

**Antiinflammatorische Wirkungen und  
Pharmakokinetik eines standardisierten  
Kiefernringenextraktes**

**DISSERTATION**

zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Tanja Grimm**  
aus Dinkelsbühl

Würzburg 2005

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 der Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Petra Högger**

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

**Für meine lieben Eltern  
Marianne und Hermann Grimm**

**Zur Erinnerung an meine Großeltern**



In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Isaac Newton



Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

*Originalpublikationen:*

Grimm, T., Schäfer, A. and Högger, P., *Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol)*. Free Radical Bio Med, 2004. **36** (6): p. 811-822.

*Posterbeiträge:*

Grimm, T. and Högger, P., *Inhibition of matrix metalloproteinases by pine bark extract and its two metabolites*. DPhG-Jahrestagung 2003, Würzburg.

Grimm, T. and Högger P., *Metabolites of pine bark extract inhibit activity and release of matrix metalloproteinases in vitro and in vivo*. 2004. XXII International Conference on Polyphenols, Groupe polyphénols. Helsinki, Finland.





## Danksagung

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

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Högger für die Überlassung des äußerst interessanten und abwechslungsreichen Themas, für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, ihre stetige Diskussionsbereitschaft und für viele Denkanstöße herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich folgenden Wissenschaftlern für ihre Kooperation und Unterstützung danken:

- Frau Prof. Dr. Ďuračková von der Medizinischen Fakultät der Universität Bratislava, Slowakei, für die Überlassung der Plasmaproben der Studienteilnehmer.
- Herrn Dr. Opitz und dem gesamten Team der Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg für die Bereitschaft, ständig auf äußerst behutsame Weise die Blutabnahmen für die Vorversuche durchzuführen.
- Herrn Dr. Sascha Zügner, Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg für die Hilfe bei der Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen des Extraktes.
- Herrn PD Dr. Knut Baumann, Institut für Pharmazie und LMC für die Erstellung der Tabellen für die pharmakokinetischen Berechnungen.
- Frau Meike Timmermann, Institut für Pharmazie und LMC, für die Isolierung der Monocyten aus Blutzellsuspensionen und für die Hilfe bei der Erstellung und Formatierung dieser Arbeit.
- Frau Roswitha Skrabala, Institut für Pharmazie und LMC, für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Messungen.
- Frau Meike Timmermann, Frau Roswitha Skrabala, Frau Dr. Christine Kirchhoff, Frau Nicole Rauschert, Herrn Dr. Anagnostis Valotis und Herrn Michael Kraus für die Bereitschaft, den Kiefernrintenextrakt in Selbstversuchen jederzeit einzunehmen und Blutabnahmen durchführen zu lassen.
- Den Teilnehmern der Pycnogenol-Studie von der Medizinischen Fakultät der Universität Bratislava für die vielen „Blutspenden“.

- Frau Dr. Elke Richling vom Institut für Pharmazie und LMC für die Überlassung der Reinsubstanz Procyanidin B1
- Frau Brunner, Konstanz, für die Überlassung des Satelliteninterface zur Kopplung des ECDs mit der HPLC-Anlage.
- Der gesamten Lebensmittelchemie, vor allem Michael Kraus, für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung beim Ausprobieren von HPLC-MS- Methoden.
- Frau Julia Thern, Frau Dr. Christine Kirchoff und Dr. Anagnostis Valotis für das äußerst aufmerksame Korrekturlesen und Formatieren dieser Arbeit.
- Und schließlich der Firma Horphag Research, Genf, für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Meike Timmermann bedanken. Danke für die großartige Zeit, für Deine Unterstützung in allen Lebenslagen, für Deine Hilfe, für unsere gemeinsamen Aktivitäten und vor allem für Deine wundervolle Freundschaft, die weit über den Uni-Alltag hinausgeht! Ich bin sehr froh über die Zeit, die wir gemeinsam in Würzburg verbracht haben.

Ein herzlicher Dank geht auch an Roswitha Skrabala. Vielen Dank, liebe Rosi, für Deine Freundschaft und für Deine Unterstützung, sowie für viele lustige, aber auch für tiefgreifende Gespräche bei einem Gläschen Freixenet.

Den weiteren Mitgliedern meines Arbeitskreises Matthias Freiwald, Dr. Anagnostis „Noti“ Valotis, Julia Thern und Angelika Schäfer danke ich für die Zusammenarbeit, Hilfe und für das angenehme Arbeitsklima. Ein herzliches Extra-Dankeschön an Noti für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft, sei es bei schwierigen fachlichen Fragen an der Uni, aber auch bei festlichen Aktivitäten.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Prof. Schirmeister, besonders Dr. Birgit Vedder, Franziska Schulz, Dr. Ulrich Käppler, Dr. Radim Vičák und Markus Schiller danke ich für die freundschaftliche Aufnahme in ihrer Mitte (und in ihrem neuen Kaffeeraum, der mir so manchen Praktikumsaufsichts-Tag „versüßte“), für viel Spass und für die wirklich ganz tolle Zeit, die wir miteinander verbracht haben.

Vielen Dank auch bei meinen jetzigen und bei meinen ehemaligen Kollegen des Erstsemester-Praktikums Dr. Birgit Vedder, Dr. Radim Vičik, Björn Degel, Joseph Scheiber, Dr. Gemma Bruno, Dr. Andreas Heinze und Dr. Claudia Meier für die angenehme Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner langjährigen Freundin Dr. „Chrischtl“ Christine Kirchhoff. Vielen Dank für Deine Unterstützung und für die großartige Freundschaft in all den Jahren, die wir uns kennen und dass Du mich auf die Idee gebracht hast, zu promovieren.

Bei allen meinen Freunden innerhalb und vor allem auch außerhalb der Universität bedanke ich mich ganz herzlich für Euer Verständnis, für die Ermutigungen und für die Unterstützung, die ich immer von Euch erhalten habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich auch schon während meines Studiums und anschließend während der Promotion jederzeit unterstützten und mir immer eine sehr große Hilfe waren! Vielen Dank, liebe Mami, lieber Papi und liebe Julia, dass ich jederzeit auf Euch zählen kann!



**Inhaltsverzeichnis:**

**A. EINLEITUNG..... 1**

**B. ALLGEMEINER TEIL .....9**

**1 MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON VERSCHIEDENEN KIEFERNRINDENEXTRAKTEN ..... 11**

**2 HEMMUNG DER AKTIVITÄT VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN *IN VITRO* ..... 13**

2.1 Die Extrazellulärmatrix ..... 13

2.2 Die Familie der MMPs ..... 14

2.3 Aufbau der MMPs ..... 14

2.4 Aktivierung von MMPs ..... 16

2.5 Einteilung der MMPs ..... 16

2.6 Pathophysiologische/physiologische Bedeutung der MMPs ..... 17

2.7 Natürliche und synthetische Hemmstoffe ..... 19

2.7.1 TIMPs ..... 19

2.7.2 Synthetische Inhibitoren ..... 20

2.8 Hemmung von MMPs durch Pycnogenol und seine Metabolite ..... 23

2.9 Methoden zur Untersuchung der Hemmung der Enzymaktivität von MMPs ..... 25

2.10 Hemmung der Aktivität von MMP-1 ..... 28

2.11 Hemmung der Aktivität von MMP-2 ..... 31

2.12 Hemmung der Aktivität von MMP-9 ..... 33

2.13 Hemmung von MMPs durch Pflanzenextrakte/ -bestandteile ..... 34

**3 MÖGLICHE MECHANISMEN DER HEMMWIRKUNG AUF MMPs ..... 37**

3.1 Schutz der Matrixproteine vor einem Abbau durch MMPs ..... 38

3.1.1 Mechanismen der Bindung an Matrixproteine ..... 39

3.1.2 Methode zur Bestimmung der Bindung ..... 40

3.1.3 Bindung von anderen Pflanzenextrakten an Proteine ..... 42

3.2 Direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MMPs ..... 44

**4 HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS STIMULIERTEN MONOCYTEN ..... 49**

4.1 Monocyten/Macrophagen als Sekretionsquelle für MMP-9 ..... 49

4.2	Liganden des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) und MMP-9 .....	51
4.3	Glucocorticoide und MMP-9 .....	53
4.4	Bestimmung der MMP-9-Freisetzung mittels ELISA .....	55
4.5	Hemmung der MMP-9-Freisetzung durch Pflanzenextrakte und -bestandteile.....	58
<b>5</b>	<b>PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG BEKANNTER INHALTSSTOFFE UND/ODER METABOLITE VON PYCNOGENOL .....</b>	<b>61</b>
5.1	Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung .....	61
5.2	Bioverfügbarkeit von Polyphenolen .....	61
5.2.1	Absorption und Metabolisierung.....	63
5.2.2	Elimination .....	66
5.3	Bestimmung der Wiederfindung nach Extraktion von Dimeren/Trimeren aus dem Gesamtextrakt Pycnogenol (Fraktion II/Fraktion III) .....	67
5.4	Pharmakokinetische Studie mit Pycnogenol nach peroraler Einnahme.....	68
5.4.1	Diätvorschriften.....	68
5.5	Studienergebnisse nach Mehrfachgabe von 200 mg Pycnogenol.....	68
5.5.1	Konzentrationen von detektierten Substanzen in den Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen nach Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase .....	69
5.5.2	Konzentrationen von detektierten Substanzen in den Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen ohne Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase .....	72
5.5.3	Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase .....	74
5.6	Studienergebnisse nach Einmaldosis von 300 mg Pycnogenol .....	78
5.6.1	Substanzen mit einem Plasma-Konzentrations-Maximum unter fünf Stunden.....	79
5.6.2	Substanzen mit einem Plasma-Konzentrations-Maximum zwischen fünf und zehn Stunden.....	82
5.6.3	Substanzen mit einem Maximum über zehn Stunden .....	83
5.6.4	Substanzen mit interindividuell variablen Plasmaspiegel-Maxima .....	85
5.7	Pharmakokinetische Parameter .....	91
<b>6</b>	<b>EX VIVO HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH FÜNFTÄGIGER UND NACH EINMALIGER PYCNOGENOL-EINNAHME.....</b>	<b>98</b>
6.1	Hintergrund und Versuchsaufbau für die Bestimmung der <i>ex vivo</i> Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten .....	98

6.2	<i>Ex vivo</i> Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme.....	99
6.2.1	Gesamteffekt der Hemmung der MMP-9-Sekretion .....	100
6.2.2	Interindividuelle Variabilität der <i>ex vivo</i> Effekte.....	101
6.3	<i>Ex vivo</i> Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme .....	103
6.3.1	Vorversuche mit 1,0 g Pycnogenol.....	103
6.3.2	Studienergebnisse mit 0,3 g Pycnogenol .....	104
6.3.2.1	Einfluss hämolytischer Plasmaproben auf die MMP-9-Sekretion <i>ex vivo</i> .....	105
6.3.2.2	Hemmung der MMP-9-Sekretion durch die auswertbaren Plasmaproben der Studienteilnehmer.....	106
6.3.2.3	Zeitlicher Ablauf der Hemmung der MMP-9-Sekretion <i>ex vivo</i> nach Pycnogenol-Einnahme .....	108
<b>7</b>	<b><i>EX VIVO</i> HEMMUNG DER AKTIVIERUNG VON NF-<math>\kappa</math>B IN MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH FÜNFTÄGIGER PYCNOGENOL-EINNAHME .....</b>	<b>112</b>
7.1	Strukturelle Eigenschaften von NF- $\kappa$ B .....	112
7.2	Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Angriffspunkte möglicher Inhibitoren .....	112
7.3	Versuchsaufbau für die Bestimmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B .....	116
7.4	Gesamteffekt der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	117
7.5	Interindividuelle Variabilität der <i>ex vivo</i> Effekte .....	118
7.6	Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Pflanzenextrakte und -bestandteile... ..	121
<b>C.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>125</b>
<b>1</b>	<b>MIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG VON VERSCHIEDENEN KIEFERNRINDENEXTRAKTEN .....</b>	<b>127</b>
1.1	Reagenzien und Geräte.....	127
1.2	Mikroskopie der Extrakte.....	127
<b>2</b>	<b>HEMMUNG VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>128</b>
2.1	Reagenzien und Geräte.....	128
2.2	Succinylierung der Substrate Collagen, Elastin und Gelatine.....	129
2.3	Proteinbestimmung mittels Bicinchonic Acid (BCA)-Methode .....	130
2.4	Aktivierung der Proenzyme.....	130
2.5	Hydrolyse der succinylierten Substrate.....	131

2.6	Hemmversuche von MMP-1 .....	131
2.6.1	Inhibitor TIMP-1 .....	131
2.6.2	Inhibitor Pycnogenol .....	132
2.6.3	Inhibitoren $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton .....	133
2.6.4	Inhibitor Kaffeesäure.....	133
2.6.5	Catechin.....	133
2.7	Hemmversuche von MMP-2 .....	133
2.7.1	Inhibitor Captopril.....	133
2.7.2	Andere Inhibitoren .....	134
2.8	Hemmversuche von MMP-9 .....	134
2.8.1	Andere Inhibitoren .....	134
2.9	Statistische Auswertung.....	134
<b>3</b>	<b>BINDUNG VON PYCNOGENOL UND M2 AN MATRIXPROTEINE .....</b>	<b>135</b>
3.1	Reagenzien und Geräte .....	135
3.2	Bindung an Hautpulver .....	135
3.3	Bindung an Collagen.....	136
3.4	Bindung an Elastin .....	136
3.5	Bindung an Ovalbumin .....	137
3.6	Bindung von M2 an Hautpulver.....	137
<b>4</b>	<b>HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS MONOCYTEN .....</b>	<b>138</b>
4.1	Reagenzien und Geräte für die Zellkultur .....	138
4.1.1	Pufferlösungen.....	138
4.1.2	Zellkultur .....	138
4.1.2.1	Trennlösungen für die Dichtegradientenzentrifugation.....	138
4.1.2.2	Medien und Seren .....	138
4.1.3	Sonstige Reagenzien für die Zellkultur .....	139
4.1.4	Geräte und Materialien für die Zellkultur .....	139
4.2	Isolierung humaner Monocyten .....	139
4.3	Zellzahlbestimmung.....	141
4.4	Stimulation der Zellen.....	141
4.4.1	Geräte und Reagenzien für die Stimulation .....	141
4.4.2	Zusatz der Inhibitoren .....	142



4.4.2.1	PPAR-Agonisten .....	142
4.4.2.2	Glucocorticoide .....	143
4.4.2.3	Metabolite M1 und M2 .....	143
4.5	Bestimmung der Anzahl lebender Zellen .....	143
4.6	ELISA-Messung des sekretierten MMP-9 .....	143
4.6.1	Geräte und Reagenzien .....	143
4.6.2	Durchführung der ELISA-Messung .....	144
4.6.3	Auswertung der MMP-9-ELISA-Messung .....	144
<b>5</b>	<b>PHARMAKOKINETISCHE STUDIE MIT PYCNOGENOL NACH PERORALER EINNAHME.....</b>	<b>146</b>
5.1	Diätvorschriften.....	146
5.2	Probandenkollektiv.....	146
5.2.1	Proben der mehrfachen Pycnogenol-Gabe .....	146
5.2.2	Proben der einmalige Pycnogenol-Gabe .....	147
<b>6</b>	<b>PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNG BEKANNTER INHALTSSTOFFE UND/ODER METABOLITE VON PYCNOGENOL .....</b>	<b>149</b>
6.1	Verwendete Geräte und Reagenzien .....	149
6.2	Aufarbeitung der Plasmaproben .....	150
6.3	HPLC-Bedingungen .....	151
6.4	Quantitative Auswertung der HPLC-Ergebnisse .....	152
6.5	Validierung der HPLC-Analytik .....	153
6.5.1	Selektivität .....	153
6.5.2	Kalibrierfunktion .....	154
6.5.2.1	Linearität .....	154
6.5.3	Prüfung auf Präzision und Richtigkeit der Methoden .....	156
6.5.4	Bestimmungsgrenzen.....	158
6.5.5	Wiederfindung (relativ) .....	159
6.5.6	Extraktionseffektivität .....	161
6.6	Bestimmung der Wiederfindung von Dimeren/Trimeren aus dem Gesamtextrakt Pycnogenol (Fraktion II/Fraktion III) .....	163
6.6.1	Vorbereitung der Proben .....	163
6.6.2	HPLC-Bedingungen .....	163
6.6.3	Bindung der Fraktionen an Plasmaproteine.....	163
6.6.4	Kalibrierung von Procyanidin B1 .....	166

<b>7</b>	<b>EX VIVO HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH PYCNOGENOL-EINNAHME.....</b>	<b>167</b>
7.1	Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten in humanem Plasma infolge Pycnogenol-Einnahme .....	167
7.1.1	Bedingungen der flavonoidfreien Diät .....	167
7.1.2	Gewinnung der Plasmaproben vor und nach Pycnogenol-Einnahme .....	167
7.1.2.1	Plasmaproben nach mehrmaliger Pycnogenol-Einnahme .....	167
7.1.2.2	Plasmaproben nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme .....	167
7.1.3	Kultivierung der Monocyten .....	167
7.1.4	ELISA-Messung der Plasmaproben .....	168
7.1.5	Auswertung der ELISA-Messung der Plasmaproben .....	168
<b>8</b>	<b>EX VIVO HEMMUNG DER AKTIVIERUNG VON NF-<math>\kappa</math>B IN MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH FÜNFTÄGIGER PYCNOGENOL-EINNAHME.....</b>	<b>169</b>
8.1	Geräte und Reagenzien .....	169
8.2	Gewinnung der Plasmaproben vor und nach Pycnogenol-Einnahme .....	169
8.3	Präparation von Kernextrakten aus Monocyten .....	169
8.4	ELISA-Messung von aktiviertem NF- $\kappa$ B .....	171
8.5	Auswertung der NF- $\kappa$ B-ELISA-Messung .....	172
<b>D.</b>	<b>TABELLARISCHER ANHANG.....</b>	<b>177</b>
<b>1</b>	<b>HEMMUNG DER AKTIVITÄT VON MATRIXMETALLOPROTEINASEN IN VITRO.....</b>	<b>177</b>
1.1	Hemmkonzentrationen der einzelnen Inhibitoren mit Mittelwert und Standardabweichung (SD) .....	177
1.1.1	MMP-1: .....	177
1.1.2	MMP-2: .....	177
1.1.3	MMP-9: .....	178
1.2	ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse.....	178
1.2.1	MMP-1: .....	178
1.2.2	MMP-2: .....	179
1.2.3	MMP-9: .....	180
<b>2</b>	<b>BINDUNG VON PYCNOGENOL AN MATRIXPROTEINE .....</b>	<b>181</b>
2.1	Bindung von Pycnogenol an Collagen, Elastin und Hautpulver.....	181

---

2.2	Bindung von Pycnogenol an Ovalbumin.....	184
2.3	Bindung von M2 an Hautpulver.....	185
2.4	ANOVA-Statistik zur Bindung von Pycnogenol und M2 an Matrixproteine und an Ovalbumin .....	185
2.5	Direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MMPs.....	185
2.5.1	Ohne Zinkzusatz.....	185
2.5.2	Zusatz von 10 $\mu$ M Zink .....	186
2.5.3	ANOVA-Statistik zur Auswertung der Hemmung von MMP-9.....	186
<b>3</b>	<b>HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS MONOCYTEN.....</b>	<b>188</b>
3.1	Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: M1 .....	188
3.2	Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: M2 .....	188
3.3	Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Rosiglitazon.....	189
3.4	Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Hydrocortison.....	189
3.5	Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Fenofibrat .....	190
3.6	Zusammenfassung der prozentualen Hemmung der MMP-9-Freisetzung.....	191
3.7	ANOVA-Statistik zur Auswertung der Hemmung der MMP-9-Freisetzung.....	191
3.8	Bestimmung der Zellviabilität.....	192
3.9	Bestimmung der Zellviabilität der Steady-state-Proben .....	192
<b>4</b>	<b>HPLC-ANALYTIK WICHTIGER INHALTSSTOFFE UND/ODER METABOLITE VON PYCNOGENOL .....</b>	<b>193</b>
4.1	Plasmapeaks der Studienteilnehmer .....	193
4.2	Pharmakokinetische Parameter der Studienteilnehmer.....	199
<b>5</b>	<b>EX VIVO HEMMUNG DER MMP-9-FREISETZUNG AUS MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH PYCNOGENOL-EINNAHME .....</b>	<b>201</b>
5.1	Konzentrationen an MMP-9 nach Mehrfachgabe .....	201
5.2	Konzentrationen an MMP-9 nach Einmalgabe (1,0 g).....	201
5.3	Konzentration an MMP-9 nach Einmalgabe (0,3 g) .....	202
<b>6</b>	<b>EX VIVO HEMMUNG DER AKTIVIERUNG VON NF-<math>\kappa</math>B IN MONOCYTEN DURCH HUMANES PLASMA NACH FÜNFTÄGIGER PYCNOGENOL-EINNAHME .....</b>	<b>203</b>
6.1	Bestimmung der Zellviabilität der Steady-state-Proben .....	203
6.2	Konzentrationen an p65 nach Mehrfachgabe.....	203

<b>E. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>207</b>
<b>F. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>215</b>
<b>G. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>219</b>

## **A. Einleitung**

---



## A. Einleitung

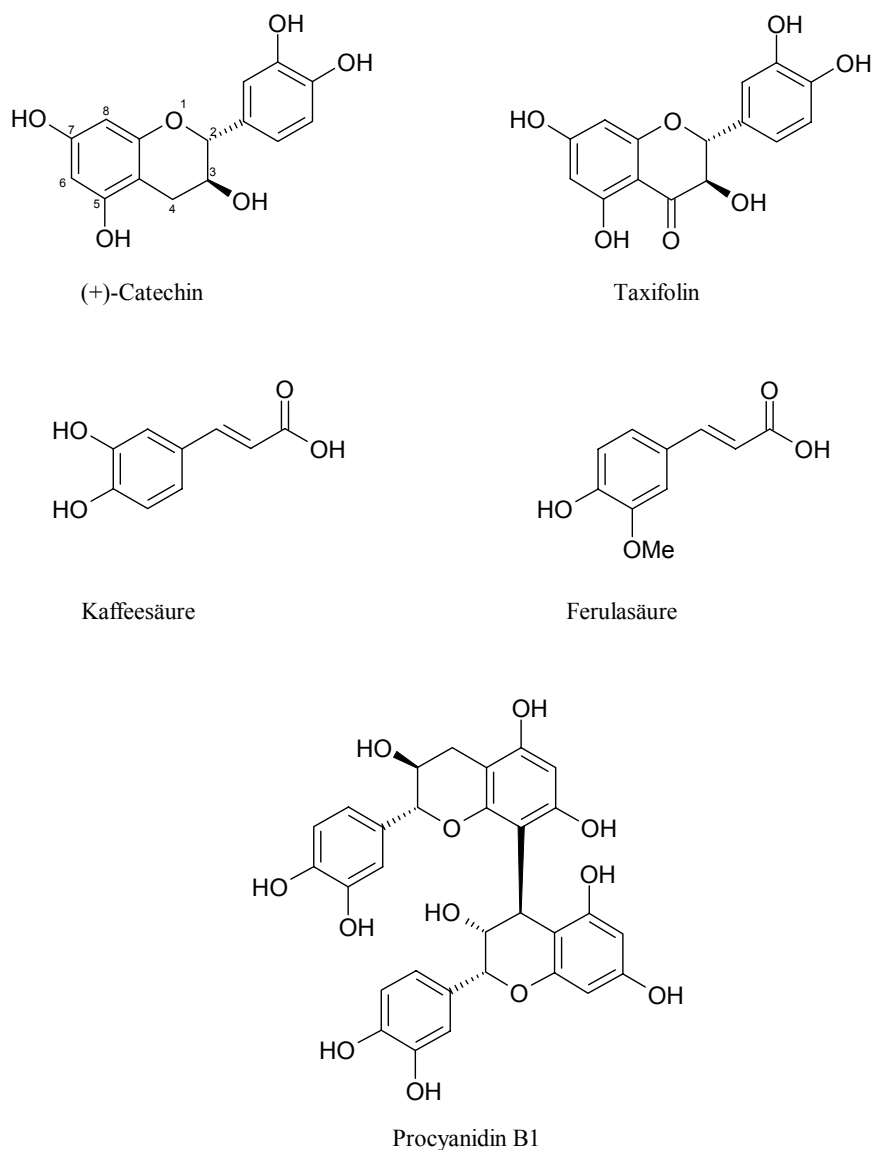
Das Arzneibuch der Vereinigten Staaten, United States Pharmacopeia (USP), beinhaltet eine neue Monographiesektion „Dietary Supplements“. Die Monographie *Maritime pine extract* wurde 2005 in die USP 28 aufgenommen. *Maritime pine extract* ist ein Extrakt aus der Rinde der Meereskiefer *Pinus pinaster* Aiton, die an der südfranzösischen Atlantikküste in großem Umfang kultiviert wird. Nach einem patentierten Verfahren der Firma Horphag Research (Genf, Schweiz) wird ein standardisierter Extrakt mit dem Handelsnamen Pycnogenol der USP konform hergestellt. Der Name *Pycnogenole* (altgriechisch: *puknos* = kondensiert und *genos* = Klasse, Familie) bezeichnete ursprünglich eine Klasse von Flavonoiden, die aus Flavan-3-ol-Derivaten zusammengesetzt waren, wird aber heute nur noch für den standardisierten Extrakt verwendet. Die Zusammensetzung des Extraktes ist weitgehend aufgeklärt, lediglich etwa 10 % der Bestandteile sind noch unbekannt. Es konnten von Pirasteh neben (+)-Catechin und Taxifolin die Phenolcarbonsäuren Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Gallussäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure und Vanillinsäure identifiziert werden (Abbildung 1) [1].

Rüve konnte zusätzlich zu den freien Phenolcarbonsäuren die glucosylierten Derivate p-Hydroxybenzoesäure- $\beta$ -D-glucosid, 1-(p-Cumaroyl)- $\beta$ -D-glucose, 1-Feruloyl- $\beta$ -D-glucose und das Flavonolglucosid Taxifolin-3'-O- $\beta$ -D-glucosid nachweisen [2]. Weiterhin konnte er geringe Mengen freier Glucose, sowie in gebundener Form vorliegende Rhamnose nachweisen. Die Aglyka der Rhamnose konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Die Hauptkomponenten sind mit einem Anteil von etwa 65 % Procyanidine, wobei es sich um Oligomere des (+)-Catechins und des (-)-Epicatechins handelt. Pirasteh konnte die dimeren Procyanidine B1, B3, B6 und B7, sowie ein trimeres Procyanidin nachweisen [1]. Der Nachweis von Oligomeren mit einer Kettenlänge bis zu zwölf monomeren Flavanoleinheiten gelang Sibbel mittels MALDI-TOF-MS [3].

Der Extrakt kann durch Gelchromatographie mit Sephadex LH-20 in vier Fraktionen aufgetrennt werden. Dabei enthält die erste Fraktion die Phenolcarbonsäuren, frei und als Glucoside, und die monomeren Polyphenole (+)-Catechin und Taxifolin. Die zweite Fraktion besteht aus dimeren und trimeren Procyanidinen und die dritte Fraktion aus

tetrameren bis hexameren Procyanidinen. Die letzte Fraktion enthält die höher oligomeren Procyanidine [1, 4].



**Abbildung 1: Strukturformeln einiger wichtiger Inhaltsstoffe des Extraktes: (+)-Catechin, Taxifolin, Kaffeesäure, Ferulasäure und Procyanidin B1.**

Weltweit wird der Kiefernrintenextrakt als Nahrungsergänzungsmittel und als Phytotherapeutikum in unterschiedlichen Darreichungsformen eingesetzt. Großes Interesse besteht an den biologischen Effekten des Rindenextraktes, wobei zunächst die antioxidativen Eigenschaften im Vordergrund standen. Substanzen mit Radikalfängereigenschaften haben das Potential, Zellschäden durch oxidativen Stress zu



verhindern [5]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie die radikalischen Verbindungen Superoxidradikalanion, Peroxylradikale oder Hydroxylradikale und die nichtradikalischen Verbindungen Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit sind an der oxidativen Zerstörung von Zielstrukturen in Zellen beteiligt [6]. Hiervon betroffen sind primär DNA, Proteine und mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden [7]. Durch die Einwirkung von ROS können einerseits DNA-Modifikationen und Fehlregulationen in der Proteinbiosynthese resultieren. Andererseits entstehen aufgrund von Lipidperoxidationen Produkte wie 4-Hydroxy-2-nonenal oder Malonaldehyd, die ihrerseits Proteinzerstörung, Apoptose und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, wie Cytokinen induzieren. Proinflammatorische Cytokine sind in der Lage, Signalwege von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Aktivator-Protein-1) oder NF- $\kappa$ B (Nuclear factor  $\kappa$ B) mit weitreichenden regulatorischen Funktionen zu aktivieren. Dies kann zur Entstehung einer Vielzahl akuter und chronischer entzündlicher Erkrankungen, sowie Erkrankungen des Immunsystems führen.

Die Radikalfängeraktivitäten des Extraktes und seiner Inhaltsstoffe gegenüber Superoxidradikalanion, Hydroxylradikal, Lipidperoxidradikal und Stickstoffmonoxidradikal sind *in vitro* und *in vivo* untersucht worden [8]. In *in vitro* Versuchen wurde die Aktivität des Extraktes und seiner Fraktionen gegenüber dem Superoxidradikalanion bestimmt [9]. Neben dem Gesamtextrakt wies die dritte Fraktion, die die tetrameren bis hexameren Procyanidine enthält, die höchste Wirkung auf. Die antioxidative Kapazität von Fraktionen des Kiefernrintenextraktes wurde auch anhand der Hemmung der Lipidperoxidation gezeigt [7]. In einer Öl-in-Wasser-Emulsion, versetzt mit den verschiedenen Fraktionen konnte nachgewiesen werden, dass die Fraktion, die oligomere Procyanidine enthielt, der stärkste Inhibitor der Lipidperoxidation war.

Starke Radikalfängereigenschaften von Pycnogenol gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, die durch Wasserstoffperoxid oder durch Phorbol ester in einer murinen Macrophagen-Zelllinie induziert wurden, konnten von Cho et al. nachgewiesen werden [10]. Dabei war die durch den Gesamtextrakt verursachte dosisabhängige Hemmung der intrazellulären Aktivität von Radikalen größer als die von dem Extraktbestandteil Catechin verursachte. Es wurde daher eine synergistische Wirkung der Extraktkomponenten in Bezug auf die Radikalfängereigenschaften angenommen.

Bayeta et al. untersuchten die antiinflammatorischen Effekte von Pycnogenol im Zellkulturmodell an Macrophagen, da dieser Zelltyp regelmäßig am

Entzündungsgeschehen beteiligt ist [11]. Es konnte eine dosisabhängige Hemmung der intrazellulären Peroxidentstehung nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein Anstieg der intrazellulären Glutathion-Konzentration beobachtet. Glutathion ist in der Zelle ein wichtiges Antioxidanz und reagiert schnell auf oxidativen Stress. Ein Anstieg der Glutathion-Konzentration durch Pycnogenol lässt auf eine Verstärkung des Radikalfängereffektes schließen.

Die Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Konzentration nach Pycnogenol-Gabe wurde im Tierversuch bestätigt. Durch Injektion von Streptozotocin wurde bei Ratten Diabetes mellitus induziert [12]. Durch den hyperglykämischen Status bei Diabetes mellitus folgt ein Anstieg der Konzentration von freien Radikalen im Körper. Nach einer i.p. Behandlung mit Pycnogenol über einen Zeitraum von zwei Wochen konnten in den behandelten Ratten erhöhte Glutathion-Konzentrationen, sowie erhöhte Aktivitäten von Glutathion-Reduktase und -Peroxidase nachgewiesen werden. Durch die Steigerung der Aktivität der beiden Enzyme kommt es intrazellulär zu einer vermehrten Entstehung des als Antioxidanz wirkenden Glutathions. Weiterhin wurde eine Normalisierung erniedrigter Katalase-Aktivität in der Leber diabetischer Ratten unter Pycnogenol-Behandlung gezeigt. Damit konnte in Ratten nach Pycnogenol-Gabe eine Verbesserung der Abwehrmechanismen gegenüber oxidativen Stress festgestellt werden.

Erkrankungen, bei denen erhöhte Konzentrationen von ROS als Ursache für die Einwanderung inflammatorischer Zellen in die Dickdarmschleimhaut diskutiert werden, sind Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Im tierexperimentellen Modell an Ratten wurden beide entzündliche Erkrankungen durch intrarektale Injektion von Trinitrobenzolsulfonsäure induziert [13]. Erhielten die Ratten vor dieser Injektion über einen Zeitraum von zehn Tagen über eine Sonde unterschiedliche Mengen Pycnogenol, so konnte eine dosisabhängige Hemmung der makroskopischen Schäden der Darmschleimhaut festgestellt werden. Die makroskopischen Schäden umfassten entzündete Areale, sowie An- und Abwesenheit von Ulzerationen. Mochizuki et al. nahmen eine Reduktion der entzündeten Gewebe aufgrund der antioxidativen Eigenschaften von Pycnogenol an, da auf diese Weise der übermäßigen Produktion von ROS entgegengewirkt wird.

Mit Pycnogenol wurden außerdem bereits eine Reihe klinischer Studien am Menschen durchgeführt. In einer Pilotstudie an Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), einer multisystemischen Autoimmunerkrankung, die durch eine Reihe von

Fehlfunktionen des Immunsystems auf molekularer und zellulärer Ebene charakterisiert ist, erhielt eine Gruppe über einen Zeitraum von 60 Tagen täglich Pycnogenol [14]. Die ersten 30 Tage wurden 120 mg Pycnogenol täglich verabreicht, die letzten 30 Tage 60 mg Pycnogenol täglich. Die zweite Gruppe erhielt Placebo. Blutzellen und Serumproben der Patienten wurden unter anderem auf die Produktion von ROS, auf den Index der Aktivität der Erkrankung und auf spontane Apoptose von Zellen untersucht. Zellen und Serum der mit Pycnogenol behandelten Gruppe wiesen eine signifikante Reduktion dieser Parameter auf. Pycnogenol könnte infolgedessen aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften zu einer Reduktion der inflammatorischen Ereignisse bei SLE beitragen.

Eine wichtige chronisch entzündliche Erkrankung ist Asthma bronchiale. In einer randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Crossover-Studie wurde Asthmapatienten über vier Wochen täglich 2,2 mg/kg Körpergewicht, jedoch höchstens 200 mg pro Tag, Pycnogenol verabreicht [15]. Neben dem signifikanten Anstieg des forcierten Ausatemvolumens konnte eine signifikante Reduktion der bronchokonstriktorisch und chemotaktisch wirkenden Serum-Leukotrien-Konzentrationen festgestellt werden. Leukotriene sind als Mediatoren der Arachidonsäure wesentlich am Entzündungsgeschehen beteiligt. Wurde Pycnogenol bei Asthma bronchiale über einen längeren Zeitraum supplementiert, so ließ sich die inflammatorische Komponente der Erkrankung verbessern.

In nahezu allen Untersuchungen zu den biologischen Effekten von Pycnogenol kam bisher der Gesamtextrakt zum Einsatz. Die Wirksamkeit von einzelnen Extraktkomponenten oder Metaboliten wurde kaum untersucht, so dass die effektiven Verbindungen bis heute unbekannt sind. Für die Aufklärung der beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen des Kiefernrintenextraktes Pycnogenol sollen in der vorliegenden Arbeit *in vitro* Versuche auf molekularer und auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. Dabei sollen ausgewählte Extraktbestandteile von denen eine Resorption gezeigt wurde oder angenommen werden konnte und Metabolite, wie die im Urin von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme identifizierten Metabolite  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M1) und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M2), in die Untersuchungen einbezogen werden [16].

Um zu klären, welche der bekannten Inhaltsstoffe des Extraktes vom Körper in welchem Umfang absorbiert werden, sollen Plasmaproben von Probanden nach p.o. Pycnogenol-Einnahme untersucht werden. Es soll dabei auch der Frage nachgegangen

werden, ob die beiden Metabolite M1 und M2 in ausreichender Konzentration gebildet werden, um im Plasma von Probanden nachgewiesen werden zu können. Von den bekannten Substanzen sollen anschließend die pharmakokinetischen Parameter berechnet werden.

Schließlich soll versucht werden, einen Zusammenhang zwischen den im Rahmen der pharmakokinetischen Untersuchungen identifizierten Substanzen und den pharmakodynamischen Effekten des Kiefernextraktes herzustellen.

## **B. Allgemeiner Teil**

---



## B. Allgemeiner Teil

### 1 Mikroskopische Darstellung von verschiedenen Kiefernringenextrakten

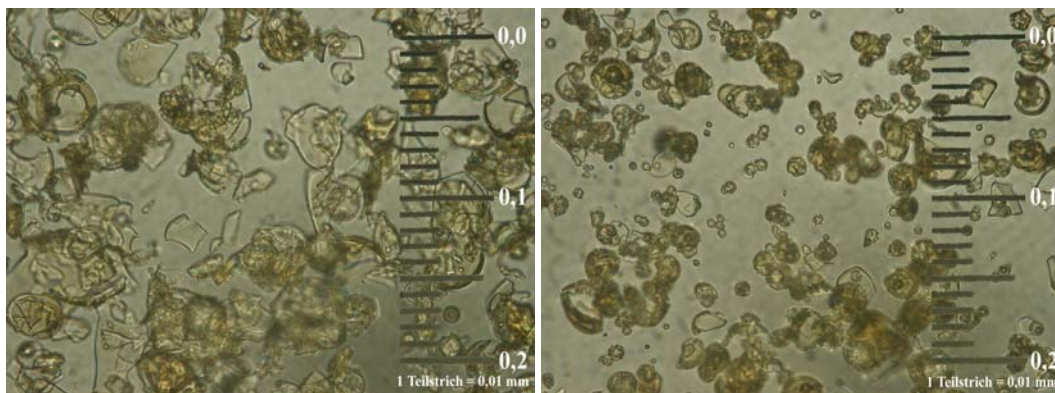
Kiefernringenextrakte werden von verschiedenen Firmen angeboten und in Form von Tabletten, Kapseln, Salben, Lösungen, etc. in den Handel gebracht. Es kommen dabei unterschiedliche Extraktionsmethoden zum Einsatz, die in der Regel patentgeschützt sind. Im Folgenden wurde der standardisierte Meereskiefernextrakt Pycnogenol der Firma Horphag Research mit Extrakten zweier französischer Firmen, DRT (Les Dérives résiniques et terpéniques) und Berkem, mikroskopisch verglichen. Dazu wurden Aufnahmen in Mandelöl, in dem sich die Extrakte nicht lösen und dadurch die Extraktfragmente besser zu erkennen sind und die Kontraste schärfer werden, gemacht. Die Vergrößerung war in allen Fällen 40-fach.



**Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahme von Pycnogenol bei 40-facher Vergrößerung; ein Teilstrich der Skala entspricht 0,01 mm.**

Die mikroskopische Aufnahme von Pycnogenol zeigte neben den braunen meist runden Extraktfragmenten auch farblose, kristallin erscheinende Bestandteile mit unterschiedlichen Größen (Abbildung 2). Die kugelförmigen Bestandteile sind ein Resultat der im Herstellungsprozess durchgeführten Sprühtrocknung. Im Vergleich zu den beiden

anderen Extrakten der Firmen Berkem und DRT waren diese Bruchstücke größer. Der Berkem-Extrakt zeigte größere Ähnlichkeit mit Pycnogenol, auch wenn weniger braune kugelförmige Extraktfragmente zu erkennen waren (Abbildung 3). Dies lässt vermuten, dass im Herstellungsprozess des Berkem-Extraktes keine Sprühtrocknung durchgeführt wurde.



**Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von Kiefernrintenextrakten produziert von Berkem (links) und DRT (rechts) bei 40-facher Vergrößerung; ein Teilstrich der Skala entspricht 0,01 mm.**

Die mikroskopische Auffälligkeit des DRT-Extraktes war die große Anzahl der braunen runden Fragmente, die zu einem wesentlich geringeren Teil in den beiden anderen Extrakten enthalten waren (Abbildung 3). Es konnten auch weniger farblose Bruchstücke identifiziert werden, so dass der DRT-Extrakt sich am deutlichsten von den anderen unterschied. Die unterschiedlichen morphologischen Merkmale der Extrakte der verschiedenen Firmen könnten in unterschiedlicher Herkunft des Pflanzenmaterials oder in einem unterschiedlichen Herstellungsverfahren des Extraktes begründet sein.

Damit konnte anschaulich gemacht werden, dass sich die Kiefernrintenextrakte verschiedener Hersteller schon optisch unterscheiden. Unterschiedliche Produktionsprozesse lassen zudem vermuten, dass sich auch das Spektrum der Inhaltsstoffe der Extrakte unterscheiden könnte.



## **2 Hemmung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen *in vitro***

### **2.1 Die Extrazellulärmatrix**

Höhere Organismen sind aus einer Vielzahl verschiedener und zum Teil hoch spezialisierter Zellen aufgebaut, die in Organen bzw. Gewebeverbänden organisiert sind. Die biologischen Gewebe bestehen jedoch nicht nur aus Zellen. Einen erheblichen Teil des Gewebevolumentums nimmt der Extrazellulärraum ein, der von einem komplexen Makromolekülgeflecht, der sogenannten Extrazellulärmatrix, ausgefüllt wird. Sie besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Polysaccharide und Proteine, die von dafür spezialisierten Zellen, wie Chondroblasten im Knorpelgewebe oder Osteoblasten im Knochen [17] gebildet und sezerniert werden und sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammenlagern [18-20].

Die zum Aufbau der Extrazellulärmatrix verwendeten Makromolekültypen variieren bezüglich ihrer Zusammensetzung und Strukturierung je nach Gewebetyp sehr stark. Insgesamt finden sich in der Extrazellulärmatrix weit über 100 verschiedene Makromolekültypen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen [21, 22]. Diese Makromoleküle lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen: Glycosaminoglykane und Faserproteine.

Glycosaminoglykane sind Polysaccharide, die meist gekoppelt an Proteine, also als Proteoglykane, vorliegen. Sie bilden aufgrund ihrer Ladungseigenschaften eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in die Faserproteine eingebettet sind und durch die Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe diffundieren können [23].

Die Klasse der Faserproteine lässt sich nochmals in Strukturproteine, wie Collagen und Elastin einerseits und in Adhäsionsmoleküle, wie Fibronectin und Laminin andererseits, unterteilen. Collagenfasern, die den Hauptproteinbestandteil der Extrazellulärmatrix darstellen, tragen zur Struktur und zur Widerstandsfähigkeit, Elastinfasern dagegen zur Elastizität bei [20]. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt zwischen der Extrazellulärmatrix und den in sie eingebetteten bzw. den sie umgebenden Zellen [24].

Die Komplexität der Extrazellulärmatrix setzt ein aufwändiges System voraus, welches für den zeitlich und räumlich koordinierten Auf-, Um- und Abbau der Matrixkomponenten sorgt. Für die Reorganisation der Extrazellulärmatrix sind mehrere Wege bekannt. So können strukturelle Makromoleküle des interstitiellen Bindegewebes neben dem Abbau über einen Plasmin-abhängigen oder über einen Leukocyten-Serinproteinasen-abhängigen Stoffwechselweg mittels Matrixmetalloproteinasen (MMPs) abgebaut werden [25]. Letzterer ist der wahrscheinlich wichtigste Prozess, der zum Ab- und Umbau der Extrazellulärmatrix führt.

### **2.2 Die Familie der MMPs**

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen ist eine Enzym-Familie von Zink-Metallo-Endopeptidasen, aus der bisher 25 Vertreter bekannt sind. Diese weisen untereinander eine signifikante Sequenz-Homologie auf. Die ersten Beweise für die Existenz von MMPs wurden vor etwa 35 Jahren von Gross und Lapiere erbracht, die die Anwesenheit von collagenolytischen Faktoren in Gewebekulturen von Kaulquappen feststellten [26]. In den letzten Jahren wurden MMPs als die größte Gruppe proteolytischer Enzyme anerkannt, die für Gewebeumbauprozesse sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen verantwortlich sind. MMPs sind in der Lage, die Hauptkomponenten der Extrazellulärmatrix zu degradieren [27].

### **2.3 Aufbau der MMPs**

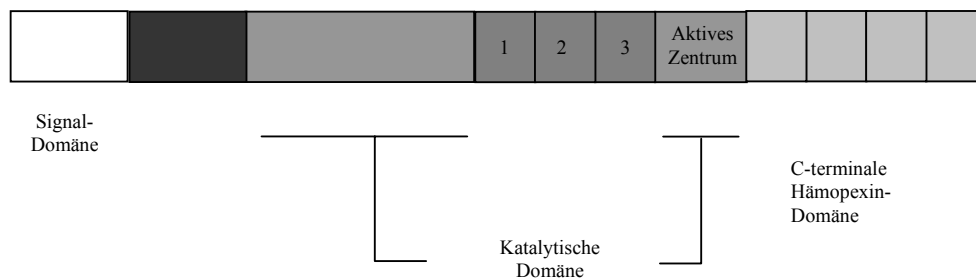
Der Aufbau der Matrixmetalloproteinasen weist, wie am Beispiel von MMP-2 verdeutlicht (Abbildung 4), mehrere Domänen auf. Alle MMPs werden mit einem etwa 20 Aminosäure-Einheiten großen Signalpeptid synthetisiert und, mit Ausnahme von MT (Membrane Type)-MMP-ähnlichen Proteinasen, als inaktive Proformen sekretiert [28]. Der Name MT-MMPs steht für membrangebundene MMPs. Diese sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und bauen dort Proteine der Extrazellulärmatrix ab.

Bei allen MMPs ist N-terminal eine Propeptid-Domäne aus ungefähr 80 Aminosäuren lokalisiert, die drei  $\alpha$ -helikale Strukturelemente enthält. Diese Propeptid-Domäne wird bei der Aktivierung der Matrixmetalloproteinase abgespalten (Allgemeiner Teil 2.4). Es folgt eine ungefähr 160 bis 170 Aminosäure-Einheiten große katalytische Domäne, die das aktive Zentrum mit dem katalytischen Zinkatom enthält. Bei inaktiven MMPs geht das

Zinkatom mit einer Cysteinsequenz der Propeptid-Domäne eine Bindung ein. In der aktiven Matrixmetalloproteinase, bei der diese Bindung gelöst und die Propeptid-Domäne abgespalten ist, ist dieses Zinkatom für die Hydrolyse von Substraten und für die Wechselwirkungen mit den verschiedenen Inhibitoren verantwortlich [29]. Dabei binden Carbonyl- bzw. Aminogruppen von Substraten und Inhibitoren über Wasserstoffbrücken an das katalytische Zinkatom. Dadurch erfolgt entweder ein Substratumsatz oder eine Inaktivierung der MMPs.

MMP-2 und MMP-9 besitzen in der katalytischen Domäne einen eingeschobenen Abschnitt von 175 Aminosäuren, der wiederum in drei Domänen unterteilt ist (Abbildung 4). Diese Domänen sind homolog zum Typ II-Motiv der collagenbindenden Domäne von Fibronectin. Der Fibronectin-ähnliche Teil von MMP-2 und MMP-9 scheint eine große Rolle bei der Substratspezifität gegenüber Typ IV Collagen und Gelatine zu spielen [30]. Die katalytische Domäne ist C-terminal kovalent durch einen 10 bis 70 Aminosäure-Einheiten großen, prolinreichen Bereich mit einer circa 195 Einheiten großen Hämopexin-Domäne verbunden. Diese besitzt vierfache repetitive Sequenzen von jeweils circa 45 Aminosäuren. Die Hämopexin-Domäne ist in Form eines vierblättrigen Propellers angeordnet, wobei jedes Blatt aus vier antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix besteht [31]. Sie kann sowohl an der Aktivierung als auch an der Hemmung des jeweiligen Enzyms beteiligt sein [32].

So spielt dieser Sequenzabschnitt eine Rolle bei der Bindung von spezifischen Inhibitoren der MMPs, den TIMPs (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases) (Allgemeiner Teil 2.5).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Matrixmetalloproteinasen am Beispiel von MMP-2, modifiziert nach Leppert et al. [33].**

## 2.4 Aktivierung von MMPs

Eine Vielzahl von Zellen, wie mikrovaskuläre, endotheliale Zellen, Granulocyten, Gliazellen, glatte Gefäßmuskelzellen und andere sind in der Lage, Matrixmetalloproteinasen als inaktive Enzymvorstufe zu sezernieren. Diese werden dann – durch weitere MMPs oder durch andere Proteasen, wie Plasmin – aktiviert. Der Aktivierungsmechanismus wird als „Cystein-Switch“ bezeichnet. Die inaktive Vorstufe wird durch einen intramolekularen Komplex zwischen einem Cystein-Rest der Propeptid-Domäne und dem Zinkatom im katalytischen Zentrum gebildet. Somit ist die proteolytische Aktivität der MMPs blockiert, da die Assoziation eines für die proteolytische Wirkung notwendigen Wassermoleküls an das Zinkion verhindert wird. Die proteolytische Abspaltung des Propeptids führt zur Aktivierung der Proteinase [32].

## 2.5 Einteilung der MMPs

Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften, sowie ihrer zellulären Lokalisierung können die MMPs in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden: die Collagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9), die Stromelysine 1 und 2 (MMP-3 und MMP-10), eine heterogene Untergruppe (MMP-7, MMP-26, MMP-12, MMP-19) und die MT-MMPs (MT-MMP-1 bis MT-MMP-4, Stromelysin-3, MMP-11) [28]. Dabei leiten sich die Bezeichnungen Collagenasen und Gelatinasen von den jeweiligen bevorzugten Substraten ab. Stromelysine bauen Proteoglycane, Laminin und Fibronectin ab. Eine Auswahl wichtiger MMPs mit alternativer Bezeichnung, Expression und ihrer pathophysiologischen Bedeutung ist in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Ausgewählte Matrixmetalloproteinasen und ihre Substrate (modifiziert nach [27, 34]).**

<b>MMP mit E.C. Nr.</b>	<b>Alternative Bezeichnung</b>	<b>Expression und Gewebe-/ Zellokalisierung</b>	<b>Pathophysiologie</b>
MMP-1 3.4.24.7	Collagenase-1 (Interstitielle Collagenase)	induzierbar	Erhöhte Konzentrationen bei Rheumatoider Arthritis; Beitrag zur Hautalterung bei UV-Exposition
MMP-2 3.4.24.24	Gelatinase A	konstitutiv (Mesenchymal- zellen)	Erhöht bei pulmonaler Fibrose, in Tumorgeweben (korreliert mit Aggressivität des Tumors)
MMP-3 3.4.24.17	Stromelysin-1	konstitutiv (Synovial- Fibroblasten)	Erhöht bei Rheumatoider Arthritis
MMP-7 3.4.24.33	Matrilysin-1	konstitutiv (einige benigne und maligne Tumore)	Erhöht bei Magenkarzinom, Verletzungen
MMP-8 3.4.24.34	Collagenase-2 (Neutrophile Collagenase)	induzierbar (neutrophile Granulocyten)	Erhöht bei bakterieller Meningitis, Parodontose, Ovarialkarzinom
MMP-9 3.4.24.25	Gelatinase B	konstitutiv (Macrophagen/ Monocyten, Tumore)	Erhöhte Konzentrationen bei Osteoarthritis, bakterieller Meningitis, Multipler Sklerose, Alzheimer, Asthma
MMP-10 3.4.24.22	Stromelysin-2	konstitutiv (Synovial- Fibroblasten)	Erhöhte Konzentrationen bei Rheumatoider Arthritis
MMP-11 3.4.24.-	Stromelysin-3	induzierbar	Expression bei Mamma- karzinom; korreliert mit Tumorinvasion
MMP-14 3.4.24.-	MT1-MMP		Aktiviert proMMP-2, damit erhöhte invasive Aktivität bei Krebszellen

## 2.6 Pathophysiologische/physiologische Bedeutung der MMPs

Einige Matrixmetalloproteinasen werden konstitutiv exprimiert (MMP-2), andere wiederum sind induzierbar (MMP-1) (Tabelle 1). Stimuliert wird ihre Produktion durch Cytokine, wie Interleukin (IL)-1 $\alpha/\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und Phorbol ester [35]. Matrixmetalloproteinasen spielen bei diversen pathologischen Prozessen, wie

Gefäßerkrankungen, chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen, Arthritis, degenerativen Gelenkerkrankungen, Krebs und bei der Hautdegeneration eine Rolle (Tabelle 1; [34, 36]).

Die MMP-Aktivität trägt auf zwei verschiedenen Wegen zur Tumorentstehung bei. MMPs sind bei soliden Tumoren an der Angiogenese beteiligt. Dabei wird der Übertritt der Tumorzellen ins vaskuläre Kompartiment durch eine Degradierung der Matrixproteine (interstitielles Collagen, Elastin, Fibronectin, Glycoproteine) erleichtert. Es kommt zur Expansion des Primärtumors. Weiterhin werden verschiedene Barrieren für die Zellmigration, die aus Collagen IV, Laminin und Proteoglykanen bestehen, durchbrochen und dadurch die Tumorzellinvasion und die Metastasierung gefördert. Erhöhte Konzentrationen von MMP-2, MMP-3, MMP-11 und MT-MMPs werden in Stromazellen, d.h. Zellen des bindegewebigen Stützgewebes eines Organs bzw. eines Tumors, gefunden, wohingegen MMP-7 und MMP-13 direkt in Tumorzellen zu detektieren sind [37].

Rheumatoide Arthritis ist charakterisiert durch chronische Entzündungsreaktionen, Proliferation der Zellen innerhalb der Synovialis der Gelenke und infolgedessen Gewebeerstörung [38]. Bei der Rheumatoiden Arthritis erfolgt die Initiation einer entzündlichen Reaktion als Antwort auf fremde Antigene, die beispielsweise aus einer bakteriellen oder viralen Infektion resultieren. Dadurch wird die Produktion von Entzündungsmediatoren durch Macrophagen eingeleitet. Inflammatorische Cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) stimulieren die Fibroblasten und Chondrocyten der Knorpelsubstanz zur Sekretion proteolytischer Enzyme wie MMPs. Diese tragen dann ihrerseits zur Zerstörung der Synovialmatrix bei [38]. MMP-1, MMP-3, MMP-9, und MMP-10 wurden bei Rheumatoider Arthritis in erhöhten Konzentrationen gefunden [27].

Eine weitere chronisch entzündliche Erkrankung, bei der MMPs beteiligt sind, ist Asthma bronchiale. Macrophagen, die sowohl in normalem Lungengewebe als auch bei chronischen Lungenerkrankungen zu finden sind, sind neben dem Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix für die Sekretion von Proteinasen, einschließlich MMPs verantwortlich [39]. Die Stimulation der Macrophagen zur MMP-9-Produktion erfolgt wieder über inflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die eine Schlüsselrolle bei pulmonalen entzündlichen Erkrankungen spielen [40]. Bei Asthmatikern wird eine erhöhte Anzahl aktivierter Macrophagen in bronchialen Biopsien gefunden [39]. Diese verursachen eine drei- bis vierfach erhöhte MMP-9-Produktion, die je nach Schweregrad der Asthma-Erkrankung bis auf das zehnfache ansteigen kann [40].

Physiologische Bedeutung kommt den MMPs bei der Wundheilung, bei Umbauprozessen von Haut und Geweben und bei der Embryogenese zu. Bei diesen Prozessen besteht ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren natürlichen endogenen Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) [41].

## 2.7 Natürliche und synthetische Hemmstoffe

### 2.7.1 TIMPs

Es sind zur Zeit vier TIMPs bekannt, die untereinander zwischen 41 und 52 % Sequenzidentität und bis zu 50 % Strukturhomologie aufweisen [28]. Sie hemmen mit unterschiedlicher Effektivität und mit geringer Selektivität die verschiedenen MMPs. Die Bindungen von TIMPs an MMPs erfolgen zwar langsam, sind aber sehr stabil. Es werden bei der Hemmung Komplexe im Verhältnis 1:1 (MMP:TIMP) gebildet. Die entsprechenden mittleren Hemmkonzentrationen bewegen sich im unteren nanomolaren Bereich [34]. Freigesetzt werden TIMPs in Geweben, zeitlich versetzt von der MMP-Expression. Sie werden oft von denselben Zelltypen exprimiert, die auch die MMPs produzieren [30]. TIMP-1 ist in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten (z.B. Amnionflüssigkeit, fötale Lungen-Fibroblasten) verbreitet [42, 43]. Die Expression resultiert als Antwort auf externe Stimuli, wie Phorbol ester als *in vitro*-Reagenz, oder physiologisch aufgrund von Wachstumsfaktoren und Cytokinen. TIMP-2 ist ebenfalls weitverbreitet und in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Herz, Uterus und Muskeln zu finden [28, 44]. TIMP-3 ist in der Extrazellulärmatrix lokalisiert und wird von Epithelzellen produziert [28]. Weiterhin wird es in Muskeln als Antwort auf mitogene Stimulation gebildet. TIMP-4 befindet sich im vaskulären Gewebe [45, 46].

TIMPs sind aus zwei Protein-Domänen aufgebaut und weisen ein Molekulargewicht zwischen 22 und 30 kDa auf. Die N-terminalen Bereiche bestehen aus etwa 125 Aminosäuren und die kleineren C-terminalen Bereiche sind aus etwa 65 Aminosäure-Einheiten zusammengesetzt, wobei jede Domäne durch drei Disulfid-Brücken stabilisiert wird [28].

TIMPs haben die Gestalt eines langgezogenen Keils. In Komplexen mit MMPs binden sie mit dem einen Ende dieses Keils an die gesamte Länge des aktiven Zentrums der entsprechenden Matrixmetalloproteinase. Die zentralen Disulfid-Segmente von TIMP binden an das Zinkatom im katalytischen Zentrum der MMPs. Die in TIMPs enthaltene

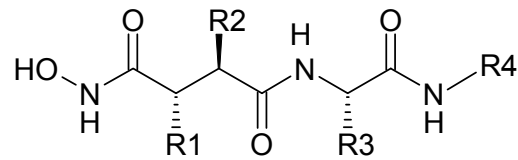
Aminosäure Cystein bildet mit Zink einen zweizähligen Komplex und eine Threonin-Seitenkette dehnt sich in die große S<sup>1</sup> Tasche („specificity pocket“), eine tiefe Spalte des aktiven Zentrums, aus [28]. Diese S<sup>1</sup> Tasche ist spezifisch für die jeweilige Matrixmetalloproteinase und bietet damit die Möglichkeit zu selektivem Inhibitor-Design [28]. Nähere Betrachtungen der Struktur zeigten, dass zusätzlich eine Hydroxygruppe der N-terminalen Einheit von TIMP mit der Aminosäure Glutaminsäure (Glu219) des aktiven Zentrums der Matrixmetalloproteinase in Form von Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung tritt. Ein Wassermolekül des aktiven Zentrums, welches eine Schlüsselrolle bei der Katalyse spielt, wird dabei ersetzt [28, 41]. Durch das Zusammenspiel dieser komplexeren Mechanismen resultiert die Hemmung der Matrixmetalloproteinasen durch TIMPs.

Das physiologische Gleichgewicht MMP:TIMP wird bei pathologischen Prozessen zugunsten der Matrixmetalloproteinasen verschoben, so dass diese in zu hohen Konzentrationen vorhanden sind. Obwohl alle TIMPs in der Lage sind, alle MMPs *in vitro* zu hemmen, existieren bevorzugte TIMP-MMP-Wechselwirkungen [47]. So sind beispielsweise TIMP-2 und TIMP-3 im Gegensatz zu TIMP-1 effektive Inhibitoren von MT-MMPs [46].

### 2.7.2 Synthetische Inhibitoren

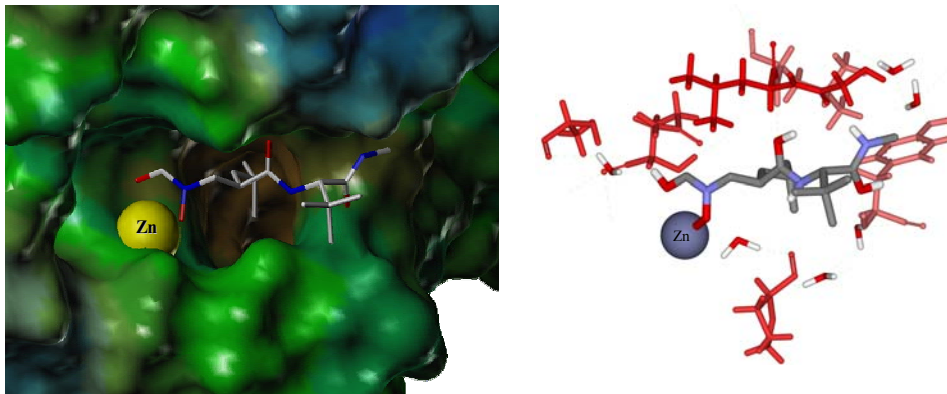
Zur Entwicklung synthetischer niedermolekularer Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren mit dem Ziel einer therapeutischen Nutzung bei pathologisch erhöhten MMP-Konzentrationen wurden die Bindungsmechanismen der natürlichen Inhibitoren berücksichtigt. Dadurch wurden unter anderem Hydroxamsäurederivate als Breitspektrum-MMP-Inhibitoren gefunden, die durch ihre Grundstruktur (Peptidstruktur, Hydroxygruppe) (Abbildung 5) Möglichkeiten zur Chelatierung des Zinkatoms besitzen [36]. Variationen an den Substituenten R1-R4 beeinflussen Aktivität, Selektivität und orale Bioverfügbarkeit. Als Substituenten haben beispielsweise Alkyl- und Phenylalkylketten Einfluss auf die Enzymspezifität. Längere Alkyl- und Phenylalkylketten an R2 erhöhen die Aktivität gegenüber MMP-2, MMP-3 und MMP-9.





**Abbildung 5: Grundstruktur von Hydroxamsäure-Inhibitoren [36]. R1 wird für die orale Bioverfügbarkeit modifiziert, R2 ist bestimmend für Aktivität und Selektivität, R3 cyclisiert mit R4 verbessert die Aktivität. Polare Gruppen an R4 könnten die biliäre Exkretion beeinflussen.**

Die Darstellung von MMP-9 im Komplex mit einem Hydroxamat-Inhibitor veranschaulicht den Angriff des Inhibitors am aktiven Zentrum der Matrixmetalloproteinase (Abbildung 6). Dabei wird deutlich, dass sowohl Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen des Inhibitors mit den Aminosäuren der Matrixmetalloproteinase (rechtes Bild), als auch die Chelatierung des Zinkatoms im aktiven Zentrum (rechtes und linkes Bild) eine entscheidende Rolle spielen.



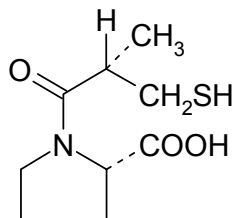
**Abbildung 6: Aktives Zentrum von MMP-9, im Komplex mit einem Hydroxamat-Inhibitor [48]. Links ist die Oberflächenstruktur des aktiven Zentrums mit der S1' Tasche im Hintergrund dargestellt, rechts die Aminosäuren und Wassermoleküle, die für die Bindung essentiell sind. Die Wechselwirkungen sind durch grün gestrichelte Linien gekennzeichnet. Der Inhibitor ist jeweils als Molekülmodell dargestellt.**

So kann neben der Chelatisierung des Zinkatoms die Carbonylgruppe des C-terminalen Endes des Hydroxamsäure-Inhibitors mit Aminosäuren wie Asparagin, die Bestandteil der S1' Tasche des aktiven Zentrums von MMP-1 und MMP-8 ist, Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, woraus eine Aktivitätsminderung dieser MMPs entsteht [48].

Weiterhin ist durch eine Hydroxygruppe des Inhibitors, die in Wechselwirkung mit Glutaminsäure (Glu219) tritt und damit das Wassermolekül des aktiven Zentrums ersetzen kann, eine zusätzliche Voraussetzung für eine MMP-Hemmung gegeben [28]. Allgemein enthalten nahezu alle bisher bekannten synthetischen Inhibitoren entweder eine zur Chelatisierung befähigte funktionelle Gruppe (Hydroxamsäure, Carboxylat- oder Thiolgruppe) zur Komplexierung des Zinkatoms und/oder eine peptidomimetische Struktur, die das Substrat imitiert und somit an das Substrat-Bindungszentrum der MMPs angelagert werden kann.

Krüger et al. untersuchten in einer neueren Veröffentlichung am Mausmodell den potenten Inhibitor SB-3CT (3-(4-Phenoxyphenyl-sulfonyl)-propylthiiran), eine Verbindung mit schwefelhaltigen funktionellen Gruppen, die selektiv für Gelatinasen ist [49]. Der Vorteil dieser Substanz liegt darin, dass sich die eigentliche Wirkkomponente erst nach der Anlagerung des Inhibitors am aktiven Zentrum der Gelatinasen bildet. Durch kovalente Bindungen mit dem Inhibitor verändert sich ein Teil des aktiven Zentrums dahingehend, dass die Gelatinasen in ihrer Aktivität gehemmt werden. Somit resultiert eine hohe *in vivo* Selektivität von SB-3CT, die vielen anderen MMP-Inhibitoren, die suboptimale klinische Wirksamkeit und hohe Nebenwirkungsraten zeigten, fehlt. Die im Vergleich zu den natürlichen Inhibitoren kleine Molekülgröße von SB-3CT verdeutlicht, dass die Voraussetzungen von MMP-Inhibitoren durch ihre Strukturen und nicht unbedingt durch ihre Größe geschaffen werden.

Eine weitere niedermolekulare Substanz, die in der Lage ist, MMP-2 und MMP-9 zu hemmen, ist Captopril (MW = 217) (Abbildung 7) [50]. Hier wird angenommen, dass die Sulfhydrylgruppe das Zinkatom im aktiven Zentrum chelatiert und somit die Aktivität der MMPs inhibiert [50].



**Abbildung 7: Struktur von Captopril.**

Zusammenfassend kann als minimale strukturelle Bedingung für einen potenten MMP-Inhibitor das Vorhandensein einer Zink-bindenden Gruppe, die mit dem zentralen

Zinkatom einen Chelatkomplex bilden kann, angesehen werden [36]. Weiterhin sind Hydroxygruppen essentiell für die hemmenden Eigenschaften. Die Effektivität von Hydroxamsäurederivaten, SB-3CT und Captopril [36, 49, 50] als MMP-Inhibitoren zeigt, dass auch Stoffe, die niedermolekularer als die natürlichen Inhibitoren sind, eine Hemmung der MMPs erzielen können. Allerdings sind diese synthetischen Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten im millimolaren Bereich wesentlich weniger effektiv als die natürlichen Inhibitoren, die  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich aufweisen.

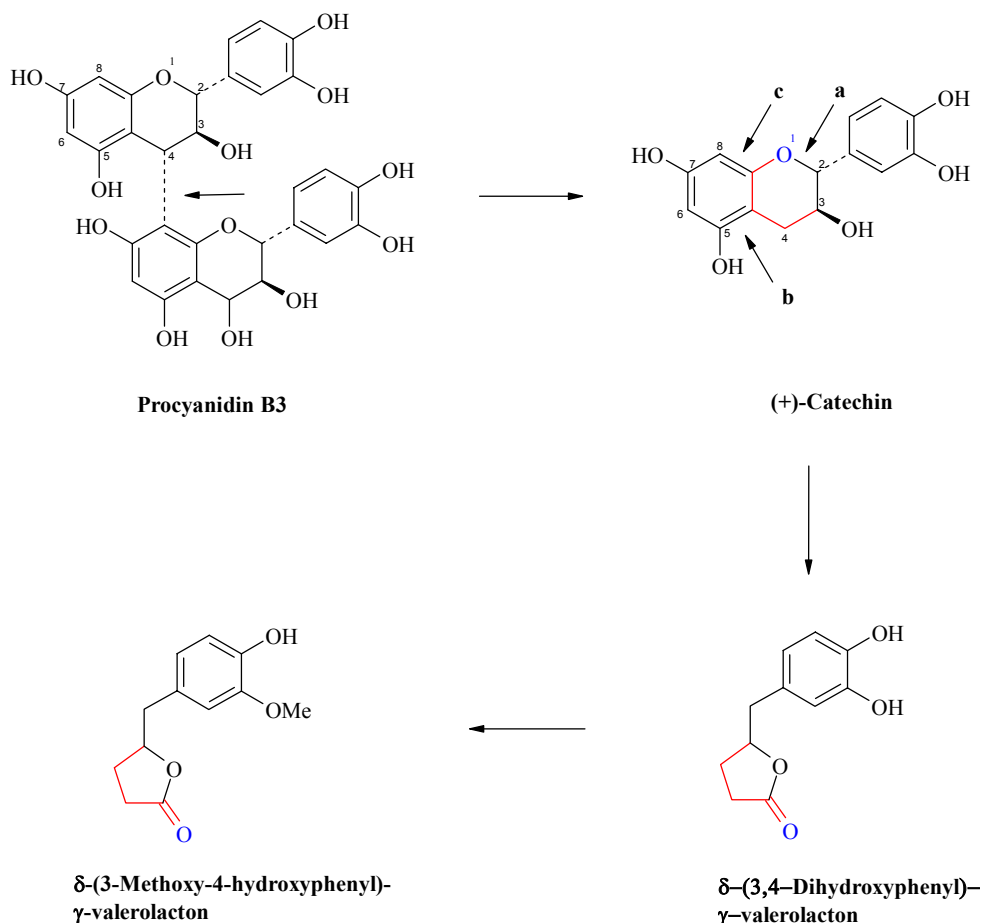
## **2.8 Hemmung von MMPs durch Pycnogenol und seine Metabolite**

Für den Pycnogenol-Extrakt und seine Metabolite sind anti-entzündliche Wirkungen sowohl in der Zellkultur, als auch am Menschen und am Tier beschrieben, auf molekularer Ebene aber nur teilweise aufgeklärt worden. So hemmte der Gesamtextrakt im Zellkulturmodell mit Endothelzellen oder Keratinocyten die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, dem Schlüsselmolekül im Entzündungsgeschehen, und weiterhin die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 oder VCAM-1 [51, 52]. In Versuchen mit Nagetieren wurde die inflammatorische Antwort im Ohrödemmodell nach Pycnogenol-Einnahme reduziert [9]. In Studien mit Asthmapatienten wurde nach Extrakt-Einnahme eine Reduktion der zirkulierenden Leukotrienkonzentrationen und eine Verbesserung der Symptomatik festgestellt [15].

Da MMPs im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle spielen (Allgemeiner Teil 2.6) sollte in den vorliegenden Untersuchungen eine Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität am isolierten Enzym durchgeführt werden. Dazu wurde der Abbau der als Substrate dienenden Proteine Collagen, Elastin und Gelatine durch Matrixmetalloproteinasen mit dem Gesamtextrakt Pycnogenol und mit einigen seiner monomeren Inhaltsstoffe untersucht. Weiterhin sollten die Metabolite  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, die aus dem Abbau von im Extrakt enthaltenen Procyanidinen bzw. Catechinen nach peroraler Gabe im Menschen entstehen, auf ihre Hemmwirkung getestet werden [53, 54].

Die Biotransformation der Catechine erfolgt durch Mikroorganismen des menschlichen Intestinaltraktes [53]. Bei der Metabolisierung von Procyanidin B3 im Körper nach oraler Procyanidin-Aufnahme (Abbildung 8) erfolgt zunächst wahrscheinlich die reduktive Spaltung der Bindung zwischen C-4 und C-8 der Catechineinheit mit Bildung

von freiem (+)-Catechin [55]. Danach sind drei verschiedene Spaltungen möglich. Die Esterspaltung in Position a zwischen C-1 und C-2 des Pyronrings, in Position b zwischen C-4a und C-5 des A-Ringes und in Position c zwischen C-8 und C-8a des A-Ringes. Daraufhin findet die Cyclisierung zum Valerolacton statt.  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton wird vermutlich aus  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton durch Methylierung gebildet. Nach Große Düweler werden im Körper die Metabolite an Glucuronsäure und/oder an Sulfat konjugiert, da im Urin keine freien Valerolactone nachzuweisen waren [54].



**Abbildung 8: Abbauweg der Procyanidine beim Menschen am Beispiel von Procyanidin B3 [54]. Die aus der Spaltung von (+)-Catechin hervorgegangenen Bereiche sind bei beiden Metaboliten farbig markiert. Die Pfeile kennzeichnen die Spaltungsstellen des Moleküls.**

## 2.9 Methoden zur Untersuchung der Hemmung der Enzymaktivität von MMPs

Um die Aktivität von MMPs bestimmen zu können, macht man sich verschiedene Techniken, wie Zymographie, Fluorimetrie oder photometrische Bestimmung nach Umsetzung mit einem Chromophor, zunutze.

Zymographie beinhaltet eine elektrophoretische Trennung von proteolytischen Proteinen wie MMPs unter denaturierenden (mittels Natriumdodecylsulfat, SDS), jedoch nichtreduzierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamidgel, welches zusätzlich Gelatine enthält [56]. Die aufgetrennten Proteine werden renaturiert, indem SDS gegen ein nichtionisches Detergens ausgetauscht wird. Anschließend wird in einem Puffer, der auf das pH-Optimum der jeweiligen Proteinase abgestimmt ist, inkubiert. Das Gel wird danach mit Coomassie Blau gefärbt und die proteolytischen Aktivitäten sind als klare Banden gegen einen blauen Hintergrund von nicht-degradierter Gelatine sichtbar [57]. Dabei hängt die Intensität der Banden vom Grad der Degradierung der Gelatine durch die MMPs ab. Proben, die vor der Elektrophorese mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert wurden, zeigen einen geringeren Verdau der Gelatine und damit weniger intensive Banden [57].

Bei der Fluorimetrie werden die unterschiedlichen Enzyme mit geeigneten fluoreszenzmarkierten Substraten gemischt und in An- und Abwesenheit von Enzyminhibitoren fluorimetrisch vermessen. Der Grad der Proteolyse der Substrate, bedingt durch die Degradierung durch MMPs, wird durch einen Anstieg der Fluoreszenz festgestellt.

Alternativ kann die Hemmung der Enzymaktivität am isolierten Enzym mittels eines kolorimetrischen Mikroassays mit anschließender UV-Messung bestimmt werden [58-60]. Durch die teilweise Zerstörung der Substratstrukturen unter MMP-Einwirkung steigt die Anzahl freier Aminogruppen im Vergleich zu den intakten, vor Versuchsbeginn succinylierten Proteinen an. Die Succinylierung der Substrate blockiert freie Aminogruppen und hält so die Hintergrundwerte der Proteine bei der UV/VIS-Spektroskopie niedrig. Die im Versuchsverlauf durch MMP-Einwirkung freigewordenen Aminogruppen reagieren nach Zusatz von Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA) über eine Kondensationsreaktion zu dem chromophoren Produkt Trinitrophenylamin, welches photometrisch bei 450 nm bestimmt werden kann (Abbildung 9).

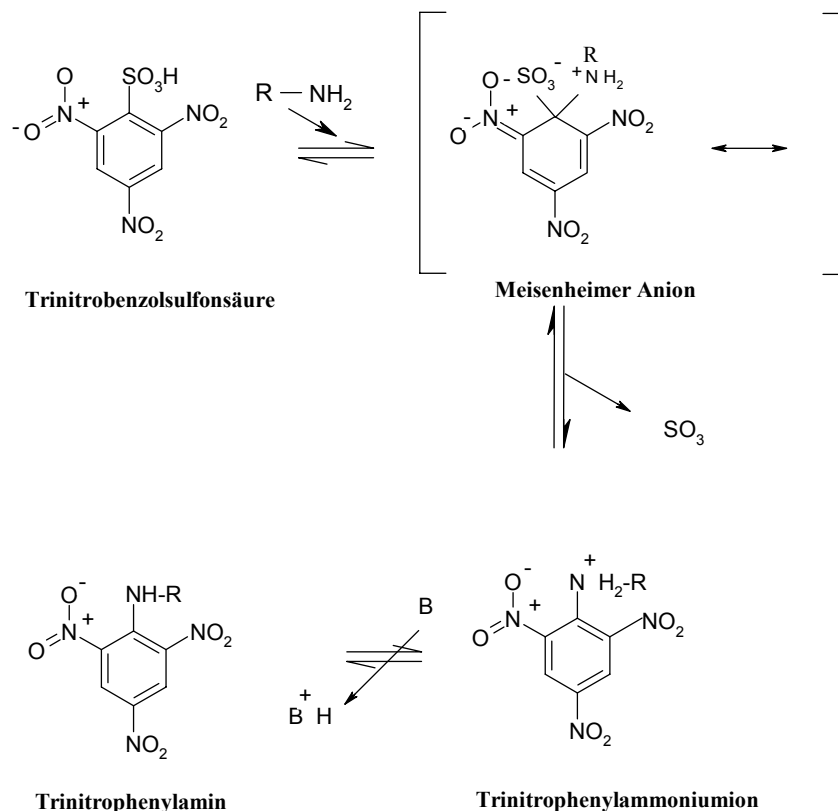


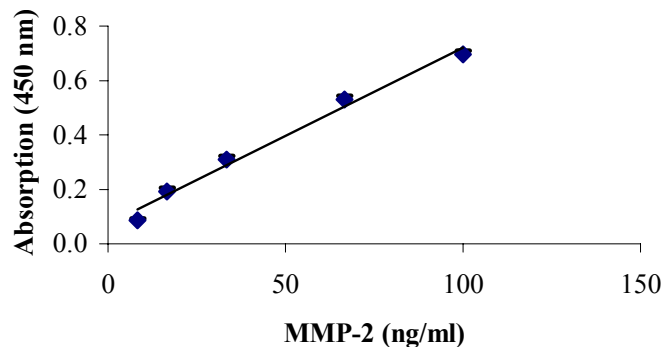
Abbildung 9: Reaktion von primären Aminen mit TNBSA zu dem chromophoren Produkt Trinitrophenylamin [61].

Je höher die resultierende Absorption, desto höher ist der Grad der Protein-Degradierung. Durch den Einsatz von steigenden Inhibitorkonzentrationen wird die Enzymaktivität von Matrixmetalloproteinasen gesenkt. Dies bringt eine geringere Degradierung der Proteinstrukturen und damit eine fallende Absorption, bedingt durch die sinkende Anzahl an freien Aminogruppen, mit sich [58].

In der vorliegenden Untersuchung wurde diese kolorimetrische Bestimmung gewählt, da sie eine schnelle, zuverlässige und einfache Methode darstellt, die durch Verwendung einer 96-Lochplatte das Messen vieler Proben zur gleichen Zeit ermöglicht.

Für die Bestimmung der einzusetzenden MMP-Konzentration wurde zunächst eine gleichbleibende Konzentration an succinyliertem Substrat mit steigenden MMP-Konzentrationen inkubiert. Es konnte ein linearer Zusammenhang ( $r = 0,9930$ ) zwischen MMP-Konzentration und steigender Substratdegradierung festgestellt werden (Abbildung 10). Die für die nachfolgenden Hemmversuche eingesetzte MMP-Konzentration wurde auf 25,0 ng/300 µl pro Versuch, entsprechend 83,3 ng/ml, festgelegt (Aktivitäten siehe

Experimenteller Teil 2.6), woraus für den ungehemmten Versuchsansatz eine Absorption von etwa 0,6 resultierte.

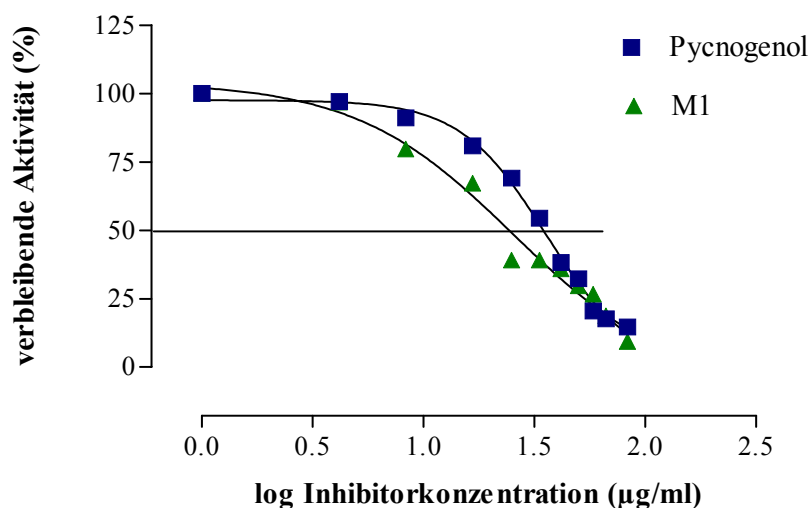


**Abbildung 10: Linearität der Degradierung von 666,7 µg/ml succinyliertem Elastin mit steigenden Konzentrationen an MMP-2. Dargestellt sind die Mittelwerte, berechnet aus drei Messungen und die Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA).**

Als Matrixmetalloproteinasen wurden MMP-1 (Collagenase 1), MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) verwendet, da sie pathophysiologisch interessant sind (Tabelle 1). Die eingesetzten Substrate der MMPs waren die Proteine Collagen und Elastin als Vertreter der Extrazellulärmatrix und der elastischen Gewebe und Gelatine als Hydrolyseprodukt des Collagens. Als Positivkontrollen wurden TIMP-1 für MMP-1 und Captopril für MMP-2 und für MMP-9 eingesetzt, da durch andere Untersuchungen bereits deren Hemmwirkung auf die jeweiligen MMPs gezeigt wurde [44, 50].

Die zu untersuchenden Inhibitoren waren neben Pycnogenol die Bestandteile des Extraktes Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin und die beiden Metabolite  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, im Folgenden als M1 bezeichnet und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, im Folgenden als M2 bezeichnet.

Der Kurvenverlauf der Hemmung von MMP-9 durch M1 und Pycnogenol mit dem Substrat Collagen entspricht einer sigmoiden Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abbildung 11). Die Effektivität des jeweiligen Inhibitors wird durch die Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration, der Konzentration, bei der 50 % des Enzyms gehemmt wird, ermittelt (Experimenteller Teil 2.6).



**Abbildung 11: Hemmkurven von MMP-9 (83,3 ng/ml) mit unterschiedlichen Inhibitoren; Substrat: succinyliertes Collagen (666,7 µg/ml). Die Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression berechnet. Die mittlere Hemmkonzentration (50 % verbleibende Aktivität) ist durch eine Linie dargestellt.**

Die Hemmkonzentration lag hier für M1 mit 25,61 µg/ml (Güte der Anpassung:  $r = 0,9909$ ) etwas unter der von Pycnogenol mit 35,64 µg/ml (Güte der Anpassung:  $r = 0,9833$ ). Der Metabolit ist somit auf einer µg/ml-Basis der effektivere Inhibitor, was sich in den anschließenden Untersuchungen mit anderen MMPs bestätigen sollte.

Im Folgenden sollen die Hemmwirkungen der einzelnen Inhibitoren auf die jeweiligen Matrixmetalloproteinasen gezeigt und so ein vergleichender Überblick über die Effektivitäten der Inhibitoren gegeben werden.

## 2.10 Hemmung der Aktivität von MMP-1

Es sollte untersucht werden, ob der Gesamtextrakt Pycnogenol, die Inhaltsstoffe Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, sowie seine Metabolite, MMP-1, welches in der Pathophysiologie der Rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielt, *in vitro* hemmen. Als Substrate von MMP-1 wurden Collagen als Vertreter der Strukturproteine und Bestandteil der Synovialmatrix und Gelatine als Hydrolyseprodukt von Collagen gewählt.

Es fand eine Hemmung von MMP-1 sowohl durch die Metabolite (Tabelle 2) als auch durch den Gesamtextrakt (Abbildung 12) statt. Die Metabolite waren dabei annähernd gleich potent, wobei die Hemmkonzentrationen mit dem Substrat Gelatine niedriger lagen als mit Collagen (Tabelle 2).



**Tabelle 2: Hemmung der Aktivität von MMP-1: Mittlere IC<sub>50</sub>-Werte und Standardabweichungen der Inhibitoren TIMP-1, M1 und M2, ermittelt aus jeweils sechs Versuchen.**

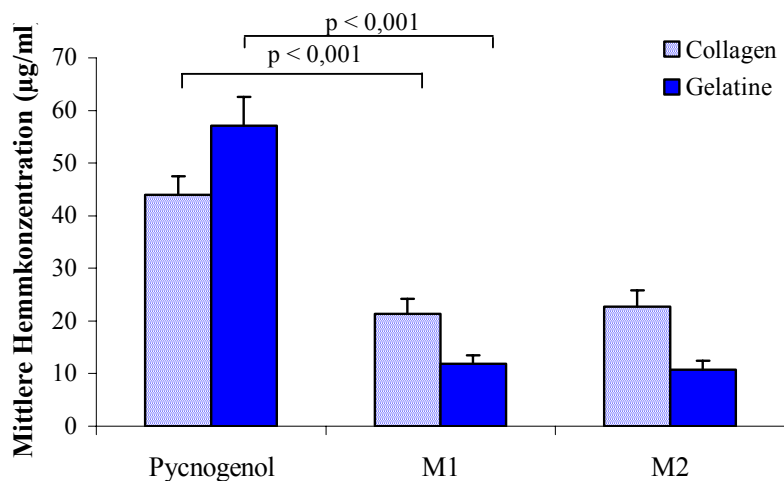
<i>Substrat</i>	<i>M 1</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>M 2</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>TIMP-1</i> [ $\text{nmol/l}$ ]
Collagen	108 ± 13,6	104 ± 13,8	4,0 ± 0,5
Gelatine	45,2 ± 7,3	48,0 ± 7,5	2,2 ± 0,3

Der Gesamtextrakt war auf einer  $\mu\text{g/ml}$ -Basis weniger wirksam als seine Metabolite. So hemmte Pycnogenol mit 57,10  $\mu\text{g/ml}$  (Gelatine) bzw. 43,91  $\mu\text{g/ml}$  (Collagen) die Aktivität von MMP-1 im Vergleich zu den beiden Metaboliten M1 und M2 (10,79  $\mu\text{g/ml}$  bis 22,71  $\mu\text{g/ml}$ ) nur halb so stark (Abbildung 12). Die Hemmung durch Pycnogenol war signifikant geringer als die durch M1 und durch M2 ( $p < 0,001$ ) hervorgerufene. Die Aktivitätshemmung von MMP-1 durch die beiden Metabolite untereinander wies dagegen keine signifikanten Unterschiede auf.

Der natürliche Inhibitor TIMP-1, der hier als Positivkontrolle diente, war, verglichen mit den Metaboliten, jeweils ungefähr um den Faktor  $2 \cdot 10^4$  effektiver in der Hemmung von MMP-1 (Tabelle 2). Damit war TIMP-1 mit IC<sub>50</sub>-Werten im nanomolaren Bereich erwartungsgemäß der potenteste der getesteten Inhibitoren [34]. Diese Ergebnisse von TIMP-1 liegen in der Größenordnung des von Owen et al. gefundenen IC<sub>50</sub>-Wertes von 19,5 nM [34].

Die Extraktkomponenten Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin wiesen keine hemmende Aktivität gegenüber den Matrixmetalloproteinasen auf. Dies ist insofern bemerkenswert, da (+)-Catechin als metabolische Vorläufersubstanz der beiden Metabolite gilt [54]. Dennoch zeigten die vorliegenden Untersuchungen, dass nur der Gesamtextrakt sowie die Metabolite die Aktivität der ausgewählten MMPs zu hemmen vermochten. Eine mögliche Erklärung der fehlenden Inhibition durch Catechine und Kaffeesäure wären die eingesetzten Konzentrationen, die im Bereich von 1,67 – 30  $\mu\text{g/ml}$  gewählt wurden. Es wäre denkbar, dass dieser Konzentrationsbereich zu niedrig war, da die Extraktbestandteile keine potenten Inhibitoren darstellen. Eventuell würden höhere Konzentrationen, die *in vivo* jedoch nur schwer zu erreichen wären, ebenfalls eine Hemmung der

Matrixmetalloproteinasen bewirken. Weiterhin könnte man annehmen, dass die Struktur von Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin keine optimalen Bedingungen für die Bindung darstellt.



**Abbildung 12: Mittlere Hemmkonzentrationen mit Standardabweichungen von MMP-1 mit Inhibitoren Pycnogenol, M1 und M2, berechnet aus mindestens sechs Versuchen je Substrat. Statistisch signifikante Unterschiede sind nur in Bezug auf M1 dargestellt (ANOVA mit Tukey's Test).**

Kuttan et al. postulierten, dass die Bindung von (+)-Catechin, dem monomeren Hauptbestandteil des Pycnogenol-Extraktes, an Collagen dieses vor enzymatischem Abbau durch Collagenasen schützt [62]. Dazu wurden zum einen bakterielle Collagenase aus *Clostridium histolyticum* und zum anderen eine humane Collagenase, gewonnen aus Fibroblasten, verwendet. Nur die humane Collagenase konnte durch Inkubation von Collagen mit (+)-Catechin gehemmt werden, nicht jedoch die bakterielle. Dies wurde damit erklärt, dass weniger eine Konformationsänderung der Enzyme, sondern vielmehr der Schutz des Substrates Collagen durch Vorinkubation und damit durch Bindung an (+)-Catechin als Wirkmechanismus für eine Hemmung angenommen wurde. In der vorliegenden Arbeit hemmte (+)-Catechin nicht die Matrixmetalloproteinasen, was folglich nicht mit den von Kuttan et al. gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. Allerdings wurden bei Kuttan et al höhere Konzentrationen an (+)-Catechin eingesetzt (0,01 – 0,1 mM) und die Inkubationszeit des Substrates mit dem Inhibitor war mit 12 Stunden wesentlich länger als die in der vorliegenden Arbeit gewählte.

## 2.11 Hemmung der Aktivität von MMP-2

MMP-2 ist in Tumorgeweben und bei pulmonaler Fibrose erhöht (Allgemeiner Teil 2.5). Es sollten die Hemmeigenschaften von Pycnogenol, seiner Inhaltsstoffe Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin und von seinen Metaboliten auf MMP-2 untersucht werden. Als Substrate von MMP-2 wurden Collagen und Elastin, beides Strukturproteine und Vertreter der Extrazellulärmatrix, eingesetzt.

Es fand wiederum eine Hemmung von MMP-2 sowohl durch die Metabolite (Tabelle 3) als auch durch den Gesamtextrakt (Abbildung 13) statt. Die Metabolite waren annähernd gleich potent, wobei die Hemmkonzentrationen mit dem Substrat Elastin niedriger lagen als mit Collagen. Der Gesamtextrakt erwies sich im Vergleich zu den Metaboliten auf einer  $\mu\text{g/ml}$ -Basis erneut als weniger wirksam. Alle getesteten Inhibitoren waren jedoch deutlich effektiver als die Positivkontrolle Captopril. Die beiden Metabolite erwiesen sich überraschenderweise als ungefähr 100-fach stärkere Inhibitoren von MMP-2 als Captopril (Tabelle 3). Da die Hemmwirkung von Captopril gegenüber MMPs für dessen klinisch relevante und erwünschte „Nebenwirkungen“, wie nephroprotektive Effekte, verantwortlich gemacht wird, ist es umso erstaunlicher, dass die beiden Metabolite in noch kleineren Konzentrationen wirksam sind.

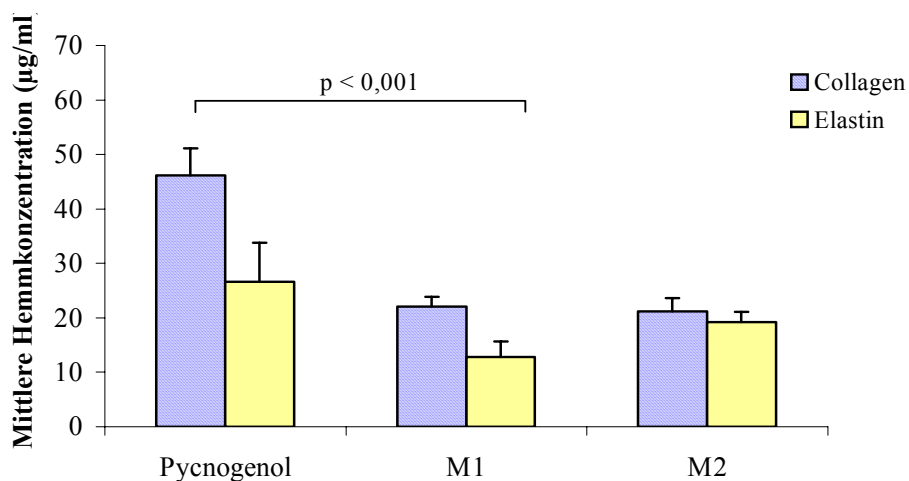
**Tabelle 3: Hemmung der Aktivität von MMP-2: Mittlere  $\text{IC}_{50}$ -Werte und Standardabweichungen der Inhibitoren Captopril, M1 und M2, ermittelt aus jeweils sechs Versuchen.**

<i>Substrat</i>	<i>M 1</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>M 2</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>Captopril</i> [ $\text{mmol/l}$ ]
Collagen	$106 \pm 8,2$	$95,1 \pm 8,4$	$8,4 \pm 1,6$
Elastin	$61,8 \pm 13,4$	$86,5 \pm 8,7$	$6,9 \pm 1,3$

Die Metabolite zeigten je nach Substrat bei einer Konzentration von  $12,85 \mu\text{g/ml}$  (M1, Elastin) bis  $22,11 \mu\text{g/ml}$  (M1, Collagen) eine 50 %ige Hemmung von MMP-2 (Abbildung 13). Die erforderliche Konzentration des Pycnogenols lag beim Substrat Collagen mit  $46,19 \mu\text{g/ml}$  im Mittel fast um das Doppelte höher als beim Substrat Elastin. Verglichen mit den Metaboliten wies Pycnogenol mit dem Substrat Collagen ebenfalls nur die Hälfte der Inhibitoreffektivität auf. Die Metabolite waren im Vergleich zu Pycnogenol, außer bei

Pycnogenol-M2-Elastin, alle signifikant potenter ( $p < 0,001$ , Tabellarischer Anhang 1.3.2). Die Metabolite untereinander zeigten erneut keine signifikanten Unterschiede.

Ebenso wie bei MMP-1 wiesen die Extraktbestandteile Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin keine hemmende Aktivität gegenüber MMP-2 auf.



**Abbildung 13: Mittlere Hemmkonzentrationen mit Standardabweichungen von MMP-2 mit Inhibitoren Pycnogenol, M1 und M2, berechnet aus mindestens sechs Versuchen je Substrat. Statistisch signifikante Unterschiede sind nur in Bezug auf M1 dargestellt (ANOVA mit Tukey's Test).**

Prontera et al. bestimmten die Hemmkonzentration von MMP-2 durch Captopril mittels Zymographie, wobei als Substrat Gelatine verwendet wurde. Sie zeigten, dass eine Verminderung der MMP-2-Aktivität bei Konzentrationen um  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/l erfolgt. Die Konzentration, die für eine komplette Hemmung der MMP-2-Aktivität nötig war, betrug  $2,0 \cdot 10^{-2}$  mol/l [63]. Diese Bezugswerte befinden sich im Bereich der in den vorliegenden Untersuchungen gefundenen Werte. Somit liegen die in der eigenen Untersuchung bestimmten Hemmkonzentrationen für Captopril in guter Übereinstimmung mit den publizierten Werten.

## 2.12 Hemmung der Aktivität von MMP-9

MMP-9 ist in erhöhten Konzentrationen bei Osteoarthritis und bei Asthma bronchiale zu finden (Allgemeiner Teil 2.5). Bei Asthmapatienten konnte gezeigt werden, dass durch eine Pycnogenol-Therapie die Symptome verbessert wurden [15]. Im Folgenden sollten die Hemmwirkungen von Pycnogenol, Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, sowie von den Metaboliten auf MMP-9 untersucht werden.

Wie schon für MMP-1 und MMP-2 festgestellt, fand auch eine Hemmung von MMP-9 durch die Metabolite (Tabelle 4) und durch den Gesamtextrakt (Abbildung 14) statt. Die Metabolite wiesen hier in ihrer Effektivität größere Unterschiede auf als bei den anderen beiden MMPs, waren jedoch erneut im Vergleich zum Gesamtextrakt auf einer  $\mu\text{g/ml}$ -Basis wirksamer in ihrer Hemmung von MMP-9.

Im Vergleich zur Positivkontrolle Captopril waren die Metabolite 100-500 fach potenter in der Hemmung von MMP-9 (Tabelle 4). Von Captopril wurden hier noch etwas höhere Konzentrationen zum Erreichen der  $\text{IC}_{50}$  benötigt als bei MMP-2, so dass diese Substanz insgesamt als der schwächste der eingesetzten Inhibitoren anzusehen ist.

**Tabelle 4: Hemmung der Aktivität von MMP-9: Mittlere  $\text{IC}_{50}$ -Werte und Standardabweichungen der Inhibitoren Captopril, M1 und M2, ermittelt aus jeweils sechs Versuchen.**

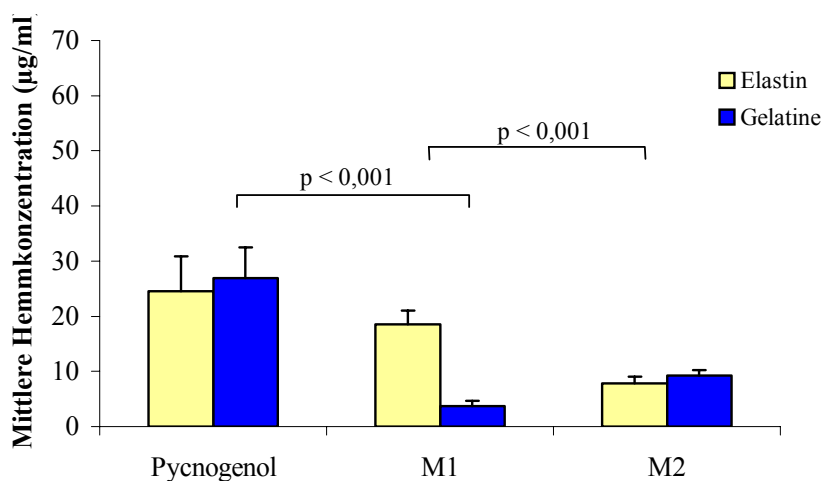
<i>Substrat</i>	<i>M 1</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>M 2</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>Captopril</i> [ $\text{mmol/l}$ ]
Gelatine	17,7 $\pm$ 4,4	41,9 $\pm$ 4,1	10,5 $\pm$ 1,3
Elastin	89,0 $\pm$ 12,4	35,3 $\pm$ 5,2	9,6 $\pm$ 1,1

Die beiden Metabolite hatten mittlere Hemmkonzentrationen jeweils im Bereich von 3,69  $\mu\text{g/ml}$  (M1, Gelatine) bis 18,52  $\mu\text{g/ml}$  (M1, Elastin) und lagen dabei in ihrer Effektivität mit 24,50  $\mu\text{g/ml}$  (Elastin) bzw. 26,98  $\mu\text{g/ml}$  (Gelatine) wieder etwas über dem Gesamtextrakt (Abbildung 14). Beim Substrat Elastin waren die mittleren Hemmkonzentrationen signifikant höher ( $p < 0,001$ ) als bei M2. Bei Gelatine hingegen waren die mittleren Hemmkonzentrationen bei M1 geringer, wobei die Abweichungen

nicht signifikant waren. Pycnogenol war beim Substrat Gelatine im Vergleich zu M1 signifikant schwächer ( $p < 0,001$ ) in der Wirkung gegenüber MMP-9. Beim Substrat Elastin war die Wirkung gegenüber MMP-9 zwar auch schwächer, jedoch nicht signifikant.

Die Extraktbestandteile Kaffeesäure, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin übten erneut keine Hemmwirkung auf MMP-9 aus.

Prontera et al. bestimmten in ihrer Arbeit zusätzlich zur Hemmung von MMP-2 durch Captopril auch die Hemmung von MMP-9 durch Captopril. Sie zeigten auch hier, dass eine Verminderung der MMP-9-Aktivität bei Konzentrationen um  $1,0 \cdot 10^{-2}$  mol/l erfolgt. Die Konzentration, die für eine komplette Hemmung der MMP-9-Aktivität nötig war, betrug  $2,0 \cdot 10^{-2}$  mol/l [63]. Diese Bezugswerte liegen erneut im Bereich der in den vorliegenden Untersuchungen gefundenen Werte und bestätigen damit die Eignung unserer Methode.



**Abbildung 14: Mittlere Hemmkonzentrationen mit Standardabweichungen von MMP-9 mit Inhibitoren Pycnogenol, M1 und M2, berechnet aus mindestens sechs Versuchen je Substrat. Statistisch signifikante Unterschiede sind nur in Bezug auf M1 dargestellt (ANOVA mit Tukey's Test).**

### 2.13 Hemmung von MMPs durch Pflanzenextrakte/ -bestandteile

Es konnte für Pycnogenol und für seine Metabolite M1 und M2 eine Hemmwirkung auf die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-2 und MMP-9 *in vitro* gezeigt werden. Dabei lagen die Hemmkonzentrationen für Pycnogenol immer etwas über denen der Metabolite. Dies bedeutet, dass diese auf einer µg/ml-Basis die besseren MMP-Inhibitoren darstellen. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen im Bereich von  $1,77 \cdot 10^{-5}$  mol/l (MMP-9, M1, Gelatine) bis  $1,08 \cdot 10^{-4}$  mol/l (MMP-1, M1, Collagen) und somit deutlich über den Werten des

natürlichen Inhibitors TIMP-1 ( $2,15 \cdot 10^{-9}$  mol/l bis  $4,02 \cdot 10^{-9}$  mol/l). Die zweite Positivkontrolle Captopril, die für MMP-2 und MMP-9 herangezogen wurde, war der am wenigsten potente der eingesetzten Inhibitoren mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen  $6,93 \cdot 10^{-3}$  mol/l (MMP-2, Elastin) und  $1,05 \cdot 10^{-2}$  mol/l (MMP-9, Gelatine).

Ein Vergleich der drei Matrixmetalloproteinasen untereinander (Abbildung 12-13) zeigt, dass der Inhibitor Pycnogenol in Bezug auf MMP-1 am wenigsten wirksam war, da die höchsten Inhibitorkonzentrationen zur Hemmung von 50 % der MMP-Aktivität benötigt wurden. Zur Inhibition von MMP-9 war die niedrigste Pycnogenol-Konzentration nötig. Für die beiden Metaboliten wurde diese Tendenz bestätigt, da für MMP-9 die niedrigsten Konzentrationen (außer M1, Elastin) zur 50 %igen Hemmung erforderlich waren. Somit ist MMP-9 die durch den Extrakt und seine Metaboliten am besten hemmbare Matrixmetalloprotease und wurde aus diesem Grund für weitere Versuche (Allgemeiner Teil 3) eingesetzt.

Sartor et al. stellten durch Untersuchungen der Hemmwirkung verschiedener Polyphenole auf MMP-2 und MMP-9 fest, dass bestimmte strukturelle Voraussetzungen, wie die Anwesenheit von Hydroxylgruppen an den Ringen A und B des Flavongrundgerüsts, die Doppelbindung zwischen C-Atom 2 und 3, sowie eine Galloyleinheit essentiell für inhibitorische Effekte sind [64]. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Metabolite M1 und M2 besitzen zwei, respektive eine Hydroxygruppe, die Komplexität des Flavongrundgerüsts ist jedoch durch den vorherigen metabolischen Abbau nicht mehr gegeben. Sartor et al. zeigten, dass Epigallocatechin-3-gallat, Epigallocatechin und Epicatechingallat, alles Bestandteile von Grünem Tee, in der Lage sind, MMP-2 und MMP-9 mit unterschiedlichen Effektivitäten zu hemmen ( $IC_{50}$  0,4 - 450  $\mu$ M). Epicatechin konnte auch hier keine der Matrixmetalloproteinasen hemmen, was im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen steht. Die  $IC_{50}$ -Werte für die unterschiedlichen Polyphenole liegen im Bereich der hier gefundenen  $IC_{50}$ -Werte für die beiden Pycnogenol-Metaboliten M1 (3,69 bis 22,11  $\mu$ g/ml) und M2 (7,85 bis 22,71  $\mu$ g/ml).

Demeule et al. [65] untersuchten mithilfe der Fluorimetrie die Effekte von Grünem Tee bzw. dessen Bestandteilen auf die Aktivitäten von MMP-2, MMP-9 und MMP-12. Der untersuchte Extrakt von Grünem Tee, der zu 85 % aus Polyphenolen besteht, enthält (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Gallocatechin, Epigallocatechin, Epicatechingallat, Gallocatechingallat und Epigallocatechingallat, wobei die beschriebene Reihenfolge die

prozentualen Anteile nach steigender Größe aufzeigt. Catechin und Epicatechin konnten auch hier die Aktivitäten von MMP-2 und MMP-9 nicht hemmen, was mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. Grüntee polyphenole hemmten MMP-2 in einer mittleren Hemmkonzentration von 10 µg/ml und MMP-9 wurde mit 0,6 µg/ml gehemmt. Damit war für MMP-9 die niedrigste Hemmkonzentration erforderlich, was ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Weiterhin liegen die mittleren Hemmkonzentrationen erneut im Bereich der hier gefundenen Werte.

In Arbeiten von Tanimura et al. wurde der Hemmeffekt von 15 hydrolysierbaren Gallotanninen auf invasive Tumorzellen untersucht [66]. Die gezeigte Hemmwirkung einiger Tannine auf die Invasion der Tumorzellen wurde unter anderem auf eine direkte Inhibition der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 zurückgeführt. Die erzielten IC<sub>50</sub>-Werte lagen je nach eingesetztem Tannin zwischen 80 µM für MMP-9 und 10 µM für MMP-2. Für die Hemmung von MMP-9 waren hier folglich höhere Konzentrationen als für die Hemmung von MMP-2 nötig. Dies weicht von den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen ab wonach MMP-9 die am leichtesten hemmbare Matrixmetalloproteinase ist. Diese Differenzen könnten auf die unterschiedlichen Effektivitäten der verschiedenen eingesetzten Inhibitoren zurückzuführen sein.



### 3 Mögliche Mechanismen der Hemmwirkung auf MMPs

Wie in den letzten Abschnitten dargestellt, konnte durch den Extrakt Pycnogenol sowie durch seine Metabolite eine Hemmwirkung auf bestimmte Matrixmetalloproteinasen erreicht werden. Um die möglichen Hemmmechanismen erklären zu können, werden im Folgenden verschiedene Ansatzpunkte, die im Allgemeinen Teil 2.7 erläutert wurden, wieder aufgegriffen.

Zum einen könnte ein Schutz des Substrates durch die Inhibitoren angenommen werden. Als weiterer Mechanismus könnte eine Hemmwirkung verschiedener Inhibitoren durch direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MMPs in Frage kommen. Eine dritte Möglichkeit wäre eine Bindung der Inhibitoren an das Enzym, allerdings nicht die bereits erwähnte Bindung an das aktive Zentrum, sondern an andere Domänen der Matrixmetalloproteinase. Es wurden im folgenden Teil der Arbeit Untersuchungen zu den aufgezählten möglichen Hemmmechanismen durchgeführt und diese zur Aufklärung der Wirkungsweise der einzelnen Inhibitoren herangezogen.

Ein Ansatzpunkt zur Erklärung der Hemmwirkung sind Procyanidin-Protein-Bindungen [67] (Allgemeiner Teil 3.1). Die im Extrakt enthaltenen Procyanidine könnten durch Bindung an die Proteinstrukturen der Substrate eine potentielle Schutzwirkung auf diese ausüben und so der Degradierung durch MMPs entgegenwirken. Um das Ausmaß der Bindungen von Pycnogenol und seinem Metaboliten M2 als Vergleich an Matrixproteine zu bestimmen, wurde eine modifizierte Variante der Hautpulvermethode des Schweizer Arzneibuchs Pharm Helv. VI verwendet (Allgemeiner Teil 3.1.2).

Auch eine andere Untersuchung zur Hemmwirkung von Procyanidinen auf Enzymaktivitäten zeigte, dass die Hemmung auf die Möglichkeit zur Bindung von Procyanidinen vor allem an prolinreiche Proteine zurückzuführen ist [68].

So wurde die Procyanidin-Proteinbindung als möglicher Mechanismus der Hemmwirkung von Pycnogenol auf Xanthinoxidase vermutet, was mittels UV-Spektroskopie und SDS-PAGE untersucht wurde [68]. Procyanidine binden an native Xanthinoxidase, einem dimeren molybdän- und eisenhaltigen Enzym, welches Oxidationsreaktionen von Purinen, Aldehyden und anderen heterocyclischen Verbindungen katalysiert, und sind demnach in der Lage, diese zu hemmen. Pycnogenol ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor von Xanthinoxidase und Xanthindehydrogenase, mit

Xanthin als Substrat. Die Hemmung der Enzymaktivität erfolgt aufgrund einer Bindung an den Enzym-Substrat-Komplex. Durch Untersuchungen der Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Xanthinoxidase unter dem Einfluss von Pycnogenol wurde gezeigt, dass der Gesamtextrakt an Xanthinoxidase bindet. Der Mechanismus der Inhibition von Xanthinoxidase durch Pycnogenol kann laut Moini et al. auf verschiedenen Wegen ablaufen. Zum einen kann, da Pycnogenol und Xanthinoxidase redoxaktiv sind, ein intramolekularer Elektronen-Transfer-Prozess ablaufen, der zur Hemmung der Xanthinoxidase führt. Zum anderen kann eine Bindung des Extraktes an das Enzym mit anschließender Konformationsänderung und Inhibition desselben erfolgen. Eine Kombination aus beiden Wegen wäre denkbar, wobei der letzte Mechanismus als der wahrscheinlichere gilt. Der Konzentrationsbereich, in dem der Pycnogenol-Gesamtextrakt die Aktivität von Xanthinoxidase und Xanthindehydrogenase hemmt, wurde von Moini et al. zwischen 10 und 100 µg/ml bestimmt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Pycnogenolkonzentrationen lagen im Mittel zwischen 26 und 58 µg/ml, je nach verwendeter Matrixmetalloproteinase.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Hemmwirkung ist, dass durch die phenolischen Hydroxygruppen der Procyanidine und der Metabolite, sowie durch die Lactonstruktur der Metabolite eine Chelatbildung mit dem katalytischen Zinkatom erfolgen könnte. Dies könnte eine Inaktivierung der MMPs nach sich ziehen.

Durch die Hydroxygruppen können weiterhin Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Carbonylsauerstoff der Aminosäuren Glutaminsäure (Glu219, Glu402) und Asparagin der MMPs angenommen werden, die ebenfalls zu einer Aktivitätsminderung führen.

Im Folgenden sollen nun die Untersuchungen zu den einzelnen Ansatzpunkten der Erklärung der Hemmwirkungen erläutert werden.

### **3.1 Schutz der Matrixproteine vor einem Abbau durch MMPs**

Es ist allgemein bekannt, dass Procyanidine an Proteine binden. Die Bindung von Procyanidinen an Hautpulver stellt im Europäischen Arzneibuch eine Methode zur Bestimmung des Gerbstoff- bzw. des Polyphenolgehaltes dar. Modifizierte Methoden sind in anderen Pharmakopöen, wie der Pharm. Helv. enthalten.

In der vorliegenden Untersuchung sollte einerseits das Bindungsverhalten des Procyanidin-Extraktes an Hautpulver und andererseits die Bindung an die einzelnen

Komponenten der Haut, Collagen und Elastin, bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Bindung des Metaboliten M2 an Hautpulver untersucht. Als Kontrolle diente Ovalbumin, das nicht zu den Strukturproteinen gezählt wird. Es sollte damit überprüft werden, ob der Mechanismus der MMP-Hemmung durch den Pycnogenol-Extrakt über eine Schutzwirkung des Substrates, verursacht durch Procyanidin-Protein-Bindungen, zu erklären ist.

### **3.1.1 Mechanismen der Bindung an Matrixproteine**

Die Bindung von Procyanidinen an Proteine erfolgt in erster Linie an prolinreiche Strukturen, ferner an die Aminosäuren Phenylalanin und Arginin. Die Bindung an prolinreiche Proteine ist abhängig vom Polymerisationsgrad und von der Anzahl der Hydroxy-Gruppen am aromatischen Ring. Der Polymerisationsgrad der Procyanidine hat dabei einen größeren Einfluss auf die Proteinbindung als die Anzahl der Hydroxy-Gruppen am aromatischen Ring [69]. Je größer und komplexer die Procyanidine sind, desto stärker ist die resultierende Bindung [70].

Die Wechselwirkungen bei Polyphenol-Protein-Bindungen sind in der Regel hydrophober Natur, wobei eine Bindung zwischen dem Arylring des Polyphenols und dem Pyrrolidinring des Prolins bevorzugt wird, wie von Feldman et al. anhand von <sup>1</sup>H-NMR-Messungen gezeigt wurde [71].

Mit Ausnahme der prolinreichen Proteine werden die relativen Affinitäten zudem durch die Proteingröße beeinflusst, da außer prolinreiche Proteine alle Proteine mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa niedrige Affinitäten zu Procyanidinen haben. Aufgrund der niedrigen Affinität von kleineren Proteinen zu Procyanidinen kann vermutet werden, dass bei den Procyanidin-Protein-Wechselwirkungen mehrere Bindungsseiten beteiligt sind, die mit steigender Proteingröße ebenfalls zunehmen. So sind Wasserstoffbrücken zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen der Procyanidine und den peptidischen Carbonylgruppen die stärksten Stabilisatoren der Procyanidin-Protein-Komplexe [72]. Dies könnte dafür sprechen, dass größere Proteinmoleküle mit helikaler, offener Anordnung, wie Collagen, bessere Möglichkeiten zur Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrücken haben und damit höhere Affinitäten zu Procyanidinen besitzen.

Die Matrixproteine Collagen und Elastin sind größtenteils in der Dermis lokalisiert. Die Haut enthält durchschnittlich 72 g Collagen und 0,6 g Elastin je 100 g Trockengewebe, womit Collagen den überwiegenden Bestandteil ausmacht [73]. Collagen hat ein

Molekulargewicht von ca. 300 kDa [70]. Mit einem Gesamtanteil von 22 % Prolin und Hydroxyprolin gehört Collagen zu den prolinreichen Proteinen. Der Carbonylsauerstoff von Prolin bewirkt eine sehr starke Elektronegativität, wodurch es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Strängen kommt. Elastin (Molekulargewicht 67 kDa), das Hauptprotein der elastischen Sehnen, Fasern, Bänder und Arterienwänden, besteht zu 11 % aus Prolin [74]. Der prozentuale Prolingehalt beträgt somit nur die Hälfte des in Collagen enthaltenen Prolins. Ovalbumin, ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa, enthält nur wenig Prolin.

### 3.1.2 Methode zur Bestimmung der Bindung

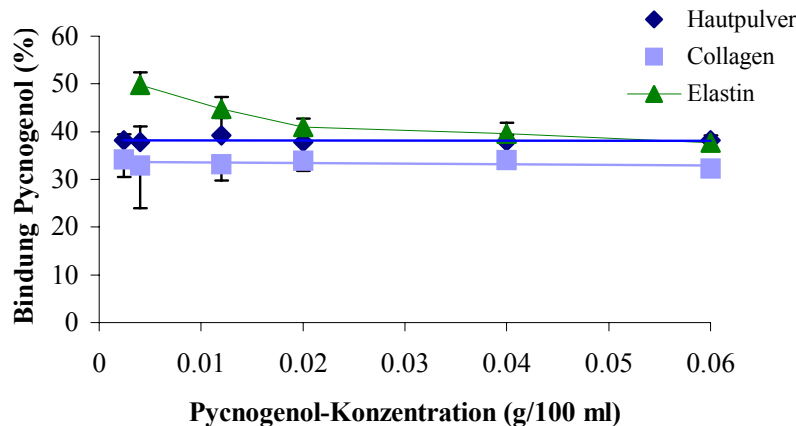
Zur quantitativen Bestimmung der Bindung der Polyphenole in Pycnogenol an Proteine wurde der wässrige Drogenextrakt mit Hautpulver eine definierte Zeit lang geschüttelt und der Gehalt an Polyphenolen vor und nach der Hautpulverbehandlung kolorimetrisch mit Phosphorwolframsäure bestimmt (Experimenteller Teil 2.1). Dabei wird die Phosphorwolframsäure ( $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_{12}\text{O}_{40})]$ ) durch die phenolischen Hydroxygruppen der Polyphenole zu Wolframblau ( $\text{WO}_2 \cdot n \text{WO}_3$ ) reduziert, welches photometrisch bei 691 nm vermessen wird. In Ergänzung der Methode wurde in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich zur Bindung an Hautpulver auch die Bindung an Collagen und an Elastin untersucht. Hierzu wurde jeweils für verschiedene Polyphenolkonzentrationen die Abhängigkeit der Bindung von Pycnogenol an die Matrixproteine untersucht (Abbildung 15).

Als Kontrolle diente zum einen die Bindung von M2 an Hautpulver. Damit sollte überprüft werden, ob ausschließlich Polyphenolstrukturen an Proteine binden und damit ein Schutz des Substrates postuliert werden kann. Als weitere Kontrolle wurde die Bindung des Extraktes an Ovalbumin, das kein Strukturprotein darstellt, durchgeführt.

Zunächst erfolgten die Messungen gemäß dem Europäischen Arzneibuch Ph. Eur. 2002, die den Standard Pyrogallol beinhalten. Da Pyrogallol – ein einfaches Trihydroxybenzol – nicht die Mehrheit der im Pycnogenol-Extrakt enthaltenen Polyphenole (Di-, Oligo- und v.a. Polymere) repräsentiert, wurde für die weiteren Untersuchungen die Verwendung dieses Standards als weniger geeignet erachtet.

Die Messungen wurden drei bis sechs Mal durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) bzw., bei weniger als sechs Messungen, die mittleren absoluten Abweichungen vom Mittelwert (MA) [75] dazu berechnet. Trägt man

die prozentuale Pycnogenol-Bindung an die jeweiligen Matrixproteine gegen die ansteigende Pycnogenol-Konzentration auf (Abbildung 15), so zeigt sich, dass mit steigenden Pycnogenol-Konzentrationen die Kurven weitgehend parallel verlaufen, wobei die Bindung an Hautpulver mit ca. 37 % etwas über der von Collagen mit etwa 33 % liegt.



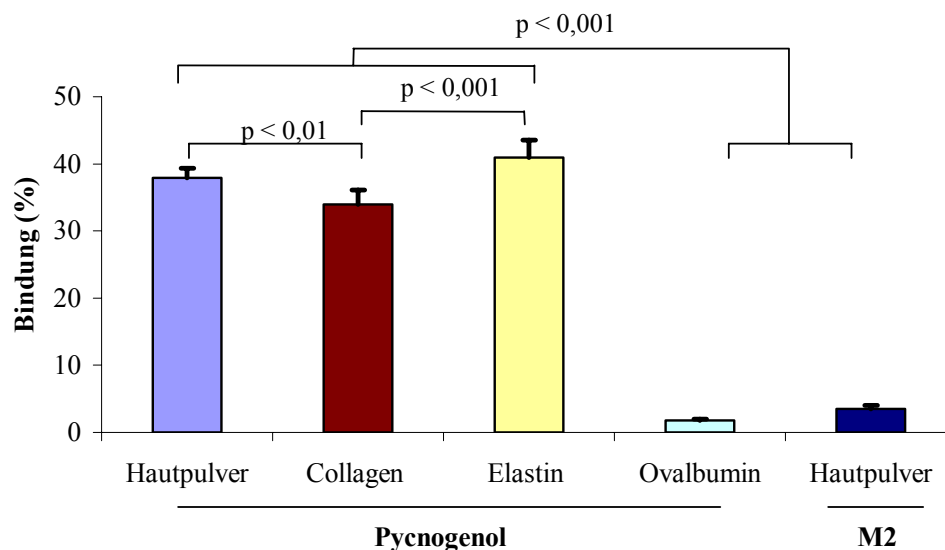
**Abbildung 15: Konzentrationsabhängiger Verlauf der Pycnogenol-Bindung an Matrixproteine. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Versuchen.**

An Elastin hingegen bindet Pycnogenol zunächst mit steigenden Konzentrationen immer weniger, was aus den initial kurvenförmig verlaufenden Messwerten ersichtlich ist. Ab einer Konzentration von 0,02 g/100,0 ml ist jedoch, wie bei Hautpulver und Collagen, nur noch wenig Änderung im Verlauf der Messung zu sehen, die Kurve geht in eine Gerade über. Dies könnte durch einen niedrigeren Prolingehalt von Elastin und durch Sättigungseffekte erklärt werden.

Für die vergleichende Darstellung der Affinität von Pycnogenol und M2 zu den verschiedenen Matrixproteinen bzw. zum Kontrollprotein Ovalbumin wurde eine mittlere Pycnogenol-Konzentration von 0,02 g/100,0 ml ausgewählt (Abbildung 16). Bei dieser Konzentration waren die Standardabweichungen bzw. die mittleren absoluten Abweichungen vom Mittelwert der Polyphenolbindungen kleiner als bei den geringeren Konzentrationen (Abbildung 15).

Die Bindung von Pycnogenol an Hautpulver betrug 37,9 %, an Collagen 33,9 % und an Elastin 41,0 % (Abbildung 16). Somit sind tendenzielle Unterschiede zu erkennen, die signifikant verschieden sind ( $p < 0,01$ ). Keine signifikanten Unterschiede wiesen hingegen die Bindungen von Pycnogenol an Ovalbumin und von M2 an Hautpulver auf. Die

Bindung von Pycnogenol an Ovalbumin war 1,80 % (MA = 0,16). Der Extrakt ging damit nur eine geringfügige Bindung zu Ovalbumin, welches nicht zu den Strukturproteinen zählt, ein. Durch die Kontrolle M2 (3,5 % Bindung an Hautpulver) konnte gezeigt werden, dass der Gesamtextrakt um das zehnfache besser an Matrixproteine bindet als der Metabolit (Abbildung 16). Somit wurde bestätigt, dass die Bindung von Procyanidinen an Proteine vom Polymerisationsgrad und von der Anzahl der Hydroxygruppen am Ring abhängig ist [69]. M2 zeigte als kleines Molekül mit nur einer Hydroxygruppe lediglich ein Zehntel des Ausmaßes der Bindung.



**Abbildung 16: Bindung von Pycnogenol und M2 (0,02 g/100,0 ml) an Matrixproteine und an Ovalbumin. Angegeben sind Mittelwerte und SD für Hautpulver, Collagen und Elastin aus sechs Messungen, sowie Mittelwert und MA für Ovalbumin aus drei Messungen.**

Diese Versuche haben gezeigt, dass durch die Bindung des Gesamtextraktes an Proteinstrukturen ein Schutz der Substrate vor Degradierung durch MMPs angenommen werden kann. Für M2 und in analoger Weise auch für M1 hingegen scheint ein anderer Hemmmechanismus verantwortlich zu sein, der im Folgenden noch genauer untersucht werden sollte.

### 3.1.3 Bindung von anderen Pflanzenextrakten an Proteine

Der Procyanidingehalt von Traubenkernextrakt, dessen antioxidative Wirkung seinem hohen Gehalt an Polyphenolen zugeschrieben wird, wird zwischen 40 und 50 % angegeben (Phytolab, Vestenbergsgreuth). Im Vergleich mit der hier gemessenen Bindung von

Pycnogenol an Hautpulver (37,9 %) weisen beide Extrakte somit ähnlich hohe Procyanidingehalte auf.

Die von Kottig [76] ebenfalls mittels Hautpulvermethode und ohne Verwendung des im Europäischen Arzneibuch angegebenen Standards untersuchte Nutzholzkiefer *Pinus lambertiana* liegt mit einem Polyphenolgehalt von 28,79 % jedoch um 10 % niedriger als die Meereskiefer *Pinus pinaster*.

Generell kann der Gehalt an Procyanidinen in der Rinde von Kiefern und auch in Traubenkernen laut Bagchi [77] in Abhängigkeit von der Herkunft und vom Extraktionsprozess variieren.

Eine weitere Methode zur Gerbstoffbestimmung ist die Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Trübungs-Methode, die ursprünglich im Brauereiwesen zur Analytik der in Gersten- und Hopfenextrakten enthaltenen Gerbstoffe eingesetzt wurde [78]. Dabei wird der Anteil an Polyphenolen, der mit PVP fällbar ist, durch Trübungsmessungen mit einem Nephelometer, welches die Intensität des durch die unlöslichen Verbindungen gestreuten Lichts erfasst, bestimmt. Die so erhaltenen Ergebnisse sind von den Parametern Messtemperatur und Dosiergeschwindigkeit, also der Geschwindigkeit, mit der die PVP-Lösung zu der Polyphenollösung gegeben wird, abhängig. Diese Methode erschien damit als zu störanfällig und wurde nicht angewandt.

Brunet et al. stellten durch Untersuchungen von Flavonoiden in Rotwein mittels SDS-PAGE fest, dass Procyanidine und Catechin an Plasmaproteine, z.B. an Apolipoprotein A-I (Apo A-I), binden und so im Blut transportiert werden [70]. Apo A-I ist das Hauptprotein des humanen Plasma-HDLs und ist möglicherweise besser für die Vorhersage von kardiovaskulären Ereignissen geeignet als das HDL-Cholesterol. Apo A-I aktiviert Lecithin:Cholesterolacyltransferase (LCAT) und ist daher für den reversen Cholesterin-Signalweg essentiell. Die Aktivierung von LCAT wird von der Konformation von Apo A-I beeinflusst, so dass eine Bindung von Procyanidinen an Apo A-I stimulierend auf LCAT wirken könnte. Die Bindung könnte als eine mögliche Ursache für die Senkung des Cholesterinspiegels nach Rotweingenuss angesehen werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Procyanidine unterschiedliche Affinitäten zu Proteinen besitzen, mit Präferenz für prolinreiche Proteine mit einem Molekulargewicht ab 20 kDa. Es konnte hier gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede bezüglich der prozentualen Bindungen von Pycnogenol an die Matrixproteine Collagen und Elastin und an Hautpulver vorhanden sind. Weiterhin ist die Bindung des Metaboliten M2 an

Hautpulver ebenfalls signifikant geringer als die Bindung von Pycnogenol an Matrixproteine.

### **3.2 Direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MMPs**

Versuche zur Wirkungsweise natürlicher und synthetischer MMP-Inhibitoren zeigten, dass die Wechselwirkung mit Zink von zentraler Bedeutung ist. So konnte durch Kristallstrukturuntersuchungen festgestellt werden, dass TIMPs als natürliche Inhibitoren der MMPs mit dem Zinkatom des aktiven Zentrums einen Chelatkomplex bilden und somit die Aktivität der MMPs hemmen [28, 41]. Die Entwicklung synthetischer Inhibitoren wie Hydroxamsäure-Inhibitoren zielte daher darauf ab, ebenfalls das Zinkatom im aktiven Zentrum zu chelatieren (Allgemeiner Teil 2.7). Die Kristallstruktur von MMP-9 im Komplex mit einem Hydroxamat-Inhibitor (Abbildung 6) zeigt, dass der Inhibitor tatsächlich am Zinkatom des aktiven Zentrums angreift.

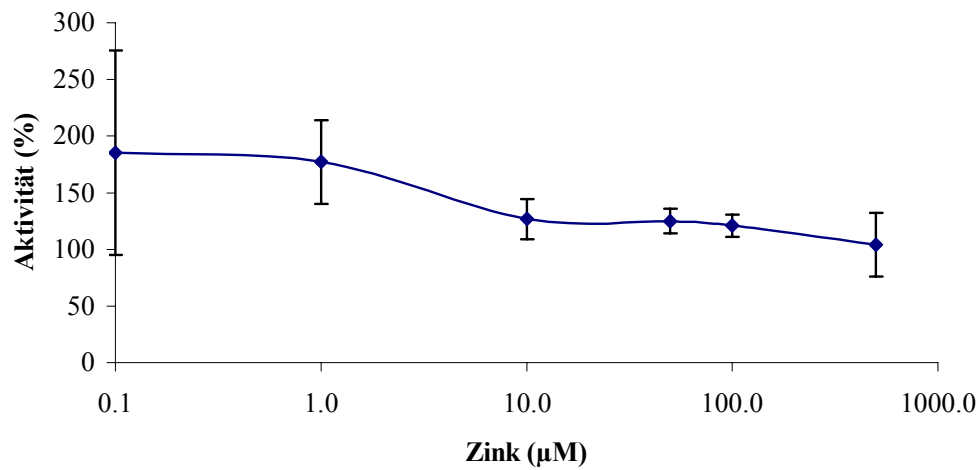
Allgemein ist, wie im Allgemeinen Teil 2.7 dargestellt, entweder eine zur Chelatisierung befähigte funktionelle Gruppe (Hydroxamsäure, Carboxylat-, Hydroxy- oder Thiolgruppe) oder eine peptidomimetische Struktur zur MMP-Hemmung erforderlich. Erfolgt eine Chelatbildung des Zinkatoms durch die funktionellen Gruppen, so wäre zu erwarten, dass diese Gruppen durch einen Überschuss an Zink in Lösung abgesättigt werden. Die Hemmung würde damit wieder rückgängig gemacht werden, da die Inhibitoren zunächst das Zink in Lösung chelatieren. Sorbi et al. führten Versuche mittels Zymographie durch und stellten fest, dass ein Zinkzusatz zwischen 50 und 100  $\mu\text{M}$  die durch 20 mM Captopril verursachte Hemmung von MMP-2 und MMP-9 aufhebt [50]. Sie schlossen daraus, dass die Wirkung von Captopril durch eine Chelatbildung mit dem Zinkatom des aktiven Zentrums zustande kommt. Um die Hemmmechanismen der Metabolite des Kiefernridenextraktes aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Versuche mit Zinkzusatz durchgeführt.

Es wurde zunächst der Einfluss von steigenden Zinkkonzentrationen auf die enzymatische Aktivität von MMP-9 mit dem Substrat Elastin untersucht (Abbildung 17). Bei niedrigen Zinkkonzentrationen (0,1  $\mu\text{M}$ ) war die Aktivität von MMP-9 mit 180 % im Vergleich zur Aktivität ohne Zink, die als 100 %-Wert angenommen wurde, höher. Möglicherweise kommt es hier zur Absättigung aller MMP-Moleküle mit dem essentiellen Zink und damit zu einer Aktivitätserhöhung. Mit zunehmender Zinkkonzentration sank die Aktivität der MMPs wieder, wobei sie bei 10  $\mu\text{M}$  ein Plateau bei etwa 130 % erreichte, um



ab 100  $\mu\text{M}$  noch weiter abzufallen (Abbildung 17). Es kann angenommen werden, dass Zink in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  an der Aktivierung von MMPs beteiligt ist. Ab einer Zinkkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  kommt es zur Ausfällung des Enzyms, so dass keine genaue Aussage darüber getroffen werden kann, ob im höheren Konzentrationsbereich eine Aktivitätserhöhung oder -minderung der Matrixmetalloproteinase stattfindet.

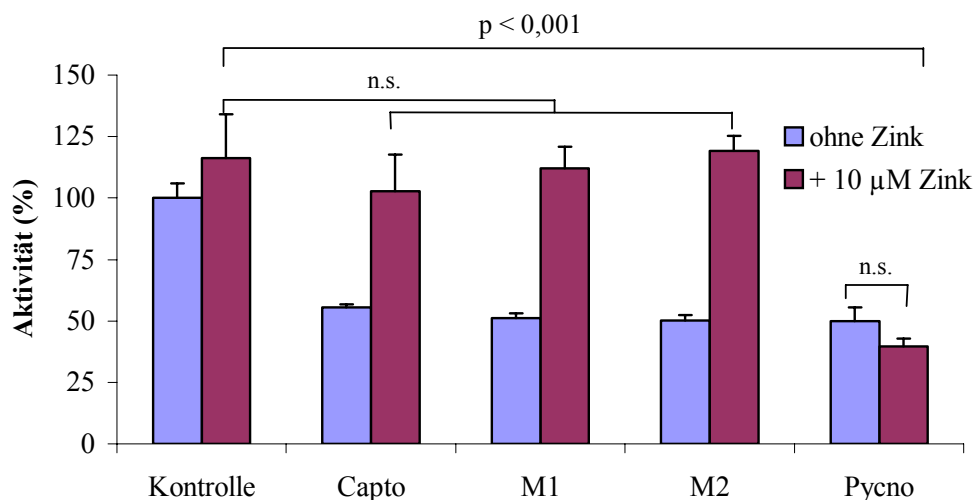
Eine Aktivitätsminderung von Matrixmetalloproteinasen durch Zink wurde allerdings von Santos et al. gefunden [79]. Nach Inkubation des Analysenpuffers mit 2 g Zinkoxid und anschließender Zugabe von MMP-2 und MMP-9 wurden mittels Immunopräzipitationsassays die verbleibenden Aktivitäten der MMPs bestimmt. Eine Konzentration von lediglich 45  $\mu\text{M}$  Zink rief hier eine 100 %ige MMP-9-Hemmung hervor. Diese niedrige Hemmkonzentration konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.



**Abbildung 17: Einfluss von steigenden Zinkkonzentrationen auf MMP-9 (83,3 ng/ml) mit Substrat Elastin. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen mit den jeweiligen MA.**

Um den Einfluss von Zink auf die Wirkung der Inhibitoren zu testen, wurden Messungen von Captopril, M1, M2 und Pycnogenol mit MMP-9 und dem Substrat Elastin in An- und Abwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Zink durchgeführt. Es wurden bei dieser Zinkkonzentration keine Proteine des Reaktionsansatzes ausgefällt. Die Aktivität der Matrixmetalloproteinase, die in den vorhergehenden Versuchen ohne Inhibitorzusatz ermittelt wurde, lag dort bei etwa 130 %. Die eingesetzten Konzentrationen von Captopril, M1 und M2 wurden im Bereich der  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen bzw. der mittleren Hemmkonzentration (Pycnogenol) der jeweiligen Inhibitoren, welche zuvor in den Hemmversuchen ermittelt wurden (Tabellen 2-4), gewählt.

In Anwesenheit von 10  $\mu$ M Zink wurden die Hemmwirkungen von Captopril, M1 und M2 auf MMP-9 vollständig aufgehoben (Abbildung 18). Die Aktivität von MMP-9 stieg dabei jeweils auf Werte über 100 %, wobei die resultierenden Aktivitäten, die sich durch die verschiedenen Inhibitoren ergaben, keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Abbildung 18, ANOVA, Tukey's Test, Tabellarischer Anhang 2.5.3).



**Abbildung 18: Hemmversuche von MMP-9 (83,3 ng/ml) mit Captopril, M1, M2 und Pycnogenol in An- und Abwesenheit von 10  $\mu$ M Zink; Substrat: succ. Elastin. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus sechs Versuchen. Statistisch signifikante Unterschiede sind bei Pycnogenol mit Zinkzusatz im Vergleich zu allen Inhibitoren mit Zinkzusatz gegeben.**

Die Tatsache, dass bei einem Zusatz von 10  $\mu$ M Zink die 50 %ige Hemmung von MMP-9, die durch die Inhibitoren Captopril, M1 und M2 hervorgerufen wurde, vollständig aufgehoben wurde, lässt wie bei Sorbi et al. beschrieben, eine Chelatisierung des Zinkatoms im aktiven Zentrum vermuten [50]. Somit zeigten die Metabolite durch die Hydroxygruppen und/oder die Lactonstruktur die Fähigkeit zur Chelatisierung von Zink. Diese Chelatisierung könnte auch über das Zinkatom im aktiven Zentrum erfolgen und damit die Matrixmetalloproteinase hemmen. Ein Überschuss an Zink hingegen bildet mit den Inhibitoren schon in der Lösung Chelatkomplexe, so dass deren Einfluss auf die Matrixmetalloproteinase vernachlässigbar zu sein scheint. Eine Bindung von M1 und M2 an Zink wäre als Hemmmechanismus plausibel.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den von Reinhardt et al. [80] durchgeführten Untersuchungen an MMP-2 und MMP-9, isoliert aus dem Myokard von Patienten mit Herzversagen. Die dort mittels Zymographie ermittelten Hemmkonzentrationen der

Matrixmetalloproteinasen durch Captopril lagen bei MMP-2 mit 2,0 mM und bei MMP-9 mit 1,65 mM im Bereich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen  $IC_{50}$ -Konzentrationen. Die Hemmeffekte von Captopril wurden durch einen Überschuss an Zink ebenfalls vollständig aufgehoben, wobei keine näheren Konzentrationsangaben gemacht wurden.

De Souza et al. bestätigten durch Untersuchungen an parodontösen Zahnfleisch-Explantaten mittels Zymographie die Anwesenheit von aktivem MMP-2 und MMP-9 [81]. Der Hintergrund dieser Studie war die Reduktion der Plaques- und Zahnsteinbildung, sowie die Entzündungshemmung bei Parodontose durch zinkenthaltende Zahnpasten und Mundwässer zu erklären. Durch Zusatz von 15  $\mu$ M (MMP-2) bzw. 40  $\mu$ M (MMP-9) Zinksulfat wurden hier die beiden Matrixmetalloproteinasen, die nachweislich erhöht in parodontösem Gewebe sind, zu 50 % gehemmt. Diese Konzentrationen an Zinksulfat entsprechen 6  $\mu$ M bzw. 16  $\mu$ M Zink. Die Hemmung der MMPs durch Zink in diesen Konzentrationen steht im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen, in welcher eine verstärkte MMP-Aktivität in diesem Bereich gezeigt wurde. Die physiologischen Konzentrationen von Zink betragen 11 bis 23  $\mu$ M in Serum, respektive 9 bis 18  $\mu$ M in Plasma. Nach den Untersuchungen von De Souza et al. müssten diese Zinkkonzentrationen für eine MMP-Hemmung ausreichen, was jedoch unter Kenntnis der physiologischen Gegebenheiten nicht der Fall sein kann, da unter solchen Umständen keine Parodontose auftreten dürfte.

Eine mögliche Erklärung für diese Differenzen ist die unterschiedliche Reinheit der Matrixmetalloproteinasen. In der Arbeit von De Souza et al. wurden MMPs aus entzündetem Zahnfleisch-Gewebe isoliert und aufgereinigt [81], wohingegen in den eigenen Untersuchungen hochgereinigte MMPs verwendet wurden. Durch die unvollständige Aufreinigung von De Souza könnte es eventuell zum Auftreten anderer bzw. unspezifischer Effekte kommen, die für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten.

Setzt man den Gesamtextrakt Pycnogenol mit der mittleren Hemmkonzentration ein, wird dagegen der Hemmeffekt durch 10  $\mu$ M Zink nicht aufgehoben. Die Aktivitäten von MMP-9 sind mit und ohne Zinkzusatz nicht signifikant verschieden (Abbildung 18). Man könnte daher vermuten, dass Pycnogenol in den eingesetzten Konzentrationen die Matrixmetalloproteinasen nicht über einen Angriff auf das katalytische Zinkatom hemmt, was im Einklang mit den Ergebnissen des Allgemeinen Teils 3.1.2 steht. Aufgrund ausgeprägter Polyphenol-Protein-Bindungen kann vermutet werden, dass Pycnogenol

primär das Substrat vor der Degradierung durch MMPs schützt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung aufgrund eines synergistischen Effektes aus Substratschutz und Angriff auf das Enzym zurückzuführen ist.

Die bei den Inhibitoren Captopril, M1 und M2 beobachtete Aufhebung der Hemmwirkung durch Zink findet bei Pycnogenol nicht statt. Es ist wahrscheinlich, dass der polyphenolreiche Extrakt die Zinkionen in der Lösung sofort komplexiert und diese somit Pycnogenol nicht aus dem aktiven Zentrum verdrängen können. Daher ändert sich die Aktivität von MMP-9 bei Pycnogenol als Inhibitor mit und ohne Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  Zink nicht signifikant.

Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der Hemmung von Matrixmetalloproteinasen durch die verschiedenen untersuchten Inhibitoren unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen dürften. So hemmen Captopril, M1 und M2 wahrscheinlich durch einen direkten Angriff auf das Zinkatom des aktiven Zentrums, wohingegen der Gesamtextrakt Pycnogenol vorwiegend durch die Bindung an Proteinstrukturen eine Schutzfunktion auf die eingesetzten Substrate ausüben dürfte.

## **4 Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten**

Die Hemmung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen wurde zunächst mittels *in vitro*-Assays am isolierten Enzym bestimmt (Allgemeiner Teil 2). Um die Wirkungen des Pflanzenextraktes und seiner Metabolite auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurde im Folgenden getestet, ob diese Inhibitoren einen Einfluss auf die MMP-Freisetzung haben. Dazu wurden Monocyten, die aus gepoolten Blutzell-Suspensionen gewonnen wurden, mithilfe von Lipopolysaccharid (LPS, *Salmonella minnesota* RE 595) zur MMP-9-Produktion stimuliert. Anschließend wurde der Effekt verschiedener Inhibitoren, darunter auch der der Metabolite M1 und M2, auf die MMP-9-Freisetzung untersucht. MMP-9 war in den vorher beschriebenen Hemmversuchen (Allgemeiner Teil 2.12) die durch den Gesamtextrakt und durch die Metaboliten am besten hemmbare Matrixmetalloproteinase. Zum einen wurde sie aus diesem Grund und zum anderen wegen ihrer pathophysiologischen Bedeutung (Tabelle 1) für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Transkription von MMP-9 kann durch eine Reihe von Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Adhäsionsmoleküle und TNF- $\alpha$ , sowie durch Phorbolster und Lipopolysaccharid induziert werden [82-84]. Dies konnte ausgenutzt werden, um die isolierten Monocyten durch Zusatz von LPS und anschließender Inkubation bei 37 °C zur MMP-9-Sekretion anzuregen.

### **4.1 Monocyten/Macrophagen als Sekretionsquelle für MMP-9**

Der menschliche Körper enthält zwischen 2 bis  $8 \cdot 10^8$  Monocyten pro Liter Blut. Monocyten und Macrophagen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Über Monoblasten und Promonocyten entwickeln sich die Monocyten. Die Monocytopoese wird angeregt durch Granulocyten-Macrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Macrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) [85]. Nachdem die jungen Monocyten das Knochenmark verlassen haben, zirkulieren sie für 8-70 Stunden im Blutsystem. Die Dauer, die sie im Blut verbleiben, wird maßgeblich beeinflusst von im Laufe einer Entzündung gebildeten chemotaktischen Signalsubstanzen. Diese veranlassen Monocyten, an Endothelzellen zu adhäreren und aus den Gefäßen in

das Gewebe zu wandern (Diapedese) [86]. Abhängig von dem Gewebe, in dem die Monocyten zu Macrophagen differenzieren, entstehen unterschiedlichste Zellen, die 1924 von Aschoff unter dem Begriff retikulohistiocytäres System zusammengefasst wurden, welches heute als Monocyten-Macrophagen System bezeichnet wird [87]. Hierzu gehören unter anderem Alveolarmacrophagen (Lunge), Peritonealmacrophagen, Kupffersche Sternzellen (Leber), Macrophagen der roten Pulpa der Milz und Osteoklasten.

Auf der Zellmembran der Zellen des Monocyten-Macrophagen Systems findet man eine Vielzahl von Rezeptoren, unter anderem die für diesen Versuch wichtigen Rezeptoren der Lipopolysaccharide, CD-14 (CD = Cluster of Differentiation). Im Immunsystem nehmen Macrophagen eine zentrale Stellung ein. Sie übernehmen vielseitige Aufgaben, wie Phagozytose, Präsentation von Antigenen und Produktion von sekretorischen Substanzen (Cytokine, Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren und proteolytische Enzyme (MMPs)). Mit Hilfe dieser Verbindungen werden von Monocyten und Macrophagen eine Vielzahl immunologischer Prozesse beeinflusst, Entzündungen gefördert, aber auch gehemmt, Erreger und körpereigenes geschädigtes Gewebe beseitigt und andere Zellen zu Wachstum und Differenzierung stimuliert [88-90].

Das Prinzip der vorliegenden Untersuchungen beruht auf der bekannten Tatsache, dass LPS Monocyten zur Sekretion von MMP-9 anregt [82, 84, 91, 92]. Vermutlich erfolgt die Aktivierung der MMP-9-Freisetzung dabei über die Signalwege der Proteinkinase C (PKC) oder der Prostaglandin E2 (PGE 2)-abhängigen Proteinkinase A (PKA) [39, 93]. Als Beispiele für weitere Stimulanzen, die die MMP-9-Freisetzung aus Monocyten bewirken, sind Phorbolster wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), sowie das Lectin Concanavalin A und das Thrombolytikum Urokinase zu nennen [39, 94, 95].

Um sicherzustellen, dass die für den Ablauf der Signalwege notwendige Zeit gewährt wurde, hielten Shu et al. eine Inkubationszeit der Monocyten mit LPS von 48 Stunden ein und bestimmten anschließend die Konzentration an MMP-9 im Zellkulturüberstand [91]. Die nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS ermittelte MMP-9-Konzentration lag bei 30 ng/ml. In den eigenen Untersuchungen wurden zunächst zwei verschiedene Inkubationszeiten, 24 und 48 Stunden, getestet. Die MMP-9-Sekretion nach 48-stündiger Inkubation (13,89 ng/ml) war fast doppelt so hoch wie die nach 24-stündiger Inkubation (7,17 ng/ml) und wurde, da dies zu deutlicheren und besser auswertbaren Ergebnissen führte, für die folgenden Hemmversuche eingesetzt. Um die Freisetzung von MMP-9 zu hemmen, wurden Monocyten mit verschiedenen Inhibitoren versetzt und anschließend

ebenfalls über einen Zeitraum von 48 Stunden mit LPS inkubiert. Diese Inhibitoren waren Rosiglitazon und Fenofibrat als Vertreter der PPAR-Agonisten (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), das Glucocorticoid Hydrocortison und die beiden Metabolite M1 und M2. PPAR-Agonisten wurden als Positivkontrolle eingesetzt, da in der Literatur neben ihrem Einsatz als Insulinsensitizer bereits mehrfach ihre antiinflammatorischen Effekte beschrieben wurden [91, 96-100].

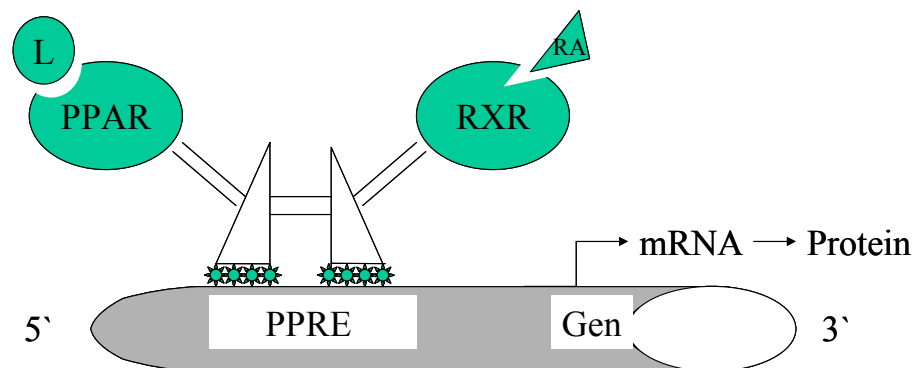
## **4.2 Liganden des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) und MMP-9**

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Rezeptoren gehören [101, 102]. Die Namensgebung der PPARs ist abgeleitet von der ursprünglichen Beobachtung einer Proliferation hepatozellulärer Peroxisomen nach Behandlung mit PPAR-Liganden, wie z.B. Fibraten, die jedoch nur bei Nagetieren auftritt. Aus der Gruppe der PPARs sind die Subtypen PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta$  (Synonym: PPAR $\delta$ ) bekannt, es konnten bislang aber nur für die  $\alpha$ - und die  $\gamma$ -Form funktionelle Bedeutungen nachgewiesen werden [101, 102]. Ursprünglich war die Bedeutung der PPARs auf die Kontrolle des Lipidmetabolismus und auf die Homeostase begrenzt. Studien der letzten Jahre zeigten jedoch, dass die PPAR-Aktivierung auch bei der Regulation von proinflammatorischen Antworten, sowie bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen und bei der Apoptose eine Rolle spielt [103-105].

PPARs können durch eine Reihe von Substanzen aktiviert werden, die in endogene und in synthetische Liganden eingeteilt werden können. Zu den endogenen Liganden zählen unter anderem Eicosanoide und Fettsäuren, sowie ihre Derivate. Fibrate, Insulinsensitizer vom Typ der Thiazolidindione und einige Nichtsteroidale Antiphlogistika gehören zu den synthetischen Liganden. PPAR $\alpha$  wird durch Liganden wie Fettsäuren (Palmitin- und Arachidonsäure) und einige Eicosanoide (Hydroxyeicosatetraenoic acid = 8(S)-HETE) aktiviert [106]. Hochaffine synthetische PPAR $\alpha$ -Liganden stellen die lipidsenkenden Fibrate (Fenofibrat, Clofibrat) dar [107]. Als endogene Liganden für PPAR $\gamma$  agieren die oxidierten Fettsäuren 9(S)-HODE und 13(S)-HODE (Hydroxyoctadecadienoic acid) und das Prostaglandinderivat 15-desoxy- $\Delta^{2,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>) [108, 109]. Die Insulinsensitizer Rosiglitazon, Troglitazon und

Ciglitazon, die zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II Anwendung finden, wurden als potente synthetische PPAR $\gamma$ -Liganden identifiziert [110]. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptorsubtypen sind bisher keine selektiven Liganden für PPAR $\delta$  identifiziert worden. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Reihe von natürlichen (mehrfach ungesättigte Fettsäuren) und synthetischen (halbsynthetisches PGI Analogon Carboprostacyclin) Substanzen diesen Rezeptorsubtyp aktivieren können. Weiterhin aktiviert das Eicosanoid PGA 1 PPAR $\delta$ , so dass angenommen werden kann, dass endogene PPAR $\delta$ -Liganden aus dem Cyclooxygenase-Signalweg stammen [107, 111].

Die Bindung der beschriebenen PPAR Liganden führt zur Aktivierung dieser Rezeptoren. Dabei werden Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), dem Rezeptor der 9-cis-Retinolsäure, gebildet. Die PPAR/RXR Heterodimere binden in der Promotorregion bestimmter Zielgene des Lipidstoffwechsels an spezifische DNA-Abschnitte, den Peroxisome Proliferator Response Elements (PPRE) und regulieren dadurch deren Transkription [112] (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung der Genregulation durch PPARs (L: PPAR-Ligand, RA: Retinolsäure = RXR-aktivierender Ligand, PPRE: Peroxisome Proliferator Response Element), modifiziert nach [113].**

Die Expression von PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  variiert von Gewebe zu Gewebe, so dass den unterschiedlichen Subtypen verschiedene physiologische Rollen zukommen. PPAR $\alpha$  wird insbesondere in Geweben mit hohen Abbauraten für Fettsäuren (Leber, Herz, Niere, Muskel) exprimiert [91]. PPAR $\beta$  besitzt eine ubiquitäre Verteilung mit unterschiedlichem Ausmaß in den verschiedenen Organen. PPAR $\gamma$  ist überwiegend im Fettgewebe zu finden, wo es die Expression von Adipocyten-Genen, welche am Lipid-Metabolismus beteiligt



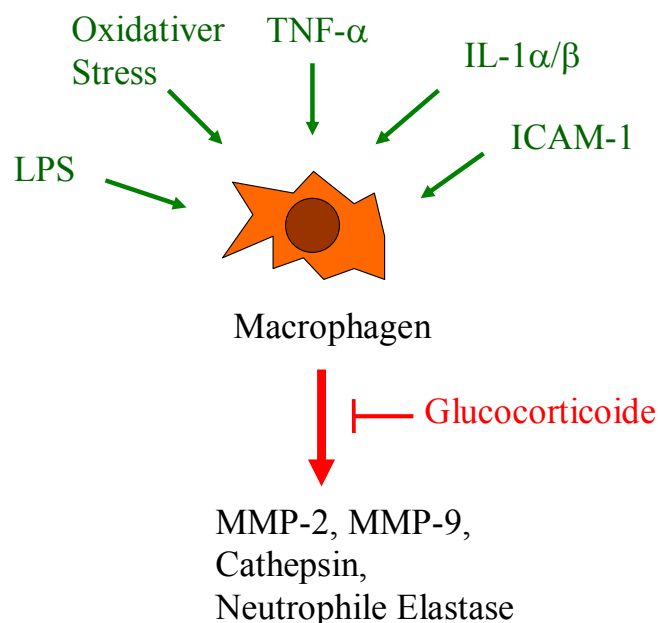
sind, und die Adipocyten-Differenzierung reguliert [91]. PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  sind jedoch auch in vielen anderen Zelltypen und Geweben nachweisbar [101, 102]. So werden beide Rezeptoren in Monocyten/Macrophagen exprimiert und es wurde gezeigt, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Regulation von proinflammatorischen Antworten beteiligt sind [91, 96-99, 114]. Es wurde nachgewiesen, dass der Zusatz von PPAR $\gamma$  Aktivatoren wie 15d-PGJ<sub>2</sub>, Troglitazon oder einigen Nichtsteroidalen Antirheumatika die Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen durch mit PMA stimulierte Monocyten hemmte [82]. Die Bildung von induzierbarer NO-Synthase, von Scavenger Rezeptor A, von MMP-9 und von MMP-9-Genen wurde außerdem stark herabreguliert [115]. Die Fähigkeit von PPAR-Liganden, die Expression von proinflammatorischen Faktoren zu hemmen, lässt eine protektive Rolle von PPAR bei entzündlichen Erkrankungen annehmen. Daher wurden Rosiglitazon und Fenofibrat in den Versuchen zur Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten als Positivkontrollen eingesetzt [91, 96-99, 114]. Diese antiinflammatorische Wirkung ist ein wichtiger Aspekt des Wirkspektrums der Glitazone. So werden zum einen Spät komplikationen von Diabetes mellitus reduziert, zum anderen kommt es zu einer positiven Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, was beim Diabetiker einen weiteren Risikofaktor herabsetzt.

### **4.3 Glucocorticoide und MMP-9**

Glucocorticoide sind eine Klasse von Steroidhormonen mit einem breiten Spektrum an physiologischen Effekten. Pharmakologisch werden Glucocorticoide aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften eingesetzt. Die Wirkungen der Glucocorticoide werden über den Glucocorticoid-Rezeptor (GR), ebenfalls ein Mitglied der nukleären Hormonrezeptorfamilie, vermittelt [114]. Das Glucocorticoid, das als Steroid die lipophile Barriere der Zellmembran ungehindert passieren kann, ist in der Lage, nach Bindung an den GR als Transkriptionsfaktor die Transkription von Glucocorticoid-sensitiven Genen zu beeinflussen. Um als Transkriptionsfaktor wirken zu können, muss der ausschließlich im Cytoplasma lokalisierte Rezeptor zunächst in den Zellkern gelangen [116]. Der gerichtete Transport in den Zellkern wird durch die Freilegung einer spezifischen, als „Kernlokalisierungssignal“ bezeichneten Peptidsequenz (Nuclear Localization Signal, NLS) im Rezeptormolekül ermöglicht. Mechanistisch scheinen hier Wechselwirkungen zwischen der NLS und Proteinen der Kernporen eine

wichtige Rolle zu spielen [116]. Die NLS wird in Abwesenheit von Corticoidliganden durch die Bindung des Rezeptormoleküls an Hitzeschockproteine (HSP), vor allem an HSP-90 (90 kDa), in einem inaktiven Zustand gehalten [117].

Der Mechanismus, der für die meisten der durch Glucocorticoide hemmbaren Gene verantwortlich ist, ist indirekt und wird als Transrepression bezeichnet [116]. Ein Großteil der antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften der Glucocorticoide kann anhand dieses Mechanismus auf molekularer Ebene erklärt werden. Viele Entzündungsmediatoren stehen unter der positiven Kontrolle der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (Nuclear-factor- $\kappa$ B) und AP-1 (Activator-protein-1). NF- $\kappa$ B reguliert die Transkription von TNF- $\alpha$  und IL-6, von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1), von Chemokinen und von Enzymen [118]. AP-1 ist verantwortlich für die Transkription von proinflammatorischen Faktoren, wie MMP-2 und MMP-9 [118]. Die beiden Transkriptionsfaktoren bilden im aktiven Zustand heterodimere Komplexe mit verschiedenen Untereinheiten. Glucocorticoide können die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren hemmen [119]. Damit wird die Synthese vieler für die Symptomatik der Entzündung verantwortlicher Substanzen, im speziellen Fall die von MMP-9, verhindert (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Eingreifen von Glucocorticoiden in die Regulation von Entzündungsmediatoren. Die Expression von stark proinflammatorischen Cytokinen wie TNF- $\alpha$ , induziert durch verschiedene Stimuli (grün), wird durch Glucocorticoide gehemmt (roter Pfeil); modifiziert nach [120].

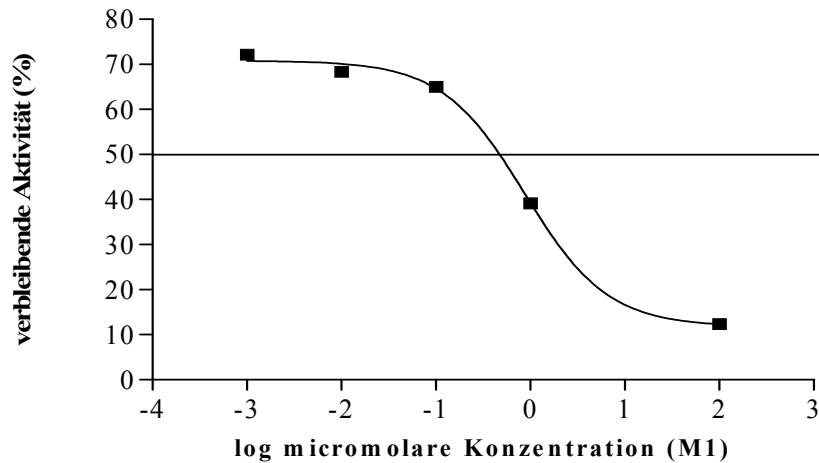
Aus der Gruppe der Glucocorticoide wurde Hydrocortison als weitere Positivkontrolle für die Versuche zur Hemmung der MMP-9-Freisetzung ausgewählt. Als endogenes Glucocorticoid mit antiinflammatorischer Wirkung hemmt Hydrocortison die Freisetzung von MMP-9 aus Monocyten *in vivo* [118]. Die Hemmung erfolgt über einen reversiblen, potenten suppressiven Effekt auf AP-1 in Monocyten, der eine verminderte Expression von MMP-9 mit sich bringt. Die physiologische Konzentration des Nebennierenrindenhormons Hydrocortison im Blut liegt beim Erwachsenen morgens zwischen 50 und 250 ng/ml.

#### **4.4 Bestimmung der MMP-9-Freisetzung mittels ELISA**

In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten Monocyten zunächst mit den jeweiligen Inhibitoren versetzt und eine Stunde (PPAR-Agonisten und Metabolite), respektive sechs Stunden (Hydrocortison) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS zur MMP-9-Freisetzung stimuliert. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden [91] wurde mittels ELISA, welcher MMP-9 und Pro-MMP-9 immunologisch quantitativ erfasst, die Gesamtkonzentration an MMP-9 in den Zellüberständen bestimmt (Experimenteller Teil 3.6).

Für die Bestimmung der 100 %igen MMP-9-Freisetzung wurde kein Inhibitor zugesetzt. Als Positivkontrollen wurden die PPAR-Agonisten Rosiglitazon und Fenofibrat, sowie das Glucocorticoid Hydrocortison eingesetzt. Die auf ihre Inhibitorwirkung zu untersuchenden Komponenten des Extraktes waren die beiden Metabolite M1 und M2. Die Konzentrationsbereiche der Inhibitoren wurden für Rosiglitazon und Fenofibrat von  $10^{-11}$  M bis  $10^{-6}$  M, für Hydrocortison von  $10^{-12}$  M bis  $10^{-4}$  M und für die beiden Metabolite im Bereich von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-4}$  M bestimmt.

Zunächst wurden von jedem Inhibitor jeweils steigende Konzentrationen eingesetzt und daraus Hemmkurven erstellt. Der Kurvenverlauf entsprach immer einer sigmoiden Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abbildung 21). Die eingesetzten Inhibitoren zeigten alle eine dosisabhängige Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten im Vergleich zu den Proben, die nur mit LPS stimuliert wurden. Die Effektivität der Inhibitoren war dabei unterschiedlich und wurde durch die Bestimmung der  $IC_{50}$  ermittelt (Experimenteller Teil 3.6).

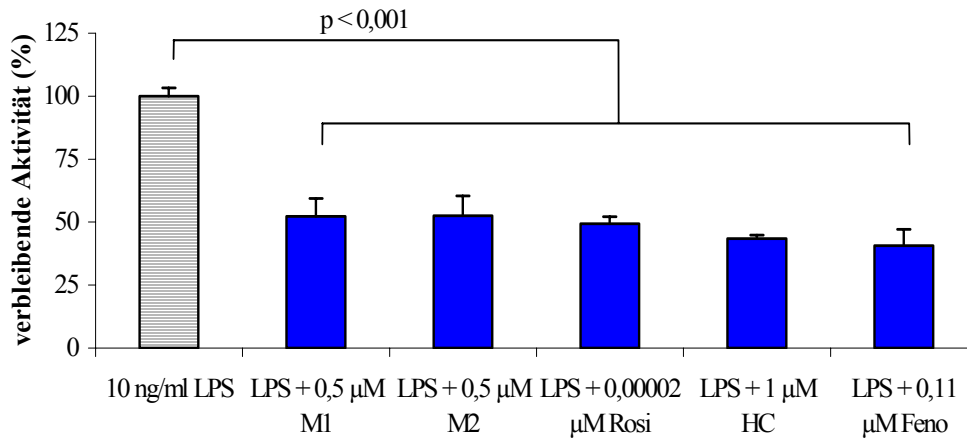


**Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten durch M1.**

Exemplarisch ist hier die Hemmung der MMP-9-Freisetzung durch M1 dargestellt, wobei eine  $IC_{50}$  von 0,49  $\mu$ M ermittelt wurde (Güte der Anpassung:  $r = 0,998$ , Abbildung 21). Durch die Erstellung der Hemmkurven konnte festgestellt werden, dass Rosiglitazon mit einer  $IC_{50}$  von etwa  $2 \cdot 10^{-11}$  M der effektivste der eingesetzten Inhibitoren war. Anschließend folgte Fenofibrat mit einer  $IC_{50}$  von ungefähr  $10^{-7}$  M, die beiden Pycnogenol-Metabolite M1 und M2 mit jeweils  $5 \cdot 10^{-7}$  M und schließlich Hydrocortison, das mit circa  $10^{-6}$  M der schwächste Inhibitor in dieser Reihe war (Abbildung 22). Dies ist insofern bemerkenswert, als das endogene antiinflammatorisch wirksame Hydrocortison weniger potent in der Hemmung der MMP-9-Freisetzung ist als die beiden Metabolite, die mit nur  $5 \cdot 10^{-7}$  M eine etwa 50 %ige Hemmung hervorrufen.

Rosiglitazon und Fenofibrat übten hier in Bezug auf die Hemmung der MMP-9-Freisetzung den gleichen Effekt aus, der auch von Shu et al. beschrieben wurde [91]. Allerdings war Rosiglitazon in der vorliegenden Arbeit um den Faktor  $5 \cdot 10^3$  potenter als Fenofibrat. Shu et al. hingegen fanden heraus, dass beide Inhibitoren gleich potent in der Hemmung der MMP-9-Freisetzung waren. Sie verwendeten Zelllinien (THP-1 monocytic leukemia cells), die sie mit den beiden PPAR-Agonisten versetzten und anschließend ebenfalls mit LPS, hier allerdings nur in einer Konzentration von 1 ng/ml, stimulierten. Die Konzentrationen an MMP-9 wurden mittels ELISA fluorimetrisch bestimmt. Jeweils 2,5  $\mu$ M Rosiglitazon und Fenofibrat bewirkten eine etwa 75 %ige Hemmung der MMP-9-Freisetzung. Die  $IC_{50}$  wurde in diesen Untersuchungen nicht direkt ermittelt, liegt aber, wie

aus den Diagrammen der Arbeit zu entnehmen ist, zwischen 0,83 und 2,5  $\mu\text{M}$ . Damit ist sie etwa um den Faktor  $8 \cdot 10^4$  bei Rosiglitazon und den Faktor 15 bei Fenofibrat höher als die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der vorliegenden Versuche.



**Abbildung 22: Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten durch M1, M2, Rosiglitazon (Rosi), Hydrocortison (HC) und Fenofibrat (Feno) im Vergleich zu den stimulierten Zellen ohne Inhibitor. Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens sechs Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede sind bei den nur mit LPS stimulierten Zellen gegenüber allen Messungen mit Inhibitoren gegeben (ANOVA, Tukey's Test). Die Hemmkonzentrationen wurden auf die Anzahl lebender Zellen normalisiert.**

Kintscher et al. [121] stimulierten THP-1 Zellen, die zuvor mit steigenden Konzentrationen an Rosiglitazon (0,01 – 10  $\mu\text{M}$ ) und Troglitazon (1 – 20  $\mu\text{M}$ ) versetzt wurden, mit 100 nM Phorbol ester (PMA) zur MMP-9-Freisetzung. Nach Analyse mittels Western Blot erfolgte die Auswertung mithilfe der Chemilumineszenz. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt. Der Zusatz von 0,1  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon verursachte eine etwa 60 %ige Hemmung der Freisetzung von MMP-9 aus der Zelllinie. Obwohl auch hier die  $\text{IC}_{50}$  nicht direkt bestimmt wurde, kann festgestellt werden, dass ungefähr um den Faktor  $5 \cdot 10^3$  höhere Konzentrationen an Rosiglitazon zur Hemmung der MMP-9-Freisetzung nötig waren als in der vorliegenden Arbeit.

Um die aus den Hemmkurven erhaltenen Ergebnisse vergleichbar und statistisch auswertbar zu machen, wurden mit den Konzentrationen, die in etwa der der ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte entsprachen, Sechsfachbestimmungen der einzelnen Inhibitoren durchgeführt. Die Mehrfachmessungen bestätigten, dass bei allen eingesetzten Inhibitoren eine signifikante Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit LPS stimulierten Monocyten stattfand (Tabellarischer Anhang 3.6, Abbildung 22).

Die Versuche zur Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten zeigten, dass die beiden Metabolite hier in ihrer Wirkung equipotent waren, während sie sich in den Versuchen zur Hemmung der Aktivität von MMP-9 (Allgemeiner Teil 2.12) je nach Substrat um mehr als das Doppelte in ihrer Effektivität unterschieden (Tabelle 4). Dies könnte darin begründet sein, dass die Metabolite durch unterschiedlich starke Bindungen an das aktive Zentrum von MMP-9 die Aktivität zwar unterschiedlich stark hemmen (Allgemeiner Teil 2.12), dass die Sekretion von MMP-9 davon jedoch nicht beeinflusst wird. Man könnte daher vermuten, dass die Metabolite auf zellulärer Ebene früher in den Transkriptionsmechanismus von MMP-9 eingreifen.

### **4.5 Hemmung der MMP-9-Freisetzung durch Pflanzenextrakte und -bestandteile**

Eine Reduktion der MMP-9-Freisetzung wurde ebenfalls bei Maus-Macrophagen beobachtet, die von Bellosta et al. mit einem methanolischen Extrakt der Rinde von *Tristaniopsis calobuxus* (Myrtaceae) inkubiert wurden [122]. Mittels Zymographie wurde die Aktivität von sekretiertem MMP-9 mit und ohne Zusatz verschiedener Fraktionen des Extraktes als Inhibitoren bestimmt. Diese Fraktionen wurden nochmals aufgetrennt und mit HPLC/MS identifiziert. Dabei verursachten 30  $\mu$ M Ellagsäure, (+)/(-)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin eine 62 - 76 %ige Hemmung der MMP-9-Freisetzung im Vergleich zur ungehemmten Kontrolle [122]. Obwohl diese Ergebnisse nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden können, da von Bellosta et al. nur aktives MMP-9 bestimmt wurde, während durch den hier verwendeten ELISA Pro-MMP-9 und MMP-9 erfasst wurden, scheinen die Metabolite M1 und M2 die potenteren Inhibitoren zu sein.

Maeda-Yamamoto et al. untersuchten unter anderem die Effekte von Tee-Polyphenolen auf die MMP-Sekretion von metastasierenden Fibrosarkom-Zellen (HT 1080) [123]. Dabei konnte mithilfe der Zymographie gezeigt werden, dass Epicatechingallat, Epigallocatechingallat und Theaflavin ebenfalls in der Lage waren, die MMP-9-Freisetzung der HT-Zellen ins Medium zu hemmen. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte lagen für Epicatechingallat und Epigallocatechingallat bei etwa 0,2 mM und damit deutlich über den mittleren Hemmkonzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit für die beiden Metabolite gefunden wurden. Das häufig beschriebene, potente Epigallocatechingallat war weniger effektiv in der Hemmung von MMP-9 als M1 und M2.

Die Arbeiten von Annabi et al. beschäftigten sich mit der Hemmung der Pro-MMP-2-Freisetzung aus Glioblastom-Zellen durch Epigallocatechingallat [124]. Nach der Durchführung eines Western-Blots wurden die mit und ohne Epigallocatechingallat behandelten Proben quantitativ mittels Densitometrie ausgewertet. Eine etwa 50 %ige Hemmung der Pro-MMP-2-Freisetzung wurde durch 25  $\mu\text{M}$  Epigallocatechingallat hervorgerufen. Dieser Wert ist ebenfalls höher als der in der vorliegenden Arbeit gefundene  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die beiden Metabolite.

Cha et al. untersuchten die Hemmwirkung eines methanolischen Extraktes von *Euonymus alatus* auf MMP-9, sekretiert von Hep3B Zellen, einer menschlichen hepatocellulären Carcinom-Zelllinie [125]. Der methanolische Extrakt wurde erneut mit verschiedenen Lösungsmitteln, wie Hexan, Ethylacetat, Chloroform und Butanol reextrahiert, wobei unterschiedliche Fraktionen entstanden. Mittels Zymographie wurde die Hemmung der Aktivität des durch Hep3B-Zellen sekretierten MMP-9 durch die unterschiedlichen Fraktionen, sowie durch separat eingesetzte Lösungen von Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat in Tris-HCl untersucht. Dabei zeigten Epigallocatechingallat und die Butanol-Fraktion die niedrigsten mittleren Hemmkonzentrationen (12 respektive 8  $\mu\text{g/ml}$ ), und waren somit in dieser Reihe die potentesten Inhibitoren. Im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen  $\text{IC}_{50}$ -Werten der beiden Pycnogenol-Metabolite war Epigallocatechingallat mit einer  $\text{IC}_{50}$  von etwa 26  $\mu\text{M}$  um den Faktor 50 weniger potent.

In neueren Untersuchungen zur Hemmwirkung verschiedener Inhaltsstoffe von *Euonymus alatus* wurde Kaffeesäure als selektiver Inhibitor von MMP-9 aus der Pflanze isoliert und identifiziert [126]. Mithilfe der Zymographie konnte eine dosisabhängige Hemmung sowohl der MMP-9-Sekretion aus Hep3B-Zellen, als auch der MMP-9-Aktivität festgestellt werden. Dabei verursachte eine Konzentration von 55  $\mu\text{M}$  Kaffeesäure eine etwa 70 %ige Hemmung der MMP-9-Sekretion aus Hep3B-Zellen. Da die  $\text{IC}_{50}$ -Werte nicht angegeben sind, kann kein direkter Vergleich mit den Hemmkonzentrationen der Metabolite angestellt werden. Die Metabolite scheinen jedoch die potenteren Inhibitoren zu sein. Die Hemmung der MMP-9-Aktivität durch Kaffeesäure konnte von Park et al. mit einer geringen sehr  $\text{IC}_{50}$  von 10-20 nM gezeigt werden. Dies steht im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen, wonach Kaffeesäure die Aktivität von MMP-9 nicht inhibieren konnte (Allgemeiner Teil 2.8).

Mittels Zymographie untersuchten Garbisa et al. die Hemmwirkungen von Epigallocatechingallat und Epigallocatechin auf MMP-2 und MMP-9, sekretiert von HT1080-Zellen [127]. Sie stellten eine dosisabhängige Hemmung der beiden MMPs durch EGCG und EGC fest. Dabei war EGCG der 20 - 30 fach potentere Inhibitor mit  $IC_{50}$ -Werten von 8  $\mu$ M (MMP-2), respektive 13  $\mu$ M (MMP-9). Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen  $IC_{50}$ -Werte der beiden Metabolite waren auch hier im Vergleich zu EGCG um etwa den Faktor 50 niedriger und somit M1 und M2 die potenteren Inhibitoren.

Die Hemmversuche der Matrixmetalloproteinasen (Allgemeiner Teil 2) zeigten, dass die Metabolite des Pycnogenol-Extraktes die Aktivität von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 *in vitro* hemmen. In den Versuchen mit stimulierten Monocyten konnte nun nachgewiesen werden, dass die Metabolite zusätzlich in der Lage waren, die Freisetzung von MMP-9 aus diesen Monocyten zu hemmen. Die  $IC_{50}$  der beiden Metaboliten lagen bemerkenswerterweise bei nur 0,5  $\mu$ M. Somit waren beide potenter als das endogene antiinflammatorisch wirksame Glucocorticoid Hydrocortison. Der Vergleich mit den PPAR-Agonisten Rosiglitazon und Fenofibrat zeigte aber, dass letztere noch effektivere Inhibitoren der MMP-9-Freisetzung waren als die Metabolite des Gesamtextraktes.



## **5 Pharmakokinetische Untersuchung bekannter Inhaltsstoffe und/oder Metabolite von Pycnogenol**

### **5.1 Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung**

Die tägliche Gesamtflavonoid-Aufnahme des Menschen (hauptsächlich durch Obst und Gemüse) wird in westlichen Ländern auf maximale Mengen zwischen 0,5 und 1 g geschätzt [128]. Dabei nimmt man an, dass der Anteil von Catechin und Procyanidin-Dimeren und -Trimeren im Bereich zwischen 18 und 50 mg liegt, wobei Tee, Schokolade, Äpfel, Birnen, Trauben und Rotwein als Hauptlieferanten dieser Substanzen gelten [129]. Allgemein liegen über die Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung von verschiedenen Autoren stark variierende Daten vor. Dies liegt zum einen an unterschiedlichen Ernährungserhebungsmethoden, zum anderen an einem stark schwankenden individuellen Verzehrverhalten. Dabei spielen sowohl saisonale, als auch geographische Parameter eine entscheidende Rolle. Zitrusfrüchte als Quelle von Flavanonen werden vorwiegend in Südeuropa angebaut, weshalb die Aufnahme unter der Bevölkerung dort höher ist als im restlichen Europa. Studien zu Anthocyanen werden vorwiegend in Finnland durchgeführt, da der Konsum von Beeren durch die Bevölkerung wesentlich höher liegt als in anderen Ländern. Der Konsum von Soja-Produkten ist im asiatischen Raum im Vergleich zu Europa und den Vereinigten Staaten um ein Vielfaches größer, was die erhöhte Isoflavon-Aufnahme in dieser Region erklärt.

### **5.2 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen**

Die Bioverfügbarkeit wird laut amerikanischer Gesundheitsbehörde FDA definiert als die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit denen der Wirkstoff oder der therapeutische Wirkstoffanteil aus seiner pharmazeutischen Form absorbiert wird und am Wirkort vorliegt bzw. aus einer pharmazeutischen Form in den systemischen Kreislauf abgegeben wird. Zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit ist immer im intraindividuellen Vergleich eine i.v.-Gabe notwendig, auf die sich die pharmakokinetischen Daten nach z.B. oraler Gabe beziehen. Diese i.v.-Gabe ist bei Menschen nicht möglich, wenn es sich um komplexe Pflanzenextrakte mit z.T. hochmolekularen Stoffen handelt. Außerdem sind die

Wirksubstanzen bei Extraktgabe zum Teil unbekannt. Der Begriff Bioverfügbarkeit wird in der Literatur für Pflanzenextrakte nicht im strengen Sinn nach FDA gebraucht, weshalb er auch in der vorliegenden Arbeit analog der Bedeutung in der Literatur verwendet wird. Wird im Folgenden von „Bioverfügbarkeit“ gesprochen, so sind die Absorption und das Vorliegen am Wirkort von, zum Teil auch unbekanntem, Inhaltsstoffen des Extraktes und nicht von einer einzelnen Wirksubstanz gemeint.

Pflanzenextrakte oder -bestandteile müssen zu einem gewissen Grad bioverfügbar sein um biologische Effekte ausüben zu können. In den letzten Jahren konnte der Wissensstand auf dem Gebiet der Absorption und der Metabolisierung von Polyphenolen stark erweitert werden. Es ist erwiesen, dass viele Polyphenole ausreichend absorbiert werden können, um auch biologische Effekte auszuüben. So erreichen beispielsweise Quercetin nach einer zwiebelhaltigen Mahlzeit, Catechin nach Rotweinkonsum und Isoflavone nach Soja-Aufnahme im Blut Konzentrationen im unteren mikromolaren Bereich [130-132]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Polyphenole die intestinalen Schranken überwinden können und im Blut Konzentrationen erreichen, die in zuvor durchgeführten *in vitro* Studien Effekte zeigten.

Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die die Wirkungen von Pflanzenextrakten auf biologische Systeme *in vitro* untersuchen. Praktisch keine dieser Studien beachtet jedoch die Bioverfügbarkeit und die eventuell ablaufenden Metabolisierungsreaktionen, so dass es fraglich ist, ob die dort gezeigten Wirkungen *in vivo* auch auftreten können. Obwohl die meisten Polyphenole bis zu einem gewissen Grad resorbiert werden, ist der Anteil wesentlich vom Molekulargewicht des Polyphenols abhängig. Der Konzentrationsbereich, in dem *in vitro* Effekte beschrieben werden, variiert zwischen 0,1 und 100  $\mu\text{M}$ . Da physiologische Konzentrationen nach Polyphenoleinnahme im Blut 10  $\mu\text{M}$  in der Regel nicht überschreiten, sind *in vitro* Wirkungen von Polyphenolen im Konzentrationsbereich über 10  $\mu\text{M}$  höchstwahrscheinlich nicht valide. Eine Ausnahme stellen lokale Konzentrationen im Darmlumen dar, da Polyphenole im Dickdarm eine Konzentration von mehreren hundert Mikromol überschreiten können [133]. Da die antioxidativen Vitamine C und E bereits in den oberen Darmabschnitten resorbiert werden, sind die lokalen Effekte von Polyphenolen neben wenigen Carotinoiden als Antioxidantien in tieferen Darmabschnitten wahrscheinlich von Bedeutung.

### 5.2.1 Absorption und Metabolisierung

Nicht alle Polyphenole sind in der Lage, in ihrer nativen Form biologische Effekte auszuüben. Dies kann an einer niedrigen intrinsischen Aktivität, einer geringen Resorption, einer hohen Metabolisierungsrate oder einer schnellen Elimination liegen. Die aktiven Wirkkomponenten werden zum Teil erst *in vivo* gebildet. So bildet die Darmflora von etwa 30 bis 40 % der Bevölkerung aus dem Soja-Isoflavon Daidzein den Metaboliten Equol [128]. Equol zeigt stärkere phytoestrogene Eigenschaften als die Vorläufersubstanz Daidzein [134]. Die Metabolite Enterolacton und Enterodiol, die aus Lignanen von Leinsamen durch die Darmflora gebildet werden, weisen im Gegensatz zu den Ursprungssubstanzen estrogene Effekte auf [135]. Intensive Kenntnisse der Bioverfügbarkeit von Polyphenolen sind daher für das Verständnis ihrer biologischen Effekte essentiell.

Ein Großteil der Mechanismen der Absorption von Polyphenolen im Darm ist noch unklar. Viele Polyphenole erscheinen zu hydrophil, als dass sie aufgrund passiver Diffusion die Darmwand passieren würden. Ein Membrancarrier, der bei der Polyphenolabsorption eine Rolle spielen könnte, wurde aber bislang nicht identifiziert. Es ist bekannt, dass die Aglykone der Polyphenole zum Teil im Dünndarm resorbiert werden können [133]. In der Nahrung liegen alle Flavonoide mit Ausnahme der Flavanole konjugiert an Glycoside, als Ester oder Polymere vor, die in dieser Form nicht absorbiert werden können [128]. Den größten Anteil der Inhaltsstoffe des Pycnogenol-Extraktes haben mit etwa 65 % auch die Procyanidine und nicht die monomeren Bestandteile [1].

Die Absorption von Procyanidinen im Speziellen ist aufgrund ihrer polymeren Struktur und daraus resultierenden hohen Molekulargewicht limitiert. Eine Methode, die intestinale Absorption von Substanzen abzuschätzen, stellt die sogenannte „rule of five“, eine Kombination von mehreren Deskriptoren, dar [136]. Diese Regeln sagen eine schlechte Absorption von Substanzen voraus, wenn einer der folgenden Parameter erfüllt ist: die molare Masse liegt über 500 Da, es sind mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren und mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren vorhanden und der errechnete logP Wert liegt über 5 [136]. Der logP Wert ist der logarithmierte Wert des Wasser/n-Octanol Verteilungskoeffizienten, der zur Abschätzung der Membrangängigkeit und der Bioverfügbarkeit einer Verbindung eingesetzt wird. Typische Wirkstoffe haben einen logP Wert < 5. Zu viele Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren ergeben die Möglichkeit zur vermehrten Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Kopfgruppen der

Membranen und bedingen dadurch eine schlechte Absorption. Die molare Masse über 500 Da schließlich bedeutet eine schlechte Diffusion durch die Membrane.

Da bereits dimere Procyanidine eine molare Masse von etwa 580 Da haben, ist es sehr unwahrscheinlich, dass Oligomere größer als Trimere im Dünndarm in ihrer nativen Form absorbiert werden [137]. Untersuchungen und Beweise zur Absorption von Trimeren liegen in der Literatur bislang nicht vor. Procyanidin B2 wird in Ratten kaum, Procyanidin B3 überhaupt nicht resorbiert [138, 139]. Eine geringe Absorption von einigen Procyanidin-Dimeren scheint jedoch möglich zu sein, da im Plasma von Freiwilligen nach Einnahme eines Kakaotranks eine geringe Menge Procyanidin B2 detektiert werden konnte [140]. Auch Sano et al. konnten im Plasma von Probanden zwei Stunden nach Einnahme von 2,0 g eines procyanidinreichen Traubenkernextraktes etwa 10 nmol/l Procyanidin B1 detektieren [141].

Neben Procyanidinen und monomeren Bestandteilen sind im Pycnogenol-Extrakt noch Glycoside von Phenolcarbonsäuren als konjugierte Substanzen enthalten [2]. Die konjugierten Substanzen müssen größtenteils durch Verdauungsenzyme oder durch die Mikroflora des Darms hydrolysiert werden, bevor eine Absorption stattfinden kann. Dabei erfolgt die Spaltung der Aglykone durch Öffnen des Heterocyclus an verschiedenen Stellen, abhängig von der Struktur. Flavonole werden hauptsächlich zu Hydroxyphenylessigsäuren und Flavone und Flavanone zu Hydroxyphenylpropionsäuren abgebaut. Die gebildeten Phenylcarbonsäuren werden häufig zu Benzoesäurederivaten metabolisiert. Flavanole werden zu Phenylvalerolactonen und Hydroxyphenylpropionsäuren degradiert [128]. So konnten nach Einnahme des Pycnogenol-Extraktes im Urin von Probanden die Valerolactone  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton nachgewiesen werden (Allgemeiner Teil 2.8) [16].

Die mikrobiell erzeugten Metabolite werden in tieferen Darmabschnitten absorbiert [128]. Ein Nachweis hierfür ist die Tatsache, dass einige der aromatischen Benzoesäurederivaten mit niedrigem Molekulargewicht als Biomarker für die Polyphenolaufnahme herangezogen werden. So wurde von Rechner et al. die 3-Hydroxyhippursäure als valider Biomarker für den Metabolismus von Kaffeesäurederivaten *in vivo* identifiziert [142]. Die strukturellen Varianten der mikrobiell erzeugten Metabolite sind sehr groß und bis heute sind noch längst nicht alle identifiziert. Weiterhin müssen interindividuelle Variationen, sowie Einflüsse der Zusammensetzung

der Mikroflora und Nahrungseinflüsse auf die Produktion mikrobieller Metabolite näher untersucht werden.

Polyphenole bzw. ihre Metabolite werden während der Absorption zunächst im Dünndarm und später in der Leber konjugiert. Dieser Prozess umfasst hauptsächlich Methylierung, Sulfatierung und Glucuronidierung. Dabei erfolgt die Methylierung mittels Catechol-o-methyltransferase, die den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin auf Polyphenole mit einer o-Diphenyl-Einheit katalysiert [143]. Die Sulfatierung findet durch Sulfotransferasen statt, die den Transfer einer Sulfateinheit von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat zu Hydroxylgruppen von verschiedenen Substraten (Steroide, Gallensäuren, Polyphenole) katalysieren [144]. Die Glucuronidierung schließlich resultiert aus dem Transfer von Glucuronsäure, katalysiert durch UDP-Glucuronosyltransferasen [145].

Die zirkulierenden konjugierten Derivate von Polyphenolen und ihren Metaboliten können im Blut stark an Albumin gebunden werden. Die Procyanidine B1 und B3 binden zu 92,4 % an Plasmaproteine [54]. Quercetin hat eine hohe Affinität zu Albumin (99 % bei Konzentrationen bis 15 µmol/l), während die Hydroxyzimtsäuren nur eine geringe Affinität, vor allem zu Rinderserumalbumin (BSA) haben [146-148]. Die Affinität von Polyphenolen zu Albumin hängt im Wesentlichen von ihrer Anzahl an Hydroxygruppen ab. Wird die Hydroxygruppe an Position 3 des Quercetins glycosyliert, so wird die Bindung an Albumin wesentlich schwächer [149]. Die Auswirkungen der Bindung von Polyphenolen an Albumin sind noch nicht vollständig geklärt. Dangles et al. zeigten, dass die antioxidative Kapazität von Quercetin, welches an Albumin gebunden war, erhalten geblieben ist, weshalb hier die Bindung keine negativen Auswirkungen zu haben scheint [149].

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen ist ihre Fähigkeit, in Gewebe einzudringen. Nach Gabe radioaktiv-markierter Polyphenole wurden diese unter anderem in Leber, Gehirn, Herz, Niere, Milz, Pankreas, Uterus und Blase von Mäusen und Ratten gefunden [150-152]. Wenige Studien untersuchten bisher die Verteilung von Polyphenolen in menschlichen Geweben. Bei Frauen, die Isoflavone einnahmen, waren Equol-Konzentrationen im Brustgewebe höher als im Serum, was auf eine Akkumulation in bestimmten Zielgeweben schließen lässt [153].

### 5.2.2 Elimination

Metabolite von Polyphenolen können biliär und renal ausgeschieden werden. Große, konjugierte Metabolite mit einer molaren Masse  $> 300$  Da werden hauptsächlich über den biliären Weg ausgeschieden, wohingegen die kleineren Konjugate wie Monosulfate meist renal eliminiert werden [128]. Untersuchungen an Laborratten zeigten je nach Struktur der Polyphenole große Unterschiede im Verhältnis biliärer zu renaler Ausscheidung [154]. Crespy et al. konnten feststellen, dass (+)-Catechin im Gegensatz zu Quercetin und Eriodictyol zu einem sehr kleinen Prozentsatz biliär eliminiert wird [154]. Strukturell könnte dies darin begründet sein, dass Quercetin und Eriodictyol im Gegensatz zu Catechin eine Ketogruppe am C-Ring besitzen.

Einige biliär eliminierte Metabolite von Polyphenolen unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf. Menschliche Darmbakterien besitzen  $\beta$ -Glucuronidasen, die in der Lage sind, aus konjugierten Metaboliten, die mit der Galle sekretiert wurden, Aglykone freizusetzen. Diese Aglykone können wieder reabsorbiert werden. In Plasma von freiwilligen Probanden wurde 10 bis 12 Stunden nach Einnahme von Hesperitin aus Orangensaft ein zweiter Plasmapeak festgestellt, der auf Hesperitin aus dem enterohepatischen Kreislauf schließen ließ [155].

Die renale Ausscheidung von Polyphenolen wurde in vielen Studien untersucht. Die Gesamtmenge der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten korrelierte dabei oftmals grob mit der maximalen Plasmakonzentration [128]. Es wurden beispielsweise zwischen 4 und 30 % der aufgenommenen Flavanone aus Citrusfrüchten mit dem Urin ausgeschieden [156, 157], die Werte für Isoflavone lagen mit 16 bis 66 % sogar noch höher [158, 159]. Für Catechine aus Tee wurde eine renale Exkretion von 0,5 bis 6 % gefunden [160], Große-Düweler bestimmte die Wiederfindung von Ferulasäure mit 36 bis 43 % und die des Taxifolins mit 7 bis 8 % im Urin nach Pycnogenol-Gabe [16]. In Untersuchungen von Virgili et al. wurde renal eliminierte Ferulasäure als Markersubstanz für die Aufnahme von Pycnogenol herangezogen [161]. Es wurde festgestellt, dass die Menge an Ferulasäure, die im Urin wiedergefunden wurde (1,3 mg, respektive 2,2 mg), mit der eingenommenen Pycnogenol-Menge (100 mg, respektive 200 mg) in direkter positiver Korrelation stand.

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Inhaltsstoffe des Pycnogenol-Extraktes nach oraler Gabe resorbiert werden und ob die von Große Düweler nach Pycnogenol-Einnahme in Urin nachgewiesenen Valerolactone auch im Plasma zu detektieren sind.

### **5.3 Bestimmung der Wiederfindung nach Extraktion von Dimeren/Trimeren aus dem Gesamtextrakt Pycnogenol (Fraktion II/Fraktion III)**

Die Identifizierung und Quantifizierung von Inhaltsstoffen und/oder Metaboliten wurde mittels HPLC-Analytik durchgeführt (Experimenteller Teil, 6). In Vorversuchen, sowie bei der Methodvalidierung wurde gezeigt, dass sowohl die monomeren Extraktbestandteile (+)-Catechin, Kaffeesäure, Taxifolin und Ferulasäure, als auch die Metabolite M1 und M2 durch die entwickelten Methoden mit ausreichender Selektivität detektiert werden können (Experimenteller Teil, 6.5.1). Weiterhin sollte gezeigt werden, dass durch die hier verwendeten Extraktions- und Analysenmethoden auch Dimere und Trimere des Extraktes im Plasma nachzuweisen wären, sofern eine Absorption dieser im Körper stattfindet (Allgemeiner Teil, 5.2.1).

Dazu wurden die Fraktionen II und III des Gesamtextraktes (Zusammensetzung siehe Einleitung) 30 Minuten lang mit Plasmaproben inkubiert, diese anschließend mit Ethylacetat aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert (Experimenteller Teil 6.6). Eine methanolische Lösung der Fraktion II wies nach Injektion 18 detektierbare Substanzen auf, von denen 16 aus Plasma zu extrahieren waren (Wiederfindung 12,51 bis 98,47 %, Mittelwert 50,42 %), wohingegen von neun detektierbaren Substanzen der methanolischen Lösung von Fraktion III vier extrahiert werden konnten (Wiederfindung 11,37 bis 55,66 %, Mittelwert 30,56 %; Experimenteller Teil, 6.6.3). Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl viele Di- und Trimere, als auch einige höhere Oligomere mit der hier entwickelten Methode aus Plasma extrahierbar sind.

Zur näheren Identifizierung der unbekanntenen Peaks wurden nachträglich noch die Reinsubstanzen Procyanidin B1 und Procyanidin B2 chromatographiert. Procyanidin B1 ist in Fraktion II vorhanden, was anhand der Retentionszeiten und durch Zumischen bestätigt wurde. Procyanidin B2 dagegen konnte weder in Fraktion II noch in Fraktion III detektiert werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Pirasteh, der die dimeren Procyanidine B1, B3, B6 und B7 als Bestandteile des Pycnogenol-Extraktes identifizieren konnte [1]. Procyanidin B2 konnte dagegen als Inhaltsstoff des Extraktes nicht nachgewiesen werden.

## **5.4 Pharmakokinetische Studie mit Pycnogenol nach peroraler Einnahme**

Das Ziel der Studie war es, die Kinetik der resorbierbaren Inhaltsstoffe und Metabolite des Pycnogenol-Extraktes im menschlichen Organismus zu untersuchen. Dazu wurden die Probanden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Probanden der ersten Gruppe sollten Steady-state-Bedingungen erreichen, indem sie über einen Zeitraum von fünf Tagen eine gleichbleibende Dosis von 200 mg Pycnogenol erhielten. Die andere Gruppe erhielt eine einmalige Dosis von 300 mg Pycnogenol. Es erfolgten daraufhin Blutabnahmen zu festgelegten Zeitpunkten bis 14 Stunden nach der Einnahme.

### **5.4.1 Diätvorschriften**

Die Bedingungen der mindestens 24-stündigen flavonoidfreien Diät sind im Experimentellen Teil 5.1 beschrieben. Eine flavonoidfreie Diät in Kombination mit der Pycnogenol-Studie ist Voraussetzung um sicherzustellen, dass aufgenommene Flavonoide und Phenolcarbonsäuren ausschließlich aus dem Extrakt stammen. Der Zeitraum von mindestens 24 Stunden sollte zudem gewährleisten, dass sich eventuell auftretende Metabolite von mit der Nahrung zugeführten Flavonoiden nicht mehr im Blut befinden, sondern bereits ausgeschieden sind. Diese Maßnahmen dienen der Vermeidung von zu hohen Plasmakonzentrationen durch Inhaltsstoffe flavonoidhaltiger Nahrung.

## **5.5 Studienergebnisse nach Mehrfachgabe von 200 mg Pycnogenol**

Den fünf freiwilligen Versuchspersonen der Pycnogenol-Kinetikstudie (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, 5) wurde zum Erreichen der Steady-state-Bedingungen fünf Tage lang jeweils 200 mg Pycnogenol pro Tag verabreicht. Die Blutabnahmen erfolgten vor und am fünften Tag vier Stunden nach der letzten Pycnogenol-Einnahme.

Jeweils 2,0 ml der Plasmaproben vor und nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme wurden vor der Aufarbeitung 2 Stunden bei 37 °C mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase inkubiert. Zum Vergleich wurden nochmals 1,0 ml der Proben ohne vorhergehende Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase aufgearbeitet. Dadurch sollte festgestellt werden, ob und zu welchem Prozentsatz Inhaltsstoffe und/oder Metabolite des



Pycnogenol-Extrakt im Plasma an Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert vorliegen (Allgemeiner Teil, Kapitel 5.2.1). Nach der Aufarbeitung erfolgte die Aufnahme der Proben in 100 µl (bei Einsatz von 2,0 ml Plasma), respektive 50 µl (bei Einsatz von 1,0 ml Plasma) Methanol und anschließend die Analyse mittels HPLC (Experimenteller Teil, Kapitel 6.2).

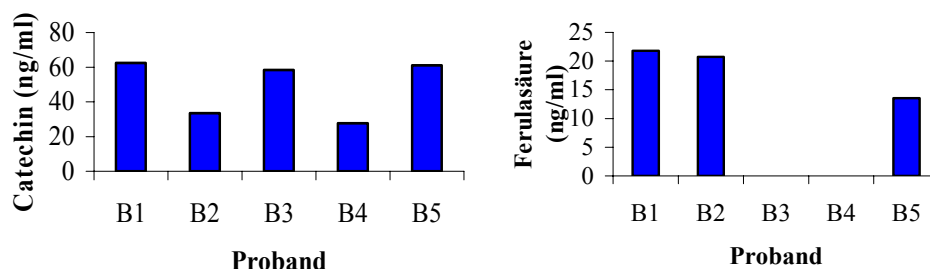
### **5.5.1 Konzentrationen von detektierten Substanzen in den Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen nach Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase**

Es konnten in den Chromatogrammen der Proben nach Pycnogenol-Einnahme Peaks von Substanzen festgestellt werden, die in den Chromatogrammen der Proben vor Einnahme nicht vorhanden waren (Tabellarischer Anhang, 4.1). Dabei handelte es sich sowohl um die bekannten Inhaltsstoffe Catechin, Kaffeesäure und Ferulasäure und um den Metaboliten M1, als auch um unbekannte Substanzen. Somit wurde gezeigt, dass Inhaltsstoffe des Extraktes vom Körper absorbiert wurden.

Die unbekannt Substanzen werden im Folgenden anhand ihrer Retentionszeiten mit U1 bis U10 bezeichnet (Tabellarischer Anhang, 4.1). Diese Peaks wiesen keine Retentionszeiten mit bekannten Extraktbestandteilen auf, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um (-)-Epicatechin, p-Hydroxybenzoesäure, Cumarsäure, Vanillinsäure, Sinapinsäure und um M2 handelt. Einige Retentionszeiten von unbekannt Substanzen aus den Plasmaproben der Studienteilnehmer liegen im Bereich der Retentionszeiten, die von Bestandteilen der Fraktion II und III gefunden wurden. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein von Dimeren und eventuell sogar Trimeren im Plasma von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme sein. Die Identifizierung dieser Substanzen mittels HPLC/MS-MS (Quadrupol) konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die Sensitivität der HPLC/MS-MS für die geringen Konzentrationen, in denen diese Substanzen im Plasma vorhanden waren, nicht ausreichte. Deshalb sollte in weiterführenden Arbeiten der Einsatz des sensitiveren Triple-Quadrupols in Erwägung gezogen werden.

Die Konzentrationen der bekannten Substanzen im Plasma, sowie die Verhältnisse der Flächen der unbekannt Substanzen zum jeweiligen Internen Standard, zeigten erwartungsgemäß große interindividuelle Schwankungen. Die Konzentrationen an Catechin, die im Plasma der Probanden vier Stunden nach der letzten

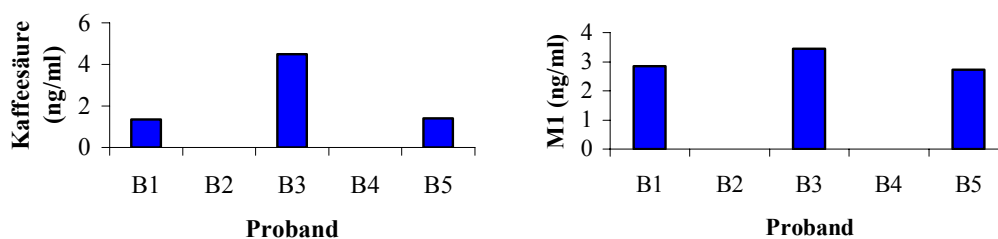
Pycnogenol-Einnahme zu messen waren, variierten zwischen 27,6 ng/ml (Proband B4) und 62,4 ng/ml (Proband B1) (Abbildung 23). Ferulasäure konnte im Plasma der Probanden B3 und B4 vier Stunden nach Abnahme nicht nachgewiesen werden; die Konzentrationen im Plasma der Probanden B1, B2 und B5 lagen im Bereich zwischen 13,55 (Proband B5) und 21,82 (Proband B1) ng/ml (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Konzentrationen (ng/ml) von Catechin (links) und Ferulasäure (rechts) in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol.**

Kaffeesäure konnte im Plasma der Probanden B2 und B4 nicht nachgewiesen werden, die Schwankungen der Plasmakonzentrationen der Probanden B1, B3 und B5 betrug zwischen 1,35 (Proband B1) und 4,5 (Proband B3) ng/ml (Abbildung 24).

Als letzte bekannte Substanz konnte schließlich der Metabolit M1 in den Plasmaproben der Probanden B1, B3 und B5 nachgewiesen werden. Es wurden sehr niedrige Konzentrationen zwischen 2,73 (Proband B5) und 3,44 (Proband B3) ng/ml detektiert (Abbildung 24).

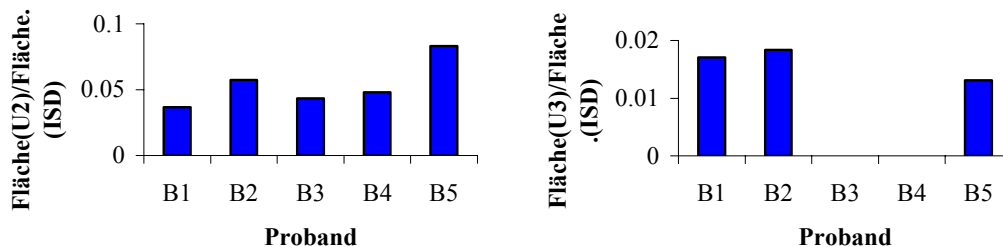


**Abbildung 24: Konzentrationen (ng/ml) von Kaffeesäure (links) und M1 (rechts) in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol.**

Die nach Enzymbehandlung gefundenen Konzentrationen der bekannten Substanzen fallen in der Reihenfolge Catechin > Ferulasäure > Kaffeesäure > M1 ab. Dies stimmt bei

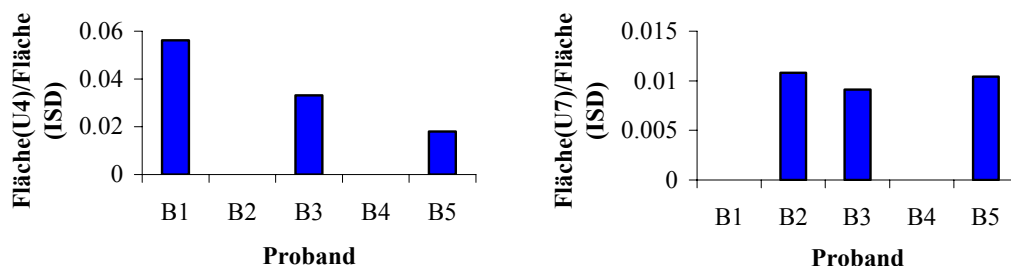
den ersten drei Substanzen mit dem mengenmäßigen Vorkommen im Extrakt überein. Demnach sind in einem Milligramm des Pycnogenol-Extraktes 9,35 µg Catechin, 3,25 µg Ferulasäure und 1,75 µg Kaffeesäure enthalten. M1 bleibt von der Betrachtung ausgeschlossen, da es als Metabolit erst im Körper aus Catechin entsteht. Catechin könnte darüber hinaus auch durch Spaltung von Polymeren, wie Procyanidin B3 entstehen. Würde diese Spaltung in großem Umfang stattfinden, so sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Epicatechin aus Polymeren entsteht und nachzuweisen ist. In keiner der untersuchten Plasmaproben nach Pycnogenol-Einnahme war jedoch Epicatechin zu detektieren, so dass die Spaltung wahrscheinlich nur in geringem Maße vonstatten geht.

Von den unbekannt Substanzen konnten nur die Verhältnisse der Peakflächen der jeweiligen Substanz zur Fläche des Internen Standards berechnet werden. Die Substanz U2 (Retentionszeit 5,4 Minuten) war bei allen Probanden nach Pycnogenol-Einnahme im Plasma vorhanden. Die Flächenverhältnisse schwankten zwischen 0,0367 (Proband 1) und 0,0832 (Proband B5) (Abbildung 25). Substanz U3 (Retentionszeit 13,4 Minuten) fand sich nur in den Plasmaproben der Probanden B1, B2 und B5, mit relativ geringen interindividuellen Unterschieden im Bereich zwischen 0,0131 (Proband B5) und 0,0184 (Proband B2) (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Flächenverhältnisse von U2 (links) und U3 (rechts) zu den jeweiligen Internen Standards, detektiert in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol.**

Die letzten beiden unbekannt Substanzen, die im Plasma der Probanden, die Steady-state-Bedingungen erreicht hatten, nach Pycnogenol-Einnahme auftraten, waren U4 (Retentionszeit 14,5 Minuten) und U7 (Retentionszeit 17,2 Minuten).

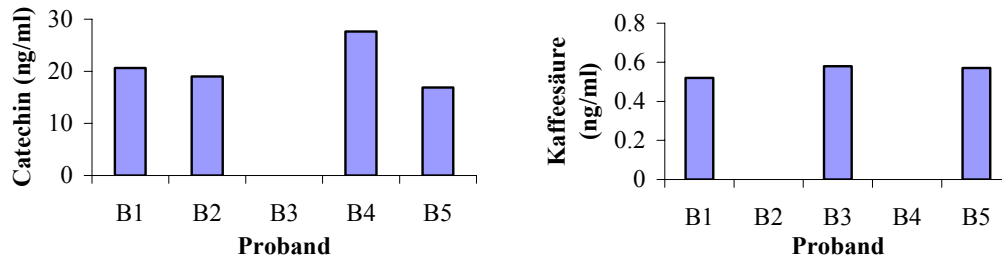


**Abbildung 26: Flächenverhältnisse von U4 (links) und U7 (rechts) zu den jeweiligen Internen Standards, detektiert in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol.**

U4 kam mit großen interindividuellen Schwankungen in den Plasmaproben der Probanden B1, B3 und B5 vor (0,0180, Proband B5 bis 0,0562, Proband B1) (Abbildung 26). Geringe Unterschiede in den Flächenverhältnissen waren bei U7 zu beobachten. Diese Substanz erschien bei drei der fünf Probanden im Plasma, mit Flächenverhältnissen zwischen 0,0091 (Proband B3) und 0,0108 (Proband B2) (Abbildung 26).

### **5.5.2 Konzentrationen von detektierten Substanzen in den Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen ohne Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase**

Die Chromatogramme der Plasmaproben, die vor der Aufarbeitung nicht mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase inkubiert wurden, wiesen deutlich weniger Peaks nach Pycnogenol-Einnahme auf, als die Chromatogramme der mit den Enzymen inkubierten Proben. Die Konzentrationen an Catechin und Kaffeesäure waren geringer als bei den enzyminkubierten Plasmaproben. Im Plasma des Probanden B3 konnte überhaupt kein freies Catechin nachgewiesen werden. Dessen Konzentration lag möglicherweise unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 27). Die Konzentrationen an freier Kaffeesäure waren bei allen Probanden niedrig und wiesen im Gegensatz zu den enzyminkubierten Proben kaum interindividuelle Schwankungen auf (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Konzentrationen (ng/ml) von Catechin (links) und Kaffeesäure (rechts) in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol. Ohne Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase.**

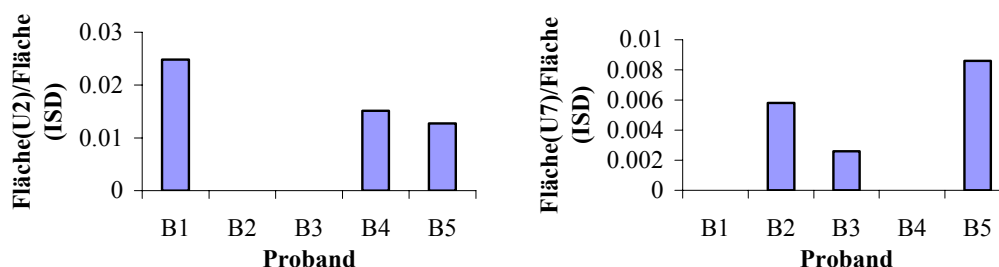
Bei keinem der fünf Probanden konnte im Plasma ohne vorherige Enzyminkubation unkonjugiert vorliegende Ferulasäure und unkonjugiert vorliegendes M1 detektiert werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine 100 %ige Glucuronidierung und Sulfatierung dieser Substanzen stattgefunden haben muß. Es ist denkbar, dass sehr geringe Konzentrationen unkonjugiert vorliegen und mit den gegebenen Detektionsmöglichkeiten nicht mehr zu identifizieren waren. So war beispielsweise die Detektionsgrenze von M1 (etwa 1 ng/ml) bei den behandelten Proben, die eine mittlere Konzentration von etwa 2,5 ng/ml hatten, fast erreicht.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass von M1 möglicherweise nur sehr geringe Konzentrationen unkonjugiert vorhanden sind, steht im Einklang mit den Untersuchungen von Meng et al. [162]. Nach Einnahme von Grünem Tee wurde in Plasma und Urin der Probanden mikrobielle Metabolite, darunter auch M1 gefunden, das vorwiegend in konjugierter Form vorlag und erst nach Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase detektiert werden konnte.

Virgili et al. konnten nach Einnahme von 200 mg Pycnogenol freie Ferulasäure im Urin von Probanden detektieren, nicht jedoch nach Einnahme von 100 mg Pycnogenol [161]. Es wurde in diesen Untersuchungen vermutet, dass die Konzentration an Ferulasäure bei der Konjugation eine Rolle spielt und dass höhere Ferulasäurekonzentrationen die Enzymkapazität überschreiten. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Enzymkapazität bereits nach Einnahme von 200 mg überschritten wurde, ist allerdings nicht sehr hoch. Große Düweler konnte nach Einnahme von 5,28 g Pycnogenol einen höheren Anteil konjugiert vorliegender Ferulasäure im Urin detektieren als nach Einnahme von 1,06 g Pycnogenol [16]. Selbst bei diesen hohen Mengen war keine frei vorliegende Ferulasäure im Urin zu detektieren. Beide Tatsachen sprechen dafür, dass die

Kapazität der Enzyme nicht überschritten war. In der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen frei vorliegender Ferulasäure nach Mehrfachgabe als Konzentrations- bzw. Detektionsproblem anzusehen und nicht im Überschreiten der Enzymkapazität.

Von den unbekannt Substanzen konnten im Plasma ohne Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase lediglich U2 und U7 identifiziert werden.



**Abbildung 28: Flächenverhältnisse von U2 (links) und U7 (rechts) zu den jeweiligen Internen Standards, detektiert in Plasmaproben der Probanden B1-B5 nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol. Ohne Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase.**

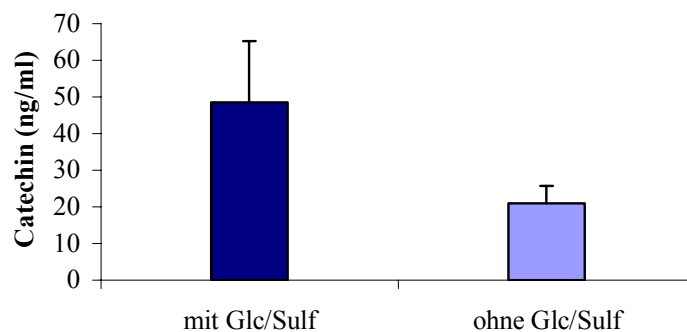
Die Flächenverhältnisse waren bei beiden Substanzen deutlich niedriger als die für die behandelten Proben errechneten. Im Plasma der Probanden B2 und B3 konnte kein frei vorliegendes U2 detektiert werden (Abbildung 28). Es kann vermutet werden, dass auch in diesen beiden Fällen die Konzentrationen so gering waren, dass die Detektionsgrenze nicht erreicht wurde.

Von den Substanzen U3 und U4 lagen in keiner Plasmaprobe der Probanden detektierbare Konzentrationen unkonjugiert vor. Der Großteil dieser Substanzen scheint daher im Plasma konjugiert vorzuliegen. Durch die Konjugation wurden offenbar die Substanzeigenschaften so sehr verändert, dass unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen keine Detektion mehr möglich war. Dies bedeutet, dass auch keine neuen Peaks in den Chromatogrammen auftauchten.

### **5.5.3 Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Inkubation mit $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase**

Die unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Flächenverhältnisse der Substanzen, die mit und ohne  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase-Behandlung in den Plasmaproben der Probanden nach fünftägiger Einnahme von 200 mg Pycnogenol nachzuweisen waren, sollten im Folgenden direkt gegenübergestellt und vergleichend diskutiert werden.

Die mittlere Konzentration an Catechin, die in den Plasmaproben der Probanden nach Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase ermittelt werden konnte, lag bei  $48,6 \pm 16,7$  ng/ml, die ohne Behandlung bei  $21,0 \pm 4,7$  ng/ml (Abbildung 29). Die interindividuellen Schwankungen im Grad der Glucuronidierung waren stark ausgeprägt. Da bei einem Probanden Catechin in der unbehandelten Probe nicht mehr zu detektieren war, konnte eine nahezu vollständige Konjugation von 100 % angenommen werden. Der Grad der Glucuronidierung lag somit zwischen 0 % (Proband B4) und 100 % (Proband B3); im Mittel waren 56,5 % des absorbierten Catechins mit Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugiert.

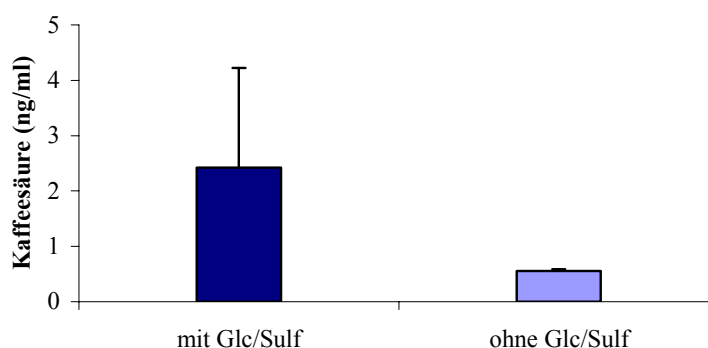


**Abbildung 29: Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) der Konzentrationen von Catechin, ermittelt aus den behandelten und unbehandelten Plasmaproben von vier Probanden nach fünftägiger Einnahme von Pycnogenol. Mit Glucuronidase (Glc) und Sulfatase (Sulf) entspricht der Gesamtkonzentration, ohne Glc/Sulf der freien Konzentration.**

In Untersuchungen von Bell et al. zur Absorption von (+)-Catechin aus Rotwein konnten die extrahierbaren Catechinkonzentrationen aus Humanplasma nach Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase um das dreifache im Vergleich zu den Proben ohne Behandlung gesteigert werden [163]. In der vorliegenden Arbeit war die Konzentration an Catechin nach Behandlung mit einem 2,3-fach höheren Wert nur geringfügig unter der von Bell et al. gefundenen.

Kaffeesäure konnte im behandelten Plasma der Probanden im Mittel mit einer Konzentration von  $2,42 \pm 1,80$  ng/ml nachgewiesen werden, im unbehandelten Plasma dagegen nur mit einer Konzentration von  $0,56 \pm 0,03$  ng/ml (Abbildung 30). Es waren je nach Proband von 59,6 % (Proband B5) bis 87,1 % (Proband B3) der Kaffeesäure glucuronidiert bzw. sulfatiert (Mittelwert: 76,9 %). Die glucuronidierten/sulfatierten Proben wiesen erneut hohe interindividuelle Schwankungen auf (Abbildung 30).

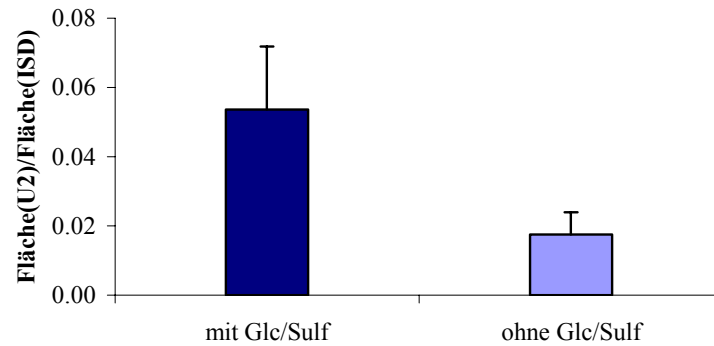
Der Grad der Konjugation steht im Einklang mit Untersuchungen von Nardini et al. über die Absorption von Phenolcarbonsäuren im Menschen nach Konsum einer Tasse aufgebrühten Kaffees [164]. Plasmaproben wurden vor, sowie eine und zwei Stunden nach der Einnahme abgenommen und auf Phenolcarbonsäuren, unter anderem auf Kaffeesäure, untersucht. Die Analyse der Plasmaproben mit und ohne  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase-Behandlung ergab, dass eine Stunde nach Kaffeekonsum 77,06 % und zwei Stunden nach Kaffeekonsum 67,72 % der Kaffeesäure im Plasma glucuronidiert bzw. sulfatiert vorlagen. Kaffeesäure war demnach in beiden Fällen zu einem hohen Prozentsatz konjugiert. Die Mittelwerte stimmen gut mit den eigenen Ergebnissen überein.



**Abbildung 30: Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) der Konzentrationen von Kaffeesäure, ermittelt aus den behandelten und unbehandelten Plasmaproben von drei Probanden nach fünftägiger Einnahme von Pycnogenol. Mit Glucuronidase (Glc) und Sulfatase (Sulf) entspricht der Gesamtkonzentration, ohne Glc/Sulf der freien Konzentration.**

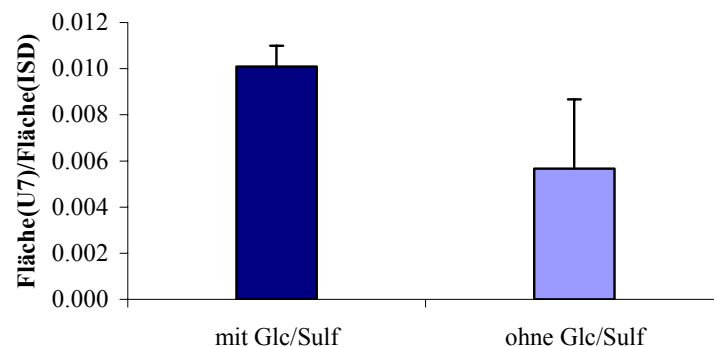
Die Flächenverhältnisse der unbekanntes Substanz U2 wurden in den behandelten Plasmaproben im Mittel mit 0,0537 errechnet, die in den unbehandelten Proben mit 0,0175 (Abbildung 31). Dabei waren je nach Proband zwischen 32,4 % (Proband B1) und 100 % (Proband B5) konjugiert (Mittelwert: 77,13 %). Die interindividuellen Schwankungen waren auch hier wieder ausgeprägt.





**Abbildung 31: Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) der Flächenverhältnisse von U2, ermittelt aus den behandelten und unbehandelten Plasmaproben von drei Probanden nach fünftägiger Einnahme von Pycnogenol. Mit Glucuronidase (Glc) und Sulfatase (Sulf) entspricht dem Gesamtanteil, ohne Glc/Sulf dem freien Anteil.**

Die letzte Substanz, die sowohl in den enzymbehandelten als auch in den unbehandelten Plasmaproben der Probanden der Steady-state-Bedingungen zu detektieren war, war die unbekannte Substanz U7. Die Flächenverhältnisse der behandelten Plasmaproben waren im Mittel 0,0101, während die der unbehandelten Proben 0,0057 betragen (Abbildung 32). Der Grad der Glucuronidierung unterlag hier mit zwischen 17,3 % (Proband B5) und 71,4 % (Proband B3) großen interindividuellen Schwankungen. Die Glucuronidierung war mit 43,6 % im Mittel am geringsten von allen vier beschriebenen Substanzen. Die Tendenz der Schwankungen war im Vergleich zu den anderen Substanzen interessanterweise gegengleich: Die Konzentration an freiem U7 wies hier hohe interindividuelle Unterschiede auf, wohingegen die Konzentration an glucuronidiertem/sulfatiertem U7 geringe Schwankungen erkennen ließ (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Mittelwerte und Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) der Flächenverhältnisse von U7, ermittelt aus den behandelten und unbehandelten Plasmaproben von drei Probanden nach fünftägiger Einnahme von Pycnogenol. Mit Glucuronidase (Glc) und Sulfatase (Sulf) entspricht dem Gesamtanteil, ohne Glc/Sulf dem freien Anteil.**

Es wurde durch den Vergleich der mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase behandelten mit den unbehandelten Plasmaproben der Probanden der Steady-state-Bedingungen gezeigt, dass die meisten Substanzen, sowohl die Inhaltsstoffe des Pycnogenol-Extraktes als auch der Metabolit M1 im Körper größtenteils an Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugiert wurden. Diese Konjugation unterlag sowohl großen individuellen, als auch substanzspezifischen Schwankungen.

Es stellt sich daher die Frage, ob der Prozess der Glucuronidierung/Sulfatierung stets größeren interindividuellen Schwankungen unterliegt. Eine starke interindividuelle Variabilität (2 bis 20 %) im Grad der Glucuronidierung/Sulfatierung von Ferulasäure wurde auch von Virgili et al. im Urin von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme festgestellt [161]. Die physiologische Bedeutung dieser hohen Schwankungen ist noch nicht aufgeklärt, es wird allerdings ein genetischer Polymorphismus der Enzyme (UDP-Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen) dafür verantwortlich gemacht [165-167].

### **5.6 Studienergebnisse nach Einmaldosis von 300 mg Pycnogenol**

Elf Probanden erhielten nach einer flavonoidfreien Diät eine einmalige Dosis von 300 mg Pycnogenol. Durch Blutabnahmen über einen Zeitraum von 14 Stunden sollte mit diesen Proben die Konzentrations-Zeit-Verläufe und die Pharmakokinetik der bekannten Bestandteile erstellt, sowie eventuell unbekannte auftretende Substanzen aufgezeigt werden (siehe Studiendesign Experimenteller Teil, 5). Die Plasmaproben wurden analog den Proben der Steady-state-Bedingungen (Experimenteller Teil, 6.4) aufgearbeitet, wobei hier ausnahmslos eine Behandlung aller Proben mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase erfolgte. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Aufnahme der Proben in 100  $\mu$ l Methanol und anschließend die Analyse mittels HPLC (Experimenteller Teil, 6.2).

Alle Peaks von Substanzen, die in den Chromatogrammen der Plasmaproben der Probanden nach Extrakteinnahme im Vergleich zu den Chromatogrammen vor der Einnahme erschienen waren, wurden ausgewertet (Tabellarischer Anhang, 4.1). Im Folgenden wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrations- bzw. Flächenverhältnis-Zeit-Verläufe aller detektierten Substanzen in den Plasmaproben der elf Studienteilnehmer dargestellt. Dabei wurde die Einteilung gemäß zeitlichem Auftreten der Maxima bzw. der Anzahl der Maxima vorgenommen. Zum Vergleich ist bei jeder

Substanz, die auch im Steady-state erschienen ist, der jeweilige Mittelwert der Konzentration mit Standardabweichung bzw. Mittlerer Abweichung vom Mittelwert (MA) in den Diagrammen dargestellt. Da die Steady-state-Proben vier Stunden nach Extrakteinnahme abgenommen wurden, wurde der Wert, der die jeweilige Konzentration repräsentiert, zu diesem Zeitpunkt abgebildet.

### **5.6.1 Substanzen mit einem Plasma-Konzentrations-Maximum unter fünf Stunden**

Von allen detektierten Substanzen zeigten erwartungsgemäß Kaffeesäure und Ferulasäure als kleinere Phenolcarbonsäuren, sowie Catechin frühe Maxima, die zwischen einer und vier Stunden nach Extrakteinnahme lagen. Die unbekannte Substanz U10 mit einer relativ späten Retentionszeit von 35,8 Minuten wies ebenfalls ein sehr frühes Maximum auf (Abbildung 33).

Der Konzentrationsverlauf von Catechin zeigte in den ersten vier Stunden einen steten Anstieg bis etwa 100 ng/ml im Maximum bei vier Stunden. Der Vergleich mit dem Mittelwert der Steady-state-Proben zeigte, dass dieser mit etwa 48 ng/ml zwar sehr viel niedriger lag, aber trotzdem noch in einem Bereich, in dem auch die interindividuellen Schwankungen der einmaligen Einnahme zu finden waren. Eine niedrigere Konzentration im Steady-state kann auch daraus resultieren, dass dort eine geringere Dosis an Pycnogenol, statt 300 mg nur 200 mg, verabreicht wurde. Der weitere Konzentrationsverlauf der einmaligen Einnahme zeigte bei sechs Stunden einen Abfall auf etwa 40 ng/ml. Diese Konzentration blieb bis 12 Stunden nach der Einnahme dann nahezu konstant. Dies könnte daran liegen, dass Catechin aus dem Abbau von Oligomeren in geringem Ausmaß vermutlich immer wieder neu entsteht und die Konzentration so über einen längeren Zeitraum kaum abnimmt.

Das Maximum der Kaffeesäurekonzentration (10,4 ng/ml) lag im untersuchten Zeitraum von 14 Stunden ebenfalls bei vier Stunden. Der Mittelwert der Kaffeesäurekonzentration der Steady-state-Proben war mit 2,42 ng/ml niedriger, jedoch erneut im Bereich der interindividuellen Schwankungen der Einmalgabe. Im weiteren Verlauf der Plasmaspiegelkurve sanken die Konzentrationen auf einen Wert von etwa 3 ng/ml ab.

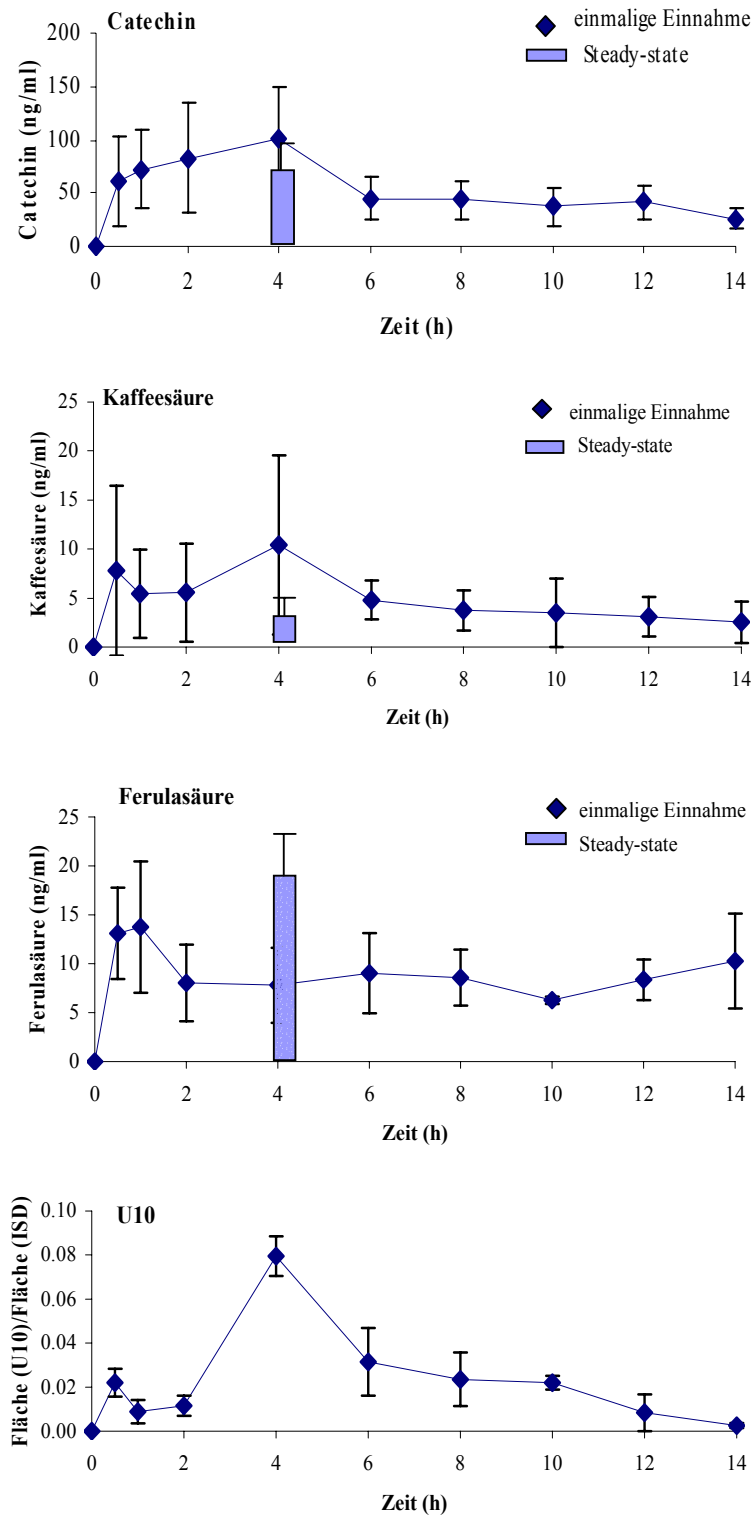


Abbildung 33: Verlauf der Plasmaspiegel von Catechin, Kaffeesäure, Ferulasäure und U10; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen messbarer Konzentrationen von sechs (U10) bis neun Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol.

Der Vergleich mit den Untersuchungen der Plasmakonzentrationen von Kaffeesäure nach Kaffeekonsum von Nardini et al. zeigt Unterschiede in den Zeitpunkten maximaler Plasmakonzentrationen [164]. Nardini et al. fanden bereits eine Stunde nach Kaffeekonsum maximale Plasmaspiegel, während diese in der vorliegenden Arbeit erst vier Stunden nach Extrakteinnahme festgestellt werden konnten. Ein Grund hierfür könnte in der Formulierung liegen, da aus der Pycnogenol-Tablette Kaffeesäure nicht so schnell verfügbar ist als aus Kaffee, wo Kaffeesäure schon gelöst vorliegt. Zum anderen ist aber der Beobachtungszeitraum von Nardini et al. mit zwei Blutabnahmen innerhalb von zwei Stunden sehr knapp gewählt worden. Der weitere Verlauf der Plasmaspiegelkurve bleibt unklar, so dass direkte Vergleiche mit der vorliegenden Arbeit schwierig sind.

Die maximalen Plasmakonzentrationen von Ferulasäure wurden mit etwa 15 ng/ml bereits eine halbe Stunde respektive eine Stunde nach Extrakteinnahme erreicht. Danach erfolgte ein Abfall der Plasmakonzentration auf etwa 7 ng/ml im Bereich von zwei bis zehn Stunden nach der Einnahme. Ab zwölf Stunden nach der Pycnogenol-Einnahme schien die Plasmakonzentration wieder leicht anzusteigen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Wittmer et al. zur Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Artischockenextrakten im Menschen [168]. Dort wurde ein nahezu biphasisches Eliminationsprofil von Ferulasäure gefunden, mit maximalen Plasmakonzentrationen eine Stunde nach Einnahme des Artischockenextraktes. Ferulasäure wurde in der Studie von Wittmer et al. unter anderem als Methylierungsprodukt von Kaffeesäure nach der ersten Leberpassage angesehen. Von Moriandi et al. wurde in Untersuchungen an Ratten-Hepatocyten eine Dehydrierung von Dihydroferulasäure, ebenfalls einem mikrobiellen Metabolisierungsprodukt von Kaffeesäure, zu Ferulasäure beschrieben [169]. Diese beiden Arbeiten könnten den in der eigenen Untersuchung gefundenen Anstieg der Plasmakonzentration von Ferulasäure zwölf Stunden nach Extrakteinnahme erklären. Weiterhin steht die relativ hohe mittlere Plasmakonzentration von 18,7 ng/ml der Steady-state-Proben mit diesen Untersuchungen im Einklang. Ein kumulativer Effekt von Ferulasäure als genuiner Extraktbestandteil, sowie als Methylierungsprodukt von Kaffeesäure könnte als Ursache für den hohen Steady-state-Wert angesehen werden.

Das Flächenverhältnis der unbekanntes Substanz U10 zum Internen Standard erreichte vier Stunden nach Extrakteinnahme den maximalen Wert. Im Bereich von sechs bis zehn Stunden blieb dieses Flächenverhältnis auf einem niedrigeren, wenn auch fast gleich

bleibendem Niveau, um ab zwölf Stunden nach Pycnogenol-Einnahme auf einen minimalen Wert abzusinken. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Substanz kein Metabolisierungsprodukt einer anderen Substanz darstellt, da die Konzentration ab zwölf Stunden gegen Null geht. Das relativ frühe Plasmaspiegel-Maximum und die Ähnlichkeit im Plasmaspiegelverlauf mit Kaffeesäure könnten auf das Vorliegen einer Phenolcarbonsäure hinweisen.

### **5.6.2 Substanzen mit einem Plasma-Konzentrations-Maximum zwischen fünf und zehn Stunden**

Zu den Substanzen, die ihre maximalen Plasmaspiegel im Bereich zwischen fünf und zehn Stunden nach Extrakteinnahme aufwiesen, zählte Taxifolin, sowie die unbekanntenen Substanzen U8 und U9 (Abbildung 34). Die Retentionszeiten der beiden Substanzen betragen 20,8, respektive 22,2 Minuten.

Das erste Auftreten von Taxifolin im Plasma der Probanden konnte erst zwei Stunden nach Extrakteinnahme verzeichnet werden. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden mit 40,4 ng/ml acht Stunden nach Extrakteinnahme festgestellt. Nach einem schnellen Abfall der Plasmakonzentrationen auf etwa 15 ng/ml blieb dieser Wert bis 14 Stunden nach Einnahme nahezu konstant. Es konnte kein Taxifolin in den Steady-state-Proben nachgewiesen werden, was an einer zu geringen Plasmakonzentration vier Stunden nach Einnahme von 200 mg Extrakt liegen könnte. Es schienen sich folglich unter Steady-state-Bedingungen keine hohen Plasmaspiegelkonzentrationen an Taxifolin aufzubauen.

Die Substanzen U8 und U9 waren erstmals acht Stunden nach Extrakteinnahme im Plasma zu detektieren und hatten zu diesem Zeitpunkt bereits beide ihre maximalen Plasmaspiegel aufzuweisen. Während sich U8 durch einen schnellen Abfall des Plasmaspiegels auszeichnete, erfolgte der des Plasmaspiegels von U9 erst zehn Stunden nach Einnahme. Da beide Substanzen erst sehr spät nachzuweisen waren und ihre Plasmaspiegel relativ schnell wieder absanken, könnte angenommen werden, dass es sich um Metabolite handelt, die erst aus Extraktbestandteilen gebildet wurden und schnell eliminiert wurden. Dies würde auch erklären, warum keine dieser beiden Substanzen unter Steady-state-Bedingungen nachzuweisen war.

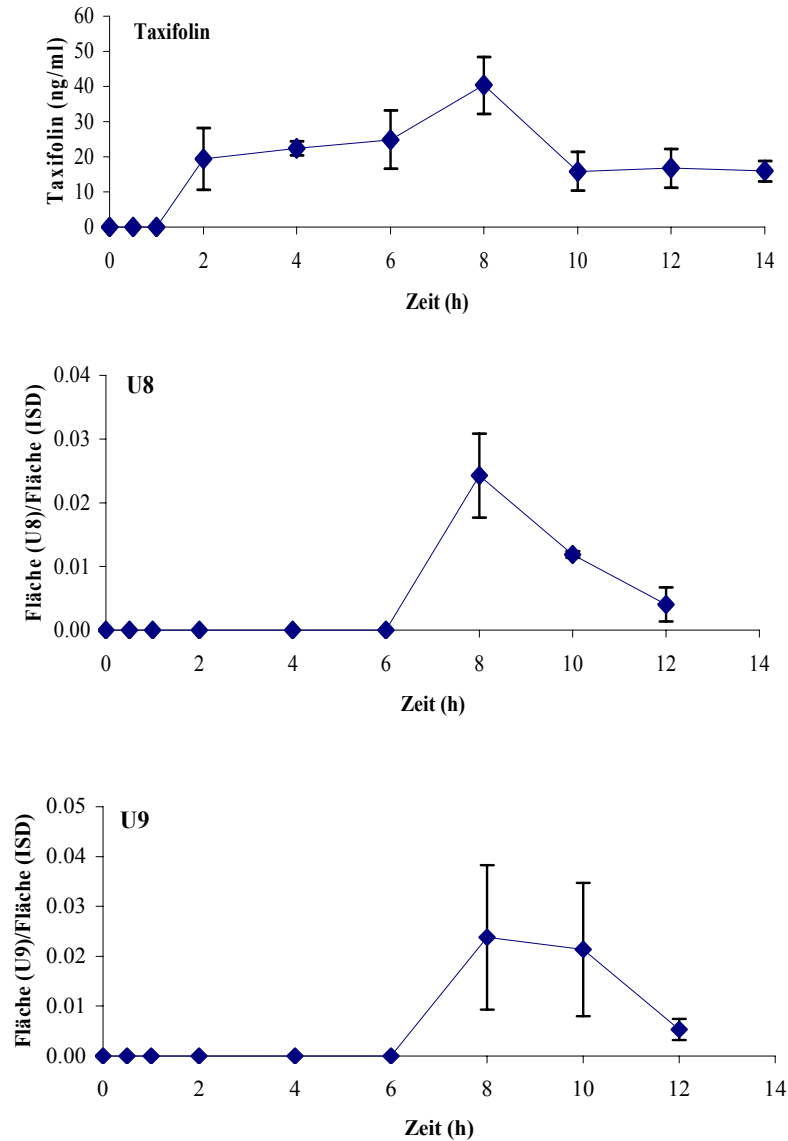


Abbildung 34: Verlauf der Plasmaspiegel von Taxifolin, U8 und U9; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. MA messbarer Konzentrationen von drei (U8) bis sechs Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol.

### 5.6.3 Substanzen mit einem Maximum über zehn Stunden

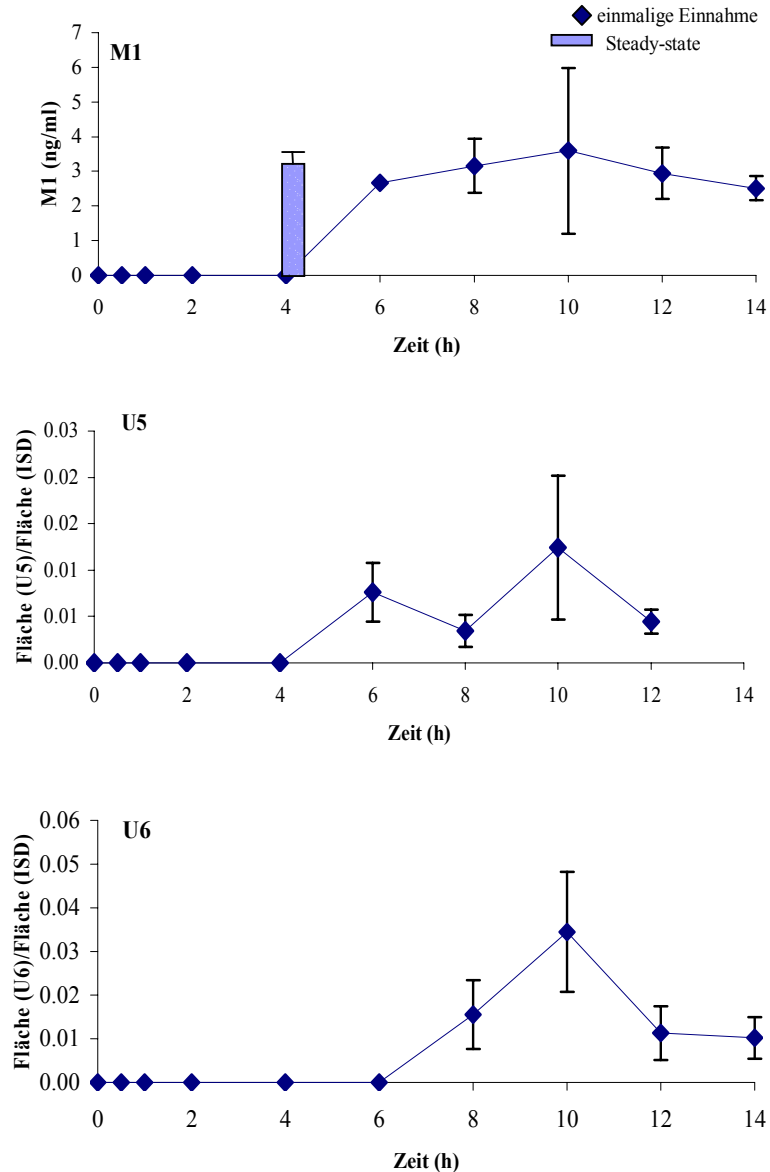
Drei Substanzen konnten im Plasma der Probanden mit maximalen Plasmaspiegeln erst über zehn Stunden nach Pycnogenol-Einnahme nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um den Metaboliten M1, sowie um die unbekannt Substanzen U5 (Retentionszeit 15,5 Minuten) und U6 (Retentionszeit 16,2 Minuten).

M1 konnte im Plasma eines einzigen Probanden bereits sechs, in den Plasmaproben weiterer sechs Probanden erst acht Stunden nach Extrakteinnahme detektiert werden. Maximale Plasmakonzentrationen wurden im Mittel zehn Stunden nach Extrakteinnahme erreicht und waren mit 3,59 ng/ml sehr gering. Die mittlere Konzentration, die nach Mehrfachgabe erreicht wurde, war mit 3,01 ng/ml im Bereich der zwölf Stunden nach Einmalgabe erhaltenen Konzentration. Da M1 vier Stunden nach der Einmalgabe noch nicht im Plasma zu detektieren war, kann davon ausgegangen werden, dass durch eine wiederholte Pycnogenol-Einnahme der Metabolit M1 über längere Zeit im Plasma vorhanden ist. Die Ergebnisse zum späten Auftreten des Metaboliten M1 stehen im Einklang mit Untersuchungen von Große Düweler et al., Li et al. und Lee et al. [16, 170, 171].

Demnach entstehen die Metabolite M1 und M2 durch Metabolisierung von monomeren und/oder oligomeren Catechin- bzw. Epicatechineinheiten mithilfe von Darmbakterien (Allgemeiner Teil 1.8, Abbildung 8, [16]). Die Kinetik dieser Metabolite unterliegt zwar interindividuellen Unterschieden, die maximalen Plasmakonzentrationen werden aber in der Literatur, bedingt durch diese Metabolisierung, mit einer zeitlichen Verzögerung von 5 bis 12 Stunden nach Einnahme procyanidinhaltiger Nahrung angegeben [170, 171]. Lee et al. beschrieben das erste Erscheinen des Dihydroxymetaboliten M1 in menschlichem Plasma drei Stunden nach Aufnahme von Grünem Tee [170]. In der vorliegenden Arbeit erschien M1 frühestens sechs Stunden nach Einnahme, was auf eine wahrscheinlich langsamere Freisetzung und Lösung der Vorläufersubstanzen aus den Tabletten im Vergleich zum Grünen Tee mit seinen bereits gelösten Inhaltsstoffen resultieren könnte.

U5 und U6 könnten ebenfalls Metabolite darstellen, da auch sie frühestens sechs Stunden (U5), respektive acht Stunden nach Einnahme erstmalig zu detektieren waren. U5 und U6 zeigten maximale Plasmaspiegel zehn Stunden nach Extrakteinnahme. Der mittlere Verlauf des U5-Plasmaspiegels wies, bedingt durch hohe interindividuelle Schwankungen zwei Maxima auf, die allerdings individuell nicht bestätigt werden konnten. U5 wurde so schnell wieder eliminiert, dass es vier Stunden später bereits nicht mehr nachzuweisen war. U6 war 14 Stunden nach Einnahme noch zu detektieren, aber auf sehr niedrigem Niveau. Diese Tatsachen könnten erklären, dass weder U5 noch U6 unter Steady-state-Bedingungen nachzuweisen waren.





**Abbildung 35: Verlauf des Plasmaspiegels von M1, U5 und U6; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) messbarer Konzentrationen von vier (U5), fünf (U6), respektive acht (M1) Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol.**

#### 5.6.4 Substanzen mit interindividuell variablen Plasmaspiegel-Maxima

Vier der fünf Substanzen, die im mittleren Plasmaspiegelverlauf interindividuell heterogene Maxima aufwiesen, konnten bislang nicht identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Substanzen mit den Retentionszeiten 5,4 Minuten (U2), 13,4 Minuten (U3), 14,5 Minuten (U4) und 17,2 Minuten (U7). Zur Identifizierung der Substanz U1 wurden im

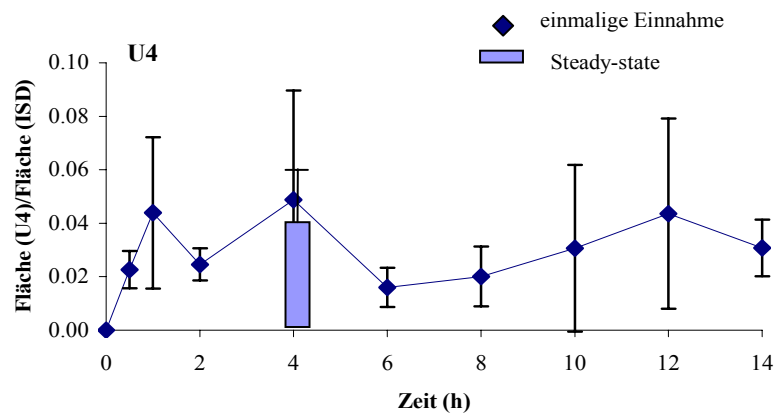
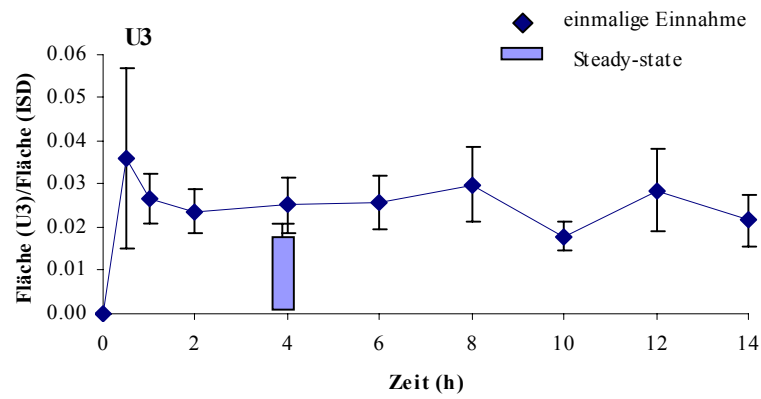
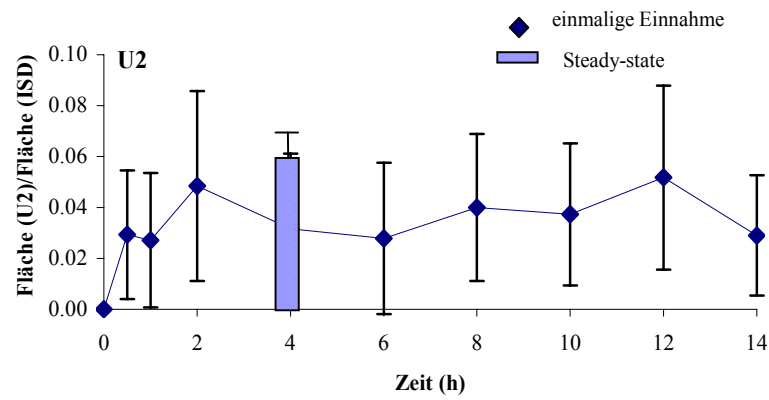
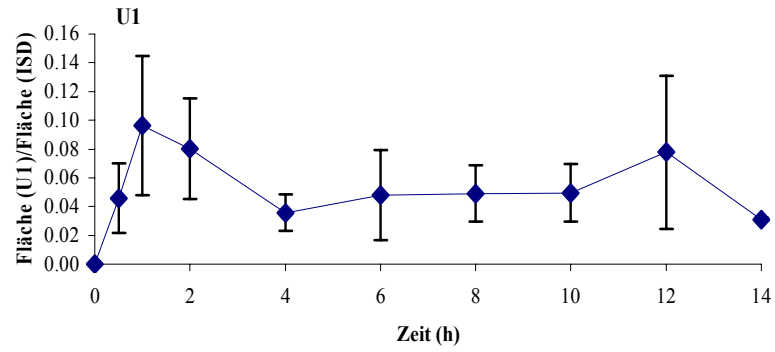
Nachhinein weitere Untersuchungen durchgeführt, die im Folgenden noch erläutert werden.

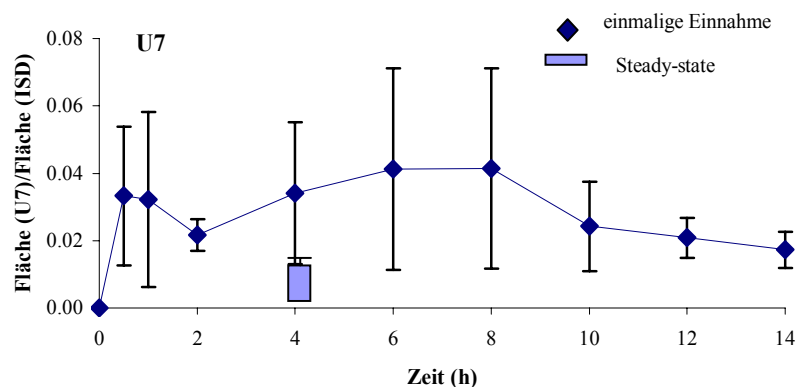
Die Substanzen wiesen im individuellen Verlauf zwei Maxima auf, die in den Darstellungen der Mittelwertskurven zum Teil nicht sehr ausgeprägt zu erkennen waren. Es kann vermutet werden, dass Substanzen mit mehreren Plasmaspiegel-Maxima dem enterohepatischen Kreislauf unterlagen und die weiteren Maxima aus einer erneuten Absorption resultierten. Der biphasische Verlauf kann auch daher rühren, dass ähnlich der Ferulasäure, andere Substanzen zu der jeweiligen Verbindung metabolisiert wurden und dies mit zeitlicher Verzögerung geschah. Eine weitere Erklärung für zwei Maxima wäre die Abspaltung einer Substanz aus Polymeren.

Die Maxima der Substanz U2 waren zwei, respektive zwölf Stunden nach Extrakteinnahme zu detektieren, die von U3 0,5 und acht Stunden nach der Einnahme (Abbildung 36). Substanz U4 zeigte bei der Darstellung der Mittelwerte mehrere Maxima nach einer, vier und zwölf Stunden und damit den ungewöhnlichsten Verlauf der Plasmaspiegelkurve innerhalb aller detektierten Substanzen (Abbildung 36). Die Betrachtung der Plasmaspiegel der einzelnen Probanden zeigte jedoch nur zwei Maxima. Das dritte Maximum entstand lediglich durch die Errechnung und Darstellung der Mittelwerte und spiegelt nicht den eigentlichen Verlauf des Plasmaspiegels von U4 wieder. Daran ist zu erkennen, dass große interindividuelle Unterschiede in den Plasmaspiegelverläufen der Substanzen aufgetreten sind.

U7 wies zwei Plateaus auf, das erste im Zeitraum eine halbe Stunde bis eine Stunde nach Einnahme das zweite im Bereich sechs bis acht Stunden nach Einnahme (Abbildung 36).

U1 war die einzige der Substanzen mit zwei Maxima, die nicht in den Plasmaproben nach Mehrfachgabe zu detektieren war. Alle anderen Substanzen waren sowohl nach Mehrfachgabe, als auch nach der Einmalgabe in den Plasmaproben nachzuweisen, wobei die Plasmaspiegel zum Zeitpunkt vier Stunden sowohl nach Mehrfach- als auch nach Einfachgabe ähnlich waren (U2 bis U4), in allen Fällen jedoch in den Bereichen der interindividuellen Variabilität lagen (U7).





**Abbildung 36: Flächenverhältnis-Zeit-Verlauf von U1, U2, U3, U4 und U7; dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. MA messbarer Konzentrationen von fünf (U1), sieben (U4, U7) und neun (U2, U3) Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol.**

Nachdem uns Procyanidin B1 als Reinsubstanz zur Verfügung stand, lag aufgrund übereinstimmender Retentionszeiten und Bestätigung durch Zumischen der Substanz die Vermutung nahe, dass es sich bei U1 um Procyanidin B1 handeln könnte. Für eine sichere Bestätigung müssen noch weitere Messungen der molaren Masse mittels HPLC-MS-MS (Triple-Quadrupol) durchgeführt werden.

Die Absorption von Procyanidin-Dimeren ist theoretisch möglich, da sie den Magen intakt passieren können. Die Stabilität von Procyanidinen in menschlichem Magensaft wurde nach Einnahme eines procyanidinhaltigen Kakaotranks durch regelmäßige Entnahme von Magensaft untersucht [172]. Diese Studie kam zu dem Ergebnis, dass im sauren Milieu des Magens Procyanidine nicht degradiert werden.

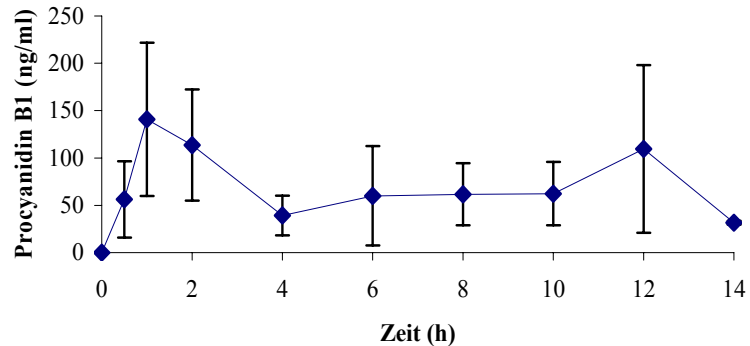
Mittels HPLC-Analytik des Pycnogenol-Extraktes und entsprechend erstellter Kalibriergeraden konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass in 300 mg Gesamtextrakt 5,76 mg Procyanidin B1 enthalten sind. Unter der Annahme, dass es sich bei U1 um Procyanidin B1 handelt, konnten maximale Plasmakonzentrationen zu den Zeitpunkten eine und zwölf Stunden nach Einnahme errechnet werden (Tabelle 5, Abbildung 37).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Konzentration im ersten Maximum war nach Einnahme eines Drittels der Menge an Procyanidin um ein Vielfaches höher als die von Sano et al. detektierte Konzentration nach Einnahme von Procyanidin B1 aus Traubenkernextrakt (Tabelle 5) [141].

**Tabelle 5: Vergleich eigener Ergebnisse der eingenommenen Dosen, Plasmakonzentrationen und Zeitpunkte maximaler Plasmakonzentrationen von Procyanidin B1 mit Literaturwerten.**

	Dosis (mg)	Maximale Plasmakonzentration (ng/ml)	Max. molare Konzentration (nmol/l)	$t_{\max}$ (h)
Eigene Ergebnisse	5,76	140,1	242,2	1
		109,6	189,4	12
Referenz aus Literatur [141]	18	6,4	11	2

Die wesentlich höhere Konzentration nach Pycnogenol-Einnahme könnte darin begründet sein, dass höher oligomere Procyanidine des Pycnogenol-Extraktes zu Procyanidin B1 abgebaut werden und so dessen Plasmakonzentration größer ist. Dafür spricht auch das Auftreten des späten zweiten Maximums zwölf Stunden nach Extrakteinnahme.



**Abbildung 37: Verlauf des Plasmaspiegels des Procyanidins B1 unter der Annahme der Substanzidentität mit U1; dargestellt sind Mittelwerte und Mittlere Abweichungen vom Mittelwert der messbaren Konzentrationen von fünf Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol.**

In Untersuchungen von Holt et al. zur Absorption von Procyanidin B2 aus flavanolreichem Kakao wurde aus einer Dosis von 256 mg aufgenommenen Procyanidin-Dimeren eine Konzentration von 41 nmol/l (23,7 ng/ml) Procyanidin B2 im Plasma wiedergefunden [140]. Damit war die Absorption von Dimeren bei Probanden der Studie von Holt et al. um etwa den Faktor 100 geringer als die Absorption von Monomeren. Diese Ergebnisse konnten unter der Annahme, dass es sich bei U1 um Procyanidin B1 handelt, in

der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Wiederfindungsraten von den monomeren Bestandteilen unterschieden sich nicht wesentlich von der des vermeintlichen Procyanidins B1. Drei Parameter der „rule of five“ sagen eine eher schlechte Absorption von Procyanidin B1 voraus: die molare Masse über 500, die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren über fünf und die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren über zehn (Tabelle 6). Allerdings kann die molare Masse mit 578 Da noch als grenzwertig betrachtet werden, da sie nicht wesentlich über der von Lipinski vorgesehenen Schranke liegt. Die relativ hohen Plasmakonzentrationen an Procyanidin B1, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, sind im Vergleich zu Daten aus Literatur eher bemerkenswert.

Für Catechin, Ferulasäure, Taxifolin und Kaffeesäure sind alle Parameter, die laut Lipinski für die Prognose einer guten Absorption essentiell sind, erfüllt (Tabelle 6). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass alle diese Substanzen im Plasma von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme nachzuweisen waren und somit absorbiert wurden. Dabei zeigten Catechin, Ferulasäure und Kaffeesäure frühe Maxima. Das Maximum von Taxifolin wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt detektiert, die Substanz war allerdings bereits viel früher im Plasma vorhanden.

**Tabelle 6: „Lipinski-Werte“ zur Vorhersage der Absorption von Catechin, Ferulasäure, Taxifolin und Kaffeesäure. MDL<sup>®</sup> QSAR entspricht MDL<sup>®</sup> quantitative structure-activity relationships.**

Substanz	LogP (MDL QSAR)	Wasserstoffbrücken-Donor	Wasserstoffbrücken-Akzeptor	Molare Masse (Da)	Absorption nach Lipinski
Catechin	0,66	5	6	290	gut
Ferulasäure	1,88	2	4	194	gut
Taxifolin	0,73	5	7	304	gut
Kaffeesäure	1,2	3	4	180	gut
Procyanidin B1	0,19	10	12	578	schlecht

## 5.7 Pharmakokinetische Parameter

Für die Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter  $AUC_{[0-t]}$ ,  $AUC_{[0-\infty]}$ ,  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und terminale Halbwertszeit  $t_{1/2}$  war es notwendig, zunächst die Dosis der einzelnen Extraktbestandteile zu bestimmen. Dazu wurden die Tabletten, die die Studienteilnehmer eingenommen hatten, mittels HPLC-Analytik auf ihren Gehalt an Kaffeesäure, Ferulasäure, Taxifolin und Catechin untersucht. Eine Tablette mit jeweils 50 mg Pycnogenol wies eine Menge von 87,5 µg Kaffeesäure, 162,5 µg Ferulasäure, 717,5 µg Taxifolin und 467,5 µg Catechin auf. Auf die Einnahme von 300 mg Pycnogenol hochgerechnet wurden diese Werte für die Pharmakokinetikberechnungen (Tabelle 7) herangezogen. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den erhaltenen messbaren Konzentrationen bzw. Flächenverhältnissen der Substanzen aus Plasmaproben der einzelnen elf Probanden errechnet (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der pharmakokinetischen Parameter von sechs (Taxifolin), sieben (Ferulasäure), acht (M1) bzw. neun (Kaffeesäure, Catechin) Probanden nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme:**

Substanz	n	$AUC_{[0-t]}$ [ng/ml*h]	$AUC_{[0-\infty]}$ [ng/ml*h]	$c_{\max}$ [ng/ml]	$t_{\max}$ [h]	term. $t_{1/2}$ [h]
Kaffeesäure	9	75,66 ± 33,53	82,78 ± 36,47	16,67 ± 13,29	3,7 ± 2,4	4,42 ± 2,47
Catechin	9			107,22 ± 55,49	3,2 ± 1,7	
Taxifolin	6	231,11 ± 85,98	399,14 ± 98,95	33,34 ± 12,54	8,2 ± 2,5	8,89 ± 2,81
Ferulasäure	7	99,05 ± 28,09	141,19 ± 73,90	14,78 ± 5,89	1,2 ± 1,1	6,87 ± 3,83
M1	8			4,11 ± 2,08	10,0 ± 1,9	

Da aus oligomeren Pycnogenol-Bestandteilen im Körper ständig Catechin freigesetzt werden kann und nicht klar ist, wie groß diese Mengen sind [55], war es unmöglich, die mittels HPLC-Analytik ermittelte Catechin-Ausgangskonzentration als Grundlage für die pharmakokinetischen Berechnungen zu verwenden. Aus Catechin entsteht der Metabolit M1, so dass auch hier keine Ausgangskonzentration zugrunde liegt. Somit wurden von Catechin und M1 lediglich  $c_{\max}$  und  $t_{\max}$  bestimmt.

Die maximale Plasmakonzentration von Catechin betrug  $107,2 \pm 55,5$  ng/ml und wurde innerhalb  $3,15 \pm 1,70$  Stunden erreicht (Tabelle 8). In Untersuchungen von Bell et al. zur Absorption von Catechin aus in einem Alkohol-Wasser-Gemisch rekonstituierten Rotwein wurden bereits etwas über eine Stunde nach Einnahme maximale Plasmakonzentrationen von Catechin gefunden [163] (Tabelle 8). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Plasmakonzentration lag fast um den Faktor 5 höher. Da bei beiden Studien keine Ausgangsmengen von Catechin angegeben waren, ist ein Vergleich der Plasmakonzentrationen nur unter Vorbehalt möglich.

**Tabelle 8: Vergleich eigener Ergebnisse der eingenommenen Dosen, Plasmakonzentrationen und Zeitpunkte maximaler Plasmakonzentrationen von Catechin mit Literaturwerten.**

	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Maximale Plasmakonzentration (ng/ml)</b>	<b>Max. molare Konzentration (nmol/l)</b>	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>
Eigene Ergebnisse		$107,2 \pm 55,5$	$369,3 \pm 191,2$	$3,15 \pm 1,70$
Referenz aus Literatur [163]		$22,7 \pm 2,58$	$78,3 \pm 8,9$	$1,44 \pm 0,24$
Referenz aus Literatur [131]	35	26,4	91	1,5

Eine weitere Studie zur Absorption von Catechin aus einem Glas Rotwein zeigte im Mittel nach 1,5 Stunden maximale Plasmakonzentrationen von Catechin auf (Tabelle 8) [131]. Auch hier waren die Plasmakonzentrationen sehr viel niedriger als nach Pycnogenol-Einnahme. Der hauptsächliche Grund für die Verschiebung von t<sub>max</sub> könnte erneut die langsamere Verfügbarkeit des Wirkstoffs aus den verabreichten Tabletten im Vergleich zum bereits gelöst vorliegenden Catechin aus Wein sein. Die in dieser Studie angegebene Menge an Catechin, die in einem Glas Rotwein enthalten ist, sollte eher kritisch betrachtet werden, da die im Rotwein enthaltenen Procyanidine ebenfalls zu Catechinmonomeren abgebaut werden können.

Kaffeensäure wies in den Plasmaproben der Probanden nach  $3,72 \pm 2,36$  Stunden die maximale Plasmakonzentration auf (Tabelle 9).

In Untersuchungen von Simonetti et al. wurden zwischen 0,5 bis einer Stunde nach Konsum von 200 ml Rotwein, die verglichen mit der eingenommenen Pycnogenol-Dosis die dreifache Menge Kaffeesäure enthielten, maximale Plasmakonzentrationen gefunden, die etwas niedriger als die nach Pycnogenol-Einnahme waren (Tabelle 9) [173]. Die



maximalen Plasmakonzentrationen waren nach Pycnogenol-Einnahme erneut sehr viel später zu verzeichnen. Nardini et al. fanden in Plasma von Probanden eine Stunde nach Genuss einer Tasse Kaffee maximale Plasmakonzentrationen an Kaffeesäure [164]. Obwohl die in Kaffee enthaltene Dosis an Kaffeesäure um ein Vielfaches (etwa Faktor 300) höher liegt als die in Pycnogenol, waren die in der Kaffee-Studie gezeigten Plasmakonzentrationen nur um den Faktor 5,5 höher. Die Absorption von Kaffeesäure aus dem Pycnogenol-Extrakt im Vergleich zu Kaffee könnte höher sein, da keine Bindung an Chlorogensäure vorliegt, die die Absorption vermindern könnte [174].

**Tabelle 9: Vergleich eigener Ergebnisse der eingenommenen Dosen, Plasmakonzentrationen und Zeitpunkte maximaler Plasmakonzentrationen von Kaffeesäure mit Literaturwerten.**

	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Maximale Plasmakonzentration (ng/ml)</b>	<b>Max. molare Konzentration (nmol/l)</b>	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>
Eigene Ergebnisse	0,525	16,7 ± 13,3	92,5 ± 73,8	3,72 ± 2,36
Referenz aus Literatur [173]	1,8	6,7 – 10,9	37 - 60	0,5 - 1
Referenz aus Literatur [164]	166	91,1 ± 33,2	505,54 ± 184,24	1

Die maximalen Plasmakonzentrationen von Ferulasäure wurden  $1,19 \pm 1,10$  Stunden nach Extrakteinnahme mit  $14,8 \pm 5,9$  ng/ml bestimmt (Tabelle 10). Die Eliminationshalbwertszeit betrug etwa 6,9 Stunden (Tabelle 10). Dies könnte, wie auch von Wittemer et al. beschrieben, am eher biphasischen Eliminationsprofil der Ferulasäure liegen [168]. Die in der Studie von Wittemer et al. über die Absorption von Flavonoiden nach Einnahme von Artischockenextrakten gefundene Eliminationshalbwertszeit lag im Bereich der nach Pycnogenol-Gabe gefundenen. Ebenso waren die maximalen Plasmakonzentrationen an Ferulasäure im Bereich der in der vorliegenden Arbeit gefundenen, wobei die Menge an mit Artischockenextrakt zugeführter Ferulasäure unbekannt ist. Die maximale Plasmakonzentration an Ferulasäure nach Einnahme der Artischockenextrakte wurde etwas früher detektiert als die maximale Plasmakonzentration an Ferulasäure in der vorliegenden Arbeit.

**Tabelle 10: Vergleich eigener Ergebnisse der eingenommenen Dosen, Plasmakonzentrationen und Zeitpunkte maximaler Plasmakonzentrationen von Ferulasäure mit Literaturwerten.**

	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Maximale Plasmakonzentrationen (ng/ml)</b>	<b>Max. molare Konzentration (nmol/l)</b>	<b>t<sub>½</sub> (h)</b>	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>
Eigene Ergebnisse	0,975	14,8 ± 5,9	76,1 ± 30,3	6,87 ± 3,83	1,19 ± 1,10
Referenz aus Literatur [168]		8,9 bis 15,4	45,8 bis 79,2	5,5 bis 6,5	0,77 ± 0,26
Referenz aus Literatur [175]	260	29,2 bis 40,84	150 bis 210		1 - 3

In Untersuchungen von Kern et al. über den Plasmaspiegel von Ferulasäure, der nach dem Verzehr von Ferulasäure aus Frühstückscerealien resultierte, wurden nach ein bis drei Stunden maximale Plasmakonzentrationen gefunden [175]. Der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration entsprach hier ungefähr dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen. Im Vergleich zur aufgenommenen Ferulasäure-Menge waren allerdings die Plasmakonzentrationen nach Pycnogenol-Einnahme erneut höher (Tabelle 10).

Maximale Plasmakonzentrationen von Taxifolin wurden mit  $33,3 \pm 12,5$  ng/ml ( $109,5 \pm 41,1$  nmol/l) erst  $8,22 \pm 2,54$  Stunden nach Pycnogenol-Einnahme detektiert. Die Eliminationshalbwertszeit wurde mit  $8,89 \pm 2,81$  Stunden berechnet. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Taxifolin im Plasma war zwei Stunden nach Einnahme, wobei der Plasmaspiegel gleich auf ein relativ hohes Niveau anstieg. In der Literatur liegen bislang keine Angaben zu Humanstudien mit Taxifolin vor, die dessen Konzentration nach oraler Aufnahme im Plasma untersuchen. Ein Hinweis für die Absorption von Taxifolin findet sich in Untersuchungen von Große Düweler. Dort konnten nach Einnahme von Pycnogenol 7 bis 8 % des im Extrakt enthaltenen Taxifolins in konjugierter Form im Urin wiedergefunden werden [16]. Dabei wurden maximale Mengen an Taxifolin bis sechs Stunden nach Einnahme von 1,06 g Extrakt detektiert. Im Zeitraum von sechs bis acht Stunden sank die Exkretion auf minimale Werte ab, um nach acht Stunden wieder anzusteigen. Dies könnte bedeuten, dass Taxifolin dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt und zeitlich verzögert eliminiert wird. Die Plasmakonzentrationen von Taxifolin, die in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, zeigten bis zum Maximum bei acht Stunden einen stetigen Anstieg. Somit war Taxifolin über den gesamten Zeitraum bis zum

relativ späten Maximum im Plasma anwesend. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Taxifolin dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt.

Schöfer et al. isolierten aus menschlichem Feces ein anaerobes Bakterium, *Clostridium orbiscindens*, welches in der Lage ist, Quercetin und Taxifolin zu degradieren [176]. Taxifolin wurde über das Intermediat Alphitonin zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucin abgebaut. Die beiden Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucin wurden in der vorliegenden Arbeit als Reinsubstanzen mit der entwickelten HPLC-Methode analysiert, um die Existenz der beiden Substanzen in den Plasmaproben nach Extrakteinnahme zu überprüfen. Es konnten in keinem Fall Übereinstimmungen in den Retentionszeiten der Reinsubstanzen mit den unbekanntem detektierten Peaks der Plasmaproben gefunden werden. Somit lag kein Hinweis darauf vor, dass nach Pycnogenol-Einnahme aus Taxifolin die mikrobiellen Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucin in Konzentrationen entstanden waren und absorbiert wurden, die mit der vorliegenden HPLC-Methodik detektierbar gewesen wären.

Von M1 wurde die maximale Plasmakonzentration von  $4,11 \pm 2,08$  ng/ml, zum Zeitpunkt  $10,00 \pm 1,85$  Stunden ermittelt, da von einem Metaboliten, der im Körper gebildet wird, keine Dosis als Grundlage zur Berechnung der anderen pharmakokinetischen Parameter vorliegt.

Von den unbekanntem Substanzen U1 bis U10 wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Mittlere Abweichungen vom Mittelwert der Zeitpunkte maximaler Plasmaspiegel errechnet (Tabelle 11).

Es kann zusammenfassend festgestellt werden, dass nach Pycnogenol-Einnahme in den Plasmaproben der Probanden sowohl die bekannten Inhaltsstoffe Kaffeesäure, Ferulasäure, Catechin und Taxifolin, als auch der Metabolit M1 nachgewiesen werden konnten.

**Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Mittlere Abweichung vom Mittelwert (MA) von  $t_{\max}$  der unbekannt Substanzen aller elf Probanden der einmaligen Pycnogenol-Einnahme:**

Substanz	$t_{\max 1}$ [h]	$t_{\max 2}$ [h]	$t_{\max 3}$ [h]
U1 (Procyanidin B1)	1,71 ± 1,11	11,0 ± 1,2	
U2	1,55 ± 1,09	11,6 ± 1,9	
U3	0,78 ± 0,26	8,0 ± 2,0	
U4	1,25 ± 0,50	3,33 ± 1,15	11,20 ± 2,28
U5	9,0 ± 2,0		
U6	6,75 ± 5,20		
U7	1,33 ± 0,52	8,80 ± 2,28	
U8	8,0 ± 0,0		
U9	8,80 ± 1,10		
U10	4,0 ± 0,0		

Weiterhin konnten zehn soweit noch unbekannt Substanzen, U1 bis U10, detektiert werden, von denen eine, U1, möglicherweise mit Procyanidin B1 identisch ist. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten. Die Untersuchungen der Steady-state-Proben zeigten, dass nach Pycnogenol-Einnahme *in vivo* ein Großteil der Inhaltsstoffe und/oder Metabolite als glucuronidierte bzw. sulfatierte Konjugate im Plasma vorlagen, wobei ausgeprägte interindividuelle Unterschiede beobachtet wurden. Vergleiche mit anderen *in vivo* Studien zur Absorption von monomeren Phenolcarbonsäuren, Catechinen und strukturell ähnlichen Polyphenolen wiesen einen vergleichbaren Grad der Konjugation auf. Die maximalen Plasmakonzentrationen bzw. Flächenverhältnisse, sowie die Zeitpunkte der maximalen Plasmaspiegel, die erreicht wurden, unterlagen erwartungsgemäß ausgeprägten interindividuellen Schwankungen.

Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob in den Plasmaproben aktive Substanzen in ausreichender Konzentration vorhanden sind, um *ex vivo* pharmakodynamische Effekte erzielen zu können. Verglichen mit den *in vitro* Effekten von Polyphenolen sind bei *in vivo*

Effekten sehr viele Parameter, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen, wie Absorption, Metabolisierung, Konjugation und Elimination, zu beachten (Allgemeiner Teil, 6.2). Um diesen Faktoren gerecht zu werden, wurden die Versuche zur Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten erneut aufgegriffen und abgewandelt.

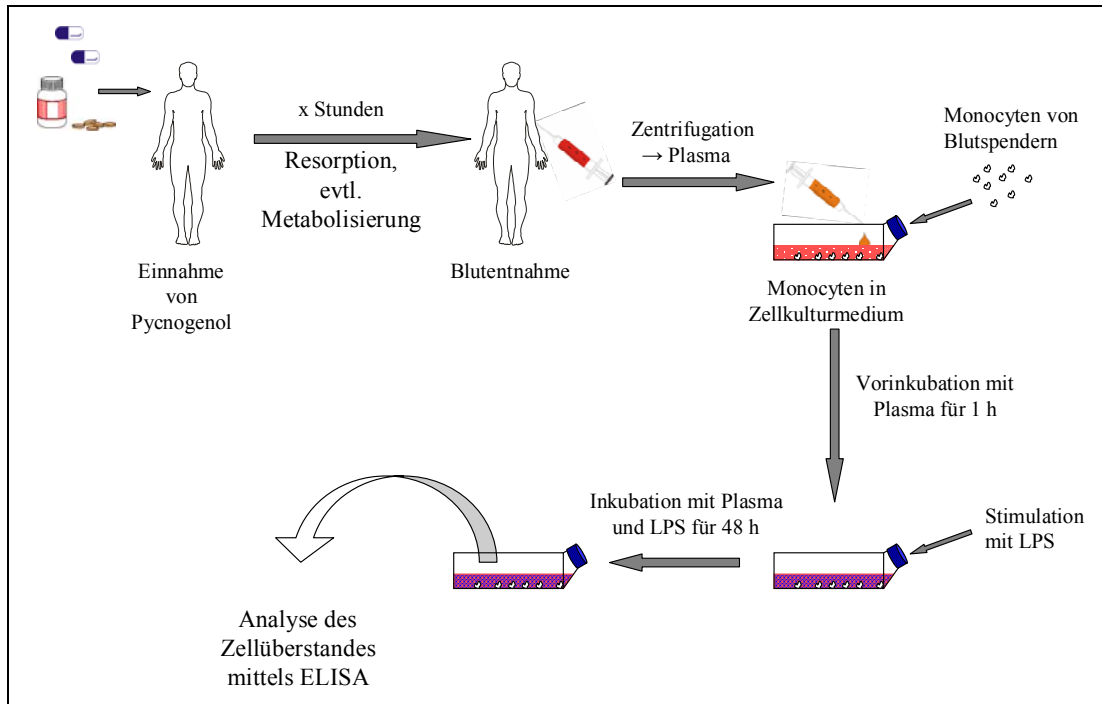
## **6 *Ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger und nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme**

### **6.1 Hintergrund und Versuchsaufbau für die Bestimmung der *ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten**

Zur Untersuchung einer möglichen *in vivo* Relevanz der Versuche zur Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit LPS stimulierten Monocyten (Allgemeiner Teil 4.4) wurde der Frage nachgegangen, ob die im Plasma von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme vorhandenen Substanzen in ausreichender Konzentration vorliegen, um eine Hemmung der MMP-9-Freisetzung erzielen zu können. Um dies zu beantworten, müsste Probanden einmal ohne und einmal nach Einnahme von Pycnogenol eine Dosis LPS parenteral verabreicht werden. Anschließend würde zu festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen und das Plasma auf die Veränderung der sekretierten MMP-9-Konzentration im Vergleich zum Basalwert hin untersucht werden. Diese Verfahrensweise ist allerdings ethisch nicht unbedenklich.

Daher sollte ein Weg gefunden werden, eine direkte Gabe des LPS an Probanden zu vermeiden, eine Untersuchung der Plasmaproben nach Pycnogenol-Einnahme auf den möglichen Gehalt MMP-9-hemmender Wirkstoffe aber trotzdem durchführen zu können. Es wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, welches erlaubt, die Hemmung der MMP-9-Sekretion *ex vivo* zu messen und dabei die Bedingungen, die zu dem jeweiligen Zeitpunkt *in vivo* herrschen, so genau wie möglich wiederzugeben. Dazu wurde ein Aliquot der im Rahmen der pharmakokinetischen Untersuchungen gewonnenen Plasmaproben mit Monocyten aus gepoolten Blutzellsuspensionen verschiedener Spender des Bayerischen Roten Kreuzes inkubiert (Abbildung 38). Die Zellen wurden nachfolgend mit LPS stimuliert und anschließend die MMP-9-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt.

Durch diese Methode werden im Körper der Probanden die Resorption des Extraktes im Gastrointestinaltrakt, eventuell eine Metabolisierung im Darm und/oder in der Leber und der Transport der Bestandteile und/oder Metabolite ins Blut genutzt. Durch Blutabnahmen zu bestimmten Zeitpunkten können die nach Extrakteinnahme erreichten Konzentrationen potentieller Wirkstoffe auch außerhalb des Körpers auf einfache und schnelle Weise auf ihre Effektivität/Wirksamkeit hin überprüft werden.



**Abbildung 38:** Darstellung des Versuchsablaufes zur Probengewinnung für die *ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten.

## 6.2 *Ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme

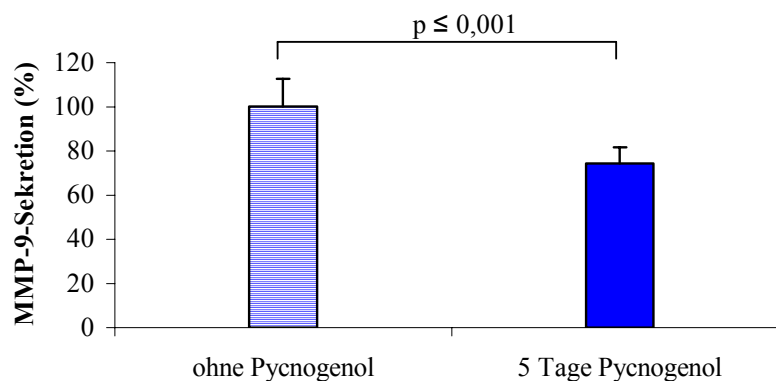
Es wurden sieben freiwillige Versuchspersonen der Steady-state-Versuche (Experimenteller Teil 5) für die Untersuchungen herangezogen. Die Blutabnahmen erfolgten vor und nach der letzten Pycnogenol-Einnahme. Das Plasma wurde im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt. Monocyten, die aus gepoolten Blutzellsuspensionen der Blutgruppe 0 isoliert wurden, wurden in dem mit Medium verdünnten Plasma der Probanden inkubiert und 48 Stunden mit 10 ng/ml LPS stimuliert (Abbildung 38). Die Konzentrationen an freigesetztem MMP-9 im Zellüberstand wurden mittels ELISA bestimmt (Experimenteller Teil 4.6).

Die resultierenden Konzentrationen wurden auf die Zellzahl von  $2,5 \cdot 10^5$  lebende Zellen normalisiert, um auszuschließen, dass abgestorbene Zellen eine Hemmung der MMP-9-Sekretion vortäuschen. Die Anzahl lebender Zellen, inkubiert in Plasma von Probanden vor und nach Pycnogenol-Einnahme, unterschied sich nicht signifikant (Tabellarischer Anhang 3.9). Durch die Normalisierung auf eine bestimmte Zellzahl war

zudem ein direkter Vergleich der sekretierten MMP-9-Konzentrationen verschiedener Versuchsansätze möglich.

### 6.2.1 Gesamteffekt der Hemmung der MMP-9-Sekretion

Nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme bewirkten die Plasmaproben aller sieben Probanden *ex vivo* eine Reduktion der MMP-9-Freisetzung im Vergleich zu den Plasmaproben vor Pycnogenol-Einnahme. Dabei lag die mittlere Hemmung der MMP-9-Sekretion bei etwa 25 % (Abbildung 39, Tabellarischer Anhang 3.10), wobei der Mittelwert der Kontrollwerte mit  $100 \pm 13$  % und der nach Pycnogenol-Einnahme mit  $74 \pm 7$  % berechnet wurde. Dieser Unterschied der prozentualen MMP-9-Sekretion zwischen dem Basalwert und dem Wert nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme war statistisch signifikant ( $p \leq 0,001$ , gepaarter, einseitiger Wilcoxon signed rank test).



**Abbildung 39: Prozentuale Darstellung der Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten, inkubiert in Plasmaproben vor und nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol. Die Werte wurden auf die Zellzahl  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Plasmaproben von sieben Probanden. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des gepaarten, einseitigen Wilcoxon signed rank test ( $p = 0,0078$ ).**

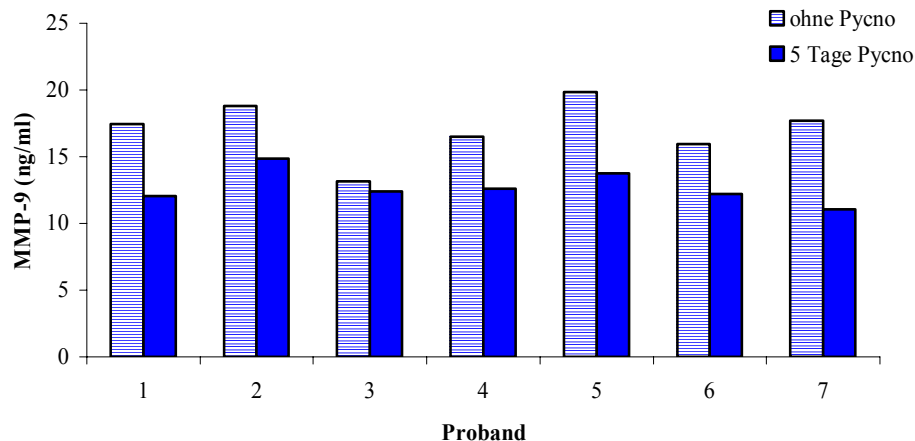
Da die Plasmaproben vor der Inkubation mit stimulierten Monocyten jeweils noch 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Hemmung *in vivo* noch größer wäre als die hier bestimmten 25 %.



Damit wurde erstmals gezeigt, dass nach Einnahme einer therapeutischen Dosis Pycnogenol offenbar *in vivo* Wirkspiegel erreicht werden, die das Potential haben, die MMP-9-Freisetzung signifikant zu hemmen.

### 6.2.2 Interindividuelle Variabilität der *ex vivo* Effekte

Die mittlere Konzentration an MMP-9, die von LPS-stimulierten Monocyten bei Inkubation mit basalen Plasmaproben von Probanden sekretiert wurde, lag bei  $17,1 \pm 2,2$  ng/ml. Die mittlere Konzentration an MMP-9 wurde auf  $12,7 \pm 1,2$  ng/ml reduziert wenn die Inkubation mit Plasmaproben von Probanden nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme durchgeführt wurde. Die Darstellung der Hemmung der MMP-9-Sekretion durch die individuellen Plasmaproben der Probanden (Abbildung 40) zeigt die Größe der interindividuellen Unterschiede. Das Plasma des Probanden 7 bewirkte *ex vivo* die stärkste Hemmung der MMP-9-Sekretion. Die MMP-9-Konzentration, die von stimulierten Monocyten sekretiert wurde, sank durch Pycnogenol-Wirkstoffe im Plasma dieses Probanden von 17,7 ng/ml auf 11,1 ng/ml (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten, inkubiert in Plasmaproben vor und nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol (Pycno). Die Ergebnisse der sieben Probanden sind auf die Zellzahl von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen normalisiert.**

Das Plasma des Probanden 3 hingegen, inkubiert mit stimulierten Monocyten, rief nach Pycnogenol-Einnahme *ex vivo* nur eine geringe Reduktion der MMP-9-Sekretion von 13,2 ng/ml auf 12,4 ng/ml hervor. Die basale Plasmaprobe dieses Probanden bewirkte

*ex vivo* im Vergleich zu allen anderen schon eine deutliche Hemmung der MMP-9-Freisetzung, die im Bereich der Hemmwirkung der Plasmaproben der anderen Probanden nach Pycnogenol-Einnahme lag. Ein Grund hierfür könnte ein Missachten der flavonoidfreien Diät sein. Flavonoidreiche Nahrungsbestandteile könnten ebenfalls einen Beitrag zur Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten leisten, da auch sie Substanzen liefern könnten, die mit den wirksamen Inhaltsstoffen des Extraktes identisch sind. Weiterhin könnten der allgemeine Gesundheitszustand bzw. die körperliche Verfassung der Probanden Einfluss auf die Hemmung der MMP-9-Freisetzung haben. Betrachtet man die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen der Plasmaproben (Allgemeiner Teil, 5.5), so waren bei Proband 3 im Vergleich zu den anderen Probanden weder ein offensichtliches Fehlen noch niedrigere Konzentrationen bestimmter Substanzen zu verzeichnen. Auch der Basalwert wies keine ungewöhnlichen Peaks verglichen mit den Plasmaproben der anderen Probanden auf. Ferulasäure war zwar in der Plasmaprobe nicht zu detektieren, fehlte aber auch in der Probe des Probanden 4. Diese rief, inkubiert mit stimulierten Monocyten, dagegen eine deutliche Reduktion der MMP-9-Sekretion hervor. Es kann daher vermutet werden, dass noch andere, mit der verwendeten HPLC-Analytik nicht detektierbare Substanzen aus dem Extrakt Einfluss auf die Hemmung der MMP-9-Sekretion haben.

Trotz der beschriebenen möglichen Einflussfaktoren und der beobachteten interindividuellen Unterschiede bewirkte das Plasma aller Probanden nach Pycnogenol-Einnahme *ex vivo* durchgehend eine Reduktion der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten. Somit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass bestimmte Inhaltsstoffe und/oder Metabolite des Extraktes, die nach oraler Gabe resorbiert werden, im Plasma in ausreichend hoher Konzentration vorhanden sind, um *ex vivo* einen inhibitorischen Effekt auf die MMP-9-Sekretion stimulierter Monocyten auszuüben.

Die interindividuellen Schwankungen sind vergleichsweise gering und sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Konzentrationen an wirksamen Verbindungen zurückzuführen. Eher geringe interindividuelle Schwankungen der pharmakologischen Effekte von Pycnogenol wurden auch in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Crossover-Studie an 22 Asthmapatienten gezeigt, die über einen Zeitraum von 8 Wochen maximal 200 mg Pycnogenol pro Tag, respektive Placebo, erhielten [15]. Dabei war in der Pycnogenol-Gruppe nach Extrakt-Einnahme eine statistisch signifikante Reduktion der Leukotrien-Konzentration zu beobachten. Die

interindividuelle Variabilität der Reduktion der Leukotrien-Konzentration nach Pycnogenol-Einnahme war mit einem Variationskoeffizient  $< 4$  vergleichsweise gering. Der Variationskoeffizient der Ergebnisse der eigenen Untersuchung lag mit 9,8 % um über das Doppelte höher.

### **6.3 *Ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob nur die Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen eine Reduktion der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten bewirken können, oder ob Plasma, entnommen nach einer einmaligen Pycnogenol-Dosis, *ex vivo* ebenfalls eine Reduktion der MMP-9-Sekretion hervorrufen würde. Wichtige Aspekte waren die Fragen, zu welchem Zeitpunkt und über welchen Zeitraum nach der Extrakt-Einnahme die Wirksubstanz bzw. die Wirksubstanzen im Plasma vorhanden wären.

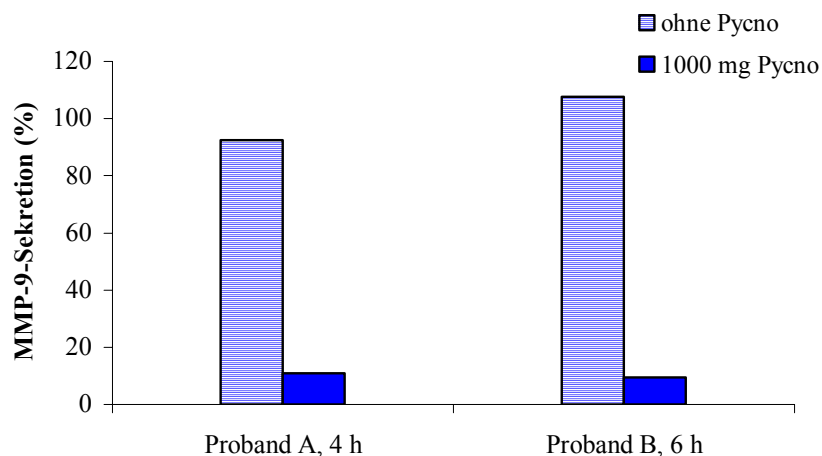
#### **6.3.1 Vorversuche mit 1,0 g Pycnogenol**

In Vorversuchen wurde von zwei freiwilligen Probanden eine hohe Dosis von jeweils 1,0 g Pycnogenol eingenommen. Die Pycnogenol-Einnahmen erfolgten wieder nach einer mindestens vierundzwanzigstündigen flavonoidfreien Diät. Vor und vier, respektive sechs Stunden nach Pycnogenol-Einnahme wurde diesen Personen Blut abgenommen. Während dieses Zeitraums wurde ebenfalls auf die Aufnahme flavonoidhaltiger Nahrung verzichtet.

Die Plasmaproben nach einmaliger Gabe von 1,0 g Pycnogenol führten *ex vivo* sowohl vier als auch sechs Stunden nach der Einnahme zu einer drastischen Reduktion der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten von etwa 90 % (Abbildung 41). Die mittlere Sekretion von MMP-9 durch stimulierte Monocyten, inkubiert in den zu untersuchenden Plasmaproben, sank von 21 ng/ml vor Pycnogenol-Einnahme auf 2 ng/ml nach Pycnogenol-Einnahme. Damit konnte gezeigt werden, dass im Plasma vier bzw. sechs Stunden nach Einnahme einer einzelnen, hohen Pycnogenol-Dosis wirksame Verbindungen vorhanden sein mussten, die eine Hemmung der MMP-9-Sekretion verursachen konnten.

Die hier mit dem Plasma der beiden Probanden *ex vivo* erzielten Hemmungen der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten waren, verglichen mit den Steady-state-

Proben (Allgemeiner Teil, 6.3.2) um den Faktor 3,6 effektiver. Damit konnte eine Dosisabhängigkeit des Effektes gezeigt werden, was die Validität der Ergebnisse untermauert. Da auch in diesem Versuch die Plasmaproben vor der Inkubation mit Monocyten im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, kann angenommen werden, dass die tatsächliche Reduktion der MMP-9-Sekretion *in vivo* noch effektiver wäre.



**Abbildung 41: Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten durch Inkubation mit Plasmaproben vor und nach Einnahme einer Einzeldosis von 1000 mg Pycnogenol. Die Blutabnahmen erfolgten 4 h, respektive 6 h nach Pycnogenol-Einnahme. Der Mittelwert aus den Messungen der Plasmaproben der beiden Probanden vor Pycnogenol-Einnahme wurde als 100 %-Wert angenommen.**

### 6.3.2 Studienergebnisse mit 0,3 g Pycnogenol

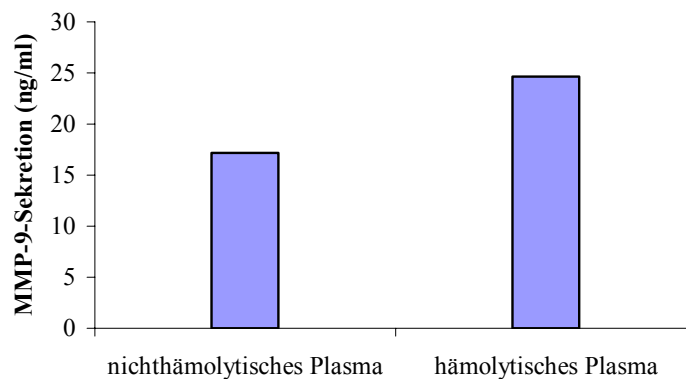
Mit den Plasmaproben der elf Probanden nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol sollte die Kinetik der wirksamen, d.h. der *ex vivo* MMP-9 hemmenden, Extraktbestandteile ermittelt werden (Studiendesign Experimenteller Teil, 5).

Die Mehrzahl der gewonnenen Plasmaproben war jedoch mehr oder weniger stark hämolytisch. Diese Hämolyse könnte durch mangelhafte Abnahmetechnik infolge eines nicht-heparinisierten Verweilkatheters oder durch falsche Zentrifugationsbedingungen des abgenommenen Blutes verursacht worden sein.

### 6.3.2.1 Einfluss hämolytischer Plasmaproben auf die MMP-9-Sekretion *ex vivo*

Da unklar war, ob sich eine Hämolyse auf die MMP-9-Sekretion auswirkt, sollte dies in Vorversuchen geklärt werden. Dazu wurde eine Blutspendeprobe des Bayerischen Roten Kreuzes aliquotiert. Die eine Hälfte wurde zur Plasmagewinnung unter normalen Bedingungen (3000 x g, 15 °C, 7 Minuten) zentrifugiert, die andere Hälfte vor der Zentrifugation durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen hämolysiert. Weiterhin wurde eine Zeitreihe stark hämolytischer Plasmaproben eines Studienteilnehmers für die Messungen herangezogen.

Die Plasmaproben wurden mit LPS-stimulierten Monocyten inkubiert und die MMP-9-Sekretion vermessen. Exemplarisch ist hier das Ergebnis der Inkubation mit einer hämolytischen und einer nicht hämolytischen („normalen“) Plasmaprobe des Spenders des Roten Kreuzes im Vergleich dargestellt (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Sekretion von MMP-9 (ng/ml) aus stimulierten Monocyten nach Inkubation mit einer nichthämolytischen und hämolytischen Plasmaprobe eines einzelnen Spenders im Vergleich.**

Die hämolytische Plasmaprobe bewirkte im Vergleich zu der nichthämolytischen Probe eine um etwa 43 % höhere MMP-9-Freisetzung aus LPS-stimulierten Monocyten (Abbildung 42). Dies könnte darin begründet sein, dass das freigesetzte Hämoglobin zu einem zusätzlichen inflammatorischen Reiz führt, infolgedessen die MMP-9-Konzentration ansteigt. So wird die Entstehung von Hydroxylradikalen und die Peroxidation von Lipiden durch freies Hämoglobin begünstigt [177]. In einer klinischen Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an freiem Hämoglobin im Serum und der Konzentration an MMP-9 gezeigt werden [178]. Dabei wurden Serumproben von 62

Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie auf hämolytische und klinische Parameter untersucht. Damit ist die Messung der MMP-9-Konzentration nach Inkubation von Monocyten mit hämolysierten Plasmaproben im Fall der vorliegenden Arbeit wenig sinnvoll.

Die mit hämolytischen Plasmaproben eines Studienteilnehmers inkubierten LPS-stimulierten Monocyten wiesen eine stark schwankende MMP-9-Sekretion auf. Es ist zu vermuten, dass den über die Zeit variierenden Konzentrationen wirksamer Extraktbestandteile eine variierende Konzentration an Hämoglobin in der jeweiligen Plasmaprobe entgegenwirkte. Es war somit nur möglich die wenigen nichthämolytischen Plasmaproben der Zeitreihe auf ihre *ex vivo* Wirksamkeit bei der Hemmung der MMP-9-Sekretion zu untersuchen. Um einen Bezugswert zu haben, war es weiterhin erforderlich, dass die Plasmaprobe, die vor Pycnogenol-Einnahme gewonnen wurde, nicht hämolytisch war. Daher konnten nur 15 von 99 Plasmaproben untersucht werden.

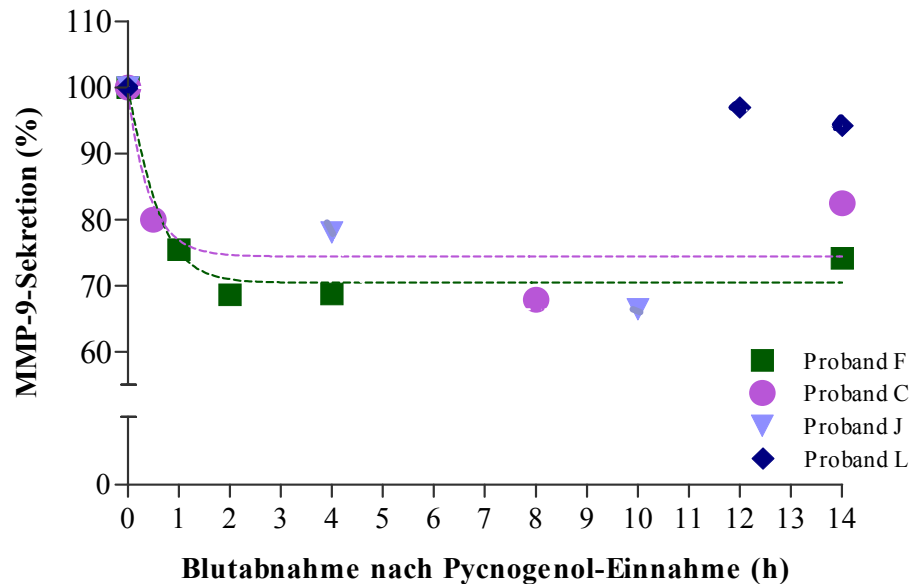
### **6.3.2.2 Hemmung der MMP-9-Sekretion durch die auswertbaren Plasmaproben der Studienteilnehmer**

Von lediglich vier der elf Probanden war eine nichthämolytische Plasmaprobe als Basiswert vor Pycnogenol-Einnahme vorhanden. Infolgedessen konnten auch nur die Plasmaproben dieser vier Probanden auf ihren *ex vivo* Effekt der Hemmung der MMP-9-Sekretion herangezogen werden.

Insgesamt lagen die späteren Zeitpunkte, für die nichthämolytische Plasmaproben vorlagen, von allen vier Probanden zusammengenommen, bei 30 Minuten, einer, zwei, vier, acht, zehn, zwölf und vierzehn Stunden nach Extrakteinnahme (Abbildung 43). Die einsetzbaren, d.h. nichthämolytischen Proben erlauben bis 14 Stunden nach Extrakteinnahme zumindest Einzelwerte zu betrachten und somit eine Aussage über die Kinetik der wirksamen Inhaltsstoffe und/oder Metabolite des Extraktes zu diesen Zeitpunkten zu treffen (Abbildung 43).

Alle Plasmaproben der Probanden C, F und J bewirkten nach Pycnogenol-Einnahme *ex vivo* eine deutliche Reduktion der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten im Vergleich zu den Plasmaproben, die vor Pycnogenol-Einnahme gewonnen wurden (Abbildung 43). Dabei wurde durch die Plasmaproben, die nach 30 Minuten (Proband C) bzw. nach einer Stunde (Proband F) abgenommen wurden, *ex vivo* eine 20 bzw. 25 %ige Verminderung der MMP-9-Sekretion hervorgerufen (Abbildung 43). Nach zwei Stunden

konnte mit dem Plasma des Probanden F *ex vivo* eine weitere Reduktion der MMP-9-Sekretion um etwa 7 % auf 68,7 % beobachtet werden, danach blieb der durch das Plasma erzielte Effekt konstant. Vierzehn Stunden nach Extrakteinnahme lag die durch das Plasma hervorgerufene Reduktion der MMP-9-Sekretion noch immer bei 75 % des Ausgangswertes, was auf einen lang anhaltenden Effekt des Extraktes in Bezug auf diesen Effektparameter schließen lässt.



**Abbildung 43: Prozentuale *ex vivo* Hemmung der MMP-9-Sekretion aus mit 10 ng/ml LPS stimulierten Monocyten, betrachtet über einen Zeitraum von 14 Stunden nach Einnahme von 300 mg Pycnogenol. Dargestellt sind die auswertbaren Plasmaproben der Probanden F, C, J und L mit nichtlinearer Regression und einseitiger Anpassung von zwei Probanden (GraphPad Prism 4.0).**

Die *ex vivo* Reduktion der MMP-9-Sekretion war bei Proband L durch die Plasmaproben, die 12 und 14 Stunden nach Pycnogenol-Einnahme gewonnen wurden, mit vier bzw. sechs Prozent sehr gering. Da alle anderen Proben hämolytisch waren, konnte nicht geklärt werden, ob ein größerer Effekt nie vorhanden oder bereits wieder abgeflacht war. Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringere Reduktion der MMP-9-Freisetzung, die die Plasmaproben des Probanden L *ex vivo* verursachten, wäre erneut in einer Missachtung der Diätvorschriften zu sehen. Der Basalwert des Probanden ließ jedoch im Vergleich mit den anderen keine Auffälligkeiten erkennen. Eine fehlende Einnahme des Extraktes kann aufgrund der pharmakokinetischen Untersuchungen ausgeschlossen werden, da in den Plasmaproben nach Pycnogenol-Einnahme Inhaltsstoffe des Extraktes

nachgewiesen werden konnten, die mit den bei anderen Probanden beobachteten Konzentrationen vergleichbar waren (Tabellarischer Anhang 4.1). Lediglich M1 konnte nicht nachgewiesen werden, fehlte aber in den Plasmaproben des Probanden J ebenfalls. Dort konnte jedoch *ex vivo* eine gute Hemmung der MMP-9-Sekretion erzielt werden.

### **6.3.2.3 Zeitlicher Ablauf der Hemmung der MMP-9-Sekretion *ex vivo* nach Pycnogenol-Einnahme**

Es konnte gezeigt werden, dass bereits früh abgenommene Plasmaproben (30-60 Minuten) offensichtlich Wirkstoffe enthielten, die *ex vivo* eine ausgeprägte Hemmung von MMP-9 verursachten. Es kann angenommen werden, dass es sich dabei um niedermolekulare Substanzen handelt, die nicht stark metabolisiert werden. Es wurden bereits schnell verfügbare Substanzen nach Einnahme anderer Pflanzenextrakte bzw. -bestandteile, wie Quercetin aus Zwiebeln und Apfelcidre, Epigallocatechin aus Grüntee-Extrakt oder Kaffeesäure aus Rotwein, beschrieben (Allgemeiner Teil 5.2) [173, 179-181]. Auch durch später (12 Stunden) gewonnene Plasmaproben wurde MMP-9 gehemmt. Die für die MMP-9-Hemmung verantwortlichen Verbindungen sind offenbar schnell im Plasma erschienen und dort über längere Zeit verblieben.

Dabei liegt die Vermutung nahe, dass es sich um mehrere wirksame Komponenten und/oder deren Metabolite handelte, von denen einige schnell verfügbar waren und andere erst später im Plasma erschienen, da der Effekt *ex vivo* lange nachweisbar war. Eine weitere Möglichkeit für die Identifizierung der wirksamen *ex vivo* MMP-9 hemmenden Pycnogenol-Bestandteile wäre, dass eine schnell resorbierte Substanz über 14 Stunden im Blut verweilt. Die Substanzen Catechin und Ferulasäure, sowie die unbekannt Substanzen U2, U3 und U7 waren über den Zeitraum von 30 Minuten bis 14 Stunden nach Pycnogenol-Einnahme relativ konstant nachweisbar und könnten für den MMP-9-hemmenden Effekt mitverantwortlich sein (Allgemeiner Teil 5.6). Zu den frühen Zeitpunkten (30 Minuten bis vier Stunden) nach Extrakteinnahme wurden daneben maximale Plasmakonzentrationen von Kaffeesäure und von den unbekannt Substanzen U1, U4 und U10 erreicht (Pharmakokinetische Parameter, Tabelle 7). Es wäre ebenfalls denkbar, dass eine oder mehrere dieser Verbindungen an der Hemmung der MMP-9-Sekretion beteiligt waren. Das Auftreten von synergistischen Effekten der nachgewiesenen Substanzen könnte darüber hinaus für die Hemmung der MMP-9-Sekretion verantwortlich sein. Catechin und Kaffeesäure waren zwar in den *in vitro* Hemmversuchen



(Allgemeiner Teil, 2.12) in den eingesetzten Konzentrationen nicht in der Lage, die Aktivität von MMP-9 zu hemmen, ihre Wirkungen auf die MMP-9-Sekretion wurden allerdings nicht untersucht.

An den Wirkungen ab sechs Stunden nach Extrakteinnahme könnten die unbekanntes Substanzen U5 und ab acht Stunden U6, U8 und U9 beteiligt sein. Es kann auch nach wie vor die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der Metabolit M1 in den späten Plasmaproben als Wirksubstanz für die Reduktion der MMP-9-Freisetzung eine Rolle spielte, da er ab sechs Stunden nach Extrakteinnahme im Plasma nachweisbar war. Wie in den *in vitro* Hemmversuchen (Allgemeiner Teil 2.12 und 4.4) gezeigt wurde, haben beide Metabolite das Potential für die Hemmung sowohl der Aktivität als auch der Freisetzung von MMP-9, mit mittleren Hemmkonzentrationen im Bereich von 0,5 µM. Die maximale Plasmakonzentration von M1 wurde in der vorliegenden Arbeit mit 19,75 nmol/l bestimmt, was um den Faktor 25 unter der IC<sub>50</sub> liegt (Allgemeiner Teil 5.7). Damit wurde zwar die zuvor ermittelte mittlere Hemmkonzentration nicht erreicht, was aber nicht ausschließt, dass M1 trotzdem in die Hemmung der MMP-9-Sekretion involviert ist.

Es ist nicht auszuschließen, dass eine dieser mittels HPLC identifizierten Substanzen oder der Synergismus mehrerer Substanzen die Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten hervorgerufen hat. Die Identifizierung der wirksamen Komponente bzw. Komponenten wäre aber nur möglich, wenn die einzelnen detektierten Substanzen aus Plasma isoliert und identifiziert werden würden und nachfolgend die Versuche zur Hemmung der MMP-9-Sekretion mit einzelnen Reinsubstanzen oder Kombinationen durchgeführt werden würden. Dies könnte ein Ansatz für weiterführende Arbeiten sein.

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass bestimmte Substanzen, die zur Hemmung der MMP-9-Sekretion beigetragen haben, mit der verwendeten HPLC-Methode und -Detektion nicht zu erkennen waren. Die Methoden zur Identifizierung von wirksamen Bestandteilen und/oder Metaboliten wurden in der vorliegenden Arbeit anhand der bekannten Leitsubstanzen entwickelt. Es wäre aber denkbar, dass auch andere Inhaltsstoffe des Extraktes (Zucker, Verbindungen ohne Chromophor, die nicht detektierbar waren) in den Mechanismus der Hemmung der MMP-9-Sekretion involviert sind.

Vergleicht man abschließend das Ausmaß der *ex vivo* Hemmung der MMP-9-Sekretion durch die Plasmaproben der verschiedenen untersuchten Gruppen - einmalige Pycnogenol-Einnahme, Mehrfachgabe und Vorversuche - so kann ein dosisabhängiger

Effekt festgestellt werden. Die Probanden der Steady-state-Untersuchung erhielten täglich 200 mg Pycnogenol. Deren Plasma erzielte *ex vivo* im Durchschnitt eine etwa 25 %ige Reduktion der MMP-9-Freisetzung aus stimulierten Monocyten. Die auswertbaren Plasmaproben der drei Probanden der einmaligen Einnahme von 300 mg Pycnogenol verursachten *ex vivo* eine etwas stärkere Reduktion von etwa 32 %, während die Plasmaproben der beiden Probanden der Vorversuche mit einer hohen Dosis von 1,0 g Pycnogenol eine drastische Reduktion von 90 % der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten sowohl vier als auch sechs Stunden nach Extrakteinnahme hervorriefen.

In anderen Untersuchungen wurden ebenfalls dosisabhängige Effekte nach Einnahme von polyphenolhaltigen pflanzlichen Nahrungsbestandteilen beschrieben. Wang et al. verabreichten 20 Probanden steigende Mengen an procyanidinreicher Schokolade (27, 53 und 80 g) und nahmen Blutproben 2 und 6 Stunden nach der Einnahme [182]. Die Untersuchungen ergaben einen dosisabhängigen Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas und gleichzeitig eine Abnahme der Oxidationsprodukte von Lipiden. Es konnte eine positive Korrelation zwischen Procyanidinaufnahme und Procyanidinkonzentration im Plasma festgestellt werden (133, 258 und 355 nmol/l Epicatechin als Leitsubstanz in Plasma).

In einer Studie von Sung et al. über den antioxidativen Effekt von Grünem Tee und dessen Dosisabhängigkeit wurde von 10 Freiwilligen steigende Mengen an Grünem Tee (2,5 g in der ersten, 5 g in der zweiten und 7 g Teeblätter in der dritten Woche, zubereitet als Infusum in Wasser) getrunken [183]. Blutabnahmen erfolgten jeweils 60 und 120 Minuten nach Einnahme des Grünen Tees. Nach Einnahme von 2,5 g Tee stieg die antioxidative Kapazität des Plasmas nicht signifikant um 1,1 %, nach 5 g Tee signifikant um 7,0 % und nach 7,5 g Tee signifikant um 12,0 %. Es wurde somit ein dosisabhängiger Effekt zwischen Teemenge und antioxidativer Kapazität des Plasmas nachgewiesen.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten, inkubiert in Plasma von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme, wurde mit einem *ex vivo* Versuchskonzept durchgeführt. In Untersuchungen von Notka et al. wurde zur Überprüfung der *in vivo* Relevanz der Hemmung der HIV-1-Replikation durch einen wässrig-alkoholischen Extrakt aus *Phyllanthus amarus* ein ähnliches Versuchsprinzip durchgeführt [184]. Probanden erhielten 1200 mg dieses Extraktes, wobei vor und bis drei Stunden nach Einnahme Blutproben abgenommen wurden. Das daraus gewonnene Serum wurde in einer Konzentration von 5 % mit einer CD4<sup>+</sup> Reporterzelllinie

inkubiert. Es konnte in den Serumproben der Probanden drei Stunden nach Extrakteinnahme eine 30 %-ige Reduktion der Virusreplikation im Gegensatz zu den Basalwert-Proben festgestellt werden, was auf einen inhibierenden Effekt des Extraktes gegenüber HIV schließen ließ. In den Untersuchungen von Notka et al. wurde im Gegensatz zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine Zelllinie von Reporterzellen verwendet. Die Verwendung von humanen Monocyten aus Blutspenden spiegelt die tatsächlichen *in vivo* Verhältnisse besser wider als dies bei der Verwendung von Zelllinien geschieht. Die vorliegende Arbeit betrachtete weiterhin sowohl die Effekte nach Mehrfachgabe als auch nach Einmalgabe. Es wurde außerdem ein längerer Zeitraum (14 Stunden) nach Extrakteinnahme untersucht als bei Notka et al. (drei Stunden). Dies bietet die Möglichkeit zu einem besseren Verständnis der pharmakokinetischen Abläufe.

In Arbeiten von Koga et al. kam eine andere Variante des *ex vivo* Versuchskonzeptes zum Einsatz. Darin wurden die Effekte von (+)-Catechin- und Quercetin-Metaboliten auf die Adhäsion von Monocyten an Endothelzellen der Aorta untersucht [185]. Eine Stunde nach Verabreichung von (+)-Catechin und Quercetin an Ratten wurden Blutproben entnommen und diese als Plasmaextrakt, der die konzentrierten Metabolite enthält, aufgearbeitet. Monocyten adhärten signifikant weniger an Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-stimulierte Aortenendothelzellen, die mit den Plasmaextrakten inkubiert wurden, als unbehandelte, aber stimulierte Aortenendothelzellen. Somit konnte eine *in vivo* Relevanz der untersuchten Flavonoide auf die Zelladhäsion nachgewiesen werden. Im Vergleich mit dem *ex vivo* Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit konnten Koga et al. die physiologischen Bedingungen *in vivo* erneut nicht so exakt wiedergeben. Durch die Herstellung eines Plasmaextraktes erfolgt eine Aufkonzentrierung, die *in vivo* nicht stattfindet und daher die Effekte wahrscheinlich stärker erscheinen, als sie tatsächlich sind. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Verdünnung des Plasmas im Verhältnis 1:1, so dass vermutet werden kann, dass die festgestellten pharmakologischen Wirkungen *in vivo* vorhanden sind.

Die *ex vivo* Methode, die in der vorliegenden Arbeit entwickelt und erfolgreich angewendet wurde, ist funktionsfähig und es konnte damit nachgewiesen werden, dass *in vivo* tatsächlich Konzentrationen erreicht werden können, die pharmakologische Wirkungen zeigen. Diese Tatsache kann daher auch als Erklärungsansatz für die beschriebenen antiinflammatorischen *in vivo* Effekte des Extraktes herangezogen werden [186].

## **7 *Ex vivo* Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme**

### **7.1 Strukturelle Eigenschaften von NF- $\kappa$ B**

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) stellt eine Familie von ubiquitär exprimierten, sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren dar, die sensitiv auf oxidativen Stress reagieren und die bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Bis heute konnten fünf Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie in Säugetierzellen identifiziert werden: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50/p105 und p52/p100. Die ersten drei sind transkriptionsaktive Proteine, während die letzten beiden Vorläufermoleküle darstellen, aus denen ebenfalls transkriptionsaktive Proteine entstehen können [187].

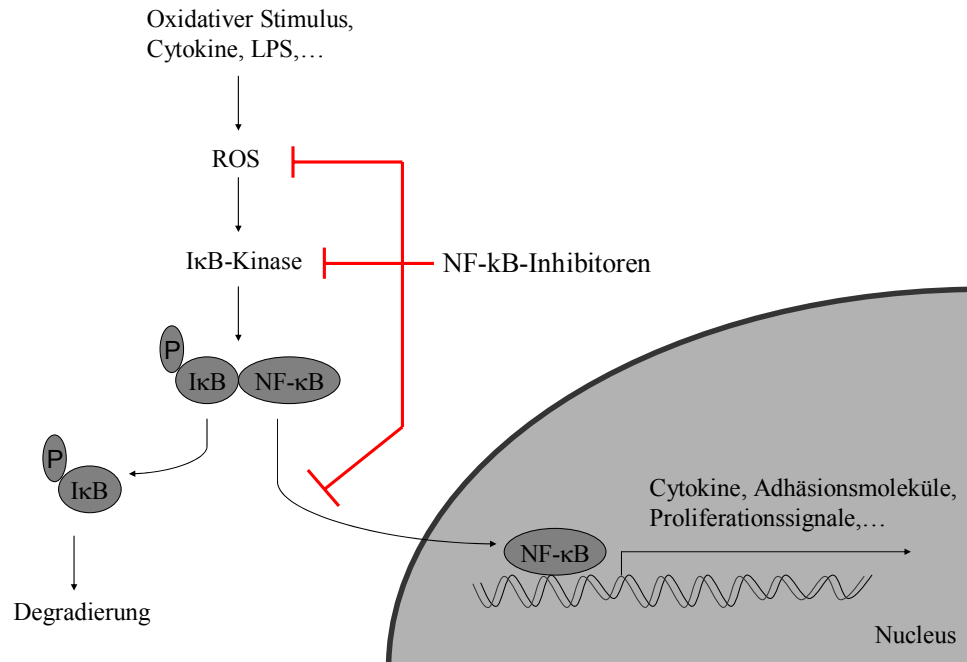
Strukturell handelt es sich um Homo- oder Heterodimere einer Familie von DNA-bindenden Proteinen, denen eine hochkonservierte, 300 Aminosäuren umfassende Region gemeinsam ist. Diese ist für die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Interaktion mit dem inhibitorischen I $\kappa$ B-Protein verantwortlich. Sie enthält außerdem eine Kern-Lokalisierungs-Sequenz [187]. Das häufigste Dimer ist p50/p65, gefolgt von den Homodimeren p50/p50 und p65/p65. Die verschiedenen NF- $\kappa$ B-Dimere haben unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu DNA- $\kappa$ B-Motiven, wodurch sich die große Spannbreite der regulierten Gene erklärt [188, 189]. Die DNA-Zielsequenz des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors umfasst ein aus 10 Basen bestehendes Motiv ( $5'$ GGGRNNYYCC $3'$ , R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase und N = R oder Y).

### **7.2 Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Angriffspunkte möglicher Inhibitoren**

In seiner inaktiven Form liegt NF- $\kappa$ B im Cytosol nicht-kovalent an Inhibitor-Proteine der I $\kappa$ B-Familie gebunden vor [190]. Dabei werden die NF- $\kappa$ B-Kern-Lokalisierungs-Sequenzen, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielen, maskiert und die Kernwanderung von NF- $\kappa$ B verhindert [187].

Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann durch eine Vielzahl von Stimuli, beispielsweise Cytokine (IL-1 und TNF- $\alpha$ ), freie Sauerstoffradikale, UV-Strahlen, sowie bakterielle

(LPS) oder virale (Influenza A Virus) Agenzien induziert werden (Abbildung 44). Dabei werden die I- $\kappa$ B-Kinasen- $\alpha$  und - $\beta$  (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) aktiviert. Diese phosphorylieren die I- $\kappa$ B-Proteine spezifisch, I- $\kappa$ B $\alpha$  an Serinrest 32 und 36, I- $\kappa$ B $\beta$  an Serinrest 19 und 23 [191] (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Vereinfachtes Schema des NF- $\kappa$ B-Signalwegs mit möglichen Angriffspunkten von Inhibitoren. ROS = reaktive Sauerstoffspezies, P = Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Untereinheit.**

I- $\kappa$ B wird daraufhin an zwei Lysinresten Ubiquitin-markiert und rasch an 26S Proteosomen degradiert, was zu einer Dissoziation des cytosolischen NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B-Komplexes führt [190, 192]. NF- $\kappa$ B wird freigesetzt und wandert in den Kern, wo es an spezifische DNA-Sequenzen bindet. Infolgedessen kommt es zum Beispiel zur Induktion von MMP-9, was ein wichtiger Aspekt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist, sowie von unterschiedlichen Cytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8), von induzierbaren Enzymen, wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), von Akute-Phase-Proteinen und von Zell-Adhäsionsmolekülen [187, 193-195] (Abbildung 44). Die gesteigerte Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen spielt eine große Rolle bei Entzündungen, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Gefäßerkrankungen und Metastasierung bei Krebserkrankungen [196, 197]. So wandern nach der Adhäsion von aktivierten Leukocyten an das Endothel weitere Leukocyten entlang eines Gradienten chemotaktischer

Faktoren (Leukotriene, Chemokine, etc.) in das Gewebe ein, wo sie lokal ihre Effektorfunktionen, wie Antigenerkennung oder Einleitung von Entzündungsreaktionen ausführen können.

Aufgrund der weitreichenden regulatorischen Funktionen in der Aktivierung und Proliferation von Zellen kommt NF- $\kappa$ B bei vielen entzündlichen Erkrankungen, sowie bei Erkrankungen des Immunsystems eine große Bedeutung zu. Auch bei viralen Erkrankungen, wie Hepatitis B oder C ist eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität festgestellt worden [198-200]. Im Zusammenhang mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wird NF- $\kappa$ B eine bedeutende Rolle zugeschrieben [201]. Im Rahmen von Asthma bronchiale ist NF- $\kappa$ B als proinflammatorischer Faktor von Interesse [202]. Bei der Alzheimer Erkrankung findet sich in frühen neuritischen Plaques eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung [203]. Hinzu kommen Krebserkrankungen, wie z.B. Leukämie oder Lymphome, Brust- Eierstock-, Prostata- oder Darmkrebs, bei denen oftmals eine Fehlregulierung von NF- $\kappa$ B vorliegt [204]. Dementsprechend ist der Signalweg von NF- $\kappa$ B ein potentielles Ziel pharmakologischer Interventionen, wobei unterschiedliche Angriffspunkte von NF- $\kappa$ B-Inhibitoren denkbar sind (Abbildung 44).

In Phase eins und zwei der klinischen Prüfung befindet sich seit Januar 2005 ein hochsensitiver und potenter NF- $\kappa$ B-Inhibitor der Firma Corgentech, USA. Es handelt sich hierbei um spezifische Oligonucleotide (ODN, Transcription factor decoy oligonucleotides), die die Expression von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen hemmen. Die ODNs sollen zur Behandlung von atopischer Dermatitis und Ekzemen eingesetzt werden. Inhibitoren, die die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen vermindern, greifen zu einem frühen Zeitpunkt in den Signalweg ein, da so ein möglicher Stimulus ausgeschaltet wird. Das erst seit kurzem auf dem Markt erhältliche Fertigarzneimittel Xigris<sup>®</sup> ist ein rekombinant hergestelltes humanes aktiviertes Protein C, ein Glykoprotein mit Serinprotease-Aktivität. Es wird zur Therapie der Sepsis eingesetzt, da es die Sepsis-Kaskade durch antithrombotische, profibrinolytische und antiinflammatorische Wirkung unterbricht. Durch eine reduzierte Ausschüttung des Stimulus TNF- $\alpha$  wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu einem frühen Zeitpunkt der Signalkaskade gehemmt.

Weiterhin kann die I- $\kappa$ B-Kinase gehemmt werden, wodurch es zu keiner Phosphorylierung der I- $\kappa$ B-Proteine und infolgedessen zu keiner NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt. Ein Imidazochinoxalinderivat (BMS-345541), welches kürzlich entwickelt wurde,

hemmt IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und wurde im Mausmodell erfolgreich zur Behandlung von Arthritis getestet. Einen Schritt weiter im Signalweg greift der seit Mai 2004 zur Therapie des multiplen Myeloms eingesetzte Proteasom-Inhibitor Bortezomib ein, der die Aktivität des 26S-Proteasoms hemmt. Eine Degradierung des NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B-Komplexes mit einer nachfolgenden Kernwanderung von NF- $\kappa$ B, sowie dessen Bindung an DNA-Sequenzen im Nucleus wird somit gehemmt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Inhaltsstoffe und/oder Metabolite von Pycnogenol ebenfalls zu potentiellen Inhibitoren der Aktivierung von NF- $\kappa$ B gezählt werden können. Cho et al. untersuchten bereits die Wirkungen des Gesamtextraktes Pycnogenol auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Inkubation mit einer LPS-stimulierten monocytären Zelllinie [10]. Die Arbeiten von Peng et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der *in vitro* Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Zellkernextrakten menschlicher Nabelschnurzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells), die vor der Stimulation mit TNF- $\alpha$  mit verschiedenen Konzentrationen an Pycnogenol (10, 20, 40, 60  $\mu$ g/ml) inkubiert wurden.[52]. Die Induktion von NF- $\kappa$ B wurde mit steigender Pycnogenolkonzentration immer weiter gehemmt; die höchste Pycnogenolkonzentration erbrachte eine etwa 60 %ige Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

Eine kritische Betrachtung der in beiden Arbeiten gezeigten Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Pycnogenol ist insofern notwendig, als die *in vitro* Zellversuche mit dem Gesamtextrakt die Pharmakokinetik völlig unberücksichtigt lassen und damit die *in vivo* Bedingungen nicht wiedergeben. Es bleiben sowohl die Resorption als auch alle Metabolisierungsschritte unberücksichtigt und außerdem können die eingesetzten Pycnogenol-Konzentrationen in keinem Fall mit den Plasmakonzentrationen der Extraktbestandteile gleichgesetzt und verglichen werden. Relevanter und aussagekräftiger dagegen sind *ex vivo* Versuche. Deshalb lautete die Fragestellung der folgenden Untersuchungen, ob im Plasma von Probanden nach Pycnogenol-Einnahme üblicher Dosen Wirksubstanzen in ausreichender Konzentration vorhanden sind, um *ex vivo* eine Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in humanen Monocyten erzielen zu können. Dies ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Frage, ob die wirksamen Bestandteile und/oder Metabolite von Pycnogenol schon in diesem Stadium in die Entzündungssignalkaskade eingreifen und dadurch die MMP-9-Sekretion hemmen.

### 7.3 Versuchsaufbau für die Bestimmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Hier kam der schon beschriebene neuentwickelte Versuchsaufbau zum Einsatz, mit dem auch die *ex vivo* Messung von MMP-9 durchgeführt wurde (Allgemeiner Teil, 6.1). Es wurden ausschließlich Plasmaproben der fünf Probanden, die fünf Tage lang jeweils 200 mg Pycnogenol täglich eingenommen hatten (Steady-state-Bedingungen), für die Messungen herangezogen. Das Plasma wurde wie unter 7.1 beschrieben behandelt und für die Versuche eingesetzt. Die Konzentrationen an freiem p65 im Nucleus wurden nach Zellkernextraktion der Monocyten mittels ELISA bestimmt (Experimenteller Teil 7.3 und 7.4).

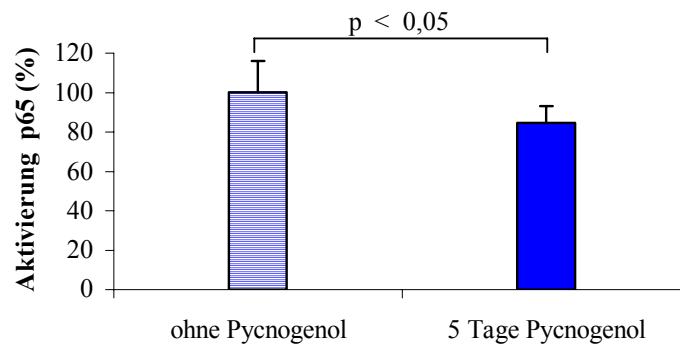
Ein ELISA stellt eine alternative Methode zur in anderen Arbeiten häufig verwendeten Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)-Technik dar. Das Prinzip von EMSA ist die Untersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen, wie z.B. der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre DNA-Bindungsstelle. Radioaktiv-markierte DNA-Fragmente, die für die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren spezifische Bindungsstellen enthalten, werden mit einer Probe, von der die Menge an Transkriptionsfaktor-spezifischer DNA-Bindungsaktivität bestimmt werden soll, inkubiert. Dieser Ansatz wird nun einer Gel-Elektrophorese unterzogen. Ungebundene DNA-Fragmente wandern dabei im Gel weiter von der Startzone weg als die größeren DNA-Protein-Komplexe, die sich während der Inkubationszeit gebildet haben. Durch anschließende Autoradiographie werden die Komplexe, die radioaktiv-markierte Komponenten enthalten, sichtbar gemacht.

Nach der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch einen inflammatorischen Reiz (hier: LPS) sind im Zellkern höhere Konzentrationen an p65 nachweisbar. Die resultierenden Konzentrationen wurden auf die Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^6$  lebende Zellen normalisiert, um auszuschließen, dass abgestorbene Zellen eine Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B nur vortäuschen. Durch die Normalisierung auf eine bestimmte Zellzahl war zudem ein direkter Vergleich der p65-Konzentrationen in den Zellkernextrakten verschiedener Versuchsansätze möglich.



## 7.4 Gesamteffekt der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Die Zellkernextrakte stimulierter Monocyten, die mit den Plasmaproben der fünf Probanden nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme inkubiert wurden, verursachten *ex vivo* eine Reduktion der p65-Konzentration im Zellkern im Vergleich zu den Plasmaproben, die vor Pycnogenol-Einnahme gewonnen wurden. Dabei lag die mittlere Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei etwa 15 %, (Tabellarischer Anhang 6.2), wobei der Mittelwert der Kontrollwerte mit  $100 \pm 16$  % und der nach Pycnogenol-Einnahme mit  $84,4 \pm 9$  % berechnet wurde (Abbildung 45). Dieser Unterschied der Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch das Plasma der Probanden nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , gepaarter, einseitiger Wilcoxon signed rank test, Abbildung 45).



**Abbildung 45: Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, dargestellt am Beispiel von p65; Monocyten wurden mit Plasmaproben vor und nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol inkubiert und mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Werte wurden auf die Zellzahl  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Plasmaproben von fünf Probanden. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des gepaarten, einseitigen Wilcoxon signed rank test ( $p = 0,0313$ ).**

Da die Plasmaproben vor der Inkubation mit stimulierten Monocyten jeweils noch 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt wurden, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung *in vivo* noch größer sein müsste als die bestimmten 15 %.

Damit wurde erstmals gezeigt, dass nach Einnahme einer therapeutischen Dosis Pycnogenol offenbar *in vivo* Wirkspiegel erreicht werden, die *ex vivo* einen deutlichen hemmenden Effekt auf die p65-Konzentration im Nucleus haben. Wirksame Bestandteile

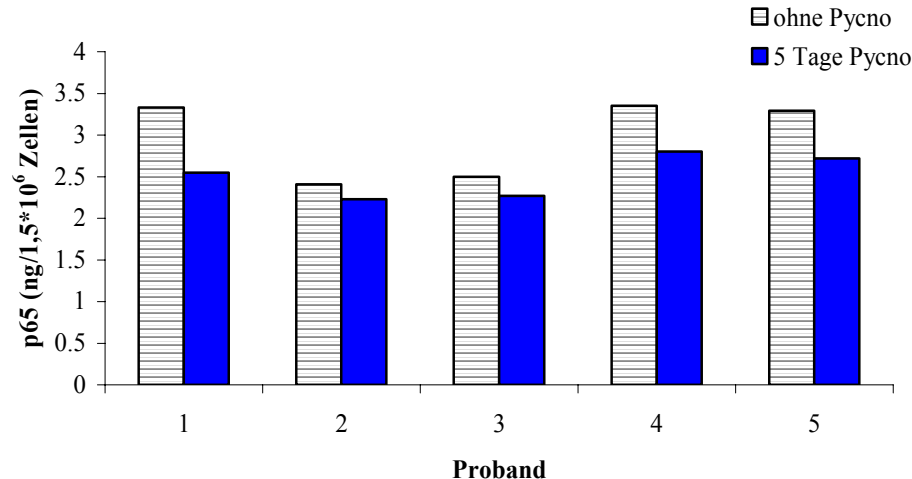
des Pycnogenols können demnach schon sehr früh mit der inflammatorischen Signaltransduktionskaskade interagieren.

### **7.5 Interindividuelle Variabilität der *ex vivo* Effekte**

Die mittlere Konzentration an p65, die in Zellkernextrakten von mit LPS stimulierten Monocyten, inkubiert mit dem Plasma von Probanden vor Pycnogenol-Einnahme bestimmt wurde, lag bei  $2,98 \pm 0,48$  ng/je  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen. Die Konzentration an p65 wurde *ex vivo* durch das Plasma, gewonnen nach Pycnogenol-Einnahme, auf  $2,51 \pm 0,26$  ng/je  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen reduziert. Die Darstellung der Hemmung der p65-Aktivierung zeigt interindividuelle Unterschiede (Abbildung 46). Das Plasma des Probanden 1 rief *ex vivo* die stärkste Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf. Die p65-Konzentration dieses Zellkernextraktes sank von  $3,33$  ng/je  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen vor Pycnogenol-Einnahme auf  $2,55$  ng/je  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme (Abbildung 46).

Die Plasmaproben der Probanden 2 und 3 riefen nur eine sehr geringe Reduktion der nucleären p65-Konzentration hervor. Dabei reduzierte sich die p65-Konzentration in  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen von  $2,41$  ng (Proband 2) bzw.  $2,50$  ng (Proband 3) vor Pycnogenol-Einnahme auf  $2,23$  ng (Proband 2) bzw.  $2,27$  ng (Proband 3) nach Pycnogenol-Einnahme. Der Basalwert dieser beiden Zellkernextrakte war im Vergleich zu den anderen Proben auffallend niedrig und lag im Bereich der durch aktive Pycnogenol-Bestandteile *ex vivo* gehemmten p65-Werte der Zellkernextrakte der anderen Probanden. Auch hier könnte ein Grund dafür ein Missachten der flavonoidfreien Diät sein. Die Basalwerte der pharmakokinetischen Untersuchungen dieser Probanden unterschieden sich allerdings nicht von den Werten der anderen Probanden. Ebenso könnten sowohl der Gesundheitszustand als auch die körperliche Verfassung der Probanden Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B haben (Allgemeiner Teil 7.3). Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen der Plasmaproben der Probanden 2 und 3 zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich fehlender oder besonders niedriger Konzentrationen von bestimmten Substanzen im Vergleich zu den Plasmaproben der anderen Probanden (Tabellarischer Anhang, 4.1). Es können daher keine Rückschlüsse auf die Wirkkomponenten, die essentiell für die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind, gezogen werden.

Die Zellkernextrakte von stimulierten Monocyten, inkubiert in den Plasmaproben aller Probanden nach Pycnogenol-Einnahme wiesen trotz dieser Faktoren und der beobachteten interindividuellen Unterschiede durchgehend niedrigere p65-Konzentrationen auf.



**Abbildung 46: Hemmung der p65-Konzentration in Zellkernextrakten von mit 1 µg/ml LPS stimulierten Monocyten, inkubiert in Plasmaproben vor und nach fünftägiger Einnahme von je 200 mg Pycnogenol (Pycno). Die Ergebnisse der fünf Probanden (B1-B5) sind auf die Zellzahl von 1,5\*10<sup>6</sup> Zellen normalisiert.**

Werden die Ergebnisse der *ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten und der Hemmung der NF-κB-Aktivierung verglichen, so fallen gemeinsame Tendenzen auf. Die Plasmaproben des Probanden 1 bewirkten nach Pycnogenol-Einnahme im Zellkernextrakt eine deutliche Reduktion der p65-Konzentration von etwa 23,5 %. Die gleiche Probe erzielte eine starke Hemmung der MMP-9-Sekretion aus Monocyten um etwa 30 %. Je stärker die NF-κB-Aktivierung gehemmt wurde, desto geringer war in der vorliegenden Arbeit auch die MMP-9-Sekretion (Proband 1).

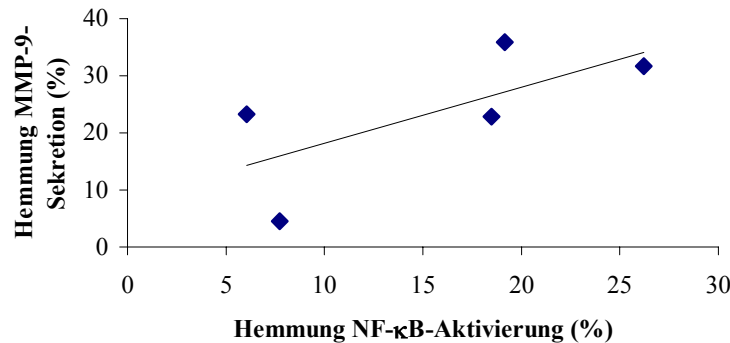
Die Plasmaproben der Probanden 4 und 5 zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Hemmung der NF-κB-Aktivierung und der Hemmung der MMP-9-Sekretion, wenn auch, speziell bei Proband 5, nicht so auffällig wie bei Proband 1.

Die Plasmaproben des Probanden 3, inkubiert mit stimulierten Monocyten bewirkten weder eine ausgeprägte Inhibition der NF-κB-Aktivierung (etwa 9 %), noch eine starke Hemmung der MMP-9-Sekretion (etwa 4 %), was in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit festgestellten Tendenzen steht.

Die Plasmaproben des Probanden 2 hingegen weichen von den Untersuchungen von Lu et al. und Lai et al. und von dem bisherigen Trend der vorliegenden Arbeit ab. Sie

wiesen trotz der geringen Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (etwa 7,5 %) eine deutliche Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten auf (etwa 22 %). Eine Erklärung könnte in einer möglichen ungenügenden LPS-Stimulation der Monocyten des NF- $\kappa$ B-Versuches, inkubiert in der Plasmaprobe vor Pycnogenol-Einnahme gesehen werden. Eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte suboptimal abgelaufen sein und daher würde der Bezugspunkt zum Wert nach Pycnogenol-Einnahme fehlen.

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten wurde der Spearman Korrelationskoeffizient errechnet (GraphPad Prism, Version 4.0). Demnach besteht eine Korrelation zwischen Wertepaaren, wenn der Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,6$  ist. Mit dem hier errechneten Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,6000$  ließ sich eine positive Korrelation zwischen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Hemmung der MMP-9-Sekretion feststellen (Abbildung 47). Diese Korrelation war aufgrund der geringen Anzahl an Wertepaaren jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,3500$ ).



**Abbildung 47: Korrelation zwischen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (%) und der Hemmung der MMP-9-Sekretion durch Plasma von Probanden nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme. Spearman Korrelationskoeffizient  $r = 0,6000$  (GraphPad Prism, Version 4.0)**

Für ein Wertepaar wurde das Plasma eines Probanden in zwei Testsystemen, ELISA für MMP-9 und ELISA für NF- $\kappa$ B, analysiert. Die ermittelte Korrelation zwischen der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Hemmung der MMP-9-Sekretion stimmt mit den Arbeiten von Lai et al. und Lu et al. [194, 205] überein. Darin wurde gezeigt, dass LPS die Produktion von MMP-9 über den NF- $\kappa$ B-Signalweg induziert. Zur Aufklärung des Mechanismus wurden Proteasom-Inhibitoren, die die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Blockade der I- $\kappa$ B-Degradierung unterdrücken, mit stimulierten Monocyten inkubiert. Beide

Proteasom-Inhibitoren hemmten konzentrationsabhängig die MMP-9-Produktion bis hin zur vollständigen Blockade [194]. Dies bedeutet, dass die Induktion von MMP-9 mit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in direkter positiver Korrelation steht.

Es konnte zusammenfassend nachgewiesen werden, dass bestimmte Inhaltsstoffe und/oder Metabolite des Extraktes, die nach oraler Gabe resorbiert werden und im Plasma vorhanden sind, *ex vivo* einen inhibitorischen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Nucleus haben, wodurch die zuvor beschriebene Hemmung der MMP-9-Sekretion erklärt werden kann. Die interindividuellen Schwankungen der *ex vivo* Effekte waren in beiden Versuchen vergleichsweise gering. Dabei konnte in fast allen Fällen ein direkter Zusammenhang zwischen der Größenordnung der prozentualen Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der MMP-9-Sekretion festgestellt werden.

## **7.6 Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Pflanzenextrakte und -bestandteile**

Die Effekte von Soja-Isoflavonen auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurden in einer Studie von Davis et al. an sechs gesunden Männern untersucht [206]. Dazu erhielten die Probanden über einen Zeitraum von drei Wochen zweimal täglich 50 mg Soja-Isoflavone. Im Anschluss wurden Lymphocyten aus Blutproben isoliert. Zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde ein Teil der Lymphocyten 15 Minuten lang mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. Nach Gabe der Soja-Isoflavone wurde die TNF- $\alpha$ -stimulierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Lymphocyten der Probanden gehemmt. Diese Hemmung war allerdings nicht statistisch signifikant. Als Kontrollversuch wurden Lymphocyten von drei Probanden, die keine Soja-Isoflavone supplementiert hatten, ebenfalls mit TNF- $\alpha$  stimuliert. Dabei wurde gezeigt, dass die Probanden ohne Soja-Isoflavon-Einnahme im Vergleich zu den Studienteilnehmern eine um das 8-fache erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B aufwiesen. Diese Ergebnisse demonstrierten einen protektiven Effekt der Nahrungsergänzung mit Soja-Isoflavonen gegenüber einer TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, was im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen, positiven Effekten, die auch Pycnogenol aufweist, steht.

Ashikawa et al. untersuchten die Wirkungen von Piceatannol, einem Tetrahydroxystilben, isoliert aus dem Samen von *Euphorbia lagascae*, auf die TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung [207]. Zellen der Leukämie-Zelllinie KBM-5

wurden acht Stunden lang mit unterschiedlichen Konzentrationen an Piceatannol vorinkubiert und anschließend 30 Minuten mit 0,1 nM TNF- $\alpha$  stimuliert. Piceatannol hemmte dosisabhängig die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Hemmung der I- $\kappa$ B-Kinasen und der Phosphorylierung von I- $\kappa$ B-Proteinen, wobei eine Konzentration von 50  $\mu$ M eine maximale Inhibition erzielte. Versuche mit den potentiellen Inhibitoren Resveratrol, das strukturell ein Trihydroxystilben darstellt, und Stilben selbst, welches keine Hydroxygruppen aufweist, sollten die Bedeutung von Hydroxygruppen für die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigen. Die Ergebnisse mit Resveratrol waren ähnlich der mit Piceatannol erreichten, wohingegen Stilben keine inhibitorischen Effekte hatte. Ashikawa et al. postulierten folglich, dass das Vorhandensein und eventuell sogar die Position der Hydroxygruppen essentiell für eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sein könnten. Diese Vermutung könnte auch Grundlage zur Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gefundenen inhibitorischen Eigenschaften sein, da sowohl Inhaltsstoffe als auch Metabolite des Pycnogenol-Extrates über eine Vielzahl von Hydroxygruppen verfügen.

In Untersuchungen von Hastak et al. wurden die inhibitorischen Effekte von Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg untersucht [208]. Dazu wurden Zellen der humanen Prostata-Carcinom-Zelllinie 24 Stunden mit 80  $\mu$ M EGCG inkubiert, 15 Minuten mit 25 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert und einer Zellkernextraktion unterzogen. Die Behandlung mit EGCG verringerte sowohl die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B, als auch die TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Weiterhin wurde die Konzentration der p65-Untereinheit im Zellkernextrakt reduziert. Eine verminderte Verfügbarkeit von NF- $\kappa$ B im Zellkern bringt demnach auch eine geringere Transkription von Cytokinen mit sich. Die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch das Grüntee-Polyphenol EGCG steht im Einklang mit den inhibitorischen Effekten des polyphenolreichen Extraktes Pycnogenol. Allerdings wurden die Untersuchungen von Hastak et al. an Zelllinien und nicht an Monocyten durchgeführt. Weiterhin ist eine kritische Betrachtung der Ergebnisse nötig, da es fraglich ist, ob unter physiologischen Bedingungen jemals derart hohe Konzentrationen an EGCG erreicht werden können.

Eine neuere Veröffentlichung von Leung et al. untersuchte den Mechanismus der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Diterpenoide, isoliert von *Isodon rubescens* [209]. Diterpenoide inhibierten die TNF- $\alpha$ - und die Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Zellkern einer hepatozellulären Carcinomzelllinie. Für die Untersuchungen des weiteren Signalweges der Entzündungskaskade wurde zusätzlich eine Hemmung der

Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) durch diese diterpenoiden Inhaltsstoffe in LPS-aktivierten Mausmacrophagen gezeigt. Leung et al. postulierten aufgrund ihrer Untersuchungen, dass ein gemeinsamer Mechanismus von Diterpenoiden ebenfalls eine Hemmung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B ist und dass die antiinflammatorischen Eigenschaften dieser Substanzen aufgrund ihrer Einwirkungen auf die Translokation von NF- $\kappa$ B resultieren. Hier wird folglich ein später Angriffspunkt im Signalweg angenommen.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass nach Einnahme von Pycnogenol auch *in vivo* Konzentrationen an Metaboliten/Bestandteilen erreicht werden, die NF- $\kappa$ B zu hemmen in der Lage sind. NF- $\kappa$ B spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der Expression von Genen, die unter anderem am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. Die wirksamen Extraktbestandteile und/oder Metabolite sind demnach in der Lage, schon früh in den Entzündungsprozess einzugreifen. Dabei können die Mechanismen, durch die eine Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und eine nachfolgende verminderte Induktion von MMP-9 zustande kommen, unterschiedlich sein (Abbildung 44). Es wäre denkbar, dass die Inhaltsstoffe und/oder Metabolite des Extraktes durch ihre antioxidativen Eigenschaften die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies vermindern. Ein weiterer Angriffspunkt ist die Hemmung der I- $\kappa$ B-Kinase. In vorausgegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Metabolite in der Lage sind, wahrscheinlich durch einen direkten Angriff auf das aktive Zentrum von Matrixmetalloproteinasen, deren Aktivität zu hemmen (Allgemeiner Teil, 3.2). Eine mögliche direkte Interaktion des Metaboliten M1 mit dem aktiven Zentrum der I- $\kappa$ B-Kinase und eine nachfolgende Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und von weiteren proinflammatorischen Substanzen im NF- $\kappa$ B-Signalweg wären daher ebenso vorstellbar.

Sowohl die Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Zellkernextrakt, als auch die Hemmung der MMP-9-Sekretion aus stimulierten Monocyten tragen folglich wesentlich zur Erklärung der beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften des Pycnogenol-Extraktes [15, 186] bei. Der Vergleich der pharmakokinetischen Daten mit der Pharmakodynamik ließ jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die wirksamen Bestandteile des Extraktes zu. Dies müsste in weiteren Arbeiten genauer untersucht werden.





## **C. Experimenteller Teil**

---



## **C. Experimenteller Teil**

### **1 Mikroskopische Darstellung von verschiedenen Kiefernringenextrakten**

#### **1.1 Reagenzien und Geräte**

- Pycnogenol-Extrakt, Horphag Research, Genf, Schweiz
- Kiefernringenextrakt, Berkem, Gardonne, Frankreich
- Kiefernringenextrakt Oligopin, DRT, Dax Cedex, Frankreich
- Mandelöl, Caelo, Hilden, Deutschland
  
- Mikroskop Olympus BX40, 40-fache Vergrößerung, Olympus, Hamburg
- Digitalkamera Olympus Camedia
- Objektträger 76 x 26 mm, Meyer + Kersting, Karlsruhe, Deutschland
- Deckgläser 18 x 18 mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

#### **1.2 Mikroskopie der Extrakte**

Von den jeweiligen Extrakten wurde jeweils eine kleine Spatelspitze auf einen Objektträger gegeben, mit einem Tropfen Mandelöl versetzt und mit einem Deckgläschen fixiert. Unter dem Mikroskop Olympus BX40 wurden die Extrakte bei einer 40-fachen Vergrößerung betrachtet und mit der Digitalkamera Olympus Camedia fotografiert. Zur Darstellung der Größenverhältnisse wurde eine Skala, deren Teilstriche jeweils 0,01 Millimeter repräsentieren, in die Extrakt-Aufnahmen mithilfe des Programms Adobe Photoshop 7.0 ME integriert.

## 2 Hemmung von Matrixmetalloproteinasen *in vitro*

### 2.1 Reagenzien und Geräte

#### Enzyme:

- Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) Proenzyme, Human Rheumatoid Synovial Fibroblast, Calbiochem, Schwalbach am Taunus
- Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) Proenzyme, Human Rheumatoid Synovial Fibroblast, Calbiochem
- Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) Monomer, Neutrophil, Granulocyte, Calbiochem

#### Substrate:

- Gelatine Type A (Porcine Skin), ca. 300 Bloom, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen
- Collagen Type I, insoluble, (Bovine Achilles Tendon), Sigma-Aldrich
- Elastin (Bovine Neck Ligament), Sigma-Aldrich

#### Inhibitoren:

- Sprühgetrockneter Pycnogenol-Extrakt, Horphag Research Ltd., Genf, Schweiz
- Captopril, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 (TIMP-1), Human Neutrophil Granulocyte, Calbiochem
- $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton-Lösung in Wasser, 0,0020 g in 10,0 ml [16]
- $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton-Lösung in Wasser, 0,0020 g in 10,0 ml [16]
- Kaffeesäure (3,4-Dihydroxymzimtsäure), Sigma-Aldrich
- (+)-Catechin, Sigma-Aldrich

**Puffer:**

- 0,05 M Tris-HCl, pH 7,0 mit 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 μM ZnCl<sub>2</sub>
- 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5
- 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 7,0 mit 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,05 M PBS-Puffer, pH 7,2 mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>

**Sonstige Chemikalien und Reagenzien:**

- Dimethylsulfoxid, Calbiochem
- 0,03 % Picrylsulfonsäure (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure TNBSA, Sigma-Aldrich )-Lösung in 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5
- p-Aminophenylmercuriacetat (APMA), Sigma-Aldrich
- 0,1 M NaOH
- Succinylanhydrid, Sigma-Aldrich
- Bicinchonic Acid Solution, Sigma-Aldrich, bestehend aus 1 % BCA, 2 % Natriumcarbonat, 0,16 % Natriumtartrat, 0,4 % Natriumhydroxid und 0,95 % Natriumhydrogencarbonat, pH 11,25
- 4 % CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O –Lösung in Wasser

**Geräte:**

- BD Zellkulturplatten Microtest™, Flat Bottom, 96 Wells, geringe Proteinbindung, BD Labware NJ, USA
- Bio-Rad Microplate Reader, Benchmark CA, USA
- Dialyseschlauch (Seamless cellulose tubing), Molecular weight cut-off (MWCO) 12 kDa, Sigma-Aldrich
- Eppendorf Thermomixer compact, Eppendorf AG Hamburg

## **2.2 Succinylierung der Substrate Collagen, Elastin und Gelatine**

Die Succinylierung der Substrate wurde wie von Baragi et al. beschrieben durchgeführt [58]. Jeweils 0,2000 g Collagen, Elastin und Gelatine wurden in 10,0 ml 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, suspendiert. Die gleiche Konzentration an Succinylanhydrid (0,2000 g in 10,0 ml Puffer) wurde zu jeder der Proteinlösungen gegeben, so dass das

Gesamtvolumen jeweils 20,0 ml betrug. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 1 M NaOH auf 8,0 bis 8,5 eingestellt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt. Anschließend erfolgte eine Dialyse der succinylierten Proteine, um überschüssiges Succinylanhydrid zu entfernen. Dazu wurden die Proteinlösungen jeweils in einen Dialyseschlauch (MWCO 12 kDa) gefüllt und in einem 3,0 l-Polyethylen-Becherglas gegen 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, über Nacht unter Rühren dialysiert. Nach der Dialyse wurde die exakte Proteinkonzentration mit der BCA-Methode bestimmt (Experimenteller Teil, 2.3).

### **2.3 Proteinbestimmung mittels Bicinchonic Acid (BCA)-Methode**

50 T der BCA-Lösung wurden mit 1 T einer 4 %igen  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  unmittelbar vor Versuchsbeginn gemischt. 1,0 ml dieser Mischung wurden mit 50  $\mu\text{l}$  der Proteinlösungen im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2 mg/ml je Protein (Kalibriergeraden) bzw. mit 50  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Lösungen von Collagen, Elastin und Gelatine (jeweils 3 Messungen als Mehrfachbestimmungen) in Eppendorfgefäßen versetzt, sofort gut durchmischt und im Thermomixer bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde unter fließendem Wasser gekühlt und die Absorption bei 490 nm gegen die Leerprobe (50  $\mu\text{l}$  Wasser) vermessen.

### **2.4 Aktivierung der Proenzyme**

MMP-1 und MMP-2 mussten als Proenzyme zunächst aktiviert werden. Dazu wurde eine 1 mM p-Aminophenylmercuriacetat- Lösung (APMA) in 0,1 M NaOH hergestellt. ProMMP: APMA wurde im Verhältnis 10:1 in ein Eppendorfgefäß einpipettiert und der Ansatz bei 37 °C 2 Stunden im Thermomixer unter leichtem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Verwendung des aktiven Enzyms war ohne Entfernung von APMA möglich (Arbeitsanweisung Calbiochem „Activation of ProMMPs“).

Die gefriergetrockneten, aktiven Enzyme wurden mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , rekonstituiert, aliquotiert (25  $\mu\text{l}$ ) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert (Arbeitsanweisung Calbiochem).

## 2.5 Hydrolyse der succinylierten Substrate

Alle Versuche wurden in 96-Loch-Zellkulturplatten durchgeführt. Zunächst wurde, wie bei den Hydrolyseversuchen von Baragi et al. beschrieben, einer immer gleichbleibenden Konzentration an succinyliertem Substrat (200 µg/300 µl bzw. 666,7 µg/ml) - im Falle von MMP-1 succinyliertes Collagen und succinylierte Gelatine, von MMP-2 succinyliertes Collagen und succinyliertes Elastin und von MMP-9 succinyliertes Elastin und succinylierte Gelatine - steigende Konzentrationen an den jeweiligen Matrixmetalloproteinasen (41,7 µg/ml, 83,3 µg/ml, 166,7 µg/ml, 333,3 µg/ml) zugesetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert [58]. Die Aliquots der aktiven Form von MMP-1 wurden kurz vor der Zugabe mit 0,05 M PBS-Puffer mit 1mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2, die von MMP-2 mit 0,05 M Natriumborat-Puffer mit 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0 und die von MMP-9 mit 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, versetzt.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl 0,03 % TNBSA in 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, zur Detektion der freien Aminogruppen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 450 nm im Microplate Reader gemessen. Die Blindprobe wurde für jede Konzentration analog durchgeführt, allerdings ohne Substrat.

## 2.6 Hemmversuche von MMP-1

Die Hemmversuche von MMP-1 wurden mit dessen natürlichen Inhibitor TIMP-1 als Positivkontrolle, mit Pycnogenol und dessen Metaboliten  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, sowie mit Kaffeesäure und mit Catechin durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden pro Versuch zwei Proben ohne Inhibitorzusatz vermessen, um die volle Aktivität von MMP-1 zu bestimmen.

### 2.6.1 Inhibitor TIMP-1

TIMP-1 wurde in 0,05 M Tris-HCl mit 200 mM NaCl, pH 7,0 rekonstituiert, zu 0,3850 µg/50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Hemmversuche wurden jeweils 666,7 µg/ml der succinylierten Substrate Collagen bzw. Gelatine mit steigenden TIMP-1-Konzentrationen (51,3 ng/ml, 77,0 ng/ml, 128,3 ng/ml, 205,3 ng/ml) und mit einer

aus dem Hydrolyseversuch ermittelten, gleichbleibenden Konzentration von MMP-1 (83,3 ng/ml, entspricht einer Aktivität von 0,14 mU) versetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden je 50 µl 0,03 % TNBSA in 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, zupipettiert und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Die Blindproben (kein Substrat) wurden analog behandelt. Die Absorptionen wurden bei 450 nm im Microplate Reader gemessen.

Die Effektivität des Inhibitors, ausgedrückt als IC<sub>50</sub>-Konzentration, wurde ermittelt, indem die relative Enzymaktivität in Gegenwart und in Abwesenheit des Inhibitors graphisch dargestellt wurde. Dazu wurde die verbleibende Aktivität der Matrixmetalloproteinase gegen die Konzentration des Inhibitors, in halblogarithmischer Darstellung, aufgetragen. Durch die anschließende Berechnung einer Regressionsgeraden (nichtlineare Regression) mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) konnte die IC<sub>50</sub> bestimmt werden. Dabei wurde die Anpassung an eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve gewählt. Die Güte der Anpassung betrug mindestens 0,9231.

Die Berechnung der nichtlinearen Regression erfolgte nach folgender Formel:

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10 \wedge ((\log EC50 - x) * Hillslope))$$
$$X = \log \text{Konzentration}$$

### 2.6.2 Inhibitor Pycnogenol

Die eingesetzten Konzentrationen an Pycnogenol in Wasser waren: 4,2 µg/ml, 8,3 µg/ml, 16,7 µg/ml, 25,0 µg/ml, 33,3 µg/ml, 41,7 µg/ml, 50,0 µg/ml, 66,7 µg/ml, 83,3 µg/ml und 100,0 µg/ml. Die Hemmversuche wurden mit den unter 2.6.1 angegebenen Substrat- und MMP-1-Konzentrationen durchgeführt. Inkubation, Detektion und Auswertung erfolgten wie unter 2.6.1 beschrieben.



### **2.6.3 Inhibitoren $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton**

Die eingesetzten Konzentrationen der beiden Metabolite in Wasser betragen jeweils 1,7  $\mu\text{g/ml}$ , 3,2  $\mu\text{g/ml}$ , 6,7  $\mu\text{g/ml}$ , 10,0  $\mu\text{g/ml}$ , 13,3  $\mu\text{g/ml}$ , 16,7  $\mu\text{g/ml}$ , 20,0  $\mu\text{g/ml}$ , 23,3  $\mu\text{g/ml}$ , 26,7  $\mu\text{g/ml}$  und 30,0  $\mu\text{g/ml}$ . Weiteres Vorgehen wie unter 2.6.1 beschrieben.

### **2.6.4 Inhibitor Kaffeesäure**

Die eingesetzten Konzentrationen der Kaffeesäure in Wasser waren 1,7  $\mu\text{g/ml}$ , 3,3  $\mu\text{g/ml}$ , 8,3  $\mu\text{g/ml}$  und 25,0  $\mu\text{g/ml}$ . Weiteres Vorgehen wie unter 2.6.1 beschrieben.

### **2.6.5 Catechin**

Die eingesetzten Konzentrationen von Catechin in Wasser betragen 1,7  $\mu\text{g/ml}$ , 3,3  $\mu\text{g/ml}$ , 6,7  $\mu\text{g/ml}$ , 10,0  $\mu\text{g/ml}$ , 13,3  $\mu\text{g/ml}$ , 16,7  $\mu\text{g/ml}$ , 20,0  $\mu\text{g/ml}$ , 23,3  $\mu\text{g/ml}$ , 26,7  $\mu\text{g/ml}$  und 30,0  $\mu\text{g/ml}$ . Weiteres Vorgehen wie unter 2.6.1 beschrieben.

## **2.7 Hemmversuche von MMP-2**

Die Hemmversuche von MMP-2 wurden mit Captopril als Positivkontrolle, mit Pycnogenol und dessen Metaboliten  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, sowie mit Catechin durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden pro Versuch zwei Proben ohne Inhibitorzusatz vermessen, um die volle Aktivität von MMP-2 zu bestimmen.

### **2.7.1 Inhibitor Captopril**

Für die Hemmversuche wurden jeweils 666,7  $\mu\text{g/ml}$  der succinylierten Substrate Collagen bzw. Elastin mit steigenden Captopril-Konzentrationen (0,6 mg/ml, 1,3 mg/ml, 2,6 mg/ml, 5,2 mg/ml) und mit einer aus dem Hydrolyseversuch ermittelten, gleichbleibenden Konzentration von MMP-2 (83,3 ng/ml, entspricht einer Aktivität von 0,1 mU) versetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert.

Im Anschluss wurden je 50  $\mu\text{l}$  0,03 % TNBSA in 0,05 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5, zupipettiert und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Die Blindproben (ohne Substrat) wurden analog behandelt. Die Absorptionen wurden bei 450 nm im Microplate Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben.

### 2.7.2 Andere Inhibitoren

Die Inhibitoren Pycnogenol, die beiden Metabolite, Kaffeesäure und Catechin wurden in Konzentration, Inkubation, Detektion und Auswertung wie unter 2.6.2 bis 2.6.5 beschrieben behandelt.

## 2.8 Hemmversuche von MMP-9

Die Hemmversuche von MMP-9 wurden mit Captopril als Positivkontrolle, mit Pycnogenol und dessen Metaboliten  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, sowie mit Kaffeesäure und mit Catechin durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden pro Versuch zwei Proben ohne Inhibitorzusatz vermessen, um die volle Aktivität von MMP-9 zu bestimmen.

### 2.8.1 Andere Inhibitoren

Captopril wurde in den Konzentrationen, die unter 2.7.1 beschrieben sind, eingesetzt und behandelt. Die weiteren Inhibitoren Pycnogenol, die beiden Metabolite, Kaffeesäure und Catechin wurden in Konzentration, Inkubation, Detektion und Auswertung wie unter 2.6.2 bis 2.6.5 beschrieben behandelt. Die Aktivität der eingesetzten Matrixmetalloproteinase betrug 8,3  $\mu\text{U}$ .

## 2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die einzelnen Gruppenvergleiche mithilfe des Tukey's Vergleichstests sind im Tabellarischen Anhang 1.3 aufgeführt. Signifikant verschieden sind die Werte  $p \leq 0,05$ .

### 3 Bindung von Pycnogenol und M2 an Matrixproteine

Die Methode zur Bestimmung der Bindung von Pycnogenol an Matrixproteine erfolgte in Anlehnung an die Methode des Schweizer Arzneibuchs (Pharm. Helv. VII) zur Bestimmung des Polyphenolgehaltes. Es wurde ohne Verwendung eines Standards gearbeitet.

#### 3.1 Reagenzien und Geräte

- Sprühgetrockneter Pycnogenol-Extrakt, Horphag Research Ltd.
- $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton [16]
- Hautpulver CRS, No. 4332, Merck, Darmstadt
- Elastin (from Bovine Neck Ligament), Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen
- Collagen Type I, insoluble (from Bovine Achilles Tendon), Sigma-Aldrich Inc.
- Albumin, Chicken Egg, Grade II, Crude, Dried Egg White, Sigma-Aldrich Inc.
- Molybdat-Wolframat-Reagenz R, Merck
- Natriumcarbonat-Lösung R 10,6 % (m/V)
- 0,5 M Zinksulfat x 7 H<sub>2</sub>O- Lösung,
  
- Faltenfilter, Durchmesser 110 mm, Machery-Nagel, Düren
- Zentrifugationsröhrchen mit Schraubverschluß, Polypropylen, Labcon CA, USA
- Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma, Type No. 6040-UV, Schichtdicke 10mm
- UV-Spektrometer, Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard
- Mischrad, Durchmesser 36 cm, 150 U/min, Eigenbau Werkstatt Pharmazie, Uni Würzburg

#### 3.2 Bindung an Hautpulver

Es wurden jeweils 25,0 ml der folgenden Pycnogenol-Lösungen in dest. Wasser hergestellt: 2,8 mg/100,0 ml, 4,0 mg/100,0 ml, 12,0 mg/100,0 ml, 20,0 mg/100,0 ml, 40,0 mg/100,0 ml, 60,0 mg/100,0 ml (= Lösung 1).

10,0 ml der jeweiligen Lösungen wurden mit 0,100 g Hautpulver CRS versetzt und in einem Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluß mit dem Mischräd mit einer Geschwindigkeit von 150 U/min 60 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde durch einen Faltenfilter mit dem Durchmesser 110 mm filtriert.

2,0 ml des Filtrats wurden mit dest. Wasser zu 10,0 ml verdünnt. 2,0 ml hiervon wurden mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Reagenz R, 10,0 ml dest. Wasser und der Natriumcarbonat-Lösung 10,6 % zu 25,0 ml versetzt. Nach 15 Minuten wurde bei 691 nm die Absorption gegen dest. Wasser gemessen (= AII).

Von Lösung 1 wurden jeweils 2,0 ml mit dest. Wasser zu 10,0 ml verdünnt. 2,0 ml hiervon versetzte man ebenfalls mit 1,0 ml Molybdat-Wolframat-Reagenz R, 10,0 ml dest. Wasser und füllte mit der Natriumcarbonat-Lösung zu 25,0 ml auf. Nach 15 Minuten wurde die Absorption bei 691 nm gegen dest. Wasser als Kompensationsflüssigkeit vermessen (= AI).

Berechnung der prozentualen Bindung von Polyphenolen an Hautpulver:

$$\frac{1562,5 * (AI - AII)}{\text{Einwaage} (g) * 1000} = \% \text{ Bindung}$$

### 3.3 Bindung an Collagen

Die Versuche zur Bindung an Collagen erfolgten analog der Bindung an Hautpulver (3.2). Statt 0,100 g Hautpulver wurden 0,100 g Collagen eingesetzt. Die Berechnung der prozentualen Bindung von Polyphenolen an Collagen entspricht der Berechnung der Bindung an Hautpulver.

### 3.4 Bindung an Elastin

Die Versuche zur Bindung an Elastin erfolgten analog der Bindung an Hautpulver (3.2).

Statt 0,100 g Hautpulver wurden 0,100 g Elastin eingesetzt. Die Werte für Elastin bei einer Pycnogenol-Konzentration von 2,8 mg/100,0 ml waren nicht auszuwerten, da die Absorptionen für AII immer größer waren, als die für AI. Diese Werte wurden in der

Auswertung vernachlässigt. Die Berechnung der prozentualen Bindung von Polyphenolen an Elastin entspricht der Berechnung der Bindung an Hautpulver.

### 3.5 Bindung an Ovalbumin

Es wurden 25,0 ml einer Pycnogenol-Lösung der Konzentration 20,0 mg/100,0 ml dest. Wasser hergestellt und wie unter 3.2 behandelt. Vor dem Filtrieren wurde jedoch das im Gegensatz zu den Matrixproteinen gut lösliche Albumin mit 1,0 ml einer 0,5 molaren Zinksulfat-Lösung ausgefällt. Anschließend wurde filtriert, wobei das gefällte Albumin zurückblieb und weiter verfahren wie unter 3.2 beschrieben. Die Absorption wurde bei 691 nm gegen eine Mischung aus dest. Wasser und der 0,5 molaren Zinksulfat-Lösung gemessen.

Die Berechnung der prozentualen Bindung von Polyphenolen an Ovalbumin erfolgte analog der Berechnung der Bindung an Hautpulver (3.2). Es wurden hier die Mittelwerte mit der Mittleren Abweichung vom Mittelwert (MA) angegeben [75].

$$MA = \frac{2}{n} \sum_{x_i > x} (x_i - x) = 2 \left[ \sum_{x_i} x_i - n \cdot x \right] / n$$

$n_1$  Werte für  $x_i > x$

### 3.6 Bindung von M2 an Hautpulver

Es wurde eine M2-Lösung der Konzentration 20,0 mg/100,0 ml dest. Wasser hergestellt und wie unter 3.2 behandelt. Die Berechnung der prozentualen Bindung von M2 an Hautpulver erfolgte analog der Berechnung der Bindung an Hautpulver (3.2).

## **4 Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten**

### **4.1 Reagenzien und Geräte für die Zellkultur**

#### **4.1.1 Pufferlösungen**

- Isotonischer Phosphatpuffer, PBS (3,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4), Biochrom, Berlin

#### **4.1.2 Zellkultur**

##### **4.1.2.1 Trennlösungen für die Dichtegradientenzentrifugation**

- Biocoll-Trennlösung (Polysucrose 400, Amidotrizoesäure; Dichte (20 °C): 1,077 g/ml, isoton), Biochrom
- Percoll-Trennlösung (Silicium; Überzug: nicht-dialysiertes PVP; Dichte (20 °C): 1,13 g/ml, hyperosmolar), Pharmacia, Freiburg
- Percoll-Mischung (45 % Percoll, 5 % Earle's Salzlösung 10x, 50 % MEM-Spinner, komplett)

##### **4.1.2.2 Medien und Seren**

- Fötale Kälberserum, FCS, hitzeinaktiviert +56 °C, 30 min, Biochrom
- McCoy's 5A modifiziertes Flüssigmedium, Biochrom
- MEM-Trockenmedium mit "Spinner" Salzen, nach Rekonstitution: pH 7,4, Biochrom

Vor Verwendung wurden die Medien mit folgenden Zusätzen ergänzt:

- MEM-Spinner, komplett (1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin in MEM-Spinner)
- McCoy's Kompletmedium (15 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin in McCoy's 5 A mod. Flüssigmedium)

### 4.1.3 Sonstige Reagenzien für die Zellkultur

- Penicillin/Streptomycin 10.000 IE (10.000 µg/ml), Biochrom
- Nicht essentielle Aminosäuren, Biochrom
- Trypanblau-Lösung, 0,4 % in PBS, Fluka, Taufkirchen
- L-Glutamin, Biochrom
- Earle`s Salzlösung 10x (6,8 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 0,14 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l CaCl<sub>2</sub>, 1,0 g/l D-Glucose, 0,008 g/l Phenolrot)
- Ethanol absolut, Sigma, Taufkirchen

### 4.1.4 Geräte und Materialien für die Zellkultur

- Hera Cell Inkubator, Kendro, Hanau
- Inverted Microscope ECLIPSE TS 100, Nikon, Düsseldorf
- Laminar Air Flow, BDK, Sonnenbühl-Genkingen
- Megafuge 1. OR, Kendro
- Neubauer improved, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup> , Superior, Marienfeld
  
- Multiwell™ 24-Loch Zellkulturplatten, Becton Dickinson, NJ, USA
- Oak-Ridge Zentrifugenröhrchen, Merck
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml aus PE, Karl Roth GmbH, Karlsruhe

## 4.2 Isolierung humaner Monocyten

Humane Monocyten wurden aus Blutzell-Suspensionen (Bayerisches Rotes Kreuz) isoliert. Diese Suspensionen enthielten die bei Plasmaspenden abgetrennten Blutzellen Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten in einem Puffer und wurden vom Bayerischen Roten Kreuz durch Ausspülen von Leukocytendepletionsfiltern gewonnen. Die Filter bestehen aus Polyesterfasern, die in bestimmter Packungsdichte gepresst werden, so dass Poren definierter Größe entstehen. In den Filtern werden die Leukocyten aufgrund verschiedener Mechanismen zurückgehalten. Um Immunreaktionen und Übertragung zellständiger Erreger bei Transfusionen zu vermeiden, ist die Leukocytendepletion seit 1997 bei Blutspenden Pflicht (Paul-Ehrlich-Institut).

Die Isolierung der Monocyten erfolgte über zwei unterschiedliche Dichtegradientenzentrifugationen. Der erste Gradient, eine Polysucrose 400 Polymerlösung der Dichte 1,077 g/ml, bewirkte eine Sedimentierung der Erythrocyten und Granulocyten. Die übrigen Zellen, Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten, haben eine geringere Dichte. Sie konzentrierten sich als scharfe Bande im oberen Drittel des Gradienten [210]. Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g) bewirkte eine Abtrennung der Thrombocyten. Über einen zweiten Gradienten, bestehend aus einer Percoll-Mischung der Dichte 1,13 g/ml erfolgte eine Trennung zwischen Monocyten und Lymphocyten [211].

Es wurden die Blutzell-Suspensionen mehrerer Spender gepoolt und durch Zentrifugation (604 x g, 20 min, RT, ohne Bremse) auf ein Drittel des Ausgangsvolumens eingeengt. Zur Bildung des ersten Gradienten wurden in einem 40 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Biocoll-Lösung mit 30 ml der konzentrierten Blutzell-Suspension überschichtet und zentrifugiert (604 x g, 40 min, RT, ohne Bremse). Monocyten, Lymphocyten und Thrombocyten wurden mit einer sterilen Messpipette abgenommen und in MEM-Spinner (komplett) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit jeweils 50 ml MEM-Spinner (komplett) gewaschen und zentrifugiert (353 x g, 10 min, RT). Durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit (169 x g, 10 min, RT) erfolgte die Abtrennung der Thrombocyten. Es muss vor der zweiten Gradientenzentrifugation eine Präformierung der Percoll-Mischung durchgeführt werden. Dazu wurden in einem Oak-Rich-Zentrifugenröhrchen 30 ml der Percoll-Mischung bei 3345 x g (60 min, RT, ohne Bremse) zentrifugiert. Es bildet sich ein hypotonischer kontinuierlicher Dichtegradient von 1,0 bis 1,3 g/ml aus. Dieser wurde dann mit jeweils 3 ml einer Suspension aus  $5 \times 10^8$  mononukleären Zellen in MEM-Spinner (komplett) überschichtet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer (Experimenteller Teil, 4.3). Mittels Zentrifugation bei 1000 x g (25 min, RT, ohne Bremse) konnte eine Trennung der Monocyten von den Lymphocyten in zwei scharf begrenzte Banden erreicht werden. Die Monocyten repräsentieren aufgrund ihrer geringeren Dichte die obere Bande. Die Zellen dieser Bande wurden abgenommen und dreimal mit MEM-Spinner (komplett) gewaschen. Nach dem dritten Waschschrift wurde erneut die Zellzahl der verbliebenen Monocyten bestimmt (Experimenteller Teil, 4.3). Zur Kultivierung der Zellen wurden diese mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml McCoy's Kompletmedium in sterile 24-Loch-Platten eingesetzt und über Nacht bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Inkubator ruhen gelassen.



### 4.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurde ein Aliquot der Suspension entnommen und je nach Zelldichte 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass mindestens 12 und maximal 50 Zellen pro Großquadrant gezählt werden konnten. Die Lösung wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop (400fache Vergrößerung) wurden die Zellen in den vier Großquadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen unter dem Mikroskop hell. Tote Zellen nehmen dagegen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

Die Zellzahl wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} * \text{Kammerfaktor} (10^4) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Ausgangsvolumen}$$

### 4.4 Stimulation der Zellen

#### 4.4.1 Geräte und Reagenzien für die Stimulation

- Lipopolysaccharid LPS, (rough strains, von *Salmonella minnesota Re 595*, lyophilisiertes Pulver), Sigma-Aldrich
- Fenofibrat, Sigma-Aldrich
- Rosiglitazonmaleat, GlaxoSmithKline, Greenford, UK
- $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton [16]
- $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton [16]
- Hydrocortison, Merck
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Calbiochem
- Ethanol absolut, Sigma, Taufkirchen

#### 4.4.2 Zusatz der Inhibitoren

Nach der Inkubation über Nacht wurden den Zellen die verschiedenen Inhibitoren, gelöst in absolutem Ethanol und verdünnt in McCoy's Medium, in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Die Zellen wurden eine Stunde mit den Inhibitoren bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS, gelöst in DMSO, versetzt. Zur Bestimmung der 100 %igen Freisetzung von MMP-9 aus stimulierten Zellen wurden Proben ohne Inhibitorzusatz, jedoch mit LPS-Stimulation, angesetzt. Es folgte eine weitere Inkubationszeit der Zellen mit Zusätzen von 48 Stunden, ebenfalls bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub>.

##### 4.4.2.1 PPAR-Agonisten

###### *Rosiglitazon:*

Zunächst wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Dazu wurde der PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon den Zellen in den Konzentrationen 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-7</sup> M und 10<sup>-6</sup> M im Medium zugegeben. Für die Sechsfachbestimmung wurde die Konzentration 2\*10<sup>-11</sup> M Rosiglitazon gewählt, da diese ungefähr der IC<sub>50</sub> entsprach. Die IC<sub>50</sub>-Konzentration wurde ermittelt, indem die verbleibende Aktivität von MMP-9 gegen die Konzentration des Inhibitors in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen wurde. Durch die anschließende Berechnung einer Regressionsgeraden (nichtlineare Regression) mit dem Programm GraphPad Prism konnte die IC<sub>50</sub> bestimmt werden. Dabei wurde die Anpassung an eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve gewählt.

###### *Fenofibrat:*

Der PPAR $\alpha$ -Agonist Fenofibrat wurde zunächst in den Konzentrationen 10<sup>-11</sup> M, 10<sup>-9</sup> M, 10<sup>-7</sup> M und 10<sup>-6</sup> M im Medium zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve eingesetzt. Für die Sechsfachbestimmung wurde die Konzentration 10<sup>-7</sup> M Fenofibrat, die ungefähr der IC<sub>50</sub> entspricht, gewählt. LPS-Zusatz, Bestimmung des 100 % Wertes und Inkubationsdauer erfolgten wie unter *Rosiglitazon* beschrieben.

#### 4.4.2.2 Glucocorticoide

*Hydrocortison:*

Für die Hemmkurven wurde Hydrocortison in den Konzentrationen  $10^{-12}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-4}$  M in Medium verwendet. Die Sechsfachbestimmung wurde mit  $10^{-6}$  M, einer Konzentration, die in der Nähe des  $IC_{50}$ -Wertes lag, durchgeführt. Die Inkubation ohne LPS betrug sechs Stunden, Zusatz des Stimulans LPS, Ermittlung des 100 % Wertes und die Inkubationsdauer von 48 Stunden erfolgten analog *Rosiglitazon*.

#### 4.4.2.3 Metabolite M1 und M2

Der Metabolit M1 wurde für die Hemmkurve in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $10^{-4}$  M in Medium den Zellen zugesetzt. Die Sechsfachbestimmung erfolgte bei M1 und bei M2 mit einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M, da diese ebenfalls in der Nähe des ermittelten  $IC_{50}$ -Wertes lag. Die Inkubationszeit ohne LPS-Zusatz betrug wie bei den PPAR-Agonisten eine Stunde. LPS-Zusatz, Bestimmung des 100 % Wertes und Inkubationsdauer erfolgten wie unter *Rosiglitazon* beschrieben.

### 4.5 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen

Die Anzahl lebender Zellen wurde wie unter 4.3 beschrieben bestimmt.

### 4.6 ELISA-Messung des sekretierten MMP-9

#### 4.6.1 Geräte und Reagenzien

- Bio-Rad Microplate Reader, Benchmark CA USA
- Schüttel-Gerät Unimax 1010, Heidolph –Instruments, Schwabach
- Microplate Washer Titertek<sup>®</sup> S8/12, Flow Laboratories,
  
- ELISA-Kit Quantikine<sup>™</sup>, Human MMP-9 (total) Immunoassay, R&D Systems, Wiesbaden-Norderstadt

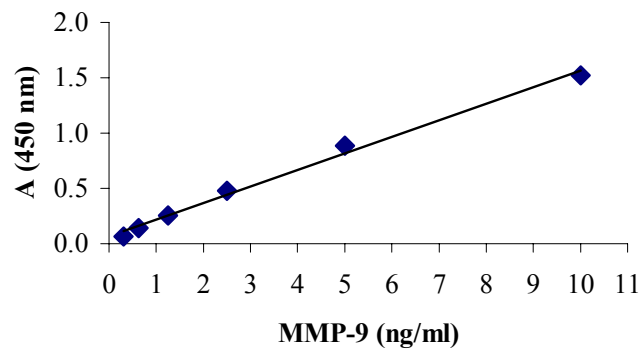
#### **4.6.2 Durchführung der ELISA-Messung**

Nach der 48 stündigen Inkubation mit LPS wurden die Zellen in der 24-Loch-Zellkulturplatte bei 173 x g fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellüberstände wurden anschließend abgenommen, mit Calibrator Diluent RD5-10 1:25 verdünnt. Der mitgelieferte MMP-9 Standard für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde so verdünnt, dass die Konzentrationen 0,312 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml MMP-9 resultierten.

Zunächst wurden je 100 µl der zu untersuchenden Proben und der Standards zu je 100 µl Assay Diluent RD1-34 in der 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. An diese mitgelieferte ELISA-Platte war bereits ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen MMP-9 gebunden. Der Ansatz wurde mit einem Adhäsivstreifen abgeklebt und zwei Stunden bei  $500 \pm 50$  Umdrehungen pro Minute auf dem Schüttel-Gerät inkubiert. Die Platte wurde anschließend vier Mal mit je 400 µl Waschpuffer, in dem ein Tensid und ein Konservierungsmittel enthalten ist, pro Loch im automatischen ELISA-Washer gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden jeweils 200 µl MMP-9-Konjugat (Polyklonaler Antikörper gegen MMP-9, konjugiert mit HRP (Horseradish Peroxidase)) zugesetzt und bei  $500 \pm 50$  Umdrehungen pro Minute eine weitere Stunde bedeckt auf dem Schüttel-Gerät inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift und anschließend der Zusatz von 200 µl Substratlösung, die eine Mischung aus stabilisiertem Wasserstoffperoxid und stabilisiertem Chromogen (Tetramethylbenzidin) für die Farbentwicklung darstellt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten, ohne Schütteln und lichtgeschützt, wurde die Farbentwicklung mit 50 µl einer 2 N Schwefelsäure als Stopplösung abgeschlossen. Innerhalb von 30 Minuten wurde nun die Absorption der einzelnen Proben mittels Microplate Reader bei 450 nm bestimmt.

#### **4.6.3 Auswertung der MMP-9-ELISA-Messung**

Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade, die sich aus den MMP-9-Standards berechnen ließ (Abbildung 48). Diese wurde für jeden Versuch neu erstellt. Im gemessenen Konzentrationsbereich von 0,312 bis 10 ng/ml MMP-9 war die Linearität bei jeder Messung gegeben.



**Abbildung 48:** Exemplarische Darstellung einer Kalibriergeraden von MMP-9; Güte der Anpassung:  $r = 0,9964$ .

Die Zellüberstände, die nur mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden, zeigten maximale MMP-9 Freisetzung und wurden daher als 100 % Wert verwendet, auf den die Proben mit den verschiedenen Inhibitoren bezogen wurden. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression (GraphPad Prism, Version 4) berechnet und darüber der jeweilige  $IC_{50}$  Wert ermittelt. Für die Sechsfachbestimmungen der einzelnen Inhibitoren wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Tukey`s Test (Tabellarischer Anhang 3.7).

## **5 Pharmakokinetische Studie mit Pycnogenol nach peroraler Einnahme**

### **5.1 Diätvorschriften**

Die einzuhaltende flavonoidfreie Diät bestand darin, dass mindestens 24 Stunden vor der Einnahme des Extraktes auf die Aufnahme von flavonoidhaltigen Nahrungsmitteln, wie Obst, Gemüse, Marmelade, Gelee, Tee, Kaffee, Kakao, Fruchtsäfte, alkoholische Getränke wie Wein und Bier, sowie auf Schokolade verzichtet wurde. Als Getränke waren lediglich Wasser und Milch zugelassen.

### **5.2 Probandenkollektiv**

Das Probandenkollektiv der pharmakokinetischen Studie setzte sich aus freiwilligen jungen, gesunden Frauen und Männern im Alter zwischen 18 und 30 Jahren zusammen. 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 Extraktes, sowie im Hinblick auf die Vertraulichkeit der Studiendaten unterzeichneten die freiwilligen Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Probanden konnten ohne Nennung von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie jederzeit zurückziehen.

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

#### **5.2.1 Proben der mehrfachen Pycnogenol-Gabe**

Für die Untersuchungen im Rahmen der Steady-state-Messungen wurden sieben Freiwillige, davon fünf Frauen und zwei Männer im Alter zwischen 18 und 30 Jahren herangezogen. Die Probanden wurden mit B1–B7 bezeichnet. Nach einer 24-stündigen flavonoidfreien Diät wurde den Freiwilligen morgens jeweils 20 ml Blut in sterilen Monovetten abgenommen. Unmittelbar nach der Blutabnahme wurden den Probanden 200 mg Pycnogenol in Tablettenform verabreicht. Während der nächsten fünf Tage wurde

von den Freiwilligen ebenfalls jeden Morgen jeweils 200 mg Pycnogenol eingenommen. Die Diätmaßnahmen, die unter 5.1 beschrieben wurden, wurden am Tag vor der Pycnogenol-Einnahme, sowie am ersten, vierten und fünften Tag der Studie beibehalten, um die Ergebnisse nicht durch die Nahrungsbestandteile zu verfälschen.

Am fünften Tag wurde vier Stunden nach der letzten Pycnogenol-Einnahme ebenfalls 20 ml Blut in sterilen Monovetten abgenommen. Die Blutabnahmen erfolgten immer durch Ärzte und Krankenschwestern.

Die Monovetten mit dem frisch gewonnenen Blut wurden jeweils sofort zentrifugiert, anschließend in die zuvor beschrifteten Plasmaröhrchen gefüllt und bei -80 °C gelagert. Dabei wurde ein Teil der Plasmaproben für die Zellversuche unter sterilen Bedingungen abgefüllt und verschlossen.

### **5.2.2 Proben der einmalige Pycnogenol-Gabe**

Für die Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs und der Konzentration der Pycnogenol-Metabolite und Bestandteile wurden elf Freiwillige, davon fünf Frauen und sechs Männer, im Alter zwischen 18 und 30 Jahren rekrutiert. Die Probanden erhielten fortlaufend die Buchstaben A–L, wobei der Buchstabe B für die Mehrfachgabe vorbehalten war. Nach einer 24-stündigen flavonoidfreien Diät wurde den Freiwilligen ein Venenkatheter gelegt. Die erste Blutabnahme (jeweils 13 ml Blut) zur Gewinnung des Basalwertes erfolgte morgens um 8.00 Uhr in nüchternem Zustand. Unmittelbar danach wurde eine einmalige Dosis von 300 mg Pycnogenol verabreicht. Zu den in Tabelle 12 vorgeschriebenen Zeiten wurden über den Venenkatheter jeweils 13 ml Blut entnommen.

Die Monovetten mit dem frisch gewonnenen Blut wurden jeweils sofort zentrifugiert, das Plasma anschließend in die zuvor beschrifteten Plasmaröhrchen gefüllt und bei -80 °C gelagert. Dabei wurde ein Teil der Plasmaproben für die Zellversuche unter sterilen Bedingungen abgefüllt und verschlossen.

**Tabelle 12: Versuchsablauf der kinetischen Untersuchung nach einer einmaligen Pycnogenol-Einnahme mit Zeitangabe der Blutabnahmen und Mahlzeiten.**

<b>Zeit</b>	<b>Blutabnahmen</b>	<b>Aktivitäten</b>
08.00	1. t = 0 h	Legen des venösen Zugangs Abnahme des Basalwertes Einnahme von 300 mg Pycnogenol
08.15		Frühstück
08.30	2. t = 0,5 h	
09.00	3. t = 1 h	
10.00	4. t = 2 h	
12.00	5. t = 4 h	
12.15		Mittagessen
14.00	6. t = 6 h	
16.00	7. t = 8 h	
18.00	8. t = 10 h	
18.15		Abendessen
20.00	9. t = 12 h	
22.00	10. t = 14 h	



## 6 Pharmakokinetische Untersuchung bekannter Inhaltsstoffe und/oder Metabolite von Pycnogenol

### 6.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Taufkirchen und Merck, Darmstadt bezogen.

#### Fließmittel:

- Acetonitril (HPLC-Gradient Grade Qualität), Fisher Scientific, Schwerte
- Wässrige Phase:
 

Octansulfonsäure-Natriumsalz	0,14 g (0,6 mM)
Ethylendiamin-Natrium	0,10 g (0,27 mM)
Triethylamin	6 ml (0,04 M)
Phosphorsäure zum Einstellen von pH 2,95	
Millipore <sup>®</sup> -Wasser	ad 1000,0 ml

#### Interne Standards:

- p-Hydroxybenzoesäuremethylester
- Hydrochinon

#### Krebs-Ringer-HEPES-Puffer:

Lösung A:	NaCl	118 mM
	KCl	4,84 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,20 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,18 mM
Lösung B:	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,44 mM
Lösung C:	HEPES	10 mM

Es wurden jeweils 10,0 ml der Lösungen A, B und C gemischt und mit Millipore<sup>®</sup> Wasser auf etwa 90 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt und mit Millipore<sup>®</sup> Wasser auf 100,0 ml ergänzt.

### **Sonstige Chemikalien:**

- Methanol
- Essigsäureethylester p.a.
- Millipore<sup>®</sup>-Wasser
- $\beta$ -Glucuronidase, Type H-3: from *Helix pomatia*; EC-Nr.: 3.2.1.31
- Sulfatase, Type H-1: from *Helix pomatia*; EC-Nr.: 3.1.6.1
- Natriumacetatpuffer, 50 mM, pH 5

## **6.2 Aufarbeitung der Plasmaproben**

Es wurden pro Versuchsansatz jeweils 2,0 ml der Plasmaproben der Steady-state-Bedingungen und der einmaligen Pycnogenol-Einnahme verwendet. Die Plasmaproben wurden mit 20 U Glucuronidase und 20 U Sulfatase in Natriumacetatpuffer, pH 5, versetzt und zwei Stunden bei 37 °C im Eppendorf Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zusatz von je 20  $\mu$ l der Internen Standards p-Hydroxybenzoesäuremethylester (100  $\mu$ g/ml) und Hydrochinon (10  $\mu$ g/ml) wurden die Proben mit 100  $\mu$ l 1 M HCl angesäuert. Der Interne Standard p-Hydroxybenzoesäuremethylester war im ECD nicht zu detektieren, so dass Hydrochinon als zweiter Interner Standard eingesetzt werden musste.

Anschließend erfolgte eine zweifache Extraktion der Plasmaproben für 20 Minuten mit je 3 ml Essigsäureethylester am Mischräd (340 mm Durchmesser, 10 Upm, konstruiert in der Werkstatt des Instituts). Die Essigsäureethylester-Phasen wurden vereinigt, unter Stickstoffbegasung bei 25 °C (Wasserbad) abgedampft und in 100  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe des Plasmas mittels Kalibriergeraden erfolgten mithilfe der HPLC. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden je 2,0 ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, dessen Elektrolytzusammensetzung und -konzentration den Plasmabedingungen ähnlich ist, mit methanolischen Extraktbestandteilen bzw. Metaboliten in verschiedenen Konzentrationsbereichen versetzt.

Der Einsatz des Puffers war nötig, da für die Erstellung der Kalibriergeraden und für die anschließende Validierung insgesamt etwa 800 ml Plasma von Blutspendern, die eine mindestens 24-stündige flavonoidfreie Diät zur Vermeidung von Verfälschungen durch flavonoidhaltige Nahrungsbestandteile eingehalten haben, erforderlich gewesen wäre. Dies war im Rahmen der von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellten gepoolten Plasmaproben von verschiedenen Spendern nicht möglich. Deshalb wurden statt Plasma jeweils 2,0 ml Puffer verwendet und dieser nach Zugabe der Internen Standards in gleicher Weise wie die Plasmaproben, jedoch ohne Inkubation mit Glucuronidase und Sulfatase, analysiert. In Vorversuchen wurden Puffer- und Plasmaproben, die mit Glucuronidase und Sulfatase inkubiert wurden, als Kontrolle aufgearbeitet. Es wurden keine interferierenden Peaks durch die beiden Substanzen in den Chromatogrammen festgestellt.

### 6.3 HPLC-Bedingungen

Für eine optimale Detektion aller Substanzen wurden sowohl ein UV-VIS-Detektor als auch ein elektrochemischer Detektor (ECD) verwendet. Da der ECD sich nicht mit dem Einsatz einer Gradientenmethode kombinieren ließ, war für eine gute Trennung der Extraktbestandteile und/oder Metabolite die Entwicklung von zwei Methoden erforderlich. Der Interne Standard Hydrochinon war für Methode A ungeeignet, da er zu früh eluiert wurde. Deshalb wurde letztendlich für jeden Detektor bzw. für jede Methode ein separater Interner Standard verwendet.

---

Pumpe	Model 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf, Waters, Milford, USA
Probengeber	717plus Autosampler, Waters
Stationäre Phase	Zorbax SB C-8, Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA
Detektoren	UV dualband Model 2487, Messwellenlänge 280 nm, Waters Elektrochemischer Detektor CLC 100, Chromsystems, München
Steuerung und Datenverarbeitung	Software „Breeze <sup>®</sup> Version 3.30“, Waters Satelliteninterface, Waters

---

**Methode A:**

Zur Detektion von Ferulasäure und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxy)- $\gamma$ -valerolacton (M2);  
Interner Standard: p-Hydroxybenzoesäuremethylester; UV-VIS-Detektion

---

Mobile Phase:	Wässrige Phase : Acetonitril 85 : 15 isokratisch
Flussrate:	1 ml/min

---

**Methode B:**

Zur Detektion von Catechin, Kaffeesäure, Taxifolin und  $\delta$ -(3,4-Dihydroxy)- $\gamma$ -valerolacton (M1); Interner Standard: Hydrochinon; elektrochemische Detektion

---

Mobile Phase:	Wässrige Phase : Acetonitril 88 : 12 isokratisch
Flussrate:	1 ml/min

---

## 6.4 Quantitative Auswertung der HPLC-Ergebnisse

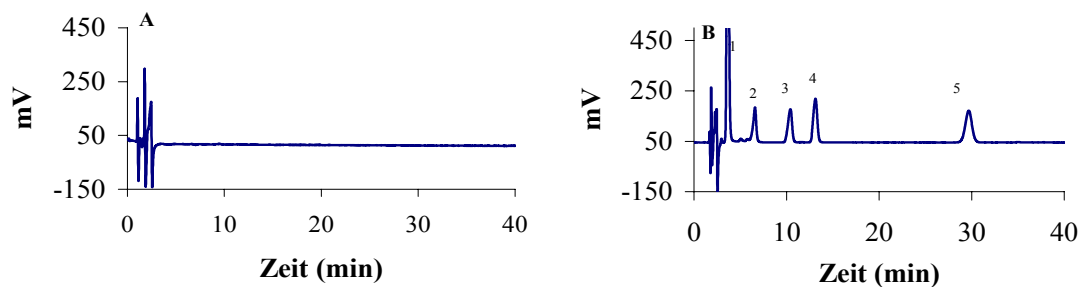
Nach Integration der Peakflächen mithilfe der Software „Breeze<sup>®</sup> Version 3.30“ wurden die Quotienten aus der Fläche des Peaks der zu untersuchenden Substanz und der des Peaks des entsprechenden Internen Standards gebildet. Die Quotienten der Kalibrierlösungen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Unter Verwendung der so ermittelten Kalibriergeraden und der Quotienten, die für die jeweils zu untersuchenden Substanzen in den Plasmaproben bestimmt wurden, konnten die Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten der Blutabnahmen (Experimenteller Teil 5.2.1 und 5.2.2) errechnet werden.

## 6.5 Validierung der HPLC-Analytik

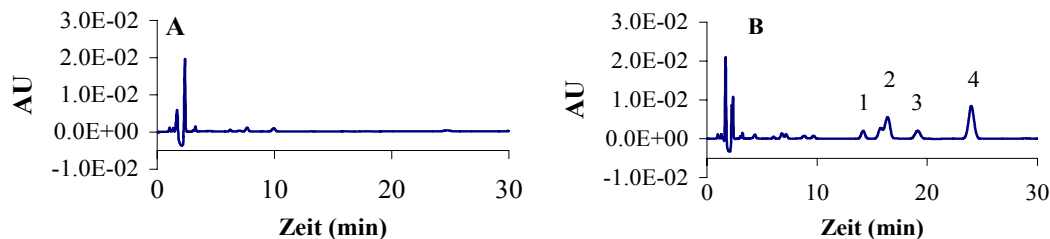
### 6.5.1 Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störungen, sowie Interferenzen mit der Matrix zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Dazu wurde der Puffer ohne bzw. mit Zusatz der zu untersuchenden Substanzen wie im Experimentellen Teil 6.2 beschrieben, jedoch ohne vorhergehende Inkubation mit Glucuronidase und Sulfatase, mit Essigsäureethylester extrahiert, aufgearbeitet und chromatographiert.

Es wurde in keinem Fall eine Übereinstimmung der Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen mit eventuell vorhandenen Matrixbestandteilen gefunden (Abbildung 49, Abbildung 50).

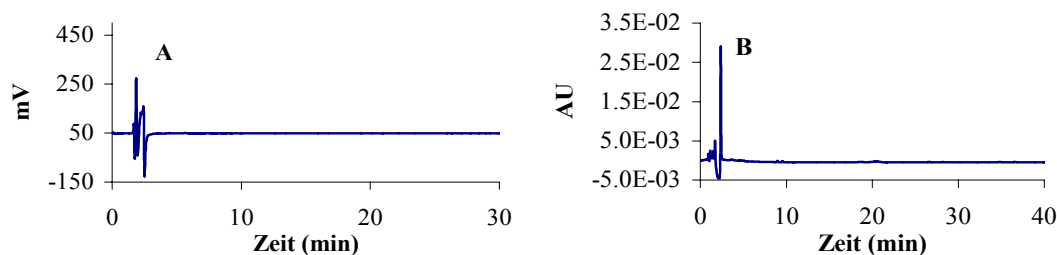


**Abbildung 49: Musterchromatogramme von Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, extrahiert mit Ethylacetat, chromatographiert nach Methode B mit elektrochemischer Detektion vor (A) und nach (B) Zugabe der folgenden Substanzen: Hydrochinon als Interner Standard (1), Catechin (2), M1 (3), Kaffeesäure (4) und Taxifolin (5).**



**Abbildung 50: Musterchromatogramme von Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, extrahiert mit Ethylacetat, chromatographiert nach Methode A mit UV-VIS-Detektion vor (A) und nach (B) Zugabe der folgenden Substanzen: Ferulasäure (1), Taxifolin (2), M2 (3) und p-Hydroxybenzoesäuremethylester als Interner Standard (4). Taxifolin (2) wurde mit Methode B ausgewertet, da der Peak dort besser zu identifizieren war.**

Um die Selektivität der Methode auch in den Humanplasma-Proben zu zeigen, sind die Blankplasma-Proben des Probanden B3 nach einer 24-stündigen flavonoidfreien Diät dargestellt (Abbildung 51). Es sind keine Peaks eventuell vorhandener Matrixbestandteile zu erkennen, so dass Peaks in Chromatogrammen nach Extrakteinnahme nur auf Bestandteile und/oder Metaboliten desselben zurückzuführen sind.



**Abbildung 51: Musterchromatogramme von Humanplasma nach einer 24-stündigen flavonoidfreien Diät, vor Pycnogenol-Einnahme, extrahiert mit Ethylacetat, chromatographiert nach Methode A mit elektrochemischer Detektion (A) und nach Methode B mit UV-VIS-Detektion (B).**

## 6.5.2 Kalibrierfunktion

### 6.5.2.1 Linearität

Die Linearität wurde mittels Kalibrierungsreihen anhand von fünf Konzentrationen in für die verschiedenen Substanzen variierenden Bereichen überprüft (Tabelle 13).

Jede erstellte Kalibrierfunktion wurde mithilfe der Software GraphPad Prism<sup>TM</sup> Version 4.0 anhand der folgenden Parameter geprüft und beurteilt: Varianzenhomogenität, Normalverteilung der Stichproben nach D'Agostino, Residualplot (zur Überprüfung von

Trends), Güte der Anpassung und Korrelationskoeffizient ( $r$ ). Sind diese Voraussetzungen erfüllt und liegt ein linearer Zusammenhang vor, kann die lineare Regression durchgeführt werden.

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden die Quotienten aus den Flächen des Peaks der zu untersuchenden Substanz und des Peaks des jeweiligen Internen Standards gebildet.

Aus den erhaltenen Quotienten ( $y$ ) wurde für jede Konzentration der Mittelwert (MW) errechnet, gegen die jeweilige Konzentration ( $x$ ) aufgetragen und daraus die Geradengleichung ( $y = ax + b$ ;  $a$ : Steigung,  $b$ : Achsenabschnitt) durch lineare Regression ermittelt.

Die Überprüfung der Kalibrierdaten mittels der Software GraphPad Prism<sup>TM</sup> Version 4.0 ergab keinen Hinweis auf Trends oder Abweichungen von der Normalverteilung. Varianzhomogenität wurde bei allen untersuchten Substanzen erreicht. Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) von mindestens 0,986 zeigen, dass die Kalibriergeraden eine gute Linearität zwischen Substanzkonzentration und Peakflächenverhältnis Substanz zu den jeweiligen Internen Standards aufweisen [212, 213]. Keine der unter diesen Aspekten untersuchten Kalibrierfunktion zeigte eine Abweichung von der Linearität.

**Tabelle 13: Kalibrierfunktionsparameter der untersuchten Substanzen nach Extraktion aus Puffer (pH 7,4) für die jeweils angegebenen Konzentrationsbereiche. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Messungen.**

Substanz	Konzentrationsbereich (ng/ml)	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)
<b>Catechin</b>	10 - 100	0,001377 ± 0,000075	-0,02776 ± 0,00463	0,9860
<b>Kaffeesäure</b>	0,5 – 20	0,006536 ± 0,000232	-0,03251 ± 0,002386	0,9924
<b>Metabolit M1</b>	1 – 50	0,003301 ± 0,000107	-0,001128 ± 0,000272	0,9975
<b>Taxifolin</b>	10 – 100	0,002622 ± 0,000097	-0,000044 ± 0,005933	0,9955
<b>Ferulasäure</b>	10 – 100	0,001302 ± 0,000062	0,007256 ± 0,003800	0,9926
<b>Metabolit M2</b>	50 – 200	0,001264 ± 0,002478	-0,01487 ± 0,00315	0,9909

### 6.5.3 Prüfung auf Präzision und Richtigkeit der Methoden

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der Methoden wurden jeweils 2 ml Puffer mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen (Qualitätskontrollstandards) versetzt, wie unter Kapitel 6.2 beschrieben, jedoch ohne Inkubation mit Glucuronidase und Sulfatase, aufgearbeitet und wiederholt ( $n = 6$ ) analysiert. Die Konzentrationen wurden anhand der Geradengleichungen der durch lineare Regression erstellten Kalibriergeraden errechnet.

Zur Feststellung der *Intra-day*-Präzision und Richtigkeit wurden an einem Tag drei verschiedene Konzentrationen (je eine Konzentration für den unteren, mittleren und oberen Arbeitsbereich) jeweils sechsmal aufgearbeitet und vermessen. Zur Ermittlung der *Inter-day*-Präzision und Richtigkeit wurde dies an fünf aufeinander folgenden Tagen wiederholt.

Zur Beurteilung der Methodenpräzision wurde die aus der Analyse der Qualitätskontrollstandards ermittelte prozentuale relative Standardabweichung herangezogen [212]. Die Richtigkeit der Methoden wurde über die prozentuale Abweichung der ermittelten Konzentration in Bezug auf die tatsächlich eingesetzte Konzentration nach folgender Gleichung berechnet [214]:

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\text{ermittelte Konzentration}}{\text{eingesetzte Konzentration}} \cdot 100$$

Die Ergebnisse zur Präzision und Richtigkeit der eingesetzten Methoden für die untersuchten Substanzen sind in Tabelle 14 (*Intra day*) und Tabelle 15 (*Inter day*) wiedergegeben.



Tabelle 14: *Intra-day*-Daten zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der verwendeten Methode.

Substanz	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit (%)	Relative Standardabweichung (%)
Catechin	25	22,71 ± 1,62	90,84	7,13
	50	46,94 ± 2,81	93,88	5,99
	75	72,85 ± 3,41	97,13	4,68
Kaffeesäure	1	0,91 ± 0,02	91,2	2,20
	5	4,5 ± 0,39	90,00	8,67
	10	8,97 ± 0,67	89,75	7,47
Metabolit M1	5	4,76 ± 0,45	95,20	9,45
	25	26,19 ± 1,12	104,76	4,28
	50	49,72 ± 2,51	99,44	5,05
Taxifolin	25	25,81 ± 0,88	103,23	3,41
	50	45,39 ± 2,72	90,78	5,99
	75	76,47 ± 3,76	101,96	4,92
Ferulasäure	25	27,05 ± 0,92	108,18	3,40
	50	45,14 ± 1,49	90,3	3,30
	75	71,50 ± 3,51	95,33	4,91
Metabolit M2	75	77,43 ± 2,22	103,24	2,87
	100	92,14 ± 2,89	92,14	3,14
	150	139,29 ± 7,52	92,86	5,40

**Tabelle 15: Inter-day-Daten zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit der verwendeten Methode.**

Substanz	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit (%)	Relative Standardabweichung (%)
Catechin	25	24,87 ± 1,97	99,48	7,92
	50	47,34 ± 5,37	94,68	11,34
	75	77,88 ± 6,54	103,84	8,40
Kaffeesäure	1	1,01 ± 0,09	101,00	8,91
	5	4,96 ± 0,36	99,20	7,26
	10	9,11 ± 0,88	91,10	9,66
Metabolit M1	5	5,05 ± 0,33	101,0	6,53
	25	24,76 ± 1,86	99,04	7,51
	50	52,87 ± 3,21	105,74	6,07
Taxifolin	25	23,48 ± 1,29	93,92	5,49
	50	50,91 ± 2,61	101,82	5,12
	75	80,06 ± 3,92	106,7	4,90
Ferulasäure	25	24,32 ± 1,11	97,28	4,56
	50	48,06 ± 1,98	96,12	4,12
	75	72,48 ± 2,63	96,64	3,63
Metabolit M2	75	76,37 ± 3,87	101,83	5,07
	100	97,90 ± 5,58	97,90	5,70
	150	142,19 ± 6,23	94,80	4,38

Die Differenz zwischen der ermittelten und der tatsächlich eingesetzten Konzentration, sowie die errechnete relative Standardabweichung lag bei allen Proben unter 15 %.

#### 6.5.4 Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen der eingesetzten Substanzen unter den hier angegebenen Aufarbeitungs- und Messbedingungen wurden niedrige Konzentrationen wiederholt (n = 6) aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. Die Konzentration der Proben wurde über die erstellten Kalibriergeraden berechnet. Als kleinste quantifizierbare Konzentration (LOQ, *lower limit of detection*) wurde diejenige Konzentration definiert, die mit ausreichender Präzision (relative Standardabweichung < 15 %) und Richtigkeit (85 bis

115 %) ermittelt werden kann [215]. Die Bestimmungsgrenzen der aus Krebs-Ringer-HEPES-Puffer extrahierten Substanzen sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 16):

**Tabelle 16: Bestimmungsgrenzen der untersuchten Substanzen nach Extraktion aus Krebs-Ringer-HEPES-Puffer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Versuchen.**

Substanz	Eingesetzte Konzentration (ng/ml)	Ermittelte Konzentration (ng/ml)	Relative Standardabweichung (%)
Catechin	10	9,89 ± 1,01	10,21
Kaffeensäure	0,5	0,69 ± 0,10	14,49
Metabolit M1	1	1,24 ± 0,17	13,71
Taxifolin	10	11,60 ± 1,18	10,17
Ferulasäure	10	9,46 ± 0,63	6,65
Metabolit M2	50	49,0 ± 1,43	2,92

### 6.5.5 Wiederfindung (relativ)

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Steigungen von sechs Kalibriergeraden nach zweifacher Extraktion ( $a_e$ ), wie unter C 6.2 beschrieben, jedoch ohne Inkubation mit Glucuronidase und Sulfatase, mit den Steigungen ( $a_s$ ) aus sechs Kalibriergeraden nach direkter Injektion ins Verhältnis gesetzt. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte für die unterschiedlichen Substanzen jeweils im gleichen Konzentrationsbereich. Die Wiederfindung wurde nach folgender Formel berechnet [216]:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{(a_e) \text{Steigung}_{\text{extrahierte Probe}}}{(a_s) \text{Steigung}_{\text{Standardprobe}}} \cdot 100$$

**Tabelle 17: Kalibrierfunktionsparameter der ermittelten Geraden nach zweifacher Extraktion mit Ethylacetat. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus sechs Messungen.**

<b>Kalibriergeraden für extrahierte Proben</b>				
<b>Substanz</b>	<b>Konzentrationsbereich (ng/ml)</b>	<b>a<sup>1)</sup></b>	<b>b<sup>1)</sup></b>	<b>r<sup>1)</sup></b>
<b>Catechin</b>	10 - 100	0,001303 $\pm$ 0,000040	-0,010160 $\pm$ 0,002480	0,9869
<b>Kaffeesäure</b>	0,5 - 20	0,006650 $\pm$ 0,000187	-0,01017 $\pm$ 0,00192	0,9891
<b>Metabolit M1</b>	1 - 50	0,003486 $\pm$ 0,000037	-0,001117 $\pm$ 0,000943	0,9984
<b>Taxifolin</b>	10 - 100	0,002537 $\pm$ 0,000102	-0,000001 $\pm$ 0,006238	0,9783
<b>Ferulasäure</b>	10 - 100	0,001343 $\pm$ 0,000016	0,005006 $\pm$ 0,000994	0,9979
<b>Metabolit M2</b>	50 - 200	0,001299 $\pm$ 0,000045	-0,037590 $\pm$ 0,005709	0,9836

<sup>1)</sup> a: Steigung der Regressionsgeraden; b: y-Achsenabschnitt; r: Korrelationskoeffizient

**Tabelle 18: Kalibrierfunktionsparameter der ermittelten Geraden bei direkter Injektion.**  
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus sechs Messungen.

Substanz	Konzentrationsbereich (ng/ml)	Kalibriergeraden für Standardproben		
		a <sup>1)</sup>	b <sup>1)</sup>	r <sup>1)</sup>
Catechin	10 - 100	0,001458 $\pm$ 0,000036	-0,007663 $\pm$ 0,002206	0,9909
Kaffeesäure	0,5 - 20	0,006849 $\pm$ 0,000111	-0,003555 $\pm$ 0,001138	0,9963
Metabolit M1	1 - 50	0,003927 $\pm$ 0,000073	-0,005158 $\pm$ 0,001862	0,9952
Taxifolin	10 - 100	0,002588 $\pm$ 0,000047	-0,021480 $\pm$ 0,002888	0,9954
Ferulasäure	10 - 100	0,001593 $\pm$ 0,000021	0,002710 $\pm$ 0,001259	0,9977
Metabolit M2	50 - 200	0,001563 $\pm$ 0,000026	-0,030160 $\pm$ 0,003334	0,9961

<sup>1)</sup> a: Steigung der Regressionsgeraden; b: y-Achsenabschnitt; r: Korrelationskoeffizient

Die daraus errechneten Wiederfindungsraten für die untersuchten Substanzen sind in Tabelle 19 aufgeführt:

**Tabelle 19: Wiederfindungsrate (%) von Inhaltsstoffen und/oder Metaboliten des Pycnogenol-Extraktes aus dem Verhältnis der unter wiederholten Bedingungen (n = 6) ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden (Tabelle 17, Tabelle 18).**

Wiederfindung (%)					
Catechin	Kaffeensäure	M1	Taxifolin	Ferulasäure	M2
89,37	97,09	88,77	98,03	84,31	83,11

### 6.5.6 Extraktionseffektivität

Zur Bestimmung der Extraktionseffektivität wurden wiederholt (n = 6) die zu untersuchenden Substanzen in drei verschiedenen Konzentrationen dem Puffer zugegeben, so dass die Endkonzentrationen 5, 10 und 20 ng/ml für Kaffeesäure und M1, 25, 50 und

100 ng/ml für Catechin, Taxifolin und Ferulasäure und 75, 100 und 150 ng/ml für M2 betragen. Die Berechnung der Extraktionseffektivität erfolgte nach folgender Gleichung [216]:

$$\text{Extraktionseffektivität (\%)} = \frac{\text{Peakfläche der Substanz nach Extraktion für } x \text{ ng/ml}}{\text{Peakfläche der Substanz bei direkter Injektion für } x \text{ ng/ml}} \cdot 100$$

**Tabelle 20: Extraktionseffektivität (%) der untersuchten Substanzen mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion für unterschiedliche Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus sechs Messungen.**

Extraktionseffektivität (%)			
Substanz	5 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml
Metabolit M1	87,61 $\pm$ 3,87	91,39 $\pm$ 4,71	89,71 $\pm$ 2,11
Kaffeesäure	95,12 $\pm$ 1,83	96,29 $\pm$ 0,98	97,45 $\pm$ 1,65

Extraktionseffektivität (%)			
Substanz	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml
Catechin	84,15 $\pm$ 1,56	83,19 $\pm$ 5,07	85,87 $\pm$ 7,11
Taxifolin	95,37 $\pm$ 1,11	92,22 $\pm$ 8,17	97,93 $\pm$ 1,89
Ferulasäure	82,76 $\pm$ 5,64	84,44 $\pm$ 3,63	83,36 $\pm$ 7,54

Extraktionseffektivität (%)			
Substanz	75 ng/ml	100 ng/ml	150 ng/ml
Metabolit M2	89,54 $\pm$ 2,56	91,23 $\pm$ 5,71	87,65 $\pm$ 3,91

## 6.6 Bestimmung der Wiederfindung von Dimeren/Trimeren aus dem Gesamtextrakt Pycnogenol (Fraktion II/Fraktion III)

### 6.6.1 Vorbereitung der Proben

Die Fraktionen II und III des Pycnogenol-Extraktes (Einleitung) wurden in getrennten Ansätzen mit einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml mit 1 ml Humanplasma bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend erfolgte die zweifache Extraktion mit Ethylacetat wie unter Experimenteller Teil 4.2 beschrieben, allerdings ohne vorherige Inkubation mit Glucuronidase und Sulfatase. Als Kontrolle wurde 1 ml Plasma unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zusatz der Fraktionen behandelt.

Die Proben für die direkte Injektion wurden in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml Fraktion in Methanol hergestellt.

Die von der Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, Arbeitskreis Professor Schreier, freundlicherweise zur Verfügung gestellten Procyanidine B1 und B2 wurden nachträglich als Reinsubstanzen zur Identifizierung möglicher Peaks chromatographiert.

### 6.6.2 HPLC-Bedingungen

Die Proben wurden mit den HPLC-Bedingungen, die in Kapitel 6.3 beschrieben sind, mittels Methode A analysiert. Die Auswertung der Peakflächen erfolgte mithilfe der Software „Breeze<sup>®</sup> Version 3.30“.

### 6.6.3 Bindung der Fraktionen an Plasmaproteine

Zur Bestimmung der Bindung der Inhaltsstoffe von Fraktion II und III wurden der Quotient der Flächen des extrahierten Anteils und der der direkten Injektion gebildet. Der prozentuale extrahierbare Anteil der einzelnen Substanzen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Extrahierbarer Anteil (\%)} = \frac{\text{Fläche}_{\text{extrahierte Probe}}}{\text{Fläche}_{\text{Standardprobe}}} \cdot 100$$

Der prozentuale extrahierbare Anteil der Inhaltsstoffe der beiden Fraktionen zeigt an, ob und zu welchem Anteil Di- bzw. Trimere des Extraktes aus Plasma mit der hier verwendeten Methode zu extrahieren sind (Tabelle 21-24).

**Tabelle 21: Retentionszeiten, Mittelwerte der Flächen aus drei Messungen und Extrahierbarer Anteil der Fraktion II; Detektion: UV/VIS**

Retentionszeit (min)	Fläche (Standard-probe)	Fläche (extrahierte Probe)	Extrahierbarer Anteil (%)
3,3	316134	86539	27,37
3,6	52051	20402	39,20
4,0	277501	88297	31,82
4,6	140204	49384	35,22
5,0	37429	19257	51,45
5,4	55917	45137	80,27
6,2	36247	18385	50,27
6,9	57002	49219	86,35
7,7	25423	21319	83,86
8,9	46781	35192	75,23
9,9	16125	11203	69,48
11,5	25103	13244	52,76
12,1	29976	29518	98,47
12,8	17537	16707	95,27
13,8	12933	8317	64,31
17,2	29592	15943	53,88
18,3	10361	n.d.*	
27,3	10131	n.d.	

\* nicht detektierbar



**Tabelle 22: Retentionszeiten, Mittelwerte der Flächen aus drei Messungen und Extrahierbarer Anteil der Fraktion II; Detektion: ECD**

<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>Fläche (Standard-probe)</b>	<b>Fläche (extrahierte Probe)</b>	<b>Extrahierbarer Anteil (%)</b>
3,5	5226556	828238	15,85
3,7	1509209	919628	60,93
4,1	4755383	946567	19,91
4,7	2180181	619303	28,41
5,6	968887	518120	53,48
6,3	451381	135129	29,94
7,0	1295244	161989	12,51
7,8	653328	n.d.	
9,0	2092684	352665	16,85
13,0	331609	n.d.	
17,4	951246	253265	26,62

**Tabelle 23: Retentionszeiten, Mittelwerte der Flächen aus drei Messungen und Extrahierbarer Anteil der Fraktion III; Detektion: UV-VIS**

<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>Fläche (Standard-probe)</b>	<b>Fläche (extrahierte Probe)</b>	<b>Extrahierbarer Anteil (%)</b>
3,3	12088	n.d.	
3,6	18435	9459	51,31
4,2	49644	n.d.	
4,4	60964	6931	11,37
5,5	74165	12358	16,66
9,1	2916	n.d.	
9,9	2297	1278	55,66
11,8	4173	n.d.	
15,3	2645	n.d.	

**Tabelle 24: Retentionszeiten, Mittelwerte der Flächen aus drei Messungen und Extrahierbarer Anteil der Fraktion III; Detektion: ECD**

Retentionszeit (min)	Fläche (Standard-probe)	Fläche (extrahierte Probe)	Extrahierbarer Anteil (%)
3,2	40614	n.d.	
3,7	960890	362440	37,72
4,6	724551	92128	12,72
5,6	878923	250499	28,50

#### 6.6.4 Kalibrierung von Procyanidin B1

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden die Quotienten aus den Flächen des Peaks der zu untersuchenden Substanz und des Peaks des jeweiligen Internen Standards gebildet.

Aus den erhaltenen Quotienten (y) wurde für jede Konzentration der Mittelwert (MW) errechnet, gegen die jeweilige Konzentration (x) aufgetragen und daraus die Geradengleichung ( $y = ax + b$ ; a: Steigung, b: Achsenabschnitt) durch lineare Regression ermittelt (Tabelle 25).

Die Geradengleichung wurde zur Quantifizierung der in den Plasmaproben enthaltenen Konzentration an Procyanidin B1 verwendet.

**Tabelle 25: Kalibrierfunktionsparameter von Procyanidin B1 nach Extraktion aus Puffer (pH 7,4) für den angegebenen Konzentrationsbereich. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs Messungen.**

Substanz	Konzentrationsbereich (ng/ml)	Steigung (a)	Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (r)
Procyanidin B1	100 - 1500	0,0005978 ± 0,0000072	0,001249 ± 0,006063	0,9920

## **7 *Ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach Pycnogenol-Einnahme**

### **7.1 Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten in humanem Plasma infolge Pycnogenol-Einnahme**

#### **7.1.1 Bedingungen der flavonoidfreien Diät**

Die Bedingungen der mindestens 24-stündigen flavonoidfreien Diät wurden Experimentellen Teil 5.1 beschrieben.

#### **7.1.2 Gewinnung der Plasmaproben vor und nach Pycnogenol-Einnahme**

##### **7.1.2.1 Plasmaproben nach mehrmaliger Pycnogenol-Einnahme**

Die Bedingungen, sowie die Gewinnung und Lagerung der Plasmaproben nach mehrtägiger Pycnogenol-Einnahme durch die Studienteilnehmer wurden im Experimentellen Teil 5.2.2 ausführlich dargestellt.

##### **7.1.2.2 Plasmaproben nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme**

Zur Durchführung der Vorversuche wurde nach der mindestens 24-stündigen flavonoidfreien Diät am Morgen nach der Abnahme des Basalwertes eine einmalige Dosis von 1,0 g Pycnogenol-Extrakt, gelöst in 200 ml Wasser, eingenommen. Vier, respektive sechs Stunden nach dieser Einnahme wurden jeweils 10 ml Blut aus der Armvene entnommen und zur Gewinnung des Plasmas sofort bei 1881 x g und 15 °C sieben Minuten lang zentrifugiert. Die Plasmaproben wurden jeweils aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Die Gewinnung der Plasmaproben der Studienteilnehmer wurde im Experimentellen Teil 5.2.2 beschrieben.

#### **7.1.3 Kultivierung der Monocyten**

Die Monocyten wurden aus gepoolten Blutzellsuspensionen der Blutgruppe 0 positiv wie unter 4.2 beschrieben isoliert. Es wurden nur Blutzellsuspensionen der

Blutgruppe 0 positiv verwendet, da die Plasmaproben ebenfalls aus dieser Blutgruppe stammten. Somit wurde einer AB0-Inkompatibilität vorgebeugt.

Die Monocyten wurden wie unter 4.2 beschrieben in 1 ml McCoy's Kompletmedium mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen in sterile 24-Loch-Platten eingesetzt und über Nacht bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Inkubator ruhen gelassen. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 1 ml einer 1:1 Mischung aus Plasmaproben und RPMI-Medium (RPMI 1640 Medium (1x), Biochrom, Berlin) ersetzt. Dabei wurden das Leerwert-Plasma und das Plasma nach Pycnogenol-Einnahme jeweils zweifach angesetzt. Alle vier Proben wurden zunächst eine Stunde nur in der Plasma-RPMI-Mischung inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 10 ng/ml LPS zugegeben und 48 Stunden bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **7.1.4 ELISA-Messung der Plasmaproben**

Nach der 48 stündigen Inkubation mit LPS wurden die Zellen in der 24-Loch-Zellkulturplatte bei 173 x g fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellüberstände wurden anschließend abgenommen und die ELISA-Messung wie unter 4.6.2 beschrieben durchgeführt.

### **7.1.5 Auswertung der ELISA-Messung der Plasmaproben**

Die Auswertung erfolgte erneut über die Kalibriergerade, die sich aus den MMP-9-Standards berechnen ließ.

Dabei stellen die Proben, inkubiert in Plasma vor Pycnogenol-Einnahme die maximale MMP-9-Freisetzung dar und wurden daher als 100 % Wert verwendet. Die Proben nach Pycnogenol-Einnahme zeigen jeweils den Grad der Hemmung dieser Freisetzung durch Pycnogenol auf und wurden entsprechend auf den 100 %-Wert bezogen.

## **8 *Ex vivo* Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme**

### **8.1 Geräte und Reagenzien**

- Bio-Rad Microplate Reader, Benchmark CA USA
- Microplate Washer Titertek<sup>®</sup> S8/12, Flow Laboratories, Meckenheim
- Biofuge A, Heraeus, Berlin
- Vortex Reax 1, Heidolph, Schwabach
- ELISA-Kit NF- $\kappa$ B p65 ActivELISA<sup>™</sup>, IMK-503, Imgenex CA, USA

### **8.2 Gewinnung der Plasmaproben vor und nach Pycnogenol-Einnahme**

Die Versuche zur Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B im Zellkernextrakt von Monocyten wurden mit Plasma der Studienteilnehmer nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, 5.2.1) durchgeführt. Keine dieser Plasmaproben war hämolysiert, so dass eine Auswertung der Versuche bei allen Probanden möglich war.

### **8.3 Präparation von Kernextrakten aus Monocyten**

Die Monocyten wurden aus gepoolten Blutzellsuspensionen der Blutgruppe 0 positiv wie unter 4.2 beschrieben isoliert. Sie wurden anschließend in 2 ml McCoy's Kompletmedium mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen in sterile 24-Loch-Platten eingesetzt und über Nacht bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Inkubator ruhen gelassen (Experimenteller Teil, 4.2). Am folgenden Tag wurde das Medium durch 2 ml einer 1:1 Mischung aus Plasmaproben und RPMI-Medium (RPMI 1640 Medium (1x), Biochrom, Berlin) ersetzt. Dabei wurde jeweils eine Probe mit dem Plasma des Basalwertes und das Plasma nach Pycnogenol-Einnahme angesetzt. Alle Proben wurden zunächst über Nacht nur in der Plasma-RPMI-Mischung inkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen 1 µg/ml LPS zugegeben und 60 Minuten bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt und die Anzahl lebender Zellen wurde wie unter 4.3 beschrieben bestimmt.

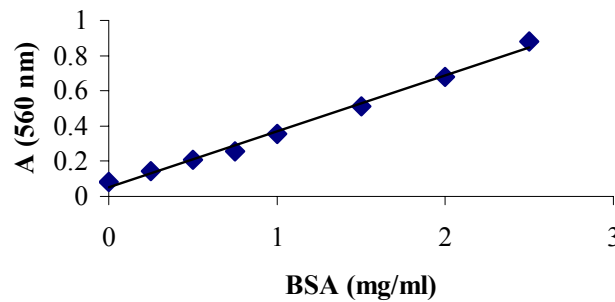
Für die weitere Präparation der Kernextrakte wurden nur vorgekühlte Reagenzien verwendet. Alle Arbeiten einschließlich der Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und wurden entsprechend der vom Hersteller mitgelieferten Vorschrift durchgeführt.

Die Zellen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und 1 Minute bei 2.000 Upm in der Minifuge zentrifugiert, anschließend vorsichtig alle Flüssigkeit abgenommen. Das Zellpellet wurde in 400 µl des mitgelieferten hypotonischen Lysepuffers resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die hypotone Salzkonzentration des Puffers bewirkte ein Anschwellen der Zellen. Nach Zusatz von 30 µl 10 % NP-40, eines nichtionischen Detergenzes, das zum Aufbrechen der Zellmembran führt, wurden die Proben 10 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Anschließend erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm. Die Zellüberstände wurden zur Analyse der cytoplasmatischen Extrakte aufgehoben.

Zum Zellpellet wurden jeweils 220 µl an eiskaltem nucleären Extraktionspuffer gegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert, wobei intermittierend gevortext wurde. Dabei erfolgte die Extraktion der Proteine aus dem Zellkern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 2 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorher gekühltes Eppendorfgefäß überführt, ein Teil für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet und die Probe anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Die für die Bestimmung der NF-κB-Aktivität einzusetzenden Proben sollten laut Herstellerangaben zwischen 0,5 und 1 mg/ml Protein enthalten.

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde mit Hilfe der BCA-Methode ermittelt (Experimenteller Teil, 2.3). Die Durchführung erfolgte in 96-Loch-Zellkulturplatten mit kleineren Volumina (200 µl BCA-Reagenz und 10 µl Probelösung). Die Kalibriergeraden wurden im Konzentrationsbereich von 0,25-2,5 mg/ml BSA erstellt (Abbildung 52).

Die mithilfe der Kalibriergeraden errechneten Konzentrationen der Proben lagen alle im Bereich zwischen 0,5 und 1 mg/ml Protein, so dass keiner der Zellkernextrakte verdünnt werden musste.



**Abbildung 52: Exemplarische Darstellung einer Kalibriergeraden zur Proteinbestimmung mittels BCA-Methode; Güte der Anpassung:  $r = 0,9965$ .**

#### 8.4 ELISA-Messung von aktiviertem NF- $\kappa$ B

Der verwendete ELISA-Kit NF- $\kappa$ B p65 ActivELISA<sup>TM</sup> misst das freie Protein p65 (RelA), welches eine aktivierende Wirkung auf die Transkription von NF- $\kappa$ B besitzt. Dieser ELISA ist nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut. Die mitgelieferte ELISA-Platte wurde zunächst mit 100  $\mu$ l pro Loch eines Anti-p65-Antikörpers, verdünnt in Coating Puffer, über einen Zeitraum von 12-24 Stunden bei 4 °C belegt. Die Lösung des Antikörpers wurde nach der Inkubationszeit entfernt und die verbleibende reaktive Oberfläche mit 200  $\mu$ l BSA-haltigem Blockier-Puffer bei Raumtemperatur für 30 bis 60 Minuten blockiert, um zu verhindern, dass der Primärantikörper unspezifisch mit anderen Proteinen eine Bindung eingeht. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde der mitgelieferte p65-Standard so verdünnt, dass die Konzentrationen 1,5625 ng/100  $\mu$ l, 3,125 ng/100  $\mu$ l, 6,25 ng/100  $\mu$ l, 12,5 ng/100  $\mu$ l, 25 ng/100  $\mu$ l und 50 ng/100  $\mu$ l p65 resultierten.

Nach dem Entfernen des Blockier-Puffers wurden jeweils 100  $\mu$ l der p65-enthaltenden Zellkernextrakte, sowie der hergestellten Standards für die Kalibriergerade in die 96-Loch-ELISA-Platte einpipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend vier Mal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer pro Loch im automatischen ELISA-Washer gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden jeweils 100  $\mu$ l eines zweiten, detektierenden Anti-p65-Antikörpers in Blockier-Puffer zugegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert.

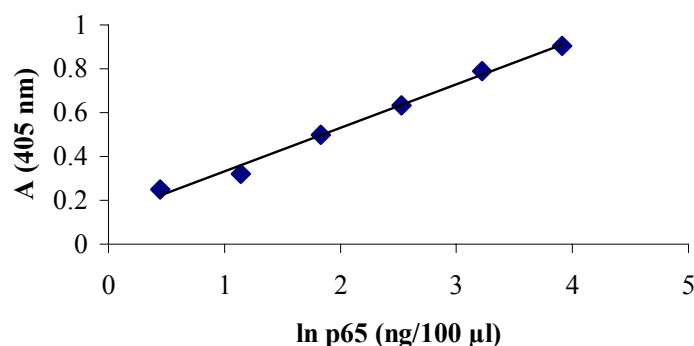
Es folgten ein weiterer Waschschrift und anschließend der Zusatz von 100  $\mu$ l eines verdünnten, mit Alkalischer Phosphatase konjugierten sekundären Antikörpers. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Waschschrift, der vier

Mal wiederholt wurde und bei dem der Waschpuffer für jeweils 20 Sekunden in den Löchern verbleiben musste, um die Hintergrundwerte niedrig zu halten.

Während dieses letzten Waschschrilles wurde die Substratlösung frisch zubereitet, indem 5 mg p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in 5 ml Substratpuffer gelöst wurden. pNPP ist für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase verantwortlich. 100  $\mu$ l dieser Substratlösung wurden in die ELISA-Platte einpipettiert und bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Proben mittels Microplate Reader bei 405 nm bestimmt.

### 8.5 Auswertung der NF- $\kappa$ B-ELISA-Messung

Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade, die sich aus den p65-Standards berechnen ließ. Dabei wurde eine logarithmische Darstellung der x-Achse, das heißt der eingesetzten p65-Konzentrationen, gewählt. Somit war im gemessenen Konzentrationsbereich von 1,5625 bis 50 ng/100  $\mu$ l p65 die Linearität bei jeder Messung gegeben (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Exemplarische Darstellung einer Kalibriergerade von p65-Standards. Die Darstellung der p65-Konzentrationen erfolgte logarithmisch. Güte der Anpassung:  $r = 0,9961$ .**

Die mit Hilfe der Kalibriergeraden erhaltenen Werte für die Plasmaproben wurden anschließend zur Ermittlung der jeweiligen Konzentrationen entlogarithmiert. Die Proben, die mit Plasma vor Pycnogenol-Einnahme inkubiert wurden, stellten die maximale p65-Aktivierung dar und wurden daher als 100 % Wert verwendet. Die Proben nach Pycnogenol-Einnahme zeigen jeweils den Grad der Hemmung dieser Aktivierung durch Pycnogenol auf und wurden entsprechend auf den 100 %-Wert bezogen.







## **D. Tabellarischer Anhang**

---



## D. Tabellarischer Anhang

### 1 Hemmung der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen *in vitro*

#### 1.1 Hemmkonzentrationen der einzelnen Inhibitoren mit Mittelwert und Standardabweichung (SD)

##### 1.1.1 MMP-1:

Substrat	TIMP-1	Pycnogenol	Metabolit 1	Metabolit 2
<b>Collagen</b>	<b>(ng/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>
	107,90	40,51	24,43	22,07
	115,70	41,52	22,68	24,33
	109,20	49,37	17,55	24,13
	121,70	47,31	20,72	24,38
	124,70	41,28	18,03	16,76
	142,30	43,48	21,66	24,59
<b>Mittelwert</b>	<b>120,25</b>	<b>43,91</b>	<b>21,39</b>	<b>22,71</b>
<b>SD</b>	<b>12,68</b>	<b>3,63</b>	<b>2,83</b>	<b>3,06</b>
<b>Gelatine</b>	52,25	59,24	9,73	11,21
	52,61	59,17	13,50	11,25
	52,04	58,49	13,54	9,75
	73,95	59,44	12,71	8,03
	62,80	51,07	11,86	11,67
	59,79	48,30	11,96	12,80
		64,00	10,05	
<b>Mittelwert</b>	<b>58,91</b>	<b>57,10</b>	<b>11,91</b>	<b>10,79</b>
<b>SD</b>	<b>8,64</b>	<b>5,44</b>	<b>1,53</b>	<b>1,67</b>

##### 1.1.2 MMP-2:

Substrat	Captopril	Pycnogenol	Metabolit 1	Metabolit 2
<b>Collagen</b>	<b>(mg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>
	2,061	42,40	20,56	21,65
	1,538	49,48	24,66	18,55
	1,786	42,12	20,87	23,40
	2,123	47,98	21,16	22,76
	1,288	53,58	23,60	19,51
	2,166	41,59	20,59	20,72
			23,35	
<b>Mittelwert</b>	<b>1,827</b>	<b>46,19</b>	<b>22,11</b>	<b>21,10</b>
<b>SD</b>	<b>0,356</b>	<b>4,91</b>	<b>1,70</b>	<b>1,87</b>

Substrat	Captopril	Pycnogenol	Metabolit 1	Metabolit 2
<b>Elastin</b>	1,288	23,92	10,21	21,19
	1,319	20,53	16,48	17,61
	1,979	20,15	12,15	20,80
	1,651	35,78	10,00	16,26
	1,308	24,25	12,27	19,07
	1,490	35,31	16,00	20,27
<b>Mittelwert</b>	<b>1,506</b>	<b>26,66</b>	<b>12,85</b>	<b>19,20</b>
<b>SD</b>	<b>0,271</b>	<b>7,09</b>	<b>2,79</b>	<b>1,94</b>

### 1.1.3 MMP-9:

Substrat	Captopril	Pycnogenol	Metabolit 1	Metabolit 2
<b>Elastin</b>	<b>(mg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>	<b>(µg/ml)</b>
	2,062	18,06	18,20	9,098
	2,182	29,74	19,37	7,125
	1,907	18,50	16,07	7,454
	1,996	23,14	17,00	6,091
	1,894	34,19	15,49	8,381
	2,527	23,38	21,43	8,925
			22,10	
<b>Mittelwert</b>	<b>2,095</b>	<b>24,50</b>	<b>18,52</b>	<b>7,846</b>
<b>SD</b>	<b>0,237</b>	<b>6,36</b>	<b>2,57</b>	<b>1,164</b>
<b>Gelatine</b>	2,094	23,98	4,937	8,03
	2,636	22,00	4,792	9,64
	2,089	37,49	3,570	10,84
	2,623	26,80	2,620	9,23
	2,143	24,83	3,225	9,15
	2,059	26,79	3,012	8,97
<b>Mittelwert</b>	<b>2,274</b>	<b>26,98</b>	<b>3,69</b>	<b>9,31</b>
<b>SD</b>	<b>0,277</b>	<b>5,46</b>	<b>0,96</b>	<b>0,92</b>

## 1.2 ANOVA-Statistik, einseitige Varianzanalyse

### 1.2.1 MMP-1:

in [ ]-Klammern ist das Substrat angegeben; Pycno = Pycnogenol-Gesamtextrakt

Tukey's Multipler Vergleichs Test	p-Wert
Pycno [Collagen] vs M1 [Collagen]	p < 0.001
Pycno [Collagen] vs M2 [Collagen]	p < 0.001
Pycno [Collagen] vs Pycno [Gelatine]	p < 0.001
Pycno [Collagen] vs M1 [Gelatine]	p < 0.001
Pycno [Collagen] vs M2 [Gelatine]	p < 0.001

Tukey's Multipler Vergleichs Test	p-Wert
M1 [Collagen] vs M2 [Collagen]	n.s. (nicht signifikant)
M1 [Collagen] vs Pycno [Gelatine]	$p < 0.001$
M1 [Collagen] vs M1 [Gelatine]	$p < 0.001$
M1 [Collagen] vs M2 [Gelatine]	$p < 0.001$
M2 [Collagen] vs Pycno [Gelatine]	$p < 0.001$
M2 [Collagen] vs M1 [Gelatine]	$p < 0.001$
M2 [Collagen] vs M2 [Gelatine]	$p < 0.001$
Pycno [Gelatine] vs M1 [Gelatine]	$p < 0.001$
Pycno [Gelatine] vs M2 [Gelatine]	$p < 0.001$
M1 [Gelatine] vs M2 [Gelatine]	n.s.

### 1.2.2 MMP-2:

Tukey's Multipler Vergleichs Test	p-Wert
Pycno [Collagen] vs M1 [Collagen]	$p < 0.001$
Pycno [Collagen] vs M2 [Collagen]	$p < 0.001$
Pycno [Collagen] vs Pycno [Elastin]	$p < 0.001$
Pycno [Collagen] vs M1 [Elastin]	$p < 0.001$
Pycno [Collagen] vs M2 [Elastin]	$p < 0.001$
M1 [Collagen] vs M2 [Collagen]	n.s.
M1 [Collagen] vs Pycno [Elastin]	n.s.
M1 [Collagen] vs M1 [Elastin]	$p < 0.01$
M1 [Collagen] vs M2 [Elastin]	n.s.
M2 [Collagen] vs Pycno [Elastin]	n.s.
M2 [Collagen] vs M1 [Elastin]	n.s.
M2 [Collagen] vs M2 [Elastin]	n.s.
Pycno [Elastin] vs M1 [Elastin]	$p < 0.001$
Pycno [Elastin] vs M2 [Elastin]	$p < 0.05$
M1 [Elastin] vs M2 [Elastin]	n.s.

**1.2.3 MMP-9:**

<b>Tukey's Multipler Vergleichs Test</b>	<b>p-Wert</b>
Pycno [Elastin] vs M1 [Elastin]	n.s.
Pycno [Elastin] vs M2 [Elastin]	P < 0.001
Pycno [Elastin] vs Pycno [Gelatine]	n.s.
Pycno [Elastin] vs M1 [Gelatine]	p < 0.001
Pycno [Elastin] vs M2 [Gelatine]	p < 0.001
M1 [Elastin] vs M2 [Elastin]	p < 0.001
M1 [Elastin] vs Pycno [Gelatine]	p < 0.01
M1 [Elastin] vs M1 [Gelatine]	p < 0.001
M1 [Elastin] vs M2 [Gelatine]	p < 0.001
M2 [Elastin] vs Pycno [Gelatine]	p < 0.001
M2 [Elastin] vs M1 [Gelatine]	n.s.
M2 [Elastin] vs M2 [Gelatine]	n.s.
Pycno [Gelatine] vs M1 [Gelatine]	p < 0.001
Pycno [Gelatine] vs M2 [Gelatine]	p < 0.001
M1 [Gelatine] vs M2 [Gelatine]	n.s.



## 2 Bindung von Pycnogenol an Matrixproteine

### 2.1 Bindung von Pycnogenol an Collagen, Elastin und Hautpulver

#### 1. Messreihe:

<b>Hautpulver</b>	Konzentration (g/25 ml)			Pycnogenol gebunden (%)
Messung		A I	A II	
1.				
2.	0,0007	0,03326	0,01668	37,0
3.	0,0006	0,03337	0,01578	39,3
4.	0,0006	0,02942	0,01538	36,6
5.	0,0006	0,02736	0,01259	38,5
6.	0,0006	0,02921	0,01403	39,5
<b>Mittelwert</b>				<b>38,18</b>
<b>SD</b>				<b>1,32</b>
<b>Collagen</b>	Konzentration (g/25 ml)			Pycnogenol gebunden (%)
Messung		A I	A II	
1.	0,0006	0,02233	0,00953	33,3
2.	0,0006	0,02237	0,00978	32,8
3.	0,0006	0,02448	0,00976	38,3
4.	0,0006	0,02062	0,00883	30,7
5.	0,0006	0,02365	0,00912	37,8
6.	0,0006	0,02156	0,00942	31,6
<b>Mittelwert</b>				<b>34,08</b>
<b>SD</b>				<b>3,58</b>

#### 2. Messreihe:

<b>Hautpulver</b>	Konzentration (g/25 ml)			Pycnogenol gebunden (%)
Messung		A I	A II	
1.	0,0019	0,09961	0,05132	39,7
2.	0,0019	0,08483	0,03810	38,4
3.	0,0016	0,05542	0,01711	37,4
4.	0,0019	0,07028	0,03331	30,4
5.	0,0010	0,04701	0,02318	37,2
6.	0,0010	0,04652	0,02262	37,3
<b>Mittelwert</b>				<b>37,73</b>
<b>SD</b>				<b>3,25</b>
<b>Collagen</b>	Konzentration (g/25 ml)			Pycnogenol gebunden (%)
Messung		A I	A II	
1.	0,0012	0,03703	0,01206	32,5
2.	0,0016	0,05222	0,03413	17,7
3.	0,0010	0,03877	0,01398	38,7
4.	0,0015	0,04001	0,01233	28,8
5.	0,0010	0,04227	0,01454	43,3
6.	0,0010	0,03812	0,01472	36,6
<b>Mittelwert</b>				<b>32,93</b>
<b>SD</b>				<b>8,98</b>

<b>Elastin</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0012	0,03703	0,00311	44,2
2.	0,0016	0,05222	0,00345	47,6
3.	0,0010	0,03877	0,00403	54,3
4.	0,0015	0,04001	0,00186	39,7
5.	0,0010	0,04227	0,00416	59,5
6.	0,0010	0,03812	0,00379	53,6
<b>Mittelwert</b>				<b>49,82</b>
<b>SD</b>				<b>7,31</b>

**3. Messreihe:**

<b>Hauptpulver</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0037	0,15788	0,06792	38,0
2.	0,0037	0,15034	0,04021	46,5
3.	0,0034	0,11357	0,03358	36,8
4.	0,0037	0,12786	0,03772	38,1
5.	0,0025	0,10025	0,03884	38,4
6.	0,0025	0,11236	0,05190	37,8
<b>Mittelwert</b>				<b>39,27</b>
<b>SD</b>				<b>3,59</b>
<b>Collagen</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	AI	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0026	0,08546	0,03156	32,4
2.	0,0032	0,10342	0,02399	38,8
3.	0,0030	0,08999	0,02739	32,6
4.	0,0030	0,08477	0,02878	29,2
5.	0,0030	0,08667	0,02789	30,6
6.	0,0030	0,09740	0,02973	35,2
<b>Mittelwert</b>				<b>33,13</b>
<b>SD</b>				<b>3,44</b>
<b>Elastin</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0026	0,08546	0,00786	46,6
2.	0,0032	0,10342	0,00630	47,4
3.	0,0030	0,08999	0,00751	43,0
4.	0,0030	0,08477	0,00285	42,7
5.	0,0030	0,08667	0,00651	41,8
6.	0,0030	0,09740	0,00698	47,1
<b>Mittelwert</b>				<b>44,77</b>
<b>SD</b>				<b>2,53</b>

## 4. Messreihe:

<b>Hautpulver</b>	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
Messung				
1.	0,0056	0,21646	0,08264	37,3
2.	0,0056	0,19846	0,05625	39,7
3.	0,0047	0,16510	0,05627	36,2
4.	0,0056	0,18802	0,05681	36,6
5.	0,0044	0,16550	0,05459	39,4
6.	0,0044	0,14914	0,04202	38,0
<b>Mittelwert</b>				<b>37,87</b>
<b>SD</b>				<b>1,44</b>
<b>Collagen</b>	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
Messung				
1.	0,0045	0,13541	0,03400	35,2
2.	0,0042	0,12392	0,03383	33,5
3.	0,0050	0,13163	0,03542	30,1
4.	0,0047	0,14043	0,03073	36,5
5.	0,0050	0,14099	0,03268	33,8
6.	0,0050	0,14497	0,03481	34,4
<b>Mittelwert</b>				<b>33,92</b>
<b>SD</b>				<b>2,16</b>
<b>Elastin</b>	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
Messung				
1.	0,0045	0,13541	0,01161	43,0
2.	0,0042	0,12392	0,01729	39,7
3.	0,0050	0,13163	0,01002	38,0
4.	0,0047	0,14043	0,00551	44,9
5.	0,0050	0,14099	0,01592	39,1
6.	0,0050	0,14497	0,01276	41,3
<b>Mittelwert</b>				<b>41,00</b>
<b>SD</b>				<b>2,59</b>

## 5. Messreihe:

<b>Hautpulver</b>	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
Messung				
1.	0,0100	0,27798	0,03728	37,6
2.	0,0098	0,34763	0,09729	39,9
3.	0,0115	0,34274	0,06572	37,6
4.	0,0098	0,32205	0,09528	36,2
5.	0,0098	0,29741	0,06709	36,7
6.	0,0098	0,30444	0,05798	39,3
<b>Mittelwert</b>				<b>37,89</b>
<b>SD</b>				<b>1,45</b>
<b>Collagen</b>	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
Messung				
1.	0,0102	0,28354	0,06201	33,9
2.	0,0101	0,27905	0,04453	36,3
3.	0,0100	0,27749	0,05998	34,0
4.	0,0111	0,31084	0,07434	33,3
5.	0,0100	0,27139	0,06805	31,8
6.	0,0100	0,28761	0,06254	35,2
<b>Mittelwert</b>				<b>34,07</b>
<b>SD</b>				<b>1,55</b>

<b>Elastin</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0102	0,28354	0,02560	39,5
2.	0,0101	0,27905	0,03178	38,3
3.	0,0100	0,27749	0,02890	38,8
4.	0,0111	0,31084	0,00602	42,9
5.	0,0100	0,27139	0,02790	38,0
6.	0,0100	0,28761	0,03081	40,1
<b>Mittelwert</b>				<b>39,61</b>
<b>SD</b>				<b>1,79</b>

**6. Messreihe:**

<b>Hauptpulver</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0161	0,47057	0,09323	37,4
2.	0,0154	0,49730	0,10480	39,8
3.	0,0154	0,45993	0,08694	39,8
4.	0,0145	0,46077	0,10638	37,8
5.	0,0141	0,42783	0,08804	38,2
6.	0,0141	0,43774	0,09959	37,7
<b>Mittelwert</b>				<b>38,46</b>
<b>SD</b>				<b>1,07</b>
<b>Collagen</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0150	0,42606	0,10048	33,9
2.	0,0151	0,35851	0,07355	29,5
3.	0,0150	0,41995	0,09675	33,7
4.	0,0148	0,39066	0,08583	32,2
5.	0,0150	0,39864	0,09438	31,7
6.	0,0150	0,40629	0,09551	32,4
<b>Mittelwert</b>				<b>32,24</b>
<b>SD</b>				<b>1,60</b>
<b>Elastin</b> Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	Pycnogenol gebunden (%)
1.	0,0150	0,42606	0,04405	39,8
2.	0,0151	0,35851	0,03334	33,6
3.	0,0150	0,41995	0,04132	39,4
4.	0,0148	0,39066	0,02914	38,2
5.	0,0150	0,39864	0,04054	37,3
6.	0,0150	0,40629	0,04512	37,6
<b>Mittelwert</b>				<b>37,66</b>
<b>SD</b>				<b>2,20</b>

**2.2 Bindung von Pycnogenol an Ovalbumin**

Messung	Pycnogenol 0,0050g (AI)	Ovalbumin mit 0,5 mol Zinksulfat-Lösung (AII)	Bindung Pycnogenol an Ovalbumin (%)
1	0,14107	0,13454	2,04
2	0,14023	0,13520	1,57
3	0,14251	0,13676	1,80

## 2.3 Bindung von M2 an Hautpulver

Hautpulver Messung	Konzentration (g/25 ml)	A I	A II	M2 gebunden (%)
1.	0,00525	0,192	0,179	3,87
2.	0,00525	0,191	0,176	4,46
3.	0,00525	0,193	0,182	3,27
4.	0,00525	0,199	0,189	2,98
5.	0,00525	0,196	0,186	2,98
6.	0,00525	0,199	0,188	3,27
<b>Mittelwert</b>				<b>3,47</b>
<b>SD</b>				<b>0,59</b>

## 2.4 ANOVA-Statistik zur Bindung von Pycnogenol und M2 an Matrixproteine und an Ovalbumin

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
Hautpulver vs Collagen	p < 0.01
Hautpulver vs Elastin	p < 0.05
Hautpulver vs M2	p < 0.001
Hautpulver vs Ovalbumin	p < 0.001
Collagen vs Elastin	p < 0.001
Collagen vs M2	p < 0.001
Collagen vs Ovalbumin	p < 0.001
Elastin vs M2	p < 0.001
Elastin vs Ovalbumin	p < 0.001
M2 vs Ovalbumin	n.s.

## 2.5 Direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MMPs

### 2.5.1 Ohne Zinkzusatz

Messung	Ohne Inhibitor	Captopril	M1	M2	Pycnogenol
1.	97,01	55,38	53,85	47,69	60,78
2.	101,49	54,41	48,53	52,94	45,78
3.	92,54	58,06	50,00	53,23	43,44
4.	104,48	54,29	52,86	48,57	47,96
5.	107,46	55,56	51,39	48,61	48,13
6.	100,00	55,22	50,75	49,25	53,46
<b>Mittelwert</b>	100,18	55,49	51,23	50,05	49,93
<b>SD</b>	5,71	1,37	1,76	2,40	5,72

### 2.5.2 Zusatz von 10 $\mu$ M Zink

Messung	Ohne Inhibitor	Captopril	M1	M2	Pycnogenol
1.	123,88	91,04	114,93	111,94	42,04
2.	128,36	92,54	116,42	123,88	40,71
3.	129,85	98,51	102,99	119,40	37,61
4.	126,87	94,03	102,99	120,90	43,36
5.	138,81	129,85	125,37	126,87	38,94
6.	122,39	110,45	110,45	111,94	34,51
<b>Mittelwert</b>	116,28	102,74	112,19	119,16	39,53
<b>SD</b>	17,79	15,03	8,62	6,15	3,21

### 2.5.3 ANOVA-Statistik zur Auswertung der Hemmung von MMP-9

Inhibitoren: Captopril (Capto), M1, M2 und Pycnogenol (Pyc); mit (m) und ohne (o) Zusatz von 10  $\mu$ M Zink (Zn)

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
100% Wert vs o Inh m Zn	p < 0.001
100% Wert vs Capto o Zn	p < 0.001
100% Wert vs Capto m Zn	n.s.
100% Wert vs M1 o Zn	p < 0.001
100% Wert vs M1 m Zn	n.s.
100% Wert vs M2 o Zn	p < 0.001
100% Wert vs M2 m Zn	p < 0.01
100% Wert vs Pyc o Zn	p < 0.001
100% Wert vs Pyc m Zn	p < 0.001
oInh m Zn vs Capto o Zn	p < 0.001
oInh m Zn vs Capto m Zn	n.s.
oInh m Zn vs M1 o Zn	p < 0.001
oInh m Zn vs M1 m Zn	n.s.
oInh m Zn vs M2 o Zn	p < 0.001
oInh m Zn vs M2 m Zn	n.s.
oInh m Zn vs Pyc o Zn	p < 0.001
oInh m Zn vs Pyc m Zn	p < 0.001
Capto o Zn vs Capto m Zn	p < 0.001
Capto o Zn vs M1 o Zn	n.s.
Capto o Zn vs M1 m Zn	p < 0.001
Capto o Zn vs M2 o Zn	n.s.
Capto o Zn vs M2 m Zn	p < 0.001
Capto o Zn vs Pyc o Zn	n.s.

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
Capto o Zn vs Pyc m Zn	n.s.
Capto m Zn vs M1 o Zn	p < 0.001
Capto m Zn vs M1 m Zn	n.s.
Capto m Zn vs M2 o Zn	p < 0.001
Capto m Zn vs M2 m Zn	p < 0.05
Capto m Zn vs Pyc o Zn	p < 0.001
Capto m Zn vs Pyc m Zn	p < 0.001
M1 o Zn vs M1 m Zn	p < 0.001
M1 o Zn vs M2 o Zn	n.s.
M1 o Zn vs M2 m Zn	p < 0.001
M1 o Zn vs Pyc o Zn	n.s.
M1 o Zn vs Pyc m Zn	n.s.
M1 m Zn vs M2 o Zn	p < 0.001
M1 m Zn vs M2 m Zn	n.s.
M1 m Zn vs Pyc o Zn	p < 0.001
M1 m Zn vs Pyc m Zn	p < 0.001
M2 o Zn vs M2 m Zn	p < 0.001
M2 o Zn vs Pyc o Zn	n.s.
M2 o Zn vs Pyc m Zn	n.s.
M2 m Zn vs Pyc o Zn	p < 0.001
M2 m Zn vs Pyc m Zn	p < 0.001
Pyc o Zn vs Pyc m Zn	n.s.

### 3 Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten

#### 3.1 Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: M1

Dargestellt sind Konzentrationen (ng/ml) der Zellüberstände; Inhibitor: 0,5  $\mu$ M M1; Stimulation: 10 ng/ml LPS; SD = Standardabweichung

Messung	LPS	M1 + LPS	Verbleibende Aktivität (%)
1.	14,10	8,16	58,96
2.	13,85	5,97	43,12
3.	14,00	7,17	51,82
4.	13,82	6,17	44,56
5.	13,32	8,22	59,38
6.	13,98	7,77	56,14
<b>Mittelwert</b>	<b>13,84</b>	<b>7,24</b>	<b>52,33</b>
<b>SD</b>	<b>0,28</b>	<b>0,99</b>	<b>7,12</b>

#### 3.2 Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: M2

Dargestellt sind Konzentrationen (ng/ml) der Zellüberstände; Inhibitor: 0,5  $\mu$ M M2; Stimulation: 10 ng/ml LPS; SD = Standardabweichung

Messung	LPS	M2 + LPS	Verbleibende Aktivität (%)
1.	14,10	7,37	53,26
2.	13,85	6,58	47,56
3.	14,00	5,90	49,18
4.	13,82	8,00	42,64
5.	13,32	6,81	57,82
6.	13,98	8,96	64,72
<b>Mittelwert</b>	<b>13,84</b>	<b>7,27</b>	<b>52,53</b>
<b>SD</b>	<b>0,28</b>	<b>1,09</b>	<b>7,88</b>



### 3.3 Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Rosiglitazon

Dargestellt sind Konzentrationen (ng/ml) der Zellüberstände; Inhibitor: 0,00002  $\mu$ M Rosiglitazon; Stimulation: 10 ng/ml LPS; SD = Standardabweichung

Messung	LPS	Rosiglitazon + LPS	Verbleibende Aktivität (%)
1.	14,10	6,89	49,78
2.	13,85	6,88	49,72
3.	14,00	7,46	47,92
4.	13,82	6,88	53,86
5.	13,32	6,63	49,72
6.	13,98	6,23	45,04
<b>Mittelwert</b>	<b>13,84</b>	<b>6,83</b>	<b>49,34</b>
<b>SD</b>	<b>0,28</b>	<b>0,40</b>	<b>2,88</b>

### 3.4 Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Hydrocortison

Dargestellt sind Konzentrationen (ng/ml) der Zellüberstände; Inhibitor: 1  $\mu$ M Hydrocortison; Stimulation: 10 ng/ml LPS; SD = Standardabweichung

Messung	LPS	Hydrocortison + LPS	Verbleibende Aktivität (%)
1.	10,55	4,48	40,45
2.	11,63	5,13	46,28
3.	10,88	4,75	42,91
4.	11,10	5,50	49,65
5.	11,02	4,25	38,39
6.	11,28	4,63	41,77
<b>Mittelwert</b>	<b>11,08</b>	<b>4,79</b>	<b>43,24</b>
<b>SD</b>	<b>0,36</b>	<b>0,45</b>	<b>4,10</b>

### 3.5 Bestimmung der MMP-9 Konzentrationen; Inhibitor: Fenofibrat

Dargestellt sind Konzentrationen (ng/ml) der Zellüberstände; Inhibitor: 0,11  $\mu$ M Fenofibrat; Stimulation: 10 ng/ml LPS; SD = Standardabweichung

Messung	LPS	Fenofibrat + LPS	Verbleibende Aktivität (%)
1.	14,41	6,27	46,95
2.	12,98	5,22	39,09
3.	12,68	4,59	34,35
4.	13,14	4,34	32,44
5.	13,25	6,34	47,41
6.	13,69	5,87	43,94
<b>Mittelwert</b>	<b>13,36</b>	<b>5,44</b>	<b>40,70</b>
<b>SD</b>	<b>0,61</b>	<b>0,86</b>	<b>6,41</b>

### 3.6 Zusammenfassung der prozentualen Hemmung der MMP-9-Freisetzung

Inhibitoren: M1, M2, Rosiglitazon, Hydrocortison und Fenofibrat; dargestellt sind mittlere Aktivitäten und Standardabweichungen, ermittelt aus jeweils sechs Versuchen; Stimulation: 10 ng/ml LPS

	10 ng/ml LPS	0,5 µM M1 + LPS	0,5 µM M2 + LPS	0,00002 µM Rosiglitazon + LPS	1 µM HC + LPS	0,1 µM Fenofibrat + LPS
Verbleibende Aktivität (%)	99,99 ± 3,37	52,33 ± 7,12	52,53 ± 7,88	49,34 ± 2,88	43,42 ± 1,41	40,70 ± 6,41

### 3.7 ANOVA-Statistik zur Auswertung der Hemmung der MMP-9-Freisetzung

Tukey's Multipler Vergleichstest	p-Wert
Positivkontrolle vs M1	p < 0.001
Positivkontrolle vs M2	p < 0.001
Positivkontrolle vs Rosiglitazon	p < 0.001
Positivkontrolle vs Fenofibrat	p < 0.001
Positivkontrolle vs Hydrocortison	p < 0.001
M1 vs M2	n.s.
M1 vs Rosiglitazon	n.s.
M1 vs Fenofibrat	p < 0.01
M1 vs Hydrocortison	n.s.
M2 vs Rosiglitazon	n.s.
M2 vs Fenofibrat	p < 0.01
M2 vs Hydrocortison	p < 0.05
Rosiglitazon vs Fenofibrat	n.s.
Rosiglitazon vs Hydrocortison	n.s.
Fenofibrat vs Hydrocortison	n.s.

### 3.8 Bestimmung der Zellviabilität

Zellen wurden mit M1, M2, Rosiglitazon (Rosi), Fenofibrat (Feno) und Hydrocortison (HC) behandelt

	Zellen	Zellen + LPS	Zellen + 0,5 $\mu\text{M}$ M1 + LPS	Zellen + 0,5 $\mu\text{M}$ M2 + LPS	Zellen + 0,00001 $\mu\text{M}$ Rosi + LPS
1.	$2,1 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$1,85 \cdot 10^5$	$0,3 \cdot 10^5$
2.	$1,05 \cdot 10^5$	$2,15 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$0,95 \cdot 10^5$
3.	$1,85 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$1,95 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$
4.	$1,6 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,15 \cdot 10^5$	$1,05 \cdot 10^5$
<b>Mittelwert</b>	<b><math>1,65 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,98 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>2,4 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>1,99 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>0,93 \cdot 10^5</math></b>

	Zellen	Zellen + LPS	Zellen + 1 $\mu\text{M}$ HC + LPS	Zellen + 0,1 $\mu\text{M}$ Feno + LPS
1.	$10,0 \cdot 10^5$	$5,75 \cdot 10^5$	$6,25 \cdot 10^5$	$5,75 \cdot 10^5$
2.	$9,75 \cdot 10^5$	$8,75 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	$7,25 \cdot 10^5$
3.	$10,0 \cdot 10^5$	$8,75 \cdot 10^5$	$7,25 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5$
4.	$8,25 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^5$	$7,75 \cdot 10^5$	$7,75 \cdot 10^5$
<b>Mittelwert</b>	<b><math>9,5 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>7,44 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>6,12 \cdot 10^5</math></b>	<b><math>6,56 \cdot 10^5</math></b>

### 3.9 Bestimmung der Zellviabilität der Steady-state-Proben

eingesetzt wurden  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen

	Blank	Tage Pycnogenol
<b>1. Proband</b>	$2,5 \cdot 10^5$	$3,25 \cdot 10^5$
<b>2. Proband</b>	$2,25 \cdot 10^5$	$2,90 \cdot 10^5$
<b>3. Proband</b>	$2,85 \cdot 10^5$	$2,70 \cdot 10^5$
<b>4. Proband</b>	$2,60 \cdot 10^5$	$2,90 \cdot 10^5$
<b>5. Proband</b>	$2,45 \cdot 10^5$	$2,55 \cdot 10^5$
<b>6. Proband</b>	$2,60 \cdot 10^5$	$2,70 \cdot 10^5$
<b>7. Proband</b>	$2,15 \cdot 10^5$	$2,50 \cdot 10^5$

## 4 HPLC-Analytik wichtiger Inhaltsstoffe und/oder Metabolite von Pycnogenol

### 4.1 Plasmapeaks der Studienteilnehmer

**Steady-state:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferul säure	Taxifolin	U1 t <sub>R</sub> =4,5 min	U2 t <sub>R</sub> =5,4 min	U3 t <sub>R</sub> =13,4 min	U4 t <sub>R</sub> =14,5 min	U5 t <sub>R</sub> =15,5 min	U6 t <sub>R</sub> =16,2 min	U7 t <sub>R</sub> =17,2 min	U8 t <sub>R</sub> =20,8 min	U9 t <sub>R</sub> =22,2 min	U10 t <sub>R</sub> =35,8 min
B1	62,35	1,35	2,85	21,82			0,0367	0,0171	0,0562						0,0007
B2	33,45			20,77			0,0572	0,0184	0,0178			0,0108			
B3	58,35	4,5	3,44			0,0908	0,0433		0,0331		0,0145	0,0091			
B4	27,60						0,0479			0,0021					0,0082
B5	61,05	1,41	2,73	13,55		0,0237	0,0832	0,0131	0,0080		0,0051	0,0104			

**Zeitpunkt 0,5 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferul säure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	28,42						0,0066	0,0330	0,0219						0,0187
C	43,41	4,76		14,21			0,0315	0,0141	0,016		0,0061				0,0154
D															
E		23,16		10,0		0,0179	0,0824	0,0220				0,0192			
F	33,87	2,27		7,68			0,0179	0,0143				0,0157			
G								0,0440							0,0213
H	129,69	5,73		14,2		0,0588		0,0440							0,0324
I	68,6	3,15		21,95											
J				13,82			0,0241	0,0502	0,0299		0,0589	0,0606			0,0222
K				9,82		0,0607	0,0109	0,0233				0,0374			
L							0,0317	0,0785							

D. Tabellarischer Anhang

**Zeitpunkt 1 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	28,49	0,77		5,63		0,085	0,0061	0,0348			0,0029				0,0023
C	84,75	5,77		8,56				0,0264	0,019			0,0319			0,0161
D															
E	26,45	12,64					0,0579	0,0326	0,0267						
F	50,35	1,09		15,04		0,0389	0,0132	0,0208	0,0156			0,0172			
G	92,55	3,2				0,1498	0,0133	0,0215	0,0735			0,0121			0,0107
H	121,37	10,36					0,0783		0,0814						0,0099
I	102,2	4,31		24,14					0,0471			0,0189			
J				14,77			0,0238	0,028			0,0036				0,0054
K				8,27		0,1429	0,0077	0,0297				0,0827			
L				19,81		0,0658	0,0168	0,0191				0,0304			

**Zeitpunkt 2 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	186,51	11,34		5,04		0,0852	0,1104		0,0351			0,0288			0,017
C	54,55	2,09		8,18	34,66		0,0256	0,0209	0,024						0,0091
D	65,97														
E	59,67	12,61					0,0869	0,028	0,0206			0,022			
F	55,35	2,14		6,62	12,34	0,0368	0,0278	0,0188	0,0214			0,0185			
G		1,82		6,77		0,052	0,0041					0,0224			0,007
H	74,02	3,3			14,15		0,0468		0,0219						0,0086
I		3,68			16,55										
J				7,55	25,29	0,1089	0,0371	0,0315							0,0158
K				16,59	13,45	0,1181		0,0199				0,0165			
L				5,55				0,0231							

**Zeitpunkt 4 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	87,27	32,35					0,0098	0,0277	0,0478						0,0847
C		6,65			24,77			0,0213							0,0891
D															
E	57,25	17,6		14,22	23,55	0,0267		0,0332				0,0346			
F	98,68	8,69		5,32	22,76			0,019	0,0139			0,0224			
G	123,65	5,99				0,0445	0,0079		0,0938			0,0157			0,0656
H	87,93	6,65			19,99		0,0737								0,0764
I	209,35	4,21		8,22	26,94		0,0516		0,1039						
J	67,85	6,69		6,59	20,83				0,0167		0,0535				0,0812
K					14,66							0,0634			
L	73,3	4,72		4,64			0,0151		0,0166						

**Zeitpunkt 6 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A		4,01					0,0242								0,0451
C		5,15		5,01	20,15			0,0313				0,0601			0,0463
D										0,0067		0,085			
E		12,65			33,16	0,0258	0,0267	0,021	0,0128						
F	38,95	3,69	2,66	13,21	12,77		0,0179	0,0202	0,0076			0,0214			
G	78,96	4,01					0,0046			0,0111					0,018
H	47,97	2,69			24,72	0,0703			0,0186	0,005					0,035
I	59,67	4,65			30,74		0,0158	0,0309				0,0171			
J	23,35	5,7			27,68				0,0138			0,0226			0,0128
K	38,8			8,86	24,89		0,0931								
L	22,7	8,81					0,0125		0,027						

D. Tabellarischer Anhang

**Zeitpunkt 8 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	65,14	3,73	3,5	5,54				0,0283				0,0279		0,0374	0,0221
C		4,14	4,14		44,19			0,0224	0,0098			0,0607		0,0199	0,0437
D			3,58						0,0167	0,0043		0,084	0,0213	0,0237	
E		7,11			50,53	0,0718	0,0181	0,0451	0,0185					0,0018	
F	32,32	4,16	3,26					0,0212				0,0198	0,0318		
G	41,25	1,44	2,19			0,0372	0,0199		0,0361	0,0015		0,015			0,0165
H	41,26	2,75	2,26		33,22		0,0156		0,0084	0,0046	0,0065		0,0197	0,0363	0,012
I	62,95	2,05		7,59	36,95		0,0711		0,031		0,0193				
J		6,71			47,13	0,0381	0,0891	0,0284			0,0208				0,0233
K	19,1			8,77	36,85		0,0388								
L		1,63		12,36	30,13		0,0273	0,0341							

**Zeitpunkt 10 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	63,04	3,51	8,98	5,87			0,0263		0,0161			0,0266		0,0186	0,0256
C		3,65	3,11		30,56	0,0747		0,0134	0,0095			0,0452		0,0098	0,0251
D			2,41		12,12					0,0228		0,013	0,0114	0,0406	
E			2,77	6,5			0,0227			0,0076		0,023		0,0164	
F	16,24	4,53					0,0054	0,0203	0,0094			0,0151	0,0124		
G	34,9	1,04	2,46	5,95	13,11	0,037	0,0449		0,0349	0,0055	0,0224	0,0093			0,0198
H	57,68	2,78	2,78		12,82	0,0419	0,0167			0,0137	0,0316		0,0118		0,0211
I		2,11		6,77		0,0735	0,0712	0,0172				0,0374			
J	41,13	10,69			14,18	0,0199	0,0913		0,0832		0,0494				0,0188
K	19,15	1,11	2,62	6,27	16,18		0,0194								
L	26,15	0,62			26,82		0,0377	0,0206							



**Zeitpunkt 12 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A	55,97	3,0	3,33			0,0701	0,0724		0,0126			0,0168			0,005
C		1,78	2,87		16,97		0,0506		0,105			0,0302		0,0052	0,0041
D	35,65	3,79	2,36		12,25				0,0387	0,005	0,0159		0,0028	0,0064	
E	23,05		2,3		11,96	0,0288	0,0133	0,037		0,0027		0,0234		0,0024	
F	63,71	0,79	2,5				0,0277	0,0211	0,0216			0,0167			
G	30,95	1,59	2,5	7,95	12,89		0,0305	0,0194	0,0247	0,0058	0,0093	0,0173	0,0071		0,002
H	42,78	1,59	3,14				0,0555		0,0206	0,0043	0,002			0,0072	0,0072
I	51,35	2,93		6,45			0,1358		0,0821				0,0022		0,0249
J		6,98		8,27		0,1343	0,0237	0,0364			0,0119				
K	17,65		4,52	10,73	21,08		0,0758								
L	54,5	5,45		11,45	25,42		0,0322				0,0175				0,0071

**Zeitpunkt 14 h:** Konzentrationen sind angegeben in (ng/ml); Detektion: ECD = blau; UV/VIS = gelb; ECD + UV/VIS = rosa

Proband	Catechin	Kaffeensäure	M1	Ferulensäure	Taxifolin	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10
A			2,29				0,0213								0,0035
C	20,04	1,09	2,3	9,78	13,67		0,0394	0,0139	0,0126			0,0253			0,0027
D			3,02	16,36							0,0059	0,0105			
E							0,0208	0,0279				0,021			
F	25,43			5,57			0,0112	0,0171	0,0369			0,0183			
G	32,4	1,65	2,44	5,77	14,11	0,0318	0,0348	0,016	0,0226		0,0108	0,0152			0,0037
H	29,34	1,67		6,87		0,0301	0,0087	0,0268			0,0098	0,0135			0,001
I															0,0019
J	10,66	6,26		10,23			0,0283	0,0284	0,0329		0,0178				
K	36,7				16,05		0,0853		0,0157						
L		2,01		17,36	20,02		0,0113	0,0209			0,0067				



## 4.2 Pharmakokinetische Parameter der Studienteilnehmer

### Kaffeensäure:

Proband	AUC <sub>[0-t]</sub> [mg/ml*h]	AUC <sub>[0-∞]</sub> [mg/ml*h]	c <sub>max</sub> [mg/ml]	t <sub>max</sub> [h]	term. t <sub>1/2</sub> [h]
A	0,00011672	0,0001281	0,00003235	4,0	2,12
C	0,00005339	0,00006435	0,00000665	4,0	6,96
D					
E	0,00012435	0,00012854	0,00002316	0,5	2,67
F	0,000049473	0,000055905	0,00000869	4,0	7,56
G	0,00003527	0,000040527	0,00000599	4,0	2,21
H	0,000050175	0,000063049	0,00001036	1,0	5,34
I	0,00010467	0,00012085	0,0000433	2,0	6,72
J	0,000091103		0,00001069	8,0	
K					
L	0,000055773	0,000060942	0,00000881	6,0	1,78

### Taxifolin:

Proband	AUC <sub>[0-t]</sub> [mg/ml*h]	AUC <sub>[0-∞]</sub> [mg/ml*h]	c <sub>max</sub> [mg/ml]	t <sub>max</sub> [h]	term. t <sub>1/2</sub> [h]
A					
C	0,0003439	0,00059717	0,00004419	8,0	12,84
D					
E	0,00031515	0,0004155	0,00005053	8,0	6,52
F	0,00016249	0,00027597	0,00002276	4,0	8,74
G	0,00006611		0,00001411	14,0	
H	0,00024028	0,00035062	0,00003322	8,0	7,57
I	0,00026172	0,00036175	0,00003695	8,0	6,86
J	0,00029347	0,00039303	0,00004713	8,0	6,83
K	0,00021219	0,00039997	0,00002108	8,0	12,87
L	0,00018476		0,00003013	8,0	

### Ferulasäure:

Proband	AUC <sub>[0-t]</sub> [mg/ml*h]	AUC <sub>[0-∞]</sub> [mg/ml*h]	c <sub>max</sub> [mg/ml]	t <sub>max</sub> [h]	term. t <sub>1/2</sub> [h]
A	0,000055763	0,000055763	0,00000587	10,0	
C	0,000094215	0,00018083	0,00001421	0,5	6,14
D					
E					
F	0,00010402	0,00012184	0,00001504	1,0	2,22
G	0,000058655	0,000058655	0,00000795	8,0	
H					
I	0,00013289	0,00020187	0,00002414	1,0	11,47
J	0,0001144		0,00001477	1,0	
K	0,00011535	0,0002282	0,00001659	2,0	7,65
L	0,00011709		0,00001981	1,0	

**M1:**

Proband	c <sub>max</sub> [mg/ml]	t <sub>max</sub> [h]
A	0,00000898	10,0
C	0,00000414	8,0
D	0,00000358	8,0
E	0,00000277	10,0
F	0,00000326	8,0
G	0,0000025	12,0
H	0,00000314	12,0
I		
J		
K	0,00000452	12,0
L		

**Catechin:**

Proband	c <sub>max</sub> [mg/ml]	t <sub>max</sub> [h]
A	0,00018651	2,0
C	0,00008475	1,0
D		
E	0,00005967	2,0
F	0,00009868	4,0
G	0,00012365	4,0
H	0,00012967	0,5
I	0,00020935	4,0
J	0,00006785	4,0
K	0,00003880	6,0
L	0,00007330	4,0

**t<sub>max</sub>**

Proband	U1	U2	U3	U4	U5
A	2,0	2,0	1,0	4,0	
C		12,0	6,0	12,0	
D				12,0	10,0
E	8,0	2,0	8,0	1,0	10,0
F	1,0	2,0	8,0	14,0	
G	1,0	10,0	0,5	4,0	6,0
H	6,0	1,0	0,5	1,0	10,0
I	10,0	12,0	6,0	4,0	
J	12,0	10,0	0,5	10,0	
K	1,0	6,0	1,0	14,0	
L	1,0	10,0	0,5	6,0	

**t<sub>max</sub>**

Proband	U6	U7	U8	U9	U10
A	1,0	2,0		8,0	4,0
C	0,5	8,0		8,0	4,0
D	12,0	6,0	8,0	10,0	
E		4,0		10,0	
F		4,0	8,0		
G	10,0	2,0			4,0
H	10,0	14,0	8,0	8,0	4,0
I	8,0	10,0			12,0
J	0,5	0,5			4,0
K		1,0			12,0
L	12,0	1,0			

## 5 *Ex vivo* Hemmung der MMP-9-Freisetzung aus Monocyten durch humanes Plasma nach Pycnogenol-Einnahme

### 5.1 Konzentrationen an MMP-9 nach Mehrfachgabe

Konzentrationen in (ng/ml), bestimmt im Zellüberstand nach Inkubation mit humanem Plasma vor und nach fünftägiger Einnahme von 200 mg Pycnogenol; Konzentrationen sind normalisiert auf die Zellzahl  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen; SD = Standardabweichung

	<b>Blank</b>	<b>5 Tage Pycnogenol</b>	<b>Hemmung (%) in Bezug auf Mittelwert</b>
1. Proband	15,97	12,18	22,21
2. Proband	17,70	11,07	38,86
3. Proband	17,45	12,05	31,66
4. Proband	18,82	14,86	23,22
5. Proband	13,16	12,38	4,57
6. Proband	16,48	12,59	22,80
7. Proband	19,87	13,74	35,93
<b>Mittelwert</b>	<b>17.06</b>	<b>12.70</b>	<b>25,61</b>
<b>SD</b>	<b>2.17</b>	<b>1.24</b>	<b>11,45</b>

### 5.2 Konzentrationen an MMP-9 nach Einmalgabe (1,0 g)

Konzentrationen in (ng/ml), bestimmt im Zellüberstand nach Inkubation mit humanem Plasma vor und nach einmaliger Einnahme von 1,0 g Pycnogenol; Konzentrationen sind normalisiert auf die Zellzahl  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen

	<b>Blank</b>	<b>5 Tage Pycnogenol</b>	<b>Hemmung (%) in Bezug auf Blank</b>
Proband A	19,56	2,31	88,19
Proband B	22,75	1,98	91,30

### 5.3 Konzentration an MMP-9 nach Einmalgabe (0,3 g)

Konzentrationen in (ng/ml), bestimmt im Zellüberstand nach Inkubation mit humanem Plasma vor und nach einmaliger Einnahme von 0,3 g Pycnogenol; Konzentrationen sind normalisiert auf die Zellzahl  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen

	Blank	Konzentration x Stunden nach Pycnogenol- Einnahme		Hemmung (%) in Bezug auf Blank
Proband C	15,05	0,5	12,04	20,00
		8	10,22	32,09
		14	12,41	17,54
Proband F	19,11	1	17,48	8,55
		2	14,64	23,37
		4	15,68	17,96
		14	14,18	25,80
Proband J	18,87	4	14,73	21,94
		10	12,53	33,60
Proband L	16,19	12	15,70	3,03
		14	15,25	5,81

## 6 *Ex vivo* Hemmung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Monocyten durch humanes Plasma nach fünftägiger Pycnogenol-Einnahme

### 6.1 Bestimmung der Zellviabilität der Steady-state-Proben

eingesetzt wurden  $5,0 \cdot 10^6$  Zellen

	Blank	5 Tage Pycnogenol
1. Proband	$1,25 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^6$
2. Proband	$1,75 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^6$
3. Proband	$1,50 \cdot 10^6$	$1,75 \cdot 10^6$
4. Proband	$1,80 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$
5. Proband	$1,15 \cdot 10^6$	$1,45 \cdot 10^6$

### 6.2 Konzentrationen an p65 nach Mehrfachgabe

Konzentration an p65 (ng/ $1,5 \cdot 10^6$  Zellen) im Zellkernextrakt von Monocyten nach Inkubation mit humanem Plasma vor und nach fünftägiger Einnahme von 200 mg Pycnogenol; Konzentrationen sind normalisiert auf die Zellzahl  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen; SD = Standardabweichung

	Blank	5 Tage Pycnogenol	Verbleibende p65-Aktivierung (%) in Bezug auf Mittelwert
1. Proband	3,33	2,55	85,47
2. Proband	2,41	2,23	74,83
3. Proband	2,50	2,27	76,17
4. Proband	3,35	2,80	93,96
5. Proband	3,29	2,72	91,28
<b>Mittelwert</b>	<b>2,98</b>	<b>2,51</b>	<b>84,48</b>
<b>SD</b>	<b>0,48</b>	<b>0,26</b>	<b>8,66</b>





## **E. Zusammenfassung**

---



## E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Hemmung des induzierten Abbaus der Matrixproteine Collagen und Elastin sowie von Gelatine durch die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-2 und MMP-9 mithilfe des Kiefernrintenextraktes Pycnogenol, einer Auswahl seiner Inhaltsstoffe und seiner Metabolite  $\delta$ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M1) und  $\delta$ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M2) untersucht. Beide Metabolite zeigten eine signifikante Hemmwirkung, während ihr metabolischer Vorläufer (+)-Catechin nicht aktiv war. Die Metabolite lagen in der Effektivität ihrer Hemmung auf einer  $\mu\text{g/ml}$ -Basis immer leicht über der des Gesamtextraktes. Die Aktivitätsminderung der MMPs durch die eingesetzten Inhibitoren war bei MMP-9 am ausgeprägtesten.

Um die in Frage kommenden Mechanismen der Hemmwirkung gegenüber Matrixmetalloproteinasen aufzuklären, wurde die Bindung des Gesamtextraktes an Hautpulver, sowie an die Matrixproteine Collagen und Elastin untersucht. Es konnte eine Bindungspräferenz von Pycnogenol an Strukturproteine (Collagen, Elastin) und an Hautpulver gegenüber Nichtstrukturproteinen (Ovalbumin) festgestellt werden. Daraus wurde ein Schutz der Substrate vor enzymatischer Degradierung durch MMPs infolge einer Adsorption der Procyanidine abgeleitet.

Die Metabolite M1 und M2 schienen auf Grund eines anderen Mechanismus die Aktivität der MMPs zu hemmen. Da viele der synthetisch entwickelten Inhibitoren durch eine Chelatisierung des Zinkatoms die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen hemmen, wurde der Einfluss von Zink auf die Wirkungen der Metabolite, sowie der Kontrollsubstanz Captopril getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkung der untersuchten Inhibitoren auf MMP-9 nach Zinkzusatz vollständig aufgehoben wurde. Daher konnte eine direkte Interaktion von beiden Metaboliten auf das Zinkatom des aktiven Zentrums angenommen werden.

Die Wirkungen der Metabolite M1 und M2 wurden anschließend auf zellulärer Ebene untersucht. Es wurde getestet, ob sie einen Einfluss auf die Sekretion von MMP-9 aus bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Monocyten hatten. Als Positivkontrolle wurden die antiinflammatorisch wirkenden PPAR-Agonisten Rosiglitazon und Fenofibrat, sowie das endogene Glucocorticoid Hydrocortison eingesetzt, deren Hemmwirkung auf die MMP-9-Freisetzung gut belegt war. Die PPAR-Agonisten waren in Bezug auf die MMP-9-

Sekretion die wirksamsten Inhibitoren. Mit einer bemerkenswert niedrigen  $IC_{50}$  von nur  $0,5 \mu\text{M}$  waren die beiden Metabolite M1 und M2 in ihrer Wirkung equipotent. Im Vergleich zu Hydrocortison ( $IC_{50}$ ) konnte sogar gezeigt werden, dass beide Metabolite potentere Inhibitoren darstellten als das körpereigene antiinflammatorisch wirksame Glucocorticoid.

In pharmakokinetischen Untersuchungen wurden Plasmaproben von Probanden nach Einmal- ( $n = 11$ ) und Mehrfach- ( $n = 5$ ) Einnahme von 300 bzw. 200 mg Pycnogenol mithilfe der HPLC vermessen. Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob eine Absorption von Extraktbestandteilen, sowie Metabolisierungsreaktionen im Körper stattfinden. Es konnten in den Proben der meisten Probanden nach Mehrfach- und nach einmaliger Pycnogenol-Einnahme erstmalig im Plasma sowohl die Extraktbestandteile (+)-Catechin, Taxifolin, Kaffeesäure und Ferulasäure als auch der Dihydroxymetabolit M1 nachgewiesen werden. Daneben konnten zehn bislang unbekannte Substanzen (U1 bis U10) detektiert werden, die in weiterführenden Arbeiten noch identifiziert werden müssen. Es liegen mehrere Hinweise vor, dass es sich bei der unbekannt Substanz U1 um das dimere Procyanidin B1 handelt. Dies muß noch mittels HPLC-MS-MS verifiziert werden. Es wurde eine große interindividuelle Variabilität sowohl im Grad der Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat als auch bei den im Plasma vorliegenden Konzentrationen der einzelnen Substanzen festgestellt. Nach Einmalgabe des Extraktes wurden verschiedene Gruppen von Substanzen mit frühen (Kaffeesäure, Catechin, Ferulasäure und U10), mittleren (Taxifolin, U8 und U9), späten (M1, U5 und U6) und interindividuell sehr variablen (U1 bis U4, U7) Plasmaspiegelmaxima nachgewiesen. Es konnten erstmalig nach Pycnogenol-Einnahme pharmakokinetische Parameter der bekannten und im Gesamtextrakt quantifizierbaren Verbindungen errechnet werden.

Nachfolgend wurde in den Plasmaproben der Probanden nach Pycnogenol-Einnahme nachgewiesen, dass Wirksubstanzen in Konzentrationen vorhanden waren, die tatsächlich pharmakodynamische Effekte erzielen konnten. Dazu wurde ein neues Versuchskonzept erstellt, bei dem die Hemmung der MMP-9-Sekretion auf zellulärer Ebene mit den Plasmaproben der Studienteilnehmer vor und nach Pycnogenol-Einnahme *ex vivo* untersucht wurde. Nach Mehrfachgabe bewirkten die verdünnten Plasmaproben der Probanden eine signifikant verminderte MMP-9-Sekretion um im Mittel 25 %. Plasmaproben nach einmaliger Einnahme von 300 mg Pycnogenol riefen schon 30

Minuten nach Extrakt-Einnahme eine Hemmung der MMP-9-Sekretion hervor. Diese Hemmung war bis 14 Stunden nach der Einnahme nachzuweisen.

Einen wichtigen Transkriptionsfaktor im Entzündungsgeschehen stellt NF- $\kappa$ B dar. Stimuliert durch verschiedene Agenzien führt NF- $\kappa$ B u.a. zur Induktion von MMP-9. Nach Mehrfachgabe konnte in *ex vivo* Versuchen mit den Plasmaproben der Studienteilnehmer nach Inkubation mit stimulierten Monocyten eine etwa 15 %ige Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung gezeigt werden. Die prozentuale Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung korrelierte mit der prozentualen Hemmung der MMP-9-Sekretion. Damit wurden Hinweise erbracht, dass die Hemmung der MMP-9-Sekretion durch Pycnogenol *ex vivo* über die Hemmung von NF- $\kappa$ B inhibiert wurde. Es konnte am Beispiel von MMP-9 und NF- $\kappa$ B erstmalig gezeigt werden, dass nach Einnahme von Pycnogenol auch *in vivo* Konzentrationen an Metaboliten bzw. Bestandteilen erreicht werden, die *ex vivo* in der Lage waren, pharmakodynamische Effekte zu erzielen.

Bislang konnte jedoch keine Zuordnung der pharmakokinetisch identifizierten Verbindungen zu den pharmakodynamischen Effekten erfolgen.

Die umfassenden *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen von Bestandteilen und/oder Metaboliten des Pycnogenol-Extraktes in der vorliegenden Arbeit leisten auf molekularer und auf zellulärer Ebene einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis der klinischen antiinflammatorischen Effekte des Kiefernridenextraktes.

## Summary

In the present thesis, the inhibition of matrixmetalloproteinase (MMP)-induced degradation of matrix proteins collagen and elastin and of the hydrolysis product of collagen, gelatin, was investigated. For the first time, a standardized extract of French maritime pine bark, a selection of its components and two metabolites  $\delta$ -(3,4-dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M1) and  $\delta$ -(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (M2) were tested as inhibitors for MMP-1, MMP-2 and MMP-9. Both metabolites displayed a significant inhibition of all MMPs, whereas their metabolic precursor (+)-catechin was inactive. The metabolites were more potent on a  $\mu\text{g/ml}$  basis compared to the extract. The highest efficacy of inhibition was observed for MMP-9.

In order to elucidate the mechanism of inhibition, the binding of the extract to skin powder as well as to the matrix proteins collagen and elastin was investigated. Preferential binding of pycnogenol to structure proteins (collagen, elastin) and to skin powder compared to the non-structure control protein ovalbumin was determined. Thus, protection of the substrates from MMP-induced degradation via an adsorption of procyanidins was assumed.

The metabolites M1 and M2 obviously inhibited the activity of MMPs by a different mechanism. As many of the synthetically developed inhibitors act through a chelation of the zinc atom located in the catalytic domain of the matrixmetalloproteinases, the influence of zinc on the effect of the two metabolites and the control substance captopril was tested. It was shown that the inhibition caused by the investigated compounds was completely abrogated after addition of zinc. Therefore, a direct interaction of both metabolites with the catalytic zinc atom was deduced.

The effects of M1 and M2 were subsequently investigated on a cellular level. It was analyzed whether the metabolites influenced the secretion of MMP-9 from bacterial lipopolysaccharid (LPS)-stimulated monocytes. As positive controls the antiinflammatory PPAR agonists rosiglitazon and fenofibrat, as well as the endogenous glucocorticoid hydrocortisone were utilized as their inhibition of the MMP-9-secretion was well documented. With respect to the MMP-9 secretion, the PPAR agonists were the most effective inhibitors. Both metabolites were equipotent in their effects, with a remarkably low  $\text{IC}_{50}$  of only  $0.5 \mu\text{M}$ . In comparison to hydrocortisone ( $\text{IC}_{50}$  of  $1 \mu\text{M}$ ), both metabolites

were even more potent than the endogenous glucocorticoid with its antiinflammatory properties.

In pharmacokinetic investigations plasma samples from volunteers after a single (n = 11) and repeated (n = 5) intake of 300 mg, respectively 200 mg Pycnogenol were analyzed by HPLC. The aim of these measurements was to find out whether absorption of ingredients and metabolism take place in the human body. For the first time, ingredients of the extract, (+)-catechin, taxifolin, caffeic acid and ferulic acid, as well as the metabolite M1 were determined in plasma samples of most of the volunteers after singular or repeated Pycnogenol intake. Furthermore, ten so far unidentified compounds (U1 to U10) were detected. Several observations suggested that one of the unknown substances, U1, may be identical with the dimeric procyanidin B1. A confirmation via HPLC-MS-MS needs to be performed. A large interindividual variability in the concentrations detected as well as in the degree of conjugation with glucuronic acid and sulphate of all substances was observed. After a single intake of the extract, compounds with early (caffeic acid, catechin, ferulic acid and U10), intermediate (taxifolin, U8 and U9) and late (M1, U5 and U6) maximum plasma levels and substances which showed highly interindividually variable plasma levels (U1 to U4, U7) were classified. For the first time pharmacokinetic parameters of the known extract components were calculated.

Subsequently it was demonstrated that the concentration of effective compounds in plasma samples of volunteers after Pycnogenol intake was sufficiently high to evoke pharmacological effects. A new concept was developed for this investigation. Inhibition of the secretion of MMP-9 on a cellular level was performed *ex vivo* with plasma samples before and after Pycnogenol intake. After repeated intake, diluted plasma samples of the volunteers evoked a significant decrease in MMP-9 secretion of about 25 %. Plasma samples after a single intake of 300 mg Pycnogenol caused an inhibition of the MMP-9 secretion already after 30 minutes. The inhibition persisted up to 14 hours.

An important transcription factor in inflammatory processes is NF- $\kappa$ B. Activated by various stimuli, NF- $\kappa$ B mediates the induction of MMP-9. In *ex vivo* experiments, plasma samples of volunteers after repeated Pycnogenol intake were incubated with stimulated monocytes. An inhibition of the NF- $\kappa$ B activation of 15 % was observed. The percentage of inhibition of NF- $\kappa$ B activation correlated with inhibition of MMP-9 secretion for matched plasma samples. These results suggested that inhibition of MMP-9 secretion by Pycnogenol *ex vivo* was mediated via NF- $\kappa$ B pathway. The examples of MMP-9 and NF-

$\kappa$ B inhibition showed for the first time that sufficiently high concentrations of ingredients and/or metabolites of Pycnogenol were reached *in vivo* that exhibited pharmacodynamically relevant effects *ex vivo*.

So far, no correlation was found between the pharmacokinetically identified substances and the pharmacodynamic effects.

The comprehensive *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* investigations of ingredients and/or metabolites of Pycnogenol, on a molecular as well as on a cellular level, contribute substantially to the understanding of the clinical antiinflammatory effects of pine bark extract.



## **F. Abkürzungsverzeichnis**

---



## F. Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

APMA	p-Aminophenylmercuriacetat
AUC	Area under curve
BCA	Bicinchonic Acid
BSA	Bovines Serumalbumin
$C_{\max}$	maximale Plasmakonzentration
CD	Cluster of Differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Elektrochemischer Detektor
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
FDA	Food and Drug Administration
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
IC	Inhibitory concentration
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LPS	Lipopolysaccharid
MA	Mittlere Abweichung vom Mittelwert
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of flight
MMP	Matrixmetalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
MT-MMP	Membrane type Matrixmetalloproteinase
MW	Molecular weight
MWCO	Molecular weight cut-off
n.d.	nicht detektierbar
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
Pharm. Helv.	Pharmacopea Helvetica
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
r	Korrelationskoeffizient
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecylsulfat
$t_{1/2}$	terminale Halbwertszeit
$t_{\max}$	Zeitpunkt maximaler Plasmakonzentration
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNBSA	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- $\alpha$	Tumor Necrose Faktor- $\alpha$
U	unbekannte Substanz
USP	United States Pharmacopeia

## **G. Literaturverzeichnis**

---



## G. Literaturverzeichnis

1. Pirasteh, G., *Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 1988, Westfälische Wilhelms-Universität: Münster.
2. Rüge, H.-J., *Identifizierung und Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe sowie pharmakologisch-biochemische Untersuchungen eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer Pinus pinaster Ait.*, in *Fachbereich Chemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 1996, Westfälische Wilhelms-Universität Münster: Münster. p. 170.
3. Sibbel, R.P., *Untersuchungen zu Radikalfängereigenschaften, Analytik und Herstellungsverfahren eines Trockenextraktes aus der Rinde der Meereskiefer Pinus pinaster Ait.*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 1996, Westfälische Wilhelms-Universität: Münster.
4. Rohdewald, P., *Pycnogenol*, in *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A., Packer L., Editor. 1998, Marcel Dekker Inc. p. 405-419.
5. Sies, H. and Stahl, W., *Antioxidants and human health*, in *Vitamin C: the State of Art in Disease Prevention Sixty Years after Nobel Prize*, Paoletti P., S.H., Bug J., Grossi E., Poli A., Editor. 1998: Heidelberg & New York. p. 1-11.
6. Briganti, S. and Picardo, M., *Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new*. JEADV, 2003. **17**: p. 663-669.
7. Tourino, S. et al., *Procyanidin fractions from pine (Pinus pinaster) bark: radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion and antiproliferative effect in melanoma cells*. J Agr Food Chem, 2005. **53**: p. 4728-4735.
8. Packer, L., Rimbach, G. and Virgili, F., *Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark, pycnogenol*. Free Radical Bio Med, 1999. **27**(5/6): p. 704-724.
9. Blazso, G. et al., *Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of procyanidins-containing extract from the bark of Pinus pinaster sol and its fractions*. Pharm Pharmacol, 1994. **3**: p. 217-220.
10. Cho, K.-J. et al., *Effect of bioflavonoids extracted from the bark of Pinus maritima on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7*. Toxicol Appl Pharm, 2000. **168**: p. 64-71.
11. Bayeta, E. and Lau, M.S., *Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages*. Nutr Res, 2000. **20**(2): p. 249-259.
12. Maritim, A. et al., *Effects of Pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats*. J Biochem Molecular Toxicology, 2003. **17**(3): p. 193-199.
13. Mochizuki, M. and N., H., *Therapeutic efficacy of pycnogenol in experimental inflammatory bowel diseases*. Phytother Res, 2004. **18**: p. 1027-1028.
14. Stefanescu, M. et al., *Pycnogenol efficacy in the treatment of systemic lupus erythematosus patients*. Phytother Res, 2001. **15**: p. 698-704.
15. Hosseini, S. et al., *Pycnogenol ((R)) in the management of asthma*. J Med Food, 2001. **4**: p. 201-209.
16. Große Düweler, K. and Rohdewald, P., *Urinary metabolites of french maritime pine bark extract in humans*. Pharmazie, 2000. **55**(5): p. 364-368.
17. Mosher, D.F. et al., *Assembly of extracellular matrix*. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**: p. 810-818.

18. Scott, J.E., *Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape*. J Anat, 1995. **187**: p. 259-269.
19. Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M. and Robert, L., *Extracellular matrix*. FEBS Letters, 1990. **268**: p. 386-393.
20. Rosenbloom, J., Abrams, W.R. and Mecham, R.P., *Extracellular matrix 4: the elastic fiber*. FASEB Journal, 1993. **7**: p. 1208-1218.
21. Ayad, S.E. and Boot-Handford, R., *The extracellular matrix factsbook*. 2 nd ed. 1998, London: Academic Press.
22. Woessner, J.F., *The matrix metalloproteinase family*. Matrix Metalloproteinases, ed. Parks W.C., M.R.P. 1998, London: Academic Press.
23. Oldberg, A. *et al.*, *Structure and function of extracellular matrix proteoglycans*. Biochem Soc T, 1990. **18**: p. 789-792.
24. Sechler, J.L. *et al.*, *Modulation of cell-extracellular matrix interactions*. Ann NY Acad Sci, 1998. **857**: p. 143-154.
25. Birkedal-Hansen, H. *et al.*, *Matrix metalloproteinases: a review*. Crit Rev Oral Biol M, 1993. **4**(2): p. 197-250.
26. Gross, J. and Lapiere, C.M., *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci USA, 1962. **48**: p. 1014-1022.
27. Murphy G. *et al.*, *Matrix metalloproteinases in arthritic disease*. Arthritis Res, 2002. **4**(3): p. S39-S49.
28. Bode, W. and Maskos, K., *Structural studies on MMPs and TIMPs*. Methods Mol Biol, 2001. **151**: p. 45-77.
29. Morgunova, E. *et al.*, *Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2*. PNAS, 2002. **99**(11): p. 7414-7419.
30. Overall, C.M., *Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies*. Method Mol Biol, 2001. **151**: p. 79-120.
31. Gomis-Rüth, F.X. *et al.*, *The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 Å crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain*. J Mol Biol, 1996. **264**: p. 556-566.
32. Morgunova, E. *et al.*, *Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed*. Science, 1999. **284**(June 4): p. 1667-1670.
33. Leppert, D. *et al.*, *Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis*. Brain Res Rev, 2001. **36**: p. 249-257.
34. Owen, C.A. *et al.*, *Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**: p. 283-294.
35. Preston, A., *Matrix Metalloproteinases (MMPs)*. Extracellular Matrix Proteases & Proteins Technical Guide, 2002. **2**: p. 1-19.
36. Beckett, R. *et al.*, *Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research*. Drug Discov Today, 1996. **1**(1): p. 16-26.
37. Heppner, K.J. *et al.*, *Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response*. Am J Pathol, 1996. **149**(1): p. 273-282.
38. Feldmann, M., Brennan, F.M. and Maini, R.N., *Rheumatoid arthritis*. Cell, 1996. **85**(3): p. 307-310.



39. Mautino, G. *et al.*, *Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **17**: p. 583-591.
40. Lemjabbar, H. *et al.*, *Contribution of 92 kda gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **159**: p. 1298-1307.
41. Brew, K., Dinakarpanian, D. and Nagase, H., *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1477**: p. 267-283.
42. Holten-Andersen, M.N. *et al.*, *Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer*. *Brit J Cancer*, 1999. **80**: p. 495-503.
43. Gardner, J. and Ghorpade, A., *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system*. *J Neurosci Res*, 2003. **74**: p. 801-806.
44. Singh, A. *et al.*, *Identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors type 1 and 2 in human masseter muscle*. *Arch Oral Biol*, 2000. **45**: p. 431-440.
45. Nagase, H. and Brew, K., *Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics*. *Arthritis Res*, 2002. **4**(3): p. 51-61.
46. Vincenti, M.P., *The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes*. *Method Mol Biol*, 2001. **151**: p. 121-148.
47. Velasco, G. and López-Otín, C., *Strategies for cloning new MMPs and TIMPs*. *Method Mol Biol*, 2001. **151**: p. 25-44.
48. Rowsell, S. *et al.*, *Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor*. *J Mol Biol*, 2002. **319**: p. 173-181.
49. Krüger, A. *et al.*, *Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3523-3526.
50. Sorbi, D. *et al.*, *Captopril inhibits the 72 kda and 92 kda matrix metalloproteinases*. *Kidney Int*, 1993. **44**: p. 1266-1272.
51. Saliou, C. *et al.*, *Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract*. *Free Radical Bio Med*, 2001. **30**: p. 154-160.
52. Peng, Q., Wei, Z. and Lau, B.H., *Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**: p. 834-841.
53. Meselhy, M.R., N., N. and M., H., *Biotransformation of (-)-epicatechin 3-o-gallate by human intestinal bacteria*. *Chem Pharm Bull*, 1997. **45**: p. 888-893.
54. Große Düweler, K., *Untersuchungen zur Metabolisierung von Inhaltsstoffen eines Rindenextraktes der Meereskiefer Pinus pinaster Ait.*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 1999, Westfälische Wilhelms-Universität: Münster.
55. Das, N.P., *Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man*. *Biochem Pharmacol*, 1971. **20**: p. 3435-3445.
56. Snoek-van Beurden, P.A.M. and Von den Hoff, J.W., *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. *BioTechniques*, 2005. **38**(1): p. 78-83.
57. Hawkes, S.P., Li, H. and Taniguchi, G.T., *Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs*. *Methods Mol Biol*, 2001. **151**: p. 399-410.
58. Baragi, V.M. *et al.*, *A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin*. *Matrix Biol*, 2000. **19**: p. 267-273.

59. Rao, S.K. *et al.*, *A versatile microassay for elastase using succinylated elastin*. Anal Biochem, 1997. **250**: p. 222-227.
60. Ratnikov, B. *et al.*, *Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin*. Anal Biochem, 2000. **286**: p. 149-155.
61. Cayot, P. and Tainturier, G., *The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination*. Anal Biochem, 1997. **249**: p. 184-200.
62. Kuttan, R., Donnelly, P.V. and Di Ferrante, N., *Collagen treated with (+)-catechin becomes resistant to the action of mammalian collagenase*. Experientia, 1981. **37**(3): p. 221-223.
63. Prontera, C. *et al.*, *Inhibition of gelatinase a (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing lewis lung carcinoma*. Int J Cancer, 1999. **81**: p. 761-766.
64. Sartor, L. *et al.*, *Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**: p. 229-237.
65. Demeule, M., Brossard, M. and Pagé, M., *Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1478**: p. 51-60.
66. Tanimura, S. *et al.*, *Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity*. Biochem Bioph Res Co, 2005. **330**: p. 1306-1313.
67. Charlton, A.J. *et al.*, *Polyphenol/peptide binding and precipitation*. J Agr Food Chem, 2002. **50**: p. 1593-1601.
68. Moini, H., Guo, Q. and Packer, L., *Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol: effect on xanthin oxidase*. J Agr Food Chem, 2000. **48**: p. 5630-5639.
69. Siebert, K.J., *Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis*. J Agr Food Chem, 1999. **47**(2): p. 353-362.
70. Brunet, M.J. *et al.*, *Human apo a-I and rat transferrin are the principal plasma proteins that bind wine catechins*. J Agr Food Chem, 2002. **50**: p. 2708-2712.
71. Feldman, K.S. *et al.*, *Binding affinities of gallotannin analogs with bovine serum albumin: ramifications for polyphenol-protein molecular recognition*. Phytochemistry, 1999. **51**: p. 867-872.
72. Hagerman, A.E. and Butler, L.G., *The specificity of proanthocyanidin-protein interactions*. J Biol Chem, 1981. **256**(No. 9 May 10): p. 4494-4497.
73. Löffler, G. and P.E., P., *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 6. 1998, Berlin: Springer Verlag. 1155.
74. Debelle, L. and Tamburro, A.M., *Elastin: molecular description and function*. Int J Biochem Cell B, 1999. **31**: p. 261-272.
75. Sachs, L., *Angewandte Statistik*. Vol. 9. 2002, Berlin: Springer Verlag. 890.
76. Kottig, K.R., *Identifizierung, Quantifizierung und pharmakologische Untersuchungen eines Extraktes aus der Rinde von Pinus lambertiana Dougl.*, in *Fachbereich Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 1999, Westfälische Wilhelms-Universität: Münster. p. 187.
77. Bagchi, D., *The truth about OPCs*. 1999.
78. Chapon, L., *Monatsschr Brauwiss*, 1993. **46**: p. 263-279.
79. Santos, M.C.L.G. *et al.*, *Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing*. Brit J Dermatol, 2001. **145**(5): p. 854.

80. Reinhardt, D. *et al.*, *Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (mmp) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ace inhibitors on mmp*. *Heart*, 2002. **88**: p. 525-530.
81. De Souza, A.P., Gerlach, R.F. and Line, S.R., *Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts*. *Dent Materials*, 2000. **16**(2): p. 103-108.
82. Jiang, C., Ting, A.T. and Seed, B., *PPAR $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. *Nature*, 1998. **391**: p. 82-86.
83. Bond, M. *et al.*, *Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B*. *FEBS Letters*, 1998. **435**: p. 29-34.
84. Russell, R.E.K. *et al.*, *Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Resp Cell Mol*, 2002. **26**: p. 602-609.
85. Nicola, N.A. and D., M. *Specificity of action of colony-stimulating factors in the differentiation of granulocytes and macrophages*. in *Biochemistry of Macrophages*. 1986. London: Ciba Foundation.
86. Beekhuizen, H. and van Furth, R., *Monocyte adherence to human vascular endothelium*. *J Leukoc Biol*, 1993. **54**: p. 363.
87. Aschoff, K.A.L., *Das reticulo-endotheliale System*. *Ergebnisse der Inneren Medizin*, 1924. **26**: p. 1-118.
88. Oliver, J.A., *Unexpected news in renal fibrosis*. *J Clin Invest.*, 2002. **110**: p. 1763-1764.
89. Muller-Quernheim, J. *et al.*, *Lung-restricted activation of the alveolar macrophage/monocyte system in pulmonary sarcoidosis*. *Am Rev Respir Dis*, 1992. **145**(1): p. 187-192.
90. Brown, S.B. and Savill, J., *Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes*. *J Immunol*, 1999. **162**(1): p. 480-485.
91. Shu, H. *et al.*, *Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells*. *Biochem Bioph Res Co*, 2000. **267**: p. 345-349.
92. Aldonyte, R. *et al.*, *Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients*. *Resp Res*, 2003: p. 4-11.
93. Wahl, L.M. and Corcoran, M.L., *Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines*. *J Periodontol*, 1993. **64**: p. 467-473.
94. Zhang, Y. *et al.*, *Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- $\alpha$ , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 $\beta$  through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms*. *J Immunol*, 1998: p. 3071-3076.
95. Menshikov, M. *et al.*, *Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis*. *Biochem J*, 2002. **367**: p. 833-839.
96. Chinetti, G. *et al.*, *Activation of proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25573-25580.
97. Hill, M.R. *et al.*, *Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia*. *Infect Immun*, 1999: p. 3488-3493.

98. Kielian, T. and Drew, P.D., *Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation*. J Neurosci Res, 2002. **71**: p. 315-325.
99. Holden, P.R. and Tugwood, J.D., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences*. J Mol Endocrinol, 1999. **22**: p. 1-8.
100. Eberhardt, W. et al., *Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33518-33528.
101. Bishop-Bailey, D., *Peroxisome proliferator-activated receptors in cardiovascular system*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(5): p. 823-834.
102. Hsueh, W.A. and Law, R.E., *PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement*. Atheroscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**: p. 1891-1895.
103. Corton, J.C., Anderson, S.P. and Stauber, A., *Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 491-518.
104. Escher, P. and Wahli, W., *Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions*. Mutat Res, 2000. **448**: p. 121-138.
105. Ricote, M. et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) as a regulator of monocyte/macrophage function*. J Leukocyte Biol, 1999. **66**: p. 733-739.
106. Fahmi, H., Pelletier, J.-P. and Martel-Pelletier, J., *PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview*. J Rheumatol, 2002.
107. Forman, B.M., Chen, J. and Evans, R.M., *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**: p. 4312-4317.
108. Nagy, L. et al., *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. Cell, 1998. **93**(17): p. 229-240.
109. Kliewer, S.A. et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-819.
110. Lehmann, J.M. et al., *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12953-12956.
111. Yu, K., Bayona, W. and Kallen, C.B., *Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 23975-23983.
112. Schoonjans, K. et al., *PPARalpha and gamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene*. EMBO J, 1996. **15**: p. 5336-5348.
113. Marx, N. and V., H., *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the vessel wall: new regulators of gene expression in vascular cells*. Z Kardiol, 2001. **90**(7): p. 470-477.
114. Eberhardt, W. et al., *Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor  $\kappa$ B and Ets transcription factors*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(8): p. 1752-1766.

115. Ricote, M. *et al.*, *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. *Nature*, 1998. **391**: p. 79-82.
116. Eberhardt, W. and Kilz, T., *Molekulare Grundlagen der Glucocorticoidwirkung*. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2003. **32**(4): p. 288-294.
117. Umland, S.P., Schleimer, R.P. and Johnston, S.L., *Review of the molecular and cellular mechanism of action of glucocorticoids for use in asthma*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2002. **15**: p. 35-50.
118. Aljada, A. *et al.*, *Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9)*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(12): p. 5988-5991.
119. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. *Clin Sci (Colch)*, 1998. **94**: p. 557-572.
120. Möller, B., *Behandlung rheumatischer Erkrankungen*. *Pharmazie in unserer Zeit*, 2003. **32**(4): p. 302-305.
121. Kintscher, U. *et al.*, *Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes*. *Eur J Pharmacol*, 2000. **401**: p. 259-270.
122. Bellosta, S. *et al.*, *Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of *Tristanopsis calobuxus* (Myrtaceae)*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**: p. 1440-1448.
123. Maeda-Yamamoto, M. *et al.*, *Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells*. *J Agr Food Chem*, 1999. **47**: p. 2350-2354.
124. Annabi, B. *et al.*, *Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1542**: p. 209-220.
125. Cha, B.Y. *et al.*, *Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9*. *J Ethnopharmacol*, 2003. **85**: p. 163-167.
126. Park, W.-H., Kim, S.H. and Kim, C.H., *A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination*. *Toxicology*, 2005. **207**: p. 383-390.
127. Garbisa, S. *et al.*, *Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavonol epigallocatechin-3-gallate*. *Cancer*, 2001. **91**(4): p. 822-832.
128. Manach, C. *et al.*, *Polyphenols: food sources and bioavailability*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**: p. 727-747.
129. Manach, C. *et al.*, *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**: p. 230S-242S.
130. Hollman, P.C. *et al.*, *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. *FEBS Letters*, 1997. **418**: p. 152-156.
131. Donovan, J.L., Bell, J.R. and Kasim-Karakas, S., *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *J Nutr*, 1999. **129**: p. 1662-1668.
132. Setchell, K.D. *et al.*, *Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements*. *J Nutr*, 2001. **131**: p. 1362S-1375S.
133. Scalbert, A. and Williamson, G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. *J Nutr*, 2000. **130**: p. 2073S-2085S.
134. Setchell, K.D., Brown, N.M. and Lydeking-Olsen, E., *The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones*. *J Nutr*, 2002. **132**: p. 3577-3584.

135. Setchell, K.D. *et al.*, *Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer*. *Lancet*, 1981. **2**: p. 4-7.
136. Lipinski, C.A., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Adv Drug Delivery Rev*, 1997. **23**(1-3): p. 3-25.
137. Déprez, S. *et al.*, *Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2001. **3**: p. 957-967.
138. Baba, S. *et al.*, *Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 (epicatechin-(4beta-8)-epicatechin) in rats*. *Free Radical Bio Med*, 2002. **33**: p. 142-148.
139. Donovan, J.L. *et al.*, *Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3*. *Br J Nutr*, 2002. **87**: p. 299-306.
140. Holt, R.R. *et al.*, *Procyanidin dimer B2 (epicatechin-(4beta-8)-epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa*. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**: p. 798-804.
141. Sano, A. *et al.*, *Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003. **67**(5): p. 1140-1143.
142. Rechner, A.R. *et al.*, *Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo*. *Free Radical Bio Med*, 2001. **30**: p. 1213-1222.
143. Donovan, J.L., *Catechin is metabolized by both the small intestine and the liver in rats*. *J Nutr*, 2001. **131**: p. 1753-1757.
144. Falany, C.N., *Enzymology of human cytosolic sulfotransferases*. *FASEB Journal*, 1997. **11**: p. 206-216.
145. Spencer, J.P., *The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids*. *FEBS Letters*, 1999. **458**: p. 224-230.
146. Adzet, T., *In vitro study of caffeic acid-bovine serum albumin interaction*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1988. **13**: p. 11-14.
147. Boulton, D.W., Walle, U.K. and Walle, T., *Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins*. *J Pharm Pharmacol*, 1998. **50**: p. 243-249.
148. Dangles, O. *et al.*, *Binding of flavonoids to plasma proteins*. *Methods Enzymol*, 2001. **335**: p. 319-333.
149. Dangles, O., *Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin*. *J Chem Soc*, 1999. **2**: p. 737-744.
150. Vitrac, X. *et al.*, *Distribution of (14C)-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissue after oral administration*. *Life Sci*, 2003. **72**: p. 2219-2233.
151. Suganuma, M. *et al.*, *Wide distribution of (3H)(-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**: p. 1771-1776.
152. Mullen, W. *et al.*, *Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of (2-(14C)quercetin-4'-glucoside*. *J Agr Food Chem*, 2002. **50**: p. 6902-6909.
153. Maubach, J. *et al.*, *Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. **784**: p. 137-144.

154. Crespy, V. *et al.*, *The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound.* Am J Physiol, 2003. **284**: p. G980-988.
155. Manach, C. *et al.*, *Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice.* Eur J Clin Nutr, 2003. **57**: p. 235-242.
156. Manach, C. *et al.*, *Bioavailability in humans of the flavanones hesoeridin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice.* Eur J Clin Nutr, 2003. **57**: p. 235-242.
157. Erlund, I. *et al.*, *Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperitin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice.* J Nutr, 2001. **132**: p. 235-241.
158. Watanabe, S. *et al.*, *Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako).* J Nutr, 1998. **128**: p. 1710-1715.
159. Zhang, Y., Hendrich, S. and Murphy, P.A., *Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women.* J Nutr, 2003. **133**: p. 399-404.
160. Yang, B., Arai, K. and Kusu, F., *Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* Anal Biochem, 2000. **283**: p. 77-82.
161. Virgili, F. *et al.*, *Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a french maritime pine (Pinus maritima) bark extract.* Free Radical Bio Med, 2000. **28**(8): p. 1249-1256.
162. Meng, X. *et al.*, *Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice and rats.* Chem Res Toxicol, 2002. **15**: p. 1042-1050.
163. Bell, J.R.C. *et al.*, *(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**: p. 103-108.
164. Nardini, M. *et al.*, *Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption.* J Agr Food Chem, 2002. **50**: p. 5735-5741.
165. Rossi, A.M. *et al.*, *Phenotype-genotype relationships of SULT1A1 in human liver and variations in the IC50 of the SULT1A1 inhibitor quercetin.* Int J Clin Pharm Th, 2004. **42**(10): p. 561-567.
166. Kiang, T.K.L., *UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions.* Pharmacol Therapeut, 2005. **106**: p. 97-132.
167. Pacifici, G., *Zidovudine glucuronidation in human liver: interindividual variability.* Int J Clin Pharmacol Ther, 1996. **34**: p. 329-334.
168. Wittemer, S.M. *et al.*, *Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans.* Phytomedicine, 2005. **12**: p. 28-38.
169. Moriandi, M.Y., Scobie, H. and O'Brien, P.J., *Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions.* Toxicol Lett, 2002. **133**(2-3): p. 141-151.
170. Lee, M.-J. *et al.*, *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, 2002. **11**: p. 1025-1032.
171. Li, C. *et al.*, *Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion.* Chem Res Toxicol, 2000. **13**: p. 177-184.
172. Rios, L.Y. *et al.*, *Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans.* Am J Clin Nutr, 2002. **76**: p. 1106-1110.

173. Simonetti, P., Gardana, C. and Pietta, P., *Caffeic acid as biomarker of red wine intake*. Method Enzymol, 2001. **335**: p. 122-130.
174. Olthof, M.R., Hollman, P.C. and Katan, M.B., *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. J Nutr, 2001. **131**: p. 66-71.
175. Kern, S.M. *et al.*, *Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption*. J Agr Food Chem, 2003. **51**.
176. Schoefer, L. *et al.*, *Anaerobic degradation of flavonoids by Clostridium orbiscindens*. Appl Environ Microb, 2003. **69**(10): p. 5849-5854.
177. Gymnich, S. *et al.*, *Haptoglobin als Indikator*. Nutztierpraxis aktuell, 2003. **6**: p. 1-5.
178. Molica, S. *et al.*, *Increased serum levels of matrix metalloproteinase-9 predict clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Eur J Haematol, 2003. **70**: p. 373-378.
179. Graefe, E.U., Wittig, J. and Mueller, S., *Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans*. J Clin Pharmacol, 2001. **41**: p. 492-499.
180. DuPont, M.S. *et al.*, *Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans*. J Nutr, 2002. **132**: p. 172-175.
181. Leenen, R. *et al.*, *A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**: p. 87-92.
182. Wang, J.F. and Cabanis, J., *A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage*. J Nutr, 2000. **130**: p. 2115S-2119S.
183. Sung, H. *et al.*, *In vivo antioxidant effect of green tea*. Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(7): p. 527-529.
184. Notka, F., Meier, G. and Wagner, R., *Concerted inhibitory activities of Phyllanthus amarus on HIV replication in vitro and ex vivo*. Antivir Res, 2004. **64**: p. 93-102.
185. Koga, T. and Meydani, M., *Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**: p. 941-948.
186. Rohdewald, P., *A review of the french maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology*. Int J Clin Pharm Th, 2002. **40**(4): p. 158-168.
187. May, M.J. and S., G., *Signal transduction through NF- $\kappa$ B*. Immunol Today, 1998. **19**(2): p. 80-88.
188. Fujita, T. *et al.*, *Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B*. Gene Dev, 1992. **6**: p. 775-787.
189. Kunsch, C., Ruben, S.M. and Rosen, C.A., *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**: p. 4412-4421.
190. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., *Ikappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**: p. 540-546.
191. Silverman, N. and Maniatis, T., *NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity*. Gene Dev, 2001. **15**: p. 2321-2342.
192. Ben Neriah, Y., *Regulatory functions of ubiquitination in the immune system*. Nat Immunol, 2002. **3**: p. 20-26.
193. Karin, M. and Ben-Neriah, Y., *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity*. Ann Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-663.
194. Lu, Y. and L.M., W., *Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/Ikka/NF- $\kappa$ B pathway*. J Leukocyte Biol, 2005. **78**: p. 1-7.



195. Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S. and Liotta, L.A., *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. *Annu Rev Cell Biol*, 1993. **9**: p. 541-573.
196. Poston, R.N. *et al.*, *Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 1992. **140**: p. 665-673.
197. Tozawa, K. *et al.*, *Effects of anti-nuclear factor kappa B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells*. *Cancer Res*, 1995. **55**: p. 4162-4167.
198. Weil, R. *et al.*, *Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**: p. 6345-6354.
199. Su, F. and Schneider, R.J., *Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors or fel-related proteins*. *J Virol*, 1996. **70**: p. 4558-4566.
200. Shrivastava, A. *et al.*, *Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors*. *J Virol*, 1998. **72**: p. 9722-9728.
201. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease (1)*. *N Engl J Med*, 1991. **325**: p. 928-937.
202. Bochner, B.S., Udem, B.J. and Lichtenstein, L.M., *Immunological aspects of allergic asthma*. *Ann Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 295-335.
203. Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, C., *Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system*. *Antioxid Redox Signal*, 1999. **1**: p. 129-144.
204. Rayet, B. and Gelinas, C., *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**: p. 6938-6947.
205. Lai, W.C. *et al.*, *Differential regulation of lipopolysaccharid-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP-1) and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases*. *J Immunol*, 2003. **170**: p. 6244-6249.
206. Davis, J.N. *et al.*, *Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappaB activation by TNF-alpha in blood lymphocytes*. *Free Radical Bio Med*, 2001. **30**(11): p. 1293-1302.
207. Ashikawa, K. *et al.*, *Piceatannol inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and NF-kappaB-mediated gene expression through suppression of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation*. *J Immunol*, 2002: p. 6490-6497.
208. Hastak, K. *et al.*, *Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells*. *Oncogene*, 2003. **22**: p. 4851-4859.
209. Leung, C.H. *et al.*, *Novel mechanism of inhibition of NF-(kappa)B DNA-binding activity by diterpenoids isolated from isodon rubescens*. *Mol Pharmacol*, 2005. **Manuscript No. 12765**.
210. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood*. *Scan J Clin Lab Invest*, 1968. **21**: p. 77-79.
211. Feige, U., Overwien, B. and Sorg, C., *Purification of human blood monocytes by hypotonic density gradient centrifugation in percoll*. *J Immunol Methods*, 1982. **54**(3): p. 309-315.
212. Braggio, S. *et al.*, *A strategy for validation of bioanalytical methods*. *J Pharmaceut Biomed*, 1996. **14**: p. 375-388.

213. Buick, A.R. *et al.*, *Method validation in the bioanalytical laboratory*. J Pharmaceut Biomed, 1990. **8**: p. 629-637.
214. Shah, V.P. *et al.*, *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991. **16**(4): p. 249-255.
215. Shah, V.P. *et al.*, *Analytical method validation--a revisit with a decade of progress*. Pharm Res, 2000. **17**(12): p. 1551-1557.
216. Gan, S.H. *et al.*, *Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for tramadol in human plasma using liquid-liquid extraction*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **772**(1): p. 123-129.

## **Lebenslauf**

Tanja Grimm, geboren am 21.01.1974 in Dinkelsbühl

### **Ausbildung**

Sep. 1980 – Juli 1984	Einschulung, Grundschule Schopfloch
Sep 1984 – Juni 1993	Gymnasium Dinkelsbühl
Juli 1993	Abitur
Sept. 1993 – März 1995	PTA-Schule Ellwangen
Mai 1996 – April 2000	Studium der Pharmazie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
Aug. 1998	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
April 2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

### **Praktika**

Sep. 1995 – Feb. 1996	PTA-Praktikum, Hubertus-Apotheke, Schopfloch
Mai 2000 – April 2001	Pharmaziepraktikantin, Sonnenhof-Apotheke, Würzburg

### **Berufspraxis**

Aug. 2001 – Sep. 2001	Apothekerin, Hubertus-Apotheke, Schopfloch
Seit Nov. 2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Petra Högger.

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten  
Kiefernrintenextraktes**

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 früher außer den urkundlich vorgelegten und anerkannten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

---

Tanja Grimm