den Probanden jeweils 20 ml Blut abgenommen. Von den Blutproben wurde anschließend wieder umgehend Serum gewonnen. Das Serum der Probanden (B1–B5) wurde aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

1.3 Humane Monocyten für *in vitro* Untersuchungen

Die Gewinnung humaner Monocyten erfolgte aus Blutzellkonzentraten bzw. sogenannten Buffy Coats, die über den Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) Wiesentheid bzw. den Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) Frankfurt bezogen wurden (Isolierungsprotokoll und Kultivierung siehe Abschnitte 4.1 und 4.2).

1.4 Humane Adipocyten für *in vitro* Untersuchungen

Die subkutanen humanen Adipocyten wurden bei BioCat (Heidelberg) bestellt. Hierbei handelt es sich um Adipocyten, die nach einem patentierten Verfahren aus Adipocyten-Precursorzellen (Prädipocyten) differenziert wurden. Diese Prädipocyten wurden aus subkutanem Fettgewebe von gesunden, nicht-diabetischen Spendern im Alter von 18–60 Jahren isoliert. Die Zellen wurden in 24-Loch-Kulturplatten zwei Wochen nach Induktion der Differenzierung geliefert (Kultivierung siehe Abschnitt 4.4).

1.5 3T3-Zellen für *in vitro* Untersuchungen

Die Fibroblasten-Zelllinie 3T3 (*Swiss albino mouse fibroblasts*) stammte von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Die Zellen wurden als gefrorene Kultur geliefert und konnten kurzfristig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden (Auftauen, Kultivierung und Differenzierung siehe Abschnitt 4.5).

2 Häufig verwendete Lösungen und Medien

2.1 Herkunft häufig verwendeter Lösungen und Medien

| Lösung bzw. Medium | Firma |
|---|--------------------------------|
| Biocoll-Trennlösung | Biochrom, Berlin |
| Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) | Biochrom, Berlin |
| DMEM/Ham's F-12 Pulvermedium | Biochrom, Berlin |
| Earle's Salzlösung (10x) | Biochrom, Berlin |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin |
| Instamed Minimum Essential Medium (MEM) Spinner | Biochrom, Berlin |
| Isotonischer Phosphatpuffer (PBS) | Biochrom, Berlin |
| McCoy's 5A modifiziertes Medium | Biochrom, Berlin |
| Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) (100x) | Biochrom, Berlin |
| Penicillin/Streptomycin (10000 U) | Biochrom, Berlin |
| Percoll-Lösung | Amersham Biosciences, Freiburg |
| RPMI 1640 Medium | Biochrom, Berlin |

2.2 Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen und Medien

| Lösung bzw. Medium | Zusammensetzung |
|----------------------------|--|
| 3T3 Differenzierungsmedium | 10 % (v/v) FBS, 10 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 0.5 mM IBMX (Fluka, Taufkirchen), 1 µM Dexamethason (Merck, Darmstadt) in DMEM |
| 3T3 Kulturmedium | 10 % (v/v) FBS, 1 % Penicillin/Steptomycin in DMEM |
| DMEM/Ham's F-12 Medium | 2450 mg/l NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 3 % FCS, 1 µM Dexamethason (Merck, Darmstadt), 100 nM Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 33 µM D-Biotin (Acros, Geel, Belgien), 17 µM Ca-Pantothenat (Acros, Geel, Belgien), 15 mM HEPES (Gerbu, Gaiberg) pH 7.4, 100 U/ml Penicillin, 100 µm/ml Streptomycin, 0.25 µg/ml Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, Regensburg) in DMEM/ Ham's F-12 Pulvermedium |
| McCoy's Kompletmedium | 15 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 1 % NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin in Mc Coy's 5A modifiziertem Medium |
| MEM Spinner komplett | 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % NEAA in Instamed MEM-Spinner, pH 7.4 |
| Percoll-Mischung | 45 % (v/v) Percoll-Lösung, 5 % (v/v) Earle's Salzlösung (10x), 50 % (v/v) MEM-Spinner komplett |
| Trypanblau-Lösung | 0.4 % Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in PBS-Puffer |

3 Häufig verwendete Geräte

| Gerät | Typ | Firma |
|-------------------|--|----------------------------|
| Deckgläser | Cover Glass 18x18 | VWR, Darmstadt |
| ELISA-Reader | BIO-RAD Nicroplate Reader | Benchmark, CA, USA |
| ELISA-Reader | Multiskan Ascent | Thermo, Vantaa, Finnland |
| ELISA-Washer | MultiWash Advantage | TriContinent, Suffolk, UK |
| ELISA-Washer | Titertek Microplate Washer | Flow Laboratories, VA, USA |
| Inversmikroskop | Eclipse TS100 | Nikon, Düsseldorf |
| Küvetten | Einmalküvetten PS, halbmikro | Hartenstein, Würzburg |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf Cap, 1.5 ml | Roth, Karlsruhe |
| Spektrophotometer | UV 2101 PC mit temperierbarem Küvettenhalter | Shimadzu, Duisburg |
| Sterilbank | Laminar Air Flow, Typ UVF 6.07 | BDK, Sonnenbühl-Genkingen |
| Thermomixer | Typ "compact" | Effendorf AG, Hamburg |
| Zählkammer | Neubauer-Improved | Superior, Marienfeld |
| Zellkulturplatten | Multiwell Tissue Culture Plate | Becton Dickinson, NJ, USA |
| Zentrifuge | Heraeus, Megafuge 1.0 R | Kendro, Hanau |
| Zentrifuge | Microfuge 22 R | Beckman Coulter, Krefeld |

4 Häufig verwendete Methoden

4.1 Isolierung humaner Monocyten aus Blutzellkonzentraten

Die Isolierung humaner Monocyten erfolgte entweder aus Blutzellkonzentraten, die über den Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) Wiesentheid bezogen wurden, oder aus sogenannten Buffy Coats, die über den Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) Baden-Württemberg – Hessen erhalten wurden.

Die Blutzellkonzentrate, die die bei Vollblutspenden abgetrennten Blutzellen Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten in einem Puffer enthalten, werden über ein relativ aufwendiges Verfahren durch Ausspülen der Leukocytendepletionsfilter erhalten. Der Einsatz dieser Filter bei Blutspenden wurde vor ein paar Jahren durch das Paul-Ehrlich-Institut festgelegt (Bundesanzeiger Nr. 26 vom 09.02.1999), da es in Anwesenheit von Leukocyten in den Konserven zu unerwünschten Immunreaktionen und Übertragung von Erregern gekommen ist. Mit diesen Filtern erreicht man eine Leukocytenreduktion in der Konserve von bis zu 1:1000 des Ausgangswertes. Die Filter bestehen aus Polyesterfasern, die in bestimmter Packungsdichte gepresst werden, so dass Poren definierter Größe entstehen.

Die Buffy Coats werden durch Zentrifugation von Vollblutspenden erhalten, die so in ihre Blutkomponenten aufgetrennt werden. In der untersten Schicht befinden sich die Erythrocyten, in der obersten Schicht das zellfreie Blutplasma mit den Eiweißstoffen (Frischplasmapräparat). Die Zwischenschicht wird als das sogenannte Buffy Coat bezeichnet und enthält die weißen Blutkörperchen und Thrombocyten.

4.1.1 Geräte und Materialien

| | | |
|---------------------|--------------|-----------------------|
| Zentrifugenröhrchen | 50 ml aus PE | Hartenstein, Würzburg |
| Zentrifugenröhrchen | Oak-Ridge | Merck, Darmstadt |

4.1.2 Umrechnung der relativen Zentrifugalbeschleunigung in Umdrehungen pro Minute

Die relative Zentrifugalbeschleunigung g (engl.: *gravity*) lässt sich bei Kenntnis des Rotationsradius r mit Hilfe folgender Formel in Umdrehungen pro Minute rpm (engl.: *rotations per minute*) umrechnen:

$$g = 1.119 * 10^{-5} * \text{rpm}^2 * r$$

4.1.3 Protokoll der Isolierung

Die Isolierung der Monocyten aus den Blutzellkonzentraten erfolgte über zwei unterschiedliche Dichtegradientenzentrifugationen. Der erste Gradient aus Biocoll-Trennlösung bewirkte die Sedimentierung von Erythrocyten und Granulocyten, die eine höhere Dichte besitzen als Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten. Diese konzentrierten sich in einer Bande an der Phasengrenze im oberen Drittel des Gradienten. Durch drei Waschschrte wurde die Abtrennung der Thrombocyten erzielt. Über einen zweiten Gradienten aus Percoll-Mischung konnten die Monocyten von den Lymphocyten getrennt werden.²⁷¹ Die Zentrifugationsschritte wurden jeweils in der Heraeus Zentrifuge Megafuge 1.0 R durchgeführt.

4.1.3.1 Aufkonzentration der Blutzellkonzentrate

Die Blutzellkonzentrate des BRK Wiesentheid mussten zunächst gepoolt und eingeeengt werden. Hierzu wurde das Konzentrat in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei $604 \times g$ und $5 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min (ohne Bremse) zentrifugiert. Etwa 30 ml des überstehenden Puffers wurden verworfen und das Pellet in 20 ml Restpuffer resuspendiert. Dieser Schritt war bei den Buffy Coats des DRK Frankfurt nicht erforderlich.

4.1.3.2 Der erste Dichtegradient

Für den ersten Gradienten wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Biocoll-Trennlösung vorgelegt und vorsichtig mit 30 ml aufkonzentriertem Blutzellkonzentrat bzw. Buffy Coat überschichtet. Biocoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrocytenaggregate und tote Zellen die Biocollschicht passieren. Granulocyten dringen in die Biocollphase ein, während Lymphocyten, Monocyten und Thrombocyten sich in der Interphase ansammeln. Durch eine isopyknische Zentrifugation bei 604 x g und 20 °C für 45 min (ohne Bremse) werden periphere mononukleare Zellen (Monocyten, B-Zellen, NK-Zellen, T-Zellen und Thrombocyten) von Erythrocyten, Granulocyten und toten Zellen getrennt (Abbildung 44).

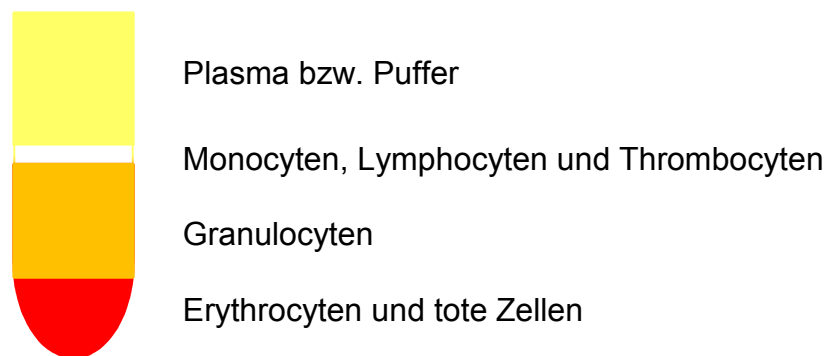


Abbildung 44: Der erste Dichtegradient bei der Isolation von Monocyten aus Blutzellkonzentraten. Erythrocyten und tote Zellen sammeln sich am Boden des Zentrifugenröhrchens, Granulocyten dringen in die Biocollphase ein. Monocyten, Lymphocyten sowie Thrombocyten sammeln sich in der Interphase.

Die oberste Schicht (etwa 20 ml Puffer bzw. Plasma) wurde abgenommen und verworfen. Die darunter befindliche Schicht aus mononukleären Zellen wurde abgenommen und mit MEM-Spinner komplett ad 50 ml aufgefüllt.

Der erste Waschschrift erfolgte bei 353 x g und 20 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 45 ml MEM-Spinner komplett resuspendiert. Der zweite Waschschrift erfolgte bei 169 x g und 20 °C für 10 min. Bei dieser Zentrifugation verblieben die Thrombocyten im Überstand und konnten abgetrennt werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 45 ml MEM-Spinner komplett resuspendiert.

50 µl dieser Zellsuspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Mit Trypanblau-Lösung wurden eine 1:10 und 1:100 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt, auf eine Neubauer-Improved Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Durchführung erfolgte analog der Beschreibung in Abschnitt 4.3 Bestimmung der Zellzahl.

Anschließend erfolgte ein dritter Waschschrift mit MEM-Spinner komplett mit nachfolgender Zentrifugation bei 353 x g und 20 °C für 10 min. Der Überstand wurde wieder verworfen.

4.1.3.3 Der zweite Dichtegradient

Der zweite Gradient musste zunächst präformiert werden. Dazu wurden 30 ml Percoll-Mischung in einem Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen bei 3300 x g und 20 °C für 90 min zentrifugiert (ohne Bremse), wodurch sich ein hypotonischer, kontinuierlicher Dichtegradient ausbildete.

Dieser wurde mit bis zu $5 \cdot 10^8$ mononukleären Zellen in 3 ml MEM-Spinner komplett vorsichtig überschichtet. Durch Zentrifugation bei 1011 x g und 20 °C für 25 min trennten sich die Zellen in eine obere Bande aus Monocyten und eine untere Bande aus Lymphocyten auf. Die Monocyten wurden abgenommen und analog dem ersten Gradienten dreimal mit MEM-Spinner komplett gewaschen.

Nach dem zweiten Waschschrift bestimmte man wieder die Zellzahl durch Verdünnen der Zellsuspension in Trypanblau-Lösung (1:10 und 1:100) und Auszählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe der Neubauer-Improved-Zählkammer.

4.2 Kultivierung humaner Monocyten

Die isolierten Monocyten (siehe Abschnitt 4.1) wurden mit einer für das jeweilige Experiment benötigten Zellzahl ($2 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Monocyten) in ausreichend McCoy's Kompletmedium (1–2 ml) in 6- bzw. 24-Loch-Kulturplatten ausgesät und bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank bis zur Weiterverwendung inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit McCoy's Kompletmedium durchgeführt.

4.3 Bestimmung der Zellzahl und Überprüfung der Kulturbedingungen

Die Bestimmung der Zellzahl ist für viele Vorgänge wie der Zellseparation beim Percollgradienten oder bei Stimulations- und Hemmversuchen von entscheidender Wichtigkeit. Die Kenntnis der genauen Zellzahl ermöglicht die Interpretation eines Experimentes, z.B. durch Berechnung der Zellviabilität oder durch Beziehen der Ergebnisse auf eine festgelegte Zahl an Zellen zur Schaffung einer einheitlichen Basis für Vergleichszwecke.

Die Kultivierungsbedingungen wurden kontrolliert, indem die Monocyten vor Durchführung der entsprechenden Versuche gezählt und ihre Vitalität bestimmt wurde. Die Zellzahl kann im Laufe der Kultivierung durch verschiedene Einflüsse wie Zelltod, mechanischen Stress und Verluste beim Mediumwechsel abnehmen. Die Kulturbedingungen wurden dann als günstig angesehen, wenn für die Dauer der Kultivierung der Zellverlust gleich bleibend gering war und die Vitalität über 90 % lag.

Darüber hinaus wurde auch untersucht, ob die Zugabe der Substanzen, die für die Stimulationsexperimente eingesetzt werden sollten, einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben.

4.3.1 Beschreibung der Zählkammer

Die während der Isolierung gewonnenen Zellen bzw. die anschließend in Zellkulturplatten „Multiwell™ 24“ oder „Multiwell™ 6“ ausgesähten Zellen wurden im Medium aufgewirbelt, sodass eine homogene Zellsuspension entstand, und die Monocyten mittels der Fuchs-Rosenthal-Methode unter Verwendung einer Neubauer-Improved Zählkammer (Abbildung 45) ausgezählt werden konnten. Hierbei handelt es sich um einen Glasblock mit zwei eingeschliffenen Kammern, dessen definierte Schichtdicke zwischen mittlerem Steg und Deckglas durch ein in das Glas des mittleren Stegs eingraviertes Zählfeld bestimmten Flächeninhalts ergänzt wird. Die Kammertiefe beträgt 100 µm.

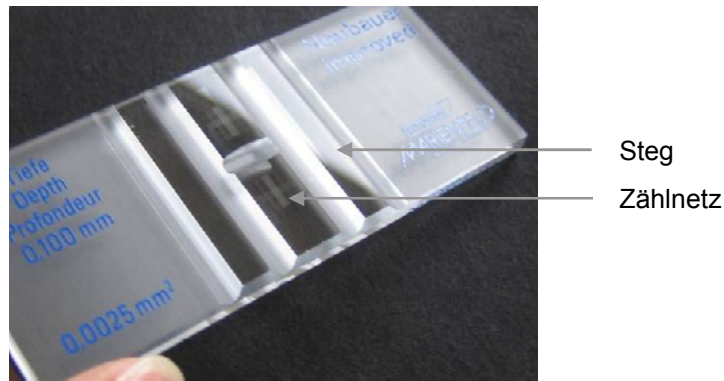


Abbildung 45: Neubauer-Improved Zählkammer mit eingraviertem Zählnetz.

Vier Leukocyten- bzw. Monocytenzählfelder (Eckquadrate) aus je 16 kleineren Quadraten umschreiben jedes eine Fläche von 1 mm^2 . Das große Quadrat in der Mitte ist zusätzlich in fünf mal fünf Gruppenquadrate mit einer Seitenlänge von je $200 \mu\text{m}$ und einem Flächeninhalt von je $40 \mu\text{m}^2$ aufgeteilt. Die Gruppenquadrate sind wiederum in 16 kleinste Quadrate von je $2.5 \mu\text{m}^2$ unterteilt, die für die Erythrocytenzählung verwendet werden (Abbildung 46).

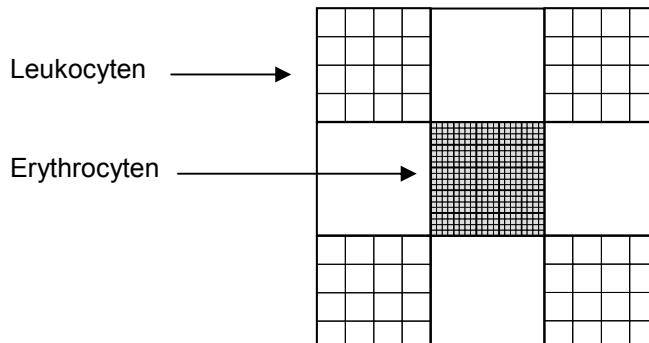


Abbildung 46: Vergrößerung des in die Kammer eingeschliffenen Zählnetzes. Die Eckquadrate mit 4×4 Feldern dienen zur Auszählung von Leukocyten und Monocyten; die kleinen Quadrate in der Mitte des Zählnetzes sind für die Bestimmung der Erythrocytenzahl vorgesehen.

4.3.2 Füllen der Zählkammer

Die Außenstege der Zählkammer wurden angehaucht und das Deckglas vorsichtig von vorne auf die Zählkammer geschoben. Die Ausbildung von Interferenzlinien

(Newton'sche Ringe) zwischen den Außenstegen und dem Deckglas zeigt, dass das Deckglas richtig aufgesetzt wurde.

Zur besseren Unterscheidung von intakten und toten Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension je nach Zelldichte im Verhältnis 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Von diesem Gemisch wurde am Rand des Deckplättchens gerade genug auf den mittleren Steg der Zählkammer pipettieren, dass sich der Spalt durch die Wirkung der Kapillarkraft vollständig füllte.

4.3.3 Auszählen der Zellen

Zur Bestimmung der Monocytenzahl wurden die Zellen von jeweils vier Großquadraten im Lichtmikroskop gezählt und der Mittelwert gebildet. Dabei wurde die Verdünnung so gewählt, dass pro Großquadrat etwa 10–50 Zellen ausgezählt wurden. Je nach Zellzahl wurde eines oder mehrere der Großquadrate zügig ausgezählt, da die Wärme der Mikroskopbeleuchtung durch Verdunstung zur Volumenkontraktion führt, die eine zu hohe Zellzahl vortäuscht.

Es wurden alle Zellen gezählt, die in einem Eckquadrat innerhalb der Dreifachlinienbegrenzung lagen und die Mittlere dieser Linien nicht berührten. Von den Zellen, die auf der mittleren Dreifachbegrenzungslinie lagen, wurden an zwei aneinander grenzenden Seiten die Zellen mitgezählt, welche die mittlere Begrenzungslinie berührten.

Die Vitalitätsrate der Monocyten wurde über den Quotienten aus lebenden zu toten Zellen bestimmt und als Prozentsatz ausgedrückt. Das Zytoplasma vitaler Zellen ist hell durchscheinend; abgestorbene Zellen füllen sich mit dem zugesetzten Azofarbstoff Trypanblau und erscheinen daher dunkler. Punktförmige oder sehr kleine Strukturen sind Thrombocyten, kleine und eventuell unregelmäßige (bikonkave) Zellen, die gelblich erscheinen, sind Erythrocyten. Die Berechnung der Zellzahl pro ml Medium erfolgte nach folgender Formel:

$$\underline{\text{Zellzahl}} \text{ [ZZ/ml]} = \frac{\text{Zahl der gezählten Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{kammerspezifischer Faktor} (10^4)}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}}$$

4.4 Kultivierung humaner Adipocyten

Die humanen Adipocyten (ca. 80000 Zellen pro *well*) wurden in 24-Loch-Kulturplatten geliefert. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit DMEM/Ham's F-12 Medium durchgeführt (1 ml Medium pro *well*) und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bis zur Verwendung kultiviert.

Humane Adipocyten werden von humanen Präadipocyten differenziert. Diese Adipocyten-Precursorzellen werden aus subkutanem Fettgewebe von gesunden, nicht-diabetischen Spendern zwischen 18 und 60 Jahren isoliert. Die Präadipocyten werden durch Zentrifugation nach Kollagenase-Behandlung gewonnen. Sie können als wachsende Precursorzellen kultiviert oder in Adipocyten differenziert werden, indem ihr Medium mit adipogenen und lipogenen Hormonen angereichert wird. 15 Tage nach Induktion der Differenzierung erhält man ausgereifte humane Adipocyten, die nach vollständiger Differenzierung mindestens zwei Wochen lebensfähig und für Experimente geeignet sind.

4.5 Kultivierung und Differenzierung von 3T3-Zellen

Die murinen Adipocyten wurden als gefrorene Kultur von der DSMZ bezogen (siehe Abschnitt 1.5). Die 3T3-Zellen wurden sofort nach Erhalt bei 37 °C in einem Thermomixer rasch aufgetaut und anschließend mit 10 ml vorgewärmtem Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren (200 x g für 5 min) wurden die Präadipocyten in 3 ml DMEM resuspendiert und in ein *well* einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesäht. Die Verdopplungszeit dieser Zellen beträgt etwa 40 Stunden. Eine konfluente Kultur wurde im Verhältnis 1 : 3 gesplittet.

Im Folgenden wurden die Zellen mit einer für das jeweilige Experiment benötigten Zellzahl (ca. 0.25 bis $1 \cdot 10^5$ Zellen) in ausreichend Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (1 ml bzw. 200 µl) in 24- bzw. 96-Loch-Kulturplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zwei Tage nachdem die Präadipocyten konfluent gewachsen waren, wurde die Differenzierung durch Zugabe von Differenzierungsmedium (10 % FBS, 10 µg/ml Insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dexamethason in DMEM), das mit adipogenen und lipogenen Hormonen angereichert ist, analog bekannten Protokollen²³⁸ induziert. Nach weiteren zwei Tagen wurde das Differenzierungsmedium durch DMEM Kulturmedium mit 10 µg/ml Insulin ersetzt. Am vierten Tag nach Beginn der

Differenzierung wurde das Medium gegen reguläres DMEM Kulturmedium gewechselt und alle zwei Tage ein Mediumwechsel bis zur Durchführung der Experimente vorgenommen.

Für die Langzeit-Lagerung wurden die Präadipocyten in 70 % DMEM, 20 % FBS und 10 % DMSO langsam eingefroren und in einem flüssigen Stickstoff-Tank bei -196 °C aufbewahrt.

4.6 Statistische Auswertung

Die Berechnung der statistisch signifikanten Unterschiede der ermittelten Werte wurde in den einzelnen Assays mittels GraphPad Prism (Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Der Name der verwendeten Methode und des Posttests sind beim jeweiligen Versuch angegeben. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

5 Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels FRAP-Assay

Der FRAP- (engl.: *ferric reducing antioxidant power*) Assay macht Aussagen über die antioxidative Aktivität von polyphenolischen Verbindungen in Bezug auf ihre eisenreduzierende Kraft.¹¹⁴

5.1 Chemikalien und Reagenzien

Die für diesen Assay benötigten Substanzen (L-(+)-Ascorbinsäure, 2,4,6-Tripyridyl-s-triazin (TPTZ), $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen. Außerdem wurden die Serumproben der Pycnogenol-Studie (Mehrfachgabe; siehe Abschnitt 1.2.4), der Kiefernrintenextrakt sowie einige seiner Bestandteile und die Metabolite M1 und M2 verwendet.

5.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die bei diesem Versuch eingesetzten Lösungen (300 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3.6, 20 mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) wurden bis auf die TPTZ-Lösung ausschließlich unter Verwendung von demineralisiertem Wasser hergestellt. Die 10 mM TPTZ-Lösung wurde in 40 mM HCl angesetzt. Des Weiteren wurden wässrige Lösungen der zu untersuchenden Antioxidantien (L-(+)-Ascorbinsäure, (+)-Catechin, *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, M1, M2, Protocatechusäure und Pycnogenol) in verschiedenen Konzentrationen hergestellt.

Das FRAP-Reagenz wurde je nach Bedarf kurz vor Verwendung durch Mischen von 300 mM Natriumacetat-Puffer, 10 mM TPTZ-Lösung und 20 mM $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Lösung im Verhältnis 10:1:1 hergestellt. Wässrige Lösungen bekannter Fe(II)-Konzentrationen im Bereich von 100–1000 μM ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) wurden zur Erstellung einer Kalibriergeraden eingesetzt.

5.3 Reduktion von Eisen durch die FRAP-Reaktion

900 μl frisch vorbereitetes FRAP-Reagenz wurde in einem Thermomixer auf 37 °C erwärmt und die Absorption als Leerwert bei 593 nm gemessen. 30 μl der Testsubstanz (wässrige Antioxidanzlösungen in variierenden Konzentrationen oder Serum) wurden zusammen mit 90 μl H_2O zum Ansatz gegeben, sodass die Endverdünnung der Probe im Reaktionsgemisch 1:34 betrug.

Die Absorptionen wurden während der gesamten Reaktionszeit über einen Zeitraum von 4 min für die Antioxidanzlösungen bzw. 60 min für die Serumproben protokolliert. Die Absorptionsänderung ΔA_{593} zwischen der Endablesung (4 min Wert bzw. 60 min Wert) und dem Blank (hier wurde Wasser anstatt einer Testsubstanz eingesetzt) wurde für jede Probe berechnet und das Ergebnis mit der Absorptionsänderung einer Fe(II)-Standardlösung mit bekannter Eisenionenkonzentration, die parallel getestet wurde, verglichen.¹²²

6 Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels DPPH-Assay

Der DPPH- (Diphenylpicrylhydrazyl-) Assay liefert Informationen über die Radikalfängereigenschaften von mono- und polyphenolischen Verbindungen, die für die Reduktion und das Bleaching des violetten DPPH-Radikals durch Transfer eines Wasserstoffatoms oder Reaktion mit einem anderen Radikal verantwortlich sind.

6.1 Chemikalien und Reagenzien

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl und Ethanol wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Außerdem wurden der Kiefernrintenextrakt, einige seiner Bestandteile und die Metabolite M1 und M2 verwendet.

6.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die bei diesem Versuch eingesetzte 60 μM DPPH-Lösung in Ethanol wurde täglich frisch angesetzt. Des Weiteren wurden wässrige Lösungen der zu untersuchenden Antioxidantien (L-(+)-Ascorbinsäure, (+)-Catechin, *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, M1, M2, Protocatechusäure und Pycnogenol) in diversen Konzentrationen bereitet.

6.3 Quenching des DPPH-Radikals

900 μl der DPPH-Lösung in Ethanol wurden mit 100 μl der zu untersuchenden Verbindungen in diversen Konzentrationen in einer Halbmikro-Küvette gemischt (Endkonzentration DPPH 54 μM ; Reaktionsvolumen 1 ml) und die Absorptionsänderung ΔA bei einer Wellenlänge von 515 nm, dem Absorptionsmaximum von DPPH, über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Parallel wurde ein Blank vermessen, der nur die ethanolische Lösung des Radikals ohne Zusatz von Antioxidantien enthielt.^{134,272}

Aus den erhaltenen Werten wurde die prozentuale Abnahme der Absorptionsänderung ΔA_{515} im Vergleich zum Blank ermittelt. Daraus konnte die Quenchung des DPPH-Radikals durch die getesteten Substanzen in Prozent berechnet werden. Der IC_{50} -Wert der untersuchten Antioxidantien wurde mittels linearer Regression mit Hilfe des Programms Microsoft Excel (Version 2003) aus den erhaltenen Dosis-Wirkungs-Diagrammen bestimmt, wobei der Korrelationskoeffizient mindestens 0.9 betrug und mindestens $n = 5$ Werte in die Regression eingingen.

7 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA

Die Untersuchung der Tumor Necrosefaktor (TNF) α Proteinexpression erfolgte in Zellkulturüberständen von kultivierten, humanen Monocyten, die aus Blutzellkonzentraten über zwei Dichtegradientenzentrifugationen isoliert wurden (siehe Abschnitt 4.1).

7.1 Stimulation humaner Monocyten zur Sekretion von TNF- α

7.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Das zur Stimulation der Monocyten verwendete Lipopolysaccharid (LPS; von *Salmonella minnesota*) sowie TNF- α wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) stammte von Calbiochem (Schwalbach). Das RPMI-Medium wurde von der Biochrom AG (Berlin) geliefert. Außerdem wurden die Metabolite M1 und M2 sowie deren Vorläufermolekül (+)-Catechin eingesetzt.

7.1.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Zur Stimulation der Monocyten wurde eine 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS-Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die benötigten Verdünnungen wurden in RPMI-Medium angesetzt. Die LPS-Stammlösung wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

7.1.3 Untersuchung der Wirkung von Serumproben auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Die isolierten und in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesähten humanen Monocyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen in McCoys Komplettmedium, Endvolumen 1.0 ml) wurden zunächst mit 500 μl Serum, das mit 500 μl RPMI-Medium verdünnt wurde, für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 6 % CO_2 im Brutschrank vorinkubiert. Durch Zugabe eines Stimulanz (10 ng/ml LPS-Lösung) und Inkubation für 6 h (Proben nach Mehrfachgabe) bzw. 48 h (Proben nach Einmalgabe) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 6 % CO_2 im Brutschrank wurden die Zellen zur

Produktion von TNF- α angeregt. Durch Zentrifugation bei 625 x g und 22 °C für 10 min in der Heraeus-Zentrifuge wurden die Zellen am Plattenboden gesammelt, so dass der Zellüberstand abgenommen werden konnte. Der Zellüberstand wurde aliquotiert und bis zur Analyse im ELISA bei -80 °C eingefroren.

7.1.4 Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Hierfür wurden die isolierten und in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesähten humanen Monocyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen in McCoys Komplettmedium, Endvolumen 1.0 ml) zunächst mit 0.5 μ M M1 bzw. M2 für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch anschließende Zugabe eines Stimulanz (10 ng/ml LPS-Lösung) und Inkubation für 6 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank wurde die Produktion von TNF- α angeregt. Der Zellüberstand wurde anschließend wieder abgenommen und bis zur Analyse mittels ELISA bei -80 °C eingefroren.

7.1.5 Untersuchung der Wirkung der Metabolite sowie (+)-Catechin auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten nach Vorinkubation mit TNF- α

Es wurde ein weiterer Versuch mit den Metaboliten sowie deren Vorläufermolekül (+)-Catechin durchgeführt, wobei die isolierten und in 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesähten humanen Monocyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen in McCoys Komplettmedium, Endvolumen 1.0 ml) zunächst mit 10 ng/ml TNF- α in McCoys Komplettmedium für 1 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank vorinkubiert wurden. Im Anschluß an diese Vorinkubation erfolgte wie bereits im Abschnitt 7.1.4 beschrieben die Inkubation mit 0.5 μ M M1, M2 bzw. (+)-Catechin für 1 h und die Stimulation mit 10 ng/ml LPS für 48 h bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank. Der Zellüberstand wurde anschließend wie gewohnt abgenommen und bis zur Analyse mittels ELISA bei -80 °C eingefroren.

7.1.6 Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Um das Maximum der TNF- α Sekretion zu bestimmen, wurden isolierte und in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesähte humane Monocyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen in McCoy's Kompletmedium, Endvolumen 1.0 ml) mit 0.5 μ M M1, M2 bzw. (+)-Catechin für 1 h inkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS bei 37 °C und 6 % CO₂ im Brutschrank stimuliert. Je 30 μ l Zellüberstand wurden nach 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 und 48 h entnommen und bis zur Analyse mittels ELISA bei -80 °C eingefroren.

7.2 Quantitative Bestimmung der humanen TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA

Der ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*) basiert auf einer Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik und dient zur quantitativen Bestimmung der TNF- α Konzentration in Zellkulturüberständen und Plasma.

7.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Es wurde der Human Quantikine TNF- α Immunoassay von R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet. Die benötigten Chemikalien und Reagenzien lagen alle dem ELISA-Kit bei und mussten zum Teil lediglich noch verdünnt oder solvatisiert werden. Die Lagerung des ELISA-Kits erfolgte bei 4 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (in der Regel 6 Monate). Nach Anbruch des ELISA-Kits wurden die Reagenzien innerhalb eines Monats aufgebraucht.

7.2.2 Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards

Das im Kit enthaltene Waschpufferkonzentrat wurde im Verhältnis 1:25 mit Millipore Wasser verdünnt. Das Calibrator Diluent RD6-35 wurde bei den Arbeiten mit Zellüberständen im Verhältnis 1:5 in Millipore Wasser verdünnt (Diluted Calibrator Diluent). Die Substratlösung wurde max. 15 min vor Gebrauch aus den beiden Farbreagenzien A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidin) im Verhältnis 1:1 gemischt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Der mitgelieferte, lyophilisierte TNF- α Standard wurde in 1.0 ml Millipore Wasser gelöst (ergab eine Stammlösung von 10,000 pg/ml) und die benötigten Lösungen für die Kalibriergerade durch entsprechende Verdünnung mit Diluted Calibrator Diluent RD6-35 mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 62.5 pg/ml, 15.6 pg/ml, 0 pg/ml.

Die Zellüberstände wurden vor Einsatz im ELISA mit Diluted Calibrator Diluent verdünnt. Das benötigte Mischungsverhältnis wurde in Vorversuchen ermittelt und lag bei den Hemmversuchen bei etwa 1:20 bis 1:30, bei den Versuchen mit Vorinkubation mit TNF- α bei 1:100. Alle Reagenzien und Proben wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

7.2.3 Protokoll des TNF- α ELISA

In die Vertiefungen einer 96-Loch (*well*) Polystyren-Mikrotiterplatte, die mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen TNF- α beschichtet war, wurden 50 μ l Assay Diluent RD1F sowie 200 μ l rekombinanter, humaner, von *E. coli* stammender TNF- α Standard oder die zu untersuchende Probe pipettiert. Die *wells* wurden mit einem Klebestreifen luftdicht versiegelt und die Mischung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde mit Hilfe des Titertek Microplate Washers die Mikrotiterplatte durch viermaliges Spülen mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen und auf diese Weise nicht gebundenes TNF- α entfernt.

In jedes *well* wurde nun 200 μ l eines polyklonalen anti-TNF- α Antikörpers, der an Peroxidase gekoppelt ist, pipettiert, mit einem Klebestreifen bedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daran schloß sich wieder ein Waschschrift mit vier Zyklen und jeweils 200 μ l Waschpuffer an, um jegliches ungebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz zu entfernen.

Im Anschluß daran wurden in jedes *well* 200 μ l Substratlösung (1:1 Gemisch aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) geben und für 20 min bei Raumtemperatur geschützt vor Licht inkubiert. Die Farbe entwickelte sich hierbei proportional zur Menge an TNF- α , das im ersten Schritt gebunden wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Stopplösung (2 N H₂SO₄) zu jedem *well* gestoppt. Hierbei war eine Farbänderung von blau nach gelb zu beobachten.

Die optische Dichte wurde anschließend innerhalb von 30 min bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des BIO-RAD Microplate Readers bestimmt. Die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 560 nm, um die optische Imperfektion der Platte zu korrigieren.

7.2.4 Berechnung der Ergebnisse des TNF- α ELISA

Mit Hilfe der TNF- α Standards bekannter Konzentrationen wurde eine Kalibriergerade durch Regressionsanalyse erstellt, wobei der Korrelationskoeffizient mindestens 0.9 betrug. Aus diesen Daten konnten die TNF- α Konzentrationen der Zellkulturüberstände nach Inkubation mit Serumproben berechnet werden. Um die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden alle Werte auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen.

8 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 *ex vivo*

Zur Bestimmung der Hemmwirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase- (COX) 1 und COX-2 wurde der COX Inhibitor Screening Assay Kit verwendet. Der Test beruht auf der Konkurrenz von Prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ und eines $PGF_{2\alpha}$ -Acetylcholinesterase Konjugats um die Bindung an eine begrenzte Menge $PGF_{2\alpha}$ monoklonalen Antikörpers. $PGF_{2\alpha}$ wird dabei durch $SnCl_2$ -Reduktion des COX-Produktes PGH_2 gebildet.

8.1 Geräte und Materialien

| | | |
|---------------|--------------------------------------|--|
| Wasserbad | Typ 1083 | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel |
| Reagenzgläser | Typ 100 x 15/16 mit Schraubverschluß | Hartenstein, Würzburg |

8.2 Chemikalien und Reagenzien

Bei diesem Assay wurden die nach einmaliger und wiederholter Einnahme von Pycnogenol gewonnenen Serumproben, sowie der Metabolit M1 in wässriger Lösung untersucht. Die Referenz Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Für die Durchführung der Cyclooxygenase (COX) Reaktion und die anschließende Bestimmung der Prostaglandin-Konzentration bzw. der Hemmung der COX-Aktivität wurde das COX Inhibitor Screening Assay Kit von Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) verwendet. Die benötigten Chemikalien und Reagenzien lagen alle dem Kit bei und mussten zum Teil lediglich noch verdünnt oder solvatisiert werden. Die Lagerung des Kits erfolgte bei -80 °C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum (in der Regel 6 Monate). Nach Anbruch der mitgelieferten Reagenzien wurden diese innerhalb des vorgeschriebenen Haltbarkeitszeitraums aufgebraucht.

8.3 Herstellung der verwendeten Lösungen des Pre-Assays

Das im Kit enthaltene Reaktionspufferkonzentrat wurde im Verhältnis 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt. Dieser Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM Phenol, pH 8.0) wird bei der COX-Reaktion, sowie zur Verdünnung des Häm benötigt. Er ist bei Raumtemperatur für mindestens einen Monat stabil. Die Häm-Lösung in DMSO wurde im Verhältnis 1:5 mit Reaktionspuffer verwendet. Diese Lösung ist bei 25 °C für 12 h stabil. Die Arachidonsäure in Ethanol wurde im Verhältnis 1:1:8 mit 0.1 M KOH-Lösung und Millipore Wasser verdünnt und innerhalb einer Stunde verbraucht. Die 1 M HCl wurde im Verhältnis 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt. Die so erhaltene 0.1 M HCl wurde zur Bereitung der Zinnchlorid-Lösung verwendet, wobei 125 mg SnCl₂ in 2.5 ml 0.1 M HCl gelöst wurden. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur für 8 h stabil.

Alle Reagenzien und Proben wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Der Reaktionspuffer wurde vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

8.4 Protokoll der COX-Reaktion (Pre-Assay)

Der COX Inhibitor Screening Assay wurde analog der beiliegenden Beschreibung des Herstellers verwendet. In einem Reagenzglas mit Schraubverschluß wurden 10 µl Häm-Lösung und 10 µl COX-Enzym (COX-1 oder COX-2) mit 950 µl Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM Phenol) gemischt (Vortex) und entweder mit 20 µl Reaktionspuffer oder 20 µl der zu untersuchenden Testlösung (Serumprobe, wässrige Aspirinlösung oder wässrige Lösung des Metaboliten M1) versetzt und für 10 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Aspirin wurde in seiner IC₅₀ Konzentration¹⁹⁷ (1.67 µM für Cox-1 bzw. 277.47 µM für COX-2) als Positivkontrolle eingesetzt.

Anschließend wurden 10 µl Arachidonsäure zugegeben und für weitere 2 min bei 37 °C inkubiert, um die COX-Reaktion zu starten. Die Zugabe von 50 µl 1 M HCl beendete die enzymatische Katalyse, gefolgt von chemischer Reduktion mit 100 µl gesättigter Zinnchloridlösung für 5 min bei Raumtemperatur. Die Reaktionsprodukte waren bei 0–4 °C für eine Woche stabil.

8.5 Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards des Enzym-Immuno-Assays (EIA)

Das im Kit enthaltene EIA-Puffer-Konzentrat wurde mit 90 ml Millipore Wasser verdünnt. Das Waschpuffer-Konzentrat wurde im Verhältnis 1:400 mit Millipore Wasser verdünnt und 0.5 ml/l Tween 20 zugegeben. Der mitgelieferte, lyophilisierte Prostaglandin-Standard wurde in 1.0 ml EIA-Puffer gelöst (ergab eine Stammlösung von 10 ng/ml) und die benötigten Lösungen für die Kalibriergerade durch entsprechende Verdünnung mit EIA-Puffer mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 2000 pg/ml, 500 pg/ml, 62.5 pg/ml, 15.6 pg/ml.

Der Prostaglandin Screening Acetylcholinesterase Tracer wurde mit 6 ml EIA-Puffer resuspendiert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht (Lagerung bei 4 °C). Das Prostaglandin Screening Antiserum wurde ebenfalls in 6 ml EIA-Puffer resuspendiert und innerhalb der nächsten 4 Wochen verbraucht (Lagerung bei 4 °C). Die erhaltenen Ansätze des Pre-Assays wurden im folgenden Verhältnis mit EIA-Puffer verdünnt: Background-Proben 1:1000, 100 % Initial Activity-Proben 1:2000, Serumproben 1:2000.

Das Ellman's Reagenz zur Entwicklung der EIA-Platte wurde erst kurz vor Verwendung hergestellt. Dazu wurde ein Vial Ellman's Reagenz mit 20 ml Millipore Wasser resuspendiert und bis zum Einsatz lichtgeschützt aufbewahrt. Die Lösung musste am selben Tag der Herstellung verbraucht werden.

8.6 Protokoll des Enzym-Immuno-Assays

Die COX-Aktivität wurde basierend auf der Menge an gebildetem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ gemessen und mittels EIA-Kit detektiert. Die Durchführung erfolgte analog dem beiliegenden Protokoll des COX Inhibitor Screening Assay Kits.

50 µl der zu untersuchenden Proben wurden im Anschluß an den Pre-Assay (siehe Abschnitt 8.4) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte, gecoatet mit Maus anti-Kaninchen IgG, überführt und mit 50 µl Prostaglandin Acetylcholinesterase Tracer und 50 µl Prostaglandin Antiserum versetzt. Die Platte wurde mit einem Plastikfilm zugeklebt und für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reaktionsgemisch durch fünfmaliges Waschen der Platte mit 200 µl Waschpuffer mit Hilfe des Titertek Microplate Washers entfernt. 200 µl Ellman's Reagenz wurden in jedes *well* gegeben und die Platte für 90 min geschützt vor Licht

bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Kontrollwells bei Messung im BIO-RAD Microplate Reader einen OD-Wert (engl.: *optical density*) zwischen 0.3 und 0.8 bei einer Wellenlänge von 405 nm ergaben.

8.7 Berechnung der Ergebnisse des COX-Assays

Der Absorptionswert des Leerwertes (*blank*) (nur Ellman's Reagenz) wurde von allen anderen *wells* subtrahiert. Der Wert % B/B₀, der den Quotienten aus gebundenem Standard bzw. Probe und maximal gebundenem Substrat in Prozent beschreibt, wurde für alle Standards und Proben wie folgt berechnet:

$$\% \frac{B}{B_0} = \frac{(well - NSB)}{corrected B_0} * 100$$

mit NSB = *non-specific binding* (unspezifisch gebundenes Substrat)
 B₀ = *maximum binding* (maximal gebundenes Substrat)
 corrected B₀ = B₀ – NSB (korrigierter Wert für maximale Bindung)

Die graphische Darstellung der Standardkurve erfolgte durch halblogarithmische Auftragung von % B/B₀ gegen die Prostaglandinkonzentration. Aus dieser Standardkurve konnte mittels linearer Regression die bei der Reaktion gebildete Prostaglandinkonzentration der Proben berechnet werden. Aus den so erhaltenen Prostaglandinkonzentrationen wurde das Verhältnis der Hemmung von COX-2 zu COX-1 berechnet, das eine Aussage über die Selektivität der absorbierten Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und seines Metaboliten M1 bezüglich der Hemmwirkung auf die beiden Isoformen des COX-Enzyms macht.

Nachdem die Hintergrundwerte von den IA-Werten (engl.: *initial activity*) und den Werten der untersuchten Proben subtrahiert wurden, wurde die Hemmung der COX-Aktivität in Prozent wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = \frac{(IA - Probe)}{IA} * 100$$

mit IA = *initial activity*

Die Berechnung der statistisch signifikanten Unterschiede der untersuchten Proben erfolgte mittels *Wilcoxon matched pairs signed rank test*. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

9 Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernrintenextraktes auf die Aktivität der α -Glucosidase

Mit Hilfe des α -Glucosidase-Assays wurde die Hemmwirkung der Bestandteile und Fraktionen von Pycnogenol auf das Enzym α -Glucosidase untersucht. Hierzu wurde die chromogene Methode von Adisakwattana et al.²⁷³ mit geringfügigen Änderungen verwendet.

9.1 Geräte und Materialien

| | | |
|-------------------|-------------------|---------------------------|
| Mikrotiterplatten | Typ „Falcon 3912“ | Becton Dickinson, CA, USA |
|-------------------|-------------------|---------------------------|

9.2 Chemikalien und Reagenzien

Bei diesem Assay wurden die Substanzen (+)-Catechin, *o*-Cumarsäure, (-)-Epicatechin, Ferulasäure, Gallussäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure, Sinapinsäure und (\pm)-Taxifolin, der Gesamtextrakt Pycnogenol, sowie die Fraktionen I–IV des Kiefernrintenextraktes untersucht.

Als Referenz wurde Acarbose (Glucobay[®] 50 N1) der Firma Bayer Vital (Leverkusen), sowie Grüner Tee Extrakt der Emil Flachsmann AG (Wädenswil, Schweiz) verwendet. Das Enzym α -Glucosidase (von *Saccharomyces cerevisiae*) sowie das Substrat *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (*p*NPG) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

9.3 Herstellung der verwendeten Lösungen

Das Enzym α -Glucosidase wurde in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.9, resuspendiert, so dass eine Konzentration von 1 U/ml resultierte, aliquotiert und bei -40 °C gelagert. Die 1.25 mM *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid-Lösung wurde ebenfalls in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.9, angesetzt. Als Stopplösung wurde eine wässrige 1 M Na₂CO₃-Lösung verwendet. Des Weiteren wurden wässrige Lösungen der zu untersuchenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt.

9.4 Protokoll der Hemmung von α -Glucosidase

In einem Eppendorfgefäß wurden 20 μ l 1 U/ml α -Glucosidase und 100 μ l der zu untersuchenden wässrigen Testlösung vermischt und für 10 min bei 37 °C in einem Thermomixer unter leichtem Schütteln (300 rpm) vorinkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 380 μ l 1.25 mM *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid-Lösung gestartet und das Reaktionsgemisch für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Katalyse wurde durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃-Lösung beendet. 100 μ l der Reaktionsmischung wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption mit Hilfe des BIO-RAD Microplate Readers bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

9.5 Berechnung der Ergebnisse des α -Glucosidase Assays

Aus den erhaltenen Werten wurde die prozentuale Abnahme der Absorptionsänderung ΔA_{405} im Vergleich zum Leerwert (*blank*) – hier wurde H₂O anstatt der zu untersuchenden Testlösung eingesetzt – ermittelt. Daraus konnte die Hemmung der α -Glucosidase durch die getesteten Substanzen in Prozent berechnet werden. Der IC₅₀-Wert ist definiert als diejenige Menge an Substanz, die benötigt wird, um die Aktivität des Enzyms um 50 % zu senken¹³⁴, und wurde mittels linearer Regression aus den Dosis-Wirkungs-Diagrammen bestimmt, wobei der Korrelationskoeffizient mindestens 0.9 betrug und mindestens n = 5 Werte in die Regression eingingen.

10 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PPAR- γ in humanen Monocyten

Zur Quantifizierung von Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ in Zellkernextrakten von kultivierten, humanen Monocyten wurde ein ELISA entwickelt.

10.1 Stimulation humaner Monocyten zur Produktion von PPAR- γ

10.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Fmoc-Leucin und Fenofibrat wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Das Rosiglitazon-maleat stammte von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz).

10.1.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die Stammlösungen der PPAR- γ Agonisten Fmoc-Leucin und Rosiglitazon mit einer Konzentration von 1 mM wurden in 35 % DMSO angesetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die 1 mM Stammlösung von Fenofibrat wurde in 1:3 DMF/PBS hergestellt und ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die zur Stimulation benötigten Lösungen der Agonisten mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden kurz vor Gebrauch in McCoy's Kompletmedium verdünnt.

10.1.3 Protokoll der Stimulation

10.1.3.1 Vorversuche – Variation der Konzentration und Inkubationszeit der Agonisten

Zunächst sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Variation der Konzentration der Agonisten sowie der Inkubationszeit auf die Aktivierung von PPAR- γ besitzen. Die isolierten und in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesähten humanen Monocyten ($5 \cdot 10^6$ Zellen in McCoy's-Medium, Endvolumen 1.0 ml) wurden mit diversen Konzentrationen der PPAR- γ Agonisten Rosiglitazon-maleat, Fenofibrat bzw. Fmoc-Leucin und dem Metaboliten M1 (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM) für 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 bzw. 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 6 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

10.1.3.2 Inkubation der Zellen mit M1 bzw. Rosiglitazon

In den weiteren Experimenten wurden die humanen Monocyten für 4 h mit dem jeweiligen Agonisten inkubiert. Die Konzentration für Rosiglitazon betrug 0.5 μM , für M1 14 nM, was die entsprechenden Plasmakonzentrationen der Testsubstanzen nach oraler Applikation einer Standarddosis repräsentieren.

10.1.4 Geräte und Materialien

| | | |
|--------------------------------|--|------------------------------------|
| Ultrazentrifugal- einheiten | Microcon Ultracel YM-30, MWCO 30000 | Millipore Co., Bedford, MA, USA |
|--------------------------------|--|------------------------------------|

10.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und Natriumorthovanadat wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Der Proteaseinhibitorcocktail CompleteTM stammte von Roche Applied Science (Mannheim).

10.1.6 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die beiden Lysepuffer Low Salt Buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 % Triton X-100, 10 % Glycerol, 1 Tablette CompleteTM/50 ml) und High Salt Buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 % Glycerol, 1 Tablette CompleteTM/50 ml) wurden unter Verwendung von Millipore Wasser hergestellt.

10.1.7 Protokoll der Zellkernextrakterstellung

Die Präparation der Zellkernextrakte aus kultivierten humanen Monocyten erfolgte analog der Beschreibung von Eickelberg et al.²⁷⁴.

Nach Ende der Stimulationszeit der Monocyten wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g und 4 °C in der Beckman-Zentrifuge).

Anschließend wurde mit einem Aliquot der Zellsuspension eine 1:15 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung hergestellt und die Zellzahl wie in Abschnitt 4.3 beschrieben bestimmt. Das Zellpellet wurde in 100 µl Low Salt Buffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Effizienz der Lyse wurde anschließend mit einem Aliquot der Zellsuspension durch Färbung mit Trypanblau-Lösung unter dem Lichtmikroskop überprüft. Durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 x g und 4 °C wurde der cytosolische Extrakt von den Zellkernen abgetrennt. Das Zellpellet wurde der Zellzahl entsprechend in High Salt Buffer resuspendiert, wobei für $1 \cdot 10^6$ Monocyten 100 µl Lysepuffer verwendet wurden, und 30 min auf Eis inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 10 min bei 13000 x g und 4 °C wurde der Zellkernextrakt abgetrennt.

10.1.8 Aufkonzentration und Entsalzen der Proben

Der Zellkernextrakt wurde in Ultrazentrifugaleinheiten überführt und für 20 min bei 14000 x g zentrifugiert. Hierdurch wurde eine Aufkonzentration um etwa den Faktor 10 erreicht. Die Proben wurden in 100 µl PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Eine dreifache Wiederholung dieses Schrittes ermöglichte laut Herstellerangaben eine Entfernung von etwa 95–99 % der Salze.

Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C bis zum Einsatz im ELISA gelagert.

10.2 Quantitative Bestimmung der PPAR- γ Konzentration in Zellkernextrakten humaner Monocyten

10.2.1 Geräte und Materialien

| | | |
|-------------------|---|--------------------|
| Mikrotiterplatten | 96-Loch-Platten, mit Streptavidin ge-coated | Sigma, Taufkirchen |
|-------------------|---|--------------------|

10.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Der polyklonale Primärantikörper *anti-human* PPAR- γ 1+2 sowie der Enzym-markierte Sekundärantikörper *anti-rabbit* IgG (H + L) HRP wurden von Acris Anti-

bodies (Hiddenhausen) bestellt. Die Positivkontrolle, das rekombinante humane PPAR γ Protein, stammte von Dianova (Hamburg). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Tween-20 wurden von Fluka (Taufkirchen), HCl, Wasserstoffperoxid sowie Natriumacetat von Merck (Darmstadt) und Dimethylsulfoxid (DMSO) von Calbiochem (Schwalbach) bezogen.

10.2.3 Sequenz der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) (Maßstab 0.01 μ mol, HPLC-Reinigung) synthetisiert, wobei eines der beiden Oligonukleotide jeweils am 5'-Ende mit Biotin modifiziert war. Es wurden zwei Sets von Oligonukleotiden mit unterschiedlicher Spacerlänge verwendet, um den Einfluss der Spacerlänge auf die Bindungseigenschaften des Substrates (PPRE) im ELISA zu testen.

Oligoset 1:

PPRE w/Biotine 5'-AAC TAG GTC AAA GGT CA-3'

PPRE 5'-TGA CCT TTG ACC TAG TT-3'

Oligoset 2:

PPRE w/Biotine 5'-AAC TAA CTA GGT CAA AGG TCA-3'

PPRE 5'-TGA CCT TTG ACC TAG TTA GTT-3'

10.2.4 Herstellung der verwendeten Lösungen und Standards

Für die Hybridisierung des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Elementes (PPRE) wurden 100 μ M Lösungen der Oligonukleotide in STE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) bereitet. Die Oligonukleotide wurden in äquimolaren Mengen in einem Thermomixer für 15 min auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Aliquots mit einer Konzentration von 25 pM des so synthetisierten doppelsträngigen PPRE (dsPPRE) wurden bei -20 °C gelagert.

Die beiden Antikörper wurden entsprechend der Angabe des Herstellers resuspendiert und Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Das TMB-Reagenz wurde täglich frisch direkt vor Verwendung in 0.1 M Natriumacetat-Puffer pH 5.5 mit 2 % DMSO und 0.005 % H₂O₂ hergestellt.

10.2.5 Protokoll des PPAR- γ ELISA

In die *wells* einer mit Streptavidin-gecoateten Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μ l 25 pM dsPPRE pipettiert und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des MultiWash Advantage die Platte durch viermaliges Spülen mit je 250 μ l PBS mit 0.05 % Tween gewaschen und auf diese Weise nicht gebundenes Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element entfernt.

Nach Zugabe von 100 μ l Zellkernextrakt wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert, um eine optimale Hybridisierung von PPAR- γ der Probe an das dsPPRE zu gewährleisten. Erneutes viermaliges Waschen der Platte mit je 250 μ l PBS mit 0.05 % Tween entfernte die Reste des ungebundenen Zellkernextraktes.

Die Bindung von 0.1 μ g/ml primärem Antikörper *anti-human* PPAR- γ 1+2 erfolgte bei Raumtemperatur für 60 min. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 0.1 μ g/ml Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper *anti-rabbit* IgG-HRP bei Raumtemperatur für 30 min gebunden. Die Konzentration der Antikörper wurde durch eine Schachbrettitration ermittelt (siehe Abschnitt 10.2.6).

Nach dem Waschen der Platte wurden 100 μ l frisch vorbereitetes TMB-Reagenz in die *wells* der Mikrotiterplatte pipettiert und lichtgeschützt für 30 min inkubiert. Die Farbe entwickelte sich hierbei proportional zur Menge an PPAR- γ , das an das dsPPRE gebunden wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (1 N HCl) zu jedem *well* gestoppt. Hierbei war eine Farbänderung von blau nach gelb zu beobachten.

Die optische Dichte wurde anschließend innerhalb von 15 min bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des Multiskan Ascent Microplate Readers bestimmt. Die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 560 nm, um die optische Imperfektion der Platte zu korrigieren.

10.2.6 Schachbrettitration

Zur Bestimmung der optimalen Arbeitsverdünnung für die im ELISA verwendeten immunologischen Reaktionspartner wurde eine Schachbrettitration nach Crowther¹⁸¹

durchgeführt. Dabei wurden die beiden Antikörper *anti-human* PPAR- γ 1+2 und *anti-rabbit* IgG-HRP in PBS verdünnt, wobei der primäre Antikörper vertikal in die Reihen A–G in die Vertiefungen 1–12 der Mikrotiterplatte und der Sekundärantikörper horizontal in die Spalten 1–11 von Reihe A–H pipettiert wurde. Hierbei erfolgte die serielle Verdünnung von Spalte 2–11 und Reihe B–G (Spalte bzw. Reihe 2: Stammlösung 5 ng/ μ l; Spalte bzw. Reihe 3: 1:1 verdünnt; etc.). Die Ränder der Platte wurden für die Kontrollen verwendet, um Randeffekte bei der Bestimmung der optimalen Bedingungen auszuschließen. Reihe H sowie Spalte 12 dienten jeweils als Negativkontrolle (ohne entsprechenden Antikörper) (Abbildung 47).

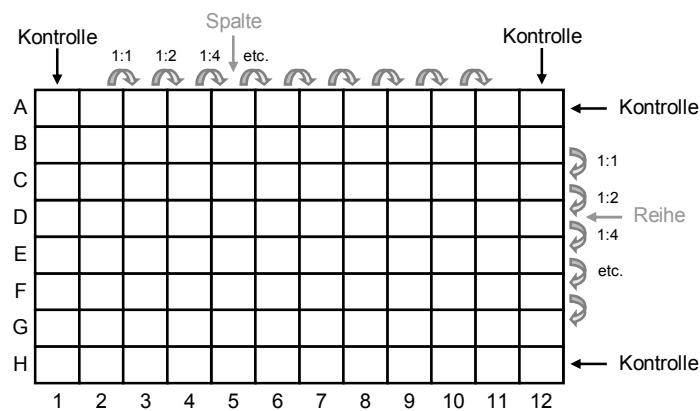


Abbildung 47: Schematische Darstellung des Ablaufs der Schachbretttitration.

Die gewünschte Verdünnung des jeweiligen Antikörpers und damit die optimale Kombination hinsichtlich der Testsensitivität wurde so gewählt, dass ein niedriger Verbrauch der Reagenzien bei gleichzeitiger hoher Extinktion (OD zwischen 0.6 und 1.0) gewährleistet war und unspezifische Bindung der Antikörper ausgeschlossen werden konnte.

11 Bestimmung der Glucosetransporter-Dichte auf der Oberfläche von Monocyten bzw. Adipocyten mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von Glucosetransportern (GLUT) auf der Oberfläche von kultivierten, humanen Adipocyten bzw. murinen 3T3 Adipocyten untersucht.

11.1 Geräte und Materialien

| | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Mikrotiterplatte | 96-Loch-Platte mit Rundboden | Sarstedt, Nümbrecht |
| FACS-Röhrchen | Falcon Tubes, 5 ml, 75x12 mm | Sarstedt, Nümbrecht |
| Durchflusszytometer | Coulter Epics XL™ Flow Cytometer | Beckman Coulter, Krefeld |

11.2 Chemikalien und Reagenzien

Das zur Stimulation verwendete Insulin (aus Rinderpankreas) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, Rosiglitazon-maleat von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz). Cytochalasin B von *Helminthosporium dematioideum* und Propidiumiodid wurden von Fluka (Taufkirchen), Rinderserumalbumin (BSA Type H1) von Gerbu (Gaiberg) bestellt. Der Primärantikörper *mouse monoclonal anti-human Glucosetransporter (GLUT) 4* stammte von Acris (Hiddenhausen), der Fluorescein-isothiocyanat- (FITC) konjugierte Sekundärantikörper *goat anti-mouse IgG (H+L)* von Dianova (Hamburg).

11.3 Herstellung der verwendeten Lösungen

Die bei diesem Versuch eingesetzten Lösungen wurden ausschließlich unter Verwendung von Millipore Wasser hergestellt. Es wurde eine Stammlösung von Insulin mit einer Konzentration von 500 U/l angesetzt. Die zur Stimulation benötigten Insulinlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden kurz vor Gebrauch in DMEM/Ham's F-12 Medium (für humane Adipocyten) oder DMEM-Kulturmedium (für

3T3-Adipocyten) verdünnt. Der Primärantikörper wurde analog den Herstellerangaben resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Der Sekundärantikörper lag in einer PBS-Lösung vor und wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Arbeitslösungen der Antikörper wurden kurz vor Gebrauch durch entsprechende Verdünnung in PBS-Puffer hergestellt.

11.4 Vorinkubation humaner Adipocyten bzw. muriner 3T3 Adipocyten mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin und Stimulation mit Insulin

Die in 24-Loch-Zellkulturplatten kultivierten humanen Adipocyten (ca. 80000 Zellen pro *well* in DMEM/Ham's F-12 Medium, Endvolumen 1.0 ml) bzw. 8–10 Tage alte 3T3 Adipocyten (ca. 100000 Zellen pro *well* in 3T3 Kulturmedium, Endvolumen 1.0 ml) wurden über Nacht ausgehungert (Kulturmedium ohne Insulin) und am folgenden Tag mit $0.5\text{ }\mu\text{M}$ Rosiglitazon, 14 nM Metabolit M1 bzw. $0.21\text{ }\mu\text{M}$ (+)-Catechin für 2 bzw. 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 im Brutschrank inkubiert. Diese Konzentrationen entsprechen den Plasmakonzentration der Testsubstanzen nach oraler Applikation einer Standarddosis.^{96,205} Anschließend erfolgte die Stimulation der Adipocyten durch Zugabe von 0.1 U/l Insulin und Inkubation für weitere 30 min. Die optimale Insulinkonzentration von 0.1 U/l war in Vorversuchen ermittelt worden und entsprach in etwa den Nüchtern-Plasmainsulinkonzentrationen von Diabetikern ($52 \pm 7\text{ mU/l}$) und Nicht-Diabetikern ($47 \pm 6\text{ mU/l}$).²³⁹

11.5 Fluoreszenzmarkierung der Glucosetransporter

Durch Zugabe von $10\text{ }\mu\text{M}$ Cytochalasin B zum Medium und Inkubation für 10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Glucosetransport durch Bindung des Moleküls an die Innenseite des Hexosetransportersystems gestoppt.²⁷⁵ Die Zellkulturplatte wurde für 2 min bei $300 \times g$ und $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ kaltem PBS mit $1\text{ }\%$ BSA gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der zu analysierenden Proben mit bzw. ohne (Negativkontrolle) $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Primärantikörper für 60 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ kaltem PBS mit $1\text{ }\%$ BSA und Abzentrifugation bei $300 \times g$ und $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 min wurden die Proben mit $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Lichtschutz

inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 50 µl 1 mM Propidiumiodid in PBS zugegeben, die Zellen sofort für 2 min bei 300 x g und 4 °C abzentrifugiert und dreimal mit je 100 µl kaltem PBS mit 1 % BSA gewaschen. Die Adipocyten wurden in 100 µl PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

11.6 Messung der GLUT-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Glucosetransporter-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten wurde mit Hilfe des Coulter Epics XL™ Flow Cytometers durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm durch einen Argonionen-Laser angeregt und seine Emission bei 530 nm bestimmt.

In einem Falcon Röhrchen wurden 100 µl der FITC-markierten Zellsuspension mit 500 µl PBS gemischt und in die Messvorrichtung des Durchflusszytometers eingespannt. Die Flußrate wurde so gewählt, dass 300 bis 800 Adipocyten pro Sekunde den Lichtstrahl passierten. Die Adipocytenpopulation wurde über die Darstellung Vorwärtsstreuung (engl.: *forward scatter*, FSc) gegen Seitwärtsstreuung (engl.: *side scatter*, SSc) definiert.

Durch Darstellung der Vorwärtsstreuung gegen die Emissionsfluoreszenz des Propidiumiodids, dessen Maximum bei 617 nm liegt, konnten tote Zellen visualisiert werden, die bei der Datenaufnahme ausgeschlossen wurden, so dass ausschließlich intakte Adipocyten in die Auswertung gingen. Ein Minimum von 10000 gezählten Zellen wurde festgelegt und durch Bestimmung der Intensität des Emissionslichts von FITC bei 495 nm der Anteil GLUT-positiver Zellen sowie die Antigendichte ermittelt.

11.7 Analyse und Darstellung der mit FACS generierten Daten

Es gibt zwei grundlegende Darstellungen, die bei der FACS-Analyse zum Einsatz kommen, das Streudiagramm (Dot Plot) und das Histogramm, wobei das Streudiagramm (teilweise auch als Punktwolkendiagramm bezeichnet) eine zweidimensionale Erweiterung des Histogramms ist.

Zuerst wurden die Zellen in einem 2-D Dot Plot entsprechend ihres Messwertes als Punkt eingetragen, wobei die Vorwärtsstreuung (FSc) gegen die

Seitwärtsstreuung (SSc) aufgetragen wurde (Abbildung 48). Von diesen Zellen wurden nur jene in die weitere Analyse eingeschlossen, die aufgrund ihrer Streulichteigenschaften mature Adipocyten repräsentierten. Durch Festlegung sogenannter „gates“ kann die entsprechende Region im Dot Plot definiert werden.

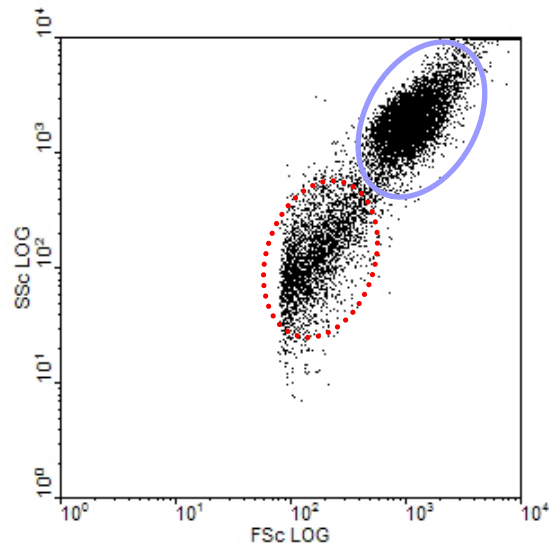


Abbildung 48: Darstellung eines typischen Streudiagramms. Logarithmische Auftragung von Zellgröße (SSc) gegen Granularität (FSc). Blau eingekreist („gate“) sind die ausdifferenzierten Adipocyten, rot die Prädipocyten.

Als nächstes wurden die GLUT-positiven Zellen in einem eindimensionalen Histogramm visualisiert, das die Verteilung der Fluoreszenz verdeutlicht. Hier wird die jeweilige Anzahl der gemessenen Zellen (engl.: *count*) (Abszisse) gegen die Fluoreszenzintensität (Ordinate) aufgetragen (Abbildung 49). Die Antigendichte wurde aus der Verschiebung der Fluoreszenzintensität des Fluorescein gegenüber der Negativkontrolle (nur sekundärer Antikörper) ermittelt. Marker definieren dabei bestimmte Bereiche in einem Histogramm und werden durch untere und obere Grenzwerte festgelegt. Hierdurch kann der Anteil GLUT-4 positiver Adipocyten gegenüber der Gesamtzahl bestimmt werden.

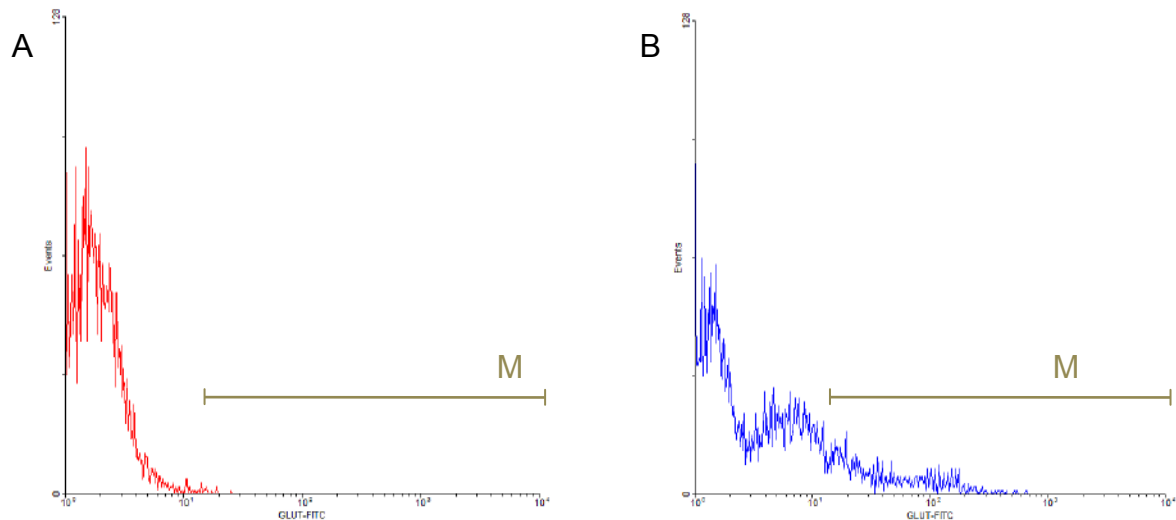


Abbildung 49: 1-D Histogramm der GLUT-4 positiven Zellen. Dargestellt ist die Zellzahl (*count*) gegen die Fluoreszenzintensität. Histogramm A repräsentiert die Negativkontrolle. Histogramm B stellt exemplarisch einen Versuchsansatz dar, in dem Zellen mit 0.5 μM Rosiglitazon für 24 h behandelt wurden. Eingezeichnet ist ebenfalls der Marker (M), der den Bereich der GLUT-4 positiven Adipocyten definiert.

In einem weiteren Histogramm wurden die Propidiumiodid-positiven Zellen gegen die Fluoreszenzintensität dargestellt. Somit konnte die Konzentration der toten Zellen bestimmt werden. In die weitere Analyse wurden nur Propidiumiodid-negative Zellen eingeschlossen und somit nur lebende Adipocyten ausgewertet.

In einem weiteren 2-D Dot Plot wurde die Zellzahl der lebenden GLUT-positiven Adipocyten gegen die Zellzahl der Propidiumiodid-markierten Zellen dargestellt (Abbildung 50). Die Aufteilung eines zweidimensionalen Diagramms in vier Regionen (Quad-Stat-Region), wobei der Schnittpunkt interaktiv definiert wird, erlaubt eine einfache und schnelle statistische Auswertung der erhaltenen Daten. Im Feld links unten erscheinen doppelt negative Zellen, das heisst Zellen, die sowohl GLUT-negativ als auch Propidiumiodid-negativ sind. Demzufolge sind Zellen im Feld rechts unten und links oben für die entsprechenden Parameter einfach negativ und rechts oben doppelt positiv. Somit ist eine einfache statistische Auswertung der FACS-Analyse mit dem Computer möglich.

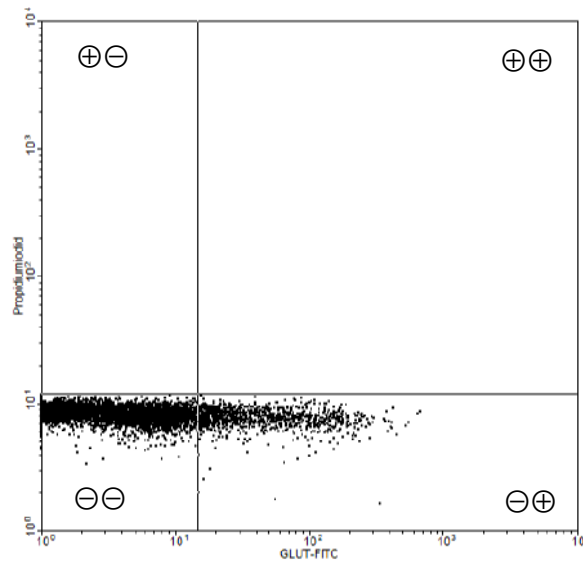


Abbildung 50: 2-D Dot Plot; dargestellt ist die Zellzahl der GLUT-4 markierten Zellen gegen die Propidiumiodid-markierten Zellen. Die untere linke Region umfasst die GLUT-4 und Propidiumiodid-negativen Zellen. Die Zellen im Feld rechts unten und links oben sind für die entsprechenden Parameter einfach negativ. Die Region rechts oben repräsentiert die doppelt positiven Adipocyten.

11.8 Auswertung der FACS-Analyse

Mit Hilfe des Programms WinMDI (Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry) Version 2.8 wurden die FACS-Messungen ausgewertet. Über ein Streudiagramm (Dot Plot) für die jeweilige Messung konnte die Adipocytenpopulation eingegrenzt werden. Die Anzahl GLUT-positiver Zellen sowie die Antigendichte wurden in einem Histogramm dargestellt, wobei die jeweilige Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurde. Als Negativkontrolle wurde der Anteil GLUT-4-positiver Adipocyten in Proben, die mit nur mit dem sekundären Antikörper (ohne Primärantikörper) inkubiert wurden, als Nullwert gesetzt. Durch direkte Vergleiche der zu untersuchenden Proben, die mit dem spezifischen Antikörper inkubiert wurden, mit der Negativkontrolle konnte der resultierende Anteil positiver Zellen ermittelt werden. Die Antigendichte wurde aus der Verschiebung der Fluoreszenzintensität des Fluorescein gegenüber der Negativkontrolle ermittelt.

12 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten

Mit Hilfe des Oil Red O Assays wurde die Wirkung von Pycnogenol, einigen Bestandteilen und Fraktionen auf die Bildung intrazellulärer Lipidtröpfchen nach Induktion der Differenzierung in 3T3 Zellen untersucht.

12.1 Chemikalien und Reagenzien

Bei diesem Assay wurden die monomeren Substanzen (+)-Catechin, Ferulasäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure und (±)-Taxifolin, der Gesamtextrakt, der Metabolit M1, die Fraktion I des Kiefernrintenextraktes sowie Rosiglitazon als Referenz untersucht.

Rosiglitazon-maleat stammte von Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz). Oil Red O, Isopropanol sowie Formalin wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen.

12.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

0.3 g Oil Red O wurden in 100 ml 60 %-igem Isopropanol gelöst, kurz aufgekocht und durch einen 0.2 µm Filter filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert. Die 10 %-ige Formaldehyd-Lösung wurde vor Verwendung frisch aus Formalin und PBS hergestellt.

12.3 Differenzierung der Präadipocyten mit und ohne Testsubstanzen

Die Kultivierung und Differenzierung der 3T3-Präadipocyten erfolgte wie in Abschnitt 4.5 beschrieben.

Undifferenzierte Kontrollen (Präadipocyten) wurden in DMEM-Medium kultiviert. Differenzierte Kontrollen (Adipocyten) wurden durch die Zusätze Insulin, IBMX und Dexamethason zum Kulturmedium zur Differenzierung angeregt.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden vom ersten Tag der Differenzierung an (Tag 0) dem entsprechenden Kulturmedium beigelegt. Die

eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen (+)-Catechin (60 ng/ml), Ferulasäure (20 ng/ml), Kaffeesäure (2.5 ng/ml) und M1 (3 ng/ml) entsprechen den Konzentrationen der Substanzen im Plasma nach wiederholter Einnahme von Pycnogenol.⁹⁶ Da die Plasmakonzentration von (±)-Taxifolin (33 ng/ml) nur nach Einmalgabe, aber nicht nach Mehrfachgabe bestimmt werden konnte, wurde diese Konzentration verwendet. Die Plasmakonzentration von Protocatechusäure nach Einnahme des Kiefernridenextraktes ist unbekannt, daher wurde sie zu 60 ng/ml eingesetzt, der Gesamtextrakt sowie die Fraktion I wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (50 µg/ml, 5 µg/ml, 0.5 µg/ml) getestet.

Die Bestimmung der intrazelluläre Lipidakkumulation erfolgte 8–12 Tage nach Beginn der Differenzierung.

12.4 Protokoll des Oil Red O Staining

Die Färbung der Lipide mittels Oil Red O wurde in Anlehnung an die Methode von Sen et al.²⁷⁶ mit geringfügigen Änderungen durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 100 µl kaltem PBS gewaschen und mit 50 µl 10 %-igem Formalin für 1 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 60 %-igem Isopropanol gewaschen und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbung der intrazellulären Lipide erfolgte durch Zugabe von 50 µl 0.3 % Oil Red O Lösung und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Überschüssiges Oil Red O wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen mit je 100 µl Millipore Wasser entfernt. Die Zellen wurden in 100 µl Isopropanol für 10 min lysiert und anschließend die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit Hilfe des Multiskan Ascent Microplate Readers bestimmt.

D **Tabellarischer Anhang**

1 Untersuchung der reduktiven Eigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels FRAP-Assay

1.1 Ergebnisse des FRAP-Assays in μM

Tabelle 14: EC_{10} -Werte des FRAP-Assays. Konzentrationen der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz bezogen auf eine 1 mM FeSO_4 -Lösung. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in μM von 5–7 unabhängigen Experimenten, sowie die Anzahl der Datenpunkte der Regressionsgeraden und die Güte der Regression (R^2).

| Substanz | Ascorbinsäure | (+)-Catechin | (-)-Epicatechin | Gallussäure |
|---|---------------|--------------|-----------------|--------------|
| Messwerte [μM] | 13.16 | 15.53 | 11.10 | 12.83 |
| | 19.67 | 15.59 | 11.14 | 13.37 |
| | 16.45 | 15.53 | 11.20 | 7.35 |
| | 15.37 | 14.98 | 10.78 | 13.05 |
| | 17.35 | 15.55 | 11.09 | 13.45 |
| | | | 11.22 | |
| MW [μM] | 16.40 | 15.43 | 11.09 | 12.01 |
| STABW [μM] | 2.41 | 0.25 | 0.16 | 2.62 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.99 | 0.99 | 0.97 | 0.99 |

| Substanz | Kaffeensäure | M1 | M2 | Protocatechusäure |
|---|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| Messwerte [μM] | 16.31 | 10.61 | 18.56 | 6.77 |
| | 16.25 | 10.28 | 20.11 | 7.48 |
| | 15.97 | 10.39 | 19.62 | 7.06 |
| | 15.98 | 11.35 | 20.54 | 6.93 |
| | 16.07 | 10.57 | 19.41 | 7.15 |
| | | | | 6.79 |
| MW [μM] | 16.12 | 10.64 | 19.65 | 7.03 |
| STABW [μM] | 0.16 | 0.42 | 0.75 | 0.27 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.90 | 0.99 | 0.98 | 0.98 |

1.2 Ergebnisse des FRAP-Assays in $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 15: EC_{10} -Werte des FRAP-Assays. Konzentrationen der Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol, dem Gesamtextrakt sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz bezogen auf eine 1 mM FeSO_4 -Lösung. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in $\mu\text{g/ml}$ von 5–7 unabhängigen Experimenten, sowie die Anzahl der Datenpunkte der Regressionsgeraden und die Güte der Regression (R^2).

| Substanz | Ascorbinsäure | (+)-Catechin | (-)-Epicatechin | Gallussäure |
|--|---------------|--------------|-----------------|-------------|
| Messwerte [$\mu\text{g/ml}$] | 2.32 | 4.51 | 3.22 | 2.19 |
| | 3.46 | 4.53 | 3.23 | 2.28 |
| | 2.90 | 4.51 | 3.25 | 2.22 |
| | 2.71 | 4.35 | 3.13 | 2.29 |
| | 3.06 | 4.51 | 3.22 | 2.05 |
| | | | 3.26 | |
| MW [$\mu\text{g/ml}$] | 2.89 | 4.48 | 3.22 | 2.05 |
| STABW [$\mu\text{g/ml}$] | 0.42 | 0.07 | 0.05 | 0.45 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.99 | 0.99 | 0.97 | 0.99 |

| Substanz | Kaffeensäure | M1 | M2 | Protocatechu- säure | Pycnogenol |
|--|--------------|-------------|-------------|------------------------|--------------|
| Messwerte [$\mu\text{g/ml}$] | 2.94 | 2.21 | 4.12 | 1.04 | 9.65 |
| | 2.93 | 2.14 | 4.46 | 1.15 | 10.52 |
| | 2.88 | 2.16 | 4.36 | 1.09 | 10.27 |
| | 2.88 | 2.36 | 4.56 | 1.07 | 9.93 |
| | 2.89 | 2.20 | 4.31 | 1.10 | 9.67 |
| | | | | 1.05 | 10.25 |
| MW [$\mu\text{g/ml}$] | 2.90 | 2.21 | 4.36 | 1.08 | 10.08 |
| STABW [$\mu\text{g/ml}$] | 0.03 | 0.09 | 0.17 | 0.04 | 0.36 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.90 | 0.99 | 0.98 | 0.98 | 0.99 |

1.3 Ergebnisse der statistische Auswertung (Werte in μM)

Tabelle 16: Statistische Auswertung der Ergebnisse des FRAP-Assays in μM mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Angegeben sind die P-Werte der untersuchten Substanzen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

| Verglichene Substanzen | P-Wert |
|--------------------------------------|-------------|
| Ascorbinsäure vs (+)-Catechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs (-)-Epicatechin | $P < 0.01$ |
| Ascorbinsäure vs Gallussäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M1 | $P < 0.01$ |
| Ascorbinsäure vs M2 | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |
| (+)-Catechin vs (-)-Epicatechin | n.s. |
| (+)-Catechin vs Gallussäure | n.s. |
| (+)-Catechin vs Kaffeesäure | n.s. |
| (+)-Catechin vs M1 | $P < 0.05$ |
| (+)-Catechin vs M2 | n.s. |
| (+)-Catechin vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |
| (-)-Epicatechin vs Gallussäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Kaffeesäure | $P < 0.05$ |
| (-)-Epicatechin vs M1 | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M2 | $P < 0.001$ |
| (-)-Epicatechin vs Protocatechusäure | n.s. |
| Gallussäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Gallussäure vs M1 | n.s. |
| Gallussäure vs M2 | $P < 0.001$ |
| Gallussäure vs Protocatechusäure | $P < 0.05$ |
| Kaffeesäure vs M1 | $P < 0.01$ |
| Kaffeesäure vs M2 | n.s. |
| Kaffeesäure vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |
| M1 vs M2 | $P < 0.001$ |
| M1 vs Protocatechusäure | n.s. |
| M2 vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |

n.s. = nicht statistisch signifikant

1.4 Ergebnisse der statistische Auswertung (Werte in µg/ml)

Tabelle 17: Statistische Auswertung der Ergebnisse des FRAP-Assays in µg/ml mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Angegeben sind die P-Werte der untersuchten Substanzen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

| Verglichene Substanzen | P-Wert |
|--------------------------------------|-----------|
| Ascorbinsäure vs (+)-Catechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs (-)-Epicatechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Gallussäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M1 | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M2 | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs (-)-Epicatechin | n.s. |
| (+)-Catechin vs Gallussäure | n.s. |
| (+)-Catechin vs Kaffeesäure | n.s. |
| (+)-Catechin vs M1 | n.s. |
| (+)-Catechin vs M2 | n.s. |
| (+)-Catechin vs Protocatechusäure | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| (-)-Epicatechin vs Gallussäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Kaffeesäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M1 | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M2 | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Protocatechusäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Gallussäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Gallussäure vs M1 | n.s. |
| Gallussäure vs M2 | n.s. |
| Gallussäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Gallussäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Kaffeesäure vs M1 | n.s. |
| Kaffeesäure vs M2 | n.s. |
| Kaffeesäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Kaffeesäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| M1 vs M2 | n.s. |
| M1 vs Protocatechusäure | n.s. |
| M1 vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| M2 vs Protocatechusäure | P < 0.001 |
| M2 vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Protocatechusäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |

n.s. = nicht statistisch signifikant

2 Untersuchung der Radikalfängereigenschaften von Bestandteilen und Metaboliten des Kiefernrintenextraktes mittels DPPH-Assay

2.1 Ergebnisse des DPPH-Assays in μM

Tabelle 18: Mittlere Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Werte) für das Quenching des stabilen Radikals DPPH durch die Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in μM von 5–9 unabhängigen Experimenten.

| Substanz | Ascorbinsäure | (+)-Catechin | (-)-Epicatechin | Gallussäure |
|---|---------------|--------------|-----------------|-------------|
| Messwerte [μM] | 24.27 | 29.94 | 12.85 | 5.86 |
| | 24.56 | 37.06 | 10.95 | 7.98 |
| | 19.74 | 38.86 | 11.71 | 7.90 |
| | 18.85 | 24.77 | 11.36 | 8.33 |
| | 20.33 | 20.57 | 10.45 | 7.71 |
| | | 23.63 | | 7.94 |
| | | 25.93 | | |
| | | 28.28 | | |
| | | 27.03 | | |
| MW [μM] | 21.55 | 28.45 | 11.46 | 7.62 |
| STABW [μM] | 2.67 | 6.04 | 0.91 | 0.89 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.97 | 0.97 | 0.94 | 0.98 |

| Substanz | Kaffeensäure | M1 | M2 | Protocatechu- säure |
|---|--------------|--------------|--------------|------------------------|
| Messwerte [μM] | 19.21 | 13.54 | 70.45 | 10.66 |
| | 18.90 | 14.26 | 77.93 | 10.24 |
| | 17.57 | 18.79 | 69.39 | 9.21 |
| | 17.02 | 17.83 | 83.51 | 9.71 |
| | 17.26 | 21.49 | 83.56 | 8.15 |
| | | 16.68 | 70.30 | |
| MW [μM] | 17.99 | 17.10 | 75.81 | 9.59 |
| STABW [μM] | 0.99 | 2.94 | 6.74 | 0.97 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.96 | 0.98 | 0.97 | 0.94 |

2.2 Ergebnisse des DPPH-Assays in µg/ml

Tabelle 19: Mittlere Hemmkonzentrationen (IC₅₀-Werte) für das Quenching des stabilen Radikals DPPH durch die Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol, den Gesamtextrakt sowie Ascorbinsäure als Referenzsubstanz. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen in µg/ml von 5–9 unabhängigen Experimenten.

| Substanz | Ascorbinsäure | (+)-Catechin | (-)-Epicatechin | Gallussäure |
|----------------------|---------------|--------------|-----------------|-------------|
| Messwerte [µg/ml] | 4.27 | 8.69 | 3.73 | 1.00 |
| | 4.33 | 10.76 | 3.18 | 1.36 |
| | 3.48 | 11.28 | 3.40 | 1.34 |
| | 3.32 | 7.19 | 3.30 | 1.42 |
| | 3.58 | 5.97 | 3.03 | 1.31 |
| | | 6.86 | | 1.35 |
| | | 7.53 | | |
| | | 8.21 | | |
| | | 7.85 | | |
| MW [µg/ml] | 3.80 | 8.26 | 3.33 | 1.30 |
| STABW [µg/ml] | 0.47 | 1.75 | 0.26 | 0.15 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R ² | 0.97 | 0.97 | 0.94 | 0.98 |

| Substanz | Kaffeensäure | M1 | M2 | Protocatechu- säure | Pycnogenol |
|----------------------|--------------|-------------|--------------|------------------------|-------------|
| Messwerte [µg/ml] | 3.46 | 2.82 | 15.64 | 1.64 | 8.76 |
| | 3.40 | 2.97 | 17.30 | 1.58 | 6.81 |
| | 3.17 | 3.91 | 15.40 | 1.42 | 5.61 |
| | 3.07 | 3.71 | 18.54 | 1.50 | 13.81 |
| | 3.11 | 4.47 | 18.55 | 3.14 | |
| | | 3.47 | 15.61 | | |
| MW [µg/ml] | 3.24 | 3.56 | 16.83 | 1.48 | 8.75 |
| STABW [µg/ml] | 0.18 | 0.61 | 1.50 | 0.15 | 3.62 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R ² | 0.96 | 0.98 | 0.97 | 0.94 | 0.96 |

2.3 Ergebnisse der statistischen Auswertung (Werte in μM)

Tabelle 20: Statistische Auswertung der Ergebnisse des DPPH-Assays in μM mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Angegebend sind die P-Werte der untersuchten Substanzen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

| Verglichene Substanzen | P-Wert |
|--------------------------------------|-------------|
| Ascorbinsäure vs (+)-Catechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs (-)-Epicatechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Gallussäure | $P < 0.001$ |
| Ascorbinsäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M1 | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M2 | $P < 0.001$ |
| Ascorbinsäure vs Protocatechusäure | $P < 0.05$ |
| (+)-Catechin vs (-)-Epicatechin | $P < 0.001$ |
| (+)-Catechin vs Gallussäure | $P < 0.001$ |
| (+)-Catechin vs Kaffeesäure | $P < 0.05$ |
| (+)-Catechin vs M1 | $P < 0.01$ |
| (+)-Catechin vs M2 | $P < 0.001$ |
| (+)-Catechin vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |
| (-)-Epicatechin vs Gallussäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Kaffeesäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M1 | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M2 | $P < 0.001$ |
| (-)-Epicatechin vs Protocatechusäure | n.s. |
| Gallussäure vs Kaffeesäure | $P < 0.05$ |
| Gallussäure vs M1 | n.s. |
| Gallussäure vs M2 | $P < 0.001$ |
| Gallussäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Kaffeesäure vs M1 | n.s. |
| Kaffeesäure vs M2 | $P < 0.001$ |
| Kaffeesäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| M1 vs M2 | $P < 0.001$ |
| M1 vs Protocatechusäure | n.s. |
| M2 vs Protocatechusäure | $P < 0.001$ |

n.s. = nicht statistisch signifikant

2.4 Ergebnisse der statistischen Auswertung (Werte in µg/ml)

Tabelle 21: Statistische Auswertung der Ergebnisse des DPPH-Assays in µg/ml mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Angegebend sind die P-Werte der untersuchten Substanzen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

| Verglichene Substanzen | P-Wert |
|--------------------------------------|-----------|
| Ascorbinsäure vs (+)-Catechin | P < 0.001 |
| Ascorbinsäure vs (-)-Epicatechin | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Gallussäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M1 | n.s. |
| Ascorbinsäure vs M2 | P < 0.001 |
| Ascorbinsäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Ascorbinsäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs (-)-Epicatechin | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs Gallussäure | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs Kaffeesäure | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs M1 | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs M2 | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs Protocatechusäure | P < 0.001 |
| (+)-Catechin vs Pycnogenol | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Gallussäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Kaffeesäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M1 | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs M2 | P < 0.001 |
| (-)-Epicatechin vs Protocatechusäure | n.s. |
| (-)-Epicatechin vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Gallussäure vs Kaffeesäure | n.s. |
| Gallussäure vs M1 | n.s. |
| Gallussäure vs M2 | P < 0.001 |
| Gallussäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Gallussäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Kaffeesäure vs M1 | n.s. |
| Kaffeesäure vs M2 | P < 0.001 |
| Kaffeesäure vs Protocatechusäure | n.s. |
| Kaffeesäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| M1 vs M2 | P < 0.001 |
| M1 vs Protocatechusäure | n.s. |
| M1 vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| M2 vs Protocatechusäure | P < 0.001 |
| M2 vs Pycnogenol | P < 0.001 |
| Protocatechusäure vs Pycnogenol | P < 0.001 |

n.s. = nicht statistisch signifikant

3 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten mittels ELISA

3.1 Ergebnisse der Untersuchung des Verlaufs der TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Tabelle 22: TNF- α Konzentrationen in pg/ml der Zellkulturüberstände von humanen Monocyten, die mit 0.5 μ M M1, M2 oder (+)-Catechin vorinkubiert und anschließend mit LPS für verschiedene Zeitspannen stimuliert wurden. Die Ergebnisse wurden auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen. Ebenfalls angegeben ist die TNF- α Konzentration der Kontrolle (mit LPS stimulierte Monocyten). (Einzelversuch)

| Zeit [h] | TNF- α Konzentration [pg/ml] | | | |
|----------|-------------------------------------|---------|---------|--------------|
| | Kontrolle | M 1 | M 2 | (+)-Catechin |
| 1 | 577.56 | 556.71 | 389.91 | 198.08 |
| 2 | 4184.74 | 4706.01 | 5665.14 | 2873.92 |
| 4 | 8813.59 | 4935.36 | 9147.21 | 11422.71 |
| 8 | 13567.56 | 5143.87 | 9126.36 | 10727.69 |
| 12 | 10919.52 | 4580.90 | 5602.59 | 7391.58 |
| 24 | 6582.57 | 5331.53 | 2996.25 | 6661.81 |
| 48 | 8980.41 | 4351.54 | 4143.04 | 4680.98 |

Tabelle 23: Hemmung der TNF- α Freisetzung in Zellkulturüberständen von humanen Monocyten, die mit 0.5 μ M M1, M2 oder (+)-Catechin vorinkubiert und anschließend mit LPS für verschiedene Zeitspannen stimuliert wurden, in Bezug auf die Kontrolle (mit LPS stimulierte Monocyten). Die Ergebnisse wurden auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen. (Einzelversuch)

| Zeit [h] | Hemmung bzw. Stimulation [%] | | |
|----------|------------------------------|--------|--------------|
| | M 1 | M 2 | (+)-Catechin |
| 1 | 3.61 | 32.49 | 65.70 |
| 2 | -12.46 | -35.38 | 31.32 |
| 4 | 44.00 | -3.79 | -29.60 |
| 8 | 62.09 | 32.73 | 20.93 |
| 12 | 58.05 | 48.69 | 32.31 |
| 24 | 19.01 | 54.48 | -1.20 |
| 48 | 51.54 | 53.87 | 47.88 |

3.2 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung der Metabolite M1 und M2 auf die TNF- α Sekretion in humanen Monocyten

Tabelle 24: TNF- α Konzentrationen der Zellkulturüberstände von humanen Monocyten, die mit 0.5 μ M Metabolit M1 oder M2 vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden. Die Ergebnisse wurden auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen. Ebenfall angegeben ist die Hemmung der TNF- α Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (mit LPS stimulierte Monocyten).

| | | TNF- α Konzentration [pg/ml] | Hemmung [%] |
|------------|-----------------|-------------------------------------|-------------|
| Ansatz I | Monocyten | 1239.00 | |
| | Monocyten w/LPS | 3671.86 | |
| | M1 w/LPS | 1114.99 | 69.63 |
| | M2 w/LPS | 1219.58 | 66.79 |
| Ansatz II | Monocyten | 240.94 | |
| | Monocyten w/LPS | 1756.19 | |
| | M1 w/LPS | 1770.90 | 30.97 |
| | M2 w/LPS | 1688.48 | 12.50 |
| Ansatz III | Monocyten | 854.74 | |
| | Monocyten w/LPS | 3029.99 | |
| | M1 w/LPS | 917.44 | 69.72 |
| | M2 w/LPS | 1261.99 | 58.35 |

3.3 Ergebnisse des TNF- α ELISA (Mehrfachgabe von Pycnogenol)

Tabelle 25: TNF- α Konzentrationen der Zellkulturüberstände von humanen Monocyten, die mit den Serumproben B1–B5 der Pycnogenol-Studie (Mehrfachgabe des Extraktes) vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden. Die Ergebnisse wurden auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen. Angegeben ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

| Proband | TNF- α Konzentrationen [pg/ml] | |
|--------------|---------------------------------------|------------------------------|
| | vor Einnahme von Pycnogenol | nach Einnahme von Pycnogenol |
| B1 | 2571.02 | 2845.00 |
| B2 | 1224.20 | 1600.15 |
| B3 | 2552.27 | 2399.74 |
| B4 | 2358.25 | 2767.26 |
| B5 | 2970.60 | 3017.74 |
| MW | 2335.27 | 2525.98 |
| STABW | 659.79 | 564.56 |

3.4 Ergebnisse des TNF- α ELISA (Einmalgabe von Pycnogenol)

Tabelle 26: TNF- α Konzentrationen der Zellkulturüberstände von humanen Monocyten, die mit den Serumproben der Einmalgabe von Pycnogenol (Probanden C, F, J, L) vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden. Die Ergebnisse wurden auf $2.5 \cdot 10^5$ Zellen bezogen. Ebenfalls angegeben ist der Mittelwert (MW) der TNF- α Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten ($n \geq 2$).

| Zeit [h] | TNF- α Konzentrationen [pg/ml] | | | | MW |
|----------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| | Proband C | Proband F | Proband J | Proband L | |
| 0 | 6422.58 | 3310.72 | 6681.96 | 7682.79 | 6024.51 |
| 0.5 | 3637.38 | | | | |
| 1 | | 3891.03 | | | |
| 4 | | 6520.89 | 8406.95 | | 7463.92 |
| 8 | 10654.87 | 7020.79 | | | 8837.83 |
| 10 | | | 5227.31 | | |
| 12 | | | | 5468.97 | |
| 14 | 8020.75 | 14524.66 | | 9798.39 | 10781.27 |

4 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 *ex vivo*

4.1 Auswirkungen der wiederholten Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität

Tabelle 27: Prostaglandinkonzentrationen der Proben nach Vorinkubation der COX-Enzyme mit den Serumproben B1–B5 der Pycnogenol-Studie (Mehrfachgabe des Extraktes). Angegeben ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

| Proband | PGF _{2α} -Konzentrationen [ng/ml] | | | |
|--------------|--|---------------|----------------|----------------|
| | COX-1 | | COX-2 | |
| | vor Einnahme | nach Einnahme | vor Einnahme | nach Einnahme |
| B 1 | 361.58 | 341.32 | 1708.61 | 4387.05 |
| B 2 | 341.32 | 147.98 | 12241.61 | 1224.90 |
| B 3 | 181.04 | 215.22 | 1331.18 | 1349.77 |
| B 4 | 482.34 | 295.52 | 1446.68 | 1066.29 |
| B 5 | 209.12 | 215.22 | 2074.71 | 2074.71 |
| MW | 315.08 | 243.05 | 3760.56 | 2020.55 |
| STABW | 122.50 | 75.82 | 4749.65 | 1378.12 |

Tabelle 28: Änderung der Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX-Enzyme durch die Serumproben B1–B5 der Pycnogenol-Studie (Mehrfachgabe des Extraktes). Angegeben ist ebenfalls der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (STABW) der berechneten Hemmwirkungen auf jedes Enzym. Die Ergebnisse waren nicht statistisch signifikant (Wilcoxon matched pairs signed rank test).

| Proband | Δ Hemmung [%] | |
|--------------|---------------|--------------|
| | COX-1 | COX-2 |
| B 1 | 3.89 | 16.47 |
| B 2 | 37.14 | 0.23 |
| B 3 | -6.57 | 79.50 |
| B 4 | 35.88 | -0.13 |
| B 5 | -1.17 | 2.75 |
| MW | 13.83 | 16.47 |
| STABW | 21.03 | 35.25 |

4.2 Auswirkungen der einmaligen Einnahme von Pycnogenol auf die Cyclooxygenase-Aktivität

Tabelle 29: Prostaglandinkonzentrationen der Proben nach Vorinkubation der COX-Enzyme mit den Serumproben M–Z der Pycnogenol-Studie (Einmalgabe des Extraktes) vor Einnahme des Extraktes, sowie 30 min nach Einnahme von Pycnogenol. Angegeben ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW).

| Proband | PGF _{2α} -Konzentrationen [ng/ml] | | | |
|--------------|--|---------------|----------------|----------------|
| | COX-1 | | COX-2 | |
| | 0 h | 0.5 h | 0 h | 0.5 h |
| M | 578.65 | 405.01 | 1506.04 | 2167.59 |
| N | 295.80 | 349.37 | 1324.45 | 1886.17 |
| O | 190.02 | 391.17 | 894.39 | 1886.17 |
| P | 182.05 | 142.72 | 2536.01 | 2039.64 |
| R | 387.98 | 209.21 | 2536.01 | 1987.14 |
| S | 453.95 | 182.05 | 2395.24 | 2021.99 |
| T | 302.20 | 107.14 | 2344.49 | 1952.90 |
| U | 150.13 | 98.10 | 1713.70 | 1974.85 |
| V | 222.33 | 257.74 | 1906.09 | 1886.17 |
| Z | 291.61 | 391.17 | n.b. | 2534.67 |
| MW | 305.47 | 253.37 | 1906.27 | 2033.73 |
| STABW | 134.74 | 122.46 | 589.91 | 196.22 |

n.b. = nicht berechenbar, Probe nicht verfügbar

Tabelle 30: Änderung der Hemmung der enzymatischen Aktivität der COX-Enzyme durch Serumproben der Probanden M–Z der Pycnogenol-Studie (Einmalgabe des Extraktes). Angegeben ist ebenfalls der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (STABW). Die Ergebnisse waren statistisch signifikant (COX-1: $P < 0.02$; COX-2: $P < 0.002$; Wilcoxon matched pairs signed rank test).

| Proband | Δ Hemmung [%] | |
|--------------|----------------------|--------------|
| | COX-1 | COX-2 |
| M | 47.54 | 10.69 |
| N | 8.82 | 22.29 |
| O | -16.00 | 3.00 |
| P | 14.85 | 15.96 |
| R | 43.95 | 18.13 |
| S | 59.57 | 16.69 |
| T | 41.50 | 19.54 |
| U | 14.80 | 18.63 |
| V | 7.27 | 22.29 |
| Z | 2.62 | n.b. |
| MW | 22.49 | 14.72 |
| STABW | 24.12 | 7.75 |

4.3 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von M1 auf die Aktivität von COX

Tabelle 31: Prostaglandinkonzentrationen der Proben nach Vorinkubation der COX-Enzyme mit dem Metaboliten M1 in drei verschiedenen Konzentrationen. (Einzelversuch)

| M 1 | PGF _{2α} -Konzentrationen [ng/ml] | |
|-------------|--|---------|
| | COX-1 | COX-2 |
| 0.5 μ M | 1094.45 | 1593.86 |
| 5 μ M | 1289.80 | 1817.65 |
| 50 μ M | 1078.59 | 1525.57 |

5 Untersuchung der Wirkung von Bestandteilen und Fraktionen des Kiefernrintenextraktes auf die Aktivität der α -Glucosidase

5.1 Ergebnisse der Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol und seinen Bestandteilen auf die Aktivität der α -Glucosidase

Tabelle 32: Mittlere Hemmkonzentrationen (IC_{50} -Werte) für die Hemmung des Enzyms α -Glucosidase durch (+)-Catechin, Pycnogenol und Grüntee sowie die Referenzsubstanz Acarbose. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in $\mu\text{g/ml}$ von 5–9 unabhängigen Experimenten, sowie die Anzahl der Datenpunkte der Regressionsgeraden und die Güte der Regression (R^2).

| Substanz | Acarbose | (+)-Catechin | Pycnogenol | Grüntee |
|--|----------------|--------------|-------------|--------------|
| Messwerte [$\mu\text{g/ml}$] | 1240.90 | 61.29 | 5.57 | 19.69 |
| | 1131.08 | 37.79 | 5.03 | 18.10 |
| | 817.56 | 31.98 | 4.47 | 19.21 |
| | 942.17 | 47.26 | 6.64 | 21.75 |
| | 785.30 | 82.23 | 6.98 | 18.27 |
| | 757.59 | | 5.20 | |
| | 1142.49 | | 4.42 | |
| | 1279.99 | | 4.77 | |
| | | | 4.80 | |
| MW [$\mu\text{g/ml}$] | 1012.25 | 52.14 | 5.34 | 19.74 |
| STABW [$\mu\text{g/ml}$] | 211.54 | 20.30 | 0.91 | 1.80 |
| Anzahl Datenpunkte | 5 | 5 | 5 | 5 |
| R^2 | 0.94 | 0.96 | 0.95 | 0.96 |

Tabelle 33: Statistische Auswertung der Ergebnisse des α -Glucosidase-Assays mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test. Angegebend sind die P-Werte der untersuchten Substanzen. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der P-Wert < 0.05 war.

| Verglichene Substanzen | P-Wert |
|--------------------------------|-------------|
| Acarbose vs (+)-Catechin | $P < 0.001$ |
| Acarbose vs Grünteeextrakt | $P < 0.001$ |
| Acarbose vs Pycnogenol | $P < 0.001$ |
| (+)-Catechin vs Grünteeextrakt | n.s. |
| (+)-Catechin vs Pycnogenol | n.s. |
| Grünteeextrakt vs Pycnogenol | n.s. |

n.s. = nicht statistisch signifikant

5.2 Untersuchung der Wirkung der Fraktionen von Pycnogenol auf die Aktivität der α -Glucosidase

Tabelle 34: Hemmung der α -Glucosidase durch die vier Fraktion des Rindenextraktes in Prozent. Die Fraktionen wurden in der IC_{50} -Konzentration von Pycnogenol (5 μ g/ml) eingesetzt. Angegeben sind die Hemmungen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) von sechs unabhängigen Experimenten.

| | Fraktion I | Fraktion II | Fraktion III | Fraktion IV |
|------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Hemmung [%] | 10.19 | 51.13 | 92.70 | 92.59 |
| | 1.81 | 44.89 | 91.91 | 94.36 |
| | 17.01 | 57.80 | 91.71 | 93.57 |
| | 1.29 | 52.73 | 92.18 | 92.60 |
| | 5.26 | 49.34 | 93.23 | 94.36 |
| | 5.98 | 45.68 | 93.83 | 94.30 |
| MW [%] | 6.92 | 50.26 | 92.59 | 93.63 |
| STABW [%] | 5.90 | 4.78 | 0.82 | 0.85 |

6 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PPAR- γ in humanen Monocyten

Tabelle 35: Zunahme der Konzentration des ligandenaktivierten und DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ humaner Monocyten, die für 4 h mit 0.5 μ M Rosiglitazon, 14 nM M1 oder beiden Substanzen gemeinsam inkubiert wurden. Angegeben sind die Konzentrationen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in Prozent von fünf unabhängigen Experimenten.

| | Kontrolle | Rosiglitazon | M1 | Rosiglitazon + M1 |
|--|---------------|---------------|---------------|-------------------|
| Zunahme der PPAR- γ Konzentration [%] | 118.90 | 141.73 | 119.69 | 133.86 |
| | 78.74 | 94.49 | 88.98 | 74.81 |
| | 67.72 | 126.77 | 127.56 | 105.51 |
| | 128.35 | 78.74 | 79.53 | 83.46 |
| | 107.87 | 155.12 | 142.52 | 130.71 |
| MW [%] | 100.31 | 119.37 | 111.65 | 105.67 |
| STABW [%] | 26.06 | 32.03 | 26.54 | 26.77 |

7 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die Glucosetransporter-Dichte auf der Oberfläche von Adipocyten mittels Durchflusszytometrie

7.1 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen für 2 h mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin

Tabelle 36: Anteil GLUT-4 positiver Zellen auf der Plasmamembran von Adipocyten nach Vorinkubation der Zellen mit 0.5 µM Rosiglitazon, 14 nM M1 bzw. 0.21 µM (+)-Catechin für 2 h und anschließender Stimulation mit Insulin für 30 min. Dargestellt sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in Prozent von drei unabhängigen Experimenten.

| | ohne Insulin | Insulin | Insulin + Rosiglitazon | Insulin + M1 | Insulin + Catechin |
|------------------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------------|
| Anteil GLUT-4 positiver Zellen [%] | 10.50 | 12.40 | 13.70 | 10.60 | 12.70 |
| | 9.88 | 11.10 | 12.10 | 11.70 | 12.40 |
| | 10.90 | 15.20 | 11.40 | 13.20 | 12.40 |
| MW [%] | 10.43 | 12.90 | 12.40 | 11.83 | 12.50 |
| STABW [%] | 0.51 | 2.11 | 1.18 | 1.31 | 0.17 |

7.2 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach Inkubation der Zellen für 24 h mit Rosiglitazon, M1 bzw. (+)-Catechin

Tabelle 37: Anteil GLUT-4 positiver Zellen auf der Plasmamembran von Adipocyten nach Vorinkubation der Zellen mit 0.5 µM Rosiglitazon, 14 nM M1 bzw. 0.21 µM (+)-Catechin für 24 h und anschließender Stimulation mit Insulin für 30 min. Dargestellt sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in Prozent von drei unabhängigen Experimenten.

| | ohne Insulin | Insulin | Insulin + Rosiglitazon | Insulin + M1 | Insulin + Catechin |
|------------------------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------------|
| Anteil GLUT-4 positiver Zellen [%] | 7.29 | 9.03 | 10.60 | 11.80 | 9.84 |
| | 7.39 | 8.29 | 12.20 | 13.70 | 9.74 |
| | 10.23 | 13.08 | 13.50 | 13.30 | 8.50 |
| MW [%] | 8.29 | 10.13 | 12.10 | 12.93 | 9.36 |
| STABW [%] | 1.67 | 2.58 | 1.45 | 1.01 | 0.75 |

8 Untersuchung der Wirkung von Pycnogenol auf die intrazelluläre Lipidakkumulation in 3T3 Adipocyten

8.1 Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der Differenzierung

Tabelle 38: Zunahme der intrazellulären Lipidakkumulation nach Induktion der Differenzierung durch Insulin, IBMX und Dexamethason. Angegeben sind die Messwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) in Prozent von fünf unabhängigen Experimenten.

| Tage nach Induktion der Differenzierung | Zunahme der Lipidakkumulation [%] | | | | | MW [%] | STABW [%] |
|---|-----------------------------------|--------|--------|-------|--------|--------------|--------------|
| 0 | -3.36 | 3.08 | -7.76 | -1.87 | 10.84 | 0.19 | 7.11 |
| 2 | 0.93 | 7.48 | -4.67 | 1.87 | 17.76 | 4.67 | 8.49 |
| 4 | -3.18 | -17.20 | -11.68 | -1.87 | -11.78 | -9.14 | 6.46 |
| 6 | 23.93 | 26.26 | 14.95 | 16.82 | 20.09 | 20.41 | 4.73 |
| 8 | 63.18 | 34.02 | 58.13 | 42.06 | 50.65 | 49.61 | 11.81 |
| 10 | 56.07 | 58.88 | 66.36 | 56.07 | 82.24 | 63.93 | 11.07 |
| 12 | 57.94 | 64.49 | 67.29 | 70.09 | 90.65 | 70.09 | 12.35 |

8.2 Ergebnisse der Hemmung der intrazellulären Lipidakkumulation durch Bestandteile und Metabolite von Pycnogenol

Tabelle 39: Wirkung von drei verschiedenen Konzentrationen von Rosiglitazon auf die intrazellulären Lipidakkumulation im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (100 %). Angegeben sind die Lipidakkumulationen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) von sechs unabhängigen Experimenten in Prozent.

| | Rosiglitazon 0.5 µM | Rosiglitazon 0.05 µM | Rosiglitazon 0.005 µM |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Lipidakkumulation [%] | 88.63 | 81.73 | 101.12 |
| | 91.17 | 93.83 | 75.14 |
| | 93.62 | 107.68 | 125.73 |
| | 110.45 | 127.01 | 104.52 |
| | 79.33 | 83.89 | 97.72 |
| | 97.89 | 87.46 | 92.11 |
| MW [%] | 93.21 | 96.16 | 98.84 |
| STABW [%] | 9.88 | 13.01 | 14.95 |

Tabelle 40: Wirkung von drei verschiedenen Konzentrationen von Pycnogenol auf die intrazellulären Lipidakkumulation im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (100 %). Angegeben sind die Lipidakkumulationen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) von sechs unabhängigen Experimenten in Prozent.

| | Pycnogenol 50 µg/ml | Pycnogenol 5 µg/ml | Pycnogenol 0.5 µg/ml |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Lipidakkumulation [%] | 85.53 | 91.98 | 92.59 |
| | 76.41 | 84.31 | 73.13 |
| | 144.86 | 97.14 | 90.76 |
| | 109.24 | 137.45 | 109.75 |
| | 118.11 | 139.22 | 87.39 |
| | 141.73 | 112.65 | 102.27 |
| MW [%] | 111.68 | 108.97 | 91.91 |
| STABW [%] | 23.02 | 13.93 | 7.27 |

Tabelle 41: Wirkung von drei verschiedenen Konzentrationen von Fraktion I auf die intrazellulären Lipidakkumulation im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (100 %). Angegeben sind die Lipidakkumulationen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) von sechs unabhängigen Experimenten in Prozent.

| | Fraktion I 50 µg/ml | Fraktion I 5 µg/ml | Fraktion I 0.5 µg/ml |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Lipidakkumulation [%] | 80.55 | 73.77 | 87.76 |
| | 109.27 | 83.73 | 85.61 |
| | 91.18 | 90.83 | 81.54 |
| | 83.61 | 86.58 | 88.73 |
| | 69.61 | 86.11 | 81.36 |
| | 157.56 | 106.59 | 112.93 |
| MW [%] | 98.63 | 87.93 | 89.65 |
| STABW [%] | 31.74 | 10.77 | 11.81 |

Tabelle 42: Wirkung von (+)-Catechin, Ferulasäure, Kaffeesäure, M1, (±)-Taxifolin und Protocatechusäure auf die intrazellulären Lipidakkumulation im Vergleich zu ausdifferenzierten Adipocyten (100 %). Angegeben sind die Lipidakkumulationen, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (STABW) von 5–10 unabhängigen Experimenten in Prozent.

| | Catechin | Ferula-säure | Kaffee-säure | M1 | Taxifolin | Protoca-techusäure |
|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------|------------------|---------------------------|
| Lipid-akkumulation [%] | 81.46 | 101.32 | 116.56 | 101.32 | 108.61 | 90.33 |
| | 84.77 | 98.01 | 92.05 | 98.68 | 105.96 | 89.80 |
| | 87.42 | 108.61 | 112.58 | 105.30 | 90.07 | 102.25 |
| | 70.86 | 90.73 | 91.39 | 93.38 | 93.38 | 125.10 |
| | 71.52 | 82.78 | | 96.69 | 98.01 | 82.98 |
| | 88.15 | | | 74.64 | | 80.73 |
| | 87.88 | | | 90.33 | | |
| | 90.66 | | | 90.86 | | |
| | 89.27 | | | 94.97 | | |
| | 99.93 | | | 112.12 | | |
| MW [%] | 85.19 | 96.29 | 100.79 | 95.83 | 99.21 | 95.20 |
| STABW [%] | 8.76 | 9.92 | 12.66 | 10.03 | 7.95 | 16.46 |

E Zusammenfassung

Zusammenfassung

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Pycnogenol® aufgrund seiner antiinflammatorischen, antioxidativen, antihypertensiven und blutglucosesenkenden Eigenschaften Vorteile für Patienten mit Prädiabetes oder Typ 2 Diabetes als Ergänzung zur konventionellen antidiabetischen Medikation haben kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bisher wenig erforschten molekularen Prozesse zu untersuchen und die für die beobachteten Effekte verantwortlichen Bestandteile bzw. Metabolite von Pycnogenol zu identifizieren.

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Diabetes und diabetischen Komplikationen. Die bekannten Bestandteile und Metabolite des Kiefernrintenextraktes Protocatechusäure, Gallussäure, Kaffeesäure und M1 zeigten in *in vitro* Assays ein stärkeres antioxidatives Potential als Ascorbinsäure. Die perorale Einnahme des Extraktes über 5 Tage bewirkte bei 2 von 5 Probanden eine Verbesserung der antioxidativen Aktivität des Serums. Somit kann Pycnogenol dazu beitragen, das bei Diabetes-Patienten verminderte antioxidative Abwehrsystem zu stärken.

Entzündungsprozesse treten als Folge von Insulinresistenz, Hyperglykämie und Hyperlipidämie auf. Daher wurde der Einfluss des Rindenextraktes auf die Sekretion von TNF- α und die Aktivität der COX-Enzyme getestet, die bei Diabetes erhöht sind. Nach peroraler Einnahme von Pycnogenol war eine statistisch nicht signifikante Zunahme der TNF- α Sekretion in Zellkulturüberständen humaner Monocyten nach Inkubation mit Serumproben festzustellen. Die antiinflammatorischen Effekte sind somit nicht durch die Reduktion der TNF- α Sekretion zu erklären. Des Weiteren wurde ein moderater inhibitorischer Effekt auf die Aktivität von COX-1 und COX-2 *ex vivo* verzeichnet. Die unselektive Hemmung der Enzyme ist mit klassischen NSAIDs vergleichbar. Da bereits 30 min nach Einnahme des Extraktes ein Hemmeffekt auf die enzymatische Aktivität *ex vivo* zu erkennen war, konnte auf eine schnelle Bioverfügbarkeit von biologisch aktiven Verbindungen aus Pycnogenol geschlossen werden. Die COX-Hemmung liefert somit eine partielle Erklärung für die *in vivo* beobachtete antiinflammatorische Aktivität und Hemmung der Thrombocytenaggregation durch den Extrakt.

Chronische Hyperglykämie gilt als Leitbefund bei Diabetes mellitus. Es sind diverse Ansatzpunkte denkbar, um der Ursache Insulinresistenz entgegenzuwirken.

Der Kiefernrintenextrakt erwies sich *in vitro* als 200-fach effektiver bei der Hemmung der α -Glucosidase als Acarbose. Dabei wurden die tetrameren und höher oligomeren Procyanidine als aktive Substanzen identifiziert und die Reduktion der Enzymaktivität diesen zugeschrieben. Hierdurch kann eine Verlangsamung der Glucoseresorption und somit eine Vermeidung von postprandialen Glucosespitzen erzielt werden, wodurch die klinisch beobachtete antidiabetische Wirkung von Pycnogenol erklärt werden könnte. Des Weiteren wurde ein auf PPAR- γ spezifischer ELISA entwickelt, da bisher PPAR- γ nur indirekt durch Aktivitätsmessung von Reportergenen bestimmt wurde. Die Inkubation von humanen Monocyten mit M1 bzw. Rosiglitazon in deren jeweiligen Plasmakonzentrationen bewirkte eine geringfügige Zunahme der Konzentration des ligandenaktivierten und DNA-bindungsfähig gemachten PPAR- γ im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine durch den Metaboliten M1 bewirkte Aktivierung von PPAR- γ , die unter anderem zur Verbesserung der Sensitivität der Insulinrezeptoren führt, konnte hier nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine reduzierte Expression von GLUT-4 auf der Zelloberfläche ist an der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt. Durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass bei 24-stündiger Vorinkubation von Adipocyten Rosiglitazon wie auch M1 eine Zunahme der GLUT-4 Dichte im Vergleich zur Kontrolle bewirkten. M1 könnte somit durch Steigerung der Exocytose von GLUT-4 die Glucoseverwertung erhöhen und so die Blutglucosespiegel senken.

Adipositas gilt als Risikofaktor für Diabetes mellitus und wird durch viele Antidiabetika begünstigt. Pycnogenol, (+)-Catechin, Ferulasäure, Protocatechusäure, (\pm)-Taxifolin, Fraktion I und M1 bewirkten *in vitro* eine Reduktion der intrazellulären Lipidakkumulation aufgrund der Hemmung der Adipogenese. Ob die im humanen Organismus erreichten Konzentrationen nach oraler Einnahme des Extraktes ausreichen, um die Adipocyten-Differenzierung signifikant zu hemmen, bleibt zu klären.

Die Ergebnisse der vorliegenden *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen liefern einen Ansatz zur Erklärung der beobachteten klinischen Effekte auf molekularer Ebene.

Summary

In clinical trials it has been shown that Pycnogenol[®] might be advantageous for patients with Typ 2 diabetes in addition to a conventional antidiabetic medication due to its antiinflammatory, antioxidant, antihypertensive and blood glucose-lowering abilities. The aim of this study was to investigate the underlying molecular processes and to identify the compounds and metabolites of Pycnogenol responsible for the observed effects.

Oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. The known compounds and metabolites of the pine bark extract protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid and M1 revealed a greater antioxidant potential than ascorbic acid in *in vitro* assays. Peroral intake of the extract for 5 days lead to an improvement of the antioxidant activity of serum in 2 of 5 volunteers. Thus, Pycnogenol could possibly contribute to a reinforcement of the reduced antioxidant body's defense system in diabetic patients.

Inflammatory processes are a consequence of insulin resistance, hyperglycemia and hyperlipidemia. Thus the influence of the pine bark extract on the secretion of TNF- α and the activity of the COX-enzymes was tested, which are elevated in diabetes. After peroral intake of Pycnogenol a statistically non-significant increase in TNF- α secretion in cell culture supernatants of human monocytes after incubation with serum samples was determined. Hence the antiinflammatory effects cannot be explained with the reduction of TNF- α secretion. Furthermore a moderate inhibitory effect on the activity of COX-1 and COX-2 *ex vivo* was observed. The non-selective inhibition of the enzymes is comparable to classic NSAIDs. Since an inhibitory effect on the enzymatic activity was already detected after 30 min after intake of the extract, a fast bioavailability of biologically active compounds from Pycnogenol was implied. The inhibition of COX provides a partial explanation for the antiinflammatory activity and inhibition of platelet aggregation by the extract observed *in vivo*.

Chronic hyperglycemia is implicated in diabetes mellitus. Several approaches are feasible to counteract the underlying insulin resistance. The pine bark extract proved to be 200 times more effective in inhibiting α -glucosidase *in vitro* than acarbose. The tetrameric and higher oligomeric procyanidines were identified as active compounds reducing the enzymatic activity most potently. This mechanism

allows to slow down glucose resorption and thus prevent postprandial glucose peaks which would explain the clinically observed antidiabetic effect of Pycnogenol. Furthermore an ELISA specific to PPAR- γ was developed; until then PPAR- γ had only been determined by indirect measuring of reporter gene activity. The incubation of human monocytes with M1 and rosiglitazon, respectively, in their plasma concentrations resulted in a slight increase of the concentration of the ligand-activated and DNA-binding-enabled PPAR- γ in comparison to untreated cells. The activation of PPAR- γ by metabolite M1, which leads among others to an improved sensitivity of insulin receptors, could not be clearly verified. A reduced expression of GLUT-4 on the cell surface is implicated in the development of insulin resistance. Flow cytometric measurements revealed that the incubation of adipocytes with rosiglitazone as well as M1 for 24 h resulted in an increase of GLUT-4 density in comparison to the control. Thus, M1 might possibly increase glucose utilization by increasing the exocytosis of GLUT-4 and consequently lower blood glucose levels.

Obesity is a risk factor for diabetes mellitus and is promoted by several antidiabetic drugs. Pycnogenol, (+)-catechin, ferulic acid, protocatechuic acid, (\pm)-taxifolin, fraction I and M1 evoked a reduction in intracellular lipid accumulation *in vitro* due to the inhibition of adipogenesis. It needs to be clarified if blood concentrations after oral intake of the extract are sufficient to inhibit adipocyt differentiation significantly *in vivo*.

The results of the present *ex vivo* and *in vitro* investigations provide a basic approach to explain the clinically observed antidiabetic effects of Pycnogenol on molecular level.

F **Abkürzungsverzeichnis**

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|-------------------|--|
| A | Absorption |
| AA | Arachidonsäure |
| AAPH | 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid |
| ABTS | 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-schwefelsäure)-diammoniumsalz |
| AchE | Acetylcholinesterase |
| AGE | advanced glycation end-products |
| AIDS | acquired immune deficiency syndrome |
| ANOVA | analysis of variance |
| AP | activating protein |
| ARP | antiradical power |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| | |
| BfEL | Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel |
| BHA | 3-Tertbutyl-4-hydroxyanisol |
| BRK | Bayerisches Rotes Kreuz |
| BSA | bovine serum albumin |
| | |
| CA | California |
| CHD | coronary heart disease |
| CMCs | zirkulierende mononukleäre Zellen |
| COX | Cyclooxygenase |
| CRP | C-reaktives Protein |
| | |
| d | Tag |
| DDU | Deutsche Diabetes-Union |
| DMEM | Dulbecco's Minimum Essential Medium |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| DPPH | Diphenylpicrylhydrazyl |
| DRK | Deutsches Rotes Kreuz |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| dsPPRE | doppelsträngiges PPRE |
| | |
| EC | equivalent concentration <i>oder</i> efficient concentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGCG | Epigallocatechingallat |
| EGF | epidermal growth factor |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EIA | enzyme immuno assay |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| | |
| FBS | fetale bovine serum |
| FCS | fetale calf serum |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FGF | fibroblast growth factor |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FL | Fluoreszenz |
| FRAP | ferric reducing antioxidant power |
| FSc | forward scatter |
| | |
| g | Gramm <i>oder</i> gravity |
| GLUT | Glucosetransporter |
| GPDH | Glycerolphosphatdehydrogenase |
| | |
| HAT | hydrogen atom transfer |
| HbA _{1c} | Hämoglobin A _{1c} |

| | |
|-----------|---|
| HDL | high density lipoprotein |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| HNTTM | Tris-(2,3,6-trichloro-3,5-dinitrophenyl)-methyl |
| HOX | Hydroperoxidase |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IA | initial activity |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methylxanthin |
| IC | inhibition concentration |
| IDF | International Diabetes Federation |
| IL | Interleukin |
| kDA | Kilodalton |
| LC/ESI-MS | Liquid Chromatography/Electron Spray Ionisation-Mass Spectroscopy |
| LDL | low density lipoprotein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M1 | δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton |
| M2 | δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton |
| MCP | monocyte chemoattractant protein |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| MI | Michigan |
| mmHg | Millimeter Quecksilber |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| MPOD | Myeloperoxidase |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MW | molecular weight <i>oder</i> Mittelwert |
| n | Anzahl |
| N | normal |
| n.b. | nicht berechenbar |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukloetidphsphot |
| NBT | Nitrotetrazolium Blau Chlorid |
| NEAA | non essential amino acids |
| NF | National Formulary |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| n.s. | nicht statistisch signifikant |
| NSAID | non steroidal antiinflammatory drug |
| NSB | non-specific binding |
| NVS | Nationale Verzehrsstudie |
| o | ortho |
| OD | optische Dichte |
| OGTT | oraler Glucosetoleranztest |
| oPD | ortho-Phenylendiamin |
| ORAC | oxygen radical absorbance capacity |
| p | para |
| P | probability |
| PBE | Kiefernindenextrakt |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCOOH | Phosphatidylcholinhydroperoxid |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PE | Polyethylen |
| PG | Prostaglandin |
| PMA | Phorbolmyristataacetat |
| pNPG | para-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid |
| pNPP | para-Nitrophenylphosphat |
| PPAR | peroxisome proliferator-activated receptor |

| | |
|----------------|---|
| PPRE | PPAR response element |
| r | Rotationsradius |
| R ² | Korrelationskoeffizient |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROS | reactive oxygen species |
| rpm | rotations per minute |
| RR | Riva-Rocci |
| RT-PCR | reverse transkription polymerase chain reaction |
| RXR | 9-cis-Retinsäurerezeptor |
| SET | single electron transfer |
| SGLT | Natrium-Glucose-Cotransporter |
| SOCS | suppressor of cytokine signalling |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SSc | side scatter |
| STABW | Standardabweichung |
| STE | NaCl-Tris-EDTA |
| STZ | Streptozotozin |
| TACE | TNF- α converting enzyme |
| TEAC | trolox equivalent antioxidant capacity |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TNFR | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| TPTZ | 2,4,6-Tripyridyl-s-triazin |
| TRAP | total reducing ability of plasma |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TX | Thromboxan |
| TZD | Thiazolidindion |
| U | Units |
| UPA | Urokinase-Plasminogen-Aktivator |
| USP | United States Pharmacopeia |
| VEGF | vascular endothel growth factor |
| VIS | visible |
| ZZ | Zellzahl |

G **Literaturverzeichnis**

1. Liebl, A. & Martin, E. (2005). Diabetes mellitus Typ 2. *Schriftenreihe der Bayerischen Landesapothekerkammer Heft 71*.
2. Masekowitz, B. (2006). Diabetesversorgung für jedermann. *Pharmazeutische Zeitung* **46**, 42.
3. Wold, L. E., Ceylan-Isik, A. F. & Ren, J. (2005). Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 908-17.
4. <http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de>.
5. Bouche, C., Serdy, S., Kahn, C. R. & Goldfine, A. B. (2004). The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* **25**, 807-30.
6. http://www.idf.org/webdata/docs/Metabolic_syndrome_definition.pdf.
7. Haffner, S. J. & Cassells, H. (2003). Hyperglycemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Med* **115**, 6-11.
8. Rodriguez, B. L., D'Agostino, R., Abbott, R. D., Kagan, A., Burchfiel, C. M., Yano, K., Ross, G. W., Silbershatz, H., Higgins, M. W., Popper, J., Wolf, P. A. & Curb, J. D. (2002). Risk of hospitalized stroke in men enrolled in the Honolulu Heart Program and the Framingham Study: A comparison of incidence and risk factor effects. *Stroke* **33**, 230-6.
9. Panzram, G. & Zabel-Langhennig, R. (1981). Prognosis of diabetes mellitus in a geographically defined population. *Diabetologia* **20**, 587-91.
10. Caplan, G. (1964). Principles of preventive psychiatry. *Basic Books Inc., New York*, 304.
11. Kim, J. S., Kwon, C. S. & Son, K. H. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2458-61.
12. Dey, L., Attele, A. S. & Yuan, C. S. (2002). Alternative therapies for type 2 diabetes. *Altern Med Rev* **7**, 45-58.
13. Campbell, I. W. (2005). The Clinical Significance of PPAR Gamma Agonism. *Curr Mol Med* **5**, 349-63.
14. Shapiro, K. & Gong, W. C. (2002). Natural products used for diabetes. *J Am Pharm Assoc (Wash)* **42**, 217-26.
15. Yeh, G. Y., Eisenberg, D. M., Kaptchuk, T. J. & Phillips, R. S. (2003). Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* **26**, 1277-94.
16. <http://www.progenebio.in/DMP/DMP.htm>.
17. Kiefer, D. & Pantuso, T. (2003). Panax ginseng. *Am Fam Physician* **68**, 1539-42.
18. Sotaniemi, E. A., Haapakoski, E. & Rautio, A. (1995). Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* **18**, 1373-5.
19. Vuksan, V., Sievenpiper, J. L., Koo, V. Y., Francis, T., Beljan-Zdravkovic, U., Xu, Z. & Vidgen, E. (2000). American ginseng (*Panax quinquefolius* L) reduces postprandial glycemia in nondiabetic subjects and subjects with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* **160**, 1009-13.
20. Yuan, C. S., Wu, J. A., Lowell, T. & Gu, M. (1998). Gut and brain effects of American ginseng root on brainstem neuronal activities in rats. *Am J Clin Med* **26**, 47-55.
21. Ohnishi, Y., Takagi, S., Miura, T., Usami, M., Kako, M., Ishihara, E. & Yano, H. (1996). Effect of ginseng radix on GLUT2 protein content in mouse liver in normal and epinephrine-induced hyperglycemic mice. *Biol Pharm Bull* **19**, 1238-1240.

22. Shane-McWhorter, L. (2001). Biological Complementary Therapies: A Focus on Botanical Products in Diabetes. *Diabetes Spectr* **14**, 199-208.
23. Kamble, S. M., Jyotishi, G. S., Kamalakar, P. L. & Vaidya, S. M. (1996). Efficacy of coccinia indica w. & a. in diabetes mellitus. *J Res Ayurveda Sidda* **17**, 77-84.
24. Azad Khan, A. K., Akhtar, S. & Mahtab, H. (1979). Coccinia indica in the treatment of patients with diabetes mellitus. *Bangladesh Med Res Counc Bull* **5**, 60-6.
25. Khan, A. K., S, A. K. & Mahtab, H. (1980). Treatment of diabetes mellitus with Coccinia indica. *Br Med J* **280**, 1044.
26. Hossain, M. Z., Shibib, B. A. & Rahman, R. (1992). Hypoglycemic effects of Coccinia indica: inhibition of key gluconeogenic enzyme, glucose-6-phosphatase. *Indian J Exp Biol* **30**, 418-20.
27. Welihinda, J., Karunanayake, E. H., Sheriff, M. H. & Jayasinghe, K. S. (1986). Effect of Momordica charantia on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacol* **17**, 277-82.
28. Srivastava, Y., Venkatakrishna-Bhatt, H., Verma, Y., Venkaiah, K. & Raval, B. H. (1993). Antidiabetic and adaptogenic properties of Momordica charantia extract: An experiment and clinical evaluation. *Phytother Res* **7**, 285-289.
29. Sarkar, S., Pranava, M. & Marita, R. A. (1996). Demonstration of the Hypoglycemic Action of Momordica Charantia in a Validated Animal Model of Diabetes. *Pharmacol Res* **33**, 1-4.
30. Khanna, P., Jain, S. C., Panagariya, A. & Dixit, V. P. (1981). Hypoglycemic Activity of Polypeptide-p From a Plant Source. *J Nat Prod* **44**, 648-55.
31. Shibib, B. A., Khan, L. A. & Rahman, R. (1993). Hypoglycaemic activity of Coccinia indica and Momordica charantia in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem J* **292 (Pt 1)**, 267-70.
32. Leatherdale, B. A., Panesar, R. K., Singh, G., Atkins, T. W., Bailey, C. J. & Bignell, A. H. (1981). Improvement in glucose tolerance due to Momordica charantia (karela). *Br Med J (Clin Res Ed)* **282**, 1823-4.
33. Khan, A., Safdar, M., Ali Khan, M. M., Khattak, K. N. & Anderson, R. A. (2003). Cinnamon improves glucose and lipids of people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **26**, 3215-8.
34. Mahomed, I. M. & Ojewole, J. A. (2004). Analgesic, antiinflammatory and antidiabetic properties of Harpagophytum procumbens DC (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract. *Phytother Res* **18**, 982-9.
35. Esposito Avella, M., Diaz, A., de Gracia, I., de Tello, R. & Gupta, M. P. (1991). Evaluation of traditional medicine: effects of Cajanus cajan L. and of Cassia fistula L. on carbohydrate metabolism in mice. *Rev Med Panama* **16**, 39-45.
36. Korec, R., Heinz Sensch, K. & Zoukas, T. (2000). Effects of the neoflavonoid coutareagenin, one of the antidiabetic active substances of Hintonia latiflora, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Arzneimittelforschung* **50**, 122-8.
37. Raghuram, T. C., Sharma, R. D. & Sivakumar, B. (1994). Effect of fenugreek seeds on intravenous glucose disposition in non-insulin dependent diabetic patients. *Phytother Res* **8**, 83-86.
38. Ajabnoor, M. A. & Tilmisany, A. K. (1988). Effect of Trigonella foenum graceum on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice. *J Ethnopharmacol* **22**, 45-9.

39. Amin, R., Abdul-Ghani, A. S. & Suleiman, M. S. (1987). Effect of *Trigonella foenum graecum* on intestinal absorption; Proc. of the 47th Annual Meeting of the American Diabetes Association (Indianapolis, U.S.A.). *Diabetes* **36**, 211.
40. Sharma, R. D. & Raghuram, T. C. (1990). Hypoglycaemic effect of fenugreek seeds in non-insulin dependent diabetic subjects. *Nutr Res* **10**, 731-739.
41. Devaraj, S., Vega-Lopez, S., Kaul, N., Schonlau, F., Rohdewald, P., Jialal, I. (2002). Supplementation with a Pine Bark Extract Rich in Polyphenols Increases Plasma Antioxidant Capacity and Alters the Plasma Lipoprotein Profile. *Lipids* **37**, 931-934.
42. Maritim, A., Dene, B. A., Sanders, R. A., Watkins, J. B. (2003). Effects of Pycnogenol Treatment on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J. Biochem. Molecular Toxicology* **17**, 193-199.
43. Silliman, K., Parry, J., Kirk, L. L., Proir, R. L. (2003). Pycnogenol Does Not Impact the Antioxidant or Vitamin C Status of Healthy Young Adults. *J. Am. Diet Assoc.* **103**, 67-72.
44. Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. (1999). Antioxidant Activity and Biologic Properties of a Procyanidin-Rich Extract from Pine (*Pinus Maritima*) Bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine* **27**, 704-724.
45. Simonetti, P., Ciappellano, S., Gardana, C., Bramati, L., Pietta, P. (2002). Procyanidins from *Vitis vinifera* Seeds: In Vitro Effects on Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6217-6221.
46. Liu, X., Zhou, H. J. & Rohdewald, P. (2004). French maritime pine bark extract Pycnogenol dose-dependently lowers glucose in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **27**, 839.
47. Liu, X., Wei, J., Tan, F., Zhou, S., Wurthwein, G. & Rohdewald, P. (2004). Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci* **75**, 2505-13.
48. Liu, X., Wei, J., Tan, F., Zhou, S., Wurthwein, G. & Rohdewald, P. (2004). Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci* **74**, 855-62.
49. Putter, M., Grotemeyer, K. H., Wurthwein, G., Araghi-Niknam, M., Watson, R. R., Hosseini, S. & Rohdewald, P. (1999). Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. *Thromb Res* **95**, 155-61.
50. Devaraj, S., Vega-Lopez, S., Kaul, N., Schonlau, F., Rohdewald, P. & Jialal, I. (2002). Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* **37**, 931-4.
51. Cesarone, M. R., Belcaro, G., Rohdewald, P., Pellegrini, L., Ledda, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., Gizzi, G., Ippolito, E., Fano, F., Dugall, M., Cipollone, G., Acerbi, G., Cacchio, M., Del Boccio, G., Di Renzo, A., Stuard, S. & Corsi, M. (2006). Improvement of diabetic microangiopathy with pycnogenol: A prospective, controlled study. *Angiology* **57**, 431-6.
52. Belcaro, G., Cesarone, M. R., Errichi, B. M., Ledda, A., Di Renzo, A., Stuard, S., Dugall, M., Pellegrini, L., Gizzi, G., Rohdewald, P., Ippolito, E., Ricci, A., Cacchio, M., Cipollone, G., Ruffini, I., Fano, F. & Hosoi, M. (2006). Diabetic ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with pycnogenol. *Clin Appl Thromb Hemost* **12**, 318-23.
53. Spadea, L. & Balestrazzi, E. (2001). Treatment of vascular retinopathies with Pycnogenol. *Phytother Res* **15**, 219-23.
54. Schonlau, F. & Rohdewald, P. (2001). Pycnogenol for diabetic retinopathy. A review. *Int Ophthalmol* **24**, 161-71.
55. <http://www.pycnogenol.com>.

56. Ceriello, A. (1999). Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab* **12**, 42-6.
57. Nishimura, F., Iwamoto, Y., Mineshiba, J., Shimizu, A., Soga, Y. & Murayama, Y. (2003). Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor-alpha in a 2-way relationship. *J Periodontol* **74**, 97-102.
58. Shanmugam, N., Gaw Gonzalo, I. T. & Natarajan, R. (2004). Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes* **53**, 795-802.
59. Schaefer, K. L., Denevich, S., Ma, C., Cooley, S. R., Nakajima, A., Wada, K., Schlezinger, J., Sherr, D. & Saubermann, L. J. (2005). Intestinal Antiinflammatory Effects of Thiazolidenedione Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Ligands on T Helper Type 1 Chemokine Regulation Include Nontranscriptional Control Mechanisms. *Inflamm Bowel Dis* **11**, 244-252.
60. Ghanim, H., Dhindsa, S., Aljada, A., Chaudhuri, A., Viswanathan, P. & Dandona, P. (2006). Low-Dose Rosiglitazone Exerts an Antiinflammatory Effect with an Increase in Adiponectin Independently of Free Fatty Acid Fall and Insulin Sensitization in Obese Type 2 Diabetics. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 3553-3558.
61. Prasad, K. (2006). C-Reactive Protein (CRP)-Lowering Agents. *Cardiovasc Drug Rev* **24**, 33-50.
62. Abdelrahman, M., Sivarajah, A. & Thiemermann, C. (2005). Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res* **65**, 772-81.
63. Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R. & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr* **59**, 113-22.
64. Skibola, C. F. & Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* **29**, 375-83.
65. Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* **8**, 797-807.
66. Hassig, A., Liang, W. X., Schwabl, H. & Stampfli, K. (1999). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses* **52**, 479-81.
67. Vaya, J., Mahmood, S., Goldblum, A., Aviram, M., Volkova, N., Shaalan, A., Musa, R. & Tamir, S. (2003). Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry* **62**, 89-99.
68. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-47.
69. Cos, P., De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. V. & Vlietinck, A. J. (2004). Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem* **11**, 1345-59.
70. Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**, 117-91.
71. Kromhout, D. (1989). Food consumption patterns in the Seven Countries Study. Seven Countries Study Research Group. *Ann Med* **21**, 237-8.
72. Aherne, S. A. & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81.
73. Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* **20**, 21-9.
74. Linseisen, J., Radtke, J. & Wolfram, G. (1997). [Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. *Z Ernahrungswiss* **36**, 403-12.

75. Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H. & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* **418**, 152-6.
76. Donovan, J. L., Bell, J. R., Kasim-Karakas, S., German, J. B., Walzem, R. L., Hansen, R. J. & Waterhouse, A. L. (1999). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* **129**, 1662-8.
77. Setchell, K. D., Brown, N. M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Kirschner, A. S., Cassidy, A. & Heubi, J. E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **131**, 1362S-75S.
78. Deprez, S., Mila, I., Huneau, J. F., Tome, D. & Scalbert, A. (2001). Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal* **3**, 957-67.
79. Booth, A. N., Deeds, F., Jones, F. T. & Murray, C. W. (1956). The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *J Biol Chem* **223**, 251-7.
80. Hackett, A. M., Griffiths, L. A. & Wermeille, M. (1985). The quantitative disposition of 3-O-methyl-(+)-[U-14C]catechin in man following oral administration. *Xenobiotica* **15**, 907-14.
81. Tsuchiya, H., Sato, M., Kato, H., Okubo, T., Juneja, L. R. & Kim, M. (1997). Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **703**, 253-8.
82. Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E. & Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 236-41.
83. Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C. & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* **80**, 15-21.
84. Kraus, M. (2006). Synthese von ¹⁴C-markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.). *Dissertationsarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
85. Spencer, J. P. (2003). Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* **133**, 3255S-3261S.
86. Labib, S. (2006). *Ex-vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Flavonoiden. *Dissertationsarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
87. Labib, S., Hummel, S., Richling, E., Humpf, H.-U. & Schreier, P. (2006). Use of the pig caecum model to mimic the human intestinal metabolism of hispidulin and related compounds. *Mol Nutr Food Res* **50**, 78-86.
88. Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M. A. & Saura-Calixto, F. (1994). Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br J Nutr* **71**, 933-46.
89. Das, N. P. (1971). Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem Pharmacol* **20**, 3435-45.
90. Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T. & Terao, J. (2001). In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J Nutr* **131**, 2885-91.

91. Virgili, F., Pagana, G., Bourne, L., Rimbach, G., Natella, F., Rice-Evance, C. & Packer, L. (2000). Ferulic acid excretion as a marker of consumption of French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radic Biol Med* **28**, 1249-56.
92. Meselhy, M. R., Nakamura, N. & Hattori, M. (1997). Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **45**, 888-93.
93. Große Düweler, K. (1999). Untersuchungen zur Metabolisierung von Inhaltsstoffen eines Rindenextraktes der Meereskiefer *Pinus pinaster Ait.* *Dissertationsarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, 70-72.
94. Groenewoud, G. & Hundt, H. K. (1986). The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat-caecal microflora. *Xenobiotica* **16**, 99-107.
95. Duweler, K. G. & Rohdewald, P. (2000). Urinary metabolites of French maritime pine bark extract in humans. *Pharmazie* **55**, 364-8.
96. Grimm, T. (2005). Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten Kiefernridenextraktes. *Dissertationsarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*, 68-78.
97. Lee, M.-J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S. & Yang, C. S. (2002). Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability. *Cancer Epidem Biomar* **11**, 1025-32.
98. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A. & Aruoma, O. I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem* **50**, 5042-7.
99. Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 435-42.
100. Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A. & Prior, R. L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* **68**, 1081-7.
101. Record, I. R., Dreosti, I. E. & McInerney, J. K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *Br J Nutr* **85**, 459-64.
102. Eberhardt, M. V., Lee, C. Y. & Liu, R. H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* **405**, 903-4.
103. Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., de Freitas, V. & Bourgeois, G. (1999). The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *J Sci Food Agric* **79**, 1081-1090.
104. Gedrich, K., Karg, G. & Oltersdorf, U. (2005). Functional Food - Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz. *Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Band 1*, 5.
105. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem* **50**, 3122-8.
106. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Hugué, F., Barrier, L., Decendit, A. & Merillon, J. M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* **61**, 2103-10.

107. Kottig, K. R. (1999). Identifizierung, Quantifizierung und pharmakologische Untersuchungen eines Extraktes aus der Rinde von *Pinus lambertiana* Dougl. *Dissertationsarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, 162-165.
108. Reiter, R. J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* **56**, 359-84.
109. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1984). Free Radicals, Lipid Peroxidation, and Cell Damage. *Lancet*. **324**, 1095.
110. Edenharder, R. & Grunhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. *Mutat Res* **540**, 1-18.
111. Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H. & Wang, R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* **26**, 285-94.
112. Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K., Mehrotra, S. & Pushpangadan, P. (2003). Studies on the antioxidant activities of Desmodium gangeticum. *Biol Pharm Bull* **26**, 1424-7.
113. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
114. Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* **48**, 3396-402.
115. Nourooz-Zadeh, J., Rahimi, A., Tajaddini-Sarmadi, J., Tritschler, H., Rösen, P., Halliwell, B. & Betteridge, D. J. (1997). Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* **40**, 647-53.
116. Jay, D., Hitomi, H. & Griendling, K. K. (2005). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Rad Biol Med?*
117. Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* **55**, S44-9; discussion S49-52.
118. Miller, M. S., Huang, M. T., Jeffrey, A. M. & Conney, A. H. (1983). Betamethasone-mediated activation of biphenyl 2-hydroxylation in rat liver microsomes. Studies on possible mechanisms. *Mol Pharmacol* **24**, 137-45.
119. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **63**, 1035-42.
120. Fang, Y. Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872-9.
121. Schäfer, A. (2004). Antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften von Metaboliten eines Rindenextraktes von *Pinus maritima*. *Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
122. Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* **239**, 70-6.
123. Janisch, K. M. (2003). Antioxidant abilities of human plasma, buckwheat extracts and fractions, and quercetin metabolites in different biochemical assays. *Dissertationsarbeit, Technische Universität München*.
124. Wei, Z. H., Peng, Q. L. & Lau, B. H. S. (1997). Pycnogenol enhances endothelial cell antioxidant-defences. *Redox Report* **3**, 219-224.

125. Nelson, A. B., Lau, B. H. S., Ide, N. & Rong, Y. (1998). Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radical-induced DNA damage. *Drug Develop Ind Pharmacy* **24**, 139-144.
126. Di Mambro, V. M., Azzolini, A. E., Valim, Y. M. & Fonseca, M. J. (2003). Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm* **262**, 93-9.
127. Edenharder, R., Fröhnage, D. (2003). Free Radical Scavenging Abilities of Flavonoids as Mechanism of Protection against Mutagenicity Induced by tert-Butyl Hydroperoxide or Cumene Hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. *Mutation Research* **540**, 1-18.
128. Govindarajan, R., Rasrogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P. (2003). Studies on the Antioxidant Activities of Desmodium gangeticum. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1424-1427.
129. Saint-Cricq De Gaulejac, N., Provost, C. & Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J Agric Food Chem* **47**, 425-31.
130. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. und -Technol.* **28**, 25-30.
131. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J.-M. (1997). Comparative Study of Radical Scavenger and Antioxidant Properties of Phenolic Compounds from Vitis Vinifera Cell Cultures Using in vitro Tests. *Life Sciences* **61**, 2103-2110.
132. Ancerewicz, J., Migliavacca, E., Carrupt, P.-A., Testa, B., Brée, F., Zini, R., Tillement, J.-P., Labidalle, S., Guyot, D., Chauvet-Monges, A.-M., Crevat, A., Le Ridant, A. (1998). Structure-Property Relationships of Trimetazidine Derivates and Model Compounds as Potential Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* **25**, 113-120.
133. O'Farrell, T. J., Pourmotabbed, T. (2000). Identification of Structural Elements Important for Matrix Metalloproteinase Type V Collagenolytic Activity as Revealed by Chimeric Enzymes. *J. Biol. Chem.* **275**, 27964-27972.
134. Tachibana, Y., Kikuzaki, H., Lajis, N. HJ., Nakatani, N. (2003). Comparison of Antioxidative Properties of Carbazole Alkaloids from Murraya koenigii Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**.
135. Wood, J. E., Senthilmohan, S. T., Peskin, A. V. (2002). Antioxidant Activity of Procyanidin-Containing Plant Extracts at Different pHs. *Food Chemistry* **77**, 155-161.
136. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**, 933-956.
137. Kato, Y., Yamashita, T., Ishikawa, M. (2002). Relationship Between Expression of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 and Invasion Ability of Cervical Cancer Cells. *Oncology Reports* **9**, 565-569.
138. Tourino, S., Selga, A., Jimenez, A., Julia, L., Lozano, C., Lizarraga, D., Cascante, M. & Torres, J. L. (2005). Procyanidin fractions from pine (Pinus pinaster) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. *J Agric Food Chem* **53**, 4728-35.
139. Sánchez-Moreno, C., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixo, F. (2000). Study of Low-Density Lipoprotein Oxidizability Indexes to Measure the Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols. *Nutrition Research* **20**, 941-953.
140. Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I. & Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol* **56**, 213-22.

141. Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. & Okuda, T. (1989). Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull* **37**, 2016-2021.
142. Davalos, A., Gomez-Cordoves, C. & Bartolome, B. (2003). Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. *J Agric Food Chem* **51**, 2512-9.
143. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., S., S., Bianchi, M. & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* **133**, 2812-9.
144. Wood, J. E., Senthilmohan, S. T. & Peskin, A. V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chem* **77**, 155-61.
145. Saleem, A., Kivela, H. & Pihlaja, K. (2003). Antioxidant activity of pine bark constituents. *Z Naturforsch [C]* **58**, 351-4.
146. Cao, G. & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* **44**, 1309-15.
147. Silliman, K., Parry, J., Kirk, L. L. & Prior, R. L. (2003). Pycnogenol does not impact the antioxidant or vitamin C status of healthy young adults. *J Am Diet Assoc* **103**, 67-72.
148. Simonetti, P., Ciappellano, S., Gardana, C., Bramati, L. & Pietta, P. (2002). Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds: in vivo effects on oxidative stress. *J Agric Food Chem* **50**, 6217-21.
149. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* **115**, 1111-9.
150. Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* **96**, 229-45.
151. Pereira, F. O., Frode, T. S. & Medeiros, Y. S. (2005). Evaluation of Tumour Necrosis Factor Alpha, Interleukin-2 Soluble Receptor, Nitric Oxide Metabolites, and Lipids as Inflammatory Markers in Type 2 Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation* **2006**, 1-7.
152. Chacón, M. R., Vendrell, J., Miranda, M., Ceperuelo-Mallafre, V., Megía, A., Gutiérrez, C., Fernández-Real, J. M., Richart, C. & Garcia-Espana, A. (2007). Different TNF α expression elicited by glucose in monocytes from type 2 diabetes mellitus patients. *Atherosclerosis in press*.
153. Knobler, H. & Schattner, A. (2005). TNF-alpha, chronic hepatitis C and diabetes: a novel triad. *QJM* **98**, 1-6.
154. Lecube, A., Hernández, C., Genescà, J. & Simó, R. (2006). Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: A case-control study. *Diabetes Care* **29**, 1096-1101.
155. Guha, M., Bai, W., Nadler, J. L. & Natarajan, R. (2000). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **275**, 17728-39.
156. Hotamisligil, G. S. & Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* **43**, 1271-8.
157. Kiritoshi, S., Nishikawa, T., Sonoda, K., Kukidome, D., Senokuchi, T., Matsuo, T., Matsumura, T., Tokunaga, H., Brownlee, M. & Araki, E. (2003). Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes* **52**, 2570-7.

158. Ziegler, D. (2005). Type 2 diabetes as an inflammatory cardiovascular disorder. *Curr Mol Med* **5**, 309-22.
159. Helmersson, J., Vessby, B., Larsson, A. & Basu, S. (2004). Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* **109**, 1729-34.
160. Hashimoto, S., Morohoshi, K., Suzuki, T. & Matsushima, K. (2003). Lipopolysaccharide-inducible gene expression profile in human monocytes. *Scand J Infect Dis* **35**, 619-27.
161. Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Bleriot, J. P. & Cavaillon, J. M. (1991). Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* **88**, 1747-54.
162. Yang, F., de Villiers, W. J., McClain, C. J. & Varilek, G. W. (1998). Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* **128**, 2334-40.
163. Ojewole, J. A. (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of Bryophyllum pinnatum (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *J Ethnopharmacol* **99**, 13-9.
164. Blazso, G., Gabor, M. & Rohdewald, P. (1997). Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from Pinus pinaster Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie* **52**, 380-2.
165. Cho, K. J., Yun, C. H., Yoon, D. Y., Cho, Y. S., Rimbach, G., Packer, L. & Chung, A. S. (2000). Effect of bioflavonoids extracted from the bark of Pinus maritima on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol* **168**, 64-71.
166. Grimm, T., Chovanova, Z., Muchova, J., Sumegova, K., Liptakova, A., Durackova, Z. & Hogger, P. (2006). Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm (Lond)* **3**, 1.
167. Vilcek, J. & Lee, T. H. (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* **266**, 7313-6.
168. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-70.
169. Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-56.
170. Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L. & Kriegler, M. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**, 251-8.
171. Glaser, K. B., Pease, L., Li, J. & Morgan, D. W. (1999). Enhancement of the surface expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) but not the p55 TNFalpha receptor in the THP-1 monocytic cell line by matrix metalloprotease inhibitors. *Biochem Pharmacol* **57**, 291-302.
172. Tsao, L. T., Lin, C. N. & Wang, J. P. (2004). Justicidin A inhibits the transport of tumor necrosis factor-alpha to cell surface in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* **65**, 1063-9.
173. Westerberg, M., Bengtsson, A., Ricksten, A. & Jeppsson, A. (2004). Tumor necrosis factor gene polymorphisms and inflammatory response in coronary artery bypass grafting patients. *Scand Cardiovasc J* **38**, 312-317.

174. Ma, Q., Kinneer, K., Ye, J. & Chen, B. J. (2003). Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. *Mol Pharmacol* **64**, 211-9.
175. Tracey, K. J. & Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* **21**, S415-22.
176. Beutler, B. & Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**, 584-8.
177. Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., 3rd, Zentella, A., Albert, J. D. & et al. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470-4.
178. Tilg, H., Knoflach, P., Petritsch, W., Vogelsang, H. & Reinisch, W. (2004). Infliximab in the Treatment of Crohn's Disease - a Practical Approach. *Z Gastroenterol* **42**, 1256-63.
179. Ma, Q. & Kinneer, K. (2002). Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *J Biol Chem* **277**, 2477-84.
180. Engvall, E. & Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* **109**, 129-35.
181. Crowther, J. R. (2001). The ELISA Guidebook: Methods in Molecular Biology. *Humana Press inc.* **149**.
182. Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G. & Packer, L. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* **465**, 93-7.
183. Hecker, M., Preiß, C., Schini-Kerth, V. B. & Busse, R. (1996). Antioxidants differentially affect nuclear factor κ B-mediated nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **380**, 224-8.
184. Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B. & Baeuerle, P. A. (1992). Antioxidants Selectively Suppress Activation of NF- κ B by Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax Protein. *J Virol* **66**, 6288-6293.
185. Scott, A., Khan, K. M., Cook, J. L. & Duronio, V. (2004). What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med* **38**, 248-9.
186. Graves, D. T. & Jiang, Y. (1995). Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med* **6**, 109-118.
187. Cronstein, B. N. (2002). Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: translating pharmacology into clinical utility. *Cleve Clin J Med* **69 Suppl 1**, S113-9.
188. Baumann, J., von Bruchhausen, F. & Wurm, G. (1980). Flavonoids and related compounds as inhibition of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* **20**, 627-39.
189. Vane, J. R., Bakhle, Y. S. & Botting, R. M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120.
190. Dannhardt, G. & Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem* **36**, 109-26.
191. Karonen, M., Hamalainen, M., Nieminen, R., Klika, K. D., Loponen, J., Ovcharenko, V. V., Moilanen, E. & Pihlaja, K. (2004). Phenolic extractives from the bark of *Pinus sylvestris* L. and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2. *J Agric Food Chem* **52**, 7532-40.

192. Flower, R. J. & Vane, J. R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* **240**, 410-1.
193. Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. & Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2692-6.
194. Chandrasekharan, N. V., Dai, H., etc. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926-13931.
195. Warner, T. D. & Mitchell, J. A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13371-3.
196. Barshes, N. R., Wyllie, S. & Goss, J. A. (2005). Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* **77**, 587-97.
197. Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J. & Vane, J. R. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11693-7.
198. Mifflin, R. C. & Powell, D. W. (2001). Cyclooxygenases. *Regulatory Peptide Letter* **VIII**, 49-56.
199. Engelhardt, G., Bögel, R., Schnitzer, C. & Utzmann, R. (1996). Meloxicam: Influence on Arachidonic Acid Metabolism. *Biochem Pharmacol* **51**, 21-28.
200. Seaver, B. & Smith, J. R. (2004). Inhibition of COX Isoforms by Nutraceuticals. *J Herb Pharmacother* **4**, 11-18.
201. Rohdewald, P. (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* **40**, 158-68.
202. Noreen, Y., Serrano, G., Perera, P. & Bohlin, L. (1998). Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Med* **64**, 520-4.
203. Balant, L., Burki, B., Wermeille, M. & Golden, G. (1979). Comparison of some pharmacokinetic parameters of (+)-cyanidanol-3 obtained with specific and non-specific analytical methods. *Arzneimittelforschung* **29**, 1758-62.
204. Cryer, B. & Feldman, M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* **104**, 413-21.
205. Malinowski, J. M. & Bolesta, S. (2000). Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* **22**, 1151-68; discussion 1149-50.
206. Hauner, H. (2002). The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* **18 Suppl 2**, S10-5.
207. Lebovitz, H. E., Dole, J., Patwardhan, R., Rappaport, E. B. & Freed, M. I. (2001). Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with Type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 280-288.
208. Phillips, L. S., Gruneberger, G., Miller, E., Patwardhan, R., Rappaport, E. B. & Salzman, A. (2001). Once- and twice-daily dosing with rosiglitazone improves glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **24**, 308-315.
209. Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T. & Osajima, Y. (1996). In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 2019-22.

210. Rohdewald, P. (1998). Pycnogenol. In: *Rice-Evans, C. A., Packer, L., Flavonoids in Health and Disease, New York: Marcel Dekker, Inc.*, 405-419.
211. Pirasteh, G. (1988). Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer. *Dissertationsarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*.
212. Onal, S., Timur, S., Okutucu, B. & Zihnioglu, F. (2005). Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Prep Biochem Biotechnol* **35**, 29-36.
213. Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y. & Rhee, H. I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* **21**, 756-61.
214. Kim, Y. M., Wang, M. H. & Rhee, H. I. (2004). A novel alpha-glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res* **339**, 715-7.
215. Moini, H., Guo, Q. & Packer, L. (2000). Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol: effect on xanthine oxidase. *J Agric Food Chem* **48**, 5630-9.
216. Matsui, T., Kobayashi, M., Hayashida, S. & Matsumoto, K. (2002). Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of alpha-glucosidase action. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 689-92.
217. Grimm, T., Schafer, A. & Hogger, P. (2004). Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic Biol Med* **36**, 811-22.
218. Desvergne, B. & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20**, 649-88.
219. Kota, B. P., Huang, T. H.-W. & Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* **51**, 85-94.
220. Lehrke, M. & Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**, 993-9.
221. Rieusset, J., Auwerx, J. & Vidal, H. (1999). Regulation of Gene Expression by Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ with Rosiglitazone (BRL 49653) in Human Adipocytes. *Biochem Biophys Res Comm* **265**, 265-271.
222. Shimaya, A., Noshiro, O., Hirayama, R., Yoneta, T., Niigata, K. & Shikama, H. (1997). Insulin sensitizer YM268 ameliorates insulin resistance by normalizing the decreased content of GLUT4 in adipose tissue of obese Zucker rats. *Eur J Endocrinol* **137**, 693-700.
223. Dubois, M., Vantghem, M. C., Schoonjans, K. & F., P. (2002). Thiazolidinediones in type 2 diabetes. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Ann Endocrinol* **63**, 511-23.
224. Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. & Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . *Cell* **83**, 803-812.
225. Rocchi, S., Picard, F., Vamecq, J., Gelman, L., Potier, N., Zeyer, D., Dubuquoy, L., Bac, P., Champy, M. F., Plunket, K. D., Leesnitzer, L. M., Blanchard, S. G., Desreumaux, P., Moras, D., Renaud, J. P. & Auwerx, J. (2001). A Unique PPAR γ Ligand with Potent Insulin-Sensitizing yet Weak Adipogenic Activity. *Mol Cell* **8**, 737-747.
226. Hwang, B. Y., Lee, J.-H., Nam, J. B., Kim, H. S., Hong, Y. S. & Lee, J. J. (2002). Two New Furanoditerpenes from *Saururus chinensis* and Their Effects on the Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *J Nat Prod* **65**, 616-617.

227. Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Mae, T., Kishida, H., Nishiyama, T., Tsukagawa, M., Konishi, E., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K. & Kitahara, M. (2003). Phenolics with PPAR- γ Ligand-Binding Activity Obtained from Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Roots) and Ameliorative Effects of Glycerin on Genetically Diabetic KK-A^Y Mice. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 4267-4272.
228. Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P. & Plutzky, J. (1998). Makrophages in Human Atheroma Contain PPAR γ . Differentiation-Dependent Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Expression and Reduction of MMP-9 Activity through PPAR γ Activation in Mononuclear Phagocytes in Vitro. *Am J Pathol* **153**, 17-23.
229. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. (1998). PPAR γ Promotes Monocyte/Makrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* **93**, 241-252.
230. Liang, Y.-C., Tsai, D.-C., Lin-Shiau, S.-Y. & Lin, J.-K. (2001). Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* **496**, 12-18.
231. Huang, T. H., Peng, G., Kota, B. P., Li, G. Q., Yamahara, J., Roufogalis, B. D. & Li, Y. (2005). Anti-diabetic action of Punica granatum flower extract: activation of PPAR-gamma and identification of an active component. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 160-9.
232. Wu, L. Y., Juan, C. C., Hwang, L. S., Hsu, Y. P., Ho, P. H. & Ho, L. T. (2004). Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in fructose-fed rat model. *Eur J Nutr* **43**, 116-24.
233. http://www.whcf.org/WHCF_WallaceHCoulter.htm.
234. VanDilla, M. A. (1985). Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis. *Academic Press, London*.
235. Shepherd, P. R. & Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* **341**, 248-57.
236. Rea, S. & James, D. E. (1997). Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**, 1667-77.
237. Watson, R. T., Kanzaki, M. & Pessin, J. E. (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev* **25**, 177-204.
238. Bogan, J. S., McKee, A. E. & Lodish, H. F. (2001). Insulin-Responsive Compartments Containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO Cells: Regulation by Amino Acid Concentrations. *Mol Cell Biol* **21**, 4785-4806.
239. Bogardus, C., Lillioja, S., Howard, B. V., Reaven, G. & Mott, D. (1984). Relationships between insulin secretion, insulin action, and fasting plasma glucose concentrations in nondiabetic and noninsulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest* **74**, 1238-46.
240. Daneman, D., Zinman, B., Elliott, M. E., Bilan, P. J. & Klip, A. (1992). Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **41**, 227-34.
241. Estrada, D. E., Elliott, E., Zinman, B., Poon, I., Liu, Z., Klip, A. & Daneman, D. (1994). Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals. *Metabolism* **43**, 591-8.
242. Hofmann, C., Lorenz, K. & Colca, J. R. (1991). Glucose transport deficiency in diabetic animals is corrected by treatment with the oral antihyperglycemic agent pioglitazone. *Endocrinology* **129**, 1915-25.

243. Weinstein, S. P., Holand, A., O'Boyle, E. & Haber, R. S. (1993). Effects of thiazolidinediones on glucocorticoid-induced insulin resistance and GLUT4 glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Metabolism* **42**, 1365-9.
244. Kramer, D., Shapiro, R., Adler, A., Bush, E. & Rondinone, C. M. (2001). Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* **50**, 1294-300.
245. Ciaraldi, T. & Henry, R. R. (1997). Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. *Eur J Endocrinol* **137**, 610-2.
246. Nugent, C., B., P. J., Whitehead, J. P., Savage, D., Wentworth, J., Chatterjee, V. K. & O'Rahilly, S. (2001). Potentiation of Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes by PPAR γ Agonists Is Maintained in Cells Expressing a PPAR γ Dominant-Negative Mutant: Evidence for Selectivity in the Downstream Responses to PPAR γ Activation. *Mol Endocrin* **15**, 1729-1739.
247. Sandouk, T., Reda, D. & Hofmann, C. (1993). The Antidiabetic Agent Pioglitazone Increases Expression of Glucose Transporters in 3T3-F442A Cells by Increasing Messenger Ribonucleic Acid Transcript Stability. *Endocrinol* **133**, 352-9.
248. Hernandez, R., Teruel, T. & Lorenzo, M. (2003). Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia* **46**, 1618-1628.
249. Maheux, P., Jeppesen, J., Sheu, W. H., Hollenbeck, C. B., Clinkingbeard, C., Greenfield, M. S., Chen, Y. D. & Reaven, G. M. (1994). Additive effects of obesity, hypertension, and type 2 diabetes on insulin resistance. *Hypertension* **24**, 695-698.
250. Liu, X., Kim, J.-K., Li, Y., Li, J., Liu, F. & Chen, X. (2005). Tannic Acid Stimulates Glucose Transport and Inhibits Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *J Nutr* **135**, 165-171.
251. Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H. & Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes* **22**, 1145-1158.
252. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.
253. Gregoire, F. M., Smas, C. M. & Sul, H. S. (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783-809.
254. Klemm, D. J., Leitner, J. W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J. E.-B., Goalstone, M. L. & Draznin, B. (2001). Insulin-induced Adipocyte Differentiation. *J Biol Chem* **276**, 28430-28435.
255. Yip, E. C., Liu, A. M., Wong, J. T. & Wong, Y. H. (2005). An aqueous extract of the popular Chinese nutraceutical Kwei Ling Ko (Tortoise shell-Rhizome jelly) activates the PPAR γ pathway and down-regulates the NF κ B activity. *Phytomedicine* **12**, 748-59.
256. Ntambi, J. M. & Kim, Y.-C. (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J Nutr* **130**, 3122S-3126S.
257. Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C. & Rosen, O. M. (1978). Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* **253**, 7570-7578.
258. Hasegawa, N. (2000). Inhibition of Lipogenesis by Pycnogenol. *Phytother Res* **14**, 472-473.
259. Hasegawa, N. (1999). Stimulation of lipolysis by pycnogenol. *Phytother Res* **13**, 619-20.
260. Novakofski, J. (2004). Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *J Anim Sci* **82**, 905-915.

261. Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S. & Friedman, J. M. (2001). Distinct Transcriptional Profiles of Adipogenesis *in Vivo* and *in Vitro*. *J Biol Chem* **276**, 34167-34174.
262. Chien, P.-J., Chen, Y.-C., Lu, S.-C. & Sheu, F. (2005). Dietary Flavonoids Suppress Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J Food Drug Analysis* **13**, 168-175.
263. Lin, J., Della-Fera, M. A. & Baile, C. A. (2005). Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Inhibits Adipogenesis and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Adipocytes. *Obes Res* **13**, 982-990.
264. Wang, P., Renes, J., Bouwman, F., Bunschoten, A., Mariman, E. & Keijer, J. (2007). Absence of an adipogenic effect of rosiglitazone on mature 3T3-L1 adipocytes: increase of lipid catabolism and reduction of adipokine expression. *Diabetologia* **50**, 654-665.
265. de Souza, C. J., Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D. & Burkey, B. F. (2001). Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* **50**, 1863-1871.
266. Fonseca, V. (2003). Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* **115**, 42S-48S.
267. Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P. & Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* **114**, 1281-1289.
268. Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L. J. & DeFronzo, R. A. (2002). Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2784-2791.
269. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, I. (2005). Maritime Pine Extract. *United States Pharmacopeia* **28**, NF 23, 2115-2116.
270. Vedder, B., Gulder, T. A. M., Bringmann, G. & Schirmeister, T. (2005). Verbesserte Synthese von 5-(3',4'-Dihydroxy)- γ -valerolacton und Anreicherung der Enantiomere mittels HPLC an chiraler Phase. *Posterbeitrag*.
271. Droste, A. (1999). Expression und Regulation des CD163 (RM3/1-Antigen), eines Mitglieds der Proteinfamilie der cysteinreichen Scavengerrezeptoren. *Dissertationsarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*.
272. Picerno, P., Mencherini, T., Lauro, M. R., Barbato, F., Aquino, R. (2003). Phenolic Constituents and Antioxidant Properties of Xanthosoma violaceum Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6423-6428.
273. Adisakwattana, S., Sookkongwaree, K., Roengsumran, S., Petsom, A., Ngamrojnavanich, N., Chavasiri, W., Deesamer, S. & Yibchokanun, S. (2004). Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on alpha-glucosidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 2893-6.
274. Eickelberg, O., Pansky, A., Mussmann, R., Bihl, M., Tamm, M., Hildebrand, P., Perruchoud, A. P. & Roth, M. (1999). Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts. *J Biol Chem* **274**, 12933-8.
275. Basketter, D. A. & Widdas, W. F. (1978). Asymmetry of the hexose transfer system in human erythrocytes. Comparison of the effects of cytochalasin B, phloretin and maltose as competitive inhibitors. *J Physiol* **278**, 389-401.
276. Sen, A., Lea-Currie, R., Sujkowska, D., Franklin, D. M., Wilkison, W. O., Halvorsen, Y.-D. C. & Gimble, J. M. (2001). Adipogenic Potential of Human Adipose Derived Stromal Cells From Multiple Donors is Heterogeneous. *J Cell Biochem* **81**, 312-319.

Curriculum Vitae

Angelika Ingrid Schäfer, geboren am 14.02.1977 in Aschaffenburg

AUSBILDUNG

| | |
|------------------------|--|
| Sept. 1983 – Juli 1987 | Grünwald-Grundschule, Aschaffenburg |
| Sept. 1987 – Juni 1996 | Karl-Theodor-von-Dalberg-Gymnasium, Aschaffenburg |
| Juni 1996 | Abschluß: allgemeine Hochschulreife (Abitur) Thema der Facharbeit: Naturfasern im Vergleich – chemischer Bau und Verwendung von Wolle, Seide und Baumwolle |
| Sept. 1997 – März 2004 | Studium der Chemie (Diplom) mit Schwerpunkt Biochemie an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg |
| April 2000 | Diplom-Vorprüfung |
| April 2003 | Diplom-Hauptprüfung |
| Juni 2003 – Feb. 2004 | Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Högger, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg Thema der Diplomarbeit: Antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften von Metaboliten eines Rindenextraktes von <i>Pinus maritima</i> |
| Februar 2004 | Abschluss: Diplom-Chemikerin Univ. |
| April 2004 – Mai 2007 | Promotionsstudium unter Anleitung von Prof. Högger, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg Thema der Dissertation: Effekte von Bestandteilen und Metaboliten eines Rindenextraktes von <i>Pinus maritima</i> (Pycnogenol®) auf pathophysiologische Aspekte des metabolischen Syndroms |

BERUFSERFAHRUNG

| | |
|---|--|
| Okt. 2001 – Feb. 2002, Nov. 2003 – Feb. 2004 | Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg |
| April 2004 – Mai 2007 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Pharmazie, Universität Würzburg |

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**„Effekte von Bestandteilen und Metaboliten eines Rindenextraktes
von *Pinus maritima* (Pycnogenol®) auf pathophysiologische
Aspekte des metabolischen Syndroms“**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Angelika Schäfer

