

**Analyse des Einflusses ausgewählter Polyphenole
auf Funktionalität und Genexpression von p-Glykoprotein
im CaCo-II-Zellkulturmodell**



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Florian Lang
aus Zellingen

Würzburg 2021

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Professor Dr. Petra Högger

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

Meiner Oma Rita, meinem Opa Georg und meinem Onkel Werner

Teile der vorliegenden Arbeit leisteten einen Beitrag zu folgenden Publikationen:

Schramm, S., Huang, G., Gunesch, S., Lang, F., Roa, J., Högger, P., Sabeté, R., Maher, P., Decker, M., *Regioselective synthesis of 7-O-esters of the flavanolignan silibinin and SARs lead to compounds with overadditive neuroprotective effects.* Eur. J. Med. Chem, (2018) 146, 93-107

Schramm, S., Gunesch, S., Lang, F., Saedtler, M., Meinel, L., Högger, P., Decker, M., *Investigations into neuroprotectivity, stability and water solubility of 7-O-cinnamoylsilibinin and its hemisuccinate derivative.* Bioorg. Med. Chem. Lett, (2018) 351

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt zunächst allgemein allen, die mich auf vielfältigste Art beim Entstehen und Gelingen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben.

Zuerst gilt dieser Dank Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Möglichkeit der Promotion in Ihrem Arbeitskreis und das entgegengebrachte Vertrauen. Vielen Dank für das Betrauen mit diesem facettenreichen und spannenden Thema, wodurch ich mich in eine Vielzahl verschiedener Methoden und Arbeitsprozesse einarbeiten durfte. Vielen Dank auch für die tolle Betreuung, das stets offene Ohr in fachlichen sowie allgemeinen Fragestellungen und die Gelegenheit zur breiten Selbstverwirklichung in den verschiedenen Projekten. Auch für das Vertrauen in der Studentenbetreuung und der Lehrtätigkeit in Klinischer Pharmazie sowie Pharmakotherapie möchte ich mich bedanken.

Herrn Jun-Prof. Dr. Scherf-Clavel danke ich für ein stets offenes Ohr und die ausgezeichnete Hilfestellung bei vielerlei Problemen.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Högger und des Arbeitskreises von Herrn Jun.-Prof. Dr. Scherf-Clavel soll ein besonderer Dank für eine unvergessliche Promotionszeit und eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre, für unzählige lustige und schöne Momente im beruflichen wie im privaten Umfeld, tolle Gespräche und konstruktive Anregungen, Vorschläge und Diskussionen bei jeglichen Problemen in den Versuchsdurchführungen gelten: Roswitha Scheblein, Dr. Maike Scherf-Clavel, Dr. Stoyan Dirimanov, Andreas Pospiech, Linda Volpp, Charlotte Beier, Jasmin Bayer, Theresa Häfner, Bettina Gerner, Sebastian Zimmermann und Maximilian Stapf. Jasmin Bayer gilt ein zusätzliches Dankeschön für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Die Zeit mit euch wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Den Assistenten der Klinischen Pharmazie sowie der Pharmakotherapie, Linda Volpp und Charlotte Beier, sowie Dr. Jens Schmitz danke ich herzlich für die stets vertrauensvolle, freundliche und intensive Zusammenarbeit in der Studentenbetreuung. Trotz dem hohen Zeitaufwand und manchen anstrengenden wie betreuungsintensiven Studenten haben wir den Spaß nie verloren.

Dr. Stoyan Dirimanov danke ich für die Einweisung und die Einarbeitung in die Zellkultur.

Dr. Marcus Gutmann vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. Meinel danke ich für die großartige Einarbeitung in die Transportversuche mit CaCo-II-Zellen und die vielen freundschaftlichen Diskussionen und Gespräche über den fachlichen Unialltag aber auch weit darüber hinaus.

Dr. Simon Schramm, Dr. Sandra Gunesch, Julian Hofmann und Matthias Scheiner vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Decker danke ich für die Unterstützung sowohl in der Durchführung als auch in der Auswertung der Stabilitäts- und der FRAP-Untersuchungen.

Ein herzliches Dankeschön geht ebenso an die Sekretärinnen Frau Ebner (†), Frau Möhler-Reitzenstein, Frau Schneider und Frau Wecklein-Weidinger für ein offenes Ohr und große Hilfsbereitschaft in organisatorischen Anliegen sowie für die vielen freundlichen Gespräche.

Für Dr. Bernd Reyer und Dr. Ludwig Höllein ein Dankeschön für ihr Engagement und die unkomplizierte Hilfe beim Lösen von Problemstellungen rund um Hard- und Software.

Herrn Keßler, Herrn Völker, Herrn Vollmuth sowie Herrn Walter von der Institutswerkstatt gilt mein Dank für ihre Hilfe und die schnelle Lösung von allerlei technischen Fragestellungen sowie kurzweiligen Gesprächen auf den Gängen, dem Bringen von Paketen und Wartung und Instandhaltung der Geräte des Arbeitskreises.

Frau Kerstin Paprotka möchte ich für die Aufbewahrung der Zellen des Arbeitskreises Högger im Biozentrum und der stets kompetenten Hilfe bei Fragen zur Kultivierung und Versorgung der Zellen danken.

Von Herzen danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung in Schul-, Studiums- und Promotionszeit. Ebenso für das immerwährende Motivieren und das Ertragen manch schlechter Laune in Verbindung mit schwierigen Phasen in den Versuchsdurchführungen. Ohne das wäre nichts von alledem möglich gewesen.

Meiner Laura danke ich für das Rückenstärken, wenn mal etwas nicht wie gewünscht geklappt hat, in Verbindung mit ständigem Motivieren, ihre bedingungslose Geduld und das Korrekturlesen der Arbeit.

Meinen Umbertos & Fätsens danke ich für vielerlei Ablenkungen bei gemeinsamen Aktivitäten, die den tristen Alltag fehlgeschlagener Versuche schnell in den Hintergrund rücken ließen, sowie die Motivation den zeitlichen Prozess einer Promotion durchzustehen.

Meinen Jungs von den Turedancern ein Dankeschön für die Ablenkung beim Training und für die vielen tollen Auftrittsabende in der Fasenachtszeit, auch wenn an Montagen zur Arbeit oftmals der nötige Schlaf gefehlt hat.

***“If we try we only risk failure,
but if we don`t try we ensure failure.
Keep trying.”***

(Author unknown)

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	21
1	Physiologie des menschlichen Darmtraktes und Prinzip der Arzneistoff- absorption.....	22
1.1	Anatomie des Magen-Darm-Traktes.....	22
1.2	Aufbau des Dünndarms und Morphologie der Zellen.....	26
2	Arzneistofftransport im Darm.....	31
2.1	Transportvorgänge an Biomembranen	31
2.2	Lokalisation und Funktionsweise von Arzneistofftransportern.....	37
2.3	ABC-Transporter	40
2.3.1	Vorkommen und allgemeine Bedeutung.....	40
2.3.2	p-Glykoprotein als Haupttransportprotein der ABC-Familie	41
2.3.3	Aufbau und Funktionsweise von p-Glykoprotein.....	42
2.4	Bedeutung der CaCo-II-Zellen in der Arzneistoffentwicklung.....	45
2.4.1	Grundzüge der Arzneistoffentwicklung	45
2.4.2	Potentiale der CaCo-II-Zellen und weitere Zelltypen	46
2.4.3	Vorhersagepotential des CaCo-II-Modells für die Arzneistoffabsorption	49
2.4.4	Kenndaten aus den Transportversuchen mit CaCo-II-Zellen	50
2.4.5	Transportversuche: Einflüsse auf die Ergebnisse und Interpretation	53
2.4.6	Weitere Untersuchungsmöglichkeiten außerhalb der Zellkultur	56
2.5	Bedeutung von p-Glykoprotein für die Arzneistoffentwicklung	57
3	Charakterisierung der Polyphenole	60
3.1	Struktur und Klassifizierung der Flavonoide	60
3.2	Gesundheitsförderliche Aspekte der Flavonoide	63
3.3	Pharmakokinetik der Flavonoide	63
3.4	Wirkung der Flavonoide	64
3.5	Einschränkungen im Nutzenpotential der Flavonoide	66
4	Ziele der Arbeit	69
B	Allgemeiner Teil	73
1	Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur	74
1.1	Zytotoxizität.....	74
1.1.1	Ergebnisse	75
1.1.2	Diskussion.....	83
1.2	Stabilität	89
1.2.1	Ergebnisse	89

1.2.2	Diskussion	91
2	Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole	95
2.1	Hintergründe.....	95
2.2	Ergebnisse	97
2.3	Diskussion	101
3	Verkürzung der Kulturzeit von CaCo-II-Zellen für Transportversuche	105
3.1	Aspekte der Zellkultur	105
3.2	Hintergründe der Kulturzeit für Transportversuche.....	106
3.2.1	Zeitlicher Ablauf der Kulturzeit vor den Transportversuchen	106
3.2.2	Bekannte Ansätze zur Verkürzung der Kulturzeit.....	108
3.2.3	Relevante Aspekte für die Kulturzeitverkürzung und deren Evaluierung	110
3.3	Fragestellung.....	113
3.4	Ergebnisse	114
3.4.1	TEER-Messung über den Kulturzeitraum.....	114
3.4.2	Färbung der Tight-junctions und der Zellkerne der CaCo-II-Zellen.....	115
3.4.3	Bestimmung der Lucifer Yellow Transportrate über den Kulturzeitraum.....	116
3.4.4	Evaluierung der p-Glykoprotein-Expression über den Kulturzeitraum	117
3.4.5	Funktionelle Aktivität von p-Glykoprotein	119
3.5	Diskussion	120
4	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport	124
4.1	Hintergründe der Transportversuche	124
4.2	Grundlagen zum Versuchsmedium und Ausblick auf Variationen	125
4.3	Limitationen des Modells und Lösungsansätze.....	128
4.4	Substanzen der eigenen Transportversuche.....	131
4.5	Simulation von oxidativen Schäden im Darm im CaCo-II-Zellmodell.....	136
4.6	Fragestellung.....	137
4.7	Ergebnisse	138
4.7.1	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123.....	138
4.7.2	Veränderung des Einflusses der Polyphenole unter physiologischeren Bedingungen.....	140
4.7.3	Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin	142
4.7.4	Effekt einer Vorinkubation mit den Urolithinen auf den Transport von Rhodamin 123.....	144

4.7.5	Effekt der Urolithine auf den mittels LPS veränderten Transport von Rhodamin 123	147
4.7.6	Permeabilität der Kontrollen für die Monolayerqualität Fluorescein und Lucifer Yellow	150
4.8	Diskussion.....	151
4.8.1	Einfluss der Polyphenole auf den Transport von Rhodamin 123	151
4.8.2	Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin.....	157
4.8.3	Einfluss einer Vorinkubation mit den Urolithinen und Dexamethason auf den Transport von Rhodamin 123.....	158
4.8.4	Einfluss der Urolithine auf den mittels LPS veränderten Transport von Rhodamin 123	160
5	Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters.....	164
5.1	Grundlagen der PCR-Technik	164
5.1.1	Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	164
5.1.2	Optimierung, Normalisierung und Validierung der RT-qPCR-Analytik	175
5.2	Fragestellung	184
5.3	Ergebnisse der Genexpressionsversuche für p-GP	185
5.3.1	Inkubation mit Polyphenolen über zwei Stunden	185
5.3.2	Inkubation mit Polyphenolen über 24 Stunden	186
5.3.3	Inkubation mit Polyphenolen über 48 Stunden	187
5.4	Diskussion.....	188
C	Experimenteller Teil	195
1	Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien.....	196
1.1	Häufig verwendete Reagenzien	196
1.2	Häufig verwendete Geräte und Materialien	198
2	Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur	200
2.1	Untersuchung der Zytotoxizität der Substanzen mittels Neutralrotassay	200
2.1.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien	200
2.1.2	Zytotoxizitäts-Testung mit Neutralrot	200
2.2	Untersuchung der Stabilität verwendeter Substanzen in Zellkultur- und Versuchsmedien.....	202
2.2.1	Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien	202
2.2.2	Stabilität in Zellkulturmedium.....	202
2.2.3	Stabilität in Versuchsmedium	203

3	Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole mittels FRAP-Assay	205
3.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien	205
3.1.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien	205
3.1.2	Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien	205
3.2	Durchführung des FRAP-Assays	205
3.3	Auswertung des FRAP-Assays	206
4	Verkürzung der Kulturzeit von CaCo-II-Zellen für Transportversuche	208
4.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien	208
4.1.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien	208
4.1.2	Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien	208
4.2	Routinetätigkeiten in der Zellkultur	208
4.2.1	Herstellung von Kulturmedium und Puffer	208
4.2.2	Auftauen und Kultivieren	210
4.2.3	Passagieren der Zellen	211
4.2.4	Einfrieren von Zellen	212
4.2.5	Test auf Mykoplasmenverunreinigung	213
4.3	Langzeit - TEER - Messung	214
4.4	Transport von Lucifer Yellow	216
4.5	Fluoreszenzfärbung der Tight Junctions	217
4.6	Aktivität der p-GP-Transporter	218
4.7	Vergleich des Rhodamintransportes nach 14 und nach 21 Tagen	218
5	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport	221
5.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien	221
5.1.1	Zusätzlich verwendete Reagenzien	221
5.1.2	Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien	221
5.2	Vorbereitung zu den Transportversuchen	221
5.2.1	Herstellung der Lösungen und Medien	221
5.2.2	Kultivierung der Zellen	223
5.3	Durchführung der Transportversuche	223
5.4	Auswertung der Permeabilitätsversuche	226
6	Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression des p-GP-Transporters	228
6.1	Verwendete Primer und zusätzlich genutzte Reagenzien, Geräte und Materialien	228

6.1.1	Verwendete Primer	228
6.1.2	Zusätzlich genutzte Reagenzien.....	228
6.1.3	Zusätzlich genutzte Geräte und Materialien	228
6.2	Primer-Design	228
6.3	Test der Primer auf Spezifität.....	231
6.4	Optimierung der Primerkonzentration.....	234
6.5	Bestimmung der Reaktionseffizienz	235
6.6	Referenzgenvalidierung	236
7	Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters.....	238
7.1	Zusätzlich verwendete Materialien	238
7.2	Inkubation der CaCo-II-Zellen mit den Polyphenolen.....	238
7.3	RNA – Isolierung und cDNA - Synthese	239
7.3.1	RNA – Isolierung	239
7.3.2	RNA - Quantifizierung	240
7.3.3	cDNA – Synthese.....	240
7.4	Vermessung der Proben mittels RT - qPCR	241
7.4.1	Proben- und Lösungsvorbereitung	241
7.4.2	Probenorganisation	242
7.4.3	Durchführung der PCR.....	243
7.5	Auswertung	244
7.5.1	Reaktionseffizienz	244
7.5.2	IRC – Normalisierung	244
7.5.3	Referenzgennormierung.....	245
7.5.4	REST [®]	245
D	Tabellarischer Anhang.....	247
1	Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur	248
1.1	Untersuchung der Zytotoxizität der Substanzen mittels Neutralrotassay	248
1.1.1	Zytotoxizität nach 24 h in Kulturmedium	248
1.1.2	Zytotoxizität nach 4 h in Kulturmedium.....	254
1.1.3	Zytotoxizität nach 48 h in Kulturmedium	255
1.1.4	Zytotoxizität nach 2 oder 4 h in Kulturmedium mit 100 µg/ml Gallensäuren und pH 6.....	260
1.2	Untersuchung der Stabilität der Substanzen in Zellkultur- und Versuchsmedium.....	264

1.2.1	Stabilität in Zellkulturmedium	264
1.2.2	Stabilität in Versuchsmedium.....	266
2	Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole	268
2.1	Eisen(II)-sulfat	268
2.2	Kontrollen	269
2.3	Probesubstanzen.....	270
2.4	Zeitliche Absorptionsänderung einer 1 mM-Lösung	274
3	Verkürzung der Kulturzeit in Transportversuchen.....	276
3.1	Werte der TEER-Messung der Zellmonolayer an den verschiedenen Versuchstagen der vier Experimente.....	276
3.2	Prozentualer Transport von Lucifer Yellow an den verschiedenen Versuchstagen zur Evaluierung der Monolayerqualität.....	277
3.3	Aktivität der p-GP-Transporter	278
3.3.1	Konzentration und Reinheit der an den jeweiligen Versuchstagen aus CaCo-II-Zellen isolierten RNA zur Bestimmung der p-GP-Aktivität	278
3.3.2	Reaktionseffizienzen und Schmelzpunkte.....	278
3.3.3	Expression von p-GP an den verschiedenen Versuchstagen.....	279
3.4	Vergleich des Rhodamintransportes nach 14 und 21 Tagen.....	280
3.4.1	Permeabilitätskoeffizienten und Ratio für Rhodamin 123 nach 12 und 21 Tagen.....	280
3.4.2	Normalisierung der Permeabilitätskoeffizienten und der Ratios für Rhodamin 123 nach 12 und 21 Tagen.....	281
3.4.3	Permeabilitätskoeffizienten und Ratio für Rhodamin 123 nach 14 und 21 Tagen.....	282
3.4.4	Normalisierung der Permeabilitätskoeffizienten und der Ratios für Rhodamin 123 nach 14 und 21 Tagen.....	283
4	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport	284
4.1	Einfluss auf den Transport von Rhodamin 123 in HBSS	284
4.1.1	P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios in HBSS	284
4.1.2	P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle.....	286
4.2	Einfluss auf den Transport von Rhodamin 123 in HBSS mit 100 µg/mL Gallensäuren und bei pH 6.....	289
4.2.1	P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios in HBSS mit 100 µg/mL Gallensäuren und bei pH 6.....	289
4.2.2	P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle.....	291
4.3	Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin	294
4.3.1	P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios	294

4.3.2	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle	295
4.4	Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten mit den Urolithinen auf den Transport von Rhodamin 123.....	296
4.4.1	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios	296
4.4.2	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle	297
4.5	Einfluss einer fünf Minuten Vorinkubation auf den Rhodamintransport.....	299
4.5.1	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios	299
4.5.2	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle	300
4.6	Vergleich zwischen reinem Rhodamintransport über 60 Minuten und Rhodamintransport unter Substanzinkubation über 60 Minuten	301
4.7	Einfluss der Urolithine auf den Transport von Rhodamin 123 nach Inkubation mit Lipopolysaccharid	302
4.7.1	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios	302
4.7.2	P _{app} -Werte und P _{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle	303
4.8	Permeabilitätskoeffizienten der Kontrollen für die Monolayerqualität Fluorescein und Lucifer Yellow	304
5	Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression des p-GP-Transporters.....	305
5.1	Konzentration und Reinheit der aus CaCo-II-Zellen isolierten RNA zur Entwicklung einer RT-qPCR-Methode	305
5.2	Optimierung der Primerkonzentration.....	305
5.3	Schmelzpunkte und Reaktionseffizienzen	307
5.4	Housekeepinggen - Validierung	308
5.4.1	Konzentration und Reinheit der RNA.....	308
5.4.2	c _t -Werte für die BestKeeper – Auswertung der Referenzgene.....	308
5.4.3	Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper in den CaCo-II-Zellen (n = 20 Proben).....	309
6	Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters.....	310
6.1	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 2 Stunden	310
6.1.1	Konzentration und Reinheit der nach 2 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA.....	310
6.1.2	BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 2 Stunden.....	314
6.1.3	Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 2 h-Inkubation (n= 6 Proben)	322
6.1.4	Relative Expression von p-GP nach 2 h-Inkubation (n= 9)	325

6.2	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 24 Stunden	327
6.2.1	Konzentration und Reinheit der nach 24 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA	327
6.2.2	BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 24Stunden	332
6.2.3	Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 24 h-Inkubation (n= 6 Proben).....	342
6.2.4	Relative Expression von p-GP nach 24 h-Inkubation (n= 9)	347
6.3	Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 48 Stunden	349
6.3.1	Konzentration und Reinheit der nach 48 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA	349
6.3.2	BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 48 Stunden	354
6.3.3	Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 48 h-Inkubation (n= 6 Proben).....	366
6.3.4	Relative Expression von p-GP nach 48 h-Inkubation (n= 9).....	371
E	Zusammenfassung	375
1	Zusammenfassung	376
2	Summary	380
F	Abkürzungsverzeichnis	383
G	Abbildungsverzeichnis	389
H	Tabellenverzeichnis	403
I	Literaturverzeichnis	406

A Einleitung

1 Physiologie des menschlichen Darmtraktes und Prinzip der Arzneistoffabsorption

1.1 Anatomie des Magen-Darm-Traktes

Für die Aufrechterhaltung wichtiger Lebensfunktionen wie Wachstum, Zellerneuerung und Körpertemperatur benötigt der menschliche Organismus Nährstoffe, die über den Verdauungstrakt aufgenommen werden [1, 2]. Die Organe des Verdauungssystems ermöglichen den Abbau der soliden und chemisch komplexen Bestandteile der Nahrung zu einfachen Molekülen sowie deren Aufnahme über das Epithel in den zirkulierenden Blutkreislauf [3]. Der Verdauungstrakt des Menschen umfasst von proximal nach distal als Hauptorgane die Mundhöhle, den Pharynx, den Ösophagus, den Magen, den Dünndarm - bestehend aus Duodenum, Jejunum und Ileum - sowie den Dickdarm mit Zäkum, Kolon und Rektum [3, 4]. Unterstützung erhalten sie durch zahlreiche Hilfsorgane: Den Zähnen, der Zunge und diversen Drüsen, wie Speicheldrüsen, Leber oder Pankreas [3]. In Zusammenarbeit nehmen diese Organe die Nahrung auf, verarbeiten sie mechanisch durch Kauen oder peristaltische Bewegungen, sekretieren aktiv unter anderem Enzyme und verdauen Bestandteile über chemische oder enzymatische Zerlegung komplexer in einfache Moleküle [3]. Diese werden dann über das Epithel resorbiert, Abfallstoffe werden exkretiert, der Speisebrei wird durch Wasserentzug verdichtet und der Fäzes wird aus dem Körper eliminiert [3]. Die Wand des Verdauungssystems ist in allen Abschnitten im Prinzip gleich aufgebaut und besteht von innen nach außen aus Mukosa mit Epithel, Lamina propria und Muscularis mucosae, der Submukosa, der Muskularis mit Ringmuskel- und Längsmuskelschicht und der Serosa (siehe Abbildung 1) [4]. Dieses gemeinsame Bauprinzip weist typische regionale Unterschiede entsprechend der jeweiligen Anforderungen auf [2]. Deren Auskleidung spielt auch eine entscheidende Rolle zum Schutz der Gewebe vor Korrosion durch Säuren oder Enzyme, vor mechanischer Belastung oder vor Pathogenen aus der Nahrung oder von Bewohnern des Verdauungstraktes [3].

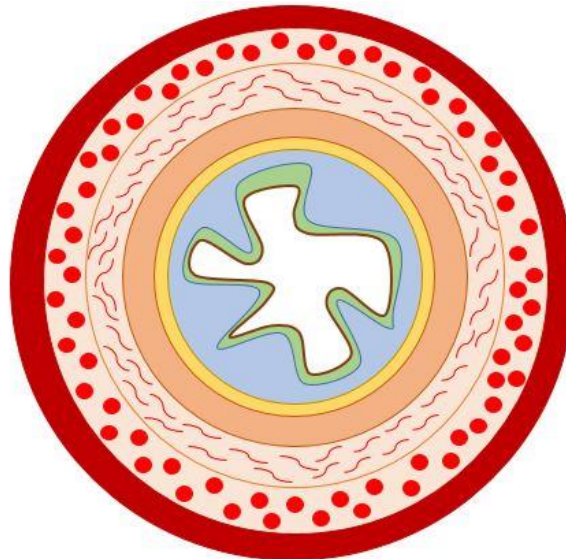


Abbildung 1 Schematischer Wandaufbau im Gastrointestinaltrakt mit den verschiedenen Bereichen und Unterbereichen von innen nach außen: Mukosa und Epithel (braun, grün), Lamina propria (dunkelblau), Muscularis mucosae (blau, gelb), Submukosa (orange), Muskularis mit Ringmuskel- und Längsmuskelschicht (Felder mit Strichen und Punkten) und Serosa (dunkelrot) (modifiziert nach [1, 4]).

Die Mukosa weist die größten regionalen Unterschiede auf und besteht nur im Ösophagus und im Analkanal nicht aus einem einschichtigen Zylinderepithel mit einem Schleimteppich, welches vorwiegend der Resorption und Sekretion dient [3, 4]. In diesen Bereichen ist das Plattenepithel mehrschichtig, um mechanische Belastung und Abrieb zu überstehen [3]. Die Submukosa beinhaltet ein dichtes, geflecht-artiges Bindegewebe mit einem großem Netz an Blut- und Lymphgefäßen für die Mukosa und einem Nervengeflecht, aber auch einige exokrine Drüsen [3, 4]. In der Muskularis ist die glatte Muskulatur in eine innere, zirkuläre Ringmuskel- und eine äußere, longitudinale Längsmuskelschicht gegliedert, welche mit Hilfe von Pendel- und Segmentierungsbewegungen sowie der Peristaltik für die Durchmischung und Weiterbeförderung des Nahrungsbreis verantwortlich sind und somit entscheidenden Anteil bei der mechanischen Verarbeitung und Vorwärtsbewegung haben [3, 4]. Die Motorik ist mit Ausnahme von Nahrungsaufnahme und Defäkation unwillkürlich gesteuert [5]. Bei der Segmentation kommt es zu keiner Bewegung des Inhaltes in eine Richtung, viel mehr wird der Speisebrei geknetet, zerkleinert und mit Verdauungsenzymen gemischt [1, 3]. Als Peristaltik bezeichnet man dagegen die Abfolge wellenförmiger Kontraktionen, die das Material durch die verschiedenen Darmregionen vorwärtsbewegt [1, 3]. Aus dieser Muskelschicht entstehen auch die Sphinkter, die eine Bewegung von Darminhalt zum falschen Zeitpunkt in die falsche Richtung über eine Verengung des Lumens verhindern [3]. Die Serosa dient der Verankerung des Magen-Darm-Traktes mittels Bindegewebe an der Umgebung [4].

Die Magen-Darm-Funktionen gliedern sich in die kephale Phase, bei der über visuelle und gustatorische Reize die Sekretion von Verdauungssäften stimuliert wird, die gastrale Phase, die sich durch Dehnungsreize beziehungsweise chemische Reize auszeichnet sowie die intestinalen Phase, in der der saure Speisebrei zunehmend neutralisiert wird und die Sekrete aus Pankreas und Leber zugegeben werden [5]. Auch der intestinale Blutfluss ist regulatorisch genau geregelt und anpassungsfähig, da er in Ruhe unter körperlicher Aktivität oder nach Nahrungsaufnahme verschieden moduliert wird [5]. Die neuronalen Mechanismen im Verdauungstrakt werden über das enterische Nervensystem gesteuert [2, 4]. Dieses ist mit etwa 100 Millionen Neuronen mit dem Rückenmark vergleichbar und agiert funktional weitestgehend autonom, kann jedoch vom Sympathikus und Parasympathikus moduliert werden [2, 4]. Zudem verfügt der Darm über eine Reihe von enteroendokrinen Zellen, welche durch die Synthese von Darmhormonen essentiell für die Koordination der verschiedenen Funktionsabläufe sind [2, 4]. Darüber hinaus besitzt der Magen-Darm-Trakt mit dem mukosalen Immunsystem ein eigenes Abwehrsystem zum Schutz des Körpers vor Krankheitserregern, welche mit der Nahrung aufgenommen werden [2, 5]. Die Besiedelung mit Bakterien im Dickdarm macht etwa ein Kilogramm an Körpergewicht aus, wobei die Population aus 500 - 1000 verschiedenen Spezies in individueller Zusammensetzung besteht und insgesamt mindestens zehnmals mehr Zellen als körpereigene Zellen aufweist [5]. Sie übernehmen eine Reihe physiologischer Funktionen, die von der Produktion oder dem Verbrauch bestimmter Vitamine über die fermentative Herstellung von kurzkettigen Fettsäuren aus Kohlenhydraten bis hin zu einer gewissen Relevanz bei der Entstehung von Krankheiten reicht [5].

Auf seinem Weg durch den Körper (siehe Abbildung 2) wird die Nahrung zunächst in der Mundhöhle aufgenommen und über diverse Berührungs-, Temperatur- und Geschmacksrezeptoren auf der Zunge analysiert [3]. Auf dem Rücken dieses muskulären, vor allem aus sich kreuzenden Bündeln von Skelettmuskulatur bestehenden Transportorganes sind unterschiedliche Papillen zu finden, die auf der ganzen Zunge für eine Sinneswahrnehmung sorgen [1, 2]. Die Zunge ist es auch, die zusammen mit dem Gaumen und den Zähnen im Kauvorgang, der sogenannten Mastikation, eine mechanische Verarbeitung durchführt [1, 3]. Das Kauen vergrößert die Oberfläche der Nahrung zur besseren Angriffsmöglichkeit für Verdauungssäfte und fördert die Speichelbildung [6]. Dazu dienen drei große Speicheldrüsen und zahlreiche kleine Drüsen, welche unterschiedliche Arten des Mundsaftes produzieren und den Speisebrei über Proteoglykane und Glykoproteine so befeuchten und gleitfähig machen [2, 3, 7]. Mittels Lysozym und Laktoferrin werden Bakterien abgewehrt und über Zusatz von Drüsensekret und Enzymen, wie der Amylase zum Kohlenhydratumsatz, wird eine erste Verdauung durchgeführt [2, 3, 7]. Über diese exokrinen Drüsen werden pro Tag etwa ein bis eineinhalb Liter Speichel zur Erhöhung der Gleitfähigkeit abgegeben [1, 7]. Der Pharynx stellt im Anschluss den gemeinsamen Durchgang für Nahrung, Flüssigkeit und Luft dar [1, 3]. Im Schluckvorgang

wird die willkürlich initiierte bukkale Phase in der Folge von den unwillkürlich und reflexartig einsetzenden pharyngealen und ösophagealen Phasen abgeschlossen, was einen komplexen Vorgang darstellt [1, 3]. Dieser spiegelt sich im anatomischen Aufbau wider, der reich an elastischen Fasern und verschiedenen Muskelgruppen ist [1, 3]. Der Tonsillenring am Übergang der Mundhöhle zum Rachen bildet eine erste Abwehrfunktion im Verdauungstrakt für Krankheitserreger und soll diese mit seinem lymphatischen Gewebe frühzeitig erkennen [1].

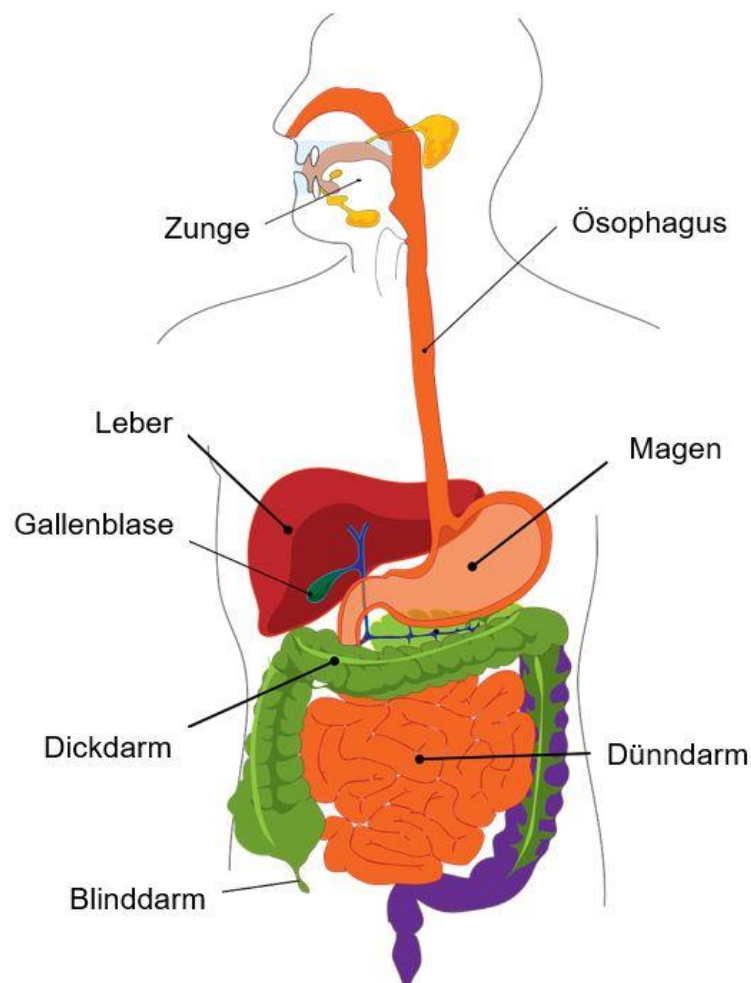


Abbildung 2 Schematischer Aufbau des menschlichen Verdauungstraktes (modifiziert nach [8]).

Der Aufbau des Ösophagus mit seinen Längsfalten für hohe Elastizität entspricht seiner hohen mechanischen Beanspruchung durch vorbeigleitenden Speisebrei mit einer muskulösen Bauweise und einer stabilen Verzahnung der Schichten durch Bindegewebe [3, 4]. Dieser muskuläre Schlauch ist etwa 25 Zentimeter lang und führt den Nahrungsbrei von der Mundhöhle durch eine Lücke im Peritoneum in den Magen [2, 3]. Dort wird die Nahrung gespeichert, mechanisch und chemisch aufbereitet und zu einem

viskosem, sehr sauren Brei, dem Chymus, portioniert [3, 4]. Seine Ausdehnung ist ausgehend von Mageneingang und -ausgang als Fixpunkte variabel und hängt von Faktoren wie Füllungszustand und Magenform ab [7], sodass der Innendruck sich trotz Volumenerhöhung kaum steigert [6]. Das schleimbildende Oberflächenepithel und die Magendrüsen, bestehend aus drei verschiedenen Arten sekretorischer Zellen, die in unterschiedlichen Regionen des Magens unterschiedlich ausgebildet werden, produzieren gemeinsam den stark sauren Magensaft, welcher unter anderem wichtige Hormone, Intrinsic Factor zur Vitamin B12 Resorption, Salzsäure und eine Reihe von Enzymen enthält, aber auch zur Abwehr von Bakterien dient [1-4]. Vor diesem aggressiven Cocktail aus eiweißspaltendem Enzym und Säure schützen sich die Magenzellen mit Hilfe einer Schleimschicht sowie einer hohen und kontinuierlichen Teilungsrate, wodurch die Zellen stetig ersetzt werden [1-3]. Der Dünndarm widmet sich der Verdauung und Resorption von Nährstoffen, welche zunächst im Lumen enzymatisch gespalten werden und deren Einzelbausteine letztlich an der Oberfläche der Schleimhaut freigesetzt und resorbiert werden [4]. Im oberen Dünndarmabschnitt werden dem Speisebrei die Produkte aus den Hilfsorganen des Verdauungssystems zugesetzt und so durch alkalischen Schleim sowie neutralisierenden Pankreassaft abgepuffert [2, 3]. Die Leber produziert Gallenflüssigkeit, welche die Verdauung und Resorption von Fetten sowie fettlöslichen Vitaminen erleichtert und die in der birnenförmigen Gallenblase gespeichert und aufkonzentriert wird [2, 3]. Der Pankreas sekretiert als exokrine Drüse eine ganze Reihe von wichtigen Verdauungsenzymen und puffernden Substanzen sowie als endokrine Drüse eine Vielzahl von essentiellen Hormonen [2, 3]. Der etwa eineinhalb Meter lange Dickdarm verfügt in der Mukosa über keine Zotten, sondern lediglich Krypten [3, 4]. Die Resorption beschränkt sich zu einem großen Teil auf Salze und Wasser, aber auch auf wichtige, von Bakterien hergestellte Vitamine, was neben der Verdichtung des Darminhaltes und der Lagerung des Stuhls vor der Defäkation, die Hauptaufgabe darstellt [3, 4].

1.2 Aufbau des Dünndarms und Morphologie der Zellen

Der Dünndarm des Menschen mit seiner durchschnittlichen Länge von sechs Metern und einem Durchmesser von zweieinhalb bis vier Zentimetern liegt als selektive, physikalische Permeabilitätsbarriere zwischen der Umwelt und der systematischen Zirkulation [3, 4, 9, 10]. Er gliedert sich mit dem kurzen Duodenum, in dem der saure Chymus aus dem Magen und Verdauungsenzyme sowie neutralisierende Sekrete aus Leber und Pankreas zusammenkommen, dem Jejunum, wo ein Großteil der chemischen Verdauung und Nährstoffresorption stattfindet und dem langen Ileum in drei Abschnitte [2, 3]. Um seiner Hauptaufgabe der Resorption effizient nachgehen zu können, ist sowohl der makroskopische als auch der mikroskopische Aufbau im Dünndarm auf maximale

Oberflächenvergrößerung ausgelegt [7]. Mit einer großen Anzahl von Villi und Mikrovilli hat er eine einzigartige Morphologie [1, 10, 11]. Nach Berechnungen kann man von einer Oberfläche von bis zu 200 Quadratmetern, also einer etwa 600-fachen Vergrößerung durch vorher genannte Strukturen, ausgehen [2, 4, 12]. Diese Flächenerweiterung wird auch durch sogenannte Ringfalten, einer regionalen Besonderheit des Dünndarmes, erreicht, welche von Mukosa und Submukosa gebildet werden, circa einen Zentimeter in das Lumen ragen und quer zur Längsachse verlaufen [2, 4]. Der Dünndarm hat neben der Hauptfunktion der Verdauung und der Absorption von Ernährungsbestandteilen, wie Zuckern, Aminosäuren oder Lipiden, als semipermeable Membran die Aufgabe die Aufnahme von Xenobiotika, Verdauungsenzymen, Toxinen oder Bakterien zu limitieren [9, 13, 14]. Neben dieser Funktion als physikalische Barriere und der Sicherstellung einer effektiven Nahrungsaufnahme sind die Produktion von Mukus mit antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen zur Immunregulation von zentraler Bedeutung [10]. Die intestinale Flüssigkeit ist nicht homogen im Darm verteilt, sondern ist in zahlreichen sogenannten Wassertaschen im Dünndarm zu finden [12]. Des Weiteren variiert dieses Milieu abhängig von vielen Faktoren, wie Ernährungszustand, Art der Nahrung oder Krankheiten, was in Verbindung mit veränderlichen Parametern wie Gallensäuren oder pH-Wert die Absorption von Substanzen stark beeinflussen kann [12]. Zur Sicherung seiner vielfältigen Funktionen verfügt er über Strukturen und Zellen mit speziellen Charakteristiken. Der Absorptionsort, die intestinale Mukosa, besteht aus drei Schichten: der muskulären Mukosa, der Lamina Propria und der epithelialen Zellschicht (siehe Abbildung 3) [9, 15]. Lediglich die einzellige Epithelschicht bildet die Aufnahme und Transport limitierende Barriere im menschlichen Darm [10, 15].

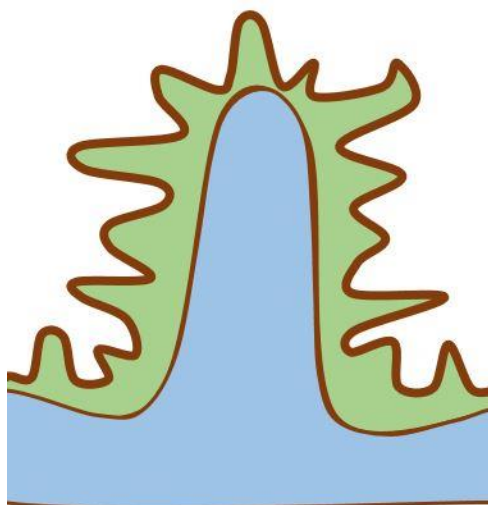


Abbildung 3 Schematischer Aufbau der intestinalen Mukosa mit den ungleichmäßig angeordneten und geformten Villi von innen nach außen: Epithelzellschicht (braun), Lamina propria (grün) und muskuläre Mukosa (blau) (modifiziert nach [7]).

Die muskuläre Mukosa mit einer Dicke von drei bis zehn Zellen befindet sich an der Grenze zwischen Mukosa und Submukosa und sorgt mit ihren durchgehenden, zirkulären und longitudinalen Muskeln für die Kontraktion und damit Entleerung der Kryptenbereiche [9, 15]. Die Lamina Propria ist das Verbindungsgewebe zwischen dem Epithel und der Basalmembran im Inneren der Villi und umgibt die Krypten [4, 9, 15]. Dieser Bereich ist für die Immunabwehr essentiell, da eine Vielzahl an Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen für die Immunantwort vorhanden sind [4, 9]. Sie verleiht darüber hinaus den Epithelzellen strukturelle Unterstützung und kann mit ihren Kapillaren diese Zellen ernähren und aufgenommene Stoffe der systemischen Zirkulation zuführen [3, 9]. Die Epithelzellschicht als mechanische Barriere ist ein heterogener Monolayer, der aus absorptiven Zellen, undifferenzierten Zellen, endokrinen Zellen zur Hormonproduktion, Gobletzellen für die Mukusproduktion und Panethzellen zur Sekretion von antimikrobiellen Peptiden besteht [9, 10, 15]. In der Lamina Propria kommen noch weitere Zelltypen vor, deren Funktion noch nicht genau bekannt ist, jedoch entstehen alle diese unterschiedlichen Zellen in den Krypten als undifferenzierte Zellen und bekommen erst auf der Wanderung entlang der Krypten-Villi-Achse ihre letztliche Funktion [3, 9, 16]. Allgemein unterliegt das intestinale Epithel einer hohen Teilungsrates und erneuert sich alle fünf bis sieben Tage komplett durch die Abstoßung apoptotischer Enterozyten in das Darmlumen [2, 4, 10]. Jede Krypte besteht aus ungefähr 250 Zellen und genauso viele werden jeden Tag neu gebildet, was der stetigen Zellerneuerung aus multipotenten Stammzellen dient [4, 10]. Die Kombination aus Krypten und Zotten ist ein typisches Merkmal der Mukosa [4]. Die Zotten sind bis zu einem Millimeter hohe fingerförmige Erhebungen, die zum großen Teil der Resorption dienen und gemeinsames Merkmal der kompletten Dünndarmschleimhaut sind [2-4].

Das Epithel im kompletten Verdauungstrakt ist mit einer hochviskosen Mukusschicht, eine komplexe gelartige Substanz, überzogen, die antimikrobielle Peptide und IgA-Antikörper zur Neutralisation von pathogenen Stoffen enthält [4, 10, 17]. Der Mukus spielt damit in der Immunabwehr des Körpers eine große Rolle. Darüber hinaus schützt er die Schleimhaut vor mechanischen Schäden und Wasserverlust zur Bewahrung der Zellintegrität [17]. Hauptbestandteil ist Mucin, was aus Proteoglycanen aufgebaut ist und den direkten Kontakt zwischen dem luminalen Mikrobiom und den Epithelzellen reduziert [10]. Im Darm gibt es zwei Arten der Mukusorganisation, da er im Dünndarm nur ein einschichtiges, im Dickdarm aber ein zweischichtiges System ist [4, 10]. So wird dieser Ort für die höhere Konzentration an Darmmikroben noch impermeabler gemacht [4, 10].

Die Epithelzellschicht besteht vor allem aus Zellen, die hoch polarisiert sind und die Absorption, unter anderem auch von pharmakologischen Substanzen, als Hauptfunktion haben [9, 11]. Charakteristisch ist die Ausbildung von etwa 3000 Mikrovilli, dem sogenannten Bürstensaum, auf der apikalen Fläche jeder Zelle, um die Resorptionsfläche

entscheidend zu vergrößern [1-3]. Die eng gepackten Mikrovilli haben eine Länge von 0,5 - 1,5 Mikrometer und einer Breite von 0,1 Mikrometer und die apikale Fläche hat eine Dicke von 10 - 11 Nanometer [9]. Die Membran der Mikrovilli trägt eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme für Peptide und Oligosaccharide sowie Transportsysteme für Aminosäuren und Zucker [2]. Eine spezielle Struktur dieser Seite ist die Glycocalyx aus schwach sauren Sacchariden, welche von den absorptiven Zellen synthetisiert wird, direkt an die Zellmembran gebunden ist und sich histochemisch vom Mukus unterscheidet [9]. Die sieben Nanometer breite basolaterale Membran unterscheidet sich von der apikalen Seite in Morphologie, biochemischer Zusammensetzung und Funktion [9]. Hier sind die Zellnachbarn auch räumlich getrennt, was im Umfang von der Lokalisation der Zellen an der Krypten-Villi-Achse und dem Hydratationsstatus abhängt [9]. Transporter für Aufnahme und Abgabe von Stoffen in oder aus der Zelle sind sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Seite lokalisiert und bilden ein großes Hindernis für die intestinale Absorption [11]. Daneben ist sicherlich die Aufrechterhaltung der Diffusionsschranke zwischen Lumen und damit der Außenwelt und dem Körperinneren essentiell [4]. Diese Epithelschicht erlaubt einen regulierten Transport von gelösten Molekülen über den parazellulären Weg und ist für bakterielle Metaboliten oder verdaute Nahrungsbestandteile selektiv permeabel [4, 10]. Die Zellen trennen das intestinale Lumen auf apikaler Seite von gut durchbluteten, basolateralen Gewebe und werden über Zellverbindungen, den Tight-junctions, intermediären Junctions oder Desmosomen, zusammengehalten [10-12]. Neben den Tight-junctions als Verschlusskontakte und den Desmosomen als Beispiel für Haftkontakte, gibt es noch die sogenannten Gap-junctions als Kommunikationskontakte (siehe Abbildung 4) [4, 18].

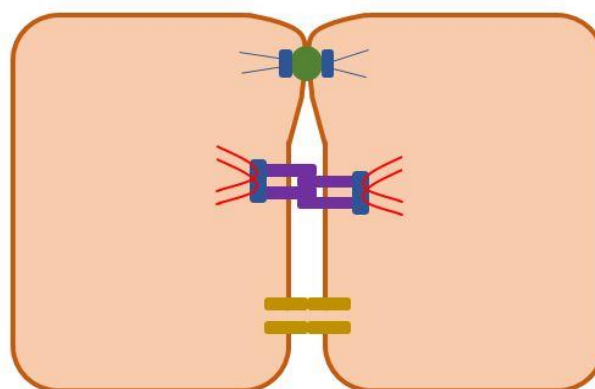


Abbildung 4 Schematische Darstellung von Verbindungen zwischen zwei Zellen von oben nach unten: Tight-junctions als Verschlusskontakte (grün/blau), Desmosomen als Haftkontakte (lila/blau/rot) und Gap-junctions als Kommunikationskontakte (gelb) (modifiziert nach [4]).

Vor allem bei den Haftkontakten kommt es an der Innenseite der Plasmamembran zu Verdichtungszone an denen Verbindungen zum Zytoskelett ausgebildet werden [4].

Desmosomale Strukturen wurden vor allem in mechanisch gestressten Geweben gefunden [19]. Sie dienen der Stabilität und ermöglichen eine Zell-Zell-Kommunikation durch Signaltransmission [19]. Tight-junctions stellen unter den Zellverbindungen die größten Diffusionsbarrieren dar, ihre Tiefe und Dichte variiert innerhalb verschiedener Darmabschnitte oder Zelltypen [2, 9]. Sie befinden sich in den apikalen Membranen, sind in Strängen organisiert und beeinflussen die parazelluläre Permeabilität durch Verbindung benachbarter Epithelzellen [20]. Sie sind 0,5 – 2 Nanometer breit und eliminieren den interzellulären Raum über eine variable Distanz [9]. Die Verbindungen bestehen aus Transmembranproteinen, die extrazellulär mit der nächsten Zelle und intrazellulär mit dem Zytoskelett interagieren [10]. Der multimolekulare Komplex kann in drei Gruppen unterteilt werden. Das integrale Protein dient zur Überbrückung des interzellulären Raumes und als Permeabilitätsbarriere [18, 21]. Plaqueproteine verbinden das integrale Protein mit dem Zytoskelett und sind wichtig für die Zellsignale [18, 21]. Zuletzt eine Gruppe von zytosolischen und nukleären Proteinen zur Koordination diverser Funktionen wie Zellpolarität oder Proliferation [18, 21]. Die am weitesten apikal liegende Tight-junctions verbindet benachbarte Plasmamembranen mit einer gürtelförmigen Zone über die Proteine Claudin und Occludin als Kernelemente so dicht, dass der Interzellulärspalt komplett versiegelt ist und sie als eine Art „Torwächter“ agieren [4, 18]. Sie führen aber auch eine Zaunfunktion aus, die das Durchmischen von Transmembranproteinen der apikalen mit der basolateralen Seite verhindert [22]. Claudin und Occludin bilden den Kern der Tight-junctions und kontrollieren die Ionenselektivität und die Permeabilität zwischen adhären Zellen [22]. Einige Mitglieder der Claudinfamilie erhöhen die Barrierefunktion, andere dagegen induzieren parazelluläre Kanäle [20]. So konnte durch Studien bereits gezeigt werden, dass das Flavonoid Quercetin in der Lage ist, über Hochregulation der Expression von Claudin-4 den transepithelialen Widerstand und somit die Barrierefunktion zu erhöhen [20].

Die epithelialen Tight-junctions sind ein wichtiges Strukturelement für die intestinale Barriere, Störungen in diesem Bereich werden mit einigen Krankheiten, die den Magen-Darm-Trakt betreffen, assoziiert [20]. Eine Störung der intestinalen Tight-junction-Barriere und folglich ein Durchgang von noxischen Molekülen, induziert das mukosale Immunsystem und eine Inflammation [10]. Diese können als Trigger für die Entwicklung intestinaler oder systemischer Krankheiten dienen, da es zu einem Gewebeschaden kommt [10]. In vielen Studien konnte ein Zusammenhang einer Störung in diesem Bereich mit Autoimmun- oder entzündlichen Erkrankungen gezeigt werden [10].

2 Arzneistofftransport im Darm

2.1 Transportvorgänge an Biomembranen

Die Absorption über die intestinale Membran stellt einen komplexen Prozess mit einer Vielzahl von Wegen dar [23]. Die wesentlichen treibenden Kräfte dahinter sind der Konzentrationsgradient, ein Unterschied an elektrischen Potentialen und ein hydrostatischer Druckgradient [9]. Der Permeabilitätswiderstand in diesem Bereich besteht aus physikalischen und biochemischen Barrieren [9]. Erstere wird hauptsächlich von den Tight-junctions, welche den parazellulären Transport nahezu verhindern, und dem Lipidcharakter der Membran bestimmt [9]. Das biochemische Hindernis bilden die zahlreichen metabolischen Enzyme in der Membran und die Effluxtransporter [9]. Diese Transmembranproteine haben Anschluss an beide Seiten der Membran, da sie durch die komplette Lipiddoppelschicht führen [4]. Im Allgemeinen gibt es an der intestinalen Mukosa als selektive Permeabilitätsbarriere für den Transport vier verschiedene Möglichkeiten: der passiv, lipophile transzelluläre oder der passiv, wässrige parazelluläre Weg sowie der carrier-vermittelte Transport und die Transcytose (siehe Abbildung 5) [9, 11, 24, 25].

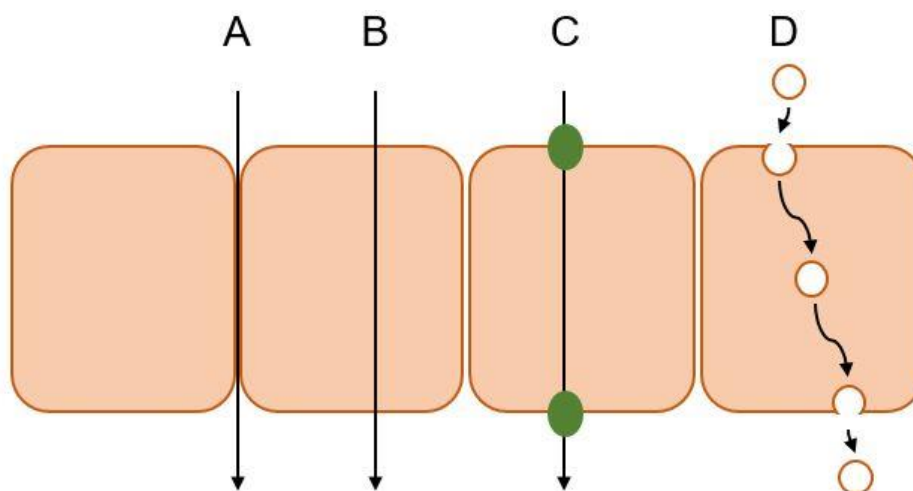


Abbildung 5 Schematische Darstellung der möglichen Transportwege über eine Epithelzellschicht mit passivem transzellulärem Weg (A), der passiven parazellulären Route (B), dem carriervermittelten, erleichterten Transportweg (C) und der Transcytose (D) (modifiziert nach [26]).

Als Diffusion wird allgemein der Transport eines Stoffes aufgrund der zufälligen thermischen Bewegung seiner Moleküle und Ionen bezeichnet [6]. Für den größten Teil an Arzneistoffen ist die passive Diffusion, welche vor allem über einen Konzentrationsgradienten angetrieben wird, der wichtigste Transportmechanismus [25, 27]. Allerdings hängt sie auch von der Permeabilität der Membran für die entsprechenden Teilchen sowie

der vorhandenen Absorptionsoberfläche ab [5, 6]. Der Zusammenhang dieser Parameter wird über das Fick'sche Diffusionsgesetz für Biomembranen hergeleitet und definiert (siehe Formel 1).

$$D = P \times A \times (\Delta c / d)$$

Formel 1

D	=	Diffusionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol/s}$]
P	=	Permeabilitätskoeffizient [cm/s]
A	=	Fläche der Membran [cm^2]
Δc	=	Konzentrationsänderung [$\mu\text{mol/cm}^2$]
d	=	Schichtdicke [cm]
$\Delta c / d$	=	Konzentrationsgradient [$\mu\text{mol/cm}^3$]

Aber auch pH-Variationen können im Hauptaufnahmeort - dem Dünndarm - einen Einfluss haben [12, 17], wodurch der pK_a -Wert der Substanzen eine wichtige Rolle spielen kann [28]. Im oberen, eher sauren Teil des Dünndarmes liegen schwache Säuren primär nichtionisiert vor und der passive transzelluläre Weg spielt die Hauptrolle [23]. Dagegen sind schwache Basen oft ionisiert und der transzelluläre Weg hat eine untergeordnete Rolle [23]. Diese Möglichkeit wird auch vorrangig in der Arzneistoffentwicklung optimiert, obwohl im Verdauungstrakt der Arzneistofftransport viele Mechanismen involviert sind [29]. Die Absorption hängt jedoch nicht alleine von der epithelialen Permeabilität ab. Entscheidend sind auch stoffspezifische Eigenschaften, wie die Löslichkeit, welche sich über die allgemeine Löslichkeitsformel bestimmen lässt, oder die Formulierung der Substanz sowie der präsystemische oder systemische Metabolismus, als größte Einflüsse auf die Transportrate [24, 25]. Als stoffspezifische Eigenschaften spielen darüber hinaus die Lipophilie und damit die Fähigkeit mit der Plasmamembran zu interagieren, die Polarität und Ladung, die Molekülgröße sowie das Molekulargewicht und die Stabilität eine große Rolle [10, 25]. Vor allem die schlecht kompatible Lipophilie ist für die Wechselwirkung mit der Membran und der Möglichkeit mit Transportern zu interagieren oftmals der limitierende Schritt [29, 30]. Jedoch sollte diese für eine Substanz nicht zu hoch sein, da ansonsten eine Abgabe aus der Plasmamembran ins Zytosol oder das interstitiale Fluid behindert ist [31]. In den Lipinski Regeln wurden auch Eigenschaften festgelegt, die stoffbezogen die Absorption beeinflussen können: die Lipophilie, die Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren und -akzeptoren sowie das Molekulargewicht [32]. Diese Regeln schaffen für die Arzneistoffentwicklung kleiner Moleküle eine Grundlage zur Vorhersage der passiven

Diffusion durch Membranen auf Basis der Identifikation von Schlüsselparametern, wie der Polarität, der Größe und der Lipophilie [33]. In Bezug auf die Größe sollte beispielsweise bei Peptiden ein hydrodynamischer Radius definiert werden, da hier über Wasserstoffbrückenbindungen der wässrige Anteil um das Molekül eine Rolle spielt [25]. In vivo beeinflussen weitere Parameter, die nicht direkt mit dem Molekül assoziiert sind, die Aufnahme und den Transport [10]. Intestinale Motilität, Interaktionen mit anderen Molekülen aus der Nahrung oder Verdauungsprozessen, wie Gallensäuren oder Enzyme, und die Löslichkeit im Mukuslayer modulieren dabei den Prozess [10, 17]. Die Entleerung des Magen-Darm-Traktes kann auch durch verschiedene Umstände, wie sportliche Aktivität oder Schmerzen, erhöht beziehungsweise erniedrigt sein und so verändert sich unter Umständen auch die Absorption des gleichen Arzneistoffes von Zeit zu Zeit [17]. Ebenso ist die Beschaffenheit der Membran hinsichtlich der Anwesenheit von Wasserporen und einer statischen Diffusionsschicht von Bedeutung [25].

Der passive transzelluläre Weg beinhaltet die Bewegung von gelösten Molekülen über die apikale Membran, durch das Zellzytoplasma und durch die basolaterale Membran und ist darüber hinaus in jeder Membran jeweils selbst ein dreiteiliger Prozess aus Penetration in die Membran, die Diffusion hindurch und die Abgabe ins Zytosol oder in den extrazellulären Raum [9, 33]. Dieser Weg wird getrieben vom elektrischen und konzentrationsabhängigen Gradienten und erfordert keine Energie [33]. Für diese Route kommen lipophile, kleine und leicht membrangängige Stoffe in Frage, die über gute Diffusionseigenschaften verfügen [9, 10, 17]. Hierbei spricht man von einfacher Diffusion [6]. Jedoch sind auch kleine polare Moleküle, wie Ethanol, in der Lage diesen Weg zu bestreiten [33]. Auch Gase zählen zu diesen membrangängigen Stoffen und diffundieren entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten einfach durch die Plasmamembran hindurch ohne von ihr behindert zu werden [4]. Da mit 99,9 Prozent Membranoberflächenanteil diese Transportroute deutlich bedeutsamer ist als die parazelluläre, kann davon ausgegangen werden, dass in einem Großteil der Fälle für Arzneistoffe nur diese Möglichkeit in Frage kommt und dass die meisten oral applizierten Substanzen hierüber aufgenommen werden [9, 24]. Es ist somit die Hauptroute für die intestinale Absorption [34]. Jedoch kann es zu einer Verzerrung der Absorption wegen Aufnahme- und Effluxtransportern kommen, da die Aufnahme mancher Substanzen durch deren Anwesenheit höher oder niedriger eingeschätzt wird, als ihre intrinsischen Membranpermeabilitätseigenschaften vermuten lassen [9].

Der parazelluläre Weg ist eine wässrige und extrazelluläre Route über das Epithel [9]. Treibende Kraft für die Diffusion sind elektrochemische Potentialgradienten, die aufgrund von Unterschieden in Konzentration, elektrischem Potential und hydrostatischem Druck auf den beiden Membranseiten entstehen [9]. Hydrophile und damit weniger lipophile Stoffe werden sehr unwahrscheinlich über die Membran aufgenommen, da sie mit deren lipophilen Bestandteilen schlecht interagieren können, weswegen für sie der parazelluläre passive

Weg bevorzugt ist [24, 34, 35]. Dieser Weg wird maßgeblich durch die Molekülgröße beeinflusst, da die wässrigen Poren der Tight-junctions nur eine begrenzte Größe vorweisen und lediglich kleine Moleküle passieren können [25]. Im Allgemeinen sollte das Molekulargewicht unter 200 liegen, um die parazelluläre Route nutzen zu können, aber auf jeden Fall 300 Da nicht überschreiten [12, 25]. Die geringe Effizienz über diese Route wird von diesen einschränkenden Zellverbindungsproteinen bestimmt [9, 24, 35]. Allerdings haben Studien gezeigt, dass sich diese limitierende Barriere auch regulieren lässt [9, 24, 35]. Komplexe intrazelluläre Prozesse können die Permeabilität über Tight-junction-Regulation steuern [10, 17]. Auch wegen seinem niedrigen Oberflächenanteil von 0,01 Prozent spielt dieser Weg in der Stoffabsorption eine sehr untergeordnete Rolle [9]. Ferner scheint dieser parazelluläre Weg für Wasserbewegungen im Darm eine Rolle zu spielen, da die Aufnahmetransporter, wie die Aquaporine in den Nierentubuli, fehlen [13, 35]. Aquaporine dienen der passiven Diffusion von vor allem Wasser, aber auch Gasen oder anderen kleinen gelösten Molekülen wie Harnstoff oder Glycerol [33].

Die Dünndarmmukosa ist in der Lage, eine große Anzahl an Absorptionstransportern zu bilden (siehe Abbildung 6), welche nicht nur für die Aufnahme von Nahrungsmittelbestandteilen und Vitaminen verantwortlich sind, sondern auch den Arzneistofftransport modulieren können [9, 10].

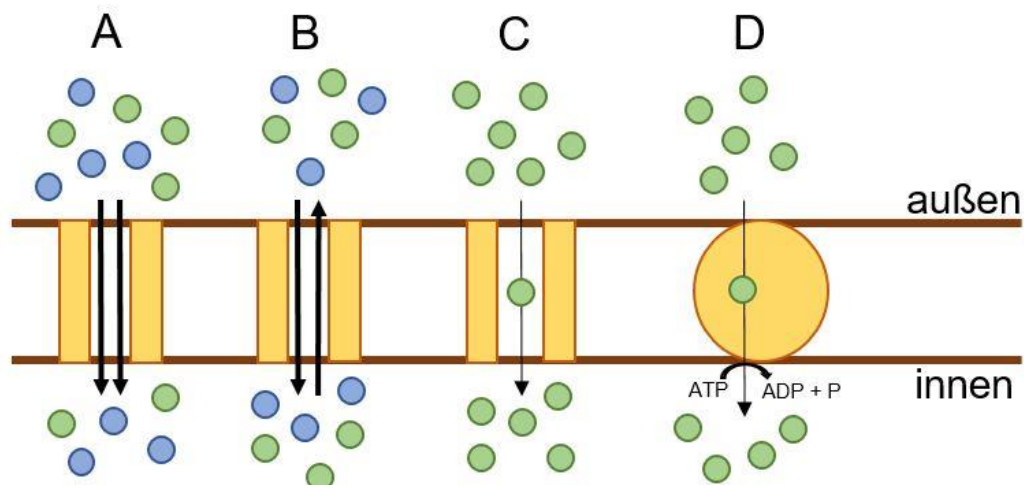


Abbildung 6 Schematische Darstellung von vier möglichen erleichterten Transportwegen über eine Biomembran mit Symport (A), Antiport (B), erleichtertes Diffusion (C) und einem primär aktiven Transport unter Verbrauch von ATP (D) (modifiziert nach [26]).

Zum einen setzen aktive Transporter Energie zum Transfer von Substraten gegen deren Konzentrationsgradienten ein, zum anderen erlauben passive Transporter Transmembrandiffusion ohne Energieeinsatz [33]. Bei den zuletzt erwähnten spricht man dann von einer

erleichterten Diffusion, da impermeable Teilchen ohne diese spezifischen Transportproteine nicht durch die Membran diffundieren könnten [6]. Für Ionen gibt es einmal für die passive Diffusion Ionenkanäle, welche hoch spezifisch aber auch abhängig von Stimuli wie Licht, Liganden oder mechanischem Stress sind [33] oder sie werden aktiv über Ionenpumpen in Sym- beziehungsweise Antiport bewegt [33]. Symport bezeichnet den Transport aller Stoffe in dieselbe Richtung, Antiport funktioniert dagegen in entgegengesetzte Richtungen [6]. Zucker, Aminosäuren oder Peptide sind Moleküle von mittlerer Größe und hoher Polarität und werden entweder über sekundär aktiven Transport, der die Energie aus dem elektrochemischen Gradienten eines anderen gelösten Stoffes nutzt, transportiert oder haben spezielle, eigene Transporter, wie den Oligopeptidtransporter [33]. Diese Transportproteine haben ein hohes Potential Arzneistoffe bei Strukturgleichheit über die intestinale Membran zu bringen und durch Bindung der gelösten Substanz diese durch die apikale Membran in den Blutstrom zu schleusen [9, 36]. Ahmen hydrophile Arzneistoffe die chemische Struktur von Nahrungsbestandteilen nach oder handelt es sich um Peptide, können sie über den carrier-vermittelten Weg transportiert werden [9, 24]. Da die Plasmamembran für derartige Substanzen selektiv durchlässig ist, würden geladene oder rein hydrophile Moleküle ohne Transporter ansonsten kaum aufgenommen werden [4]. Somit werden die Substanzen gegen einen Gradienten mit Hilfe einer Konformationsänderung der Transporter und unter Verbrauch von ATP transportiert [4]. Substrate dieser Transporter zeigen eine höhere intestinale Absorption als man aus ihren Diffusionseigenschaften über Zellmembranen erwarten würde [9, 36]. Jedoch können Effluxtransporter, als gastrointestinale Absorptionsbarriere über Exkretion zurück in das Darmlumen, auch gegenteilige Effekte haben [9, 36]. Charakteristisch für diese Route ist die Sättigbarkeit der Transportproteine: kein dauerhafter Anstieg des Transportes, sondern eine Abnahme der Absorption ab einem gewissen Zeitpunkt, was vor allem für hohe Dosen eines Arzneistoffes eine Rolle spielt [12, 24, 29]. Im Gegenzug steigt die Bioverfügbarkeit des Stoffes wieder an, sobald der Efflux gesättigt ist [37, 38]. Dies kann man beispielsweise über die Bestimmung der Efflux-Ratios zeigen, wenn die gleiche Substanz, zum Beispiel Quinidin, in verschiedenen verwendeten Konzentrationen auch unterschiedliche Werte zeigt [23]. Daneben zeichnet die aktiven Transportmechanismen eine gewisse Spezifität für bestimmte Substanzgruppen, eine unterschiedliche Affinität der Substanzen zum Transportsystem und eine folglich kompetitive Hemmung sowie die Notwendigkeit einer Energieversorgung aus [6]. In diesen Bereich zählt ebenso der aktive Effluxtransport durch p-Glykoprotein oder weitere Proteine (siehe Tabelle 1) dieser Familie, welcher einen Schutzmechanismus der Zelle vor Xenobiotika darstellt und durch ein Zusammenspiel vieler Proteine die Absorption mindert [9, 23, 24]. Hier werden Stoffe von der serosalen zur mucosalen Seite und vom Zytoplasma ins Lumen transportiert, also auf dem entgegengesetzten Weg [9, 24]. Manche Arzneistoffe, wie Talinolol oder Paclitaxel, werden so bei niedriger Dosis schlecht absorbiert, da sie von p-GP kontinuierlich in das

Lumen zurückgepumpt werden [39]. Steigert man die orale Dosis, treten die oben beschriebenen Sättigungseffekte ein, der absorptionslimitierende Effekt wird weniger dominant, die passive Diffusion wird gesteigert und die aufgenommene Fraktion des Stoffes erhöht sich [39].

Tabelle 1 Beispielhafte Übersicht der beiden Familien aus der ATP-binding cassette (ABC)-Superfamilie, die unter anderem für den apikalen Arzneistoffefflux verantwortlich sind. Die Familie multidrug resistance (MDR) mit den Beispielen p-Glykoprotein (p-GP) und breast cancer resistance protein (BCRP) und ihrem jeweiligen Vorkommen sowie exemplarischen Funktionen. Ebenso die Familie multidrug resistance associated protein (MRP) mit Transporterbeispielen und Vorkommen sowie Funktion [9, 11, 40].

Familie	Transporter	Vorkommen	Funktionen
MDR	ABCB1/MDR1 (p-GP)	Enterozyten, Leber, Niere, Blut-Hirn-Schranke	apikale Effluxfunktion, Sekretion von Zytokinen, Ionentransport, Transport von Steroidhormonen
	ABCG2 (BCRP)	Enterozyten, Brust, Plazenta	Apikale Effluxfunktion von Konjugaten, Abwehrmechanismus in der Plazenta, Extraktion in die Muttermilch
MRP	MRP1, MRP2/cMoat, MRP3	Duodenum	apikale Effluxfunktion, Transport organischer Anionen
	MRP1, MRP3, MRP 5	Kolon	apikale Effluxfunktion, Transport organischer Anionen

Aufgrund der Limitierung der Permeabilität über intestinale Enzyme, wie beispielsweise der Di-/Tripeptidtransporter (PEPT1), können Enterozyten die Absorption auch über vesikuläre Transportprozesse steuern [9]. Der transcytotische Weg stellt aufgrund seiner geringen Kapazität eine wenig attraktive Möglichkeit für Arzneistoffabsorption dar und wird nur für hoch potente Stoffe, die von allen anderen Routen wegen ihrer Größe für die Diffusion ausgeschlossen sind, in Betracht gezogen [9, 24]. Makromoleküle können an Rezeptoren an der Zellmembran binden und werden als Rezeptor-Ligand-Komplex in einem Vesikel endozytiert, an den Lysosomen vorbei geschleust und über die basolaterale Membran heraus transportiert [9, 10]. Der Nachteil an Vesikeln ist, dass diese eine hohe Konzentration an proteolytischen Enzymen enthalten, was zu einem Abbau exogener Stoffe auf dem Weg durch die Zelle führt oder über die Bindung an Lysosomen die Substanzen entsorgt werden [9, 24].

Im Wesentlichen sind zwei Parameter für die intestinale Arzneistoffabsorption, welche organabhängig und nicht stoffspezifisch wie die Löslichkeit sind, entscheidend: die Permeabilität über die epitheliale Mukosa und die gastrointestinale Transitzeit [9]. Nur Erstere lässt sich mit in vitro Modellen evaluieren [9].

2.2 Lokalisation und Funktionsweise von Arzneistofftransportern

Der Gastrointestinaltrakt bildet noch vor der Immunabwehr im Blutkreislauf sozusagen eine Art erster Verteidigungslinie des Körpers gegen orale Exposition mit Fremdstoffen, Toxinen oder Arzneistoffen [41]. Hier sind Membrantransporter die Haupteinflussfaktoren auf die Absorption, die Distribution und die Elimination der meisten gebrauchten Arzneistoffe [42] und stellen häufig den Ort von Arzneistoffinteraktionen dar [43]. Die schlechte orale Bioverfügbarkeit von einer Vielzahl an Arzneistoffen kann verschiedene Gründe haben. So gibt es auf der einen Seite physiko-chemische Probleme, wie eine schlechte Löslichkeit in der gastrointestinalen Flüssigkeit [44], von der im Darm circa 0,25 bis 0,5 Liter zur Verfügung stehen [45], oder die entsprechenden Eigenheiten der Arzneistoffformulierung sowie physiologische Bedingungen [11]. Auf der anderen Seite spielt ein möglicherweise ausgeprägter First-Pass Metabolismus eine Rolle [44]. Darüber hinaus bildet die sogenannte Multi Drug Resistance (MDR), welche erstmalig 1968 in der Krebstherapie beschrieben wurde, ein weiteres großes Problem in der Pharmakotherapie von diversen Krankheiten, wie beispielsweise HIV [40, 46]. Sie beschreibt das Phänomen der gleichzeitigen Kreuzresistenz gegen verschiedene, strukturell wie funktionell unterschiedliche Arzneistoffe [40, 47, 48]. Somit ist sie ein wichtiger Faktor für ein Therapieversagen [49]. Diese Resistenz besteht aus vielerlei Mechanismen, wie Überexpression von p-GP (was für gewöhnlich den Hauptmechanismus darstellt) oder die Variation von Isomerasen oder Transferasen [47, 50]. Die Penetration von Stoffen in verschiedene Zellen oder Gewebe ist stark limitiert und der Einfluss auf Absorption, Verteilung und Elimination folglich sehr groß [40]. Lange Jahre ließ sich manche schlechte und variable Absorption einiger Stoffe, wie beispielsweise Cyclosporin, nur ungenügend über die physiko-chemischen Eigenschaften erklären, was sich erst mit der Entdeckung dieser Abwehr- und Resistenzmechanismen ändern sollte [44, 51]. Bei dieser Art der Kreuzresistenz existiert nach allgemeiner Auffassung eine koordinierte Zusammenarbeit von metabolischen Enzymen und Effluxtransportern als Schutzmechanismus, die für eine große Zahl an Xenobiotika die hauptsächliche limitierende Barriere für deren Aufnahme darstellen [42, 44, 51, 52].

Ein Beispiel für eine solche Allianz verschiedener Proteine kann in den Epithelzellen am intestinalen Lumen des Darmes vorgefunden werden [17, 51]. Cytochrom P450 (CYP) 3A stellt die größte Enzymfamilie des Phase-I-Metabolismus und das P-Glykoprotein einen wichtigen Arzneistofftransporter im Menschen dar [44, 53]. Beide sind in hohem Maße in den Enterozyten des Gastrointestinaltraktes, der primären Anlaufstelle für oral applizierte Stoffe, zu finden [44, 52]. Als Entgiftungssystem arbeiten diese beiden Proteine synergistisch zur Reduzierung der Bioverfügbarkeit von oral applizierten Substraten [54]. Dieser Fakt sowie die signifikante Überlappung ihrer Substratspezifität und der schlechten Bioverfügbarkeit von Substraten beider Proteine spricht für eine enge Zusammenarbeit [44, 52, 55], was diesem Tandem eine große Aufmerksamkeit in der klinischen Pharmakotherapie zukommen lässt [56]. Zusätzlich sind sie auch auf Ebene der Genexpression chromosomal sehr nahe beieinander lokalisiert [57, 58]. Viele Stoffe können sowohl das Enzym als auch das Transportprotein inhibieren oder induzieren. Die hohe Gemeinsamkeit an Arzneistoffsubstraten beider Proteine führt dazu, dass eine Vielzahl an Stoffen die Expression beider Proteine simultan modulieren, aber auch nur auf jeweils ein Protein Auswirkungen zeigen kann [59]. Beispielsweise kann Piperin, ein Inhaltsstoff des schwarzen Pfeffers, beide Proteine inhibieren, was belegt, dass auch pflanzlichen Substanzen aus der Nahrung eine hohe Aufmerksamkeit in der Pharmakotherapie zukommen sollte [60]. So spielen diese Beiden komplementäre Rollen in der Absorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion durch Biotransformation und Transport, vor allem in den Villi des Dünndarmes [44]. Das Wirkprinzip der zwei Proteine basiert auf der wiederholten Exposition der Substanzen mit dem metabolisierenden Enzym. Der Stoff wird über passiven Transport in die Zelle aufgenommen, wo er auf das Enzym trifft und metabolisiert werden kann [44]. P-GP sorgt nun parallel für einen aktiven Rücktransport der nicht an das Enzym gebundenen Substanz in das Darmlumen [44, 54]. Somit kann die restliche, unverstoffwechelte Substanz wiederum in Zellen penetrieren und ist wieder neuen Stoffwechselezymen ausgesetzt; sie zirkulieren also regelrecht im Darm (siehe Abbildung 7) [44, 54].

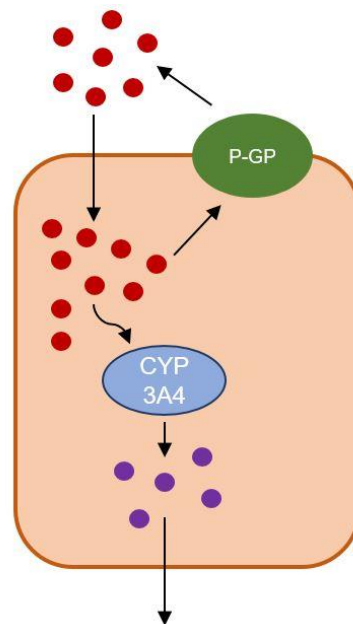


Abbildung 7 Schematische Darstellung des funktionellen Tandems des Enzyms CYP 3A4 und dem Transportprotein p-GP für ein Substrat. Der Substanz (rot) wird in die Zelle aufgenommen, durch CYP 3A4 zum Metabolit (lila) abgebaut und dann in den Körper aufgenommen. Parallel transportiert p-GP den Stoff wieder aus der Zelle und ermöglicht so eine weitere Exposition gegenüber CYP 3A4 bevor der Stoff unverstoffwechselt in den Körper gelangt (modifiziert nach [54]).

Xenobiotika, die kein Substrat der p-GP-Transporter darstellen, haben somit nur einen Durchgang durch das Epithel und werden folglich in geringerem Maße metabolisiert [44]. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Prinzip in der Leber, wo diese „Schutzallianz“ aus p-GP und CYP 3A ebenso exprimiert wird, genau invers funktioniert und dass es im Ausmaß der Bildung von Transportproteinen durchaus einen geschlechter-spezifischen Unterschied gibt, was eine Clearancedifferenz bedingt [51]. In der Leber befindet sich der Stoff nun basolateral, wird nach der Aufnahme von CYP 3A verstoffwechselt, aber gleichzeitig über das apikale p-Glykoprotein aus der Zelle geschleust, wodurch dem Metabolismus weniger Substanz zur Verfügung steht und keine wiederholte Exposition stattfinden kann [51]. Daher lässt sich festhalten, dass eine Inhibition von entweder p-GP oder CYP 3A in Darm dementsprechend gegenteilige Auswirkungen als in der Leber haben kann [51]. Durch diesen speziellen Mechanismus sind auch die ausgeprägten Substratpräferenzen von Enzym und Transporter erklärbar. Therapeutisch lässt sich an den Transportern angreifen, indem man durch Inhibition von p-GP die Zirkulation im Darm unterbindet und so die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen erhöhen kann. Folglich nimmt der intestinale Metabolismus ab, wofür als Beispiel der Effekt des p-GP-Inhibitors Cyclosporin auf die intrazelluläre Akkumulation des Arzneimittels Sirolimus genannt werden kann [51].

Im Hinblick auf den Nutzen der Entdeckung dieser natürlichen Mechanismen zur Limitierung des Eintritts von Xenobiotika in den menschlichen Kreislauf lassen sich durchaus positive Effekte generieren [40]. In der Forschung führte dies dazu, dass neue Stoffkandidaten routinemäßig auf Interaktionen mit Transportern getestet werden und diese Ergebnisse können die zukünftige Entwicklung beeinflussen [51]. Die Transportereigenschaften lassen sich zum einen hinsichtlich des Substrattransportes und dessen Umstände sehr zeitaufwändig oder aber über Expressionsanalysen sensitiver und schneller evaluieren [14].

Einer der wichtigsten Mechanismen in der MDR stellen die Überexpression sowie die erhöhte Aktivität der Transporter, die zur Adenosintriphosphat (ATP)-binde-Kassette (ABC) Transporterfamilie gehören, dar [40]. Die Beteiligung von p-Glykoprotein an diesem Phänomen wurde zuerst bei der Minderung der Wirkung von Chemotherapie bei Krebszellen beobachtet [37, 52]. Diese Resistenz richtet sich gegen diverse Substanzklassen, wie Vincaalkaloide, Anthrazykline und Paclitaxel [61].

2.3 ABC-Transporter

2.3.1 Vorkommen und allgemeine Bedeutung

ABC-Transporter, als ubiquitär membrangebundene, ATP-getriebene Proteine, sind eine von insgesamt vier grundlegend verschiedenen Klassen an membrangebundenen Proteinen und kommen in allen Prokaryonten, Pflanzen, Pilzen oder Tieren vor [58]. Die drei weiteren sind Ionenkanäle, Aquaporine und andere Transporter [58]. Exprimiert werden sie in den verschiedensten Zellen und Geweben, wie den Lymphozyten, in Darm, Leber und Niere sowie den Geschlechtsorganen oder im zentralen Nervensystem [40, 62]. Diese ABC-Transporter sind meistens primär in den Zellmembranen lokalisiert, wo sie eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Arzneistoffen, Arzneistoffkonjugaten, Metaboliten oder andere Stoffe aus dem Zellinneren nach außen befördern [40]. Als endogene Substrate können anorganische Anionen, Metallionen, Peptide, Aminosäuren, Zucker und eine große Anzahl von hydrophoben Substanzen und Metaboliten genannt werden [58]. Allgemein schützen sie die Organe und die systemische Zirkulation vor dem Eintritt von toxischen Substanzen [62]. So wird durch diese Proteine die Fähigkeit von Arzneistoffen, ihr therapeutisches Ziel zu erreichen, massiv reduziert und sie greifen stark in die Pharmakokinetik, Arzneimittelsicherheit und -effektivität ein [40, 63]. Folglich kann es auch zur Beeinflussung des klinischen Effektes und der Toxizität durch pharmakodynamische Arzneistoffinteraktionen mit den ABC Transportern oder einer Vielzahl weiterer Membrantransporter kommen [40, 64, 65]. Substrate dieser Transportfamilie (siehe Tabelle 2) können sich in kinetischen und dynamischen Aspekten gegenseitig

beeinträchtigen und in der Klinik unter Umständen vor allem bei Stoffen mit engen therapeutischem Intervall ein großes Problem darstellen [66, 67].

Tabelle 2 Tabellarische Übersicht von beispielhaften Substraten von p-GP, BCRP und MRP2 aus der Familie der ABC-Transporter [65-68].

Transporter	Substrate
p-GP	Digoxin, Quinidin, Dipyridamol, Ketoconazol, Loratadin, Verapamil, Testosteron, Colchicin, Dexamethason, Ciprofloxacin
BCRP	Ketoconazol, Ciprofloxacin
MRP2	Estradiol, Colchicin, Fexofenadin

So schreibt die FDA eine Untersuchung von Arzneistoffkandidaten auf Substrat-, Induktor- und Inhibitorcharakter für p-Glykoprotein vor [67]. Generell kann die Pharmakokinetik, die Sicherheit, die Effektivität und die Gewebekonzentration von p-GP-Substraten durch die Modulierung sowohl der Expression als auch der Funktionalität von p-GP durch Inhibitoren oder Induktoren beeinflusst werden [69]. Eine Vielzahl chemischer Faktoren, wie Hormone, Vitamine, Zytokine oder Karzinogene, können die Aktivität und die Expression von p-Glykoprotein modulieren [70]. Der zirkadiane Rhythmus ist, basierend auf 24-Stunden-Intervallen, ein Zyklus, der die tägliche Aktivität und Physiologie eines Organismus teilweise stark beeinflusst [71]. So wurde entdeckt, dass auch die mRNA- und die Proteinkonzentration von p-GP im Darm einer solchen Rhythmik unterliegen und am Morgen am höchsten sind, was ebenfalls die Bioverfügbarkeit vieler Arzneistoffe beeinflussen kann [71]. Für klinisch relevante Arzneistoffwechselwirkungen wird in den Behörden inzwischen auf die Transportproteine in gleichem Maße ein Auge geworfen wie auf metabolisierende Proteine [72].

2.3.2 p-Glykoprotein als Haupttransportprotein der ABC-Familie

Obwohl diese Familie in Funktionalität und Anzahl verschieden ist, wird vor allem den MDR-assoziierten Proteinen (MRPs) 1-6, dem p-Glykoprotein (p-GP) sowie dem Brustkrebs-Resistenz-Protein (BCRP) eine klinisch signifikante Rolle zugesprochen [11, 40]. Das p-GP ist das am besten untersuchte Transportprotein und sein Resistenzmechanismus der am häufigste charakterisierte in dieser Familie [40], da es für viele pharmakokinetische Parameter als der wichtigste ABC-Transporter angenommen wird [73]. Es wird physiologisch in den apikalen bzw. luminalen Membranen von

polarisierten Zellen in verschiedenen Geweben mit entweder sekretorischer, wie Darm, Leber oder Niere, oder mit Barrierefunktion, wie Darm, Blut-Hirn-Schranke oder Geschlechtsorganen, exprimiert [40, 45, 52]. Vor allem also in Geweben, die am Entgiftungsprozess von Xenobiotika oder der Abwehr von Toxinen beteiligt sind [32, 59, 74]. Innerhalb der Zelle kommen diese Transportproteine am endoplasmatischen Retikulum, den Peroxisomen und den Mitochondrien ebenfalls vor [75]. Aber auch die biliäre und renale Clearance sowie die Gehirnpenetration werden so beeinflusst [66, 76]. Speziell im Verdauungstrakt findet die Expression jedoch nicht überall in gleichem Maße statt, sondern ist im Ileum höher als im Kolon [29, 32]. Das heißt, sie nimmt von proximal nach distal ab [29, 32]. Diese plasmamembrangebundenen Proteine bilden eine Schutzbarriere für den Körper durch aktive Verminderung der Absorption und systemischen Distribution von Xenobiotika oder durch Erhöhung derer Elimination in Kombination mit metabolischen Enzymen (siehe 2.2) [40, 51]. Jedoch ist ein Substrat von beispielsweise p-GP nicht automatisch schlecht bioverfügbar. Studien haben gezeigt, dass die Rolle von diesem Protein in der gastrointestinalen Absorption für manche Stoffe überschätzt wird [77]. Dieser Transporter verfügt über mehr als eine Substratbindedomäne und kann dadurch eine große Anzahl an strukturell wie funktionell nicht verwandte Substanzen verarbeiten [11, 40], vornehmlich allerdings eher kationische Substanzen [69, 78]. Trotz der breiten Variation an potentiellen Substraten haben alle eine gewisse Hydrophobie, das Vorhandensein von zwei bis drei in einer festen Trennung arrangierten Elektronendonoreinheiten sowie eine Ausbildungskapazität von Wasserstoffbrücken zur Affinitätssteigerung gemeinsam [62]. Neben diesem Mechanismus erfüllt p-Glykoprotein noch physiologische Funktionen mit dem Transport von Steroidhormonen, Peptiden oder Ionen und der Sekretion von Zytokinen, wie Interferonen [40, 52, 79]. Ergo spielt er auch eine große Rolle in Immunmechanismen und der Sterolhomöostase [80]. Ein Mangel an p-GP-Transportern kann auch mit der Ausbildung von Colitis Ulcerosa verbunden sein oder durch die fehlende regulatorische Beteiligung in Inflammation oder Apoptose die Entstehung von Darmkrebs begünstigen [81]. Genvariationen in der ABC-Transporter-Familie werden für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich gemacht werden [80]. Ein Beispiel hierfür wäre die zystische Fibrose, welche auf Anomalien in einem Chloridionenkanal zurückzuführen ist, der zum Kreis der ABC-Transporter gehört [75]. Der Verlust dieses Transporters ist an der Ausbildung dieser Krankheit beteiligt [75].

2.3.3 Aufbau und Funktionsweise von p-Glykoprotein

Die Familie der menschlichen ABC Gene besteht aus insgesamt 49 Vertretern, die in sieben Unterfamilien organisiert sind und eine Vielzahl von Funktionen im Körper erfüllen [58]. Damit gehören diese Transporter zu den am häufigsten und weitesten exprimierten

Proteinfamilien [41]. Das in die Unterfamilie B zugehörige p-GP (siehe Tabelle 3) wird von zwei MDR-Genen, MDR1 (ABCB1), welches auf dem Chromosom 7q21 lokalisiert ist, und MDR3 (ABCB4) kodiert [40, 58, 82]. Es unterliegt einer großen, acht- bis zehnfachen interindividuellen Variation in der Expression [83]. Die Isoform MDR1 wird vorwiegend im Darm exprimiert und ist hier für den Einfluss auf die Absorption zahlreicher Arzneistoffe und die damit verbundenen Resistenzmechanismen verantwortlich [45, 52, 59]. MDR3 dagegen hat seine Aufgabe eher in der biliären Exkretion [45, 52, 59].

Tabelle 3 Übersicht über die sieben Subfamilien der ABC-Transporterfamilie mit Synonym, Anzahl der Gene und Pseudogene sowie einem Transporterbeispiel [58].

Subfamilie	Synonym	Gene/Pseudogene	Beispiele
ABCA	ABC1	12 / 5	ABCA13
ABCB	MDR	11 / 4	p-GP
ABCC	MRP	13 / 2	CFTR
ABCD	ALD	4 / 4	ABCD1
ABCE	OABP	1 / 2	OABP
ABCF	GGN20	3 / 2	ABCF1
ABCG	White	5 / 2	ABCG1

Die höchste Expressionsdichte von p-GP besteht an den Enterozyten in der Nähe zu den luminalen Darminhalten und nimmt in Richtung der Krypten ab, was impliziert, dass p-GP-Substrate dann bevorzugt in den Kryptenzellen aufgenommen werden [84]. Das 170 kDa-Transmembranprotein ist aus 1280 Aminosäuren aufgebaut [40, 78, 85]. Es besteht aus zwei homologen Hälften, der NH₂- und der COOH-endigen Hälfte [40, 52]. Jede der beiden verfügt über eine Transmembrandomäne und einer zytosolischen Nukleotid-Bindedomäne, die über einen Linker von 60 Aminosäuren verbunden sind [40, 58]. Jede Transmembrandomäne besteht aus insgesamt sechs Transmembran- α -Helix-Segmenten (TMs) (siehe Abbildung 8) [40, 52].

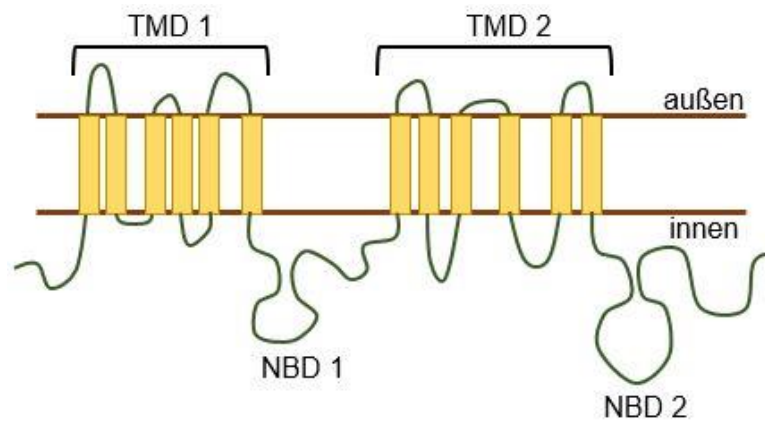


Abbildung 8 Schematische Darstellung von p-Glykoprotein in einer Membran mit seinen beiden homologen Hälften bestehend aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer Nukleotid-Bindedomäne (NBD). Jede TMD besteht aus sechs Transmembran- α -Helix-Segmenten (TMs) (modifiziert nach [41]).

Diese zwölf Transmembrandomänen formen zusammen eine Fassstruktur, die sich über die Plasmamembran spannt [40]. An der Nukleotid-Bindedomäne wird für den Transport von Arzneistoffen gegen den Konzentrationsgradienten die Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP genutzt [11, 40, 66]. Die Regionen der Nukleotid-Bindedomäne an der zytosolischen Seite sind genau festgelegt und bestehen aus einem A-Loop, den zwei Regionen Walker A und Walker B für die Bindung und die Hydrolyse von ATP und einer Signatur C zur Phosphatbindung und Kommunikation [86]. Pro Transportzyklus werden zwei Moleküle ATP hydrolysiert [67]. Diese Energie ist nötig um aktiv relativ lipophile Substanzen durch die lipophile Zellmembran in den Extrazellularraum zu transportieren [40] und die freie, zelluläre Konzentration an Arzneistoffen oder Xenobiotika zu senken [78]. Man vermutet bei p-Glykoprotein das Vorhandensein von bis zu sieben unterschiedlichen Substratbindestellen [67, 87]. So zählen zahlreiche strukturell und pharmakologisch nicht verwandte, neutrale oder positiv geladene hydrophobe Substanzen zu den Substraten [57, 63]. Für die Substratspezifität von p-GP ist eine Bindetasche, welche aus TM5, TM6, TM11 und TM12 gebildet wird, verantwortlich [40]. Intrazellulär hat dieses Transportprotein Funktionen in der intrinsischen Resistenz, verhindert aber auch in den zytoplasmatischen Organellen die Akkumulation von Xenobiotika [16].

Der Transportmechanismus von p-Glykoprotein kann durch drei verschiedene Modelle erklärt werden. Im sogenannten Porenmodell formen die Transmembrandomänen ein Fass mit einer zentralen Pore, was die extrazelluläre Oberfläche öffnet und fast durch die komplette Membrantiefe durchreicht [40]. Binden nun Nukleotide an die Struktur, wandeln sich die Transmembrandomänen in drei kompakte Domänen um, die die zentrale Pore über die ganze Tiefe der Membran öffnen und hydrophoben Stoffen direkten Austritt durch die Lipiddoppelschicht ermöglichen [40]. Beim Flippasemodell nimmt man an, dass, nachdem die Substanz mit der Plasmamembran Kontakt hatte, der Stoff in den Kern der

Transmembrandomänen in der Zellmembran gelangen kann, damit p-GP sie unter ATP-Hydrolyse gegen den Konzentrationsgradienten von der Innen- auf die Außenseite flippen kann [17, 40]. Beiden Modellen ist die Interaktion von Substanzen mit der Lipidschicht vor p-GP sowie die Lokalisation der Bindetasche in der Mitte der Plasmamembran gemeinsam [40, 57]. Diese Eigenschaften können möglicherweise auch die weite Substratspezifität des p-Glykoprotein erklären, da für Arzneistoffe scheinbar das Interkalieren in die Lipiddoppelschicht wichtiger als die Wechselwirkung mit der Bindetasche des Proteins ist [40]. Das Modell des hydrophoben Saugers kombiniert die beiden ersten Modelle und basiert auf der Eigenschaft der Mehrheit der Substrate von p-GP, die sich als hydrophobe Substanzen mit einem planaren Ringsystem und einer positiven Ladung bei physiologischem pH-Wert auszeichnen [40]. Hierbei bindet der hydrophobe Stoff direkt an p-GP und wird von diesem über einen Proteinkanal von innen nach außen transportiert [40]. Möglicherweise gelangen Substrate über Tore zwischen TM 5 und 8 sowie TM 2 und 11 in ihre Bindetaschen [40]. Eine Änderung im elektrischen Potential und im pH-Wert beim Weg über die Membran scheint ebenso förderlich für den Prozess zu sein, wie Konformationsänderungen im p-GP-Protein selbst, sobald Substanzen gebunden sind [40].

Eine Inhibition von p-Glykoprotein kann über biochemische oder physikalische Wege erfolgen [62]. Biochemische Inhibition wird über Modulation der Membrantransporter durch Interaktion von Stoffen mit der Bindestelle oder Inferferenz mit ATP als Energiequelle erreicht, wohingegen physikalische Inhibition beispielsweise über die Veränderung der Zellmembranfluidität erfolgen kann [62, 88]. Ist nun das Ziel, zur Absorptionserhöhung eines Wirkstoffes einen Inhibitor für p-GP zu finden oder zu entwickeln, so sollte man vorab genauestens evaluieren, dass es sich um keinen irreversiblen Inhibitor handelt, da in diesem Fall die protektive Funktion dieses Transporters für die Organe verloren geht [62].

2.4 Bedeutung der CaCo-II-Zellen in der Arzneistoffentwicklung

2.4.1 Grundzüge der Arzneistoffentwicklung

Heutzutage ist die Entwicklung neuer Arzneistoffe ein sehr riskantes und kostspieliges Vorhaben [23]. Die Herausforderung für die pharmazeutische Industrie liegt in der Entwicklung von Hoch-Durchsatz-, kosteneffektiver und Vorhersageuntersuchungsmethoden für die frühe Forschungsphase [89], um eine Balance zwischen Zeit, Kosten und Risiko sowie der Evaluation von pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und Sicherheitsparametern zu gewährleisten [72]. Zudem muss ein großes Augenmerk auf die Transportproteine als Schlüsselement der Distribution, Clearance und Exkretion gelegt werden [72]. So gehen für einen potentiellen Kandidaten schnell viele Jahre vorbei, in

denen erhebliche Ressourcen verbraucht und tausende Substanzen getestet werden, ohne Sicherheit, dass ein Stoff jemals Marktreife erlangt [9, 23]. Ein hoher Prozentsatz an Substanzen schlägt in der Entwicklungsphase fehl, weil biopharmazeutische Eigenschaften, wie Stabilität, Absorption oder Clearance zu schlecht sind, sodass hoch potente Stoffe aufgrund ihrer schlechten pharmazeutischen Profile nicht weiterentwickelt werden [9, 90]. Mit der parallelen Testung von neuen Substanzen hinsichtlich Pharmakologie und Pharmakokinetik konnte schon viel Zeit und Geld eingespart werden, jedoch ist die Erfolgsrate noch vergleichsweise gering, da die Evaluierung von biopharmazeutischen Eigenschaften, wie Löslichkeit, intestinale Permeabilität oder potentielle Interaktionen eine hohe Hürde darstellt [23]. Eine Kombination aus in vitro Modellen, die einen hohen Durchsatz aufweisen, aber schlechte Vorhersagen liefern, wie beispielsweise der parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), und zellbasierten Modellen mit, zum Beispiel CaCo-II-Zellen, welche geringen Durchsatz aber eine hohe Vorhersagekraft haben, kann diesem Problem entgegenwirken [23]. In der Frühphase der Entwicklung werden diese beiden Modelle oft synergistisch verwendet, da sich über den effizienten und ökonomischen PAMPA mit dem Zellmodell, als jahrelangen Goldstandard für Permeabilitätsversuche, weite Bereiche der Transportmöglichkeiten von Substanzen einfach simulieren lassen und so eine gute und schnelle Vorhersage getroffen werden kann [23]. Jedoch gibt es einen gravierenden Unterschied zwischen diesen beiden Modellen: der PAMPA liefert lediglich Daten über die passive, transzelluläre Diffusion von Stoffen durch eine Lipiddoppelschicht [23]. Das CaCo-II-Modell dagegen kann zusätzliche Aussagen über das Verhalten von Transportern, parazellulären Poren oder weiteren Transportwegen generieren, was dazu führt, dass eine schlechte Korrelation einer Substanz aus der Kombination beider Versuche genau auf ihre Bedeutung hin untersucht werden muss [23]. Eine hohe PAMPA Permeabilität und eine niedrige über CaCo-II-Zellen können daher eher einen aktiven Effluxprozess über Transporter bedeuten, als generell eine schlechte intrinsische Absorption [23]. Auch eine simultane Verwendung der beiden Modelle kann die komplexe Absorptionsprozesse im menschlichen Darm nicht adäquat nachempfinden, weswegen diese Modelle immer mit in vivo Studien kombiniert werden sollten, um ein umfassenderes Bild dieser Mechanismen zu erhalten [23]. In vivo Ansätze liefern zwar direkte Daten zur Bioverfügbarkeit, jedoch sind in vitro Methoden als erste Schritte durch ihre Vorteile, wie das Fehlen ethischer Beschränkungen und der Kosten- und Zeitersparnis, deutlich sinnvoller [91].

2.4.2 Potentiale der CaCo-II-Zellen und weitere Zelltypen

Das Nutzenpotential für CaCo-II-Monolayer für die Vorhersage der Absorption in der Arzneistoffentwicklung ist enorm und es lassen sich mit diesem Modell alle vier

Transportwege von Stoffen über das intestinale Epithel untersuchen [27]. Darüber hinaus sind mit diesem Zellmodell noch weitere Aspekte, wie der Einfluss des Mikrobioms auf das Epithel oder von Formulierungsbestandteilen auf den Transport untersuchbar [92]. Aber nicht nur die passive und aktive Permeabilität können beobachtet werden, sondern auch der Effluxtransport, welcher die Absorption über Rücktransport ins Darmlumen limitiert [29]. Die Verlässlichkeit solcher Studien hängt von der Einheitlichkeit und der Integrität des konfluenten und polarisierten Zelllayers ab, was vorab evaluiert werden muss [10]. So können Stoffe mit möglichen Absorptionsproblemen identifiziert und Substanzen mit optimaler passiver Absorption aus einer ganzen Serie von pharmakologisch aktiven Substanzen aus Entwicklungsprogrammen ausgewählt werden [24, 44]. Es ist das am meisten genutzte Modell zur Identifizierung von p-GP-Substraten, p-GP-Induktoren oder Inhibitoren [93]. Der Vorteil dieser aus menschlichem Kolon-Adenokarzinom (**Cancer coli-2**) gewonnenen Zellen besteht in der hohen Ähnlichkeit zu natürlichen Enterozyten im Hinblick auf die Morphologie und die funktionelle Aktivität [23, 92, 94]. Allerdings zeigte eine Genanalyse, dass die CaCo-II-Zellen nicht vollständig mit dem humanen Kolon korrelieren, was die Annahme bestätigt, dass die Zellen die Funktionalität des Dünndarmes eher abbilden [14]. Sie generieren einen gut differenzierten Bürstensaum an Mikrovilli auf der apikalen Oberfläche und exprimieren viele typische Transporter und Enzyme, was Ergebnisse dieses in vitro Modells sehr gut mit in vivo Erkenntnissen korrelieren lässt [66, 92, 94]. Auch die Tight-junctions sind sehr gut ausgebildet [11, 66]. Daneben wird eine Vielzahl an intestinalen Enzymen, wie Aminopeptidasen oder Sulfatasen, und Transportern produziert [9, 92]. So sind p-GP und MRP2 an der apikalen Seite und MRP3 an der Basolateralen vorhanden, MRP1 dagegen wird in einer Zellkultur gar nicht erst gebildet, um einige Beispiele für Effluxproteine aufzuzeigen [78]. Diese ganze Reihe von Aufnahmetransportern - wie PepT1, HPT1 oder OCTN2 - und Effluxtransportern werden in der CaCo-II-Zellkultur abhängig von Zellherkunft, Passagennummer und Kulturbedingungen exprimiert, oder die verwendeten Materialien wie Inserts haben einen Einfluss [66, 95, 96]. Je nach Transportertyp wird dieser in CaCo-II-Zellen entweder höher oder niedriger exprimiert als im menschlichen Darm und speziell das Gen für p-Glykoprotein kann zwischen verschiedenen Klonen von CaCo-II variieren [97]. Studien konnte aber auch für das p-GP-Gen ABCB1 eine erhebliche Expression in CaCo-II-Zellen und darüber hinaus eine signifikante Korrelation zwischen Zellmodell und Verdauungstrakt für die Proteinexpression dieses Transporters zeigen, was die in vitro Versuche für die Untersuchung des Arzneimitteltransportes qualifiziert [93, 97]. Eine Spearman-Korrelation zeigte einen Wert von 0,87, was für eine gute Korrelation hinsichtlich der Expression von vielen Transportergenen von menschlichem Darm zum CaCo-II-Zellmodell spricht [98]. Zu beachten gilt jedoch, dass bei Bewertung der Ergebnisse aus einem solchen Modell, die p-GP-Aktivität in CaCo-II-Zellen höher ausfallen kann als im menschlichen Intestinum [99].

Permeabilitätsversuche mit CaCo-II-Zellen können auch einen großen Einfluss auf das sogenannte Biopharmaceutical Classification System (BCS) haben (siehe Abbildung 9) [11, 100]. Mit diesem Modell soll eine Basis für die Korrelation zwischen in vitro und in vivo Daten geschaffen sowie Vorhersagen über Arzneistoffabsorptionsprobleme getroffen werden [100]. Über die Messung der Löslichkeit und Permeabilität sollen pharmakokinetische Eigenschaften von Arzneistoffprodukten in vivo vorhergesagt werden [27]. In Abhängigkeit von der in vivo Permeabilität und der in vitro Löslichkeit werden die Substanzen in vier Klassen eingeteilt: Klasse 1 mit hoher Permeabilität sowie Löslichkeit, Klasse 2 mit hoher Permeabilität und niedriger Löslichkeit, Klasse 3 mit niedriger Permeabilität aber hoher Löslichkeit und Klasse 4 mit sowohl niedriger Permeabilität als auch niedriger Löslichkeit [100].

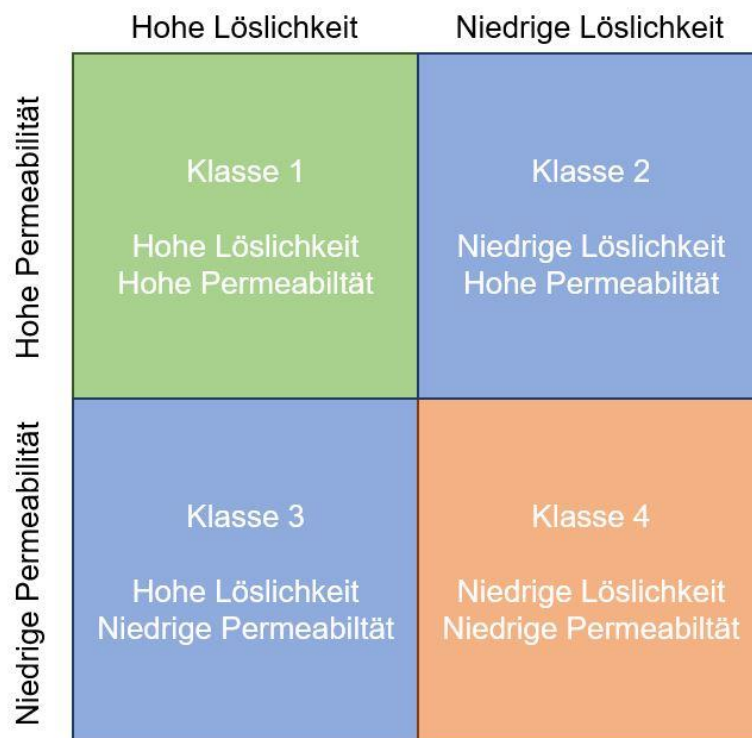


Abbildung 9 Darstellung des Biopharmaceutical Classification System (BCS) mit seinen vier Klassen: Klasse 1 mit hoher Löslichkeit und Permeabilität (grün), Klasse 2 mit niedriger Löslichkeit und hoher Permeabilität (blau), Klasse 3 aus Hoher Löslichkeit und niedriger Permeabilität (blau) und Klasse 4 mit niedriger Löslichkeit und niedriger Permeabilität (orange) (modifiziert nach [27]).

Derartige Versuche lassen sich auch noch mit weiteren Zellmodellen, wie MDCK- oder LLC-PK1-Zellen durchführen [11, 101]. MDCK-Zellen formen ebenso polare Monolayer mit Tight-junctions und haben eine kürzere Kulturzeit als CaCo-II-Zellen [9]. Jedoch gibt es diverse Probleme, wie Unterschiede in Kultivierungszeit und -bedingungen [11]. Auch aufgrund ihrer Herkunft aus Hundeniere (MDCK) bzw. Schweineniere (LLC-PK1) zeigen diese Zellen eine von CaCo-II-Zellen verschiedene Enzym- sowie Transporterausstattung

und die Korrelation auf in vivo Permeabilitäten im Menschen ist dadurch nur schwer möglich [11]. Darüber hinaus wurden MDR1-MDCK-Zellen für Transportversuche durch Transfektion hergestellt und ECV304-Zellen, als weiteres Beispiel für andere Zellen, zur Nachahmung der Blut-Hirn-Schranke verwendet [101]. Auch der Einsatz von Primärkulturen aus isolierten, humanen intestinalen Epithelzellen ist aufgrund der schwierigen Kultivierbarkeit und der begrenzten Lebensdauer ungeeignet [102]. Die Zellisolation zerstört viele Zellen und schränkt generell ihre Vitalität ein [9]. Nutzbar sind diese Zellen im Anschluss lediglich in Suspensionskulturen, sodass keine charakteristische Polarität der Zellen wie in der Darmmukosa vorhanden ist und somit nur die Arzneistoffaufnahme, aber kein transepithelialer Transport untersucht werden kann [9]. Von den am häufigsten genutzten CaCo-II-Zellen unterscheiden sich alle weiteren möglichen Modelle teilweise stark in den Wachstumszeiten bis zur Ausbildung eines Monolayer, den TEER-Werten sowie den Permeabilitätskoeffizienten von Referenzsubstanzen wie Mannitol [101]. Auch für das Screening von p-GP-Substraten scheinen sich CaCo-II-Zellen deutlich besser zu eignen als viele andere Zelltypen [101]. Die CaCo-II-Modelle wurden ebenso schon zu sogenannten „Ready-to-use“-Kits weiterentwickelt, bei denen die Kulturzeit auf drei bis sieben Tage beschränkt ist [11]. Den offensichtlichen Vorteilen der hohen Flexibilität, Kosten- sowie Zeitersparnis, einfache Benutzbarkeit, hohe Reproduzierbarkeit, Automatisierbarkeit und hohe Durchsatzquote, steht der große Nachteil gegenüber, dass diese inadäquate Kulturzeit zu einer verminderten Expression von Enzymen und Transportern führt [11]. Auf Basis von physikochemischen Deskriptoren und dem Einsatz von vielen strukturell unterschiedlichen Arzneistoffen konnten auch reproduzierbare Computermodelle zum virtuellen Screening von p-GP-Substraten in der frühen Forschungsphase entwickelt werden [103].

2.4.3 Vorhersagepotential des CaCo-II-Modells für die Arzneistoffabsorption

Der Gebrauch der CaCo-II-Monolayer stieg in den letzten Jahren stark an. Mittlerweile werden sie in der Forschung als beliebtestes und am besten charakterisiertes Modell routinemäßig kultiviert, da es sich um eine einfache Methode, welche nur wenig Testsubstanz benötigt, handelt [11, 23, 24]. Ebenso kann durch derlei Testsysteme eine Ersparnis an Kosten und Zeit im Entwicklungsprozess stattfinden [66]. Mit Transportstudien lässt sich evaluieren, ob ein Arzneistoff aktiv oder passiv über das Epithel transportiert wird, wobei der Transporter im Fall eines aktiven Mechanismus zusätzlich bestimmbar ist [24]. Da es durchaus auch zu Expressionsschwankungen bei Transportern kommen kann, sind erhaltene Daten in Verbindung mit einem Rückschluss auf in vivo Vorgänge vorsichtig zu interpretieren: So zeigte sich in Studien für β -Lactam-Antibiotika oder ACE-Hemmer eine schlechte Permeabilität, obwohl sie in vivo komplett absorbiert werden [11, 23]. Derlei

Diskrepanzen sind aber nicht aufgrund unterschiedlichen Geschlechtes oder Alters zu erwarten [81]. Traditionell werden Substrate von p-Glykoprotein über den Vergleich von apikalem-zu-basolateralem und basolateralem-zu-apikalem Transport in einem Zwei-Kammer-System und über die Inhibition des Transportes durch einen Inhibitor identifiziert [101]. Die Anwesenheit und Abwesenheit von Inhibitoren dient der Evaluation der Spezifität einer Substanz für p-GP [101]. Aufgrund einer asymmetrischen Kinetik der Effluxtransporter in absorptivem und sekretorischem Transport zeigt ein Substrat entweder erhöhte Aufnahme, erniedrigten Efflux oder beides, wenn p-GP inhibiert wird [29].

In einer Vielzahl von Studien wurde die Korrelation der Arzneistoffabsorption über CaCo-II-Monolayer und dem menschlichen Jejunum in situ untersucht [24]. Dabei wurde das Augenmerk auf drei der vier Routen gelegt: die passive transzelluläre sowie die parazelluläre Route und der carrier-vermittelte Transport [24]. Für die am meisten genutzte Permeationsroute – passiv transzellulär – stellen Monolayer ein sehr gutes Modell zur Vorhersage dar, da sich hierbei die Permeabilitäten von schnell und komplett absorbierten Stoffen im Vergleich zum Jejunum kaum unterscheiden [24]. Bei der Gegenüberstellung der Permeabilität von langsam und unvollständig absorbierten Substanzen über den passiven parazellulären Weg zeigten sich allerdings starke Differenzen: So war der Transport über den Monolayer sehr viel langsamer als über das Jejunum [24]. Hierfür ließen sich zwei mögliche Erklärungen finden. Zum einen haben elektrophysiologische Permeabilitätsdaten gezeigt, dass die Tight-junctions im Monolayer weniger durchlässig sind als im menschlichen Darm, zum anderen unterscheidet sich die Absorptionsoberfläche [24]. Aufgrund der Anatomie des Darmes haben Substanzen mit geringer Permeabilität eine längere Verweildauer, da sie entlang der Villi nach unten diffundieren können und so in den durchlässigeren Bereichen der Krypten einfacher aufgenommen werden [24]. Die Fläche wird dadurch im Vergleich zu den Monolayern deutlich erhöht. Ein Unterschied dieser beiden Modelle in Bezug auf den carrier-vermittelten Transport kann dadurch bedingt sein, dass interessante Transporter im Zellmodell weniger exprimiert werden als in vivo [24], für p-GP beispielsweise bis zu siebenfach weniger [14].

2.4.4 Kenndaten aus den Transportversuchen mit CaCo-II-Zellen

Für die Evaluierung, in welchem Ausmaß ein Stoff möglicherweise absorbiert wird, spielt in Monolayerexperimenten der Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) eine wichtige Rolle: bei einem hohen P_{app} von $> 1 \times 10^{-6}$ cm/s erwartet man von einer eher hohen Aufnahme, bei kleinen P_{app} -Werten von $< 1 \times 10^{-7}$ cm/s von unvollständiger Absorption (siehe Formel 2) [24, 104].

$$P_{app} = ((dQ/dt) \times v) / (A \times c_0)$$

Formel 2

P_{app}	=	scheinbare Permeabilität [$\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$]
dQ / dt	=	Rate an Arzneistofftransport über die Zeit [$\text{nM} \times \text{min}^{-1}$]
v	=	Volumen des Akzeptorkompartiments ($\text{ml} = \text{cm}^3$)
A	=	Oberfläche der Membran [cm^2]
c_0	=	initiale Donorkonzentration [nM]

Der Koeffizient wird verwendet, um aus einem Zwei-Kammer-Diffusionssystem den Transport zu quantifizieren [101]. Der Arzneistofftransfer wird als steigende Konzentration in der Akzeptorkammer über die Zeit gemessen und der differentiale Anstieg anhand der gesamten Arzneistoffmenge berechnet [101, 105]. Nimmt man annähernd Sink-Bedingungen an, so sollen in der Akzeptorkammer maximal zehn Prozent der Gesamtmenge der Substanz über das Zeitintervall wiedergefunden werden [101, 105]. Ferner scheint es aber keinen unbegrenzten Transport an Substanzen zu geben, im Gegenteil ist dieser ab einer gewissen Konzentration in der Akzeptorkammer gesättigt, da im Beispiel der reinen Diffusion der Gradient als treibende Kraft wegfallen würde [66]. Bidirektionale Permeabilitätsversuche, bei denen der Transport in beide Richtungen evaluiert werden kann, gelten als Goldstandard zur Evaluierung von potentiellen p-GP-Substraten [23]. Aus diesen Koeffizienten lässt sich auch eine sogenannte Efflux-Ratio oder P_{app} -Ratio aus dem Quotienten von basolateral nach apikal und apikal nach basolateral errechnen (siehe Formel 3).

$$P_{app} \text{ Ratio} = P_{app(ba)} / P_{app(ab)}$$

Formel 3

$P_{app} \text{ Ratio}$	=	Verhältnis der scheinbaren Permeabilitäten
$P_{app(ba)}$	=	scheinbare Permeabilität basolateral nach apikal [$\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$]
$P_{app(ab)}$	=	scheinbare Permeabilität apikal nach basolateral [$\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$]

Eine Ratio von 1 zeigt an, dass der jeweilige Stoff kein Substrat von p-GP ist, da er in beide Richtungen in gleichem Ausmaß transportiert wird. Je größer der Quotient wird und typischerweise über einem Wert von zwei bis drei liegt, desto wahrscheinlicher kann die

Testsubstanz als p-GP-Substrat eingeschätzt werden [23, 44], beziehungsweise eine bevorzugte Sekretion des Stoffes in das Darmlumen postuliert werden [29, 106]. Bestimmt man die Efflux-Ratio in An- und Abwesenheit von spezifischen Inhibitoren, können beteiligte Transporter noch genauer definiert werden [23]. Neben diesen Werten ist die Massebilanz der einzelnen Substanzen zur Interpretation der Ergebnisse von großer Bedeutung [66]. Sie sollte über 80 % liegen, sodass man von einem akzeptablen P_{app} -Wert sprechen kann [105]. Findet sich eine niedrigere Massebilanz nach Versuchsende im Donorkompartiment wieder, so kann es zu einer Unterschätzung des Ergebnisses kommen, was jedoch für beispielsweise qualitative Studien, bei denen lediglich Substrate identifiziert werden sollen, keine Rolle spielt [105]. Die Permeabilität ist von einer Reihe von Faktoren abhängig [11]. Der Stoffanteil, welcher das Annahmekompartiment erreicht, die initiale Konzentration im Ausgangskompartiment und die Oberfläche der physikalischen Barriere können solche Variablen für lipophile Arzneistoffkandidaten sein und zu einer unvollständigen Wiederfindung führen [11]. Diese kann auch über das Phänomen der reversiblen Membranbindung von Substanzen an die Caco-II-Zellen oder durch unspezifische Bindung an Plastikbestandteile der Inserts oder der Transportbehälter erklärt werden [11].

Generell basieren mathematische Modelle zur Berechnung der Permeation über Membranen auf dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz, dem Kompartimentmodell und der Michaelis-Menten-Kinetik [12]. Das Ausmaß des p-GP-Einflusses auf eine Substanz und das Inhibitionspotential von Stoffen können im Wesentlichen über vier verschiedene Methoden berechnet werden [107]. Die prozentuale Hemmung des p-GP-vermittelten Transportes eines Stoffes durch einen Inhibitor lässt sich bestimmen, indem man entweder die kumulativen Permeabilitäten in basolateraler und in apikaler Richtung in An- und Abwesenheit eines Inhibitors verwendet oder zunächst die Efflux-Ratios errechnet, um über diese dann die prozentuale Inhibition zu erhalten [23]. Zwei weitere Methoden beziehen nur jeweils den einen Permeabilitätsweg mit ein, indem sie entweder nur den apikalen oder nur den basolateralen Permeabilitätswert in An- und Abwesenheit eines Inhibitors in einer Formel mit einer aus vielen Vorversuchen erhaltenen Konstanten verrechnen [23]. Basierend auf Studien zeigte der Berechnungsweg unter Einbezug der Permeabilitätswerte von basolateraler in apikaler Richtung die verlässlichsten Ergebnisse bezogen auf die prozentuale Inhibition [23]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse auf Grundlage der Methode, welche die Efflux-Ratios (siehe Formel 3) mit einbezieht, berechnet. Diese ist zwar nicht in der Lage, kleine Änderungen in den Permeabilitätswerten wiederzugeben [23], allerdings sollte lediglich ein Vergleich des Effektes der Polyphenole zu der Kontrolle und zu Verapamil und Dexamethason getroffen werden. Weiterführende Rechenmodelle können darüber hinaus die Ereignisse an apikaler und basolateraler Membran während des Transportprozesses über Einbezug von Sättigungsprozessen oder der unbewegten Wasserschicht separat errechnen [108]. Die unbewegte Wasserschicht ist eine statische

Schicht aus Wasser, Mukus und Glykokalyx direkt auf den intestinalen Zellen, welche durch unvollständiges Mischen des gastrointestinalen Inhaltes entsteht und die Absorption von Stoffen beeinflusst [13]. Diese Schicht moduliert vor allem den Transport von hoch permeablen Substanzen über ihre Dicke, da der Durchgang nur durch Diffusion möglich ist [109]. Der neutrale pH-Wert der Mukusschicht während die Glykokalyx gleichzeitig negativ geladen ist kann auch in die Transportvorgänge von ionisierbaren Molekülen eine Rolle spielen [110].

2.4.5 Transportversuche: Einflüsse auf die Ergebnisse und Interpretation

So hängt die Korrelation von Monolayer zu menschlichem Darm hinsichtlich von Absorptionsvorhersagen auch stark vom Arzneistoff an sich ab und unterscheidet sich stark innerhalb verschiedener Arzneimittelgruppen [24]. Darüber hinaus hat die Zelllinie einen Einfluss, da Variabilität in den Ergebnissen solcher Untersuchungen auch durch unterschiedliche Passagennummern, Kulturzeiten, extrazelluläre Bedingungen und dem Kulturmedium bedingt sein können [24]. Als eine Passage wird der Zyklus vom konfluenten Wachsen der Zellen in einer Zellkulturflasche, über das Ablösen vom Flaschenboden hin zum Aussäen entweder in einer neuen Flasche oder für einen Versuch bezeichnet [111]. Mit höherer Passagennummer und damit höherem Alter der Zellen kann die Expression von typischen Differenzierungsmarkern variieren, die Proliferationsrate kann zunehmen und aufgrund von zunehmendem Wachstum in Multilayern steigen die TEER-Werte (siehe Allgemeiner Teil 3.2) an [92, 99]. Es wurde jedoch ebenso beobachtet, dass die TEER-Werte bis Passage 70 ansteigen und danach wieder zurückgehen, jedoch immer noch bis Passage 100 über einem annehmbaren Schwellenwert für die Layerintegrität sind [112]. All dies sollte in Betracht gezogen werden, wenn die Resultate verschiedener Laboratorien mit einander verglichen werden [24]. So kann es wegen fehlender Standardisierungen in Zellkultur und experimentellem Vorgehen zu unterschiedlichen Resultaten zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen kommen [93, 113]. In vitro Modelle haben auch eine Reihe von Limitationen gegenüber in vivo Modellen und damit dem menschlichen Organismus, welche eine mögliche Korrelation ebenso beeinflussen [92, 114]. In Kulturmodellen fehlen viele physiologische Faktoren, die bei der Verdauung zusammenspielen, wie muskuläre Mechanik des Darmes oder die mikrobielle Flora [114]. Auch CaCo-II-Zellen zeigen als Nachteile eine gewisse Heterogenität, verfügen nicht über einen Mukuslayer und die Übertragbarkeit auf in vivo Bedingungen ist wegen ihrer tumoralen Herkunft limitiert, da der Phänotyp variiert [91, 102]. Darüber hinaus gibt es diverse Kontaminationsrisiken, einen langen Wachstumszyklus, den Einfluss der unbewegten Wasserschicht, eine variable Expression von Transportern oder metabolischen Enzymen, die Limitierung eines signifikanten Volumens an Cosolventien

und die Tatsache, dass diese Methode vor allem für Substanzen mit hoher Permeabilitätsrate nützlich ist [115]. Für die heutigen Anforderungen an die Forschung mit biotechnologischen Proteinen und neuartigen Darreichungsformen sind neue Untersuchungsmethoden, die näher an den physiologischen Bedingungen im Darm sind, nötig [102]. Die *in vitro* Zellmethoden sind eher für kleine Moleküle geeignet [102]. Allerdings lässt sich über ein experimentelles Design, mit dessen Hilfe physiologische Bedingungen besser abgebildet werden können, die Zellkultur optimieren und die Aussagekraft erhöhen [116].

CaCo-II-Monolayer stellen folglich ein geeignetes Modell dar, um *in vitro* Vorhersagen über die Arzneistoffabsorption treffen zu können. Ferner können neben der Permeabilität auch Arzneistoffinteraktionen oder Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und pflanzlichen Inhaltsstoffen untersucht werden [11]. Die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln aus der alternativen Medizin zur Besserung des Gesundheitszustandes wird immer populärer, was zu einer klinisch relevanten Erhöhung der pharmakokinetischen Interaktionen zwischen Arzneistoffen und Pflanzenstoffen führen kann [117]. Da Pflanzen eine Vielzahl von phytochemischen Substanzen mit funktionellen Gruppen, ähnlich zu konventionellen Arzneistoffen, haben, ist eine Überlappung an Rezeptorwirkungen im Bereich des Möglichen [11]. Aber auch allgemein stellt die Einnahme pflanzlicher Produkte aufgrund ihrer unklaren und oft variierenden Zusammensetzung in pharmakologischer Hinsicht ein Problem dar [118]. Als Beispiel sei an dieser Stelle Johanniskraut, welches gegen Depressionen eingesetzt wird, genannt, was die Bioverfügbarkeit einer ganzen Reihe von Arzneistoffen, wie Kontrazeptiva, Cyclosporin oder Digoxin, erniedrigen kann [11, 119]. Dieses ist in der Lage über die Induktion von CYP 3A4 und über die Regulierung von p-Glykoprotein, klinisch relevante Interaktionen zu verursachen, wenn es mit Arzneistoffen zusammen verabreicht wird [95, 119]. Diese Wirkung von Johanniskraut wird beispielsweise den enthaltenen Flavonoiden zugeschrieben [120]. Im menschlichen Darm kommen über das Epithel verteilt unterschiedliche Zellen, die unter anderem den aufgelagerten Schleim produzieren, als heterogene Oberfläche vor [24, 121]. Co-Kulturen mit weiteren Zellen würden somit eher *in vivo* Bedingungen imitieren, jedoch lassen sich diese Zelllinien nicht im geforderten Verhältnis kultivieren und auch die Schleimproduktion findet in deutlich reduziertem Umfang statt, was den Gebrauch solcher Kulturen sehr erschwert [24]. Neben dem fehlenden Mukus sowie der fehlenden Heterogenität ist die Abwesenheit von CYP 3A4 und eine generell variable Expression von metabolischen Enzymen ein weiteres Problem [101, 121]. Das in 2.2 beschriebene Tandem aus CYP 3A und p-GP lässt sich so nur schwer simulieren [11, 44]. Hierfür wäre die Co-Inkubation mit einem Induktor oder die Transfektion der Zellen nötig, um eine gewisse Expression zu regulieren [121]. Allerdings zeigen derartig veränderte Zellen oft einen verminderten Kontakt untereinander und wachsen eher in Multilayern [100]. Daneben sind die Kosten deutlich höher, die Expressionslevel sind sehr variabel und die *in vivo* beobachtete Aktivität

wird dennoch oft nicht erreicht [121]. Die Transporterexpression zeigt sich zwar auch im Vergleich von CaCo-II-Zellen zum menschlichen Darm als weitestgehend ähnlich, jedoch auch durchaus mit Unterschieden bezüglich Niveau und Art der Transporter, was in Betracht gezogen werden muss, um Studiendaten nicht zu über- oder unterschätzen [92, 95]. *Brück et al.* konnten speziell für ABCB1, welches für p-GP kodiert (siehe Einleitung 2.3), einen zweifach höheren Proteingehalt in CaCo-II-Zellen als im menschlichen Jejunum nachweisen, was sich mit vielen weiteren Studien deckt und dazu führt, dass CaCo-II-Zellen zur Überprüfung des passiven Transportes wertvoll sind, aber der aktive Transport bei der Beteiligung von p-GP nicht überschätzt werden darf [95]. Dieses Zellmodell eignet sich eher für die Untersuchung einer Inhibition von p-Glykoprotein, als der Evaluierung der Induktion des Arzneistofftransportes [95]. Nukleäre Rezeptoren wie der Pregnan-X-Rezeptor, welche für die Regulation der Expression von Transportproteinen wichtig sind, werden in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert [95]. Um in der Forschung den Aspekt der p-GP-Spezifität zu erhöhen, kann man auch mittels RNA Interferenz (RNAi) die Expression von p-GP und dessen Funktion beeinflussen [122].

Neben einem großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von klassischen Arzneistoffen wurde in den letzten Jahren der Effekt von p-GP auf neuartige Stoffe genauer untersucht. Dabei fiel auch hier eine Modulierung der Permeabilität durch p-Glykoprotein auf. So zeigt beispielsweise der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, welcher bei verschiedenen Formen der Leukämie eingesetzt wird, zwar eine hohe Bioverfügbarkeit von 98 % nach oraler Einnahme, allerdings wurden schwankende Plasmaspiegel beschrieben, welche Transportprozessen zugeschrieben werden [32]. Es konnte eine Beteiligung von p-Glykoprotein, da Imatinib als p-GP-Substrat detektiert werden konnte, gezeigt werden, die darüber hinaus auch im Falle einer Therapieresistenz eine Rolle spielt [32].

Für die Korrelation der Ergebnisse aus den Zellversuchen mit der Situation im Menschen, sollten auch potentielle entzündliche Darmerkrankungen mitberücksichtigt werden. So zeigten endogene Zytokine, welche bei diesen Krankheiten induziert werden, zellmodulierende Eigenschaften in Verminderung der Zellintegrität durch Erhöhung der Absorption über die Tight-junctions und Veränderung des p-GP-vermittelten Effluxtransportes [34, 79]. Auch die Peroxidation, also die oxidative Degradation von Lipiden kann über eine Öffnung der Tight-junctions die Zellmembranstruktur schädigen und dadurch eine Dysfunktion von p-GP provozieren, was zur Entwicklung von Krankheitsbildern, wie einer Ischämie, führen kann [123]. *Nagira et al.* konnten über Induktion eines solchen Vorganges mittels tert-Butylhydroperoxid eine konzentrations- und zeitabhängige p-GP-Dysfunktion und Abnahme der Membranintegrität, aber auch die Umkehrung dieser Prozesse durch Antioxidantien zeigen [123]. Weiterhin gibt es die Möglichkeit die parazelluläre Permeabilität zu erhöhen, indem die Zellen mit Substanzen exponiert werden, welche die Tight-junctions öffnen [9, 34]. Die Tight-junctions

sind mit dem Zytoskelett verbunden und dieses lässt sich über die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels dahingehend modulieren, dass es zu einer Öffnung der Zellverbindungen kommt [34]. In vivo wird diese Möglichkeit durch Sicherheitsbedenken stark limitiert [9]. Auch das Ausüben von osmotischem Stress auf die Darmzellen durch Erhöhung der Osmolarität zeigt eine Erniedrigung der Tight-junction-Funktion, ohne die Zellen an sich zu schädigen [35]. Derartige Veränderungen werden von speziellen Osmosensoren in der Zelle wahrgenommen und die Permeabilität über proinflammatorische Signale moduliert [35].

2.4.6 Weitere Untersuchungsmöglichkeiten außerhalb der Zellkultur

Für die Untersuchung der intestinalen Arzneistoffabsorption ist es nötig, die relevanten Charakteristiken der biologischen Barriere in vivo nachzubilden, wofür verschiedene Systeme entwickelt wurden, die die intestinale Mukosa unterschiedlich imitieren [9]. Eine Möglichkeit zur Evaluierung von Arzneistoff- oder Nahrungsabsorption bietet entnommenes Gewebe, welches zum einen die architektonische Integrität bewahrt und die Absorption in unterschiedlichen Darmbereichen darstellen kann, aber sich die geringe Lebensdauer auch nachteilig auswirkt [9]. Zu diesem System zählen ganze, durchblutete intestinale Segmente, der „umgestülpte Sack“ oder ausgeschnittene Mukosateile mit oder ohne Muskelschicht, da diese keine physiologische Absorptionsbarriere darstellt [9]. Beim durchbluteten intestinalen Segment lässt sich eine Probenmessung nur mukosal durchführen und die Verminderung der Arzneistoffkonzentration wird mit der Absorption gleichgesetzt, was aufgrund von Metabolismus oder Akkumulation in Zellen zu einer Überschätzung und falschen Annahmen führen kann [9]. Darüber hinaus werden große Mengen an Substanz benötigt und die Anzahl solcher Segmente aus einem Lebewesen ist limitiert [9]. Beim „umgestülpten Sack“ wird bei einem Teil des Darmes die apikale Seite nach Außen gestülpt, die beiden Enden verschlossen und das Innere mit einer Pufferlösung gefüllt [9]. Nach Platzierung in einem Container mit der Testsubstanz in einer Lösung können Proben sowohl im Inneren des Sacks als auch Außerhalb gezogen werden [9]. Auch hier können die Ergebnisse jedoch über eine mögliche Akkumulation des Stoffes in der vorhandenen Muskelschicht verfälscht werden [9]. Bei ausgeschnittenen Mukosateilen wird ein Darmsegment longitudinal geschnitten und auf eine Diffusionskammer angepasst [9]. Die Kammer ist an eine Stromquelle zur fortlaufenden Überwachung der Gewebeintegrität und der Viabilität angeschlossen und dient im Allgemeinen zur Bestimmung von gerichtetem Transport über das Darmepithel sowie dem segmentabhängigen Transport [9]. Neben diesen drei Methoden stellt die direkte Untersuchung an Membranvesikeln eine weitere Möglichkeit dar [9]. Diese sind in physiologischem Puffer, der die Testsubstanz gelöst enthält, suspendiert [9]. Über dieses Modell ist man in der Lage die Arzneistoffaufnahme

über Membranen, Metabolismus durch plasmamembrangebundene Enzyme und weitere spezifische Membranprozesse zu untersuchen [9]. Sehr schwierig im Hinblick auf den Versuchsaufbau und die Durchführung sind in vivo Techniken, wie Perfusionen während Operationen, bei denen die Permeabilität der Untersuchungssubstanz über deren Abnehmrate in der Perfusionslösung im Darm bestimmt wird, durchzuführen [13]. Diese Möglichkeit wird durch die schlechte Massebilanz aufgrund von Akkumulation oder Metabolismus in den Zellen limitiert und auch der direkte Eingriff in physiologische Vorgänge wie die Darmmotilität ist kritisch [13].

2.5 Bedeutung von p-Glykoprotein für die Arzneistoffentwicklung

Die orale Route stellt für die Applikation von Arzneimitteln die gebräuchlichste und wichtigste Route dar, weswegen die intestinale Barriere maßgeblich den klinischen Effekt der Substanzen beeinflusst [13, 17, 90]. Vorteile dieses Aufnahmeweges sind die Zweckmäßigkeit, geringe Kosten sowie eine hohe Patientencompliance im Gegensatz zu anderen Applikationsformen [89]. Daher ist die Multi Drug Resistance über p-GP für die Arzneistoffentwicklung von enormer Bedeutung. Sie repräsentiert eines der größten Probleme in der Pharmakotherapie von unterschiedlichsten Krankheiten, wie Krebs, Infektionskrankheiten oder Epilepsie [40]. Zwar haben eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf diese Mechanismen, jedoch hat die erhöhte Expression oder die verstärkte funktionale Aktivität des p-GP-Transporters als ein natürlicher Entgiftungsprozess in menschlichen Geweben einen großen Anteil [40]. Aktive Sekretion des absorbierten Arzneistoffes stellt somit einen signifikanten Faktor für die orale Bioverfügbarkeit dar [52]. Diese wird laut FDA allgemein als Absorptionsrate oder -ausmaß der aktiven Wirkkomponente mit entsprechender Verfügbarkeit am Wirkort definiert [91]. Darüber hinaus kann man die absolute Bioverfügbarkeit, also ein Vergleich einer beliebigen Applikation zu einer intravenösen Gabe, und die relative Bioverfügbarkeit, dem Vergleich zweier Darreichungsformen, bestimmen. Aber auch für intravenös applizierte Chemotherapeutika können über Inhibitoren von p-Glykoprotein die AUC erhöht und die Clearance erniedrigt werden [52]. Neben einer möglichen negativen Beeinflussung von Therapieregimen kann sich p-GP auch auf Arzneistoffinteraktionen, durch Verminderung der therapeutischen Effektivität oder der Erhöhung von toxischen Effekten, auswirken [40]. Als mögliche Mechanismen der Wechselwirkung sind hier zum einen eine Kompetition an der Bindestelle oder zum anderen eine Veränderung der Expressionslevel von p-GP denkbar [66]. Dieser Transporter sollte auch Gegenstand in der vorliegenden Arbeit sein. Viele klinisch relevante Arzneistoffe aus verschiedenen pharmakotherapeutischen und pharmakologischen Klassen (siehe Tabelle 4) werden von ihm moduliert [40].

Tabelle 4 Übersicht über mögliche Substanzklassen mit beispielhaften Arzneistoffen, deren Absorption von p-Glykoprotein beeinflusst wird [40].

Substanzklasse	Arzneistoffe
Antibiotika	Fluorchinolone, Erythromycin, Tetrazykline
Antiepileptika	Carbamazepin, Felbamat, Lamotrigin, Phenobarbital, Phenytoin, Gabapentin
Antidepressiva	Amitriptylin, Citalopram, Doxepin, Risperidon, Venlafaxin, Paroxetin
Antihypertonika	Carvedilol, Talinolol, Diltiazem, Felodipin, Verapamil
Glucocorticoide	Dexamethason, Hydrocortison, Methylprednisolon, Triamcinolon
Protonenpumpeninhibitoren	Lansoprazol, Omeprazol, Pantoprazol
Zytostatika	Anthrazykline, Vincaalkaloide, Paclitaxel, Tamoxifen, Methotrexat, Imatinib, Etoposid, Topotecan, Irinotecan, Mitoxantron

Potentielle Inhibitoren von p-GP sind dahingehend für die Forschung von Interesse, diesen Effekt umzukehren, auszuschalten oder sogar therapeutisch nutzen zu können [40]. Mit diesen Inhibitoren ist es möglich, die Absorption des Arzneistoffes zu steigern oder mögliche Therapieresistenzen gegen Medikamente zu minimieren [74]. Es wäre denkbar, gewisse Arzneistoffe in der Komedikation mit reversiblen Inhibitoren zu verabreichen, um die Aufnahme, zum Beispiel im Gehirn oder in Krebszellen, zu erhöhen [40]. Auch Zusatzstoffe, wie Tween 80 oder Cremophor EL, in oralen Formulierungen können möglicherweise p-GP inhibieren und so die Bioverfügbarkeit des Arzneistoffes modulieren [52].

Mit Versuchen an CaCo-II-Monolayern können also mögliche Interaktionen evaluiert werden. Unter anderem hat die Food and Drug Administration (FDA) in den USA Leitlinien für solche Forschungen an Arzneistoffkandidaten zur adäquaten Informationsbeschaffung aufgestellt [69]. Ebenso stellte die European Medicines Agency (EMA) Orientierungshilfen zur Erforschung von Arzneistoffinteraktionen auf und lieferte so eine Leitlinie, um feststellen zu können, ob die Durchführung klinischer Interaktionsstudien notwendig ist [124]. Ein in vitro Probesubstrat für die p-GP-Inhibition sollte sehr selektiv sein, also eine hohe Spezifität auf diesen Transporter haben, ohne mit weiteren ABC-Proteinen oder CYP-Enzymen zu interagieren [40]. Die Substanz sollte zudem lediglich schwache bis moderate passive Membranpermeabilität zeigen, keinem signifikanten Metabolismus unterlegen sein, kommerziell verfügbar und ebenso für in vivo Studien brauchbar sein [40]. Darüber hinaus

sollte sie zu p-Glykoprotein eine hohe Affinität haben, ohne selbst eine pharmakologische Wirkung zu entfalten sowie keine toxischen Effekte haben und die Transporter schon in geringen Konzentrationen hemmen [66].

Toxischen Effekte, wie beispielsweise kardiovaskuläre Reaktionen bei Verapamil, limitieren die einsetzbaren Konzentrationen [61]. Sind sie in der Regel doch strukturell sehr verschieden, sollte Substrat und Inhibitor jedoch auch einige physiko-chemische Gemeinsamkeiten aufweisen [40]. Bei den Inhibitoren handelt es sich meist um hydrophobe Moleküle mit einem Gewicht von 200 bis 1900 Da sowie einem planaren Ringsystem und einer schwachen positiven Ladung bei physiologischem pH-Wert [40], was auch allgemeine Merkmale von Substanzen sind, die an p-GP binden [50]. Des Weiteren scheinen ein Pharmakophor mit zwei bis drei Wasserstoffbindungsakzeptoren, eine planare aromatische Domäne und ein, bei neutralem pH deprotoniertes, tertiäres Stickstoffatom hilfreich für die Wirkung zu sein [40].

Leider hat die Entwicklung über die Jahre gezeigt, dass hoffnungsvolle Inhibitoren unerwünschte Nebeneffekte im Körper verursachen können [40]. Als Beispiel sei hier die Komedikation mit dem Modellinhibitor Verapamil genannt, welche zu kardiotoxischen Effekten führen kann [40].

3 Charakterisierung der Polyphenole

Die synthetische Entwicklung von chemischen Inhibitoren der p-GP-Transporter brachte keine Stoffe mit annehmbaren pharmakologischen Eigenschaften hervor, wodurch manchen Pflanzeninhaltsstoffen, wie vor allem den Polyphenolen oder Flavonoiden, eine erhöhte Aufmerksamkeit zu Teil wurde [40]. Die Gruppe der natürlichen Produkte zählt zur vierten Generation an p-Glykoprotein-Inhibitoren, denen die erste Generation von Substanzen, die eigentlich für andere Indikationen entwickelt wurden und die zweite sowie dritte Generation, die aus Substanzen bestehen, die aus der ersten Generation weiterentwickelt oder komplett neu designet wurden, voraus gehen [86]. Phytochemische Substanzen können biologisch aktiv sein und über synergistische oder antagonistische Effekte physiologische Aktionen modulieren, wenn sie therapeutischen Substanzen ähneln [57]. Flavonoide sind bekannt dafür, regulatorisch in den p-GP-vermittelten, zellulären Transport von verschiedenen Substanzen eingreifen zu können [125, 126]. Solche Interaktionen beinhalten Induktion oder Inhibition von metabolisierenden Enzymen oder Effluxproteinen [57]. Die menschliche Zelle kann dabei nicht zwischen einem pflanzlichen und einem synthetischen Stoff unterscheiden, was bedingt, dass alle physiologischen, pharmakologischen und toxikologischen Effekte unabhängig von der Herkunft der Substanz dieselben sind [57]. Der primäre Mechanismus von solchen Interaktionen betrifft sowohl Induktion als auch Inhibition von intestinalen Arzneistoff-Efflux-Transportern [57]. Die pflanzlichen Stoffe zeigen eine Reihe von sehr nützlichen Merkmalen. Sie sind sehr selektiv und haben nur geringe zelltoxische Effekte, jedoch gilt es auch hier Sicherheitsfragen zu klären [40]. Hinsichtlich der Inhibition von Transportern haben sie ein ähnliches Potential wie klassische Substanzen [40, 74].

3.1 Struktur und Klassifizierung der Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide besteht aus tausenden Substanzen mit variablen Kombinationen vieler Hydroxyl- sowie Methoxygruppen am Grundgerüst (siehe Abbildung 10) und ist eine Untergruppe der Polyphenole [40, 91].

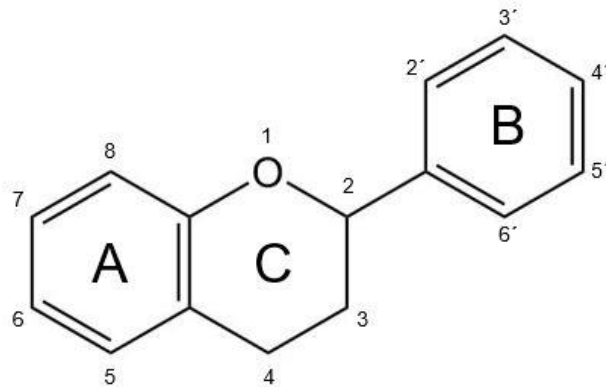


Abbildung 10 Schematische Darstellung des Grundgerüsts der Flavonoide mit den charakteristischen drei Ringen und dem Sauerstoffatom (modifiziert nach [40]).

Sie kommen in allen vaskulierten Pflanzen vor, sind dort oft für die Pigmentierung und den Geschmack verantwortlich und haben ein niedriges molekulares Gewicht [40, 126]. Biosynthetisch werden sie über den phenolpropanmetabolischen Pfad gebildet [86]. Für die Pflanze nehmen sie zahlreiche wichtige Rollen in Wachstum, Entwicklung, Blumenfarbe, Allelopathie, Schutz vor ultraviolettem Licht oder Inhibition des Auxintransportes ein [40]. Dazu spielen diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe als Verteidigungsmechanismus eine wichtige Rolle im Schutz vor physikalischen und biologischen Schäden, wie durch Pilze [1, 126, 127]. Sie zählen zu den am weitesten verbreiteten Gruppen an polyphenolischen Substanzen und sind zahlreich in Nahrungsmitteln oder Getränken, wie Früchten, Gemüse, Nüssen, Rotwein oder Tee, enthalten [40, 94]. Diese Tatsache sowie eine mögliche Wirkung vieler pflanzlicher Inhaltsstoffe auf den p-GP-Transporter führen dazu, dass man in der oralen Arzneitherapie immer auch die jeweilige Ernährung des Patienten mit einbeziehen sollte, sofern es sich um Arzneimittel handelt, welche Substrate für aktiven Effluxtransport sind [76]. Die Grundstruktur der Flavonoide besteht aus zwei Benzenringen, welche in der Mitte über einen heterozyklischen Pyran- oder Pyronring mit einer Doppelbindung verbunden sind [40]. Basierend auf dem Oxidationsstatus des C-Rings, dem Hydroxylierungsmuster der Ringstruktur und dem Substituenten an der C3-Position können die Flavonoide in verschiedene Klassen gegliedert werden [20, 40]. So werden insgesamt sechs Hauptklassen entsprechend ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten definiert [40, 126, 128]. Diese bestehen aus den Anthocyanen, den Flavanolen oder Catechinen, den Flavanonen, den Flavonen, den Flavonolen und den Isoflavonen (siehe Abbildung 11) [40, 128].

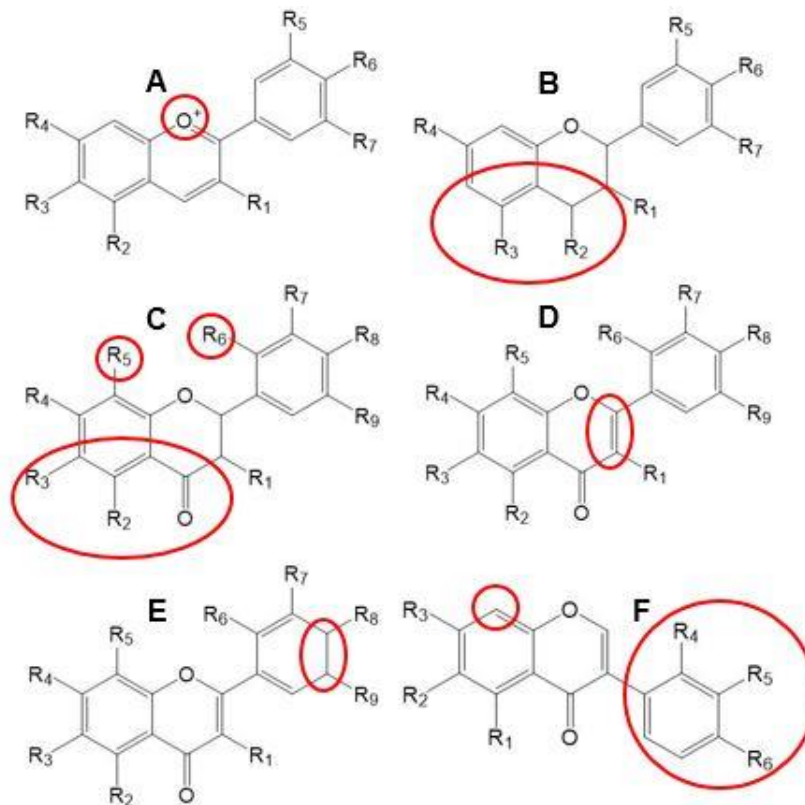


Abbildung 11 Übersicht über die sechs Hauptklassen der Flavonoide mit Anthocyanen (A), Flavanole (B), Flavanone (C), Flavone (D), Flavonole (E) und Isoflavone (F). Mit einem roten Kreis sind relevante Strukturunterschiede zwischen den Klassen gekennzeichnet (modifiziert nach [40]).

Anthocyane sind glykosilierte, wasserlösliche Pigmente, welche für die Farbgebung verschiedener Pflanzenteile verantwortlich sind und ebenso wie Flavonoide mit einer Reihe von gesundheitsförderlichen Eigenschaften diskutiert werden, aber unter Einfluss von Licht oder pH auch hochgradig instabil sind [91]. Catechine sind die Hauptpolyphenole in grünem Tee [76], kommen aber auch in Äpfeln, Beeren oder Schokolade vor [129]. Eine Reihe von gesundheitsförderlichen Eigenschaften des Kaffees, wie Risikoreduktion von koronaren oder zerebrovaskulären Herz-Kreislauf-Erkrankungen, mit den Flavanolen in Verbindung gebracht [129]. Isoflavone kommen vor allem in Sojabohnen und Sojaprodukten vor und werden als Aglykone oder als Metabolite der Darmmikroflora absorbiert [28]. Durch ihre Affinität zum Östrogenrezeptor können sie endokrine Wirkungen auslösen [28]. Flavanone sind vor allem in Zitrusfrüchten vorhanden und laut diverser in vitro Studien können sie Signalwege für beispielsweise Vaskularisation beeinflussen [130]. Flavone stellen eine der größten Subgruppen der Flavonoide dar und bekannte Substanzen wie Apigenin sind für antiinflammatorische oder antioxidative Effekte verantwortlich [131]. Flavonole kommen in Sojabohnensamen vor [132]. Anthocyane dienen den Pflanzen als Farbstoffe und werden als solche auch in Lebensmitteln angewendet [133]. Sie gelten als sehr sicher und haben viele potentielle therapeutische Eigenschaften [133].

3.2 Gesundheitsförderliche Aspekte der Flavonoide

Diesen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird somit eine Reihe von gesundheitsfördernden Eigenschaften nachgesagt, weswegen diesen Stoffen mittlerweile ein hohes Maß an Aufmerksamkeit in der Ernährungswissenschaft zu Teil wird [114, 127]. So sollen sie antivirale, antiinflammatorische, proapoptotische, antimikrobielle, antioxidative Merkmale und eine Wirkung gegen Krebs haben [40, 94, 128]. Über ihre antioxidative Aktivität können sie der Entwicklung von Pathogenen entgegenwirken und einen Schutz gegen UV-Schäden oder oxidativen Stress darstellen [20, 114]. Pathogene sind in diesem Fall sogenannte freie Radikale, also reaktive Sauerstoffspezies, die unter anderem Schäden an der DNA oder Zellmembranen verursachen können, da sie aufgrund ihrer ungepaarten Elektronen sehr instabil und somit chemisch hoch reaktiv sind [1]. Die Pflanzenstoffe sind in der Lage eine große Auswahl an Proteinkinasen, Membran-ATPasen und viele weitere Enzyme zu hemmen [40], aber auch Zellsignalwege oder Genexpression zu beeinflussen [134]. Ebenso können sie bei Osteoporose, neurodegenerativen Störungen oder kardiovaskulären Erkrankungen mit einem gesundheitsförderlichen Effekt in den Krankheitsstatus eingreifen [40, 114]. Aber auch für die Abwehr von Krankheitserregern können diese Pflanzenstoffe wertvoll sein, wie beispielsweise das aus einer chinesischen Heilpflanze gewonnene Tryptanthrin, welches gute Wirksamkeiten gegen viele Pilze, aber auch gegen Krankheiten wie Leishmaniose und Tuberkulose zeigt [135]. Vor allem Flavonoide werden schon lange zur Verbesserung des Gesundheitszustandes bei chronischen Krankheiten, wie HIV oder Krebs, eingesetzt, allerdings mit dem großen Problem, dass es aufgrund von Interaktionen zu Therapieversagen oder Toxizitäten kommen kann [11]. Dies basiert auf einer Kombination aus Fehlkommunikation zwischen Patient und Arzt bezüglich der Anwendung von pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln, fehlender klinischer Prüfung und Überwachung dieser Anwendungsformen und der generellen Annahme, traditionelle pflanzliche Produkte seien sicher und ohne Nebeneffekte oder Interaktionen [57]. Jedoch müssen diese Substanzen bioverfügbar sein, zu ihrem entsprechenden Wirkort gelangen können und in dieser Zeit ihre Bioaktivität behalten [91].

3.3 Pharmakokinetik der Flavonoide

Im Allgemeinen werden Flavonoide auf komplexen Wegen intestinal stark metabolisiert sowie schlecht absorbiert [40, 136] und in ihrem Nutzen als Therapeutika limitiert [94, 137]. Hauptabsorptionsort der Flavonoide ist der Dünndarm, jedoch können sie auch in den Dickdarm gelangen, wo sie Substrate für mikrobiellen Metabolismus sind [137]. Die meisten Flavonoide werden über passive Diffusionswege vom Körper aufgenommen, manche zeigen jedoch auch aktiven Transport über diverse Wege, wie den MRP2 [20, 94, 136].

Beispielsweise zeigen Isoflavonoide aufgrund ihrer Affinität zu Biomembranen eher eine Absorption über passive Diffusion, Flavanone sowohl protonengekoppelten aktiven Transport, als auch transzelluläre passive Diffusion [127, 136]. Generell kann ihre Aufnahme von vielen Faktoren wie dem Einfluss von Transporter, der Membraninteraktion, der Stabilität, der Löslichkeit und der Hydrophobie der Stoffe bestimmt werden [94]. Zumeist liegen sie gebunden an Zuckermoleküle als Glykoside vor [40, 137]. Der oral absorbierte Anteil wird über simple Diffusion im Bereich von 0 bis 60 % für die Flavonoide geschätzt und vorab enzymatische zu lipophileren Strukturen deglykosiliert [126, 137]. Über Phase I und Phase II des Metabolismus werden sie anschließend schnell an ihren freien OH-Gruppen glucuronidiert, sulfatiert oder methoxyliert, um sie wieder renal auszuscheiden [40, 138], was einen Hauptgrund für ihre sehr geringe orale Bioverfügbarkeit darstellt [138]. Für die Phase II sind die UDP-Glucuronosyltransferase und die Sulfotransferase von großer Bedeutung [28, 126]. Die genaue Wirkung und Bioaktivität dieser Metabolite nach der Verdauung im Körper ist jedoch unklar [114]. Hepatische Metabolite können über biliäre Exkretion wieder in den Dünndarm gelangen [40, 114]. Dort kann der nicht absorbierte Anteil ebenso im Kolon von der Darmmikroflora über Fermentationsprozesse zu einfachen phenolischen Säuren abgebaut und entweder absorbiert, mit dann möglicher Wirkung als Signalmoleküle, oder direkt wieder ausgeschieden werden [40, 114]. Dieser enterohepatische Kreislauf zwischen Leber und Kolon führt zu einer langen Verweildauer von 24 bis 48 Stunden im Blut, wie für Enterolignane schon gezeigt werden konnte [114].

3.4 Wirkung der Flavonoide

Für die Struktur-Wirkungsbeziehung sind eine Reihe von Merkmalen interessant (siehe Abbildung 12), wie die Anwesenheit aromatischer Ringe, eine gewisse Lipophilie oder Methoxygruppen [74]. Grundlegend scheinen die 5- und 3-Hydroxylgruppe hierfür genauso wichtig zu sein wie die 2,3-Doppelbindung und eine planare Struktur des Moleküls [40, 139]. Hydrophobe Teile zur Interaktion mit den steroid-interagierenden Sequenzen von p-Glykoprotein sollten ebenso vorhanden sein wie Hydroxylgruppen zur polaren Interaktion, möglicherweise an der ATP-Bindestelle [40]. Ein virtuelles Screening kennzeichnete Glutamin-47, Tyrosin-53, Serin-83, Isoleucin-87, Glycin-100 und Arginin-154 auf Seiten von p-GP als wirkungsrelevant für die Bindung von Flavonoiden [40].

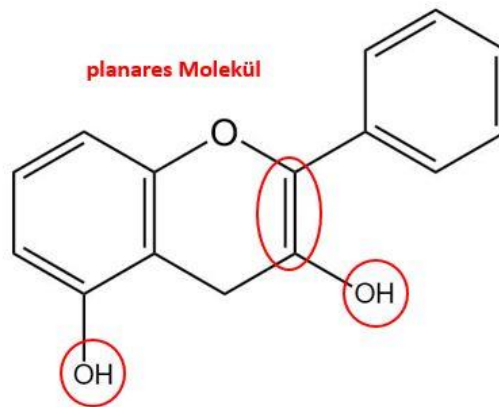


Abbildung 12 Darstellung der, für die Struktur-Wirkungs-Beziehung, wichtigen Bestandteile der Flavonoide mit den 5- und 3-Hydroxylgruppen, der 2,3-Doppelbindung und dem planaren Molekül (modifiziert nach [40]).

Pflanzliche Inhaltsstoffe können über verschiedene Wege mit p-Glykoprotein eine Wechselwirkung ausüben. Ein Stoff kann mit einem Substrat kompetitiv um das Transportprotein konkurrieren, ein Induktor sein und somit die Plasmakonzentration über höheren Efflux erniedrigen oder über Inhibition die Absorption durch Verminderung der Aktivität von Membrantransportern steigern [57]. Auf der Ebene der Genexpression können eine Erhöhung oder Erniedrigung von p-Glykoprotein, die generelle Stabilisierung der mRNA oder die Veränderung der Proteinumwandlung als zweiten Regulierungsmechanismus für manche Stoffe, wie Chrysin oder Quercetin, eine Rolle spielen [82, 86]. Eine Modulation über Expressionsveränderungen wäre zudem auch denkbar, jedoch würde das längere Zeitspannen benötigen und hätte keinen kurzfristigen Effekt [57]. Neueste Erkenntnisse identifizierten den Wnt/ β -catenin Signalweg als verantwortlich für eine Überexpression von ABC-Transportern und bestimmte Flavonoide, wie Theaflavin oder Rutin, die anhand ihrer strukturellen Voraussetzungen diesen Weg herunter regulieren können [140]. Obwohl das Interaktionsprinzip der Flavonoide mit dem p-GP-Transporter noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es eine Reihe von Ansätzen dieses zu beschreiben. Eine Modulation des p-Glykoproteins über eine Wechselwirkung der pflanzlichen Stoffe mit der vicinalen ATP-Bindestelle sowie der Steroidbindestelle stellt wohl den Hauptweg der Inhibition dar [40, 117]. Diese Bifunktionalität an zwei verschiedenen Bindetaschen wird über das Ringsystem der Polyphenole herbeigeführt [40]. Eine Bindung an die Substratbindedomäne kann auch gewisse Effekte erreichen, jedoch können andere Flavonoide p-GP auch über heterotrophe allosterische Mechanismen aktivieren [49, 82]. Quercetin beispielsweise kann die ATPase Aktivität inhibieren, wohingegen Kämpferol und Naringenin diese stimulieren können [36, 49]. Des Weiteren können die Flavonoide eine Konformationsänderung des Proteins über eine Bindung an eine andere Arzneistoffbindestelle herbeiführen [40]. Die Inhibition findet ebenso konzentrationsabhängig statt: Die Konzentration im Intestin sollte 10 μ M oder höher sein [40]. An dieser Stelle können solche

Konzentrationsbereiche durchaus erreicht werden. Aufgrund der teilweise stark verminderten Absorption kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dies in anderen Geweben nicht erreicht wird und auch die Glucuronid- und Sulfatkonjugate der Flavonoide als organische Anionen keinerlei Wirkung in dieser Hinsicht zeigen [40]. So wurde für Polyphenole aus grünem Tee schon erfolgreich gezeigt, dass sie über eine Bindung an p-GP konzentrationsabhängig die Funktion von p-Glykoprotein reversibel um bis zu 75 Prozent vermindern können [76]. Im Allgemeinen kann man von einer unterschiedlichen Beeinflussung der p-GP-vermittelten Arzneistoffresistenz ausgehen, die stark von der chemischen Struktur der Modulatoren abhängt [49]. Auch eine kompetitive Konkurrenz eines Flavonoids mit einem Substrat als allgemeiner Mechanismus ist im Bereich des Möglichen [36]. Viele Studien belegen, dass unterschiedliche Gruppen der Flavonoide die Transportproteine auch verschieden beeinflussen können [141]. Für das p-GP-Modellsubstrat Rhodamin 123 ließ sich eine Erhöhung der Aufnahme durch Flavone über kompetitive Inhibition feststellen, wohingegen andere Flavonoide zu einer Induktion der Effluxtransporter führen oder keinerlei Einfluss haben [141]. Flavone können im Dünndarm die Expression an p-GP erhöhen, jedoch nicht im Kolon [82], was sie als Zusatzmedikation zu p-GP-Substraten zur möglichen Erhöhung der Gewebepenetration und damit der systemischen Bioverfügbarkeit interessant macht [40].

In der heutigen Zeit spielt eine bewusste Ernährung mit einem Anteil an pflanzlichen Stoffen zur Ausnutzung potentiell gesundheitsfördernder Effekte eine große Rolle. Dabei liegt es auf der Hand, dass es hierbei zu vielen harmlosen, förderlichen, aber auch schädlichen Interaktionen zwischen Nahrung und Arzneistoffen, speziell von Flavonoiden mit p-GP kommen kann [40, 82]. Durch mögliche Zusatzapplikation lässt sich dies aber auch bewusst ausnutzen. Anstelle von zusätzlichen Stoffen oder Molekülen zur Modulation der Bioverfügbarkeit können so auch wesentlich sichere phytochemische Stoffe verwandt werden und diese Strategie kann in einer kosteneffektiveren Optimierung münden [40].

3.5 Einschränkungen im Nutzenpotential der Flavonoide

In Beobachtungs- und Interventionsstudien gibt es eine große Diskrepanz in den angenommenen Effekten der pflanzlichen Inhaltsstoffe [114]. Dies lässt sich am ehesten mit der fraglichen Permeabilität dieser Substanzen erklären, da diese nicht nur von physiologischen Bedingungen und Vorgängen abhängt, sondern auch von der Verarbeitung der Pflanzenteile und der Freisetzung aus ihrer jeweiligen Matrix, welche von einer Vielzahl von Variablen abhängt [114]. Postuliert werden auch eher synergistische Effekte von mehreren Inhaltsstoffen eben jener Matrix und keine Wirkung von einzelnen Substanzen, da es unter anderem im Bereich der Absorption zu einer Vielzahl von Polyphenol-

interaktionen kommen kann, welche sich über Beeinflussung von beispielsweise Transportern im Darm zeigen [114]. Auch die gleichzeitige Einnahme von apolaren Polyphenolen mit Fetten aus der Nahrung kann die Absorption der Polyphenole über Mizellenbildung erhöhen, wohingegen Proteine die Absorption der Polyphenole negativ beeinflussen können [114]. Schon die Verarbeitung des rohen Pflanzenmaterials stellt einen entscheidenden Schritt für die Absorption dar, weil die potentiell wirksamen Substanzen aus den Pflanzenteilen und Zellclustern heraustreten müssen, allerdings bietet dies einen ersten Angriffspunkt für Abbau und Wirkminderung [114]. Polyphenole liegen in konjugierter Form an Mono- und Disacchariden sowie Proteinen in den Vakuolen und Apoplasten der Pflanzen vor [114]. Bereits das physikalische und mechanische Bearbeiten von Nahrungsmitteln kann einen großen, positiven wie negativen Einfluss auf die Struktur der Polyphenole haben [114]. Zwar scheinen Flavonoide sehr stabil gegenüber mechanischen Einflüssen, wie Schneiden, zu sein, allerdings setzen derlei Prozesse auch Enzyme und weitere am Abbau oder Umwandlung beteiligte Stoffe frei, sodass die Stabilität somit fraglich ist [114]. Dagegen hat die thermische Behandlung von pflanzlichen Materialien auf die Verfügbarkeit von freien Polyphenolen einen positiven Einfluss über die Freisetzung aus Bindungen oder von schwerextrahierbaren Polyphenolen [114]. Im Dünndarm stellen sich dann für die Absorption der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe weitere Fragen hinsichtlich der Löslichkeit, der Mizellenbildung von apolaren Substanzen, der Diffusion durch die unbewegte Wasserschicht und den Mukus, Transporterbeteiligung und Metabolismus [114]. Polyphenole können in hohen Konzentrationen diverse Verdauungsenzyme wie Lipasen oder Pepsin hemmen und somit dazu führen, dass ihr Anteil, welcher in das Kolon weitertransportiert wird, ansteigt, da nur noch eine reduzierte Freisetzung aus der Nahrungsmatrix stattfindet [114]. Darüber hinaus können Polyphenole ihren eigenen Metabolismus induzieren oder hemmen und ihre Gewebeverteilung mit der Beeinflussung von Transportern oder Enzymen modulieren [114]. Als Beispiele sind hier die Hemmung von CYP 3A4 durch Grapefruitsaft über seine Inhaltsstoffe Naringin und Bergamottin [114, 142] oder die Beeinflussung der Talinololaufnahme durch die Flavonoide aus diesem Fruchtsaft zu nennen [143]. In Studien wurde darüber hinaus für Grapefruitsaft auch eine inhibierende Wirkung auf p-Glykoprotein anhand des modulierten Colchicintransportes nachgewiesen [144]. Weitere Studien zeigten auch die modulierende Wirkung weiterer Fruchtsäfte, wie Limetten-, Zitronen-, Pomelo- oder Orangensaft mit ihren Inhaltsstoffen Neoponcirin oder Tangeretin auf Arzneistofftransportwege [145-147]. Für eine zelluläre Aufnahme müssen die Polyphenole zunächst durch den Mukus diffundieren, wobei die Viskosität des Mukus, potentielle Mizellenbildung und die Polarität der Stoffe an sich eine Rolle spielt [114]. Für die Route durch das Epithel sind der transzelluläre und der parazelluläre Weg möglich. Die Funktionalität der Tight-junctions kann von manchen Polyphenolen unter anderem über die Beeinflussung von zellulären Signalwegen erhöht oder auch erniedrigt werden, um den Durchlass für kleine Moleküle zu verändern [114]. Der

transzelluläre Weg läuft über passive Diffusion, zum Beispiel apolare Polyphenolaglykone, und vor allem über transportervermittelte Aufnahme [114]. An ihrem Weg durch die Zelle werden die Polyphenole gehindert, indem sie als Xenobiotika von der Zelle Phase II metabolisiert werden oder aktiv von Effluxtransportern, wie p-Glykoprotein, in das Darmlumen zurückgefördert werden [114].

4 Ziele der Arbeit

Oral applizierten Arzneistoffe werden über die intestinale Mukosa absorbiert [27]. Als ein *in vitro* Modell zur Vorhersage von Arzneistoffabsorption und zur Erforschung von Aufnahmemechanismen können Caco-II-Zellen verwendet werden, da sie nicht nur spontan differenzieren und zu konfluenten Monolayern binnen drei Wochen in Zellkultur wachsen, sondern auch als polarisierte Zellen strukturell und funktionell das Dünndarmepithel nachahmen [27]. Die gute Korrelation experimenteller Daten mit *in vivo* Vorgängen und die Einfachheit dieses Modells, haben dieses nützliche Zellmodell in der Forschungswelt sehr beliebt gemacht [148]. Über aktiven Transport können Arzneistoffe von Effluxtransportern gegen den Konzentrationsgradienten aus dem Zytoplasma in das intestinale Lumen befördert werden [27]. Dieser Vorgang stellt auf der einen Seite einen Resistenzmechanismus in der Arzneimitteltherapie, auf der anderen Seite aber auch eine Schutzfunktion für den Organismus vor Xenobiotika oder Toxinen dar. P-Glykoprotein ist das am häufigsten untersuchte Mitglied der ATP-binde Kasette (ABC) Transporterfamilie und limitiert die intestinale Absorption einer großen Anzahl von Arzneistoffen [27]. Pflanzlichen Sekundärstoffe aus der Gruppe der Flavonoide können den Transport von Arzneistoffen oder anderen exogenen Substanzen über Interaktion mit p-GP beeinflussen [143], was sie zu interessanten Objekten in der Forschung werden lässt.

Ziel dieser Arbeit war daher zunächst die Charakterisierung der verwendeten Substanzen und Flavonoide hinsichtlich ihrer Zytotoxizität auf CaCo-II-Zellen, ihrer Stabilität in gewöhnlichem Zellkultur- und dem Versuchsmedium sowie die Evaluierung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole. Vor allem die Erkenntnisse über Zytotoxizität und Stabilität sind unerlässlich, um abschätzen zu können, bis zu welcher Konzentration die Substanzen sinnvoll untersucht können und ob eine ausreichende Stabilität über den Versuchszeitraum aussagekräftige Ergebnisse erlaubt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit sich die dreiwöchige Kulturzeit der Zellen für die Transportversuche reduzieren ließ. Dieser Aspekt sollte eine mögliche Zeit- und Kostenersparnis aufzeigen.

Weiterführende Ziele waren die Untersuchung des Einflusses der Flavonoide auf den Transport von Rhodamin 123 als spezifisches p-GP-Substrat über den Zellmonolayer in Transportversuchen sowie der Einfluss der Polyphenole auf die Genexpression des Transportproteins nach einer Inkubation von 2, 24 und 48 Stunden. Ergänzend hierzu wurden dem Versuchsmedium noch Gallensäuren zugesetzt und der pH-Wert auf 6 eingestellt, um einen möglichen Unterschied unter physiologischeren Bedingungen erkennen zu können. Ebenso sollte eine Korrelation der Erkenntnisse aus den Genexpressions- mit den Transportversuchen hergestellt werden. Der Praxisbezug sollte mit der Verwendung des Arzneistoffes Ciprofloxacin als p-GP-Substrat in

Transportversuchen mit den Urolithinen A, B, C und Isourolithin A evaluiert werden. Zudem sollte über eine Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS) und dem damit verbundenen induzierten oxidativen Stress die Fähigkeit der vier Urolithine untersucht werden, über ihre antioxidativen Kapazitäten dem Effekt von LPS entgegenzuwirken.

Auf diese Weise sollten wichtige Erkenntnisse zur Interaktion von Flavonoiden mit Substraten von p-Glykoprotein und dem daraus resultierenden Einfluss auf den Transport und die Permeabilität über das intestinale Epithel gewonnen werden.

B Allgemeiner Teil

1 Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur

1.1 Zytotoxizität

Zum Erzielen valider Ergebnisse und aussagekräftiger Schlussfolgerungen aus den Transportversuchen ist eine genaue Evaluierung der Zytotoxizität der verwendeten Substanzen unerlässlich. So soll nicht nur die allgemeine Schädigung der CaCo-II-Zellen durch die Substanzen bestimmt, sondern auch eine geeignete, übereinstimmende Konzentration der Stoffe für die Versuche ermittelt werden. Es konnte in Studien für manche Polyphenole schon eine zytotoxische Wirkung auf menschliche Krebszellen in der Zellkultur gezeigt werden [149]. Steigt die akute Toxizität einer Substanz durch beispielsweise eine hohe Konzentration an, so verringert sich durch die Schädigung der Zellen im Monolayer der transepitheliale Widerstand, was sich in sinkenden TEER-Werten (siehe Allgemeiner Teil 3.2.3) und steigender transepithelialer Permeabilität von Markermolekülen äußert [150]. Die Vermeidung von toxischen Effekten auf den Monolayer ist von großer Bedeutung, weil diese gewöhnlicher Weise nicht im Absorptionsversuch erkannt werden können [15]. Als Resultat entsteht eine fehlerhafte hohe Absorption [15]. Um solche falschen Interpretationen zu vermeiden, konnten *Konsoula et al.* bereits ein statistisches Modell als zusätzliche Hilfe entwickeln [150]. So können über eine Korrelation von Zytotoxizitätsdaten aus verschiedenen Versuchen, unter anderem dem Neutralrotassay, und Permeabilitätsversuchen, Vorhersagen für toxische orale Konzentrationen von Stoffen getroffen werden [150].

Dieser Neutralrotversuch wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und basiert auf der Aufnahme des Farbstoffes und der lysosomalen Akkumulation in lebende, unverletzte Zellen nach deren Exposition gegenüber einer Konzentrationsreihe einer Testsubstanz [151-153]. Hierbei gelangt dieser schwach kationische Stoff durch nicht-ionische passive Diffusion über die Zellmembran und konzentriert sich durch elektrostatische hydrophobe Bindung an anionische Gruppen der Matrix in den Lysosomen [154]. Der Versuch hängt von der Kapazität der Zelle ab, zwischen Zytoplasma und Lysosomen einen pH-Gradienten aufzubauen und die Substanz über Protonierung am Austritt aus den Zellorganellen zu hindern [154]. Eine Extraktion lässt sich im Anschluss mit einer angesäuerten Ethanollösung durchführen und die Absorption der gelösten, farbigen Substanz wird mit einem Spektrometer vermessen [154]. Die Quantifizierung des extrahierten Farbstoffes korreliert linear mit der Zahl an lebenden Zellen [152, 153]. Er ist ein schneller, ökonomischer und halbautomatischer Test, der quantitative Daten über mögliche toxische Potentiale von Stoffen liefert [152]. Ferner lässt er sich auch für die Evaluierung von temperatur- oder metabolismusabhängiger Toxizität beziehungsweise von

physikalischen Vorgängen, wie Strahlung oder Licht, einsetzen [154]. Gegenüber weiteren Tests, die über die Quantifizierung der Dehydrogenaseaktivität durch chemische Reduktion eines Formazansalzes funktionieren, ist der Neutralrotassay billiger, sensitiver, zeigt weniger Interferenzen und benutzt keine instabilen Reagenzien [154]. Jedoch hat der Test Nachteile bei schlecht löslichen Substanzen und muss nach Initiierung schnellstmöglich vollendet werden [154]. In diesem Testmodell wird eine Viabilität von über 70 Prozent als nicht toxisch, über 50 Prozent als wenig toxisch und darunter als toxisch angenommen [151]. Für die durchgeführten Zytotoxizitätsversuche wurde 80 Prozent oder ein Faktor von 0,8 als Grenze für die nicht-toxischen Eigenschaften einer Substanz festgelegt.

1.1.1 Ergebnisse

In orientierenden Versuchen wurden zunächst die Stoffe für die Kontrollen oder bestimmte Versuchsbedingungen hinsichtlich ihrer toxischen Eigenschaften nach einer Inkubation über 24 Stunden auf die verwendeten CaCo-II-Zellen in Kulturmedium getestet (siehe Experimenteller Teil 3.1). In den weiteren Versuchen wurden jeweils mikromolare Konzentrationen für die Substanzen herangezogen und für jeden Stoff in die Einheit Mikrogramm pro Milliliter umgerechnet, um aus den Zytotoxizitätsversuchen mit den Konzentrationsreihen in dieser Einheit einen Bezug herstellen zu können (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten Substanzen mit ihren molaren Massen [$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$] und ihren in den Versuchen eingesetzten Konzentration in $50 \mu\text{M}$ (für Ciprofloxacin $20 \mu\text{M}$) sowie ihrer entsprechenden Konzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Substanz	Molare Masse [$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$]	Konzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$
Taxifolin	304,250	15,21
Silibinin	482,440	24,12
Urolithin A	228,200	11,41
Urolithin B	212,200	10,61
Urolithin C	244,200	12,21
Isourolithin A	228,200	11,41
rac. Hydnocarpin D	464,430	23,22
(+)-Hydnocarpin D	464,430	23,22
(-)-Hydnocarpin D	464,430	23,22
M1	208,000	10,40
Verapamil	454,602	22,73
Dexamethason	392,464	19,62
Ciprofloxacin	331,346	6,63

Dimethylsulfoxid (DMSO) dient in Laborversuchen als Lösungsvermittler für schlecht lösliche oder instabile Substanzen, kann jedoch die Integrität von Zelllayern oder die Funktionalität der Zellen negativ beeinflussen [11, 23]. In Vorversuchen mit einer Konzentrationsreihe an DMSO zeigte sich eine Konzentration von einem Prozent mit einem Faktor von $1,23 \pm 0,101$ ($n=6$) bezogen auf die Neutralrotabsorption in einer normalisierten Kontrolle als unbedenklich für die Zellen. Auch die Löslichkeitseigenschaften der Untersuchungssubstanzen waren in dieser Konzentration zufriedenstellend. Als Positiv-Kontrolle, um die erhaltenen Werte sofort in Relation setzen zu können, diente bei allen Untersuchungen Zink(II)-chlorid, welches bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ einen Faktor von $0,235 \pm 0,135$ ($n=6$) in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle zeigte. Dies war die geringste mögliche Konzentration, da alle geringeren ein deutlich nicht toxischeres Verhalten gegenüber den CaCo-II-Zellen zeigten. Neben der allgemeinen

Evaluierung des Einflusses von Polyphenolen auf den p-GP-vermittelten Transport im Zellmodell, sollte dies weiterführend noch unter physiologischeren Bedingungen durchgeführt werden, um diesbezüglich etwaige Unterschiede zu ermitteln. Gallensäuren kommen natürlicherweise im Verdauungstrakt des Menschen vor. Dabei zeigten sich in den eigenen Versuchen 100 µg/mL einer 50:50 Mischung aus Cholsäure und Desoxycholsäure mit einem Faktor von $0,884 \pm 0,154$ ($n=7$) als unbedenklich. In höheren Konzentrationen wurden vermehrt toxische Effekte beobachtet. Auch eine pH-Wert-Variation zwischen 5,93 und 8,86 hatte keinerlei negativen Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen, wodurch eine Anpassung auf pH 6 wie im menschlichen Darm ermöglicht wurde. Auf den Epithelzellen im Darm ist ein saures Mikroklima zwischen 5,8 und 6,3 vorherrschend [155]. Ciprofloxacin gilt als ein Substrat für p-Glykoprotein [103], weswegen es in der vorliegenden Arbeit als eine Modellschubstanz für praxisbezogene Ergebnisse verwendet wurde. Analog zu Rhodamin 123 konnten 20 µM (entsprechend 6,63 µg/mL) auch für Ciprofloxacin bedenkenlos eingesetzt werden, da selbst bei 10 µg/mL mit $1,074 \pm 0,054$ ($n=3$) der Faktor als unbedenklich einzustufen war. Verapamil, als häufig gebrauchter Modellinhibitor für den p-Gp-abhängigen Transport [156], zeigte in einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 1000 µg/mL bei 50 µg/mL mit einem Faktor von $0,836 \pm 0,320$ ($n=6$) die maximale nicht-toxische Konzentration (siehe Abbildung 13). Daher zeigten sich die verwendeten 22,73 µg/mL als unbedenklich. Als Modellinduktor von p-Glykoprotein wurde Dexamethason verwendet [157], welches in einer Konzentration von 19,62 µg/mL durch seinen Faktor $1,050 \pm 0,021$ ($n=3$) mit 25 µg/mL unbedenklich eingesetzt werden konnte. Für die Positiv-Kontrolle mit Zink(II)-chlorid lagen die Werte zwischen $0,072 \pm 0,004$ und $0,194 \pm 0,014$ und waren nach einem statistischen Test mittels einer ANOVA signifikant unterschiedlich zu sämtlichen relevanten Werten. Ebenso unterschieden sich die Substanzen im benötigten Bereich nicht signifikant von der unbehandelten Negativ-Kontrolle.

Zytotoxizität von Verapamil

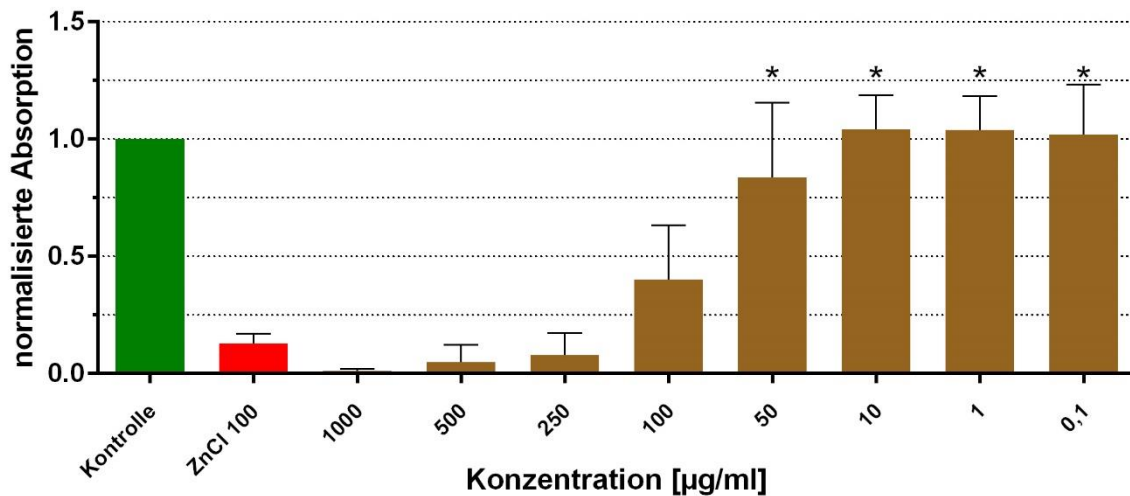


Abbildung 13 Zytotoxizität von Verapamil auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 24 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 1000 µg/mL Verapamil sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n=6$ und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierten Säulen (*) stellen die nicht statistisch signifikant unterschiedlichen Konzentrationen von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 22,73 µg/mL als unbedenklich kennzeichnete.

Bei allen verwendeten Polyphenolen sollte nach Möglichkeit eine einheitliche Konzentration evaluiert werden. Für jede Substanz stellte sich 50 µM nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation als geeignet heraus. Taxifolin zeigte noch bei 50 µg/mL einen als unbedenklich einzustufenden Faktor von $1,071 \pm 0,111$ ($n=5$) gegenüber der Negativ-Kontrolle und Silibinin war bei 50 µg/mL mit $0,792 \pm 0,162$ ($n=6$) immer noch knapp unter der angenommenen Grenze von 0,8 für diese Kennzahl. Für die vier verwendeten Urolithine entsprach eine Konzentration von 50 µM jeweils ungefähr 10 µg/mL, was sich nach Vermessung einer jeweiligen Konzentrationsreihe als nicht-toxisch herausstellte (Urolithin A $1,045 \pm 0,018$ ($n=3$), Urolithin B $0,852 \pm 0,003$ ($n=3$), Urolithin C $0,875 \pm 0,018$ ($n=3$), Isourolithin A $1,009 \pm 0,053$ ($n=3$)). Die Ergebnisse für Urolithin A sind in Abbildung 14 exemplarisch dargestellt. Das Racemat D von Hydnocarpin D sowie (+)-Hydnocarpin D und (-)-Hydnocarpin D wurden in einer Konzentration von 23,22 µg/mL in den Versuchen eingesetzt. Sowohl für das racemische Gemisch als auch für die beiden Enantiomere zeigte sich jedoch bei jeweils 25 µg/mL mit den Faktoren $0,477 \pm 0,039$ (Racemat D, $n=3$), $0,445 \pm 0,007$ ((+)-Hydnocarpin D, $n=3$) und $0,475 \pm 0,006$ ((-)-Hydnocarpin D, $n=3$) ein Wert von unter 0,5, welches ein Indiz für toxische Effekte auf die Zellen in diesem Konzentrationsbereich ist. M1, ein Metabolit von Catechin, wies bei 10 µg/ml, was ziemlich genau seiner eingesetzten Konzentration entsprach, einen Wert von $0,830 \pm 0,011$ ($n=3$) und somit keine giftigen Eigenschaften auf. Bei der Untersuchung der

Polyphenole zeigte die Positiv-Kontrolle Zink(II)-chlorid Werte zwischen $0,057 \pm 0,011$ und $0,276 \pm 0,014$ (je $n=3$). Alle für weitere Versuche relevanten Konzentrationen waren nach einer ANOVA statistisch unterschiedlich von dieser Kontrolle. Keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich einer geringeren Absorption stellte der Vergleich zur unbehandelten Negativ-Kontrolle dar. Eine Ausnahme bildeten hier das racemische Hydnocarpin D und seine beiden Enantiomere, die jeweils statistisch signifikant unterschiedlich zur Negativ-Kontrolle nach einer Inkubation über 24 Stunden waren. Manche eingesetzten Konzentrationen wiesen einen statistisch signifikant unterschiedlichen Wert auf, der oberhalb der Negativ-Kontrolle lag, weswegen diese dennoch verwendet werden konnten.

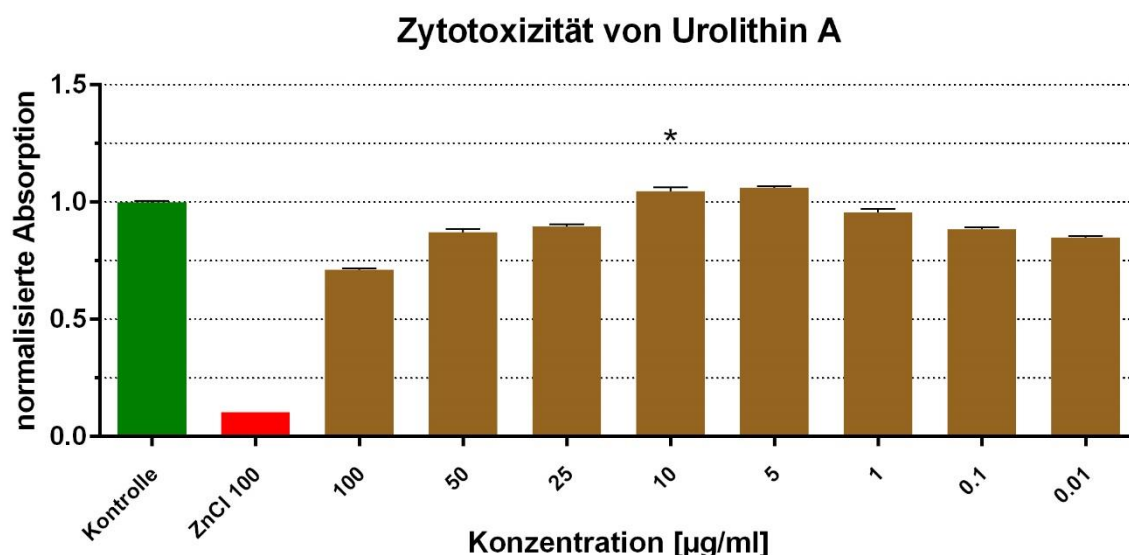


Abbildung 14 Zytotoxizität von Urolithin A auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 24 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin A sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n=3$ und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt hier die statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 11,41 µg/mL als unbedenklich kennzeichnete.

Aufgrund der toxischen Tendenzen der drei Hydnocarpinvarianten wurde die Zytotoxizität auf die CaCo-II-Zellen nochmal nach vier Stunden evaluiert, um über den Versuchszeitraum der Transportversuche von zwei Stunden eine unbedenklichere Aussage generieren zu können. Beim Racemat (siehe Abbildung 15) und bei (+)-Hydnocarpin D lagen die Faktoren bei $0,775 \pm 0,020$ ($n=3$) respektive $0,730 \pm 0,029$ ($n=3$) bei einer Konzentration von 25 µg/mL und damit über die doppelte Transportversuchszeit schon knapp unter dem nicht-toxischen Bereich, waren jedoch immer noch statistisch signifikant unterschiedlich

von der Negativ-Kontrolle. (-)-Hydnocarpin D dagegen zeigte bei dieser Konzentration über vier Stunden keinen statistisch unterschiedlichen Wert von $1,049 \pm 0,014$ ($n=3$) gegenüber der Absorption der Kontrolle und damit eine klare nicht-giftige Eigenschaft auf die Zellen. Die Positiv-Kontrolle lag bei diesen Versuchen zwischen $0,174 \pm 0,012$ und $0,256 \pm 0,013$ (je $n=3$).

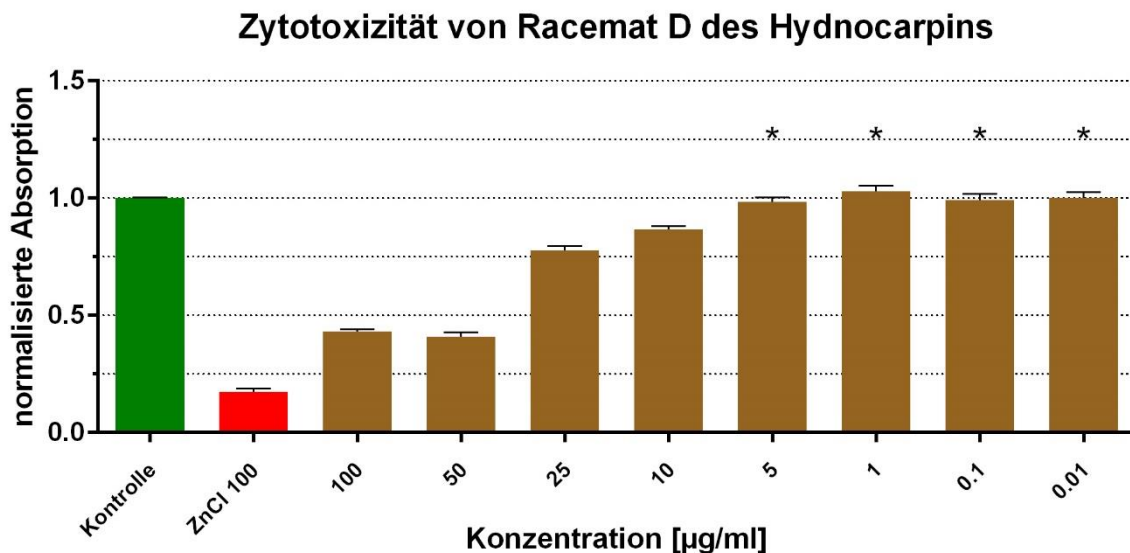


Abbildung 15 Zytotoxizität von dem Racemat D des Hydnocarpins auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über vier Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL racemischem Hydnocarpin D sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n=3$ und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierten Säulen (*) stellen hier die statistisch signifikant unterschiedlichen Konzentrationen von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar. Die in Versuchen verwendete Konzentration von 23,22 µg/mL war signifikant verschieden von der Negativ-Kontrolle, konnte jedoch mit der in der Literatur beschriebenen Grenze von 0,7 als verwendbar gekennzeichnet werden.

Zusätzlich zur Untersuchung des Einflusses auf das Transportverhalten bei CaCo-II-Monolayern wurde der Effekt auf die Genexpression der Polyphenole auf p-Glykoprotein untersucht (siehe Experimenteller Teil 7). Das bedingte eine Inkubation über 48 Stunden und somit vorab einen Test, wie toxisch die Substanzen in ihrer eingesetzten Konzentration über diesen Zeitraum hin waren. DMSO zeigte sich auch bei einer längeren Inkubationszeit mit einem Faktor von $0,837 \pm 0,022$ ($n=3$) bei einer einprozentigen Konzentration als unbedenklich. Die Modellsubstanzen für Inhibition und Induktion von p-Glykoprotein, Verapamil und Dexamethason wurde auch in den Genexpressionsversuchen hinsichtlich ihres Einflusses untersucht. Bei Verapamil zeigte sich in der Konzentrationsreihe zwischen 10 und 50 µg/mL ein starker Abfall des Faktors von $0,972 \pm 0,008$ auf $0,181 \pm 0,002$ (je $n=3$), was für eine verwendete Konzentration von 22,73 µg/mL

etwaige toxische Effekte nahelegte. Dexamethason dagegen war auch noch bei 25 µg/mL mit einem Wert von $0,853 \pm 0,015$ ($n=3$) bezogen auf die Kontrolle nicht toxisch. Das Polyphenol Taxifolin mit $0,794 \pm 0,003$ ($n=3$) bei 25 µg/ml konnte in seiner Versuchskonzentration von 15,21 µg/mL als unproblematisch angesehen werden. Dagegen zeigte Silibinin bei 25 µg/mL mit einem Faktor von $0,685 \pm 0,007$ ($n=3$) Eigenschaften im wenig toxischen Bereich nach 48 Stunden. Mit der Verlängerung der Inkubationszeit lagen nun auch die vier Urolithine mit jeweils unter einem Faktor von 0,6 bei 10 µg/mL im wenig toxischen Bereich in Bezug auf die Negativ-Kontrolle der CaCo-II-Zellen (Urolithin A $0,532 \pm 0,006$ ($n=3$), Urolithin B $0,573 \pm 0,004$ ($n=3$), Urolithin C $0,558 \pm 0,005$ ($n=3$), Isourolithin A $0,582 \pm 0,021$ ($n=3$)). Die Ergebnisse für Urolithin B sind in Abbildung 16 exemplarisch dargestellt. Über 48 h, verglichen mit 24 h, zeigten das racemische Hydnocarpin D und die beiden Enantiomere nochmal einen deutlich toxischen Effekt, der für 25 µg/mL bei allen drei Stoffen unter 0,1 lag (Racemat D $0,072 \pm 0,067$ ($n=3$), (+)-Hydnocarpin D $0,080 \pm 0,029$ ($n=3$), (-)-Hydnocarpin D $0,083 \pm 0,011$ ($n=3$)). M1 lag erneut mit einem Faktor von $0,965 \pm 0,018$ ($n=3$) bei 10 µg/mL im nicht-toxischen Bereich. Für die Positiv-Kontrolle Zink(II)-chlorid lagen die Werte zwischen $0,025 \pm 0,020$ und $0,251 \pm 0,003$ (jeweils $n=3$) bei den Versuchen über 48 Stunden. Hinsichtlich der statistischen Analysen ließ sich festhalten, dass die Substanzen, welche in diesem Testsystem einen wenig toxischen bis toxischen Effekt zeigten, auch statistisch signifikant unterschiedlich von der Negativ-Kontrolle laut einer ANOVA mit nachfolgender multiplen Vergleichstestung waren.

Zytotoxizität von Urolithin B

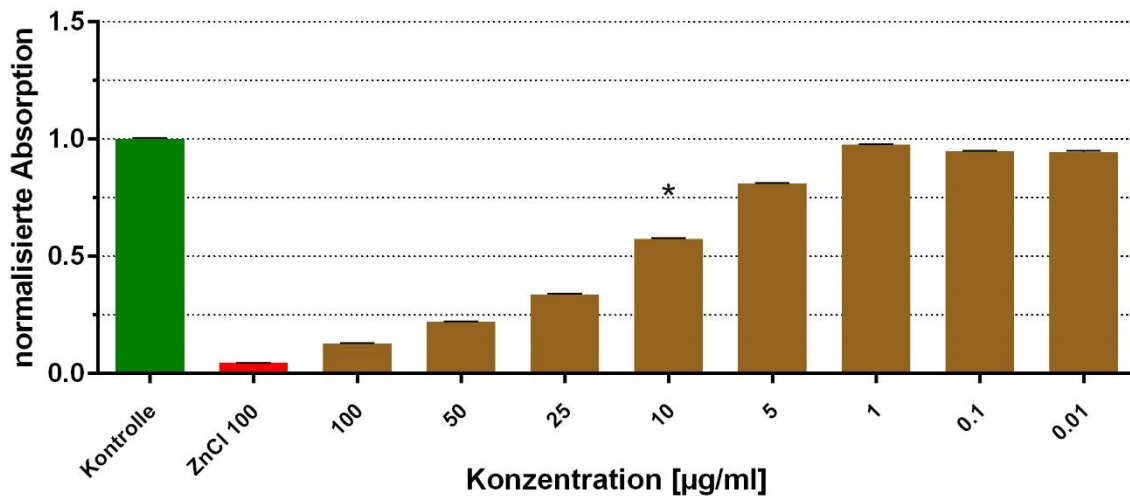


Abbildung 16 Zytotoxizität von Urolithin B auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 48 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin B sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n=3$ und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt die von der unbehandelten Negativ-Kontrolle statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 10,61 µg/mL als wenig toxisch kennzeichnet.

Zusätzlich wurde noch die Zytotoxizität der Substanzen auf die CaCo-II-Zellen in Kombination mit 100 µg/mL Gallensäuren und pH 6 getestet, um schädliche Einflüsse dieses Gemisches für die weiterführenden Transportversuche mit physiologischeren Bedingungen auszuschließen. Für die beiden Kontrollen sowie für sämtliche Polyphenole zeigten sich im Inkubationszeitraum von zwei bis vier Stunden geringe zytotoxische Effekte. Die Ergebnisse für Urolithin C sind in nachfolgender Abbildung exemplarisch dargestellt (siehe Abbildung 17). Lediglich das racemische Hydnocarpin D und (+)-Hydnocarpin D lagen etwas unter dem selbstgewählten Grenzfaktor von 0,8. Sie konnten aber basierend auf anderen Grenzen aus der Literatur wie 0,7 ebenso als nicht toxisch angesehen werden. Auch hier lagen für Zink(II)-chlorid die Werte zwischen $0,074 \pm 0,004$ und $0,367 \pm 0,008$ (jeweils $n=3$) im stark toxischen Bereich. Statistisch betrachtet zeigten sich die verwendeten Konzentrationen entweder als nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrolle oder im signifikant unterschiedlichen Fall waren die Zellen unter dem Einfluss der Testsubstanz viabler als unter Kontrollbedingungen.

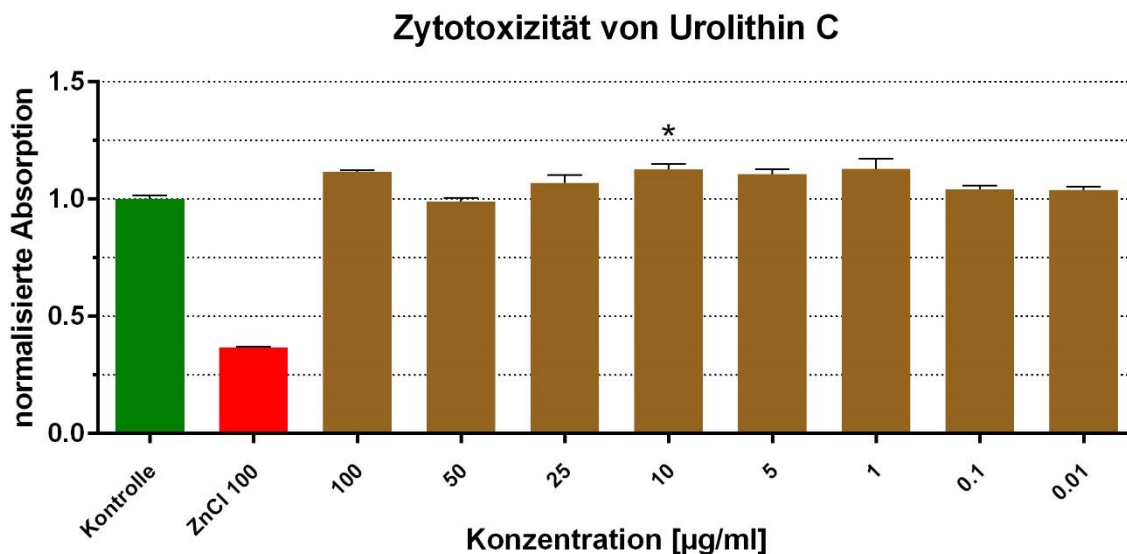


Abbildung 17 Zytotoxizität von Urolithin C auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation mit 100 µg/mL Gallensäuren und pH 6 über vier Stunden in HBSS. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin A sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit $n=3$ und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt hier die statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 12,21 µg/mL als unbedenklich kennzeichnet.

1.1.2 Diskussion

Für DMSO konnte ein zelltoxischer Effekt der eingesetzten Konzentration von 1 % (V/V) als Lösungsvermittler in den Polyphenollösungen und somit eine Verfälschung der Messergebnisse nach sowohl 24 als auch 48 Stunden ausgeschlossen werden. Diese Grenzkonzentration wurde auch in weiteren Versuchen verwendet (siehe Allgemeiner Teil 4.3). Erst ab höheren Konzentrationen > 1 % konnten toxische Auswirkungen detektiert werden. In der Literatur wird in vergleichbaren Versuchen, die allerdings eine deutlich kürzere Inkubationszeit hatten, basierend auf Ergebnissen von Neutralrot- sowie Laktatdehydrogenaseversuchen als Marker für die Integrität der Zellmembran eine Unbedenklichkeit dieser geringen Konzentration an DMSO nahegelegt [158]. Aufgrund der zusätzlich zufriedenstellenden Löslichkeit der Substanzen nach Zusatz der DMSO-Konzentration wurde diese in den eigenen Versuchen verwendet.

Für Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle konnte mit 100 µg/mL eine geeignete Konzentration für die CaCo-II-Zellen bestimmt werden. Diese Konzentration wurde auch bereits in anderen Studien verwendet [159, 160].

Für die physiologischen Bedingungen in den Transportversuchen wurden die zytotoxischen Effekte von einer pH-Wert-Änderung sowie nach Zusatz von Gallensäuren untersucht. Die Untersuchungen zeigten einen nicht toxischen pH-Bereich von 5,93 bis 8,86 und somit konnte pH 6 bedenkenlos als Versuchsbedingung Anwendung finden. *Palm et al.* detektierten in ihrer Studie ebenfalls keinen negativen Effekt auf die Zellmonolayer zwischen pH 4,8 und 8,0, was die eigenen Ergebnisse stützt [161]. Natürlicherweise kann man im menschlichen Magen-Darm-Trakt nach dem Magen, zwischen Duodenum und Rektum, von einem pH-Bereich zwischen ungefähr 5,6 und 7,3 ausgehen [162], sodass gerade im absorptionsrelevanten Dünndarm ein pH-Wert von 6 durchaus realistisch ist [163]. Pro Tag werden bis zu 700 mL Galle in den Darm sezerniert [26]. In Kombination mit der vorhandenen Flüssigkeit im Darm kann man so auf einen täglichen Umsatz von ungefähr 10 g Gallensäuren kommen, die zu 90 Prozent über ein aktives Transportsystem im Ileum wieder resorbiert werden [26]. Beim Menschen ist die Gesamtmenge an Gallensäuren mit 3 - 5 g am ganzen Organismus verhältnismäßig gering, wird jedoch über den enterohepatischen Kreislauf sechs bis zehn Mal jeden Tag umgewälzt [26]. Insgesamt wird die Konzentration an Gallensäuren im Darm bei 1 - 10 mM angenommen [164]. In Anbetracht dieser enormen Mengen und Vorgängen im Magen-Darm-Trakt erscheint die gewählte Konzentration an Gallensäuren in den Versuchen mit 100 µg/mL als durchaus sinnvoll gewählt. Zumal die beiden Bestandteile dieses Zusatzes zu den primären und damit häufigsten Gallensäuren zählen [26, 165]. Für Desoxycholsäure ließ sich in Studien bereits ein förderlicher Effekt auf die Viabilität von CaCo-II-Zellen nach Exposition gegenüber toxischen Substanzen [166]. 100 µM an unkonjugierten Gallensäuren zeigten in weiteren Experimenten keinen signifikanten negativen Effekt auf diese Zellen [167].

In einer Testreihe mit den jeweiligen Polyphenolen (1000 - 0,1 µg/mL beziehungsweise 100 - 0,01 µg/mL) konnten für diese über einen Zeitraum von zwei bis vier Stunden keine toxischen Effekte auf die Zellen nachgewiesen werden, was die weiterführenden Versuche unter physiologischeren Bedingungen ermöglichte. Die Anpassung des pH-Wertes und der Zusatz von Gallensäuren zum Testsystem hatte somit keinen verstärkenden Einfluss auf die Zytotoxizität der Substanzen. Versuche mit einer Kombination von 100 µM Chenodesoxycholsäure und einem Extrakt aus der Dattelpalme, welcher reich an Flavonoiden wie Anthocyane ist, waren hinsichtlich schädlicher Einflüsse auf CaCo-II-Zellen unauffällig [168]. In niedrigen Konzentrationen um 50 µM zeigten auch die Polyphenole aus der Apfelbeere in einem Kulturmedium zusammen mit Gallensäuren keinen negativen Effekt auf die Viabilität von CaCo-II-Zellen [169]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den eigenen Resultaten.

Für Ciprofloxacin als Modellarzneimittel für den p-GP-vermittelten Transport konnte die eingesetzte Konzentration von 20 µM als unbedenklich identifiziert werden, was sich auch mit Ergebnissen aus der Literatur deckt, die die Substanz erst mit einem höheren IC₅₀-Wert

von $51,8 \pm 27 \mu\text{g/mL}$, bei dem 50 Prozent der Zellen gestorben sind, als moderat zytotoxisch bezeichnen [170].

Für die Verwendung der beiden Kontrollen, Verapamil und Dexamethason, und sämtlicher Polyphenole in den Transport- und Genexpressionsversuchen sollte idealerweise eine geeignete, übereinstimmende Konzentration über die Zytotoxizitätsversuche identifiziert werden, sodass sich die Ergebnisse besser aufeinander beziehen und vergleichen lassen. Diese konnte mit $50 \mu\text{M}$ für jede Substanz erfolgreich bestimmt werden. Für Verapamil zeigte sich in Studien, dass die Zellviabilität von $100 \mu\text{M}$ über 120 Minuten nicht statistisch signifikant negativ beeinflusst wurde [117] sowie über einen Zeitraum von vier Stunden bei $100 \mu\text{M}$ keine Erniedrigung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle stattfand [62], was mit den eigenen Ergebnissen zu vereinbaren war. Jedoch legten diese Versuche auch einen Trend der zeitlichen Abhängigkeit der Toxizität nahe, was wiederum den negativeren Einfluss einer 48-Stunden-Inkubation mit Verapamil erklärt. Für die Plausibilität der Unbedenklichkeit einer Konzentrationsreihe von $0,01$ bis $100 \mu\text{g/mL}$ Dexamethason, sowohl nach 24 und nach 48 Stunden, spricht die Verwendung dieser Substanz in der oralen Arzneimitteltherapie mit einer durchschnittlichen Tagesdosis von vier bis acht Milligramm.

Pro Tag werden mit ungefähr einem Gramm an Polyphenolen, davon circa 40 bis 80 Milligramm Flavonoide, signifikante Mengen konsumiert [171, 172]. Legt man im Darm eine maximale Flüssigkeitsmenge von etwa 0,5 Liter zugrunde [45], so ergibt das eine tägliche Konzentration von $2000 \mu\text{g/mL}$ an Polyphenolen. Es gilt zu beachten, dass dieser Wert schwierig zu erfassen ist, regionalen Unterschieden unterworfen sein und von Ernährungsgewohnheiten und dem Angebot an Nahrung abhängig sein kann, was zu einer Überschätzung führen könnte, sodass der tatsächliche Wert auch unter 10 mg am Tag liegen könnte [173]. Da es sich allerdings um ein Gemisch aus einer großen Vielzahl von diesen pflanzlichen Sekundärstoffen handelt, erscheint die in den Neutralrotversuchen detektierte, gemeinsam verwendbare Konzentration von jeweils $50 \mu\text{M}$ der Substanz, was im Bereich von $10,4$ bis $24,12 \mu\text{g/mL}$ liegt, als durchaus plausibel. Für Taxifolin konnte in Studien in einen Zeitraum von vier Stunden für einen Konzentrationsbereich bis $1000 \mu\text{M}$ (entspricht $304,24 \mu\text{g/mL}$) und von 48 Stunden für einen Bereich bis $100 \mu\text{M}$ (entspricht $30,42 \mu\text{g/mL}$) keine Toxizität auf die CaCo-II-Zellen gezeigt werden [174]. Im MTT-Assay zeigte sich für $40 \mu\text{M}$ (entspricht $12,17 \mu\text{g/mL}$) Taxifolin ebenso über einen Zeitraum von 24 Stunden keine Zytotoxizität, die Zellviabilität lag immer noch bei $99,48 \%$ [94]. Dies deckt sich weitestgehend mit eigenen Versuchen über 24 und 48 Stunden, wobei die Werte für den längeren Inkubationsbereich an der Grenze zum nicht-toxischen Bereich liegen. Einschränkend muss man hier auf die verringerte Stabilität von Taxifolin im Zellkulturmedium hinweisen (siehe Allgemeiner Teil 1.2). In Stabilitätsuntersuchungen konnte für diesen Stoff eine Abnahme der Konzentration um circa 75% nach 24 Stunden

festgestellt werden, was auch zu einer Erklärung der nicht-toxischen Effekte beitragen kann. Silibinin zeigte in den Versuchen einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität als Taxifolin, da sie nach 24 Stunden schon an der Grenze und nach 48 Stunden dann komplett im gering schädlichen Bereich lag. In anderen Versuchen konnte für Silibinin, das zu den am meisten aktiven Flavolignanen zählt, für 50 und 100 µg/mL ebenso ein signifikanter zytotoxischer Effekt mit 42 % und 52 % Mortalität ermittelt werden [175]. Über einen deutlich kürzeren Zeitraum von zwei Stunden scheint dieser Stoff dagegen bis zu einer Konzentration von 200 µM keine negativen Effekte auf CaCo-II-Zellen aufzuweisen [176], was der Zeit in eigenen Transportversuchen entspricht. Für Urolithin A und Urolithin B konnte für eine Konzentration von 40 µM sowohl über 24 ($87,4 \pm 4,9$ % (A) und $83,0 \pm 13,6$ % (B)) als auch über 48 Stunden ($81,0 \pm 6,9$ % (A) und $87,0 \pm 5,9$ % (B)) noch eine sehr hohe Viabilität festgestellt werden [177]. *Gonzales-Sarrias et al.* beobachteten in ihren Versuchen für 50 µM beziehungsweise 100 µM von Urolithin A, B und C nach 24 und 48 Stunden eine hohe Viabilität von jeweils über 90 % und somit auch keine zytotoxischen Eigenschaften dieser Urolithine [178]. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch in den eigenen Neutralrotversuchen nicht hinreichend bestätigen. Lediglich über den 24 Stunden Zeitraum decken sich die Ergebnisse. Bei einer Inkubation über 48 Stunden wiesen die Urolithine geringe toxische Eigenschaften mit Zellviabilitäten von 50 bis 60 % auf. Werte zu Isourolithin A finden sich nur sehr wenige, jedoch wurde aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu Urolithin A dessen Werte als Vergleichsgrundlage herangezogen. Im MTT-Assay konnte für die vier verwendeten Urolithine in anderen Studien eine Abwesenheit von Zytotoxizität für eine Konzentration von 10 µM nachgewiesen werden, da nach fünf Tagen noch immer mehr als 90 % der Zellen am Leben waren [179], allerdings war diese Konzentration deutlich geringer im Vergleich zu den eigenen Versuchen. Von den verwendeten Polyphenolen zeigten das racemische Hydnocarpin D und seine beiden Enantiomere den schädlichsten Einfluss auf die CaCo-II-Zellen. So waren bereits nach 24 Stunden weniger als 50 % der Zellen bei jeder der drei Substanzen noch vital. Innerhalb von 48 Stunden fiel die Viabilität dann sogar auf unter 10 %, was eine aussagekräftige Verwendung vor allem in den Genexpressionsversuchen sehr erschwerte. Für (-)-Hydnocarpin D konnte auch an anderer Stelle eine moderate zytotoxische Wirkung auf HT-29- und HL60-Zellen festgestellt werden [180]. Bemerkenswert für diese Stoffe, ebenso wie für Silibinin, war der Verlauf der Ergebnisse in den jeweiligen Konzentrationsreihen: mit steigender Konzentration fiel die Absorption von Neutralrot kontinuierlich ab, was angesichts der umgekehrten Proportionalität der Zellzahl Sinn ergibt. Jedoch gab es ab einer bestimmten Konzentration einen Wendepunkt und die Absorption stieg wieder an. Diese vermeintlich hohe Zellzahl bei höheren Konzentrationen war wohl weniger mit abnehmenden toxischen Eigenschaften der Substanz als mit einer verminderten Löslichkeit in diesem Bereich erklärbar, da hohe Konzentrationen dieser vier Stoffe eher milchige als klare Lösungen ergaben. Sedimentiert nun dieser ungelöste Anteil, so kann das Neutralrot

während der Inkubationszeit an dieses Sediment binden und die Messung verfälschen. Zwar kann ungelöste Substanz nur verminderte zytotoxische Effekte ausüben, allerdings wird das an das Sediment gebundene Neutralrot durch den Waschschrift während der Untersuchung nicht mehr entfernt, sodass die Anzahl an viablen Zellen nicht aussagekräftig detektiert werden kann. Für die Evaluierung des Einsatzes der drei Hydnocarpine in den Transportversuchen wurden zusätzliche Zytotoxizitätsversuche über einen Zeitraum von vier Stunden durchgeführt. Das Racemat und (+)-Hydnocarpin D lagen nun nur noch knapp unter dem selbstgewählten nicht toxischen Bereich und (-)-Hydnocarpin D hatte keine schädlichen Eigenschaften mehr, was die drei Substanzen für Transportversuche qualifizierte. Der Catechinmetabolit M1 übte weder nach 24 h noch nach 48 h eine Toxizität aus, weswegen es für die weitere Verwendung in Versuchen bezüglich der Konzentration keine Einschränkungen gab. Allerdings zeigte er sich in den Stabilitätsuntersuchungen als sehr instabil (siehe Allgemeiner Teil 1.2), weshalb Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen unter dem Stabilitätsaspekt kritisch diskutiert werden müssen. In Zellkulturmedium war nach kurzer Zeit bereits keine Substanz mehr nachweisbar. Jedoch war in den Zytotoxizitätsversuchen ein niedrigerer Proteingehalt im Medium vorhanden. Diese Erkenntnisse sind aber auch aufgrund der Unbedenklichkeit seiner Stammsubstanz Catechin naheliegend, da in Studien erst eine deutlich höhere Konzentration von $146,7 \pm 5,1 \mu\text{g/mL}$ in der Lage war, die Hälfte der Zellen abzutöten [181]. Der konzentrationsabhängige, zytotoxische Effekt des Metaboliten M1, aber auch allgemein von Polyphenolen mit Phenol-Strukturen, in der Zellkultur ist mit diesem oxidationsempfindlichen Strukturmerkmal erklärbar, welches über leichte Bildung von Oxidationsprodukten wie Chinonen oder Wasserstoffperoxid in Kulturmedium indirekt schädliche Auswirkungen haben kann [182, 183].

Für die Flavonoide lassen sich strukturelle Eigenschaften beschreiben, die für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sind. So fördert das Vorhandensein der 2,3-Doppelbindung, einer 4-Carbonylgruppe und ein B-Ring, der unter Umständen zudem ortho-hydroxyliert ist, diese Eigenschaft [184]. Vor allem die Catecholstruktur am B-Ring führt über Redoxreaktionen mit Metallionen und Radikalbildung zu schädigenden Effekten [185] und kann zytotoxische Level an Wasserstoffperoxid generieren. Stark steigt die zytotoxische Eigenschaft von Flavonoiden durch O-Methylierung und Glucuronidierung im Metabolismus oder mit sinkender Anzahl an Hydroxygruppen und folglich steigender Lipophilie an [184]. Zudem scheint die Zytotoxizität auch mit der Größe und Komplexität der Moleküle zu korrelieren, sodass Oligomerisierung der Flavonoide zu polymeren Substanzen einen schädigenden Einfluss hat [186]. Jedoch ist aufgrund der schlechten Absorptionsrate dieser polymeren Polyphenole, wenn auch mögliche Einflüsse von Metaboliten noch unentdeckt sein können, eine generalisierte toxische Wirkung im Körper jenseits des Magen-Darm-Traktes unwahrscheinlich [187]. Bemerkenswert war über die gesamten Neutralrotversuche, dass für mehrere Substanzen in den niedrigen

Konzentrationen einer Reihe eine höhere Absorption in der Probe im Vergleich zur Kontrolle messbar war, was bedeuten würde, dass nach den Inkubationszeiträumen mehr lebendige Zellen vorhanden waren. In den Versuchen befinden sich die Zellen in einer Stresssituation, wogegen die Polyphenole in diesen niedrigen Konzentrationen möglicherweise zellprotektive Eigenschaften entfalten können (siehe Einleitung 3). An dieser Stelle kann speziell die postulierte Wirkung dieser pflanzlichen Stoffe gegen reaktive Sauerstoffspezies erwähnt werden, welche die Zellen vor schädlichen Einflüssen bewahren kann (siehe Allgemeiner Teil 2). Für bestimmte Polyphenole konnte in Studien schon eine Induktion der generellen Genexpression sowie des zellulären RNA-Gehaltes unter Verwendung geringer Konzentrationen gezeigt werden [188], inwieweit das allerdings für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stoffe der Fall ist, müsste weiterführend untersucht werden. Daneben ist auch schon ein membranverändernder Effekt bestimmter Flavonoide über Interaktion mit der Lipidschicht beschrieben worden [189], der neben potentieller Modellierungen von Zellprozessen durch die eingesetzten Substanzen auch eine erhöhte Aufnahme von Neutralrot und damit eine höhere Absorption erklären würde.

Kritisch im Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse ist zum einen die unterschiedlich verwendeten Testsysteme mit teilweise variierenden Zellen oder Versuchsmethoden in der Literatur und die damit einhergehende schwierige Vergleichbarkeit. Zum anderen wurden bei den hier durchgeführten Versuchen Zellen aus einem Kolonkarzinom verwendet, sodass der Effekt nicht direkt mit dem auf gesunde, humane Zellen übertragen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die für die nachfolgenden Versuche eingesetzten Konzentrationen der Substanzen für Kontrollen, physiologischere Bedingungen oder als Modellsubstanz für den Vergleich der Ergebnisse der Polyphenole unbedenklich eingesetzt werden konnten, ohne einen toxischen oder negativen Einfluss auf die weiteren Versuche zu haben. Selbiges gilt auch für die polyphenolischen Stoffe über einen Zeitraum von 24 Stunden in den Transport- und Genexpressionsversuchen mit Einschränkung für die drei Hydnocarpine, die sich nur über einen deutlich kürzeren Zeitbereich als tauglich für die Transportversuche erwiesen. Aufgrund der Zytotoxizität der Hydnocarpine sowie aller Stoffe über 48 Stunden wird eine Verwendung in den Genexpressionsversuchen eingeschränkt, was an dieser Stelle mit den Ergebnissen aus diesen Expressionsuntersuchungen zu p-GP in Bezug gesetzt werden muss.

1.2 Stabilität

Neben der Zytotoxizität ist die Stabilität der Substanzen in den verschiedenen Medien ein grundlegender Faktor, um die Aussagekraft der Ergebnisse einordnen zu können. Die Versuche zur Genexpression fanden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit seinen Supplementen fetales bovines Serum (FBS), nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA) und Penicillin-Streptomycin-Lösung (PEST) statt. Für die Transportversuche wurde dieses gegen die Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), welche vorab mit Natriumhydrogencarbonat und 2-Ethansulfonsäure als Puffersubstanzen versetzt wurde, getauscht. Somit galt es die Polyphenole und die Referenzstoffe hinsichtlich ihrer Stabilität in diesen beiden Lösungen zu evaluieren.

Zur Präzisierung der Frage, ab welcher Abweichung die Flavonoide konkret als stabil angesehen werden, gibt es kontroverse Angaben. So ziehen Studien auf der einen Seite beispielsweise eine geringere Abweichung von maximal zehn Prozent in der Peakfläche als Maß für die Stabilität heran [190]. Auf der anderen Seite können auch relative Konzentrationen größer als 50 % für die meisten dieser pflanzlichen Stoffe eine gute Stabilität im Puffer suggerieren [94]. Kleinere Restkonzentrationen weisen auf Instabilitäten hin, was für eine schlechte Permeabilität und geringe P_{app} -Werte verantwortlich sein kann [94]. DMEM ist zwar das mit am meisten genutzte Zellkulturmedium, eine negative Beeinflussung der Polyphenolstabilität wurde jedoch beobachtet [129]. Das Medium kann eine Isomerisierung und Hydrolyse dieser Substanzen beeinflussen, weswegen eine genaue Evaluierung der Stabilität unter den experimentellen Bedingungen unerlässlich ist, um falsche Schlussfolgerungen aus Transportversuchen zu vermeiden [129]. Für Bestandteile aus grünem Tee wurden beispielsweise in wässrigen Lösungen Autooxidationen und Epimerisierungen beobachtet [191]. Anfällig für solche redoxreaktionsbedingten Abbauprozesse ist die Catecholstruktur am B-Ring [185]. Die Anwesenheit von Zellen im Versuchssystem kann jedoch die Ergebnisse von Stabilitätsuntersuchungen wieder relativieren [192]. Sekretierte Enzyme können beispielsweise einen Substanzabbau begünstigen, allerdings kann die Stabilität auch durch mögliche Adsorption an zelluläre Proteine erhöht werden [192]. Darüber hinaus sind die initiale Konzentration, die Temperatur, die Anwesenheit und Konzentration von Proteinen und der pH-Wert ausschlaggebende Parameter für die Stabilität [192].

1.2.1 Ergebnisse

Bei den Messungen im gewöhnlichen DMEM-Zellkulturmedium ergab sich ein homogenes Bild und die meisten Substanzen wiesen nach einer Inkubation über 24 Stunden eine Stabilität zwischen $80,50 \pm 0,67$ und $130,78 \pm 5,18$ % auf. Alle Ergebnisse repräsentierten

den Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (siehe Experimenteller Teil 3.2). Die vier Urolithine A, B, C sowie Isourolithin A waren im Zellkulturmedium sehr stabil, da ihre Konzentrationen über dem Untersuchungszeitraum knapp unter oder sogar deutlich über dem Referenzwert von 100 Prozent zum Zeitpunkt 0 lagen (A $102,16 \pm 5,13 \%$, B $130,78 \pm 5,18 \%$, C $93,21 \pm 7,59 \%$, Isourolithin A $101,51 \pm 1,20 \%$). Ebenso zeigte sich das racemische Hydnocarpin D mit einer Stabilität von $102,49 \pm 11,49 \%$ nach 24 Stunden und seine beiden Enantiomere mit $102,71 \pm 1,91 \%$ (+) und $107,09 \pm 9,51 \%$ (-) als sehr stabil in diesem Medium. Für die beiden Kontrollen Verapamil und Dexamethason war ebenfalls kein nennenswerter Substanzverlust über den Zeitraum erkennbar ($117,30 \pm 13,39 \%$ und $91,43 \pm 9,27 \%$). Am unteren Bereich für die stabilen Substanzen lag Silibinin, was allerdings mit $80,50 \pm 0,67 \%$ nach der Inkubation in Kulturmedium noch eine ausreichende Beständigkeit hatte (siehe Abbildung 18). Taxifolin und der Metabolite M1 waren hingegen unzureichend stabil. Taxifolin lag nach 24 Stunden noch bei $27,06 \pm 1,73 \%$ von der Ausgangsmenge, womit knapp 75 % des ursprünglichen Stoffes um- oder abgebaut wurden. Dieser Rückgang war jedoch erst zu späteren Zeitpunkten zu erkennen, sodass die Substanz über mindestens drei Stunden als ausreichend stabil angesehen werden konnte. Der Metabolit M1 wurde äußerst schnell abgebaut, sodass nach 24 Stunden keine Startsubstanz mehr auffindbar war. Dieser Rückgang war bereits nach einigen Minuten zu bemerken.

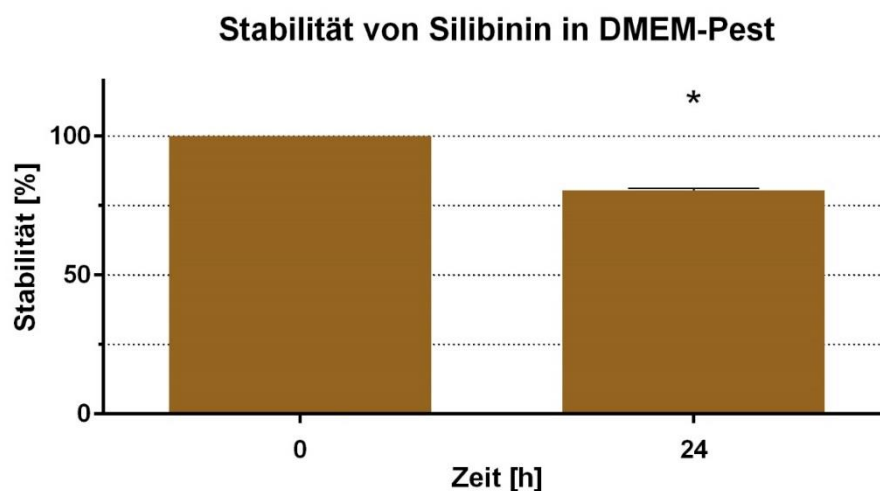


Abbildung 18 Stabilität von Silibinin in Zellkulturmedium DMEM-Pest über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dargestellt sind die Referenzfläche in Prozent zum Zeitpunkt 0 sowie nach erfolgter Inkubation mit jeweils $n=3$. Zwar war die Stabilität nach dieser Zeitspanne signifikant niedriger als zum Ausgangszeitpunkt (*), allerdings konnte die Substanz dennoch als ausreichend stabil angesehen werden.

Die Untersuchungen mit dem gepuffertem HBSS-Versuchsmedium fanden über einen deutlich kürzeren Zeitraum verglichen mit dem Zellkulturmedium statt, weswegen die

Stabilität der Substanzen nur über vier Stunden evaluiert wurde. Hierbei zeigte sich für alle Stoffe mit einem Bereich von $83,22 \pm 10,24$ bis $144,24 \pm 45,49$ % eine ausreichend hohe Stabilität für die Transportversuche. Für die Urolithine galt, dass sie über den Versuchszeitraum wieder knapp unter beziehungsweise über der Marke von 100 % im Vergleich zum Zeitpunkt 0 lagen (A $126,58 \pm 22,69$ %, B $94,00 \pm 6,12$ %, C $98,94 \pm 4,41$ %, Isourolithin A $101,63 \pm 6,88$ %). Die beiden Kontrollen Verapamil und Dexamethason waren ebenfalls stabil ($144,24 \pm 45,49$ % und $102,22 \pm 1,70$ %). Bei dem Hydnocarpin D wurde aufgrund der hohen Stabilität im Zellkulturmedium DMEM für sowohl Racemat als auch Enantiomere, lediglich die racemische Variante vermessen, da jeweils nur sehr wenig Substanz vorhanden war. Sie erwies sich zwar mit $83,22 \pm 10,24$ % als am wenigsten stabile Substanz in HBSS, allerdings konnte das immer noch als ausreichend angesehen werden. In HBSS war auch der Metabolit M1 mit einem Wert von $106,65 \pm 15,94$ % stabil. Taxifolin mit $92,99 \pm 10,86$ % (siehe Abbildung 19) und Silibinin mit $96,02 \pm 5,81$ % lagen beide nur knapp unter 100 % und damit in einem sehr guten Bereich.

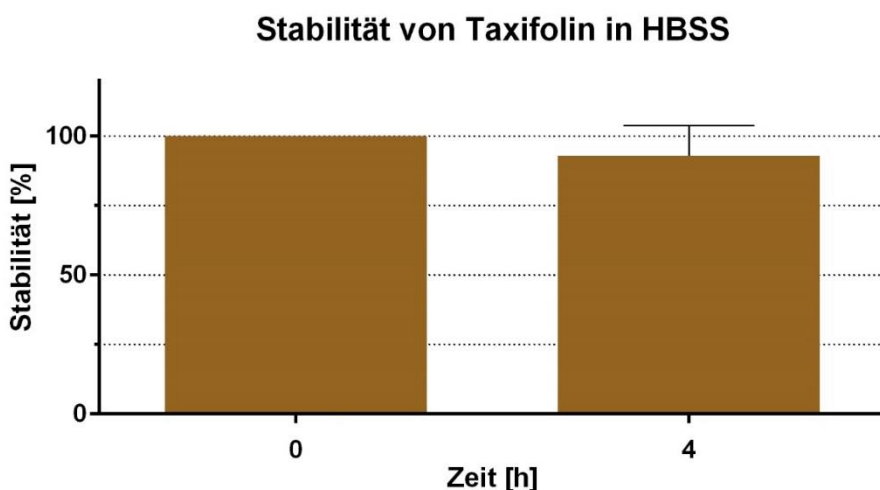


Abbildung 19 Stabilität von Taxifolin in Versuchsmedium HBSS über einen Zeitraum von 4 Stunden. Dargestellt sind die Referenzfläche in Prozent zum Zeitpunkt 0 sowie nach erfolgter Inkubation mit jeweils $n=3$. Die Stabilität nach dieser Zeitspanne war nicht signifikant niedriger als die der Kontrolle, weswegen die Substanz als ausreichend stabil angesehen wurde.

1.2.2 Diskussion

Die Stabilität in der Zellkultur ist für individuelle Polyphenole sehr unterschiedlich. Abhängig von strukturellen Merkmalen werden manche schon nach relativ kurzer Zeit signifikant abgebaut, andere dagegen sind auch über längere Zeiträume von ein paar Stunden stabil [192]. Die Anwesenheit mehrerer Hydroxylgruppen, speziell am B-Ring und der C-C-Doppelbindung, erniedrigen die Stabilität, wohingegen Glykosylierung und Methylierung diese erhöhen [192]. Neben diesen Merkmalen stellt die Fähigkeit der

Polyphenole an Proteine oder Plastikbestandteile über sowohl reversible als auch irreversible Prozesse zu binden, einen negativen Einflussfaktor dar [193, 194]. Auf diesem Weg kann auch ein Teil der eingesetzten Menge dieser Stoffe für die Detektion verborgen bleiben und Instabilitätsvortausch der Substanzen ist die Folge.

In einer wässrigen Lösung kann zudem der pH-Wert eine Auswirkung auf die Stabilität der Polyphenole haben. In Studien zeigte sich dies zuvor für bestimmte Substanzen bei sauren pH-Werten von 2 bis 4, aber auch für alkalische Bereiche ab 9, in denen sich die Stoffe schnell umgewandelt oder abgebaut haben [195]. Im Bereich von 5 bis 9 zeigten sich Monomere stabiler als Dimere, mit einer erhöhten Stabilität im tieferen pH-Bereich für beide Substanzarten und für Monomere bei neutralem pH von 7,4 [195]. Jedoch gilt es festzuhalten, dass die Stabilität von Polymeren von der Expositionszeit gegenüber den jeweiligen pH-Werten abhängt. Vor allem die stark sauren Werte werden bei Nahrungsaufnahme nochmal abgepuffert, womit in vivo eine andere Stabilität als in vitro Versuchen zu erwarten ist [196, 197]. Im Licht dieser Ergebnisse erschienen die beiden pH-Werte von 6 und 7,4, die in den eigenen Versuchen verwendet wurden, plausibel. Sie hatten keine negativen Einflüsse auf die Versuchsergebnisse, zudem handelte es sich bei den Polyphenolen um Monomere. Auch konnte am Beispiel der Urolithine schon früh gezeigt werden, dass diese in Anwesenheit von Gallensäuren stabiler waren [198]. Diese beiden Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass die Vermessung der Polyphenole unter physiologischeren Bedingungen mit Zusatz von Gallensäuren und einem angepassten pH-Wert in den nachfolgenden Transportversuchen ohne vorherige Überprüfung der Stabilität durchgeführt werden konnte. Daher wurden die Stabilität der Polyphenole lediglich in HBSS untersucht und auf die Zugabe von Gallensäuren sowie die Variation des pH-Wertes verzichtet.

Die zu untersuchenden Substanzen wiesen in beiden Flüssigkeiten eine gute Stabilität auf. Strukturelle Merkmale, welche die Substanz anfällig für Um- und Abbau machen, schienen somit in den Versuchszeiträumen hinreichend stabil zu sein. Um deutlich negativeren Effekte auf die Stabilität nach einem Zeitraum von 48 Stunden vorzubeugen, wurde in Genexpressions- und Zytotoxizitätsversuchen, die diese Inkubationszeit erforderten, das Medium und damit die jeweilige Substanz nach 24 Stunden getauscht und erneuert. So stellt dieser Bereich die maximale Zeitspanne dar, über die die Substanzen in der vorliegenden Arbeit stabil sein mussten.

Für die Urolithine war sowohl in DMEM als auch in HBSS in den jeweiligen betrachteten Zeiträumen keinerlei Instabilität erkennbar, da der Gehalt prozentual in der Nähe des Anfangswertes für alle vier Substanzen lag. Weder die diversen OH-Gruppen der Urolithine und die Catecholstruktur von Urolithin C, noch eine mögliche Proteinbindung im DMEM hatten offenbar einen negativen Einfluss auf die Stabilität. Auch andere Untersuchungen

beobachteten nach vier und zwölf Stunden Inkubation in einem anderen Zellkulturmedium (endothelial cell growth medium (ECGM)) bereits für Urolithin A und B eine hohe Stabilität [199]. Dagegen schien Urolithin C bei einer Inkubation bei Raumtemperatur über sechs Stunden in Plasma nicht sehr stabil zu sein, da der Gehalt über diesen Zeitraum signifikant abnahm [200], was mit einem erhöhten Proteingehalt in Plasma im Gegensatz zu dem eingesetzten Zellkulturmedium in den eigenen Versuchen zusammenhängen könnte und darüber erklärbar wäre. Diese Instabilität scheint daher erst bei höheren Proteinkonzentrationen relevant zu werden. *Garcia-Villalba et al.* führten Versuche zur Methodenentwicklung mit den Urolithinen durch und konnten diese in einer methanolischen Arbeitslösung zu je 20 µM nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über 50 Stunden als stabil charakterisieren, da die Peakfläche bei der Auswertung nur um maximal sechs Prozent abwich [190].

Beim Hydnocarpin D schien eine Instabilität nicht mit den Enantiomeren in Zusammenhang zu stehen und auch hier galt, dass diese Substanz uneingeschränkt in beiden Medien benutzt werden konnte. Für Hydnocarpin D konnte an anderer Stelle schon in Nanopartikeln über 24 Stunden eine sehr gute Stabilität nachgewiesen werden [201], was die eigenen Ergebnisse dahingehend stützt, dass es sich um eine nicht strukturelle Substanz handelt. Die Ergebnisse aus weiteren Versuchen wären damit nicht durch Instabilität verfälscht. Dasselbe galt für das Polyphenol Silibinin, welches keinen signifikanten Abbauprozessen in den betrachteten Zeiträumen unterlag. In einer alkoholischen Tinktur war Silybin, strukturell bis auf stereochemische Aspekte dem Silibinin entsprechend, über einen Zeitraum von 90 Tagen weitestgehend stabil [202]. Dies stützt die eigenen Erkenntnisse. Bindungen an Bestandteile der Lösungen und abbauende Prozesse aufgrund struktureller Merkmale schienen in den Versuchszeiten somit nicht stattzufinden.

Die Einschränkung hinsichtlich der Stabilität betraf lediglich Taxifolin und den Metaboliten M1. Jedoch waren beide über 4 h in HBSS hinreichend stabil und konnten uneingeschränkt verwendet werden, nur im Zellkulturmedium kam es zu deutlicher Degradierung. In vorherigen Studien zeigte sich Taxifolin nach einer einstündigen Inkubation in HBSS bei pH 7,4 und 37 °C als stabil [203], was tendenziell die eigenen Ergebnisse plausibel erscheinen lässt. Im gewöhnlichen DMEM-Zellkulturmedium zeigten sowohl Taxifolin als auch der M1 ausgeprägte Instabilitäten. Taxifolin lag nach 24 Stunden in einem Bereich, in dem kein Effekt der Substanz mehr erwartet werden konnte. Allerdings ließ sich bei diesem Stoff im zeitlichen Verlauf der Inkubation ein früher ausgeprägter Abbau erkennen, der sich in der Folge verlangsamte. Bei der Interpretation weiterer Ergebnisse zu Taxifolin ist also die Möglichkeit zu erwägen, dass es in der frühen Inkubationsphase einen Einfluss auf die Zellen ausüben kann. Der M1 dagegen war schon nach einigen Minuten nicht mehr im Zellkulturmedium nachweisbar, was mögliche Ergebnisse hinsichtlich eines Effektes je nach Fragestellung schwierig zu interpretieren macht. Strukturell ist die geringe

Stabilität wahrscheinlich durch die Catecholstrukturen beider Stoffe erklärbar und auch eine hohe Affinität zu Proteinen, welche in ihrem Ausmaß die deutliche Konzentrationserniedrigung ermöglichen würde, ist, vor allem für den M1, möglich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die eingesetzten pflanzlichen Stoffe über die versuchsrelevanten Zeiträume für alle weiteren Versuche eine ausreichende Stabilität aufwiesen. Für den Einsatz in den Transportversuchen erwiesen sich alle als hinreichend stabil. Sämtliche weiterführende Ergebnisse sollten dementsprechend valide interpretierbar sein. Für Taxifolin und den M1 sollten für Zytotoxizitäts- sowie Genexpressionsversuche ihre verringerte Stabilität in die Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden.

2 Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole

2.1 Hintergründe

Die gesundheitsförderlichen Effekte von vielen Früchten, Samen oder Nüssen werden mit ihrem hohen Anteil an Polyphenolen mit antioxidativer Wirkung in Verbindung gebracht [204]. Flavonoide aus der Gruppe der Polyphenole sind essentiell für die Pflanze zur Protektion vor oxidativem Zellschaden. Diese antioxidativen Eigenschaften können auch Krankheiten, beispielsweise mit einer neurodegenerativen Pathogenese, günstig beeinflussen [126]. Es gibt starke Hinweise darauf, dass die Entwicklung von kognitiver Alterung sowie zerebralen Erkrankungen in Verbindung mit der schädlichen Wirkung freier Radikale auf Proteine, Lipide und Nukleotide steht, da das Gehirn einen hohen Anteil an oxidativem Metabolismus aufweist [205]. In vielen Studien konnten verschiedene Flavonoide dem oxidativen Stress entgegen wirken [205]. Zusätzlich wurde bereits festgestellt, dass die Aufnahme von Obst und Gemüse mit hohem Gehalt an antioxidativen Stoffen antioxidative Komponenten, wie α - oder β -Carotine im menschlichen Blut erhöhen kann [206].

Reaktive Sauerstoffspezies ist ein Sammelbegriff für aus Sauerstoff entstandenen Substanzen, die sowohl oxidierbare Stoffe, welche leicht zu Radikalen werden können, als auch freie Radikale enthalten [207]. Freie Radikale sind definiert als eine Spezies, die unabhängig existieren können und mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen [207]. Sie werden im Körper als Teil des physiologischen Metabolismus gebildet und sind hochreaktiv, weswegen eine Reihe von Verteidigungsmechanismen im Organismus existieren, um die Interaktion mit beispielsweise Fettsäuren, DNA oder Proteinen zu verhindern [207, 208]. In gesunden Individuen ist die Bildung solcher reaktiven Spezies und die Kapazität des Verteidigungssystems normalerweise ausbalanciert [207]. Oxidativer Stress hat schädigende Einflüsse und entsteht ab dem Punkt, an dem die körpereigene Abwehr überlastet ist oder als Folge von physiologischem Stress [208]. So kann er zu diversen Krankheiten einen Beitrag leisten: Zum einen kann er Krankheiten, beispielsweise in der Kanzerogenese, selbst verursachen, zum anderen ist er nicht selbst der Grund für eine Krankheit, kann aber zur Pathologie beitragen [207]. Drittens kann er aber auch bei einer Krankheit auftreten, diese jedoch nicht verstärken [207]. Auch der Alterungsprozess wird teilweise in degenerativen Prozessen aus den Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies vor allem in den Mitochondrien begründet [209, 210]. Allerdings sind diese Stoffe auch essentiell für physiologische Prozesse, wie der Energieproduktion, der Signalübertragung in Zellen oder der Funktion des Immunsystems, weswegen sie täglich zu einem gewissen Maße gebildet werden müssen [209].

Bei den Flavonoiden sind bestimmte strukturelle Merkmale für die Ausbildung der Eigenschaft, Radikale abzufangen, nötig. So sind eine ortho-Dihydroxylstruktur am B-Ring oder am A-Ring, die C-C-Doppelbindung im C-Ring, in zusätzlicher Konjugation zu einer Ketogruppe sowie die Anwesenheit einer 3-Hydroxyl- und einer 5-Hydroxylgruppe relevante Bauteile (siehe Abbildung 20) [192, 208].

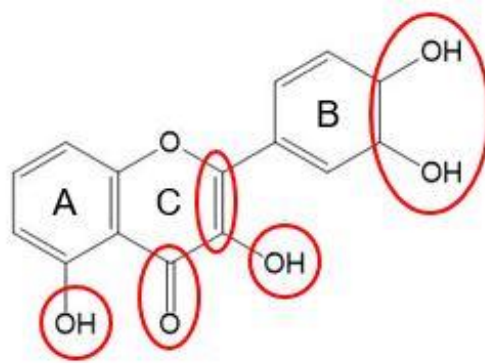


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Grundstruktur der Flavonoide mit relevanten Merkmalen für die antioxidative Aktivität. Die ortho-Dihydroxylstruktur, die Doppelbindung, die Ketogruppe sowie die beiden Hydroxylgruppen sind farbig markiert (modifiziert nach [208]).

Diese Eigenschaften decken sich auch mit den Strukturmerkmalen, die zu erhöhter Instabilität von Polyphenolen führen, da hier ein leichter Abbau stattfinden kann [192]. Die sogenannte Catecholstruktur am B-Ring ist für eine antioxidative Aktivität wohl am meisten relevant, kann jedoch dann auch als Pro-Oxidans Makromoleküle wie DNA oder Proteine schädigen [185, 211]. Weitere Strukturmerkmale dienen vorwiegend der Elektronen-delokalisation, um eine weitere Reaktion zu toxischen Verbindungen möglichst zu unterbinden und sind für eine gute Radikalfängereigenschaft und eine antioxidative Aktivität wichtig [208]. Ferner scheinen auch stereochemische Merkmale und der Grad an Polymerisierung einen Einfluss zu haben [212]. Für die antioxidative Fähigkeiten sind zwei Bedingungen von Bedeutung: Zum einen sollte ein Antioxidans in geringeren Konzentrationen als das oxidierbare Substrat vorliegen, um eine Verzögerung oder Verhinderung von Autooxidation und Radikal-induzierte Oxidation zu erreichen [213]. Zum anderen muss das gebildete freie Radikal nach dem Elektronenabfang durch strukturelle Merkmale stabil gegenüber weiterer Oxidation sein [213]. Die antioxidative Aktivität kann zudem auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen, wie dem Einfang freier Radikale, der Inhibierung von Enzymen, der Unterdrückung von Singulett-Sauerstoff oder der Chelatisierung von Übergangsmetallen [207]. Der Mechanismus basiert entweder auf einem Wasserstoffatomtransfer oder einem Einzelelektronentransfer zwischen dem freien Radikal und einem Oxidans [214]. Letzterer spielt im FRAP- (ferric reducing antioxidant power) Assay eine Rolle, bei dem ein Einzelelektron vom Antioxidanz auf das Oxidanz übertragen wird, was Fe(III) als Oxidationsmittel bewerkstelligt [214]. Er beurteilt demnach

die antioxidative Aktivität von Substanzen in biologischen Flüssigkeiten oder wässrigen Lösungen anhand ihrer eisenreduzierenden Kraft [210]. Allerdings ist auch eine Lösung der Substanzen in beispielsweise Methanol möglich, wobei man beachten sollte, den Fe(II)-Standard sowie alle Referenzen ebenfalls in diesem Lösungsmittel zu verarbeiten, um falsche Schlüsse oder Ergebnisse zu vermeiden [210].

Beim FRAP-Assay findet bei niedrigem pH-Wert eine Reduktion eines Eisenkomplexes statt, bei der eine intensiv blaue Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 593 nm entsteht [215]. Eine Versuchsdauer von vier Minuten scheint für den Versuch ausreichend zu sein, da der Komplex über diese Zeit stabil ist [215]. Es ist ein schneller und leicht durchführbarer Test, dessen Reaktion linear und reproduzierbar hinsichtlich der eingesetzten molaren Konzentration der Antioxidantien ist [215]. Gegenüber anderen Tests bietet er den Vorteil, über eine kolorimetrische Reaktion die Substanzen direkt zu vermessen und nicht wie bei anderen Tests über eine indirekte Messung der Hemmung von vorher generierten freien Radikalen abzulaufen [210]. Somit wurde dieser Test in der vorliegenden Arbeit verwendet. *Pellegrini et al.* kamen beim Vermessen von häufig gebräuchlichen Nahrungsmitteln, wie Obst, Gemüse oder Pflanzenölen, zu drei unterschiedlichen Ergebnissen für die antioxidative Kapazität der Bestandteile, wobei drei verschiedene Assays aufgrund von Unterschieden im Versuchsaufbau oder der Auswertung verwendet wurden [216]. Dies zeigt, dass es für einen Vergleich der Aktivität von verschiedenen Substanzen essentiell ist, diese mit dem gleichen Assay zu vermessen. Das hauptsächliche Ergebnis des FRAP-Assays ist der EC_{1-} (equivalent concentration) Wert, der die Konzentration an Antioxidanz darstellt, die die gleichen reduzierenden Effekte wie eine 1 mM Fe(II)-Lösung aufweist [210]. Es gilt, je größer dieser Wert ist, desto geringer ist die antioxidative Kapazität einer Substanz [210]. Darüber hinaus lässt sich für einen Stoff noch die Reaktionskinetik durch Auftragung der Absorption gegen die Versuchsdauer oder die Dosis-Effekt-Beziehung über Auftragung der Konzentration gegen die Absorptionsänderung aus diesem Versuch bestimmen. Die Kinetik liefert eine Aussage darüber, ob ein Stoff im Zeitintervall keine, eine gleichbleibende oder eine sich erst entwickelnde antioxidative Kraft besitzt. Sind bei der Dosis-Effekt-Beziehung die Zusammenhänge linear, so kann man von einer konzentrationsabhängigen Kapazität ausgehen.

2.2 Ergebnisse

Es wurde die jeweilige antioxidative Aktivität der Untersuchungssubstanzen ermittelt und durch Vergleich mit den beiden Kontrollen Ascorbinsäure und Trolox bewertet. Für die Berechnung des EC_{1-} -Wertes einer jeden Substanz wurde die Absorption einer ein

millimolaren Eisen(II)-sulfat-Lösung jeweils mit den Geradengleichungen aus den Absorptionen einer Konzentrationsreihe eines Stoffes verrechnet und so in Relation gesetzt (siehe Experimenteller Teil 2). Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Messungen je Substanz.

Für die beiden Referenzkontrollen Ascorbinsäure und Trolox ergaben sich Werte von $14,83 \pm 1,12 \mu\text{M}$ und $16,21 \pm 1,60 \mu\text{M}$ für ihre reduktive Kraft beziehungsweise ihre antioxidative Aktivität. Die untersuchten Polyphenole zeigten ein sehr heterogenes Ergebnisbild und lassen sich in aktive, wenig aktive und nicht aktive Stoffe unterteilen (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Einteilung der Polyphenole hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität.

Substanzen		EC ₁ -Werte
Aktiv	Taxifolin, Urolithin A, Urolithin C, M1	7 - 18 μM
Wenig aktiv	Silibinin, racemisches Hydnocarpin D	46 - 77 μM
Nicht aktiv	Urolithin B, Isourolithin A	> 1000 μM

Die EC₁-Werte der aktiven Substanzen lagen zwischen 7 und 18 μM , die wenig Aktiven in einem Bereich von 46 bis 77 μM und die nicht aktiven bei Werten deutlich größer als 1000 μM . Mit einem Wert von $7,09 \pm 0,41 \mu\text{m}$ erwies sich Urolithin C als Substanz mit der höchsten antioxidativen Kapazität, gefolgt von dem Catechinmetaboliten M1, der mit $12,18 \pm 0,34 \mu\text{M}$ ebenfalls reaktiver als die beiden Referenzen war. Bei beiden wurde auch mittels einer ANOVA mit multipler Vergleichstestung ein statistisch signifikant höheres reduktives Potential als bei den zwei Referenzsubstanzen nachgewiesen. Für Taxifolin ließ sich mit $14,92 \pm 0,37$ ein ähnlicher Wert wie bei der Ascorbinsäure ermitteln und Urolithin A ($17,95 \pm 0,22 \mu\text{M}$) zeigte sich nur geringfügig weniger aktiv als die Referenz Trolox. Taxifolin war im Vergleich zu beiden Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich, hatte demnach also die gleiche antioxidative Fähigkeit. Urolithin A war die einzige Substanz, die signifikant weniger aktiv als Ascorbinsäure war. Verglichen mit Trolox zeigte Urolithin A keinen statistisch signifikanten Unterschied und konnte hinsichtlich der antioxidativen Kapazität gleichgesetzt werden. Viel schlechtere reduktive Fähigkeiten wurden für die beiden Substanzen Silibinin ($46,43 \pm 1,71 \mu\text{M}$) und racemischem Hydnocarpin D ($76,75 \pm 1,73 \mu\text{M}$) ermittelt. Die beiden waren den Kontrollen statistisch signifikant unterlegen. Die EC₁-Werte der Substanzen und der Kontrollen sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (siehe Abbildung 21). Mit $1315,67 \pm 2,11 \mu\text{M}$ für Urolithin B sowie $3667,26 \pm 1665,27 \mu\text{M}$ für

Isourolithin A wurden die beiden höchsten EC_{10} -Werte gemessen, weswegen bei diesen beiden Polyphenolen von keiner antioxidativen Kapazität mehr gesprochen werden konnte und sie keiner weiteren Auswertung unterzogen wurden.

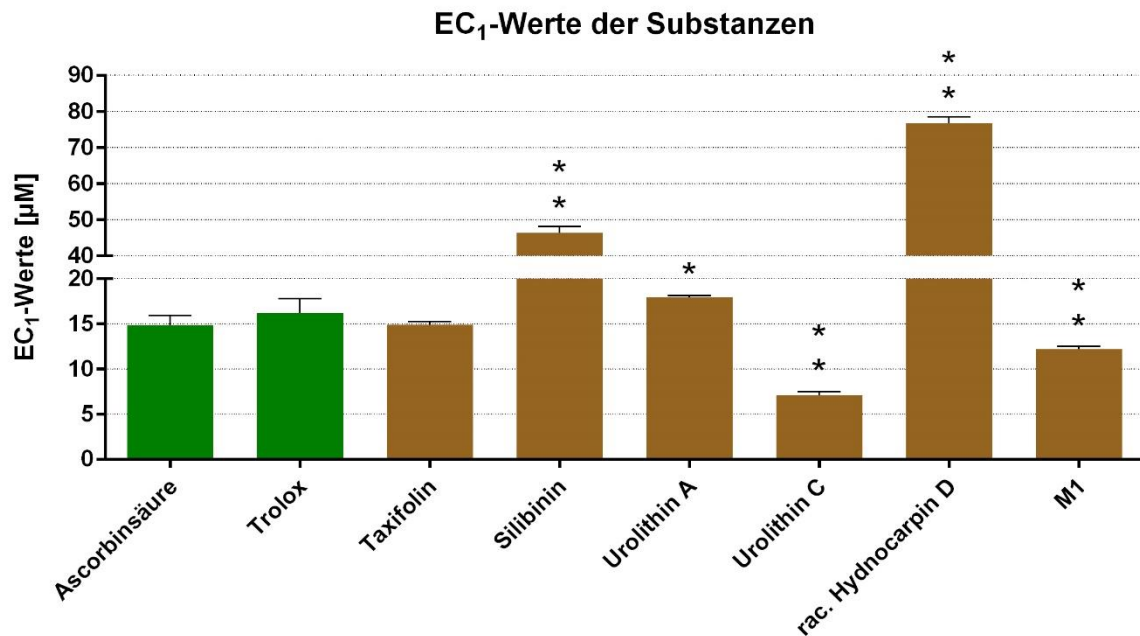


Abbildung 21 EC_{10} -Werte aus den FRAP-Versuchen für die beiden Kontrollen und die einzelnen Substanzen. Im Vergleich zu den zwei Referenzen waren Urolithin C und der M1 signifikant aktiver. Taxifolin hatte eine äquivalente Aktivität. Urolithin A war signifikant aktiver als Ascorbinsäure, jedoch nicht verglichen mit Trolox. Silibinin sowie racemisches Hydrocarpin D waren deutlich inaktiver als die Referenzen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit $n=5$ und die jeweilige Standardabweichung. Die markierten Säulen (**) waren statistisch signifikant unterschiedlich zu beiden Kontrollen, die andere markierte Säule (*) nur zur Ascorbinsäure. Taxifolin war nicht signifikant unterschiedlich zu den Referenzen. Urolithin B und Isourolithin A wurden hier nicht mit aufgeführt.

Aus den Resultaten lässt sich durch Korrelation der Absorptionen mit den Konzentrationen der Substanzen ein Dosis-Effekt-Diagramm generieren (siehe Abbildung 22). Hierüber lassen sich Aussagen zu Dosis-Wirkungsbeziehungen der untersuchten Stoffe über den Verlauf und die Steigung ihrer Geraden treffen. Auch hier zeigte sich das Bild für die Untersuchungssubstanzen heterogen. Zwar waren alle Geraden linear, was für eine konstante oder keine Zunahme der Absorption spricht, jedoch stieg diese bei Urolithin C deutlich steiler an als bei zum Beispiel dem racemischen Hydrocarpin D. Ein steilerer Anstieg charakterisiert die zunehmende antioxidative Aktivität mit einer steigenden Konzentration des Stoffes. Für manche Stoffe führte somit eine Erhöhung der Konzentration auch zu einem stärkeren Anstieg der reduktiven Eigenschaften. Dies ließ sich mit der antioxidativen Aktivität korrelieren: je höher diese war, desto steiler war die Gerade für diesen Stoff. Auch hier lagen Urolithin C und der M1 über den Referenzen Ascorbinsäure

und Trolox, Taxifolin war beinahe deckungsgleich zu diesen und Urolithin A war knapp darunter. Zusätzlich lässt sich in diesem Diagramm Eisen(II)-sulfat darstellen, welches in diesem Versuch eine geringere Aktivität als die vorher genannten Substanzen zeigte. Silibinin und das racemische Hydnocarpin D zeigten auch hier kaum Effekte und Urolithin B sowie Isourolithin A wurde nicht mit aufgeführt.

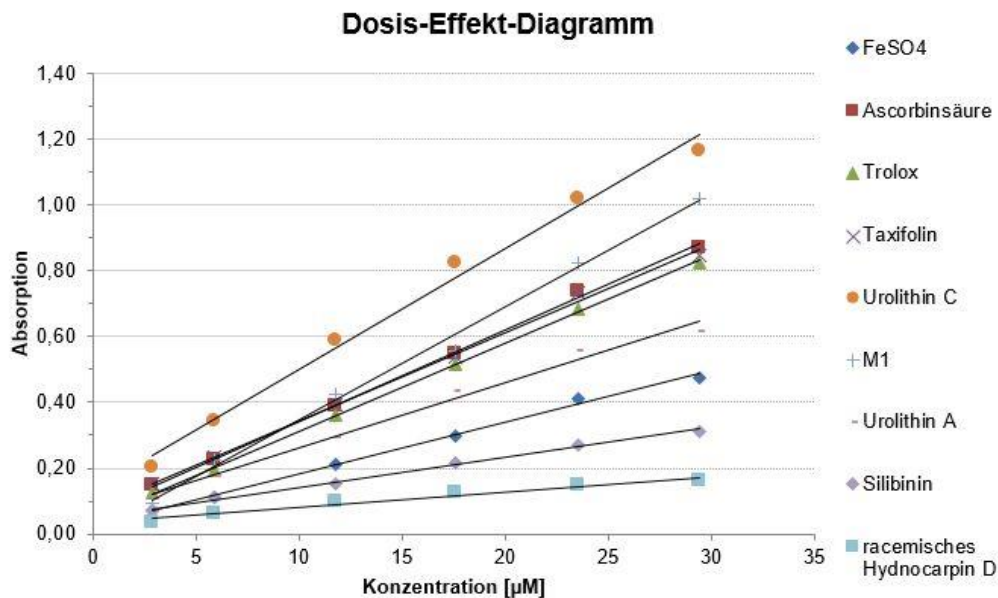


Abbildung 22 Dosis-Effekt-Diagramm für die Substanzen. Sämtliche Geraden für die Substanzen sind linear steigend, was eine konstante Zunahme der antioxidativen Kapazität mit höheren Konzentrationen nahelegt. Je steiler eine Gerade ist, desto schneller bildet sich dieser Effekt aus. Dieser nimmt mit steigender allgemeinen antioxidativen Aktivität zu, sodass Urolithin C mit der größten Kraft auch die größte Steigung aufweist. Die Geraden für Urolithin C und den M1 liegen über denen der Referenzen und Taxifolin kann als nahezu deckungsgleich bezeichnet werden. Sämtliche weitere Substanzen inklusive Eisen(II)-sulfat selbst liegen darunter entsprechend ihrer sinkenden Aktivität. Dargestellt sind die Geraden der Stoffe aus einer Reihe von sechs Konzentrationen mit $n=5$.

In einer weiteren Auswertung kann eine Aussage zur Kinetik der antioxidativen Aktivität getroffen werden. Durch Auftragung der Absorption der 0,1 mM Lösung für einen Stoff gegen die Zeit über den Versuchszeitraum von vier Minuten, erhält man einen zeitlichen Verlauf der antioxidativen Fähigkeiten für jede Substanz und kann diese dadurch in gewisse Gruppen einordnen (siehe Abbildung 23). Ascorbinsäure, Trolox, Eisen(II)-sulfat und der M1 wiesen im Versuchszeitraum keine Änderung der Absorption auf, was dafürspricht, dass ihre antioxidative Kraft konstant war. Urolithin C und Taxifolin konnten als schnelle Ausbilder ihrer antioxidativen Aktivität charakterisiert werden, da sich ihr Kurvenverlauf recht schnell auf einem Plateau einstellte. Bei Silibinin, Urolithin A und das rac. Hydnocarpin D dagegen stieg die Kurve über den gesamten Versuchszeitraum an und bildete kein Plateau aus. Demnach vergrößerten sich ihre reduktiven Kapazitäten stetig.

Für eine genaue Evaluierung des Zeitpunktes ihrer vollen antioxidativen Aktivität wären weiterführende Versuche nötig gewesen.

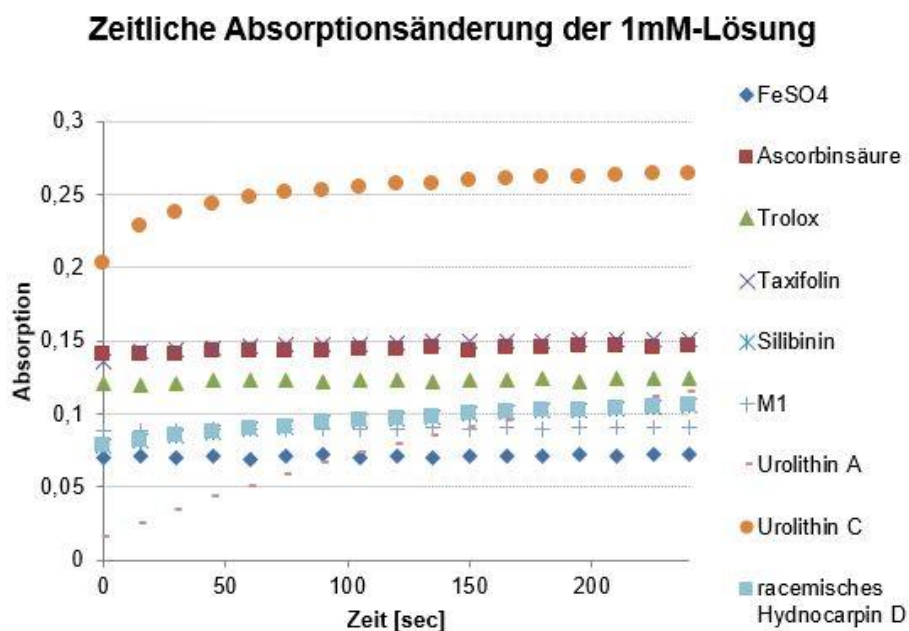


Abbildung 23 Zeitliche Verläufe einer ein millimolaren Lösung der jeweiligen Substanzen über den Versuchszeitraum von vier Minuten. Ascorbinsäure, Trolox, Eisen(II)-sulfat und der M1 zeigten eine konstante Absorption und folglich keine Änderung der antioxidativen Kapazität. Urolithin C und Taxifolin näherten sich schnell einem Plateau an, bildeten somit ihre Fähigkeiten recht schnell aus. Urolithin A, Silibinin und das racemische Hydnocarpin D dagegen zeigten über den Zeitraum eine stetig steigende Absorption und damit eine konstante Erhöhung der reduktiven Kraft. Messungen fanden für jede Substanz alle 15 Sekunden statt.

2.3 Diskussion

Für das Ausmaß der antioxidativen Kapazität der untersuchten Verbindungen ließ sich eine absteigende Reihenfolge festlegen: Urolithin C > M1 > Ascorbinsäure > Taxifolin > Trolox > Urolithin A > Silibinin > racemisches Hydnocarpin D. Die beiden Substanzen Urolithin B und Isourolithin A wurden hierbei aufgrund ihrer Inaktivität nicht mehr aufgeführt. Für die Einordnung der Ergebnisse gilt es zu beachten, dass die Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln zu verschiedenen Werten aus den Tests führt und somit vor allem eine Charakterisierung über Tendenzen angebracht ist [210].

Die in den eigenen Versuchen ermittelte Reihenfolge kann auf Basis der strukturellen Merkmale, die für eine antioxidative Aktivität notwendig sind [208], für die Substanzen erklärt werden (siehe Abbildung 34, Allgemeiner Teil 4.4). Konsequenter Weise hat Urolithin C unter den Urolithinen die größte Aktivität, da es als einziges über eine Catecholstruktur im Molekül verfügt, was ein wichtiger Punkt für die Ausbildung

antioxidativer Eigenschaften ist. Danach folgt Urolithin A, das sich zwar ohne eine solche Struktur zeigt, allerdings eine OH-Gruppe in räumlicher Nähe zur Ketogruppe besitzt, um so über mögliche Elektronendelokalisation eine reduktive Kraft auszubilden. Hier liegt der Unterschied zu Isourolithin A, welches durch Isomerisierung aus Urolithin A entsteht, und bezogen auf die angesprochene OH-Gruppe einen zu großen räumlichen Abstand zur Ketogruppe aufweist, um antioxidative Eigenschaften zu entwickeln. Urolithin B besitzt nur eine OH-Gruppe in deutlicher räumlicher Trennung zur Ketogruppe, weswegen auch dieser Stoff keine antioxidativen Aktivitäten aufweist. Taxifolin verfügt wieder über eine Catecholstruktur am B-Ring und zudem über eine Hydroxylgruppe in unmittelbarer Nähe zur Ketogruppe, womit seine Aktivität im Bereich der Referenzen von der Struktur her erklärbar ist. Silibinin und das racemische Hydnocarpin D sind beides größere Moleküle und sich strukturell durchaus ähnlich, was ihre gemeinsame Einordnung im wenig aktiven Bereich erklären kann. Eine Catecholstruktur ist hier aufgrund von methylierten Hydroxylgruppen nicht zu finden. Lediglich am A- und am C-Ring weisen sie mit einer OH-Gruppe in unmittelbarer Nähe zur Ketogruppe (Silibinin und rac. Hydnocarpin D) sowie einer C=C-Doppelbindung in Nachbarschaft zur Ketogruppe (rac. Hydnocarpin D) Merkmale für eine reduktive Kapazität auf. Die schwächere Aktivität von racemischem Hydnocarpin D trotz einem zusätzlichen Merkmal mit der Doppelbindung in Nachbarschaft zur Ketogruppe im Vergleich zu Silibinin konnte nicht geklärt werden. Der Metabolit M1 ist wiederum ein recht kleines Molekül mit einer Catecholstruktur an einem Phenolring, der nicht durch etwaige Elektronendelokalisation stabilisiert werden kann. Das legt eine hohe Aktivität nahe.

Im Vergleich mit anderen Studien bestimmten *Pulido et al.* für die beiden Referenzen Ascorbinsäure und Trolox einen EC_{1-} -Wert von $392 \pm 8 \mu\text{M}$ und einen von $322 \pm 17 \mu\text{M}$, allerdings unter anderen Lösemittelbedingungen [210], was die abweichenden Werte in eigenen Versuchen erklärt. Übereinstimmungen zu den eigenen Ergebnissen sind in den antioxidativen Fähigkeiten von M1 und Taxifolin zu finden. So wurde bereits für den M1 ein EC_{1-} -Wert von $10,64 \pm 0,42 \mu\text{M}$ sowie für Taxifolin ein Wert von $28,89 \pm 4,94 \mu\text{M}$ und damit eine statistisch signifikante, fast dreimal niedrigere antioxidative Kapazität für Taxifolin gegenüber M1 ermittelt [217]. Für den Metaboliten M1 befand sich der Wert aus den eigenen Versuchen in einer ähnlichen Größenordnung wie in der erwähnten Studie und auch eine stärkere antioxidative Kraft im Vergleich zu Taxifolin konnte gezeigt werden. Jedoch war der in den eigenen Studien gemessene EC_{1-} -Wert von Taxifolin deutlich geringer, was sich mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären lässt. Ferner zeigte sich Taxifolin als das dominante Polyphenol unter den Monomeren nach einer Extraktion aus Kiefernrinde in einer weiteren Studie [218]. Im FRAP-Assay wies dieser Extrakt eine hohe antioxidative Kapazität, ausgedrückt in Milligramm Troloxäquivalenten pro Gram Rindenextrakt, auf [218]. Zu diesem Schluss kam auch eine weitere Studie, bei der die Fraktion eines Extraktes mit dem höchsten Anteil an freiem Taxifolin auch die

höchste antioxidative Eigenschaft in Milligramm Ascorbinsäureäquivalenten, bezogen auf das Trockengewicht in Gramm, aufwies [219] Diese beiden Studien stützen die eigenen Ergebnisse zur antioxidativen Fähigkeit von Taxifolin.

Bei der Vermessung von Nanopartikeln, die unter anderem mit Taxifolin und Silibinin beladen waren, konnte mit sinkendem totalem Gehalt an Silymarin auch eine Erniedrigung der Werte aus dem FRAP-Assay und folglich eine Steigerung der antioxidativen Kapazität festgestellt werden, was sich möglicherweise mit dem steigenden prozentualen Anteil an Taxifolin erklären lässt [220]. So konnte auch in eigenen Versuchen ein Unterschied zwischen den Aktivitäten beider Stoffe gezeigt werden, wobei Taxifolin deutlich potenter als Silibinin war. Diese geringe antioxidative Kapazität von Silibinin wird zusätzlich durch eine Studie gestützt, bei der Silybin A, eine stereochemische Variante von Silibinin, mit $0,06 \pm 0,00$ Äquivalenten von Fe^{2+} als sehr wenig aktiv charakterisiert wurde [221]. Auch Hydnocarpin D besaß in einem DPPH-Test keine nennenswerten antioxidativen Aktivitäten, was die Erkenntnisse aus den eigenen Untersuchungen bestätigt [222].

Für die Urolithine wurde bereits für Urolithin A, B und C mit 1,29 mM, 7,92 mM und 2,68 mM als Konzentrationen, die einen Absorptionsanstieg im gleichen Rahmen wie eine 1 mM Fe^{2+} -Lösung zeigten, verglichen Trolox mit einer Konzentration von 0,527 mM eine schwächere Wirkung bestimmt [223]. Auch hier sind die abweichenden Werte mit unterschiedlichen Bedingungen verglichen mit den eigenen Versuchen erklärbar. Lediglich die Tendenz, dass Urolithin B das am wenigsten potente Urolithin war, stimmt hier überein. An anderer Stelle konnte dagegen auch Urolithin C mit stärkster antioxidativer Aktivität verglichen mit Ascorbinsäure und auch Urolithin A charakterisiert werden [224]. Die eigenen Ergebnisse zeigten ebenso eine höhere Aktivität des Urolithin C gegenüber Urolithin A, was strukturell durchaus nachvollziehbar war, sowie eine antioxidative Kapazität, die nahe der der Referenzsubstanz Trolox lag. Die Urolithine stellen hinsichtlich der antioxidativen Eigenschaften ein stark beforschtes Feld dar. Für Urolithin A sind die reduktiven Eigenschaften schon oft, unter anderem nach oraler Gabe bei Mäusen, belegt worden [225]. Mittels des ORAC-Assays wurde auch den Metaboliten Urolithin A und B eine stärkere antioxidative Wirkung als der Muttersubstanz nachgewiesen [226]. *Tomas-Barberan et al.* stellten in ihrer Arbeit die Ergebnisse von einigen Studien aus der Literatur zusammen, welche die Fähigkeiten der verschiedenen Urolithine hinsichtlich der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies bestätigen [227]. Das Phänomen der erhöhten antioxidativen Aktivität im Plasma nach Verzehr von Erdbeeren [228] beruht wohl auf der Bildung von unter anderem Urolithin A durch das Mikrobiom, da die totale Konzentration an Polyphenolen nach dem Essen unverändert bleibt und auch Vitamin C keinen nennenswerten Beitrag leistet [229]. Dies stimmt mit der eigenen Charakterisierung dieses Stoffes überein.

Zusammenfassend ist erwartungsgemäß die Abhängigkeit der antioxidativen Kapazität von den strukturellen Eigenschaften einer Substanz bestätigt worden. Die Substanzen lassen sich auf Basis von Erkenntnissen aus der Literatur hinsichtlich der reduktiven Kraft von pflanzlichen Stoffen sinnvoll in Relation setzen und im Hinblick von Referenzsubstanzen einordnen.

3 Verkürzung der Kulturzeit von CaCo-II-Zellen für Transportversuche

3.1 Aspekte der Zellkultur

Für reproduzierbare Ergebnisse sind die adäquate Kultivierung der CaCo-II-Zellen sowie der richtige Umgang mit dieser Zelllinie sehr wichtig [230]. Nach dem Auftauen von Zellaliquots sollten die Zellen zwei- bis dreimal vor der Verwendung in Versuchen passagiert werden sollten, damit sichergestellt ist, dass sich der Phänotyp stabilisiert [105]. In der weiteren Kultur finden die CaCo-II-Zellen in einer Zellkulturflasche mit Dulbecco's Modified Eagle Medium, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem bovinem Serum, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren und 1 % einer 100 U/mL Penicillin-Streptomycin-Lösung supplementiert wurde, mit 37 °C und einer Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % optimale Bedingungen vor (siehe Experimenteller Teil 4.2) [92, 230]. Der Zusatz des Serums aus biologischen Quellen zum Kulturmedium ist wegen der adäquaten Versorgung mit Hormonen, Haftungs- sowie Wachstumsfaktoren, wie den Transforming Growth factor, und anderen, für Zellwachstum und Differenzierung wichtigen Substanzen, essentiell [231]. Die exakte Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist sehr variabel und hängt vom genauen Zelltyp ab [231]. Jedoch ist eine Serumkonzentration von 10 % des Gesamtvolumens wichtig, da nur so die adäquate Ausbildung von Tight-junctions und p-Glykoprotein für Transportversuche gewährleistet ist [232]. Über den Zusatz von nicht-essentiellen Aminosäuren werden die Zellen mit wichtigen Bestandteilen für den Stoffwechsel versorgt, die, wie beispielsweise Glutamin, für das Zellwachstum hauptverantwortlich sind und deren Fehlen zur verringerten Expression von Tight-junction-Protein oder zur Apoptose führen würde [99]. Die Penicillin-Streptomycin-Lösung als Supplement stellt sicher, dass sich während der Kulturzeit keine Bakterien zusätzlich in den Flaschen ansiedeln. In Studien konnte dieses Standardmedium mit Zusatz von einer Penicillin-Streptomycin-Lösung als unproblematisch für die Transportversuche charakterisiert werden [100].

Das Kulturmedium kann die Biologie der CaCo-II-Zellen über seine physiko-chemischen Eigenschaften oder über seine Zusammensetzung beeinflussen, was sich durch Auswirkungen auf Differenzierung, Proliferation, Permeabilität und Morphologie äußern kann [99]. Ein Mediumwechsel sollte alle zwei bis drei Tage stattfinden, um eine ausreichende Nährstoffversorgung sicherzustellen [92]. Eine Variation in der Frequenz dieses Wechsels moduliert auch Wachstum und Differenzierung, da die enthaltenen Wachstumsfaktoren nicht konstant zur Verfügung stehen [99]. Sind die Zellen etwa zu 70 - 90 % konfluent, ist es notwendig, sie zu passagieren, um sie weiterhin in Kultur halten zu können und um ihre volle Genexpression aufrecht zu erhalten [92, 99]. Speziell für p-GP,

das ein wichtiger Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, nimmt die Aktivität der Expression ab, wenn erst nach voller Konfluenz passagiert wird [37, 99]. Andere Studien sprechen sich dagegen für eine Passagierung der Zellen nach maximal 50 % Konfluenz aus, da hier noch ein stabilerer Erhalt der Wachstumsphase gezeigt werden konnte und die Architektur des polarisierten Monolayers besser war [233]. In den eigenen Versuchen wurden die CaCo-II-Zellen bei maximal 80 % überführt, was keinen erkennbaren negativen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Das regelmäßige Passagieren ist essentiell, da sich die Zellen in einer Kulturflasche nach 25 - 30 Tagen selbst ablösen würden und sie somit ständig ihren eigenen Enzymen, Abfallprodukte oder apoptotischen Signalen exponiert würden [111]. Werden die Zellen auf Filtern für die Transportversuche kultiviert, finden solche Phänomene wegen der Poren nicht statt [111]. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Versuche in der Zellkultur nach den hier dargelegten Bedingungen und Umständen durchgeführt und die Zellen dauerhaft auf diese Art kultiviert (siehe Experimenteller Teil 4.2).

3.2 Hintergründe der Kulturzeit für Transportversuche

3.2.1 Zeitlicher Ablauf der Kulturzeit vor den Transportversuchen

In Transportversuchen zur Vorhersage der intestinalen Absorption von neuen Arzneistoffkandidaten werden die CaCo-II-Zellen auf sogenannte Inserts ausgesät. Diese beinhalten eine Kapillarporenmembran aus Polyethylenterephthalat mit einem Porendurchmesser von 0,4 μm und einer Porendichte von $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$. Ihr Verhalten folgt dabei während der Kulturzeit festen Merkmalen oder Mustern (siehe Abbildung 24).

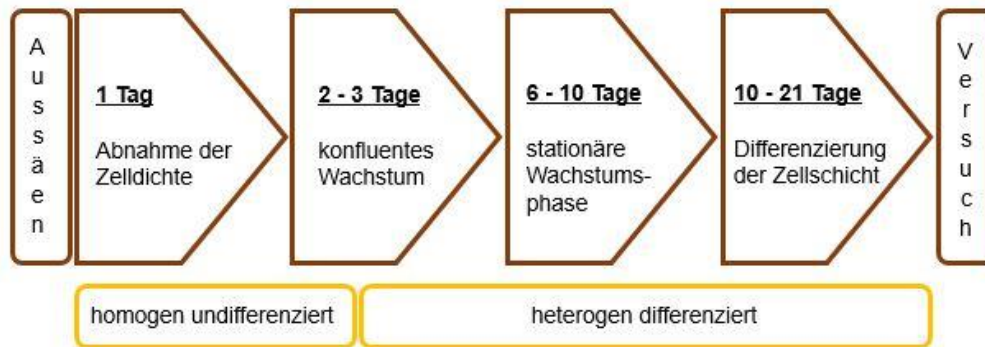


Abbildung 24 Zeitlicher Ablauf des Wachstums von CaCo-II-Zellen auf den Inserts vom Zeitpunkt des Aussäens bis zum Versuch. Aufgrund fehlender Adhäsion von manchen Zellen sinkt die Zelldichte nach einem Tag wieder etwas. Ab diesem Punkt wachsen sie in zwei bis drei Tagen konfluent. Nach sechs bis zehn Tagen erreichen die Zellen ihre stationäre Wachstumsphase, von der aus sich die Zellschicht nur noch differenziert. In Subkonfluenz haben die Zellen noch ein homogen undifferenziertes Erscheinungsbild und wandeln sich ab Tag 2 - 3 hin zu heterogen differenzierten Zellen.

Die Zelldichte sinkt leicht nach einem Tag, da nicht alle Zellen erfolgreich an die Filtermembran adhären [234]. Ab diesem Zeitpunkt vermehren sie sich kontinuierlich bis zu einer Plateauphase [234]. Sie wachsen innerhalb von zwei bis drei Tagen, je nach Sähdichte, konfluent und erreichen die stationäre Wachstumsphase in Monolayern nach ungefähr sechs bis zehn Tagen [99, 101, 234]. Die Differenzierung der CaCo-II-Zellen scheint einem strikten Zeitplan in der Ausbildung von morphologischen und biochemischen Charakteristiken zu folgen [99]. Dabei handelt es sich allerdings nicht um einen gekoppelten Vorgang sondern um ein individuelles Verhalten der Zellen weitestgehend unabhängig voneinander [99]. So findet die Differenzierung in der Wachstumszeit in Clustern statt, in denen manche Zellen nach 12 - 14 Tagen bereits eine volle, erkennbare Differenzierung erreicht haben, andere erst nach 18 - 21 Tagen [92]. Die Zellen zeigen in der Zellkultur drei Stadien, von homogen undifferenziert in Subkonfluenz, über heterogen differenziert bis zu Tag 20 nach Konfluenz, hin zu homogen polarisiert und differenziert jenseits von 30 Tagen [27]. Für das Erreichen dieses Zustandes scheint mitunter die Passagenzahl von Bedeutung zu sein, da die Morphologie der Zellen aus höheren Passagen nach Konfluenz homogener war [112]. Wird die Entwicklung der Zellen anhand eines Genexpressionsprofils überwacht, so erkennt man im zeitlichen Verlauf nach der Konfluenz eine Abnahme von Genen für die Zellzyklusprogression, DNA-Synthese oder Proteintranslation sowie eine Zunahme von Genen für den Metabolismus oder die Zellstruktur [99]. Für die Versuche sind die CaCo-II-Zellen gewöhnlich nach 21 Tagen einsatzfähig, da hier die Transporterexpression ein Maximum erreicht und ein reguläres Netzwerk an Tight-junctions von den differenzierten Zellen ausgebildet wurde [95, 101, 231]. Es gibt jedoch auch Studien, die eine maximale p-GP-Expression ab Tag 15 gegeben sehen [79] und ab diesem Tag auch die morphologischen Eigenschaften als ähnlich zu normalen Enterozyten eingeschätzt werden [234]. Folglich gilt es, in der Frage nach einer Möglichkeit der

Verkürzung der Kulturzeit zu evaluieren, auf welche Merkmale der Genexpression oder welche Eigenschaften der Zellen der Fokus gelegt werden soll.

3.2.2 Bekannte Ansätze zur Verkürzung der Kulturzeit

Es wurden diverse Ansätze beschrieben, die Kulturzeit für Transportversuche entscheidend zu verkürzen, um so vor allem Geld und Zeit zu sparen. So wurden „Ready-to-use“-CaCo-II-Modelle mit einer Kulturzeit von drei bis sieben Tagen entwickelt, in denen allerdings die Expression an relevanten Transportern und Enzymen stark vermindert war [11]. Auch gibt es mit BIOCOAT® ein kommerziell verfügbares Drei-Tage-Modell, welches deutlich teurer ist als die anderen Zellkulturmodelle und eine komprimiertere Barrierefunktion der Monolayer aufweist [231, 235]. Im sogenannten Biocoat Intestinal Epithelium Differentiation Environment (BIEDE) bekommt man in drei Tagen voll differenzierte und konfluente CaCo-II-Zellen durch die Verwendung einer Filtermembran aus Polycarbonat, dem Einsatz des Extrazellulärmatrixproteins Kollagen Typ 1 zur Anregung der Zelladhäsion und zwei veränderten Kulturmedien [99, 236]. Normalem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ist MITO+ zugesetzt, welches Glukocortikoide, Insulin, Transferrin oder EGF für ein schnelles Wachstum enthält [236]. Dieses wird nach 24 Stunden durch Entero-STIM, einem serumfreien, Buttersäure enthaltenden Medium, ausgetauscht [236]. Die kurzkettige Fettsäure Buttersäure wird als Differenzierungsreagenz zugesetzt, da es in der Lage ist, Wachstumsstopp zu verursachen und Differenzierung zu induzieren [237]. *Yamashita et al.* generierten aus diesem 3-Tage-Modell verschiedene Protokolle mit Veränderung der Medien und der Kulturzeit, um die vorhandenen Limitationen auszugleichen [237]. Simple Modifikationen durch Tausch des speziellen Wachstumsmediums gegen das Standardmedium im ersten Tag und die Verlängerung der Kulturzeit auf fünf Tage insgesamt, konnte die Monolayerintegrität verbessern und die Transporteraktivität erhöhen [237]. *Lentz et al.* gelang daneben die Entwicklung eines Kulturmodells über vier Tage, was eine erhebliche Verkürzung der regulären Zeit darstellt [231]. Als Kulturmedium wählten sie ein spezielles DMEM, welches unter anderem mit Eisen versetztem Kälberserum und einem Mix aus insgesamt sieben Hormonen und Wachstumsfaktoren, wie Rinderinsulin, menschlichem Transferrin oder Cholera toxin hergestellt wurde [231]. Diese erweiterten Supplemente ermöglichten in diesem verkürzten Zeitraum die Ausbildung einheitlicher und konfluenter Monolayer [235]. Allerdings stellten die Autoren über die Permeabilität von Markern und der Aktivität der alkalischen Phosphatase, einem biochemischen Marker für die Beurteilung der Differenzierung der Membran, eine geringere Zelldifferenzierung in diesem schnelleren Modell fest, wenn auch über die Untersuchung der Permeabilität eines p-GP-Substrates ein vorhandener polarisierter Transport gezeigt werden konnte [231]. Für dieses Transportprotein konnte

aber über Western Blot Analyse eine deutlich geringere Expression nachgewiesen werden, sodass zwar von einem gerichteten Transport von Substraten gesprochen werden könnte, die Permeabilitätsratios allerdings kleiner ausfielen [235]. Ferner waren auch die Mikrovilli nicht so eng gepackt und regulär verteilt wie im konventionellen Zellsystem, was zu undichten Arealen in der Zellschicht führt [235]. Seinen Beitrag zum BCS-System (siehe Einleitung 2.4) kann dieses Modell daher eher bezüglich der passiven Permeabilität leisten, da für eine oral applizierte Substanz eine gleiche Klassifikation mit dem schnellen Modell und dem normalen 21-Tage-Modell getroffen werden konnte und so die gleichen Tendenzen in kürzerer Zeit bestimmt werden können [231]. Es stellt eine ausgezeichnete Alternative für den schnellen Durchsatz von Testsubstanzen zur Zeit- und Kostenersparnis dar, jedoch eher nicht für die Untersuchung von p-GP-vermitteltem zellulären Efflux [235]. *Peng et al.* verglichen die Ergebnisse mehrerer Laboratorien für ein 7-Tage-CaCo-II-Modell und leiteten daraus ein Modell ab, welches aufgrund guter funktioneller Eigenschaften für den Arzneistoffentwicklungsprozess im Bereich des Screenings der Klassifikation eines Stoffes eingesetzt werden konnte [113]. Auch *Cai et al.* postulierten die Möglichkeit das CaCo-II-Zellmodell auf sieben Tage zu verkürzen, indem die Zelldichte erhöht und ein spezielles Differenzierungsmedium, dessen genaue Zusammensetzung nicht näher erläutert wurde, verwendet wurden [238]. Im Vergleich mit dem traditionellen 21-Tage-Modell konnten die Autoren vergleichbare Monolayer- und Barriereigenschaften sowie eine funktionelle p-GP-Aktivität, die eine Identifizierung und Einordnung von Substraten ermöglicht, zeigen [238]. *Galkin et al.* gingen noch einmal einen anderen Weg und entwickelten ein 7-Tage-Modell mit angepasster Zelldichte und durch Glutaminzusatz nur geringfügig modifiziertem Kulturmedium in 96-Transwell-Platten für einen schnellen Screeningprozess in der Arzneistoffentwicklung und konnten vergleichbare Monolayer und funktionelle Aktivitäten zum traditionellen Modell zeigen [90]. *Sevin et al.* stellten ein weiteres angepasstes Zellkulturmodell über sechs Tage vor, in dem über den Austausch der Penicillin-Streptomycin-Lösung aus dem gewöhnlichen Zellkulturmedium gegen das Antibiotikum Puromycin eine Reduktion der Kulturzeit erreicht wurde und so der Optimierungsprozess in der Arzneimittelentwicklung verkürzt werden konnte [239]. Zwar bildeten sich mit diesem Zusatzstoff in der kürzeren Zeit vergleichbare Monolayer und die Klassifizierung von Testsubstanzen war ähnlich zum traditionellen Modell [239], allerdings ist es fraglich, inwieweit diese Substanz in weitere relevante zelluläre Prozesse beeinflusst. Über moderne Methoden der „Klick-Chemie“ lassen sich auch mittlerweile Mikrochipsysteme für das Hoch-Durchsatz-Screening von Arzneistoffen in Gewebebarrieremodellen entwickeln und durchführen [240]. Diese vielfältigen Entwicklungen zeigen, dass im Bereich der CaCo-II-Zellkultur schon viele Variationen hinsichtlich der Kultivierung untersucht wurden und die Ergebnisse für die jeweiligen Kulturzeiten durchaus unterschiedlich ausfielen. Kritisch ist sicherlich der Zusatz von diversen weiteren Substanzen zum Grundlagenmedium zu sehen, da eine Auswirkung auf

zelluläre Prozesse zum einen nicht ausgeschlossen werden kann und zum anderen ein daraus folgender Einfluss auf die Ergebnisse solcher Versuche schlecht absehbar ist. Hierbei fehlen noch aktuelle systemische Untersuchungen zu den Grundlagen solcher möglichen Prozesse. Darüber hinaus kommt es auch immer auf die Frage an, welche Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit CaCo-II-Zellen gezogen werden sollen und welche exprimierten Proteine, welche Vorgänge und welche Qualität des Monolayers dafür notwendig sind.

3.2.3 Relevante Aspekte für die Kulturzeitverkürzung und deren Evaluierung

Beim möglichen Verkürzen der Kulturzeit in Transportversuchen verbietet es sich die Konfluenz der Zellen als das alleinige Kriterium heran zu ziehen [101]. Es kann nicht nur signifikante Unterschiede zwischen der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase hinsichtlich der TEER-Werte und somit der Monolayerqualität geben, sondern die Expression von Transportproteinen kann auch deutliche Veränderungen aufweisen [101]. So kamen *Goto et al.* zu dem Schluss, dass die Expression von p-GP eng mit der Entwicklung der Zelle verknüpft ist [16]. In der frühen Phase der Proliferation ist sowohl die Transkriptionsrate, als auch die Stabilität der mRNA für p-Glykoprotein deutlich erhöht und sinkt mit der Zeit wieder, wenn die Zelle in die Differenzierungsphase übergeht [16]. Dieser Mechanismus scheint sicherzustellen, dass in der Phase der Proliferation keine schädlichen Einflüsse von außen auf die Zelle einwirken [16]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung pendelt sich die Expression von p-Glykoprotein im Verhältnis zu weiteren Proteinen wieder auf ein normales Level ein, weil andere Eiweiße exprimiert werden, welche zu den jeweiligen Zeitpunkten vermehrt benötigt werden [16]. Ein Beispiel hierfür ist Villin, welches als Actin-Bindeprotein mit dem Bürstensaum der Enterozyten assoziiert ist [102]. Da der Proteingehalt an p-GP über die Zeit abnimmt, muss mit einer zeitlichen Anpassung der Kulturzeit vorsichtig umgegangen werden [95]. Das Transportprotein wird über den kompletten Kulturzeitraum für Transportversuche kontinuierlich exprimiert, allerdings scheint es zu Beginn noch nicht voll funktionsfähig zu sein, weswegen die Tage 17 bis 21 eher für die Durchführung der Versuche geeignet sind [100, 156]. Darüber hinaus nimmt das Expressionslevel ab Tag 21 auch wieder ab [100]. Die eingeschränkte Funktionalität könnte auch die Ursache für die erhöhte Transkriptionsrate und die Stabilität der mRNA in der frühen Phase sein. Für eine mögliche Verkürzung der Kulturzeit war es wichtig, sowohl die ausreichende Expression von p-Glykoprotein sicherzustellen, als auch die Funktionalität dieses Transporters an dem verkürzten Zeitpunkt mittels einer Markersubstanz für den p-GP-vermittelten Transport, Rhodamin 123, zu bestimmen.

Rhodamin 123 als kationischer und hydrophiler Fluoreszenzfarbstoff (siehe Abbildung 25) wurde als Modellsubstrat für p-GP, neben der Bestimmung einer potentiellen kürzeren Kulturzeit auch in der Evaluierung des Einflusses der Polyphenole auf den Effluxtransport von CaCo-II-Zellen schon in einer Vielzahl von Publikationen verwendet [241-243]. Er wird oft als Probesubstrat zur Beurteilung der funktionalen p-GP-Aktivität in einer Vielzahl von Zelllinien und Versuchen gewählt, da der sekretorische scheinbare Permeabilitätskoeffizient sehr viel höher als der absorptive und damit der Transport dieses Stoffes apikal gerichtet ist [243]. So konnte für diese Substanz in Anwesenheit von p-GP-Inhibitoren eine vermehrte Akkumulation in den Zellen gezeigt werden, was dessen Substratcharakter für dieses Transportprotein belegt [137]. Auch zeigte ein Arzneistoffscreen in 58 unterschiedlichen Zelllinien eine gute Korrelation von Rhodamintransport mit der Expression von p-GP, aber nicht von anderen MDR-assoziierten Proteinen [241]. Auf basolateraler Seite scheinen mehrere Transporter am Übergang von Rhodamin 123 durch die Membran verantwortlich zu sein [242]. Aufgrund seines pK_a -Wertes von 6,1 ist es in physiologische pH-Bereichen partial positiv geladen, weswegen auch die Absorption dieses Stoffes über organische Kationentransporter angenommen wird [137]. Darüber hinaus unterliegt die Aufnahme von Rhodamin 123 einer konzentrationsabhängigen Kinetik, was für sättigbare transportervermittelte Prozesse spricht [137].

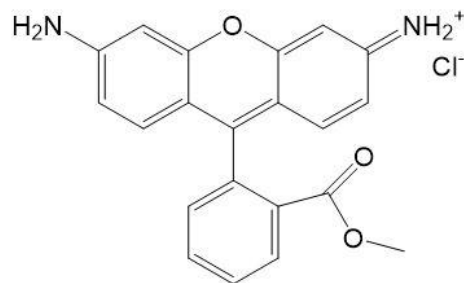


Abbildung 25 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123, der als Modellsubstanz für den p-GP-vermittelten Transport eingesetzt wird.

Zusätzlich zur Bestimmung der Transportproteinaktivität ist die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) ein wichtiges, nicht-invasives Instrument zur Evaluierung der Qualität des Monolayers, da hierbei die Höhe des Wertes mit der guten Integrität durch dicht ausgebildete Tight-junctions korreliert [11, 66, 91]. Jedoch muss bedacht werden, dass die Tight-junctions einer Fluktuation zwischen offener und geschlossener Konformation unterliegen, was einen dynamischen Prozess darstellt und sich im TEER-Wert widerspiegeln kann [18]. Die Komplexität des Tight-junction-Netzwerks ist in verschiedenen Epithelien sehr variabel, weswegen eine direkte Beziehung zum gemessenen TEER-Wert nahe liegt [18]. Der TEER-Wert des menschlichen Ileums ist mit 40 - 50 Ωcm^2 deutlich geringer als im CaCo-II-Zellmodell,

weswegen dieser Aspekt zum Vergleich von Ergebnissen zwischen Kulturmodell und in vivo Situation eher nicht herangezogen werden kann [104]. In den erhaltenen TEER-Werten kann es zu Schwankungen für einen Monolayer in einem bestimmten Bereich über den Kulturzeitraum kommen, weshalb es keinen starren Wert als Akzeptanzkriterium gibt, sondern vielmehr eine Schwelle die überschritten sein sollte, um den Monolayer als qualifiziert für den Gebrauch einzustufen [66, 100]. So zeigte sich beispielsweise in Versuchen ein Anstieg im Monolayerwiderstand bis Tag 7 in Kultur, ein Abfall der Werte bis Tag 14 und dann ein erneuter Anstieg bis zu einem Maximum an Tag 28 [100]. Mit der Kulturzeit nimmt der TEER-Wert also zu und der parazelluläre Transport dementsprechend ab, bis zu einem Plateau nach circa zwei Wochen, da die Zellen immer dichter wachsen [14]. *Mukherjee et al.* merken jedoch zurecht an, dass der TEER-Wert durchaus kritisch zu betrachten ist [244]. Sie konnten zeigen, dass nach Exposition mit Enhancern in zelltoxischer Konzentration sowohl der TEER-Wert als auch die Zellviabilität sanken [244]. Nach 24 Stunden erholen sich allerdings lediglich die TEER-Werte auf Ausgangsniveau, was die Aussagekraft der Ergebnisse in Frage stellt [244]. Zur Vermeidung von trügerischen Schlüssen im Hinblick auf die Qualität der Monolayer basierend auf den TEER-Werten lässt sich die Zellschicht mithilfe zweier Antikörper, von denen einer fluoreszenzmarkiert ist, anfärben (siehe Experimenteller Teil 4.5). Diese Visualisierung des Tight-junction-Netzes dient zur zusätzlichen Beurteilung der Integrität. Als weitere Möglichkeit bietet sich die Testung des oben erwähnten, sinkenden parazellulären Transportes über die Kulturzeit mit Hilfe einer Referenzsubstanz an.

Der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (siehe Abbildung 26) wird oft zur Evaluierung der Qualität von Zell Layern verwendet [245]. Er wird apikal zugegeben und der Anteil im basolateralen Kompartiment nach Versuchsende bestimmt [25, 94, 105]. Mit Hilfe solcher kleiner, hydrophiler Moleküle können Informationen über die Durchlässigkeit der Tight-junctions gewonnen werden [10].

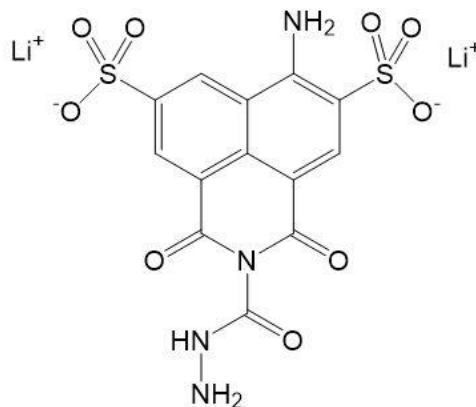


Abbildung 26 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow, welcher als Marker für die Integrität des Monolayers durch Evaluierung des parazellulären Transportweges benutzt wird.

3.3 Fragestellung

Für Transportversuche mit CaCo-II-Zellen scheint eine Kulturzeit von insgesamt zwei bis eher drei Wochen optimal zu sein: Bis zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen homogene Monolayer mit gut ausgebildeten Tight-junctions und Mikrovilli gebildet und die Expression von Transportern erreicht ein Maximum [11, 100]. Vorherige Zeitpunkte zeigten keine komplette Differenzierung, flache Monolayer oder eine verminderte Genexpression von Transportern [100]. Eine volle strukturelle Polarisierung mit großen und regulären Mikrovilli erreichen die Zellen allerdings auch erst nach einer Kulturzeit von 30 Tagen [11], was aufgrund verminderter Bildung von Transportproteinen sowie der Gefahr von Multilayerausbildung für Transportversuche unpraktisch ist [100].

Es existieren vielfache Ansätze die Kulturzeiten für Transportversuche anzupassen und damit zu verkürzen (siehe Allgemeiner Teil 3.2), jedoch gilt es stets die Zielsetzung dieser Anpassung zu betrachten. Oftmals geschieht dies unter der Verwendung von zusätzlichen Supplementen oder anderen Bedingungen, wie beispielsweise modifizierte Inserts. Vor allem ist nicht absehbar, inwieweit die Zusatzstoffe einen Einfluss auf zelluläre Prozesse haben können und somit die möglichen Ergebnisse der Versuche verändern. Ein Ziel in der vorliegenden Arbeit war es daher, ohne weiteren Zusatz zum Zellkulturmedium oder Veränderung der Versuchsbedingungen einen geeigneten Zeitpunkt zu bestimmen, der hinreichend für äquivalente Durchführung von Transportversuchen hinsichtlich der Qualität der Monolayer sowie der Zelleigenschaften ist.

Zur Beurteilung der Qualität der Monolayer und der Expression von p-Glykoprotein wurden fünf Kriterien herangezogen. Der TEER-Wert von Zelllayern ist ein gängiges und weit verbreitetes Mittel zur Charakterisierung der Integrität (siehe Allgemeiner Teil 3.2) und wurde in Mehrfachbestimmung an mehreren Tagen in den Versuchen gemessen. Zudem lässt sich die Dichtheit der Monolayer über den prozentualen Transport einer Markersubstanz für den parazellulären Weg bestimmen, was in der vorliegenden Arbeit mittels Lucifer Yellow an mehreren Tagen erfolgte. Die Färbung der Tight-junctions durch Antikörper sowie des Zellkernes, liefert zusätzliche Informationen zur Beurteilung der Qualität der Monolayer dar. Über den kompletten Versuchszeitraum von 21 Tagen wurden Monolayer angefärbt, um zu evaluieren, ab welchem Tag ein homogenes und geschlossenes Wachstum vorhanden ist. Neben diesen drei Ansätzen zur Prüfung der Monolayerqualität wurden zwei Untersuchungen zu p-GP ergänzend durchgeführt. Über die Expression dieses Transportproteins sollte gezeigt werden, an welchen Tagen der Transporter ausreichend exprimiert wird. In Expressionsversuchen wurde ein geeigneter Tag ermittelt, an dem zusätzlich die funktionelle Aktivität von p-GP über den Rhodamintransport bestimmt wurde. Somit ließ sich aus diesen Versuchen eine Aussage

treffen, an welchem Tag sowohl die Qualität der Zellschicht als auch die funktionelle Aktivität von p-GP ausreichend war, um die Kulturzeit zu verkürzen.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 TEER-Messung über den Kulturzeitraum

Bezüglich der TEER-Werte ließ sich am neunten Tag ein erstes Ende des Anstieges erkennen (siehe Experimenteller Teil 4.3). Im weiteren zeitlichen Verlauf schwankten sie teilweise deutlich, jedoch konnte eine klare Tendenz zur Ausbildung des vorab erwähnten Plateaus beobachtet werden. Bereits am dritten Tag wurde mit $410,27 \pm 102,25 \Omega\text{cm}^2$ ($n=4$) ein relativ hoher transepithelialer elektrischer Widerstand von den Monolayern erreicht (siehe Abbildung 27). Ab dem fünften Tag lag der Mittelwert aus den vier repräsentativen Versuchen mit $519,47 \pm 209,42 \Omega\text{cm}^2$ ($n=4$) nochmal deutlicher über dem selbst gesetzten Grenzwert von $300 \Omega\text{cm}^2$. Allerdings zeigte dieser Wert auch die zweithöchste Standardabweichung über den Versuchszeitraum und dementsprechend eine heterogene Qualität in den Versuchen. Tag 13 markierte einen Zeitpunkt, ab dem sie sich um einen Wert von $600 \Omega\text{cm}^2$ einpendelten. Aufgrund von einem fehlenden weiteren Anstieg der Werte kann man davon ausgehen, dass in den Inserts keine Ausbildung eines Bi- oder sogar eines Multilayers über den Versuchszeitraum stattgefunden hat.

TEER-Werte über den Kulturzeitraum

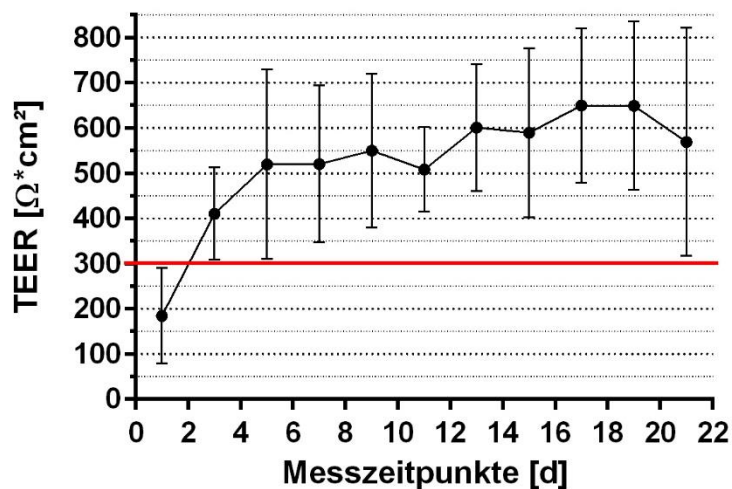


Abbildung 27 Zeitlicher Verlauf der TEER-Werte über den Kulturzeitraum von 21 Tagen. Eine Messung fand ab Tag 1 an jedem zweiten Tag in insgesamt vier Experimenten statt (n= 4). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus den vier Untersuchungen. Bereits am dritten Tag überschritten die TEER-Werte die gesetzte Schwelle von 300 Ωcm² und lagen schon an Tag fünf über 500 Ωcm². Ab dem dreizehnten Tag pendelten sich die Werte um 600 Ωcm² ein.

3.4.2 Färbung der Tight-junctions und der Zellkerne der CaCo-II-Zellen

In den Mikroskopbildern nach erfolgter Färbung der Tight-junctions sowie der Zellkerne konnte an Tag zwölf zum ersten Mal ein homogener und geschlossener Zellverband visualisiert werden (siehe Abbildung 28). Der Antikörper ist mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass die einzelnen Zellen grün umrahmt sind. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) färbt die Zellkerne bläulich an (siehe Experimenteller Teil 4.5). Über den Versuchszeitraum gab es ein Wachstum von einzelnen Zellen über sich stetig vergrößernde Cluster hin zu einem Monolayer. Der Zelllayer war schon an Tag sieben zu erkennen, allerdings zeigten sich vor allem im mittleren Bereich noch deutliche Löcher, weshalb noch nicht von einem flächendeckenden Bewuchs gesprochen werden konnte. Bis Tag 16 steigerte sich die Intensität der Tight-junctionfärbung noch einmal, um im Anschluss bis Tag 21 wieder abzunehmen, da die Zelldichte wieder rückläufig war. Auf Basis dieser Färbung schien eine Verwendung der CaCo-II-Monolayer für Transportversuche ab Tag zwölf als plausibel.

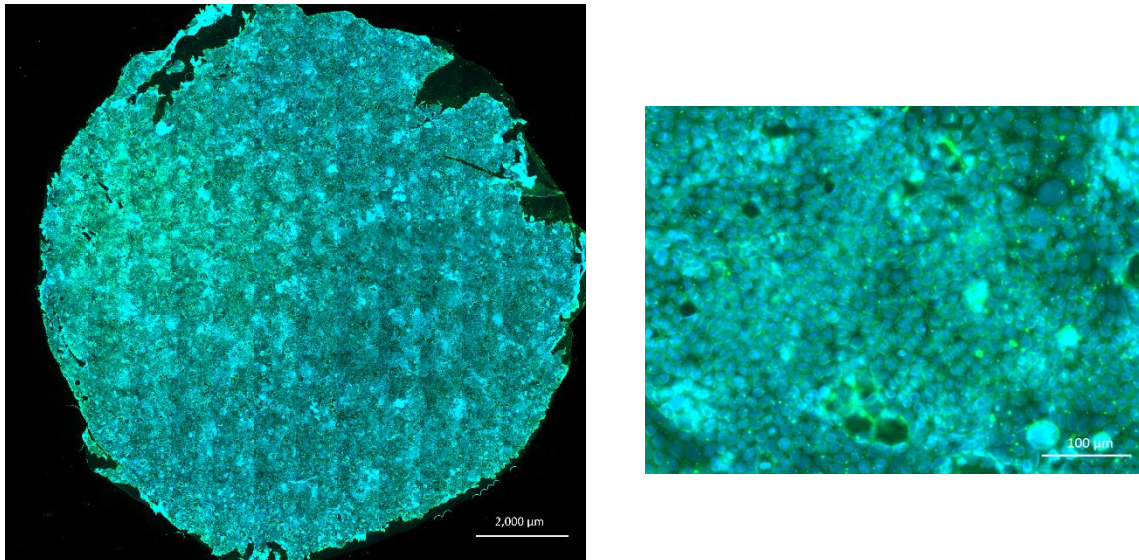


Abbildung 28 Repräsentative Darstellung einer Antikörper- und DAPI-Färbung des CaCo-II-Monolayers an Tag 12. Die Tight-junctions wurden mit zwei Antikörpern, von denen einer fluoreszenzmarkiert war, angefärbt, was einen grünen „Kasten“ um die Zellen ergab. Die DAPI-Färbung der Zellkerne brachte eine bläuliche Farbe hervor. Auf dem Bild links ist der komplette Monolayer dargestellt. Die Risse am Rand stammen von der Bearbeitung und dem Herausstrennen aus den Inserts. Ansonsten lässt sich eine homogene und dicht gewachsene Zellschicht ohne größere Löcher erkennen. Das rechte Bild zeigt eine Vergrößerung aus der Mitte des Monolayers, was die Zellen mit ihren Begrenzungen deutlich macht. Bildliche Darstellung des zwölften Tages ist exemplarisch und weitere Bilder der anderen Tage können auf Nachfrage eingesehen werden.

3.4.3 Bestimmung der Lucifer Yellow Transportrate über den Kulturzeitraum

Als dritte Möglichkeit zur Evaluierung der Qualität des CaCo-II-Monolayers wurde der prozentuale Transport von Lucifer Yellow alle ein bis drei Kulturtage in insgesamt vier Versuchsreihen gemessen (siehe Experimenteller Teil 4.4). In den vier Experimenten wurde eine Bestimmung an den jeweiligen, vorher festgelegten Tagen aus je drei Inserts durchgeführt und daraus über alle Versuche der Mittelwert gebildet. Es zeigte sich, dass nach einem Tag der prozentuale Transport von Lucifer Yellow unter einem Prozent lag (siehe Abbildung 29). Allerdings war dieser Wert mit einer großen Standardabweichung behaftet, sodass man noch nicht von einer ausreichend bestätigten Integrität sprechen konnte. Bis zum siebten Tag fiel der Transport auf einen Tiefstwert von $0,28 \pm 0,04$ % ($n=12$). In der Folge stieg dieser wieder leicht an und pendelte sich von Tag 13 ($0,35 \pm 0,08$ %, $n=12$) bis zum Tag 21 ($0,49 \pm 0,22$ %, $n=9$) um ungefähr 0,4 % ein. Zum Vergleich wurden zwei weitere Versuche ohne Zellen in den Inserts durchgeführt (siehe Tabellarischer Anhang 3.2). Hierbei lag der prozentuale Transport von Lucifer Yellow im Mittel um $5,55 \pm 0,42$ % ($n=6$) und damit deutlich über den Werten mit Zellen auf den Inserts. Allein deren Anwesenheit, ohne dass diese zu einem kompakten Monolayer verwachsen waren, senkte damit also den Übertritt des Fluoreszenzfarbstoffes schon

deutlich. Im Hinblick auf Reduzierung der Kulturzeit von 21 Tagen in den 12-Well-Platten, stellte sich nach diesem Experiment eine Reduktion der Zeit auf sieben Tage als die beste heraus, da hier der prozentuale Transport von Lucifer Yellow am geringsten war.

Lucifer Yellow Transport über den Kulturzeitraum

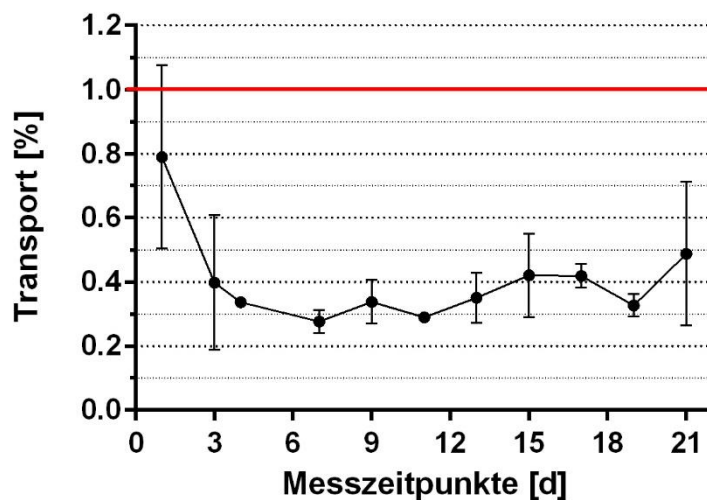


Abbildung 29 Zeitlicher Verlauf des prozentualen Lucifer Yellow Transportes über den Kulturzeitraum. Aus insgesamt vier Versuchen wurden alle ein bis drei Kulturtage Transportversuche mit Lucifer Yellow als Marker für die Integrität der Layer durchgeführt (n= 3-12). Nach einem Tag lag der Prozentsatz an transportiertem Fluoreszenzfarbstoff unter einem Prozent, war allerdings mit einer großen Standardabweichung behaftet. Den geringsten Wert wurde an Tag 7 erreicht und in der Folge stiegen die Werte wieder leicht an, pendelten sich dann jedoch um ungefähr 0,4 % ein.

3.4.4 Evaluierung der p-Glykoprotein-Expression über den Kulturzeitraum

Neben der Qualität des Monolayers waren die Expression sowie die Funktionalität von p-Glykoprotein entscheidende Aspekte, die es zu evaluieren galt (siehe Experimenteller Teil 4.6). Für Ersteren wurden ab Tag eins an jedem zweiten Tag während der Kulturzeit Proben genommen und mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion alle zwei Tage die Genexpression von p-GP ermittelt (n= 6) (siehe Experimenteller Teil 4.6). Über den kompletten Zeitraum erwies sich die Bildung des Transportproteins als wenig stabil und war großen Schwankungen unterlegen (siehe Abbildung 30).

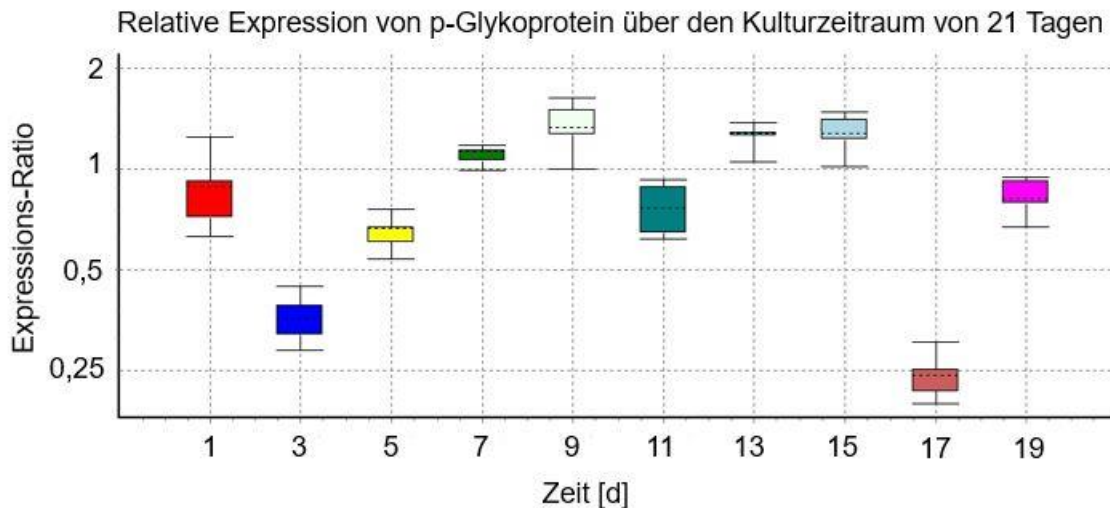


Abbildung 30 Vergleich der Genexpression von p-Glykoprotein an jedem zweiten Tag während der Kulturzeit von drei Wochen ab dem ersten Tag. Dargestellt ist die relative Expression als Expressionsratio bezogen auf die Expression dieses Transportproteins an Tag 21 aus jeweils $n=6$. Eine starke Schwankung der Expression über den Kulturzeitraum ist erkennbar. Meistens lagen die relativen Expressionen teilweise deutlich unter der Referenz von 21 Tagen, allerdings auch an insgesamt vier Tagen knapp darüber. An Tag 11 war die Expression mit 0,758 signifikant erniedrigt und schon zwei Tage später sowie an Tag 15 mit 1,247 und 1,270 signifikant höher. Dies stellte den interessantesten Bereich für eine Verkürzung dar.

Im Vergleich zur Expression an Tag 21 fiel diese an den meisten Tagen teilweise deutlich geringer aus und war nur an insgesamt vier Tagen etwas erhöht. Auf Basis der drei Versuche zur Monolayerintegrität wurde vor allem der Bereich von einer Kulturzeit von zwei Wochen näher untersucht. An Tag 11 war die relative Expression mit 0,758 noch signifikant niedriger im Vergleich zur Referenz bestehend aus der p-GP-Expression an Tag 21. Schon zwei Tage später und ebenso an Tag 15 befand sie sich mit 1,247 und 1,270 im signifikant höher regulierten Bereich als der Vergleichswert nach drei Wochen. Eine weitere Analyse mit Bezug auf die drei Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA wiesen die relevanten Tage 11, 13 und 15 eine signifikante Überexpression von p-GP auf (siehe Abbildung 31).

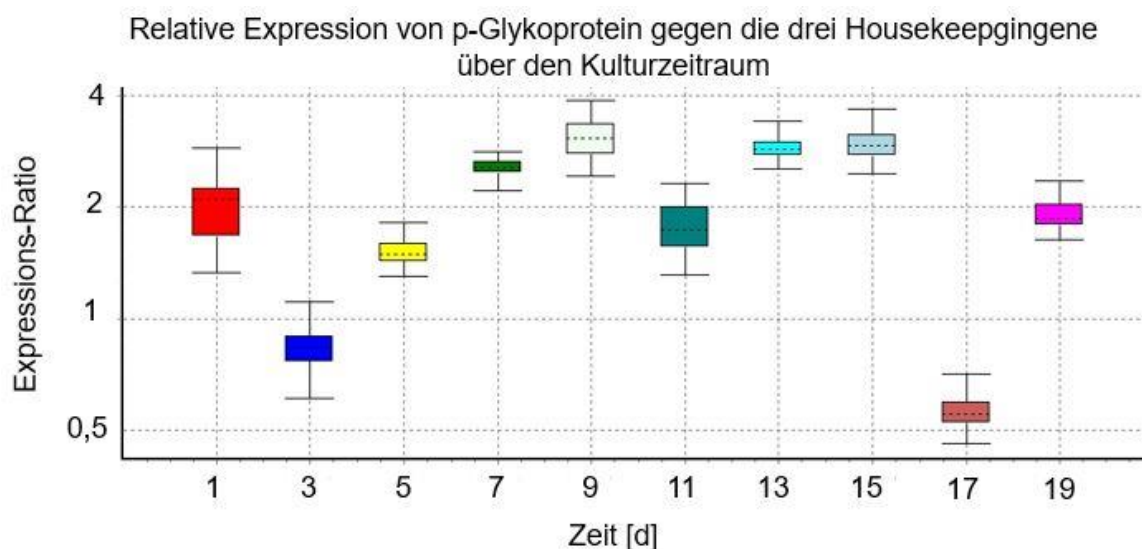


Abbildung 31 Vergleich der Genexpression von p-Glykoprotein gegen die drei Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA an jedem zweiten Tag während der Kulturzeit von drei Wochen ab dem ersten Tag. Dargestellt ist die relative Expression als Expressionsratio bezogen auf die Expression der drei Housekeepinggene aus jeweils $n=5$. Eine starke Schwankung der Expression über den Kulturzeitraum ist erkennbar. Die Tage 11, 13 und 15 stellten den interessanten Bereich für eine Verkürzung dar. Die Analyse gegen die Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA wies die relevanten Tage mit einer signifikanten Überexpression von p-GP auf (Tag 11: 1,757; Tag 13: 2,891; Tag 15: 2,944).

3.4.5 Funktionelle Aktivität von p-Glykoprotein

Die Daten aus den bisherigen vier Qualitätsuntersuchungen legten eine Verkürzung auf maximal zwölf Tage nahe. In den Versuchen zur Genexpression von p-GP zeigte sich dieses als geringer exprimiert an Tag elf und als erhöht an den Tagen 13 und 15, jeweils im Vergleich zur Referenz nach 21 Tagen. Für die Bestimmung der funktionellen Aktivität von p-Glykoprotein wurden daher Transportversuche mit Rhodamin 123 als Markersubstanz nach einer Kulturzeit von 12 und 14 Tagen durchgeführt und die Ergebnisse mit denen nach 21 Tagen verglichen. Nach zwölf Tagen zeigte sich eine statistisch signifikant niedrigere P_{app} -Ratio von $0,86 \pm 0,18$ im Vergleich zu Tag 21 (siehe Tabellarischer Anhang 3.4). In der Gegenüberstellung der Ergebnisse nach zwei vollen Wochen wurden in der verkürzten Zeit geringere P_{app} -Werte in beide Richtungen detektiert: $1,79 \times 10^{-7}$ cm/s (14 Tage, basolateral, $n=15$) und $2,34 \times 10^{-7}$ cm/s (14 Tage, apikal, $n=15$) gegenüber $3,27 \times 10^{-7}$ cm/s (21 Tage, basolateral, $n=15$) und $4,09 \times 10^{-7}$ cm/s (21 Tage, apikal, $n=15$). Jedoch fiel nach zwei Wochen die Standardabweichung der Werte mit 10^{-8} (21 Tage) zu 10^{-7} (14 Tage) um eine Dimension geringer aus (siehe Tabellarischer Anhang 3.4). Beim Vergleich der P_{app} -Ratios nach 21 und 14 Tagen war zu erkennen, dass sie mit 1,33 (21 Tage) und 1,34 (14 Tage) annähernd identisch waren und somit die Verringerung des p-GP-vermittelten Transportes für beide Richtungen im gleichen Ausmaß stattfand (siehe Abbildung 32). Allerdings war die Standardabweichung der Ratio für

14 Tage größer, was eine breitere Streuung der Ergebnisse in weiterführenden Versuchen nahelegte. Normalisiert man die Werte aus dem verkürzten Versuch mit den Mittelwerten aus den P_{app} -Werten für beide Richtungen, sowie der P_{app} -Ratio, so zeigte sich, dass der Transport in basolaterale Richtung nur 55 % und der in apikale nur 57 % des Ausmaßes nach 21 Tagen einnahm, allerdings auch hier mit einer geringeren Standardabweichung. Die P_{app} -Ratio dagegen war konsequenterweise mit $1,01 \pm 0,27$ nach 14 Tagen wieder nahezu identisch zum 21. Tag ($1,00 \pm 0,12$), streute allerdings wiederum etwas mehr. Eine statistische Analyse mittels eines t-Testes ergab folglich auch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Zeitpunkten, weswegen sie aus dieser Sicht als äquivalent eingestuft werden konnten.

Vergleich des Rhodamintransportes nach 14 und nach 21 Tagen

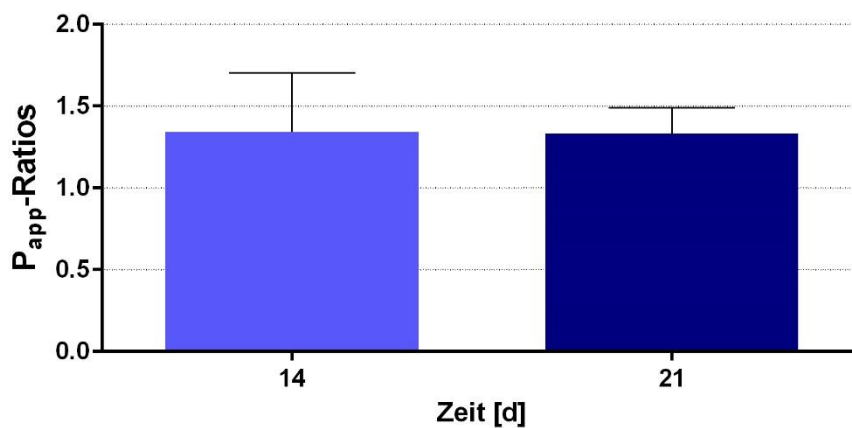


Abbildung 32 Vergleich des Transportes von Rhodamin 123 als Markersubstanz für die Funktionalität von p-Glykoprotein nach 14 und 21 Tagen. Dargestellt sind die P_{app} -Ratios von Rhodamin 123 aus den jeweiligen Versuchen mit $n=15$. Erkennbar sind annähernd identische P_{app} -Ratios und auch eine statistische Analyse mittels eines t-Testes ergab keinen signifikanten Unterschied. Lediglich die Standardabweichung zeigte sich nach der Kulturzeit von 14 Tagen etwas größer.

3.5 Diskussion

Die Möglichkeit einer Verkürzung der Kulturzeit für Transportversuche ist von verschiedenen Aspekten abhängig. So kommt es darauf an, welche zellulären Prozesse, wie Transport oder Metabolismus, von Interesse sind und auf welche Aussage man Wert legt, welche Qualitätsmerkmale zum Beispiel für eine Verkürzung der Zeit von Bedeutung sind. Eine kurze Kulturdauer in Versuchen wurde schon vielfach untersucht, allerdings waren diese Ansätze stets mit einer Änderung der Versuchsbedingungen verbunden [231, 235, 236]. Eine Verwendung zusätzlicher Supplemente oder anderer Materialien mag

entscheidende zeitliche Vorteile liefern, jedoch kann eine Auswirkung auf die Zellen und die Ergebnisse oft nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde in dieser Arbeit eine Verkürzung der Kulturzeit ohne eine Anpassung der Umstände in den Experimenten untersucht.

Unerlässlich für die Verwendung eines anderen Zeitpunktes ist das Vorhandensein von CaCo-II-Monolayern mit ausreichender Qualität und Integrität. Nur so ist sichergestellt, dass die Ergebnisse vergleichbar sind und valide interpretiert werden können. In den eigenen Experimenten wurde eine TEER-Wert Grenze von $300 \Omega\text{cm}^2$ als Qualitätsmerkmal festgelegt, welche schon am dritten Tag von den Zellschichten überschritten wurde. Für den TEER-Wert lässt sich kein definitiver Wert als Kennzahl ausmachen, sodass Werte über $250 \Omega\text{cm}^2$ beziehungsweise von 200 bis $1000 \Omega\text{cm}^2$ für eine ausreichende Monolayerintegrität zu sprechen scheinen [91, 246]. Generell können CaCo-II-Zellen eine hohe Spanne von 150 bis 1000 oder sogar größer als $1400 \Omega\text{cm}^2$ zeigen [247, 248]. Weitere Untersuchungen geben eine Grenze von $200 \Omega\text{cm}^2$ [249], $250 \Omega\text{cm}^2$ [250], $350 \Omega\text{cm}^2$ [251] oder $400 \Omega\text{cm}^2$ [252] an. Also ist eine große Diversität in den Grenzwerten für die Messung des transepithelialen Widerstandes zu beobachten und es obliegt dem Versuchsplaner diesen individuell festzulegen. Meistens wird von ausreichender Integrität des Monolayers ab einem TEER-Wert von größer $300 \Omega\text{cm}^2$ [174, 253, 254] beziehungsweise größer $400 \Omega\text{cm}^2$ [174, 255] ausgegangen, weswegen die eigene gewählte Grenze von $300 \Omega\text{cm}^2$ als sinnvoll und plausibel erschien und von Werten aus der Literatur gestützt wird. Die zweite angegebene Grenze von $400 \Omega\text{cm}^2$ wurde bereits an Tag fünf erreicht und die Werte pendelten sich ab der zweiten Woche um ungefähr $600 \Omega\text{cm}^2$ ein, sodass allein auf Basis einer TEER-Wert-Messung die Monolayer ab spätestens dem fünften Tag eine geeignete Qualität aufwiesen und verwendet werden konnten. Die Integrität der Zellschicht zeigte auf Grundlage des prozentualen Transportes von Lucifer Yellow als Markersubstanz für den parazellulären Weg mit $0,28 \pm 0,04 \%$ am siebten Tag den niedrigsten Wert. Je niedriger der Prozentsatz an diesem Fluoreszenzfarbstoff nach der Inkubationszeit in der basolateralen Kammer ist, desto dichter ist das Netz an Tight-junctions zur Verhinderung des Durchflusses zwischen den Zellen. Als Richtwert wurde die Grenze an basolateralem Lucifer Yellow Anteil zur Identifikation von löchrigen Zelllayern in mehreren Studien unter einem Prozent gesetzt [25, 253]. Andere fassten allerdings auch höhere Grenzbereiche von unter fünf Prozent oder zwischen $2 - 4,5 \%$ für eine hohe Qualität ein [32]. Die erhaltenen Werte aus den selbst durchgeführten Experimenten stehen somit eigentlich im Widerspruch zu den Erkenntnissen aus vergangenen Studien, da diese jedoch kleiner als die Literaturwerte waren, konnte von einer höheren Integrität ausgegangen werden. Dies war darüber hinaus zusätzlich wünschenswert, da aufgrund der Beibehaltung von gewöhnlichen Kulturbedingungen höhere Anforderungen an die Qualität der Layer gestellt wurden. Bildete man nun die Schnittmenge der Qualitätscharakteristik aus TEER-Werten und Lucifer Yellow Transport, so ließ sich eine mögliche Verkürzung auf fünf Kulturtage aus den ersten Versuchen mit Lucifer Yellow bestätigen. Die Qualität der Monolayer wurde anschließend

noch mit einer Färbemethode aus Antikörpern und DAPI visualisiert. Hierbei ergab sich ein unerwartetes Bild, wenn man die Erkenntnisse aus den TEER-Messungen und den Lucifer Yellow-Versuchen mit den Mikroskopbildern der CaCo-II-Monolayer kombinierte. Die Zellschicht war zwar auf Basis der ersten beiden Versuche nach wenigen Kulturtagen von ausreichender Qualität für eine Verwendung in Transportversuchen, jedoch waren in den mikroskopischen Bildern noch deutliche Löcher erkennbar. Dies zeigte eindeutig die irreführenden und falschen Schlussfolgerungen, welche man rein aus TEER-Werten und einer Markersubstanz als Qualitätsmerkmal ziehen kann. Erst am Tag zwölf war ein homogener und durchgehender Monolayer erkennbar, was bedingt, dass die ersten beiden Qualitätsversuche das wahre Aussehen der CaCo-II-Zellen verschleierten und zu falschen Interpretationen in den Folgeversuchen geführt hätten. In den frühen Kulturtagen war die Färbung noch nicht so kräftig, was die geringe Zelldichte ausdrückt. Nach sieben Tagen war das Insert schon zu großen Teilen bewachsen, ließ aber dennoch einige Löcher erkennen. Führte man nun die Ergebnisse aus den drei Versuchen zur Beurteilung der Monolayerqualität zusammen, so konnte man schlussfolgern, dass die Monolayer, beurteilt nach der Färbung, ab dem zwölften Tag in Kultur dicht gewachsen waren, was von den beiden anderen Versuchen gestützt wurde. Somit erschien im Hinblick auf die Integrität eine Verkürzung der Kulturzeit auf zwölf Tage möglich.

Neben der Qualität sollten Expression und Funktionalität von p-Glykoprotein, welches Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war, den zweiten Aspekt zur Beurteilung einer möglichen Kulturzeitverkürzung bilden. Diese beiden Punkte sind für dieses Transportprotein zwingend zusammen zu betrachten, weil es im Kulturzeitraum zu einer Diskrepanz beider kommen kann (siehe Allgemeiner Teil 3.2.) [101]. So wurde berichtet, dass die p-GP-Genexpression zu Beginn der Kultivierung höher war, aber die volle Funktionalität erst mit einigen Tagen auf den Inserts ausgebildet wurde [16, 100]. Auch in den eigenen Versuchen zur Expression wurde ein sehr schwankender Verlauf der p-GP-Expression über die drei Wochen detektiert. Die relative Expression lag für die meisten Tage unter der Referenz von Tag 21, allerdings auch an insgesamt vier Tagen signifikant darüber. Zur Unterstützung der eigenen Erkenntnisse legten auch andere Studien per Westernblotanalyse, in der sich erkennen ließ, dass in den Wochen eins und vier nach dem Aussäen die p-GP-Expression am höchsten ist und in Woche zwei am geringsten [156], einen ungleichmäßigen Verlauf nahe. Jedoch wurde die Expression des MDR1-Gens über diesen dreiwöchigen Zeitraum als allgemein konstant beschrieben [65], was wiederum eher widersprüchlich zu eigenen Ergebnissen angemerkt werden muss. Aus den Qualitätsversuchen konnte der Tag zwölf als möglicher Zeitpunkt, auf den die Kulturzeit verkürzt werden konnte, detektiert werden, weswegen in den Untersuchungen von p-GP die Aufmerksamkeit auf den Zeitraum um circa zwei Wochen gelegt wurde. An diesen Tagen war die relative Expression an p-GP aber entweder signifikant herunterreguliert oder signifikant herauf reguliert. Rein mit der Genexpression als Grundlage ließ sich kein Tag

eindeutig identifizieren, an dem eine gleichwertige Expression stattfindet und dieser somit bedenkenlos für eine Verkürzung der Kulturzeit verwendet werden konnte. Ein vollständiges Bild wurde erst in Verbindung mit der Untersuchung der Funktionalität erhalten. Hierfür wurde zunächst mittels Rhodamin 123 als Markermolekül für den p-GP-vermittelten Transport am zwölften Tag in der Kultur bestimmt und mit dem Durchfluss des Fluoreszenzfarbstoffes an Tag 21 verglichen. In der Auswertung ließ sich dieser (Tag 12) allerdings als statistisch signifikant niedriger im Vergleich zur Referenz (Tag 21) charakterisieren, was den Zeitpunkt in Kombination mit einer signifikanten herunter Regulierung der p-GP-Expression an Tag elf als Möglichkeit für eine Kulturzeitverkürzung disqualifizierte. Ein erneuter Versuch mit Rhodamin 123 an Tag 14 zeigte nun keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Tag 21 mehr, allerdings waren die P_{app} -Werte für beide Transportrichtungen um 40 bis 50 % reduziert, was für eine geringere Funktionalität an diesem Tag spricht. Dagegen ließ sich in der Expression eine signifikante Überregulierung des Genes erkennen, was nahelegt, dass die geringere Funktion von p-GP mit einer erhöhten Bildung dieses Proteins kompensiert wurde. Aus der Verbindung dieser beiden Umstände ließ sich eine Verkürzung der Kulturzeit auf 14 Tage als plausibel einstufen.

Insgesamt wurden dementsprechend fünf Experimente zur Evaluierung einer möglichen kürzeren Kulturzeit durchgeführt. Aus den Ansätzen zur Qualität des Monolayers ergab sich zunächst eine ausreichende Integrität der Monolayer in der ersten Woche der Kulturzeit, was jedoch von der Visualisierung der Zellen in Mikroskopbildern widerlegt wurde. Es zeigte sich, dass die Zellen trotz aller positiven Kennzahlen zur Dichtigkeit der Zellschicht erst nach mehr als zehn Tagen dicht gewachsen waren, sodass aussagekräftige Transportversuche am ehesten an Tag 12 möglich waren. Daher wurden in Untersuchungen zur Expression und Funktionalität von p-Glykoprotein der Zeitraum zwischen den Tagen 11 und 15 betrachtet. Allerdings war die Funktionalität an diesem Tag im Vergleich zu Tag 21 geringer und auch die Expression am Tag elf fiel niedriger aus. An Tag 14 dagegen war die Funktionalität basierend auf den beiden Transportrichtungen erniedrigt, allerdings die Expression signifikant zur Referenz erhöht, was dies auszugleichen schien. Kombinierte man nun die Erkenntnisse aus allen fünf Versuchen, so lag es nahe, dass eine Verkürzung der Kulturzeit von drei auf zwei Wochen ohne einen Verlust an Aussagekraft der Ergebnisse plausibel erschien. Nach unserem Kenntnisstand wurde diese Kombination aus den fünf Experimenten erstmalig zur Beurteilung der Monolayerqualität und der Genexpression sowie der Funktionalität von p-Glykoprotein untersucht und liefert daher einen neuartigen Ansatz für Transportversuche mit CaCo-II-Zellen. Zudem konnte diese Verkürzung ohne einen Wechsel des Kulturmediums oder ein Anpassen der Kulturbedingungen durchgeführt werden, womit ein negativer Einfluss auf die Erkenntnisse durch fragliche Wirkung auf zelluläre Prozesse dahingehend ausgeschlossen werden konnte.

4 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport

4.1 Hintergründe der Transportversuche

Für eine adäquate Versuchsdurchführung von Transportassays mit CaCo-II-Zellen sind die Kulturbedingungen von großer Bedeutung und können einen Einfluss auf die Qualität der Monolayer während der Versuche sowie die Expression von p-GP haben. Unterschiede in der Zusammensetzung des Kulturmediums, im experimentellen Protokoll, wie Waschschritte, Inhalt des Versuchsmediums, oder das Alter der Zellen, zum Beispiel Passagennummer oder Kulturzeit, können verschiedene Permeabilitätswerte erzeugen [23]. In der vorliegenden Arbeit wurden CaCo-II-Zellen mit Passagennummern von 60 bis 100 verwendet. Die Expressionslevel von p-Glykoprotein scheinen über eine gewisse Spanne an Passagennummern konstant zu sein [14, 66], was diesen größeren Bereich durchaus rechtfertigt. Zudem kann die p-GP-Expression im Bereich oberer Passagen höher eingeschätzt werden [93]. Sie steigt also über das Alter der Zellen an und ist in früheren Passagen deutlich geringer [93], weswegen die CaCo-II-Zellen nicht in niedrigeren Passagen verwendet wurden. Auch konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass in höheren Passagen der TEER-Wert als Maß für die Integrität größer war [247]. Neben der Passagennummer ist die Zelldichte beim Aussäen essentiell für die Entwicklung, da die Differenzierung erst mit einem konfluenten Zelllayer beginnt und dann erst relevante Merkmale exprimiert werden [99]. Niedrigere Dichten führen zu dünnen Zellschichten mit wenigen Tight-junctions und höhere Dichten zu Multilayern, jedoch vermindert eine Abweichung in beide Richtungen jeweils die Expression bestimmter Transporter [99, 100]. Die Ausbildung eines Multilayers kann auch durch das Wechseln des Mediums drei bis sechs Stunden nach dem Aussäen für einen Transportversuch beschränkt werden [99, 105]. Ob die Inserts, auf denen die Zellen wachsen, zusätzlich beschichtet sind oder nicht, scheint keinen größeren Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Expressionsverhalten der CaCo-II-Zellen zu haben [100].

Die Transportversuche wurden nach den Vorgaben von *Hubatsch et al.* durchgeführt [105]. Dieser Versuchsaufbau macht es möglich, die Permeabilität einer Testsubstanz in zwei Richtungen, basolateral oder apikal, und darüber hinaus noch den aktiven oder passiven Transport zu studieren [105]. Die initiale Konzentration der Substanz richtet sich nach deren Löslichkeit und Toxizität [105]. Das Volumen in den Versuchen wurde auf 0,4 mL apikal und 1,2 mL basolateral festgelegt, weil es so keine hydrostatischen Druckunterschiede gibt [105]. Ein Schütteln der Zellkulturplatten mit den Inserts während des Versuches ist zusätzlich zwingend notwendig, um den Einfluss der starren Wasserschicht zu minimieren (siehe Abbildung 33), da die genauen hydrodynamischen Bedingungen in den Inserts

unbekannt sind, wohingegen ein Einfluss der Dicke der starren Wasserschicht gesichert ist [105, 109]. Diese Schicht kommt mit einer Dicke von 30 bis 100 μm ebenso physiologisch im menschlichen Darm vor und die Bewegung der Zellkulturplatten können zudem die Darmmotilität in vivo simulieren [116]. Die Dicke der unbewegten Wasserschicht kann zu einer Überschätzung der Permeabilität von hoch-permeablen Substanzen führen, allerdings sollte nicht zu kräftig geschüttelt werden, da sich dies auf die Integrität der Monolayer ab einem kritischen Punkt negativ auswirkt [105, 116]. Eine Unterschätzung der unbewegten Wasserschicht ist ebenso möglich, wenn beispielsweise sehr lipophile Substanzen gut über den Zelllayer penetrieren würden, jedoch von der polaren Wasserschicht als signifikante Diffusionsbarriere daran gehindert werden [109, 116].

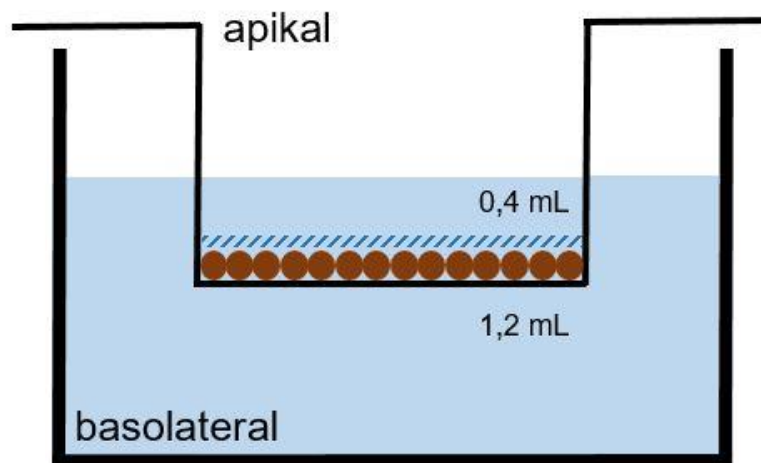


Abbildung 33 Schematische Darstellung eines Wells aus einer 12-Well-Platte mit einem Insert und Zellbewuchs. Sowohl apikal als auch basolateral der CaCo-II-Zellen befindet sich das Versuchsmedium in den entsprechenden Volumina, die zu einem ausgeglichenen Flüssigkeitsstand führen und somit hydrostatische Druckunterschiede verhindern. Die mögliche unbewegte Wasserschicht ist oberhalb des Zelllayers eingezeichnet (blaue Striche) (modifiziert nach [105]).

Sind diese Probleme noch eher mechanischer Natur, so kann auch das für die Transportversuche verwendete Medium unter bestimmten Umständen problematisch sein.

4.2 Grundlagen zum Versuchsmedium und Ausblick auf Variationen

Für die Transportversuche kann das gewöhnliche Zellkulturmedium aufgrund seiner Zusammensetzung nicht verwendet werden. Die Bestandteile könnten den Versuchsverlauf durch Interaktion mit den Testsubstanzen, wie zum Beispiel durch Adhäsion an Proteine, stören und die Analyse erschweren. Das macht einen Wechsel der Flüssigkeit nötig, wofür

eine gepufferte Salzlösung mit pH 7,4, die Hank`s balanced salt solution (HBSS), verwendet wird [121]. Der Gebrauch von HBSS spiegelt physiologischen Bedingungen allerdings eher ungenügend wider, da viele natürliche Bestandteile darin fehlen [246]. So sind die physiko- und biochemischen Eigenschaften dieses Puffers sehr unterschiedlich zur intestinalen Flüssigkeit [256]. Spezielle Medien, welche bestimmte Ernährungssituationen simulieren, könnten hier Abhilfe schaffen [246]. Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) und Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) beispielsweise, welche den Fasten- sowie den Ernährungszustand simulieren, sind mit Anpassungen zur Einstellung von pH-Wert, Osmolarität und Zugabe von Gallensäuren oder Enzymen besser geeignet, die menschliche Intestinalflüssigkeit nachzubilden [256, 257]. Vor allem das Vorhandensein von Gallensäuren kann die Integrität des Monolayers verändern, den p-GP-vermittelten Transport modulieren und somit die Permeabilität von Substanzen beeinflussen [246]. Ferner zeigte die Verwendung von humanem intestinale Fluid, was über Nacht durch duodenale Aspiration mit einem Katheter aus freiwilligen Probanden gewonnen wurde, in Bezug auf den Einfluss von p-GP-vermitteltem Transport, dass dieser mit HBSS als Transportmedium eher überschätzt wird. Eine Reihe von natürlich vorkommenden Substanzen, wie zum Beispiel Hormone, können mit diesen Transportern interagieren [246]. Die Verwendung von biorelevanten Flüssigkeiten in Zellmodellen zur Simulation der intestinalen Barriere kann folglich die Bioverfügbarkeit, speziell von neuen Kandidaten oder Dosierformen, genauer vorhersagen [256, 257]. Mit der Standardlösung HBSS lassen sich je nach Fragestellung somit eher Tendenzen charakterisieren, welche in weiterführenden Versuchen noch genauer untersucht werden sollten.

Es wurden neben den normalen Transportversuchen zusätzliche Experimente mit der Verwendung von einem angepassten pH-Wert von 6 auf apikaler Seite und mit Zusatz von Gallensäuren durchgeführt (siehe Abbildung 34). Der pH-Wert der Pufferlösung wurde vor dem Versuch einmalig eingestellt und eine mögliche geringfügige Schwankung während der Versuchszeit wurde außer Acht gelassen. Mit der reinen Pufferlösung HBSS ist kein pH-Gradient über den Zellmonolayer zu simulieren [121]. Allerdings ist aus industrieller Sicht der vorherrschende pH-Wert von entscheidender Bedeutung, da sich mit ihm zusammenhängend die Löslichkeit, Stabilität und zielgerichtete Freisetzung über die Formulierung der Arzneiform steuern lässt [67]. Studien legten zudem nahe, dass möglicherweise die Permeabilität von Substanzen im Darm auch mit dem vorherrschenden pH-Wert und der Anwesenheit von Gallensäuren zusammenhängt [121, 134]. Der natürliche pH-Wert im menschlichen Verdauungstrakt auf der Epithelzellschicht pendelt zwischen 1 im Magen und 7,5 im Rektum und schwankt im Dünndarm zwischen 5,5 und 6,5 [67, 121]. Direkt auf den Epithelzellen in diesem Abschnitt liegt er zwischen 5,8 und 6,3 [155]. Somit ist er deutlich verschieden vom gepufferten pH-Wert von 7,4 des gewöhnlichen Transportmediums [67]. Dieses saure Mikroklima kann in vivo die Absorption von Substanzen beeinflussen und ein pH-Gradient während der Transportversuche würde

physiologische Bedingungen besser simulieren [96]. Eine Änderung der Permeabilität erfolgt abhängig vom pK_a -Wert, da sich durch eine pH-Wert-Änderung die ionisierte sowie die unionisierte Fraktion zu einander verschieben [23, 28]. Ebenso sind Arzneistoffinteraktionen im Bereich des Möglichen, falls gewisse Arzneistoffe die pH-Wert-Verhältnisse modulieren und somit zu Änderungen in der Pharmakokinetik anderer Arzneistoffen führen [67]. Beeinflusst wird über den pH-Wert nicht nur die Ionisation von Arzneistoffen, sondern auch die pH-abhängige Funktionalität unterschiedlicher Carrier mit ihren Protonen-Cotransport-Mechanismen [96, 121]. Durch eine Reduzierung der p-GP-ATPase Aktivität findet im niedrigen pH-Bereich eine Verringerung des Transportes von basolateraler in apikale Richtung statt, sodass pH-Wert-Änderungen in die Funktion von p-Glykoprotein eingreifen können [67]. Diese Aktivität ändert sich im Intervall von pH 7,4 bis pH 5,0 nicht, erst ab 4,5 setzt eine merkliche Reduzierung des Auswärtstransportes ein [67]. Das Ausmaß der Funktionsänderung kann auch vom p-GP-Substrat abhängen, was einen zusätzlichen Effekt einer pH-Wert-Änderung auf die Substratbindestelle suggeriert [67]. CaCo-II-Zellen sind alleine nicht in der Lage einen pH-Gradienten zu generieren, sodass dieser ohne Zusatz oder Änderung von außen in den Versuchen konstant neutral bleibt [11]. Jede Veränderung dieses Zustandes kann zu einem anderen Löslichkeitsverhalten der Substanzen aber auch zu einem anderen Verhalten des Monolayers führen [11]. Dementsprechend kann geschlussfolgert werden, dass ein angepasster pH-Gradient im CaCo-II-Modell eine bessere Vorhersage der absorbierten Fraktion zulässt, da sowohl die Substanzen als auch die pH-abhängigen Transporter davon beeinflusst werden [121].

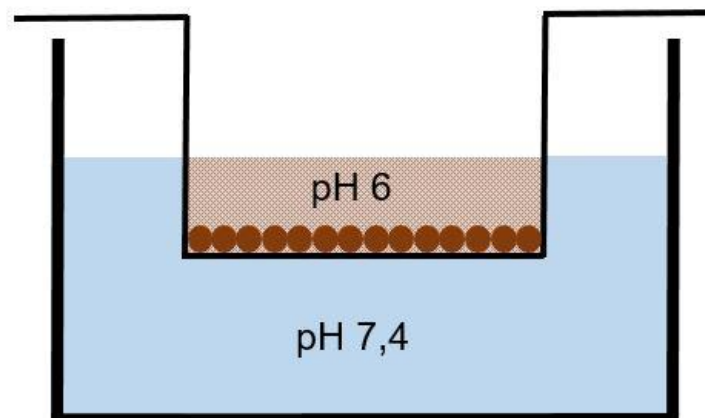


Abbildung 34 Schematische Darstellung der angepassten Versuchsbedingungen. Im apikalen Raum wurden dem Versuchsmedium Gallensäuren supplementiert und der pH-Wert einmalig vor dem Versuch auf 6 eingestellt (blau-braun). In der basolateralen Kammer befindet sich normales Versuchsmedium mit seinem natürlichen, neutralen pH-Wert von 7,4 (modifiziert nach [105]).

Gallensäuren können als biorelevante Zusätze im Transportversuch betrachtet werden, weil sie im intestinalen Lumen vorkommen und somit die physiologische Relevanz des Modells erhöhen können [121]. Durch ihre Eigenschaften sind sie in der Lage, Löslichkeit von hoch lipophilen Substanzen zu erhöhen [256, 257]. Daneben können sie auch die Permeabilität von Substanzen verbessern [121]. Über die Bildung von reversiblen Mizellen in der Lipiddoppelschicht mit der hydrophoben Oberfläche werden womöglich Kanäle gebildet, durch die Substanzen penetrieren können [121]. So wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich neben einem angepassten pH-Wert auch eine 50:50 Mischung der Natriumsalze der Gallensäuren Cholsäure und Desoxycholsäure in einer Konzentration von 100 µg/ml in Versuchen verwendet. Diese haben im menschlichen Darm einen hohen Anteil und zählen zu den wichtigsten Gallensäuren [26, 165].

4.3 Limitationen des Modells und Lösungsansätze

Der Gebrauch eines wässrigen HBSS-Puffers bringt noch einige weitere Probleme mit sich, die die verminderte Löslichkeit von hoch lipophilen Substanzen und den Wert des Zellmodells als in vivo Vorhersagemodell betreffen [121, 257]. Darüber hinaus zeigt dieses System Anfälligkeiten für Adsorption und unspezifische Bindung an die Zellen oder Plastikbestandteile des Modells [121]. Zudem herrschen keine Sinkbedingungen als die treibende Kraft für passiven, transepithelialen Transport [121].

Am Beispiel des Ochratoxin A, einem nephrotoxischen Mykotoxin, lassen sich Beschränkungen eines gewöhnlichen Transportversuchsmodells aufzeigen [78]. Die vorab beschriebene pH-Wert-Änderung (siehe Allgemeiner Teil 4.2) von einem neutralen zu einem physiologischeren Wert konnte den transepithelialen Transport dieses Stoffes und damit die Absorption signifikant erhöhen [78]. Wird der basolateralen Kammer noch Serumalbumin zugesetzt, wodurch das Vorhandensein von Proteinen wie in der Blutbahn imitiert wird, führt dies zu einer zusätzlichen Erhöhung der Absorption im Fall von Ochratoxin A und zeigt einen weiteren potentiell wichtigen Parameter im Gesamtkonzept der Stoffaufnahme in den Körper [78]. Die Anwesenheit von Proteinen in der „Körperseite“ des Versuchsmodells gibt manchen Substanzen mit Affinität zu Eiweißen die Möglichkeit, sich natürlicher zu verhalten. Die damit einhergehende Absorptionsänderung dieses Mykotoxines durch Zusatz von Albumin lässt sich über die damit verbundene Annäherung an Sink-Bedingungen erklären. In vivo wird ein absorbiertes Arzneistoff sofort über das Blut abtransportiert und der so entstehende Konzentrationsgradient bildet die treibende Kraft für den Substanztransport über das Epithel [121]. Die Konzentration im Akzeptorkompartiment wird somit konstant niedrig gehalten. Eine Vorhersage der Diffusion, speziell von Substanzen mit hoher Permeabilität und geringer Löslichkeit aus dem BCS-System, wird

durch das Fehlen von Sink-Bedingungen im Standardprotokoll eines Transportversuch unzureichend wiedergegeben [121]. Das Vorhandensein der Sink-Bedingungen kann folglich im System beispielsweise über den Zusatz von Albumin auf der basolateralen Seite des Systems gewährleistet werden, was in der vorliegenden Arbeit nicht weiterführend untersucht wurde. Aufgrund des fehlenden Abtransportes wie im menschlichen Blut können diese Bedingungen nach Proteinzusatz wegen der steigenden basolateralen Konzentration der Substanz abhängig von Substanzkonzentration und Proteinmenge ungenügend aufrechterhalten werden, aber führen das Modell näher an physiologische Eigenschaften heran. Dieses Problem lässt sich nur über den häufigeren Wechsel des Lösungsmittels in der Akzeptorkammer oder den Umbau des Versuchsmodelles zu einem Flusssystem beseitigen [121]. Der Aspekt der Proteinbindung muss vor allem für den Transport in apikale Richtung in Betracht gezogen werden, da während des Durchgangs in die basolaterale Kammer der Arzneistoff sofort an die Proteine bindet und somit nicht mehr für Effluxtransporter zur Verfügung steht [148]. Das bedingt, dass es zu einer Falscheinschätzung des Efflux und einer Falschberechnung der P_{app} -Ratios kommen kann [148]. Beispielsweise konnte für Verapamil eine hohe Proteinbindung von 90 % detektiert werden, was in der Interpretation eines Versuches im Hinblick auf den Transport dieses Stoffes eine große Rolle spielen würde [257]. Die Zugabe sollte ein Maximum von 4 % Albuminzusatz nicht überschreiten, da dies auch der Konzentration im Serum entspricht [116]. Neben der besseren physiologischen Simulation durch den Albuminzusatz lässt sich so auch die unspezifische Bindung von Substanz an Plastikbestandteile einschränken und generell die Qualität des Zellmodells erhöhen [116, 121].

Eine unspezifische Bindung betrifft vor allem lipophile Substanzen, die nicht nur an Plastikbestandteile des Kulturmodells adsorbieren können sondern auch eine mögliche Adsorption an den Zellmonolayer zeigen [23, 121]. Der Sachverhalt führt zu fehlerhaften Schlussfolgerungen aus den Experimenten, einer schlechten Wiederfindungsrate des Stoffes und zu einer schlechten Massebilanz [23, 121]. Diese Bilanz bezeichnet die Menge an Substanz, welche nach erfolgtem Experiment noch in der Donorkammer wiedergefunden werden kann. Die Permeabilität wird auf Basis von initialer Donorkonzentration, gemessener Akzeptorkonzentration und der Oberfläche der physikalischen Barriere berechnet (siehe Einleitung 2.4.4) [23]. Vor allem Fehler in der Massebilanz wirken sich auf die Berechnung von verlässlichen P_{app} -Werten negativ aus, da durch derartige Bindungen die Konzentration in Donor- und Akzeptorkompartiment reduziert wird [23, 121]. Die Adsorption an Zellen findet auch unter physiologischen Bedingungen statt, jedoch ist die unspezifische Bindung an Plastik ein exklusives Problem von in vitro Systemen, das noch nicht vollständig erforscht ist und dessen Auswirkung auf die Ergebnisse kontrovers diskutiert wird [113, 121]. Eine Anwesenheit von Zellen scheint die Bindung an Plastikbestandteile zu reduzieren, jedoch ist eine positive Auswirkung fraglich, weil der Stoff durch Zelladsorption trotzdem für die Ergebnisinterpretation

„verloren“ ist [121]. Zusätzlich kann ein Substanzverlust durch eine Akkumulation in den Zellen selbst erfolgen [113]. Diese Probleme betreffen die Zellen und den Versuchsaufbau, sind allerdings noch nicht in vollem Umfang verstanden, weswegen ihr genauer Einfluss auf die Ergebnisse aus Transportversuchen weiterhin unklar bleibt. Das potentielle Ausmaß dieser Adsorptionsproblematik hängt nicht zuletzt auch von der genauen Fragestellung der Experimente ab, welche Erkenntnisse gewonnen werden sollen.

Eine weitere Limitation in diesen Untersuchungen betrifft die Testsubstanz selbst. Struktur-Wirkungsbeziehungs-Versuche führen oft zu lipophilen und schlecht wasserlöslichen Arzneistoffkandidaten, die in Permeabilitätsversuchen oftmals eine geringe Löslichkeit im Versuchsmedium zeigen [23, 121]. Hierbei können organische Kosolventien als Lösungsvermittler Abhilfe schaffen, da sie bis zu einer gewissen Konzentration einsetzbar sind [11, 116, 121]. Diese Stoffklasse besteht aus nicht-pharmazeutischen Substanzen, wie Dimethylsulfoxid (DMSO), welches auch in der vorliegenden Arbeit zur Verbesserung der Löslichkeit verwendet wurde, sowie pharmazeutischen Substanzen, wie Cyclodextrin [121]. Eine finale Konzentration des DMSO von bis zu 1 % (V/V) wurde als sehr gut tolerabel für die Zellen vorgeschlagen [11, 23] und konnte in eigenen Zytotoxizitätsversuchen auch als unproblematischer Gehalt ermittelt werden (siehe Allgemeiner Teil 1.1). Höhere Konzentrationen kann die Tight-junction-Funktion dahingehend negativ beeinflussen, dass die Monolayer für Transportversuche unbrauchbar werden [11, 23] oder es kann zu Interferenzen mit den aktiven Transportmechanismen kommen [92, 121]. Folglich können die Ergebnisse durch Verwendung von Lösungsvermittlern leicht unzuverlässig werden [23], was einen dosierten und wohl überlegten Einsatz unabdingbar macht.

Zuletzt soll noch der typische Sauerstoffgehalt von meistens 21 % (Atmosphärengehalt) im Zellkulturmodell erwähnt werden, der um circa das Vierfache in Bezug auf physiologische Bedingungen im Darm erhöht ist [258]. Dieser normale Atmosphärengehalt wird im Körper nicht erreicht und ist abhängig vom spezifischen Gewebetyp und dem Entwicklungszustand des Gewebes oft viel geringer [259]. Man spricht hier von einem physioxischem Zustand, der von einem hypoxischen Zustand abgegrenzt werden muss [259]. Im hypoxischen Zustand ist ein Sauerstoffdefizit zu erkennen, das einen signifikanten Effekt auf Körperfunktionen hat und an der Entwicklung von verschiedenen Krankheiten von kardiovaskulärer oder inflammatorischer Genese beteiligt ist [259]. Die Konzentration dieses lebensnotwendigen Gases ist im menschlichen Kolon und auf dem Level der Mukosa durchschnittlich 5 % [258]. Darüber hinaus nimmt der Sauerstoffgehalt von aufsteigendem Kolon zum Rektum (2 % und <0,1 %) sowie von der Submukosa (10 - 13 %) ins Darmlumen (<0,1 %) hin ab [258]. Diese luminalen Sauerstofflevel von unter 0,5 % werden vor allem von den zahlreichen obligat vorkommenden Anaerobiern benötigt, welche unter den normalen Zellkulturbedingungen nicht in Versuchen verwendet werden

können [260]. Somit ist ein weiterer physiologischer Aspekt, der in der Evaluierung des Arzneistofftransportes von Relevanz sein könnte, nur mit hohem Aufwand darstellbar. Der Sauerstoffgehalt für Kolonkarzinomzellen liegt zwischen 0,1 und 4 % [258], kann sich also noch einmal zusätzlich von den Normalbedingungen im Verdauungstrakt unterscheiden. Des Weiteren variiert die Sauerstoffkonzentration je nach Ernährungszustand und je nach gastrointestinalem Blutfluss, welcher zwischen 5 % des totalen Blutvolumens im Fastenzustand und 30 % nach einer Mahlzeit schwankt [258]. Die Abbildung physiologischer Sauerstofflevel stellt unter Umständen einen relevanten Aspekt für Transportvorhersagen dar, kann jedoch nur aufwändig in der Zellkultur abgebildet werden.

4.4 Substanzen der eigenen Transportversuche

Pflanzliche Inhaltsstoffe gewinnen aufgrund ihrer Vielzahl an postulierten positiven gesundheitlichen Effekten immer mehr an Popularität (siehe Einleitung 3). So wurden für die Untersuchung zum Einfluss auf Transportvorgänge bei CaCo-II-Zellen diverse Polyphenole ausgewählt. Taxifolin, das Aglykon von Astilbin (Abbildung 35 A), kommt in vielen Zitrusfrüchten, wie Grapefruit oder Orange, vor. Es soll antioxidative sowie antimikrobielle Eigenschaften haben, die Triglyceridsynthese hemmen und darüber hinaus antiproliferative Effekte ausüben, sowie apoptotische Prozesse in Krebszellen auslösen können [174, 261]. Silibinin (Abbildung 35 B) ist der Hauptinhaltsstoff der Mariendistel aus dem mediterranen Raum und wird in einer Anticholesteroldiät zur Prävention von kardiovaskulären Krankheiten eingesetzt. Es soll auch gegen verschiedene Krebszellen in beispielsweise Brust-, Haut- oder Darmkrebs antikanzerogene Effekte besitzen und zudem hepatoprotektiv wirken [175, 262]. Ellagatannine und Ellagsäure bildet eine Vorstufe von vielen Urolithinen (Abbildung 35 C - F), welche im Verdauungstrakt über mikrobielle Stoffwechselwege hergestellt und dadurch bioverfügbar werden [179]. Die Vorstufen werden hauptsächlich über passive Diffusionswege absorbiert, was jedoch nur in einem sehr geringen Ausmaß stattfindet [263]. So hat die Darmmikroflora ausreichend Zeit, diverse Stoffwechselprodukte aus den Ellagatanninen und der Ellagsäure zu produzieren, die hinsichtlich ihrer Wirkung auf den p-GP-vermittelten Transport näher untersucht wurden. Dieser intestinale Metabolismus ist individuell variabel und hängt stark von der Zusammensetzung der Mikroflora im Darm ab [179, 264]. In Studien konnten bis zu vier unterschiedliche Metabolisierertypen definiert werden, je nachdem welche Urolithine bevorzugt gebildet werden [179]. Allgemein wird diesen Stoffen ein positiver Effekt bezüglich der Prävention von Darmkrebs über Modulierung der Gen- und Proteinexpression zugesprochen [177]. In der chinesischen Medizin wird dem Trinken von Tee ein großer gesundheitlicher Nutzen zugeschrieben und der Metabolit M1 (Abbildung 35 G) des Hauptinhaltsstoffes von Grünem Tee, dem Catechin, welcher über bakterielle Prozesse

gebildet wird, konnte bereits in relevanten Mengen in Urin und Blut nachgewiesen werden [265]. Zuletzt wurden noch das Racemat von Hydnocarpin D (Abbildung 35 H) sowie die beiden Enantiomere näher betrachtet, inwieweit sich jeweils potentielle Effekte unterschieden. Hydnocarpin D ist in der Pflanzenwelt der tropischen und subtropischen Gebiete weit verbreitet und wird seit tausenden Jahren in Indien, China und Südostasien für Hautkrankheiten eingesetzt [201]. Daneben soll er unter anderem antidiabetische, antiinflammatorische und antimikrobielle Eigenschaften haben [201].

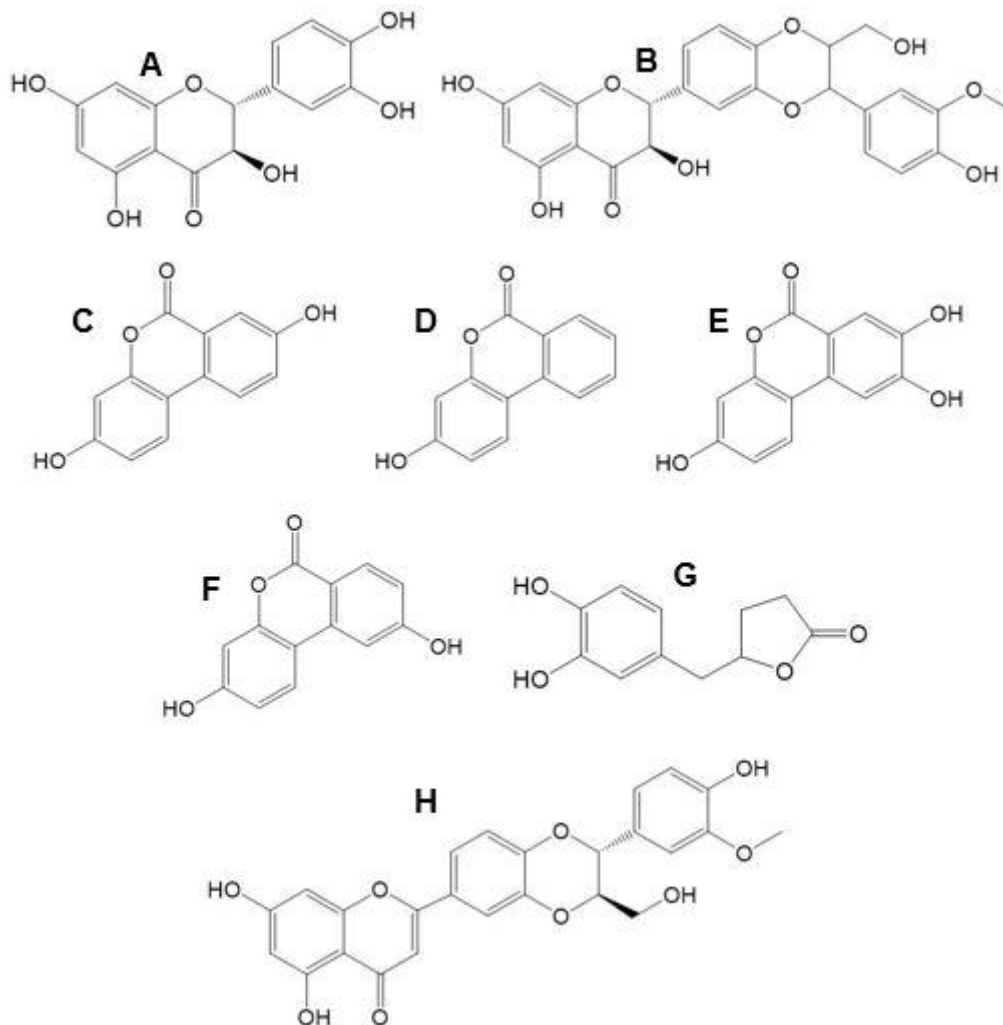


Abbildung 35 Übersicht der, in den Transportversuchen, verwendeten Polyphenole mit Taxifolin (A), Silibinin (B), Urolithin A (C), Urolithin B (D), Urolithin C (E), Isourolithin A (F), dem Catechinmetaboliten M1 (G) sowie dem racemischen Hydnocarpin D (H).

Für eine bessere Einordnung der Effekte dieser pflanzlichen Substanzen auf den Transport via p-Glykoprotein wurden mit Verapamil und Dexamethason zwei Modellsubstanzen für Inhibition und Induktion des Transportproteins in die Experimente mit einbezogen. Verapamil (siehe Abbildung 36) wurde im Jahr 1981 als erster Inhibitor für p-GP

entdeckt [74]. Es zeigt eine hohe passive Permeabilität sowie eine starke Affinität zu p-GP [45] und gilt selbst als kompetitives Substrat dieses Transportproteins [156]. Die Hemmung ist über eine kompetitive Konkurrenz mit dem Substrat, um die Interaktion an der gewöhnlichen Bindestelle reversibel [62]. Darüber hinaus fungiert Verapamil noch als ATPase-Aktivator an diesem Protein [266, 267]. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass diverse Metabolite von Verapamil noch über teilweise große inhibitorische Eigenschaften verfügen [268]. Aufgrund der guten Umkehraktivität der Resistenz gegen viele Arzneistoffe fokussierten sich Forscher auf die Weiterentwicklung von neuen Inhibitoren auf Basis des Verapamilmoleküls, die gegebenenfalls weniger unerwünschte kardiovaskuläre Nebenwirkungen aufweisen [269]. Aus der Molekülstruktur scheint ein basischer Stickstoff in definiertem Abstand zu den zwei aromatischen Gruppen, die flexibel über einen Linker verbunden sind, für die hohe Affinität zu p-GP verantwortlich zu sein [269]. In Transportstudien lässt sich diese Substanz als Modellinhibitor des p-Glykoprotein-vermittelten Transportes durch apikale und basolaterale Zugabe einsetzen und stellt einen der am häufigsten verwendeten Stoffe für die Abbildung dieser Zusammenhänge dar [79, 156]. Der apikal-gerichtete Transport von Digoxin ließ sich um 73 % senken [117]. Gleiches beobachteten *Hosoya et al.*, die den Transport von Cyclosporin A von basolateraler in apikaler Richtung um 40 % erniedrigen konnten [156]. Daher eignet sich Verapamil um Transportvorgänge über p-Glykoprotein zu charakterisieren.

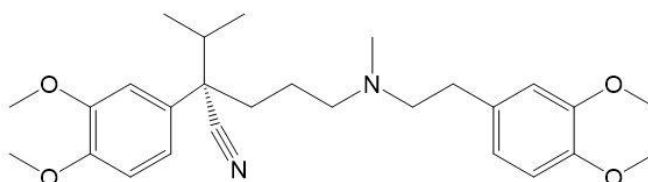


Abbildung 36 Strukturformel von Verapamil, das als Modellinhibitor für den p-GP-vermittelten Transport verwendet wurde.

Das Glukokortikoid Dexamethason (siehe Abbildung 37) wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellinduktor für p-Glykoprotein verwendet. Diese synthetische Substanz ist in der Lage, abhängig vom Gewebetyp oder der Zellherkunft, die Expression von Effluxproteinen zu beeinflussen [270]. Zudem gilt es als p-GP-Substrat [103]. Die Beeinflussung der Genexpression ist für Glukokortikoide schon lange bekannt. Auch für Dexamethason konnte gezeigt werden, dass es konzentrationsabhängig in menschlichen Leberzellen das für p-GP-kodierende Gen MDR1 aktivieren und somit die Expression steigern kann [157]. Ebenso zeigte sich in Studien eine konzentrationsabhängige und reversible Steigerung der p-GP-Expression im Endothel von Rattenhirnen nach vierundzwanzigstündiger Inkubation [270]. Aufgrund der physiologischen Funktion von p-GP für den Transport von

Steroiden (siehe Einleitung 2.3) wäre ebenso eine direkte Modulation und Interaktion mit dem Transportprotein neben der Genexpressionskomponente möglich, die nach unserem Kenntnisstand noch nicht näher beschrieben ist.

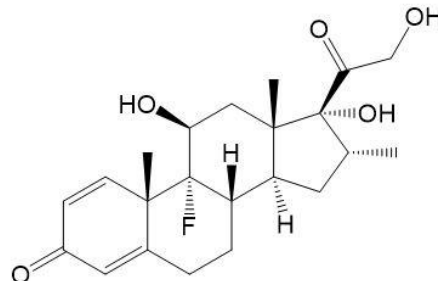


Abbildung 37 Strukturformel von Dexamethason, das als Modellinduktor für den Transport via p-Glykoprotein gebraucht wurde.

In den Transportversuchen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (siehe Allgemeiner Teil 3.2), welcher als Modellsubstrat von p-Glykoprotein gilt, verwendet, um den p-GP-beeinflussenden Effekt der Polyphenole zu evaluieren. Im Anschluss an diese Experimente wurde für den näheren Praxisbezug für die Analyse des Einflusses der Urolithine als Substrat von p-Glykoprotein das synthetische antibakterielle Fluorchinolon Ciprofloxacin ausgewählt (siehe Abbildung 38) [271]. Dieses zählt ebenfalls zur großen Gruppe der p-GP-Substrate [103]. In vivo wird 18 % einer i.v. Applikation einer Ciprofloxacinosis intestinal eliminiert, was sich als Ausscheidungsweg mit in vitro Daten, die die aktive transepitheliale Sekretion im CaCo-II-Zellmodell zeigten, bestätigen ließ [106, 271]. Diese Sekretion war im Modell sättigbar und wurde durch die Hemmung intrazellulärer ATP-Konzentrationen antagonisiert [106]. *Cavet et al.* konnten in ihrer Studie die Sekretion von Ciprofloxacin in Transportversuchen über CaCo-II-Zellen durch Zusatz von 100 μM Verapamil um 64,9 % senken, was einen aktiven Transport über p-GP nahelegt, jedoch auch zeigt, dass dies offenbar nicht der einzige Weg ist [272]. Für die teilweise widersprüchlichen Erkenntnisse zu Ciprofloxacin scheint die Absorption über einen energieabhängigen Transporter verantwortlich zu sein, der den Auswärtstransport durch p-Glykoprotein dadurch abschwächt [273]. Auch zeigte diese Untersuchung einen Unterschied im Ciprofloxacintransport zwischen verschiedenen Zelltypen mit Schwankungen in der p-GP-Aktivität [273].

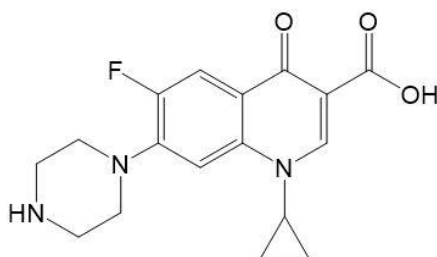


Abbildung 38 Strukturformel von Ciprofloxacin, was als weiteres Substrat von p-GP in den Versuchen verwendet wurde.

In den Transportversuchen sollte nach Möglichkeit eine Überprüfung der Monolayerqualität stattfinden, um auszuschließen, dass die Integrität komprimiert ist und somit irreführende Ergebnisse resultieren. Zu diesem Zweck können aus einer Reihe von Markersubstanzen die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Lucifer Yellow verwendet werden. Lucifer Yellow dient dabei ausschließlich als Referenz für den parazellulären Weg (siehe Allgemeiner Teil 3.2). Fluorescein (siehe Abbildung 39) kann ebenso als Marker für den parazellulären Transport dienen, allerdings liefert es auch Auskunft über einen intakten transzellulären Transportweg, da in den Transport spezifische protonengekoppelte Mechanismen involviert sind [96, 250, 263]. Der Transport dieser Substanz ist pH- und konzentrationsabhängig sowie sättigbar, in eine basolaterale Richtung führend und unabhängig von der Permeabilität der Tight-junctions [250]. Im Gegensatz zu den TEER-Werten sollten die P_{app} -Werte für Fluorescein möglichst niedrig sein, was ebenso für Lucifer Yellow gilt [96, 250]. Diese inverse Relation ist jedoch erst um einem pH-Wert von 7,4 gegeben und in niedrigeren Bereichen um pH 6 können P_{app} - und TEER-Werte unabhängig voneinander betrachtet werden [96, 250]. Für die Einordnung der Ergebnisse gelten $0,5 - 1 \times 10^{-6}$ cm/s als Grenze für einen gut ausgebildeten Monolayer und im Falle einer Beschädigung würden diese deutlich höher liegen [96, 263].

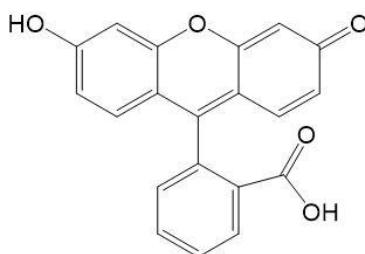


Abbildung 39 Strukturformel von Fluorescein, das als Marker für die Integrität des CaCo-II-Monolayers benutzt wurde. Ein intakter Monolayer zeigt eine geringe Permeabilität für diese Substanz, die unter $0,5 - 1 \times 10^{-6}$ cm/s liegen sollte.

Während der Transportversuche können eine Reihe von Umständen zu einer Überschätzung der Permeabilitätswerte führen [23]. Eine solche fehlerhafte Einschätzung

können auch die Testsubstanzen über zytotoxische oder monolayerschädigende Eigenschaften selbst bedingen. In der Inkubationsphase kann es konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Integrität des Monolayers kommen, was eine höhere Permeabilität als über einen intakten Monolayer bewirkt [23]. In Studien zeigte sich für den Einsatz von Flavonoiden in derlei Versuchen eine Konzentration von 50 μM , welche unter Bezugnahme auf eine tägliche orale Einnahme, eine variable Extraktion sowie variierende Volumina der Flüssigkeit im Magen-Darm-Trakt bestimmt wurde, als gut verträglich für die Zellen [251]. So wurde diese Konzentration nicht nur für die pflanzlichen Stoffe, sondern auch für die beiden Kontrollen, Verapamil und Dexamethason, verwendet.

4.5 Simulation von oxidativen Schäden im Darm im CaCo-II-Zellmodell

Lipopolysaccharid (LPS), ein Hauptbestandteil der Zellwände gram-negativer Bakterien und ubiquitärer Endotoxinmediator, wird in Studien eingesetzt, um inflammatorische Prozesse in den Zellen zu provozieren (siehe Abbildung 40) [274-276]. Intestinale Epithelzellen sind eine wichtige physikalische Barriere für Fremdstoffe, um deren Eindringen in den Körperkreislauf zu verhindern [275, 277]. Krankheiten mit einem inflammatorischen Geschehen, wie die entzündliche Darmerkrankung, führen, vor allem durch eine Fehlfunktion in den Tight-junctions, zu einer Störung in dieser Schutzschicht und damit zu einer erhöhten Exposition mit Pathogenen [275]. Interleukin-8 ist ein inflammatorischer Mediator, der während beispielsweise bei LPS-induzierten inflammatorischen Prozesse vermehrt sekretiert wird und dessen Überproduktion in vitro mit LPS stimuliert werden kann, um Entzündungssituationen nachzuahmen [275, 278]. Im Gegenzug konnte auch nachgewiesen werden, dass LPS die Expression von relevanten Proteinen für die Tight-junction-Funktion signifikant beeinträchtigen kann [278]. Allgemein kann die proinflammatorische Zytokinkaskade von dieser Substanz stimuliert werden [276] und es wird über unter anderem oxidative Mechanismen eine Barrieredysfunktion herbeigeführt [279]. Dieser Sachverhalt legt eine Wirkung von pflanzlichen Inhaltsstoffen mit antioxidativen Eigenschaften nahe, die dem Effekt von LPS entgegenwirken könnten. So kann ihre Aufnahme die Inzidenz von kardiovaskulären Krankheiten, sowie Krebs oder Diabetes mellitus Typ 2, welche durch eine chronische und systemische inflammatorische Komponente gekennzeichnet sind, senken, da sie die Entzündung und den oxidativen Stress über einen Eingriff in Signalkaskaden modulieren können [280]. Viele Früchte oder Pflanzenarten, wie Granatapfel, Grapefruit oder Thymian, werden weltweit aufgrund ihrer antioxidativen und antiinflammatorischen gesundheitlichen Vorteile, welche auf die Polyphenole zurückzuführen sind, konsumiert [278, 281, 282]. Eine präventive Wirkung gegen inflammatorische Prozesse wurde für Kämpferol und Quercetin nachgewiesen [275,

276]. Für viele Flavonoide wurde eine Schutzwirkung gegen intestinale Inflammation gezeigt [277]. Für die Induktion einer Inflammation mittels LPS gibt es diverse Schemata: 24 Stunden mit 1 µg/mL [275], 25 µg/mL [278] oder 100 µg/mL [277] sowie kürzere Zeiträume über 2 Stunden mit 400 µg/mL [279] oder über 6 Stunden mit 200 µg/mL [276]. Der Unterschied in der Inkubationszeit mit LPS führt zu einer Simulation einer akuten, beziehungsweise einer chronischen Inflammation [276], was auch die unterschiedlichen Konzentrationen erklärt.

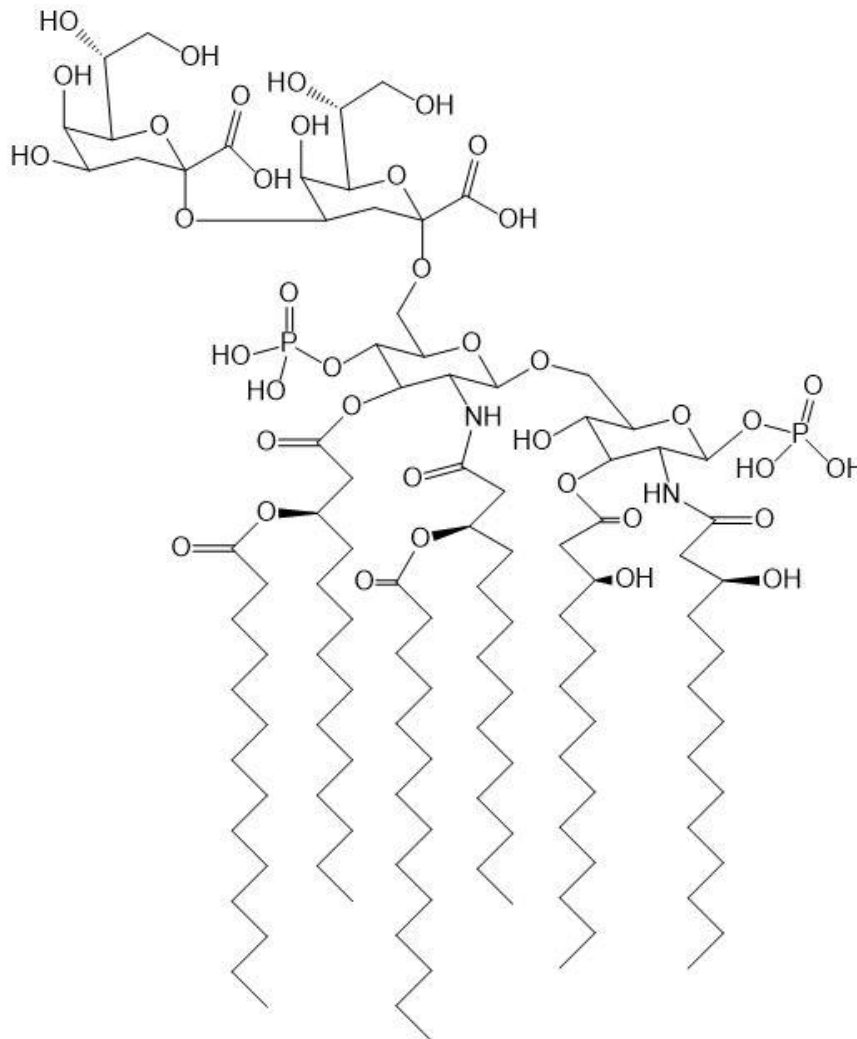


Abbildung 40 Strukturformel von Lipopolysaccharid (LPS), welches als bakterielles Endotoxin im Körper oxidativen Stress auslösen kann.

4.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde in Transportversuchen das p-GP-Modellsubstrat Rhodamin 123 (siehe Allgemeiner Teil 3.2) zur Untersuchung der Funktion dieses

Transportproteins verwendet. Ausgewählte pflanzliche Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Polyphenole (siehe Allgemeiner Teil 4.4) sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeiten untersucht werden, inwieweit sie den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123 beeinflussen können. Eine Identifizierung dieser Einflüsse fand in klassischen Transportversuchen in einem Zwei-Kammer-System statt, mit dem ein Vergleich von apikalem-zu-basolateralem und basolateralem-zu-apikalem Transport des p-GP-Substrats unter Inkubation mit einer Testsubstanz gezogen wurde [101]. So wurden neben der Evaluierung des Effektes der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport unter Standardbedingungen und unter physiologischeren Versuchsbedingungen mit Zusatz von Gallensäuren und dem Einstellen auf pH 6 noch weitere Aspekte überprüft. Zu diesen zählte der praxisnähere Einfluss der Urolithine auf den Transport des Antibiotikums Ciprofloxacin, die Frage nach dem zeitlichen Einsetzen des Effektes direkt am Transportprotein, sowie eine mögliche Protektion der Zelllayer vor oxidativen Schädigungen. Die Erkenntnisse aus den Genexpressionsversuchen für die Urolithine (siehe Allgemeiner Teil 5.3), bei denen eine Stimulation der Expression für p-GP detektiert werden konnte, sollten hinsichtlich der funktionellen Aktivität von p-GP bestätigt werden. Diese Untersuchungen hatten das Ziel, ein möglichst umfassendes Bild der Polyphenole im Hinblick auf deren Effekt auf den p-GP-vermittelten Transport im menschlichen Dünndarm, der für Arzneimittel sehr relevant ist, zu liefern.

4.7 Ergebnisse

4.7.1 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123

Für eine umfassende Bestimmung des Effektes der Polyphenole auf den Transport war es sinnvoll nicht nur die P_{app} -Ratios, sondern auch die P_{app} -Werte der einzelnen Transportrichtungen -nach basolateral und nach apikal - zu betrachten. Dafür wurden die einzelnen Ergebnisse aus den Inkubationen mit den jeweiligen Testsubstanzen in Anwesenheit der Kontrolle Rhodamin 123 auf die Resultate des alleinigen Rhodamintransportes normalisiert (siehe Abbildung 41). Dementsprechend ergab sich für Rhodamin 123 jeweils ein Wert von 1,00 für die drei Aspekte (P_{app} -Ratio $1,00 \pm 0,21$ ($n= 18$), basolateral $1,00 \pm 0,97$ ($n= 18$), apikal $1,00 \pm 0,87$ ($n= 18$)). Alle normalisierten Ergebnisse wurden einem Ausreißertest unterzogen und diese gegebenenfalls von der Auswertung ausgeschlossen. Die beiden Kontrollsubstanzen, Verapamil und Dexamethason, zeigten auch in den eigenen Versuchen ihre in der Literatur beschriebenen Effekte (siehe Allgemeiner Teil 4.4). Verapamil beeinflusste den basolateralen Transport kaum, konnte jedoch den apikalen auf $0,48 \pm 0,54$ ($n= 15$) und somit ebenfalls die P_{app} -Ratio signifikant auf $0,48 \pm 0,14$ ($n= 15$) verringern. Dexamethason dagegen induzierte beide Wege, den in

apikale Richtung mit $3,21 \pm 0,69$ ($n= 15$) deutlich stärker als in basolateraler Richtung, sodass insgesamt die P_{app} -Ratio mit $1,78 \pm 0,41$ ($n= 15$) durch Zusatz dieses Stoffes um mehr als 75 % gesteigert wurde. Für die Polyphenole ergab sich ein eher heterogenes Bild. Taxifolin und Silibinin waren beiden in der Lage den gerichteten Transport von Rhodamin 123 beidseitig zu hemmen (Taxifolin: basolateral $0,91 \pm 0,62$, $n= 12$; apikal $0,59 \pm 0,72$, $n= 12$, und Silibinin: basolateral $0,41 \pm 0,40$, $n= 9$; apikal $0,72 \pm 0,82$, $n= 9$). Dabei inhibierte Silibinin den basolateralen Weg stärker im Vergleich zur apikalen Route als Taxifolin, weswegen mit einer P_{app} -Ratio von $1,38 \pm 0,39$ ($n= 9$) die Transportrate über p-GP erhöht war. Taxifolin dagegen hemmte den apikalen Weg und somit die p-GP-Funktion in größerem Ausmaß als Silibinin, was zu einer P_{app} -Ratio von $0,82 \pm 0,72$ ($n= 12$) führte. Beide Resultate waren jedoch nicht statistisch signifikant verschieden von der Transportrate des reinen Rhodamins. Eine ähnliche, nicht signifikante Änderung wie Silibinin zeigte der M1 mit einer P_{app} -Ratio von $1,40 \pm 0,51$ ($n= 8$). Bemerkenswert war hierbei die starke Erhöhung sowohl des basolateralen ($2,49 \pm 2,07$, $n= 8$) als auch des apikalen Transportes ($3,86 \pm 4,07$, $n= 8$) im Vergleich zum reinen Rhodamintransport, die jedoch beide mit einer hohen Standardabweichung behaftet waren. Mit der Ausnahme von Urolithin A ($1,45 \pm 0,64$, $n= 9$) bewirkten alle Urolithine eine statistisch signifikant erhöhte P_{app} -Ratio verglichen mit der Rhodaminkontrolle und somit eine Induktion des p-GP-Transportes (Urolithin B $1,98 \pm 0,45$, $n= 15$; Urolithin C $2,15 \pm 0,58$, $n= 15$; Isourolithin A $1,63 \pm 0,33$, $n= 15$). Mit $0,82 \pm 0,37$ ($n= 9$, Urolithin A), $0,97 \pm 0,26$ ($n= 15$, Urolithin B), $0,55 \pm 0,05$ ($n= 15$, Urolithin C) und $0,29 \pm 0,08$ ($n= 15$, Isourolithin A) waren alle vier Stoffe in der Lage den basolateralen Transport in differenziertem Ausmaß zu verringern. Urolithin A, B und C konnten zudem die apikale Transportrate im Vergleich zu reinem Rhodamin 123 erhöhen ($1,25 \pm 0,74$, $n= 9$; $1,97 \pm 0,28$, $n= 15$; $1,24 \pm 0,26$, $n= 15$). Lediglich Isourolithin A erniedrigte diese Rate auf $0,50 \pm 0,13$ ($n= 15$). Das racemische Hydnocarpin D und seine beiden Enantiomere führten zu einer Erniedrigung der P_{app} -Ratio für den Rhodamintransport (Racemat $0,87 \pm 0,58$, $n= 15$; (+) $0,48 \pm 0,21$, $n= 13$; (-) $0,95 \pm 0,34$, $n= 15$), von denen dies für (+)-Hydnocarpin D auch statistisch signifikant war. Bezogen auf die einzelnen Transportrichtungen und den reinen Rhodamintransport konnten die drei Stoffe als sehr divers charakterisiert werden. Das Racemat verringerte beide Transportrichtungen nur wenig (basolateral $0,97 \pm 0,32$, $n= 15$; apikal $0,86 \pm 0,65$, $n= 15$), wohingegen (+)-Hydnocarpin D diese schon sehr deutlich änderte (basolateral $0,08 \pm 0,03$, $n= 13$; apikal $0,04 \pm 0,02$, $n= 13$). (-)-Hydnocarpin D konnte beide Raten mehr als verdoppeln (basolateral $2,07 \pm 0,45$, $n= 15$; apikal $2,05 \pm 0,67$, $n= 15$). Unter den inhibierenden Substanzen erreichte lediglich (+)-Hydnocarpin D annähernd das Ausmaß der Kontrolle Verapamil. Die induktiven Effekte von Dexamethason wurden in der Untersuchung von Urolithin B und C übertroffen sowie von Isourolithin A annähernd erreicht. Statistisch wurden die einzelnen Versuchsansätze über eine ANOVA mit nachfolgender Tukey`s multiple comparison mit der Rhodaminkontrolle verglichen.

Einfluss der Polyphenole auf den Transport von Rhodamin 123

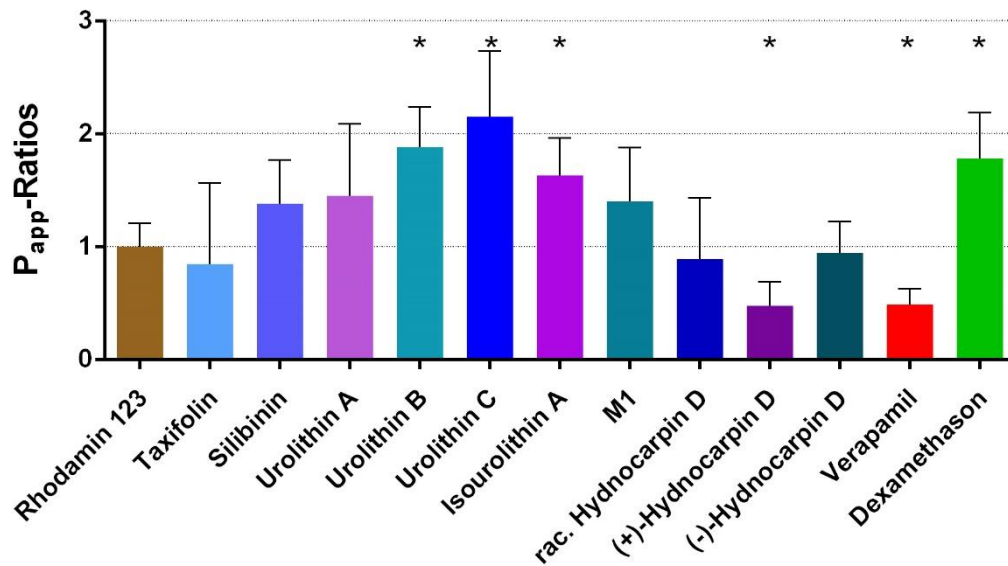


Abbildung 41 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123. Dargestellt ist der jeweilige Einfluss der Substanz als Normalisierung auf die Rhodaminkontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus $n = 8 - 18$. Zusätzlich wurden die beiden Kontrollen, Verapamil und Dexamethason, mit dargestellt. Substanzen mit statistisch signifikanten Einflüssen auf den Rhodamintransport sind gekennzeichnet (*).

4.7.2 Veränderung des Einflusses der Polyphenole unter physiologischeren Bedingungen

Mit dem Zusatz von $100 \mu\text{g/mL}$ an Gallensäuren und einer Einstellung auf pH 6 während der Transportversuche sollten ermittelt werden, ob unter physiologischeren Bedingungen eine Änderung detektiert werden konnte. Tatsächlich wurde für die Substanzen ein Verhalten mit teilweise deutlichen Unterschieden beobachtet (siehe Abbildung 42). Rhodamin 123 selbst zeigte unter den modifizierten Bedingungen mit einer P_{app} -Ratio von $1,89 \pm 0,95$ ($n = 12$) im Vergleich zu reinem HBSS mit $1,45 \pm 0,30$ ($n = 18$) einen etwas höheren Wert, allerdings war die Differenz nicht statistisch signifikant. Die beiden Kontrollen, Verapamil und Dexamethason, lagen mit den P_{app} -Ratios in Gegenwart von Gallensäuren und pH 6 etwas höher als unter Standardbedingungen. Für Verapamil ließ sich sogar eine statistisch signifikant höhere P_{app} -Ratio als in reinem HBSS nachweisen ($0,78 \pm 0,23$ ($n = 15$) zu $0,48 \pm 0,14$ ($n = 12$)). Für Dexamethason war die Ratio zwar mit $2,86 \pm 2,45$ ($n = 9$) zu $1,78 \pm 0,41$ ($n = 15$) deutlich höher im Hinblick auf die Standardbedingungen, aufgrund der größeren Standardabweichung jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Ebenso waren die P_{app} -Ratios von Rhodamin 123 nach Inkubation mit den Stoffen Taxifolin, Silibinin, das racemische Hydrocarpin D und seine beiden Enantiomere nicht statistisch signifikant höher oder niedriger unter den beiden Versuchsbedingungen. Taxifolin führte unter den physiologischeren Bedingungen zu einer Steigerung des

Rhodamintransportes mit einer P_{app} -Ratio nach der Normalisierung auf die Rhodaminreferenz von $1,61 \pm 1,28$ ($n= 15$) im Vergleich zu $0,85 \pm 0,72$ ($n= 12$) in reinem HBSS. Beide Transportrichtungen wurden wiederum von Taxifolin erniedrigt im Vergleich zum reinen Rhodamin 123, allerdings in größerem Ausmaß als unter Standardbedingungen. Das Gleiche galt in Bezug auf die beiden Transportwege für Silibinin, aber mit den P_{app} -Ratios $1,38 \pm 0,39$ ($n= 9$) und $1,23 \pm 0,49$ ($n= 12$) war die Erhöhung des Transportes von Rhodamin 123 in beiden Situationen für Silibinin annähernd identisch. Die drei Hydnocarpine waren auch unter angepassten Bedingungen weiterhin in der Lage, die Transportrate von Rhodamin 123 zu erniedrigen, da alle P_{app} -Ratios unter Eins lagen. Das Racemat verringerte beide Transportrichtungen stärker als unter Standardbedingungen, was allerdings zu keiner signifikanten Änderung der P_{app} -Ratio führte ($0,81 \pm 0,59$ ($n= 9$) zu $0,87 \pm 0,58$ ($n= 15$)). (+)-Hydnocarpin D konnte unter physiologischeren Bedingungen den basolateralen Transport im Vergleich zur Referenz steigern und den Apikalen weniger stark hemmen, was sich in Kombination in eine höhere P_{app} -Ratio als in reinem HBSS äußerte ($0,70 \pm 0,32$ ($n= 9$) zu $0,48 \pm 0,21$ ($n= 13$)). (-)-Hydnocarpin D zeigte nun keine ungefähre Verdopplung der Transportrate mehr wie unter konventionellen Transportversuchsbedingungen, sondern im Gegenteil eine starke Inhibition, die zu einer nochmaligen Verringerung der P_{app} -Ratio auf $0,55 \pm 0,64$ ($n= 8$) von $0,95 \pm 0,34$ ($n= 15$) in reinem HBSS führte. Der M1 zeigte unter Standardbedingungen eine Erhöhung beider Transportwege im Vergleich zum reinen Rhodamintransport und eine Steigerung der P_{app} -Ratio auf $1,40 \pm 0,51$ ($n= 8$). Unter angepassten Bedingungen senkte er in beiden Richtungen signifikant den Transport und die P_{app} -Ratio auf $0,41 \pm 0,11$ ($n= 12$). Urolithin A zeigte nach der Anpassung der Versuchsbedingungen mit einer P_{app} -Ratio von $2,17 \pm 0,62$ ($n= 9$) einen höheren aber nicht statistisch signifikanten Wert verglichen mit reinem HBSS ($1,45 \pm 0,64$, $n= 9$), führte jedoch nun zu einer Senkung beider Transportrichtungen im Vergleich zum Transport von reinem Rhodamin 123. Konnte Urolithin B im Standardexperiment die P_{app} -Ratio sowie den apikalen Transport der Kontrolle noch nahezu verdoppeln und den basolateral gerichteten Durchfluss von Rhodamin 123 konstant halten, so war die P_{app} -Ratio im angepassten Versuch nun signifikant erniedrigt ($0,32 \pm 0,24$, $n= 12$) und auch beide Transportrichtungen waren stark verringert. Für Urolithin C konnte unter neuen Bedingungen ebenfalls eine starke Senkung beider Transportraten im Vergleich zu reinem Rhodamin 123 detektiert werden, die allerdings für den basolateralen Weg stärker ausfiel. In der Folge stieg die P_{app} -Ratio von einer Verdopplung in HBSS ($2,15 \pm 0,58$, $n= 15$) auf das fast Zehnfache im angepassten Experiment signifikant an, war jedoch mit einer sehr großen Standardabweichung behaftet ($9,72 \pm 6,10$, $n= 12$). Isourolithin A verhielt sich in beiden Medien mit einer Erhöhung der P_{app} -Ratio zur Kontrolle ($1,22 \pm 0,29$ ($n= 15$) zu $1,63 \pm 0,33$ ($n= 15$)) ähnlich, war jedoch in geänderten Experimentbedingungen signifikant niedriger als unter Standardumständen. Beide Transportrichtungen wurden im Vergleich zur Referenz verringert.

Vergleich des Rhodamintransportes in zwei Medien

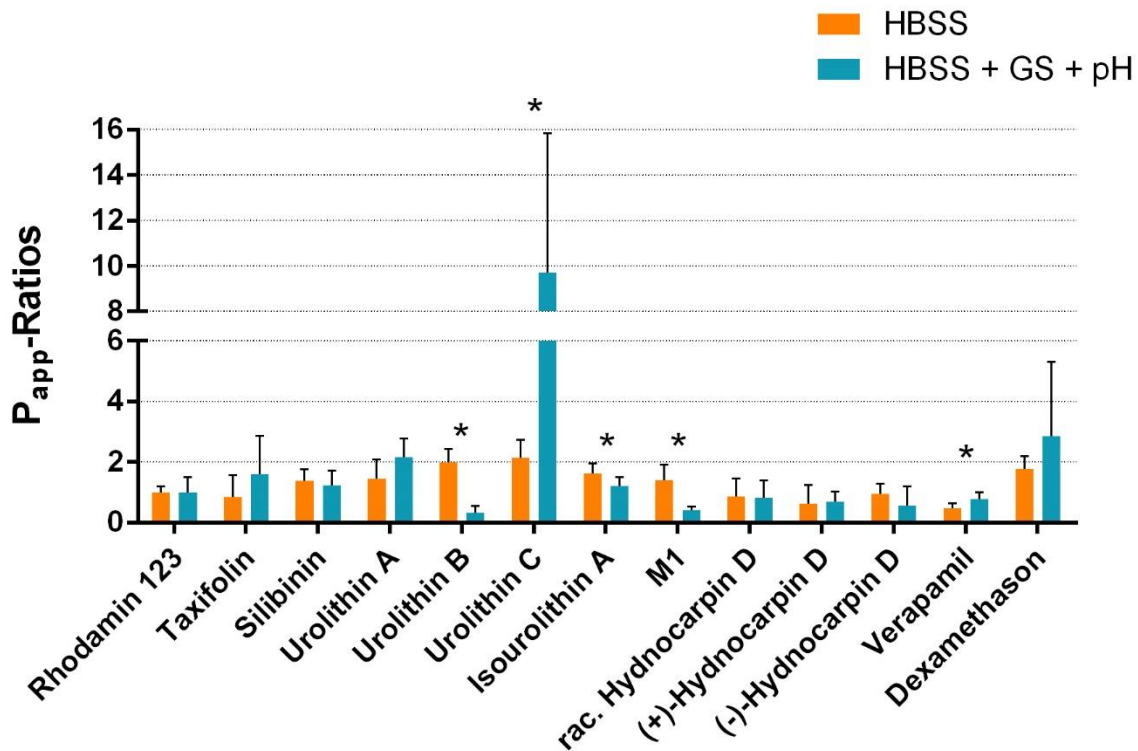


Abbildung 42 Vergleich des Einflusses der Substanzen auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport zwischen reinem HBSS und HBSS, welches mit 100 µg/mL Gallensäuren (GS) versetzt und auf pH 6 eingestellt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung aus n= 8 - 18. Substanzen, deren Effekt auf den Rhodamin 123 statistisch signifikant höher oder niedriger zwischen den zwei Bedingungen war, wurden gekennzeichnet (*).

4.7.3 Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin

Auf Basis der Erkenntnisse aus den Rhodaminversuchen mit den vier Urolithinen (siehe Allgemeiner Teil 4.7.1) wurde zusätzlich ihr Einfluss auf den Transport von Ciprofloxacin untersucht (siehe Experimenteller Teil 5). Dieses Fluorchinolon gilt als p-GP-Substrat (siehe Allgemeiner Teil 4.4) und eine mögliche Beeinflussung des Transportes dieser Substanz durch pflanzliche Inhaltsstoffe stellt im Kontext der vorhandenen Problematik mit Antibiotikaresistenzen und dem geforderten rationalen Einsatz dieser Arzneistoffgruppe einen interessanten Aspekt dar. Mit diesem Ansatz sollte neben den theoretischen Grundlagen aus den Experimenten mit Rhodamin 123 noch ein praktischer Bezug hergestellt werden. Hierbei zeigte sich allerdings ein anderes Bild im Vergleich zu Rhodamin 123 (siehe Abbildung 43). Zwar wiesen alle Substanzen bis auf Isourolithin A (Urolithin A $1,24 \pm 0,17$ (n= 15); Urolithin B $1,17 \pm 0,14$ (n= 15); Urolithin C $1,15 \pm 0,11$ (n= 15); Isourolithin A $0,91 \pm 0,16$ (n= 15)) größere P_{app}-Ratios als Eins auf, was einen größeren Effluxtransport nahelegte. Allerdings fiel nach der Normalisierung der P_{app}-Ratios

auf die Ciprofloxacinratio von $1,71 \pm 0,14$ ($n= 15$) eine statistisch signifikante Erniedrigung aller Werte im Bezug auf diese auf (Urolithin A $0,73 \pm 0,09$ ($n= 15$); Urolithin B $0,69 \pm 0,08$ ($n= 15$); Urolithin C $0,77 \pm 0,10$ ($n= 15$); Isourolithin A $0,53 \pm 0,09$ ($n= 15$)). Somit waren die vier Substanzen in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, den Transport von Ciprofloxacin in basolaterale Richtung zu steigern. Am stärksten zeigte sich dies für Urolithin B mit einer Erhöhung um 45 % ($1,45 \pm 0,49$, $n= 15$), gefolgt von Urolithin A mit $1,39 \pm 0,43$ ($n= 15$), Urolithin C mit $1,14 \pm 0,13$ ($n= 15$) und Isourolithin A mit $1,11 \pm 0,36$ ($n= 15$) bezogen auf die Ciprofloxacin-Kontrolle. Urolithin B wies mit $1,02 \pm 0,40$ ($n= 15$) ein nahezu konstantes Ausmaß des apikalen Transportes verglichen mit reinem Ciprofloxacin auf. Auch Urolithin A führte mit $0,99 \pm 0,25$ ($n= 15$) zu keiner nennenswerten Änderung der apikalen Transportrichtung im Vergleich zum reinen Ciprofloxacin. Für Urolithin C und Isourolithin A dagegen wurde nach der Normalisierung mit 23 % ($0,77 \pm 0,10$, $n= 15$) und 43 % ($0,57 \pm 0,09$, $n= 15$) eine deutliche Erniedrigung des apikalen Transportes verglichen mit der Kontrolle detektiert, was in Kombination mit der Erhöhung des basolateralen Transportes hinsichtlich des Ciprofloxacintransportes die beiden niedrigsten P_{app} -Ratios bedingte.

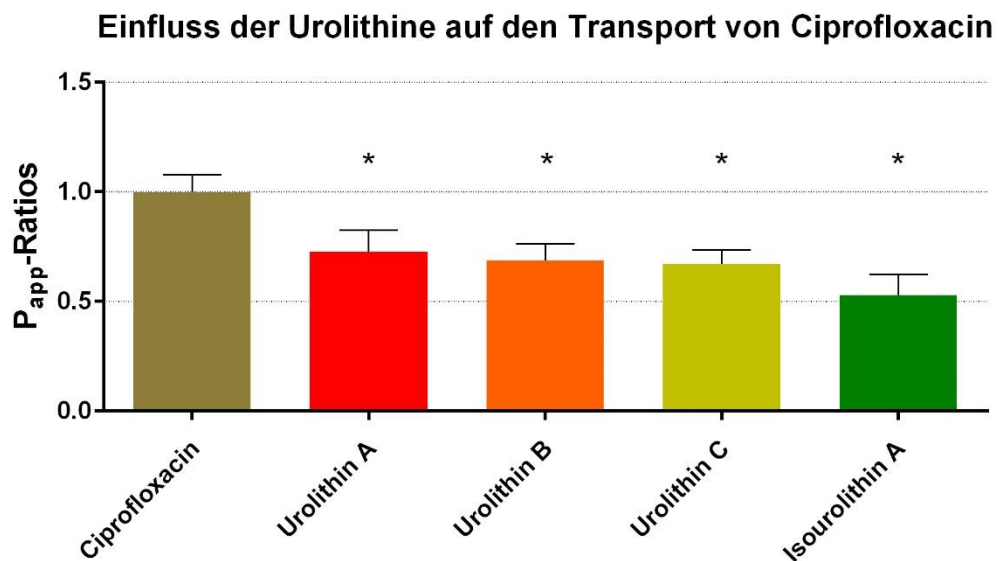


Abbildung 43 Einfluss der vier Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin durch eine CaCo-II-Zellschicht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n= 15$. Alle vier Urolithine zeigten nach der Normalisierung auf reines Ciprofloxacin eine statistisch signifikante Erniedrigung der P_{app} -Ratio von Ciprofloxacin (*).

4.7.4 Effekt einer Vorinkubation mit den Urolithinen auf den Transport von Rhodamin 123

In den Genexpressionsversuchen wurde nach einer Inkubation der CaCo-II-Zellen mit den Urolithinen A, B und C über 24 h und 48 h eine unterschiedlich ausgeprägte signifikante Erhöhung der relativen Genexpression von p-GP ermittelt (siehe Allgemeiner Teil 5.3). Daher sollten diese Erkenntnisse in Transportversuchen mit einer vorherigen Inkubation der Urolithine über 24 h und 48 h auf ihre Konsistenz hin überprüft und ermittelt werden, ob die Erhöhung der Genexpression von p-GP mit einer Modulation der Funktionalität dieses Transportproteins korreliert. Jede der vier Substanzen konnte den Rhodamintransport sowohl nach einer 24-Stunden-, als auch nach einer 48-Stunden-Inkubation statistisch signifikant und teilweise deutlich im Vergleich zu Versuchen ohne Vorinkubation steigern (siehe Abbildung 44). Die Funktionalität erhöhte sich am zweiten Tag nicht mehr so stark und war unter Urolithin B sogar leicht rückläufig ($3,97 \pm 2,33$, $n=15$ (24 h) und $3,70 \pm 0,89$, $n=15$ (48 h)), sodass die ersten 24 Stunden für die Ausbildung dieser Effekte offenbar entscheidend waren. Im Vergleich zu reinem Rhodamin 123 zeigte Urolithin A nach 24 Stunden eine Erhöhung der Transportrate um $4,38 \pm 1,22$ ($n=15$) und nach 48 Stunden eine von $4,89 \pm 0,92$ ($n=15$) bezüglich den P_{app} Ratios. Isourolithin A führte zu einer etwas geringeren Steigerung von $3,09 \pm 1,24$ ($n=15$, 24 h) und $3,44 \pm 1,18$ ($n=15$, 48 h), war jedoch von Urolithin A nicht statistisch signifikant verschieden. Urolithin C stellte sich mit P_{app} -Ratios von $5,20 \pm 2,09$ ($n=15$, 24 h) und $5,33 \pm 0,79$ ($n=15$, 48 h) als der potenteste der vier Stoffe heraus. Betrachtete man die einzelnen Transportrichtungen gesondert, so fiel auf, dass alle Urolithine über jeden Zeitraum mit der Ausnahme von Urolithin C nach 48 Stunden den apikalen Transport um mindestens 60 % und in der Spitze sogar um das Siebenfache durch die längere Vorinkubation erhöhen konnten (Urolithin B, $7,01 \pm 6,79$, $n=15$, 24 h). Urolithin B führte jedoch über den gleichen Zeitraum zu einer geringen Steigerung des basolateralen Transportes im Vergleich zu reinem Rhodamin 123 ($1,45 \pm 0,81$, $n=15$). Über 48 Stunden wurden dann der basolaterale Transport auf $0,41 \pm 0,25$ ($n=15$) erniedrigt und der apikale nur noch auf $1,60 \pm 0,92$ ($n=15$) verglichen zur Kontrolle erhöht. Urolithin C hielt den apikalen Transport nach 48 Stunden mit $0,98 \pm 0,27$ ($n=15$) nahezu konstant, aber konnte den basolateralen auf $0,17 \pm 0,04$ ($n=15$) erniedrigen, was den hohen Anstieg in der P_{app} -Ratio im Hinblick auf reines Rhodamin 123 bedingt. Bereits nach 24 Stunden wurde von dieser Substanz der basolaterale Weg um mehr als 50 % inhibiert ($0,47 \pm 0,41$, $n=15$), allerdings auch der apikale auf $3,11 \pm 3,99$ erhöht. Isourolithin A erniedrigte jeweils die basolaterale Transportrate auf $0,58 \pm 0,26$ ($n=15$, 24 h) und $0,61 \pm 0,57$ ($n=15$, 48 h) und erhöhte die apikale auf $2,23 \pm 1,73$ ($n=15$, 24 h) und $1,71 \pm 0,88$ ($n=15$, 48 h). Das Isomer dieser Substanz, Urolithin A, zeigte ein ähnliches Bild wie Urolithin B: Einer Steigerung der beiden Transportwege nach 24 Stunden ($1,17 \pm 1,14$ ($n=15$, basolateral) und $6,01 \pm 6,24$ ($n=15$, apikal) stand eine Verringerung des basolateralen Weges auf $0,37 \pm 0,08$ ($n=15$) und nur noch eine moderate Erhöhung

auf $1,97 \pm 0,59$ ($n= 15$) des apikalen Weges im Vergleich zum reinen Rhodamintransport nach 48 Stunden gegenüber.

Vergleich des Rhodamintransportes bei unterschiedlichen Inkubationszeiten der Urolithine

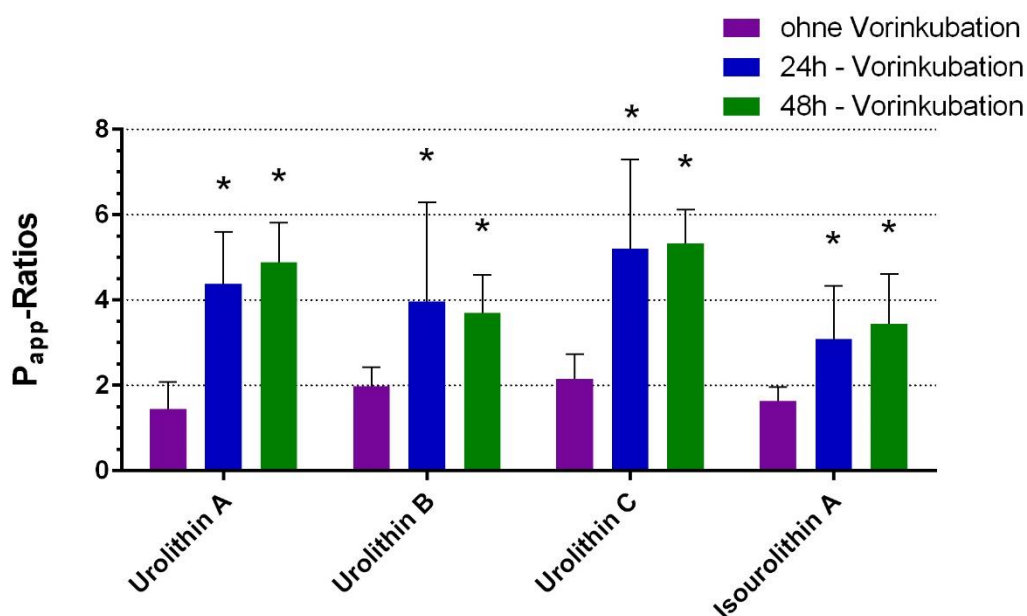


Abbildung 44 Änderung des p-GP-vermittelten Transportes von Rhodamin 123 durch zwei längere Vorinkubationszeiten mit den vier Urolithinen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n= 15$. Alle Inkubationen mit den Urolithinen über 24 und 48 Stunden vor den Transportversuchen mit Rhodamin 123 waren statistisch signifikant unterschiedlich zu den normalen Transportversuchen ohne Vorinkubation (*).

Zwei orientierende Versuche wurden zur Evaluierung einer potentiellen direkten Wirkung am Transportprotein von den Urolithinen A, B und C sowie Dexamethason durchgeführt. Eine fünfminütige Vorinkubation mit den vier Substanzen sollte zeigen, ob diese Zeitspanne für die Ausbildung eines Effektes an p-GP durch die Substanzen ausreichend war und dieser während der Versuchszeit von zwei Stunden und dem Fehlen der Stoffe im Versuchsansatz Beständigkeit besaß (siehe Experimenteller Teil 5.3). Für alle vier Substanzen ließ sich zwar ein höherer apikal gerichteter Transport zur Kontrolle und somit ein aktiver Efflux detektieren (siehe Tabellarischer Anhang 4.5), allerdings lagen die P_{app} -Ratios nach der Normalisierung auf den reinen Rhodamintransport entweder äquivalent zur Referenz (Urolithin B $1,01 \pm 0,09$, $n= 3$) oder zwischen 10 und 22 % darunter (Urolithin C $0,90 \pm 0,07$, $n= 3$; Urolithin A $0,80 \pm 0,02$, $n= 3$; Dexamethason $0,78 \pm 0,13$, $n= 6$) (siehe Abbildung 45). Eine Inkubation über fünf Minuten vor den Transportversuchen in Verbindung mit der nachfolgenden Entfernung der jeweiligen Substanzen während der Versuche reichte demnach nicht aus, um einen Effekt auf p-GP zu entwickeln und diesen auch aufrecht zu erhalten. Demensprechend konnte auch die teilweise signifikanten

Effekte, welche die Substanzen bei einer Verwendung während der Versuche und ohne Vorinkubation generierten, nicht erreicht werden. Die Permeabilitätskoeffizienten in beide Transportrichtungen konnten von jeder Substanz nach fünfminütiger Vorinkubation um mindestens das dreifache im Vergleich zum reinen Transport von Rhodamin 123 gesteigert werden (siehe Tabellarischer Anhang 4.5).

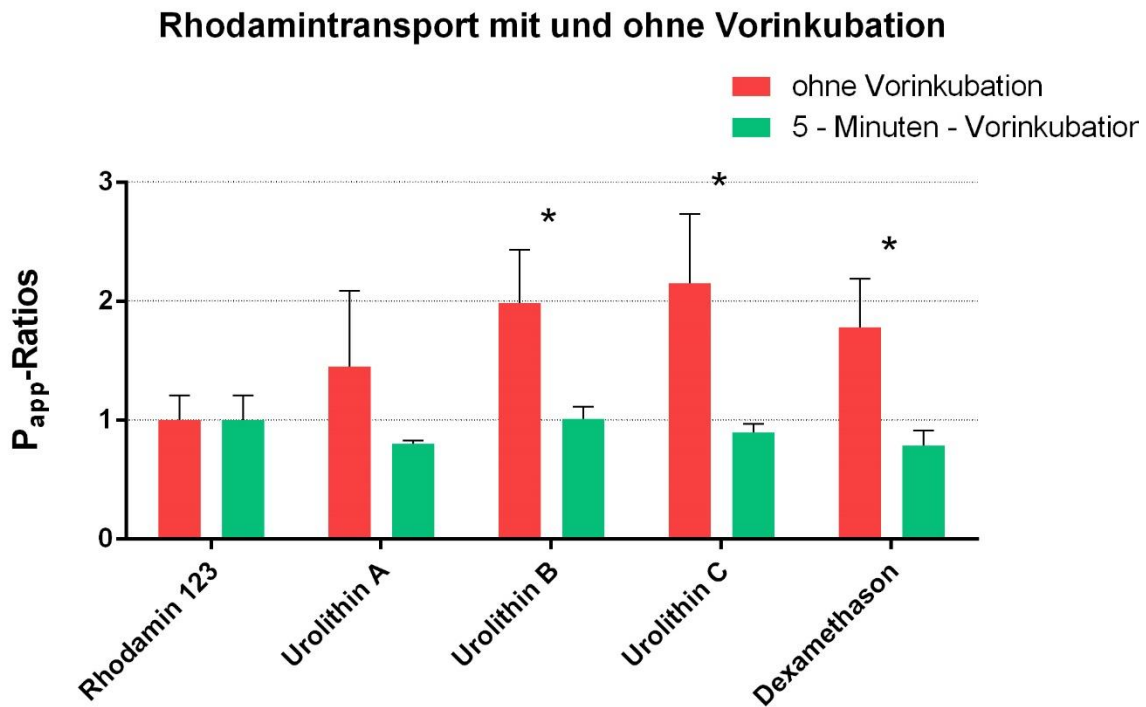


Abbildung 45 Vergleich des p-GP-vermittelten Rhodamintransportes mit und ohne fünfminütiger Vorinkubation mit Urolithin A, B, C und Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n= 3 - 18. In den normalen Transportversuchen fand eine Inkubation mit den Substanzen während der Versuche statt. Eine Inkubation mit den Substanzen während der Versuche entfiel nach der fünfminütigen Vorinkubation. Sämtliche Stoffe konnten nach lediglich fünf Minuten ihre teilweise signifikanten induktiven Effekte (*) auf den Rhodamintransport nicht ausbilden und aufrecht erhalten.

Ein zweiter Versuch hinsichtlich einer direkten Wirkung auf p-GP sollte aufzeigen, inwieweit Urolithin A, B und C sowie Dexamethason in der Lage waren, den p-GP-vermittelten Rhodamintransport durch ihre Anwesenheit im Versuchsansatz zu modulieren. Dafür wurde der Transport von Rhodamin 123 über 60 Minuten (0 - 60 Min) mit dem Rhodamintransport inklusive Anwesenheit von Testsubstanz über weitere 60 Minuten (60 - 120 Min) verglichen (siehe Experimenteller Teil 5.3). Die Permeabilitätskoeffizienten sowie die P_{app} -Ratios konnten für die vier Substanzen nur bedingt korreliert werden (siehe Tabellarischer Anhang 4.6). Im Vergleich der ersten mit den zweiten 60 Minuten konnte ein Zusatz von Urolithin A, Urolithin B und Dexamethason sowohl den Transport in basolaterale Richtung als auch den über die apikale Route steigern. Urolithin C dagegen führte auf beiden

Transportwegen zu einer Erniedrigung der Permeabilität. Im Hinblick auf die P_{app} -Ratios fiel auf, dass die Inkubation mit Urolithin C die Ratio im Intervall von 60 bis 120 Minuten erhöhen konnte, unter Urolithin A die Ratio nahezu konstant blieb und der Zusatz von Urolithin B sowie Dexamethason zu einer Erniedrigung der Ratio führte. Setzte man jedoch die kumulativen Stoffmengen in den zwei Zeitintervallen ins Verhältnis, so war ersichtlich, dass die transportierten Mengen an Rhodamin 123 im Intervall von 60 bis 120 Minuten deutlich über denen aus den ersten 60 Minuten lagen und auch die Gerade einen steileren Anstieg zeigte (siehe Abbildung 46).

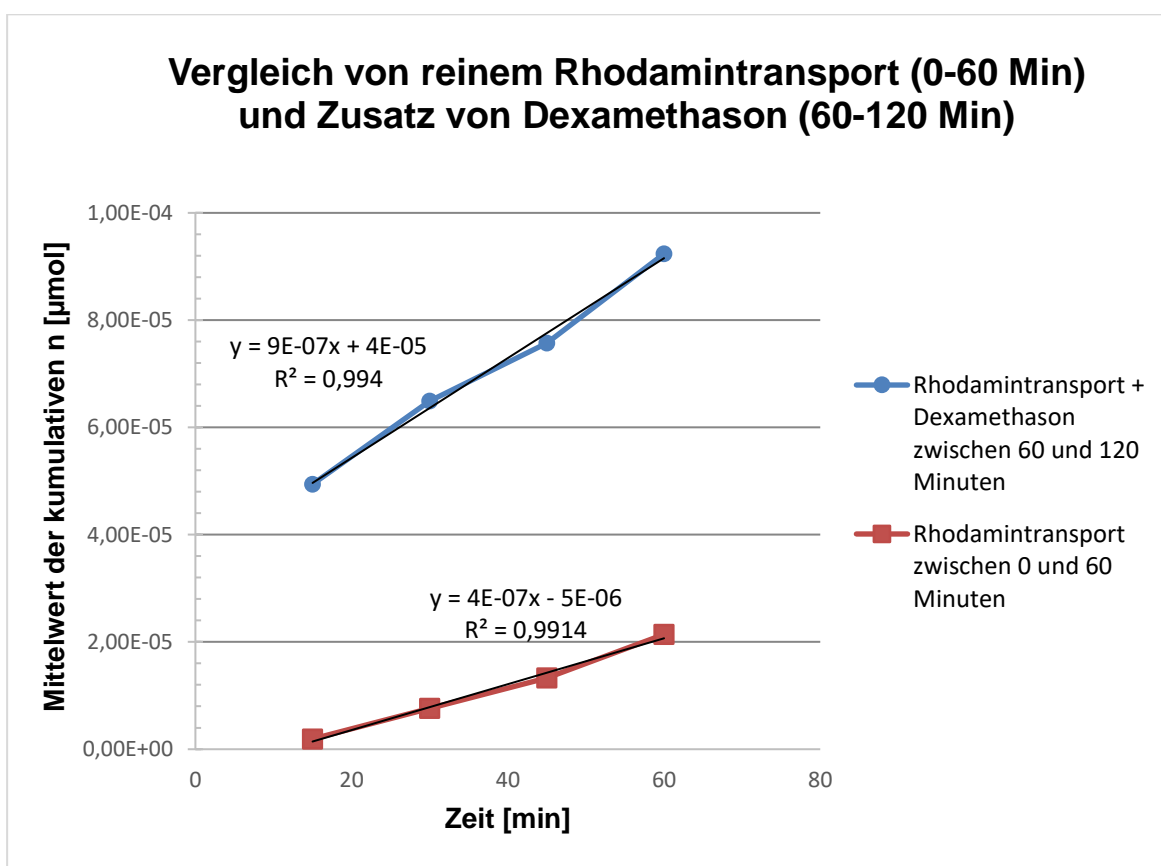


Abbildung 46 Repräsentative Darstellung der kumulativen Stoffmengen an transportiertem Rhodamin 123 in den beiden Zeitintervallen. Zwischen 0 und 60 Minuten handelte es sich um reines Rhodamin 123, zwischen 60 und 120 Minuten fand eine zusätzliche Inkubation mit Dexamethason statt. Dargestellt ist jeder Zeitpunkt in $n=3$. Die kumulativen Werte aus dem zweiten Intervall lagen teilweise deutlich über denen aus dem ersten Zeitintervall und auch die Steigung der Geraden fiel steiler aus.

4.7.5 Effekt der Urolithine auf den mittels LPS veränderten Transport von Rhodamin 123

Eine adäquate und physiologische Epithelfunktion im Verdauungstrakt ist für den Organismus von enormer Bedeutung und eine Dysfunktion in dieser Zellschicht, welche unter anderem vom bakteriellen Endotoxin LPS induziert werden kann, kann zu

pathophysiologischen Krankheitszuständen führen (siehe Allgemeiner Teil 4.5). Daher sollte mittels einer Vorinkubation mit 200 µg/mL Lipopolysaccharid über sechs Stunden eine solche Funktionsstörung als akuter oxidativer Schaden der CaCo-II-Zellen simuliert werden. Diese Konzentration war basierend auf einer TEER-Wertmessung am geeignetsten für die Simulation einer akuten und inflammationsbedingten Monolayer-dysfunktion (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 Übersicht der TEER-Werte nach einer Inkubation mit einer Konzentrationsreihe an LPS über sechs Stunden.

		Konzentration an LPS [µg/mL]				
	Ohne LPS	10	25	50	100	200
TEER-Werte	653	819	791	784	623	381
	854	784	959	823	599	580
	770	932	872	971	312	729
		885	859	871	892	443
		949	963	901	655	380
n	3	5	5	5	5	5
MW	759	873,80	888,80	870	616,20	502,60
SDV	100,95	71,12	72,75	72,06	206,43	150,51

Eine Vorinkubation von 24 h mit den Urolithinen A, B und C sowie Isourolithin A vor der LPS-Stimulation bewirkte keine statistisch signifikante Steigerung der TEER-Werte (siehe Tabelle 8). In der Tendenz zeigten die vier Urolithine jedoch ihre Fähigkeit oxidativen Schäden entgegenwirken zu können, da eine Vorinkubation mit den Urolithinen die jeweiligen TEER-Werte im Vergleich zur reinen LPS-Inkubation wieder steigern konnte.

Tabelle 8 Übersicht der TEER-Werte nach einer Inkubation mit den vier Urolithinen zu je 50 µM vor einer sechststündigen Inkubation mit 200 µg/mL LPS.

	Ohne LPS	200 µg/mL LPS	+ 50 µM Urolithin A	+ 50 µM Urolithin B	+ 50 µM Urolithin C	+ 50 µM Isourolithin A
TEER-Werte	653	381	696	498	473	617
	854	580	711	803	781	561
	770	729	524	618	647	703
		443	423	629	589	649
		380	680	543	633	457
n	3	5	5	5	5	5
MW	759	502,60	606,80	618,20	624,60	597,40
SDV	100,95	150,51	127,29	116,59	110,99	93,86

Die Folge des Zellschichtschadens wurde im Anschluss über eine Messung der Permeabilität von Rhodamin 123 über diesen Zelllayer im Vergleich zu einem unbehandelten Monolayer als Kontrolle bestimmt. Die Werte des Rhodamintransportes nach der Inkubation mit LPS wurden wiederum auf eine Referenz von reinem Rhodamin 123 normalisiert und vorab potentielle Ausreißer eliminiert (siehe Abbildung 47). Die P_{app} -Ratio war nach LPS-Inkubation laut eines t-Testes mit $2,15 \pm 0,49$ ($n=9$) statistisch signifikant höher als in der Kontrolle. Ebenso konnte der Transport in apikale Richtung auf $1,73 \pm 1,09$ ($n=9$) erhöht werden, wohingegen der basolaterale Transport um 27 % verringert wurde ($0,73 \pm 0,44$, $n=9$). Eine Vorinkubation mit 50 µg/mL der vier Urolithine über 24 Stunden vor der LPS-Inkubation konnte diese Tendenz nicht umkehren. In den P_{app} -Ratios zeigte sich für alle Substanzen nochmal eine deutliche Steigerung (Urolithin A $3,70 \pm 1,99$ ($n=9$), Urolithin B $3,40 \pm 1,19$ ($n=9$), Urolithin C $3,63 \pm 1,41$ ($n=9$), Isourolithin A $4,01 \pm 0,89$ ($n=6$)). Diese Ratios waren nach einer ANOVA mit nachfolgender Tukey's multiple comparison signifikant höher als beim reinen Rhodamintransport. In der apikalen Richtung erhöhten alle Urolithine nochmals die Transportrate des Rhodamins. Nur Isourolithin A lag hier leicht unter dem Wert der LPS-Inkubation. Der Transport in basolaterale Richtung konnte nur durch eine Vorinkubation mit Urolithin A leicht erhöht werden. Der Zusatz der anderen Urolithine führte zu einer Verminderung dieser Transportrate, welche nur unter Urolithin B weniger stark ausgeprägt war als unter reinem LPS. Urolithin C sowie Isourolithin A führten nochmals zu einer Verringerung des Rhodamintransportes in basolaterale Richtung.

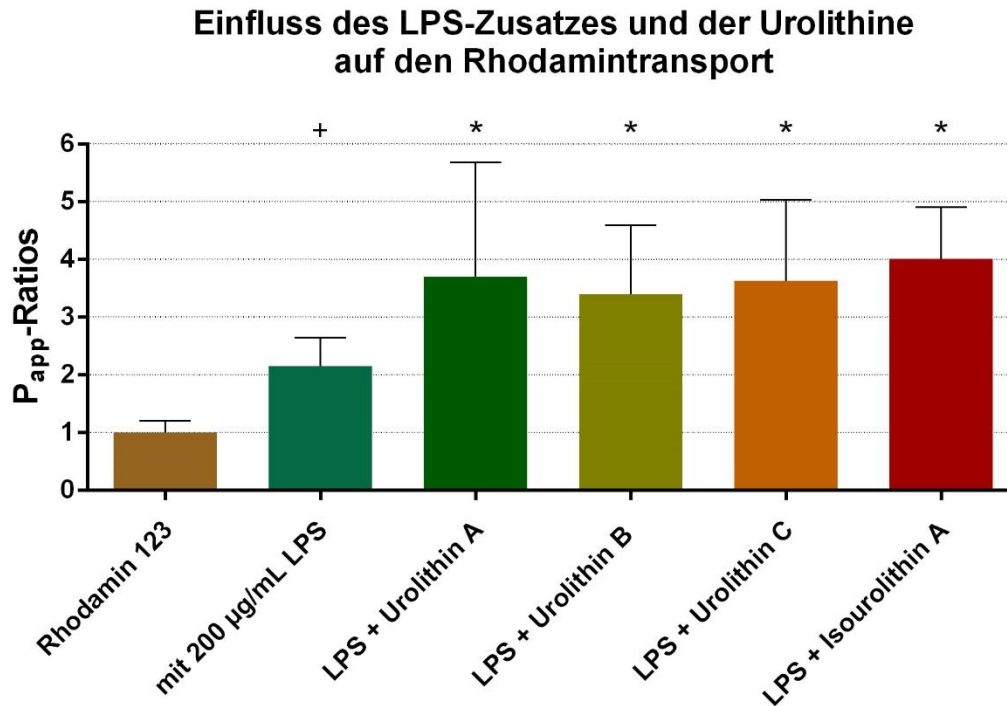


Abbildung 47 Einfluss des LPS-Zusatzes auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport und Effekt einer zusätzlichen Vorinkubation über 24 h mit den vier Urolithinen (je 50 µg/mL). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n= 6 - 9. Der Zusatz von 200 µg/mL LPS zum Kulturmedium über sechs Stunden vor den Transportversuchen führte zu einer signifikanten Steigerung des Rhodamintransportes (+). Die Vorinkubation mit den Urolithinen vor dem Zusatz von LPS konnte den Transport von Rhodamin 123 nochmal signifikant erhöhen (*).

4.7.6 Permeabilität der Kontrollen für die Monolayerqualität Fluorescein und Lucifer Yellow

In sämtlichen Transportversuchen wurde stets die Permeabilität von Fluorescein und Lucifer Yellow zur Evaluierung der Qualität des CaCo-II-Monolayers an jeweils drei exemplarischen Monolayern aus dem Gesamtansatz während der Versuche zusätzlich ermittelt (siehe Allgemeiner Teil 3.2.3 und 4.4 sowie Tabellarischer Anhang 4.8). Für Fluorescein, als Referenz für den funktionierenden Transport über den Zelllayer, ergab sich im Mittel ein Koeffizient von $1,79 \times 10^{-5}$ (n= 30). Die maximale Permeabilität hatte einen Wert von $4,54 \times 10^{-5}$ (n= 30) und die minimale von $2,31 \times 10^{-6}$ (n= 30). Für Lucifer Yellow, als Kontrolle der Monolayerintegrität, zeigte sich ein circa dreifach höherer Wert von $4,05 \times 10^{-5}$ (n= 30) und sein minimaler und maximaler Koeffizient waren weiter voneinander entfernt (minimal $9,99 \times 10^{-7}$, n= 30, und maximal $0,00036$, n= 30). Eine Tendenz, unter welchen Versuchsbedingungen die Werte jeweils minimal oder maximal waren, konnte sich aus den Versuchen nicht ableiten lassen.

4.8 Diskussion

4.8.1 Einfluss der Polyphenole auf den Transport von Rhodamin 123

In der heutigen Arzneistoffforschung kommt Zellkulturmodellen zur schnellen und sparsamen Evaluierung von Arzneistoffkandidaten hinsichtlich ihrer Permeabilität und dem Einfluss von p-Glykoprotein auf diesen Transport eine große Bedeutung zu (siehe Einleitung 2.4). Eine mögliche Therapieresistenz über den Auswärtstransport via p-GP ist in einer Vielzahl von Krankheiten klinisch relevant und so ist es ein Ziel der Forschung, diese funktionelle Barriere zu überwinden, um die Absorption von Arzneistoffen zu erhöhen [40]. Über die Jahre wurden eine steigende Zahl Inhibitoren dieses Transportproteins charakterisiert und auf Basis ihrer Struktur in mittlerweile drei Generationen an Substanzen eingeteilt [40]. In einer vierten Generation kommt phytochemischen Stoffen als p-GP-Modulatoren aufgrund ihrer wenig toxischen Eigenschaften und ihren Gemeinsamkeiten zu klassischen Inhibitoren Aufmerksamkeit zu [40]. So wurden in der vorliegenden Arbeit ausgewählte pflanzliche Inhaltsstoffe aus der Klasse der Flavonoide (siehe Allgemeiner Teil 4.4) grundlegend auf ihren Einfluss auf das Transportprotein hin untersucht. Rhodamin 123, ein allgemein anerkanntes und oft eingesetztes Substrat von p-GP (siehe Allgemeiner Teil 3.2), wurde hierbei als Referenz verwendet. In der Literatur wurden für den Transport von Rhodamin 123 über CaCo-II-Monolayer Permeabilitätskoeffizienten in basolaterale Richtung von $1,95 \times 10^{-9}$ cm/s und in apikale Richtung von $16,44 \times 10^{-9}$ cm/s angegeben, was im Einklang mit den eigenen Ergebnissen war [62]. Hieraus würde sich eine P_{app} -Ratio von deutlich über Eins berechnen, was klar für ein p-GP-Substrat spricht. An anderer Stelle konnte eine Ratio für Rhodamin 123 von ungefähr 4 bestimmt werden [283]. Die selbst durchgeführten Untersuchungen lieferten kein solches Ausmaß in der Ratio, allerdings wurde Rhodamin 123 ebenso als Substrat identifiziert und konnte daher für das Erzielen aussagekräftiger Ergebnisse zur Beeinflussung des p-GP-vermittelten Transportes durch die Polyphenole verwendet werden.

In eigenen orientierenden Transportversuchen wurde für die Polyphenole ein heterogenes Bild ermittelt, sodass neben inhibitorischen Eigenschaften auch Induktionseffekte auf den p-GP-vermittelten Transport beobachtet wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden neben Verapamil als Modellinhibitor noch Dexamethason als Modellinduktor in die Versuche einbezogen (siehe Allgemeiner Teil 4.4). Verapamil stellt den ersten identifizierten Inhibitor des Transportproteins dar, weswegen er in der Vergangenheit in Studien häufig eingesetzt wurde und unter anderem in der Lage war, in einer Konzentration von 300 μ M den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123 um circa 50 % zu inhibieren [56]. So wurde auch an anderer Stelle von einer signifikanten Reduktion auf 5 % des Ausgangstransportes für Rhodamin 123 Stelle berichtet [241]. In weiteren Versuchen hemmte Verapamil in einer Konzentration von 100 μ M den Transport

dieses Fluoreszenzfarbstoffes, was sich in einer Reduktion der P_{app} -Ratios von 4,62 auf 1,22 [174] beziehungsweise von 6,11 auf 2,03 äußerte [255]. Die Inhibition des Rhodamintransportes durch Verapamil von mehr als 50 % in den eigenen Untersuchungen fügte sich somit nahtlos in die Literaturwerte ein, wenn auch in der gleichen Konzentration schon ein größerer Effekt des Verapamils von anderen Forschungsgruppen gezeigt werden konnte [103]. In einem Calceinversuch mit CaCo-II-Zellen konnten die P_{app} -Ratio von Rhodamin 123 durch 50 μ M Verapamil von 36,5 auf 0,9 signifikant gesenkt werden. Ebenso ließ sich für den Modellinduktor Dexamethason der signifikante Trend der Erhöhung des Rhodamintransportes in den eigenen Versuchen im Einklang mit anderen Studien bestätigen, wenn auch mit anderen Zelllinien. In Experimenten mit einer humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie, LS 180, wurde eine Aktivitätserhöhung für p-GP von 50 % durch Dexamethason sogar ab einer Konzentration von 5 μ M sowie eine Induktion von 150 % durch 50 μ M, die sowohl die Aktivität des Transportproteins als auch die Genexpression von p-GP betreffen kann, diskutiert [284]. Die eigenen Untersuchungen bestätigten zudem erstmalig nach unserem Kenntnisstand, dass nur akute Effekte des Dexamethasons auf p-GP vorhanden sind (siehe Abbildung 46). Daneben lässt sich noch ein Tierversuch anführen, bei dem die Effluxratio von Rhodamin 123 mit einer Inkubation mit Dexamethason zwar nicht signifikant aber dennoch deutlich gesteigert werden konnte [285]. Somit erschienen die für CaCo-II-Zellen erhaltenen Ergebnisse zu Dexamethason als durchaus plausibel. Für beide Kontrollen verhielten sich demnach die Resultate aus den eigenen Versuchen wie in der Literatur beschrieben, was die Grundlage für valide Folgeversuche darstellt.

Für Taxifolin standen die nicht signifikanten Erkenntnisse aus den eigenen Versuchen im Einklang mit Werten aus der Literatur. *Wang et al.* kamen bereits zu der Schlussfolgerung, dass Taxifolin nicht in der Lage war, den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123 signifikant zu beeinflussen [174]. Die P_{app} -Ratio ließ sich in deren Experimenten selbst mit Einsatz von 100 μ M Taxifolin nur unwesentlich von 4,62 auf 4,29 erniedrigen [174]. Dies entsprach der doppelten Konzentration im Vergleich zu den eigenen Versuchen mit diesem Stoff. An anderer Stelle wurde die Rhodaminaufnahme in CaCo-II-Zellen mit einer Inkubation über 30 Minuten mit 250 μ M Taxifolin nicht beeinflusst [137]. Allerdings ließen sich für Taxifolin auch gegensätzliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich der einzelnen Transportrichtungen finden. So konnte während des Transportes eines Prokarzinogenes in einer Untersuchung des Flavonoideinflusses zwar ebenso nur eine geringfügige Erniedrigung der P_{app} -Ratio beobachtet werden, hierbei wurde der basolaterale Transport nicht signifikant und der Transport in apikale Richtung in keiner Weise beeinflusst [36]. In den eigenen Untersuchungen dagegen wurde der apikale Transport stärker als der basolaterale verringert. Andererseits wurde je nach Versuchsaufbau für Taxifolin eine konzentrationsabhängige Inhibition der p-GP-Funktion sowie eine p-GP-ATPase Stimulation beschrieben, die kompetitiv an derselben Bindestelle

wie der Modellinhibitor Verapamil stattfand, was die Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen einschränkt [261]. Somit müsste der genaue Einfluss der Konzentration von dieser Substanz auf den p-GP-vermittelten Transport in weiteren Experimenten noch näher evaluiert werden.

Tendenziell induktive Transporteffekte, wenn auch nicht signifikant, konnten in den eigenen Untersuchungen für das Flavonoid Silibinin detektiert werden. Dies stand im Gegensatz zu Erkenntnissen aus einer anderen Studie, welche zwar ebenso keine statistische Signifikanz ermitteln konnte, es sich hierbei allerdings um eher inhibitorische Einflüsse dieser Substanz handelte. *Patel et al.* konnten in ihrer Studie über die zelluläre Aufnahme von Ritonavir in CaCo-II-Zellen keine signifikante Inhibition durch 100 µM Silibinin auf das p-Glykoprotein nachweisen [286]. *Lee et al.* konnten mit 10 bis 100 µM Silibinin in MCF-7/ADR Zellen eine Inhibition des Rhodamintransportes in einem p-GP-Funktionalitäts-Assay beobachten [287]. Diese Zelllinie ist eine veränderte Form der MCF-7-Zellen, welche eine Überexpression an p-GP zeigt und weswegen ein Vergleich dieser Ergebnisse zu den eigenen Versuchen eher schwierig war. Es ließ sich festhalten, dass sowohl Taxifolin als auch Silibinin den p-GP-vermittelten Transport kaum moduliert und beide nicht relevant die Permeabilität von Arzneistoffen über das intestinale Epithel beeinflussten, wenn man die Erkenntnisse sowohl aus selbst durchgeführten Untersuchungen als auch den Ergebnissen anderer Studien miteinander verbindet.

Die Analyse des Catechinmetaboliten M1 aus den eigenen Versuchen lieferte dagegen neuartige Erkenntnisse im Vergleich zur Literatur. Für die Muttersubstanz konnte eine konzentrationsabhängig Suppression des p-GP-vermittelten Effluxtransport ermittelt [288], beziehungsweise, eine Induktion von p-GP durch andere Substanzen wie zum Beispiel Doxorubicin umzukehren, detektiert werden [289]. In den selbst durchgeführten Versuchen war die Tendenz der Induktion des Transportes über p-GP dagegen nicht signifikant. Nach unserem Kenntnisstand konnte diese Eigenschaft für den Metaboliten M1 erstmalig gezeigt werden. Die veränderte Wirkung verglichen mit Catechin dürfte am ehesten mit dem Metabolismus und einem damit einhergehenden Verlust von effektrelevanten Merkmalen in der Muttersubstanz erklärbar sein. Allerdings müssten für eine valide Einordnung und zur Überprüfung der Konsistenz der eigenen Ergebnisse noch weiterführende Versuche durchgeführt werden.

Für eine Vielzahl von Arzneistoffen ist in der Literatur beschrieben, dass ihre Enantiomere unterschiedliche Eigenschaften besitzen, die auch die Wirkung auf den p-GP-vermittelten Transport betreffen. Im Falle von Tamsulosin konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Erhöhung der p-GP-Funktion durch das R-Enantiomer gezeigt werden, wohingegen das S-Enantiomer sowie das Racemat ohne nennenswerte Effekte waren [290]. Clausenamid dagegen führte zu einer Erhöhung der Rhodaminakkumulation

in CaCo-II-Zellen und damit einer Inhibition von p-GP, die konzentrationsabhängig für die beiden Enantiomere unterschiedlich ausfiel und für (-)-Clausenamid mit Verapamil vergleichbar war [291]. Bemerkenswert war der Effekt, dass (+)-Clausenamid in kleiner Konzentration die p-GP-Aktivität eher induzierte und erst ab einer höheren Konzentration inhibitorische Eigenschaften dieser Substanz auftraten [291]. Für Cetirizin konnte für den Transport von Rhodamin 123 gezeigt werden, dass sein R-Enantiomer als Induktor von p-GP und sein S-Enantiomer als Inhibitor dieses Effluxtransporters fungierte [292]. Diese Erkenntnisse aus verschiedenen Studien belegen heterogene Effekte einiger Enantiomere. Im Licht dieser Ergebnisse erschien die variabel ausgeprägte hemmende Wirkung des racemischen Hydnocarpins und seiner beiden Enantiomere, von denen (+)-Hydnocarpin D eine statistisch signifikante Inhibition bewirkte, in den eigenen Versuchen plausibel. Für Hydnocarpin D und seine Derivate konnte zudem, unter anderem im *Staphylococcus aureus*, eine inhibitorische Wirkung an einer multidrug resistance Effluxpumpe festgestellt werden [293, 294], was die eigenen Resultate dahingehend zusätzlich stützte, da diese Hemmung für den p-GP-vermittelten Rhodamintransport in den eigenen Versuchen ebenfalls detektiert wurde. Darüber hinaus kamen Studien zu dem Schluss, dass (-)-Hydnocarpin D keine direkte Inhibition der p-GP-Funktion in einer Konzentration von 10 μ M bewirkte [295]. Das spiegelte sich im nicht signifikanten Einfluss dieser Substanz in den eigenen Untersuchungen wider. In die Interpretation zu den Hydnocarpinen müssen aber auch Stabilitätseffekte, die am nicht signifikanten Effekt einen Anteil haben können, in Betracht gezogen werden, da nach vier Stunden im Versuchsmedium mehr als 15 % der Substanz abgebaut wurde (siehe Allgemeiner Teil 1.2).

Von den untersuchten Polyphenolen waren die Urolithine die potentesten Induktoren des p-GP-vermittelten Transportes von Rhodamin 123. Sie konnten die P_{app} -Ratio dieses Fluoreszenzfarbstoffes um mindestens 45 % bis hin zu 115 % meist signifikant zu steigern. Lediglich die Inkubation mit Urolithin A führte zu keiner signifikanten Erhöhung. Dieses Polyphenol war auch nicht signifikant unterschiedlich von seinem Isomer Isourolithin A. Da die Urolithine durchaus in der Lage sind, mehrere Arten von Transportern im menschlichen Körper zu modulieren, was in der Literatur belegt wurde (siehe Allgemeiner Teil 4.8.2), erscheinen die Erkenntnisse aus den eigenen Versuchen plausibel. Speziell ihr Einfluss auf p-Glykoprotein wurde jedoch nach unserem Kenntnisstand noch nicht untersucht, sodass die Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen neu sind. Es bleibt festzuhalten, dass diese endogen aus Ellagsäure hergestellten pflanzlichen Stoffe ein Potential zur Beeinflussung des Arzneistofftransportes über das Darmepithel aufwiesen. Allerdings wären weitere Untersuchungen nötig, um die Wirkung noch genauer im Hinblick auf unterschiedliche Metabolisierertypen oder Ernährungssituationen zu evaluieren.

Für physiologischere Bedingungen wurde der Rhodamintransport zusätzlich unter Zusatz von Gallensäuren und pH 6 durchgeführt und mit den Ergebnissen der einzelnen

Substanzen aus den Rhodaminversuchen verglichen. Auf den Transport des reinen Fluoreszenzfarbstoffes hatten diese Änderungen keinerlei Einfluss. Für die zwei Testsubstanzen, Urolithin C und Verapamil, konnte ein signifikant höherer Effekt auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123 festgestellt werden. Für Urolithin B, Isourolithin A und den M1 war dieser Einfluss unter angepassten Bedingungen signifikant niedriger. Unter Verapamil erhöhte sich die P_{app} -Ratio für den Fluoreszenzfarbstoff signifikant. Die Substanz wirkte dennoch weiterhin inhibierend auf p-GP. In anderen Studien konnte ebenso eine geringere inhibitorische Wirkung von Verapamil auf dieses Transportprotein in Anwesenheit von Taurodeoxycholsäure dargelegt werden [296], was die eigenen Ergebnisse stützt. Auch hierbei wurde die prinzipielle Inhibition durch Verapamil nicht grundlegend geändert. Die Anwesenheit von Gallensäuren im Modell schien je nach Substanz einen positiv oder negativ ausgeprägten Einfluss zu haben, wenn auch der in vivo entscheidende Effekt von Verdauungsenzymen im Zellmodell der Transportversuche fehlt [297]. Neben der Verapamilkontrolle zeigten noch Urolithin B, Isourolithin A und der M1 niedrigere Effekte auf p-GP. Urolithin C dagegen steigerte seinen Einfluss auf den p-GP-vermittelten Transport unter diesen angepassten Bedingungen. Für die Interaktion von pflanzlichen Substanzen mit Gallensäuren sind eine Vielzahl von möglichen Mechanismen auf Basis ihrer Struktur oder über Mizellen denkbar. Vor allem hydrophobe Wechselwirkungen dieser beiden Stoffgruppen scheinen eine Rolle zu spielen [298]. Die gewählte Konzentration an Gallensäuren von 100 μM lag deutlich unter der kritischen mizellbildenden Konzentration, welche um circa 1000 μM relevant wird, weswegen die Bildung von Mizellen und daraus folgende Interaktionen sehr wahrscheinlich ausschieden [298]. Nichtsdestotrotz ließ sich nicht ausschließen, dass es über vereinzelte Aggregate von Gallensäuren in Kombination mit Interaktionen mit der lipophilen Zellmembran sowie den pflanzlichen Stoffen zu veränderten Löslichkeiten dieser Substanzen und daraus folgenden Verschiebungen im Einfluss auf p-GP kam. Zum einen könnte dies eine erhöhte Penetration der Stoffe in die Zelle mit einer folglich höheren Wirkung an p-GP bewirken, zum anderen wäre aber auch eine verminderte Wirkung denkbar, sofern die pflanzlichen Substanzen durch diese Interaktionen an der Zellmembran haften bleiben. Für Teepolyphenole, wie Catechin, der Muttersubstanz des M1, wurde in vergangenen Studien die Bildung eines hydrophoben Raumes, welcher die Gallensäuren über Wasserstoffbrückenbindungen adsorbiert, angenommen [299]. Diese hätte eine verminderte Verfügbarkeit dieser Pflanzeninhaltsstoffe in einem Versuchssystem mit Gallensäuren zur Folge. Für Gallussäure, Catechin und Epichatechin konnte bereits eine Bindung an primäre Gallensäuren belegt werden [300]. Daher erschien es sehr plausibel, dass die stark signifikant erniedrigte Wirkung des M1 auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport nach Zusatz von Gallensäuren in den eigenen Versuchen durch eine Bindung an eben diese erklärbar war. Folglich würde der M1 für eine Wirkung am p-Glykoprotein nicht mehr zur Verfügung stehen. Derlei Prozesse konnten auch für die

deutlich verminderten Effekte von Urolithin B und den leicht niedrigeren Einfluss von Isourolithin A in der eigenen Studie verantwortlich sein, sodass auch diese beiden Stoffe unter den anderen Bedingungen den Transport weniger beeinflussen konnten. Im Gegensatz dazu stand in den eigenen Versuchen die enorm gesteigerte Induktion des Transportproteins durch eine Inkubation mit Urolithin C unter diesen Versuchsbedingungen. Für diesen Stoff sollten demnach weniger Bindemechanismen an die Gallensäuren, sondern vielmehr Verbesserung der Löslichkeit des Urolithin C oder eine Interaktion mit der Zellmembran, welche die Verfügbarkeit des Pflanzeninhaltsstoffes am p-Glykoprotein erhöht, eine Rolle spielen. Die große Standardabweichung macht jedoch weitere Versuche zu Urolithin C notwendig. Die genauen Mechanismen auf molekularer Ebene sind jedoch weiter unklar und weitere Forschung ist für die genauere Interpretation des Komplexes aus Gallensäuren und Polyphenolen sowie dem Zusammenspiel mit der Zellwand nötig [298]. Im Hinblick auf den geänderten pH-Wert von circa 7,4 auf 6 muss eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Eine nicht-enzymatische Oxidation in Anwesenheit von Sauerstoff und unter nahezu neutralem pH kann auf die Permeabilität durch die Zellschicht und die Stabilität der Polyphenole je Klasse einen unterschiedlichen Einfluss haben (siehe auch Allgemeiner Teil 1.2) [297]. Für einen genauen Einblick, auf welche Weise Gallensäuren oder der pH-Wert den Einfluss von Polyphenolen auf den Effluxtransporter p-GP verändern, sind demnach weitere Untersuchungen nötig.

Die Permeabilitätskoeffizienten für die beiden Kontrollen der Monolayerqualität zeigten stets eine ausreichende Qualität der Zellen in den Versuchen um aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Die erhaltenen Werte für beide Substanzen ließen sich mit Werten aus der Literatur stützen. Für Fluorescein konnte in einer Studie ein P_{app} -Wert von $24,5 \pm 0,73 \times 10^{-6}$ bis $30,2 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ cm/s gezeigt werden [301], was nur geringfügig über den Ergebnissen aus den selbst durchgeführten Untersuchungen lag und diese somit plausibel erscheinen lässt, sodass man von einer guten allgemeinen Funktionsfähigkeit der CaCo-II-Zellen ausgehen konnte. Lucifer Yellow wird in Studien sehr breit als Marker für die Durchlässigkeit von Monolayern eingesetzt. Manche Arbeitsgruppen gingen dabei von einem prozentualen Transport von unter fünf Prozent und einem P_{app} -Wert von kleiner 3×10^{-6} cm/s als Marker für eine gute Integrität des Monolayers aus [32], aber auch von Werten zwischen 8×10^{-6} cm/s und 5×10^{-5} cm/s wurden berichtet [302]. Andere Studien nahmen einen Wert von $0,5 \times 10^{-6}$ cm/s als Kennzahl an [255, 303]. Die eigenen Erkenntnisse fügen sich in dieses Gesamtbild an Grenzwerten ein und werden von diesen bestätigt. In den eigenen Untersuchungen konnten auf Basis der Werte von Lucifer Yellow sogar noch bessere Integritäten der Zellschicht erreicht werden.

4.8.2 Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin

Neben der Evaluierung des Einflusses der Polyphenole auf den Rhodamintransport wurden speziell die Urolithine im Hinblick auf einen möglichen Effekt auf den Transport von Ciprofloxacin als weiteres p-GP-Substrat untersucht, um praxisnähere Daten zu erhalten. Dieses Fluorchinolon wird zwar hauptsächlich renal eliminiert, jedoch gibt es auch Hinweise auf eine signifikante intestinale Elimination [272]. Aufgrund seiner Zwitterioneigenschaft scheinen in der Niere sowohl Kationen- als auch Anionentransporter eine Rolle zu spielen und eine ganze Reihe von primär und sekundär aktiven Transportsystemen scheint involviert zu sein [272]. So konnte diese Substanz als ein Substrat mehrerer aktiven Transporter, zum Beispiel p-Glykoprotein, BCRP oder dem organischen Anionentransporter, charakterisiert werden [304, 305], wenn gleich es zur Substrateigenschaft dieses Stoffes für p-Glykoprotein auch widersprüchliche Angaben in der Literatur gibt [273]. Eine Beteiligung des organischen Kationentransporters 1 (OCT1) ist darüber hinaus ebenso denkbar [306]. Der dominante Sekretionsmechanismus von Ciprofloxacin im menschlichen Jejunum scheint allerdings über das Transportprotein BCRP stattzufinden [305]. Die Annahmen im Hinblick auf Substrateigenschaften dieses Stoffes konnten auch in Experimenten mit Tierversuchen gestützt werden. In Mäusen wurde eine Beteiligung von p-GP an intestinaler Absorption und Eliminationsprozessen von Ciprofloxacin beobachtet, wenn auch BCRP einen größeren Anteil daran hatte [68]. Ebenso zeigte sich eine Korrelation von Mäuseexperimenten mit den Vorhersagen von CaCo-II-Modellen bezüglich dieser beiden Transporter [68]. Weitere Mechanismen in dieser Zelllinie, die der multidrug resistance ähneln, sind auch möglich [272]. In den eigenen Transportversuchen konnte für Ciprofloxacin ein aktiver Efflux über einen erhöhten Transport in apikale Richtung detektiert werden, was durch Werte aus der Literatur gestützt wurde. In Studien konnte sogar ein circa fünffach höherer apikal gerichteter Flux gezeigt werden, was für eine aktive Sekretion sprach [271]. Über MDCK-chAbcb1-Zellen, konnte eine Effluxratio von 2,43 für diesen Stoff beobachtet werden [307]. Beide Erkenntnisse überstiegen die Werte von 1,7 als Faktor für einen größeren apikalen Transport und 1,71 als Effluxratio aus den selbst durchgeführten Versuchen, allerdings stützten sie die erhaltenen Tendenzen.

Während in Inkubationsversuchen mit den vier Urolithinen A, B und C sowie Isourolithin A für den p-GP-vermittelten Rhodamintransport überwiegend signifikante induktive Effekte gezeigt wurden (siehe Allgemeiner Teil 4.7.1), konnte für diese vier Stoffe in den Transportversuchen mit Ciprofloxacin ein konträres Bild ermittelt werden. Bis auf Isourolithin A waren die pflanzlichen Stoffe auch in den Ciprofloxacinversuchen in der Lage, den aktiven Efflux im Vergleich zur Referenz von reinem Ciprofloxacin zu erhöhen. Allerdings zeigte sich nach Normalisierung der Ergebnisse der vier Urolithine auf die Referenz mit reinem Ciprofloxacintransport, dass die Ratios für Ciprofloxacin nach der Inkubation zwischen 27 und 47 % geringer waren. Dies stellte eine deutliche Diskrepanz zu

vorherigen Versuchen mit Rhodamin 123 als Modells substrat für p-GP dar. Für eine Einordnung der Resultate muss die vorab dargelegte Diversität in den möglichen Transportmechanismen für Ciprofloxacin in Betracht gezogen werden. Ebenso sind die Urolithine nicht sehr selektiv für einen bestimmten Transporter. Urolithin A soll ein Substrat der Arzneistoffeffluxpumpe ABCG2/BCRP sein und diese auch teilweise inhibieren können [308], was möglicherweise auch für Urolithin B gilt [178]. Für weitere Urolithine ist diese Eigenschaft nach unserer Kenntnis noch nicht diskutiert und bedarf weiterführender Untersuchungen. Legt man das Transportprotein BCRP als Hauptsekretionsmechanismus für Ciprofloxacin zu Grunde, so erscheint eine Interaktion zwischen den Urolithinen und diesem Arzneistoff und damit ein verändertes Transportverhalten plausibel. Möglicherweise spielen hier sowohl Wechselwirkungen als kompetitive Substrate oder auch inhibitorische Effekte der Urolithine auf BCRP eine Rolle, was den verminderten Efflux von Ciprofloxacin erklärt. Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse aus der Literatur auf die eigenen Untersuchungen ist dahingehend geben, da CaCo-II-Zellen neben p-GP auch in der Lage sind BCRP zu exprimieren [309]. In Kombination mit Ciprofloxacin, einem Stoff, der über diverse Mechanismen, von denen unter Umständen noch nicht alle detektiert sind, sekretiert werden kann, können zu den Rhodaminversuchen die widersprüchlichen Erkenntnisse erklärt werden.

4.8.3 Einfluss einer Vorinkubation mit den Urolithinen und Dexamethason auf den Transport von Rhodamin 123

Die Vorinkubation der Urolithine und Dexamethason mit den CaCo-II-Zellen vor den eigentlichen Transportversuchen diene verschiedenen Fragestellungen. Mit einer Inkubation der Zellen über 24 h und 48 h mit den Urolithinen sollte eine mögliche weitere Steigerung des Rhodamintransportes überprüft werden. Eine Inkubation mit Urolithin A, B und C sowie Dexamethason über fünf Minuten vor den Transportversuchen in Verbindung mit dem Fehlen der Substanzen im Transportversuch sollte das Einsetzen des Effektes an p-GP und das Aufrechterhalten dieser Wirkung klären. In einem weiteren orientierenden Versuch wurden in den ersten 60 Minuten des Transportversuches lediglich Rhodamin 123 transportiert und im zweiten Abschnitt zwischen 60 und 120 Minuten Urolithin A, B und C sowie Dexamethason zugegeben, um eine akute Veränderung des Transportverhaltes durch die Anwesenheit der Substanzen zu belegen.

Der Zusatz der vier Urolithine zum Kulturmedium der Zellen über 24 und 48 Stunden und die nachfolgenden Untersuchungen mit Rhodamin 123 als Marker für den p-GP-vermittelten Transport hinsichtlich der Funktionalität des Transportproteins sollte die Erkenntnisse aus den Experimenten zum Genexpressionseinfluss der Polyphenole auf p-GP bestätigen (siehe Allgemeiner Teil 5.4). In diesen Versuchen konnten die Urolithine A, B und C als

Induktoren der p-GP-Expression nach 24 h charakterisiert werden, was über 48 h nur für Urolithin C nachgewiesen werden konnte. Die Vorinkubation über beide Zeiträume zeigte eine signifikante Erhöhung der p-GP-Funktion schon nach 24 h. Somit konnten die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse, die eine Stimulation der Expression für p-GP durch die Polyphenole nach 24 h erkennen ließen, belegt werden. Auch die hohe Stabilität der Urolithine (siehe Allgemeiner Teil 1.2) bestärkt die Plausibilität der gesteigerten Effekte dieser pflanzlichen Stoffe auf den p-GP-vermittelten Transport. Dagegen müssen die höheren zytotoxischen Effekte (siehe Allgemeiner Teil 1.1) dieser Stoffe auf CaCo-II-Zellen von nahezu 50 % nach 48 h aufgeführt werden, was die nicht mehr erkennbare Genexpressionssteigerung nach diesem Zeitraum für Urolithin A und B erklären konnte. In Studien wurde ein Einfluss der Urolithine auf eine Reihe von Transportproteinen, wie ABCG2/BCRP oder den GLUT4, schon vielfach belegt [178, 308, 310], wenn auch die zeitliche Wirkung speziell dieser Polyphenole auf p-Glykoprotein noch lückenhaft erforscht ist. Daher sind die Erkenntnisse aus den eigenen Versuchen nach unserem Kenntnisstand erstmalig in der Lage, den eine zeitabhängige Erhöhung der Aktivität von p-GP durch die Urolithine zu belegen. Es konnte für nicht-pflanzliche Substanzen bereits ein zeit- und konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Expression und Funktionalität von p-GP in anderen Studien nachgewiesen werden. Eine Inkubation zwischen 24 und 96 Stunden mit Tumornekrosefaktor α oder Interleukin 2 konnte die Funktionalität von p-GP hinsichtlich des Rhodamintransportes senken [311, 312]. Eine Vorinkubation über 24 und 72 Stunden mit Acebutolol war in der Lage, den transportierten Anteil des p-GP-Substrates Digoxin signifikant zu steigern [313]. Ebenso konnte für anticholinerge Arzneistoffe eine zeitabhängige Änderung der p-GP-Funktion evaluiert werden [314]. Aber auch für einige pflanzliche Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavonoide, wie Diosmin aus Zitrusfrüchten, konnte eine Veränderung der Rhodaminakkumulation über kurze Vorinkubationszeiträume in Untersuchungen anderer Forschungsgruppen gezeigt werden [315]. Dies lässt eine Modulation der p-GP-Funktion durch weitere pflanzliche Inhaltsstoffe als möglich erscheinen und stellt die Erkenntnisse zu den Urolithinen aus den eigenen Versuchen als plausibel dar.

Das zeitliche Einsetzen des Effektes auf die p-GP-Funktion durch die Urolithine A, B und C sowie Dexamethason in Kombination mit einer Aufrechterhaltung der Wirkung über den Transportversuch konnte mit einer Inkubation über fünf Minuten vor dem Versuch und einem Fehlen der Substanzen über den Untersuchungszeitraum nicht erreicht werden. Der Versuchsaufbau war nicht in der Lage, das Ausmaß der Stimulation des Transportes über p-GP nach einer Inkubation mit den Teststoffen über den vollen Versuchszeitraum zu erreichen. Folglich scheint für die vorab diskutierte Erhöhung des p-GP-vermittelten Transportes von Rhodamin 123 durch die Urolithine A, B und C sowie durch Dexamethason (siehe Allgemeiner Teil 4.8.1) die Inkubationszeit nicht ausreichend zu sein, um das Transportprotein ausreichend beeinflussen zu können, beziehungsweise bis die

Substanzen ihre Wirkung am Protein entfalten. Sie muss demnach länger gewählt werden. Zudem ist diese Stimulation ebenso als reversibel zu betrachten, da der Effekt mit Abwesenheit des Stoffes nicht bestehen blieb. Eine dauerhafte Anwesenheit ist für die Aufrechterhaltung der Wirkung notwendig.

In einer zweiten Untersuchung wurde die Zeit von zwei Stunden für einen Transportversuch dahingehend verändert, dass in der ersten Stunde nur Rhodamin 123 transportiert wurde und in der zweiten Stunde dieser Transport zusätzlich unter Zugabe mit den vier Testsubstanzen stattfand. Hierbei konnte nun eine deutliche Steigerung in der transportierten Stoffmenge an Rhodamin 123 beobachtet werden, was einen akuten induktiven Einfluss der Substanzen und eine direkte Wirkung am Transportprotein nahelegte. Unser Versuchssystem stellte einen neuartigen Ansatz dar, einen direkten Effekt an p-GP detektieren zu können. Diese Erkenntnisse ließen sich mangels weiterer beschriebener Studien nicht mit Werten aus der Literatur unterstützen, was nahelegt, dass die Ergebnisse aus den eigenen Versuchen eine neue Ansicht zu einer Wirkung am Transportprotein durch die Urolithine A, B und C sowie Dexamethason boten.

4.8.4 Einfluss der Urolithine auf den mittels LPS veränderten Transport von Rhodamin 123

Lipopolysaccharid ist als bakterielles Endotoxin ein bekannter Induktor von inflammatorischen Prozessen (siehe Allgemeiner Teil 4.5) und kann daher zur Simulation dieser Prozesse verwendet werden. Es lassen sich mit dieser Substanz durch Variation der Konzentration und Inkubationsdauer sowohl akute als auch chronische Schädigungen einer Zellschicht nachbilden. So wurde nach einer 24-Stunden-Inkubation mit 1 µg/mL LPS eine Reduktion in den TEER-Werten sowie eine Erhöhung von Interleukin-8 als Entzündungsmediator beschrieben [275]. Mit einer Konzentration von 100 µg/mL LPS konnte der TEER-Wert signifikant um 10,86 % nach einer Inkubation über einen Tag gesenkt werden [277]. Dagegen zeigte 25 µg/mL LPS über 24 Stunden eine signifikante Erniedrigung des TEER-Wertes um circa 15 % [278]. Das genaue Ausmaß der Dysfunktion eines Zellmonolayers nach LPS-Inkubation ist somit nicht klar vorauszusagen und bedurfte einer genauen Evaluierung des Effektes im eigenen Versuchsaufbau, da die Wirkung dieser bakteriellen Substanz möglicherweise auch von weiteren Faktoren, wie Zelleigenschaften oder der Versuchsplanung abhängig war. In den eigenen Experimenten wurde ein akuter Effekt von LPS angestrebt, was eine Erhöhung der Konzentration unter einer Verkürzung der Inkubationszeit mit sich brachte. In der Untersuchung einer Konzentrationsreihe von LPS wurden 200 µg/mL über eine Zeit von sechs Stunden als potenter Stimulus ermittelt. In anderen Studien konnten 400 und 1000 µg/mL LPS über zwei Stunden den TEER-Wert signifikant senken und zugleich den prozentualen Transport einer Markersubstanz

signifikant erhöhen [279], was die eigene Erkenntnis plausibel erscheinen ließ. Bemerkenswert war hinsichtlich der TEER-Werte eine Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS nach einer Inkubation über sechs Stunden mit 10 µg/mL, 25 µg/mL und 50 µg/mL LPS, was intuitiv einen Widerspruch zur propagierten Induktion einer Dysfunktion durch dieses Endotoxin darstellte. Bereits zuvor konnte in einigen Studien ebenfalls diese Tendenz gezeigt werden. 1 µg/mL LPS konnten nach einer Inkubation über sechs Stunden den TEER-Wert eines CaCo-II-Monolayers nicht signifikant um circa 5 % steigern [275], 10 ng/mL LPS führten in einer weiteren Studie nach einem Tag zu einer 20 % Steigerung des TEER-Wertes [316] und eine andere Arbeitsgruppe konnte eine circa zehnpromtente Erhöhung des TEER-Wertes mit 200 µg/mL LPS nach zwei Stunden ermitteln [279]. Allerdings blieben auch diese Quellen eine Erklärung zu diesem Phänomen schuldig, sodass nur gemutmaßt werden kann, dass es sich dabei eventuell um einen kurzfristigen Schutzmechanismus der Zelle handeln könnte, über eine Erhöhung der Integrität einen Schaden durch dieses Toxin abwenden zu wollen. Der Einfluss von nur LPS auf den Rhodamintransport war anhand des P_{app} -Ratios zu identifizieren. Die P_{app} -Ratio von Rhodamin 123 war in zusätzlich durchgeführten Transportversuchen mit diesem Fluoreszenzfarbstoff nach sechsständiger Vorinkubation mit LPS mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu reinem Rhodamintransport. In Kombination mit den niedrigeren TEER-Werten sprach dies für eine Erhöhung der Permeabilität durch den Monolayer. Bei Rhodamin 123 als p-GP-Substrat könnte ein gesteigerter Efflux dieser Substanz für eine erhöhte Schutzfunktion der Zellen sprechen, was positiv zu bewerten wäre. Auf der einen Seite lässt sich als Effekt der LPS-Inkubation womöglich eine gesteigerte Aktivität von p-GP anführen, um den Organismus vor schädigenden Einflüssen aus der Zelldysfunktion zu bewahren. Auf der anderen Seite fällt bei Betrachtung der einzelnen Transportrichtungen von Rhodamin 123 ein generell gesteigerter Transport in apikale Richtung ins Auge, sodass diese Permeabilitätssteigerung auch einen Schaden des Monolayers indizieren könnte. In Entzündungssituationen im Krankheitsfall könnte dies bedeuten, dass zum einen die Permeabilität von Substanzen über das Darmepithel allgemein erhöht, aber als Reaktion auf diese Prozesse auch eine gesteigerte p-GP-Funktion als Schutzmechanismus möglich wäre, was noch weiterführend untersucht werden müsste. Fluorescein und Lucifer Yellow wurden in diesen Untersuchungen zur Wirkung von LPS nicht verwendet und konnten daher nicht zur weiteren Interpretation der Ergebnisse beitragen.

Für eine ganze Reihe von pflanzlichen Inhaltsstoffen wurde in anderen Arbeitsgruppen eine protektive Wirkung auf LPS-vermittelte Schäden beobachtet [275, 317, 318]. Diesen Schutz zeigten die Substanzen nach einer Inkubation der Zellen vor der eigentlichen Stimulation durch LPS. Beispielsweise konnte Kämpferol durch eine 48-stündige Inkubation in einer Konzentration von 80 µM eine Protektion vor einer kompletten Dysfunktion der Zellschicht entfalten [275]. Ebenso konnte für Urolithin A eine schützende Wirkung auf die zelluläre Barrierefunktion in vitro bereits nachgewiesen werden [317]. Dabei war dieses Polyphenol

in der Lage auf der einen Seite den durch TNF α induzierten Rückgang des TEER-Wertes umzukehren und auf der anderen Seite die Expression der Claudine, welche für Poren in den Tight-junctions verantwortlich sind, zu erniedrigen [317]. Eine Induktion von Tight-junction-Proteinen, welche für eine adäquate Funktionalität notwendig sind, wurde an anderer Stelle gezeigt [318]. Allerdings lagen die relevanten Konzentrationen von Urolithin A in diesen Studien mehr als doppelt so hoch, wie die 50 μ M in den eigenen Versuchen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden in den selbst durchgeführten Versuchen alle vier Urolithine in einer 24-stündigen-Inkubation vor der Zugabe von LPS auf ihre Fähigkeit hin, einer Dysfunktion entgegenzuwirken, untersucht. Bei der Betrachtung der TEER-Werte nach einer Inkubation mit den Urolithinen und der nachfolgenden akuten oxidativen Schädigung der Monolayer durch LPS fiel eine geringer ausgeprägte Senkung der TEER-Werte als bei reiner LPS-Inkubation auf. Dieser Effekt war allerdings nicht statistisch signifikant, wies jedoch auf die antioxidative Eigenschaft der Urolithine hin, indem die Dysfunktion weniger ausgeprägt war. Die P_{app} -Ratios von Rhodamin 123 wurden von den Urolithinen im Vergleich zur reinen LPS-Inkubation nochmals gesteigert, alle hatten einen teilweise deutlich größeren Wert als 3 und alle waren signifikant unterschiedlich zum reinen Rhodamintransport. Auf Basis der Erkenntnisse aus den Genexpressionsversuchen für p-GP zu den Urolithinen (siehe Allgemeiner Teil 5.4), in denen eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression dieses Transportproteins über 24 h ermittelt werden konnte, scheint Rhodamin 123 als p-GP-Substrat ein ungenügender Marker zu sein. Positive Effekte auf die oxidative Schädigung der Zellschicht durch die Urolithine wurden dadurch verschleiert, da p-GP nach Inkubation mit diesen pflanzlichen Stoffen funktionell aktiver war und keine neutrale Bewertung der Permeabilität von Rhodamin 123 getroffen werden konnte. Dementsprechend ließ sich der negative Einfluss von LPS nicht abmildern. In anderen Studien wurde für die Urolithine vor allem über eine Regulierung der Genexpression von Proteinen und Mediatoren in inflammatorischen Prozessen, welche von LPS induziert werden, die Eigenschaft diskutiert, in physiologisch relevanten Konzentrationen von mehr als 40 μ M diese Prozesse abzufangen [319]. Im Hinblick des großen Effektes der Urolithine auf p-GP konnten die Beobachtungen in den eigenen Versuchen nicht gemacht werden. Nach unserem Kenntnisstand fehlt es jedoch an Daten zu LPS-induzierten Zellschäden in Kombination mit der Inkubation der Zellen mit Urolithinen und den resultierenden P_{app} -Werten von Rhodamin 123, sodass diese als neuartige Ergebnisse diskutiert werden können. Über Modulierung von Zellsignalwegen und der Genexpression von beispielsweise Interleukin 6 konnte Urolithin A nach 24 Stunden konzentrationsabhängig eine Endotheldysfunktion in den Blutgefäßen umkehren [320], was für die eigenen Erkenntnisse nahelegt, dass eine Wirkung der Urolithine auf den oxidativen Zellschaden nicht ausgeschlossen werden kann. Die endogene metabolische Produktion der Urolithine im menschlichen Verdauungstrakt könnte demnach im Krankheitsfall bei Entzündungssituationen die Möglichkeit bieten, das körpereigene Entgiftungssystem via

p-Glykoprotein zu induzieren und Schadstoffe trotz einer Monolayerdysfunktion vermehrt ausscheiden zu können. Zur genauen Evaluierung der Wirkung der Urolithine auf den LPS-induzierten inflammatorischen Schaden an Zellmonolayern wären demnach weitere Untersuchungen beziehungsweise in vivo Versuche mit geeigneten Markersubstanzen notwendig.

5 Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters

5.1 Grundlagen der PCR-Technik

5.1.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Jahr 1983 sollte die Biotechnologie für immer verändern: Mit der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary Mullis und seinem Team wurde ein ganzes Analysegebiet durch diese Schlüsseltechnologie revolutioniert [321-324]. Ihnen gelang es über die Entwicklung eines eigenen Weges zur DNA-Sequenzierung mittels der Elongation über spezifische Primer und DNA-Polymerasen aktuelle Probleme im Ablauf der DNA-Analyse zu umgehen [325]. Für ein breites Feld an Anwendungen war es nun möglich spezifische Teile der DNA zu amplifizieren. Der Fokus lag hierbei zunächst auf der DNA-, für beispielsweise die Bestimmung einer Viruslast, sowie der RNA-Quantifizierung. Zu Beginn war jedoch noch die alleinige Endpunktbestimmung nach abgelaufener Reaktion, welche nur durch eine Gelelektrophorese visualisiert werden konnte, von Nachteil. Erst mit der Zugabe von Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der unter Bindung an DNA fluoresziert, gelang *Higuchi et al.* die Weiterentwicklung zur Echtzeit-PCR sowie der Echtzeit-Reversetranskriptions-PCR (RT-PCR) als neuer Standard [323, 326]. Das Gebiet der Genexpressionsmessung änderte sich dadurch nochmals grundlegend und viele Fallstricke der Endpunktbestimmung ließen sich vermeiden [321]. Fortan war es möglich, die Daten durch Vereinigung von Amplifikation und Detektion während dem Prozess zu sammeln [327], was zu einer weiteren Automatisierung und einer noch breiteren Nutzung in der Praxis führte [326].

Obwohl es sich um eine kostspielige analytische Methode handelt, birgt sie zahlreiche Vorteile: eine hohe Spezifität und Sensitivität, mit der kleinste DNA-Mengen in einer unbekannt Probe und sogar nur eine einzelne Kopie eines spezifischen oder seltenen Transkriptes detektiert werden können und die Fähigkeit, fast identische Sequenzen von messenger RNAs zu unterscheiden, was den Einsatz von Ausgangsmaterial (Template) minimiert [328]. Diese Punkte sind zusammen mit einer möglichst hohen Reproduzierbarkeit von entscheidender Bedeutung beim Einsatz in der klinischen Diagnostik [329]. Darüber hinaus gelingt mit dieser robusten Analysemöglichkeit das Monitoring von Biomarkern sowie die Validierung von Microarray Experimenten [321] und ein breiter Einsatz in Molekularmedizin, Forensik, Virologie, Mikrobiologie, genomischen Studien und Biotechnologie wird ermöglicht [328, 330].

In der Genexpressionsanalyse gilt diese Methode als Goldstandard [331]. *Bustin et al.* entwickelten dafür eine Leitlinie mit den notwendigen Informationen, die zu veröffentlichen

sind, sodass die Experimente untereinander vergleichbar werden [332]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach diesen Maßstäben gearbeitet. Nicht nur dem Forscher wird für eine adäquate Durchführung dieser Methode einiges abverlangt, sondern auch für die PCR-Instrumente, die im besten Fall Amplifikation, Detektion und Quantifizierung vereinen, gelten gewisse technische Anforderungen, um die potentiellen Kontaminationen zu minimieren und Zeit einzusparen [329]. Die PCR findet in Thermocyclern mit einem präzise temperierbaren Reaktionsraum und einer automatischen Steuereinheit zur Regelung des zyklischen Temperaturprogrammes aus Zeit, Temperatur und Zyklenzahl statt [328].

5.1.1.1 PCR-Prozess und Amplifikationskurve

Im PCR-Prozess wird DNA kopiert und exponentiell amplifiziert, wofür die zyklische Wiederholung der einzelnen Schritte das entscheidende Prinzip darstellt (siehe Abbildung 48) [323, 328]. Im Vorgang binden kurze, sequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, an den davor, durch Erhöhung der Temperatur auf 90 - 95 °C, denaturierten DNA-Doppelstrang [324]. Diese spezifischen, komplementären Sequenzen bestehen gewöhnlich aus 16 bis 28 Nukleotiden und hybridisieren zwischen 55 und 65 °C an die Einzelstränge (Annealing) [324, 333]. Sind die Primer zu kurz, wird ein spezifisches Primerdesign und die Auswahl der optimalen Annealingtemperatur schwierig, wohingegen zu lange Primer die Kosten erhöhen und die Effizienz über Sekundärstrukturen oder Primerdimere senken [333]. Der jeweilige komplementäre Strang wird an diesem Startpunkt durch Enzyme, sogenannte DNA-Polymerasen, mit Hilfe eines Einbaus freier Nukleotide zwischen 60 und 75 °C nachgebildet und somit verlängert (Elongation). Wichtig neben der Fähigkeit zur Elongation an der Template-DNA, also Vorlagen-DNA, und zur Bildung neuer DNA-Stränge ist für diese Polymerasen die Hitzebeständigkeit, da nach jedem Zyklus das Reaktionsgefäß zur erneuten Denaturierung erhitzt wird. Insgesamt werden so während einer PCR insgesamt 40 Zyklen durchlaufen und idealerweise wird das Template in jedem Zyklus verdoppelt, um das gesuchte Produkt in ausreichender Zahl für eine Detektion herzustellen.

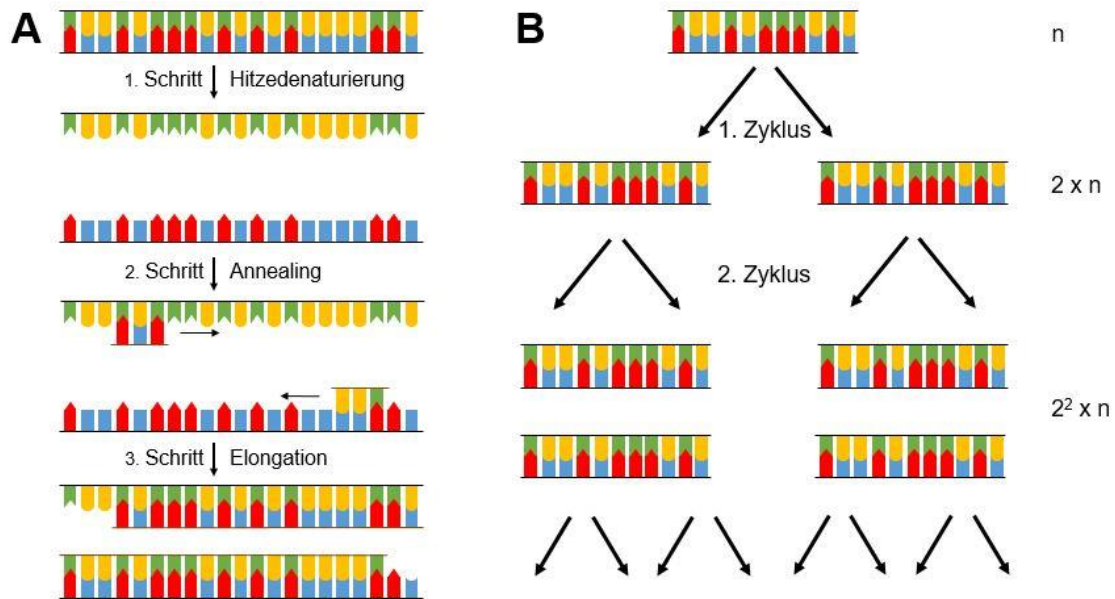


Abbildung 48 Schematische Darstellung des PCR-Prozesses (A) und der Amplifikation (B). Beim PCR-Prozess wird zunächst die doppelsträngige DNA im ersten Schritt über Hitze denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die Einzelstränge an (Annealing). Zuletzt findet schließlich im dritten Schritt die Elongation und damit die Bildung der komplementären DNA-Stränge über Polymerasen statt. In der idealen exponentiellen Amplifikation findet basierend auf n DNA-Stücken in jedem Zyklus eine Verdopplung der Ausgangsmenge statt (modifiziert nach [328]).

Aus der breiten Auswahl an möglichen Enzymen für die Elongation, die sich alle durch spezifische Vor- und Nachteile auszeichnen [329], wird am häufigsten die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Sie wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert, welches in der Lage ist, in seinem Lebensraum, in heißen Quellen, zu überleben und sich zu vermehren, was eine Stabilität und Funktionalität noch bei hohen Temperaturen gewährleistet [324]. Eine Entfaltung der Funktion erst in höheren Temperaturbereichen ist zudem wichtig, weil eine Aktivität im niedrigeren Bereich das Umschreiben von falschen Primeranlagerungen begünstigen würde [333]. Jedoch gilt es zu beachten, dass beim Wechsel zwischen verschiedenen Polymerasen das Experiment neu optimiert werden muss.

Eine weitere große Bedeutung kommt der Magnesium- sowie der Nukleotidkonzentration zu, sodass ein falscher Magnesiumgehalt die Enzymaktivität und die Schmelztemperatur der Produkte negativ beeinflussen, aber auch die Nukleotide komplexieren kann. Zu hohe Konzentrationen der Basen führen zu Interferenz mit der Polymerase und falscher Primeranlagerung. Daneben spielt die Länge des Amplikons eine Rolle. Optimalerweise sollte sie 100 Basenpaare nicht überschreiten, da sich kürzere Amplikons leichter unter den Temperaturen einer PCR denaturieren lassen und die Reaktion hinsichtlich Primeranlagerung effektiver gestalten [329].

Normalerweise verläuft die Amplifikationskurve einer PCR, welche durch Auftragung der Menge an synthetischer DNA gegen die Anzahl der Zyklen erhalten wird, in einem genau definiertem Verlauf, der sich in vier Phasen unterteilen lässt (siehe Abbildung 49) [327]. Die lineare Phase markiert den Beginn der PCR-Reaktion. Hier ist die Fluoreszenzemission noch nicht höher als der Hintergrund, sodass lediglich die Basislinienfluoreszenz detektiert wird [333]. Sobald die Kurve in die frühe exponentielle Phase übergeht, wird die Fluoreszenzintensität signifikant größer und die Amplifikation des Zielgenes wird messbar [333]. Diesen Punkt bezeichnet man als Threshold-Zyklus (c_t): Er ist in dieser Phase willkürlich vom Experimentator über die Festlegung einer Schwellenlinie definierbar, sollte allerdings in wiederkehrenden Versuchen konstant in der exponentiellen Phase festgelegt werden, weil er die Grundlage für die Berechnung der Endergebnisse der PCR bildet [333]. Er stellt somit einen zentralen Bezugspunkt in der PCR dar [333]. In der dritten Phase, der sogenannten log-linearen Phase, kommt es im optimalen Fall zu einer Verdoppelung des Templates in jedem Zyklus. Unter realen Bedingungen findet die Reaktion jedoch nicht mit perfekter Effizienz statt, sodass vor allem gegen Ende die Kurve in eine Plateauphase übergeht: Hier kommt es zu keiner Steigerung der Fluoreszenzintensität mehr, da die Ausgangskomponenten erschöpft sind oder die enzymatische Aktivität nachlässt [323, 327]. Diese letzte Phase ist ebenso der Grund dafür, dass die Ausgangsmenge nicht verlässlich berechnet werden kann, da es mit steigender Zykluszahl auch immer wieder zu Fällen von sogenannter Selbstanlagerung der denaturierten DNA-Stränge kommt. Es lassen sich aber sehr gut Aussagen über die Expression bestimmter Gene unter verschiedenen äußeren Einflüssen treffen. Allgemein sollte der Wert am Plateau über einer Fluoreszenz von 0,5 liegen, da nur in diesem Fall von einer erfolgten Amplifikation ausgegangen werden kann [333].

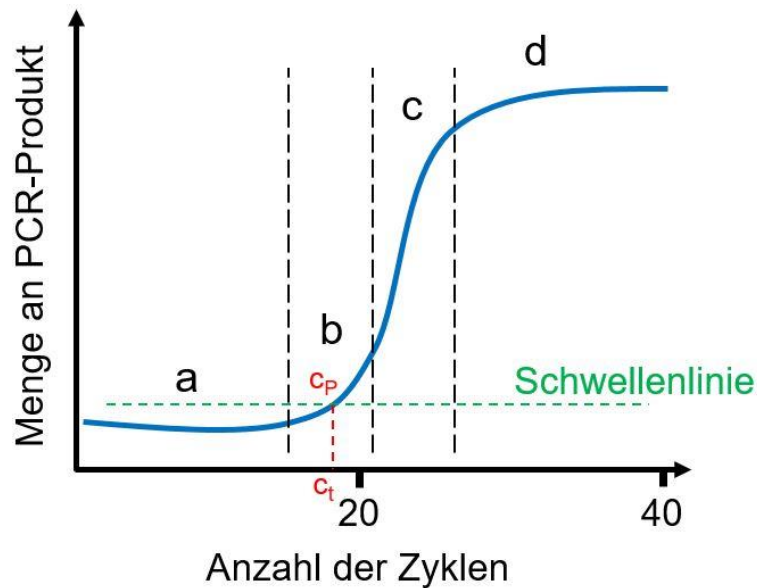


Abbildung 49 Schematische Darstellung einer idealen Amplifikationskurve eines PCR-Prozesses mit den vier Phasen sowie der Thresholdlinie (Schwellenlinie, grün), dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenlinie (c_p , rot) sowie der daraus resultierende Thresholdzyklus (c_t , rot). Die Kurve unterteilt sich in eine lineare Phase (a), in der nur Basislinienfluoreszenz detektiert werden kann, und eine frühe exponentielle Phase (b), während dieser die Amplifikation des Zielgenes messbar wird und die Schwellenlinie überschreitet. Darauf folgt die log-lineare Phase (c), in der im Idealfall eine Verdopplung der Ausgangsmenge an DNA in jedem Zyklus erreicht wird. Den Abschluss bildet die Plateauphase (d), die keine weitere Steigung der Fluoreszenz mehr beinhaltet (modifiziert nach [321, 333]).

Für die Methodenentwicklung sowie für die einzelnen Experimente wurde jeweils eine Zwei-Schritt-Echtzeit-PCR durchgeführt [327, 329]. Diese unterscheidet sich von der Ein-Schritt-PCR darin, dass die cDNA-Synthese und die PCR in zwei getrennten Schritten stattfinden [333]. Dementsprechend benötigt man auch mit der reversen Transkriptase und der DNA-Polymerase zwei Enzyme und nicht ein Einzelnes, das beide Fähigkeiten aufweist [329]. Obwohl dieser Weg anfälliger für potentielle Kontaminationen der DNA ist, bringt er doch einige Vorteile mit sich. Aus einem einzelnen stabilen cDNA-Pool lassen sich über Verdünnungen mehrere Versuche durchführen. Ebenso lässt sich auf diesem Weg die eingesetzte Menge an Template besser normieren und durch Analyse mittels einer Pearson-Korrelation sind die Daten sehr reproduzierbar [328].

5.1.1.2 Herstellung komplementärer DNA

Bereits die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus isolierter RNA ist ein wichtiger Schritt für die PCR hinsichtlich Variabilität und Reproduzierbarkeit. Das biologische Ausgangsmaterial unterliegt einer gewissen Veränderung und aufgereinigte RNA besitzt eine veränderliche Qualität sowie eine gesicherte Instabilität. Zuletzt hängt die Umwandlungseffizienz von der Menge an RNA-Template ab [330, 333].

RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können RNA schnell hydrolysieren [328], was ein steriles und sauberes Arbeiten während der Extraktion unabdingbar macht. Auch ist eine jede Probe meistens einzigartig, sodass eine Verunreinigung während der RNA-Extraktion die Relevanz der Ergebnisse einschränkt und potentiell wichtige Erkenntnisse unwiederbringlich verloren gehen können [334]. So muss in diesem Isolationsprozess extreme Sorgfalt gelten und sich strikt an vorgegebene Protokolle gehalten werden, die eine genormte Anzahl an Zellen als Ausgangspunkt vorsehen.

Das gewonnene Template muss für die Verwendung in weiterführenden Versuchen gewisse Kriterien erfüllen: eine hohe Qualität, DNA-Freiheit, Nuklease-Freiheit und keine Co-Isolation von PCR-Inhibitoren sollte stattgefunden haben [334]. Biologische Proben enthalten immer derartige Inhibitoren der reversen Transkription beziehungsweise der PCR, was bedingt, dass der Versuch immer beeinflusst wird [330]. Sie müssen daher auf ein Minimum reduziert werden. Daneben spielt auch die Lagerung der Proben sowie der isolierten RNA für die Qualität und Reproduzierbarkeit eine Rolle [332]. Sie sollte unter sofortiger Verwendung stets auf Eis stattfinden.

Unerlässlich nach erfolgreicher Extraktion der RNA ist es, diese zu quantifizieren, um mehrere Proben vergleichen zu können. Hierbei wird zum einen die Konzentration der RNA bestimmt, damit man für die nachfolgende cDNA-Synthese einheitliche Ausgangsmengen einsetzt, zum anderen wird eine Absorptionsratio von 260 nm zu 280 nm bestimmt, um potentielle Verunreinigungen erkennen zu können [332]. Dies ist ebenso für die Normalisierung des gesamten Versuches ein entscheidender Schritt [333]. Für die Herstellung dieser cDNA werden spezielle Enzyme, die reversen Transkriptasen, welche vor allen aus Retroviren in der Natur bekannt sind, verwendet [323]. Die Entdeckung dieses Enzyms ermöglichte die Entwicklung von sensitiven molekularbiologischen Methoden zur Grundlagenforschung, von Medikamenten und von diagnostischen Verfahren [328]. Für die Viren hat die Reverse Transkriptase eine ganze Reihe von Funktionen, von denen lediglich die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität für die PCR von Bedeutung ist. Neben dem Enzym spielt die Primerauswahl für die cDNA-Synthese eine große Rolle. Diese kann mit Random-, oligo-DT- und zielgenspezifischen Primern oder einer Kombination aus Random- und oligo-DT-Primern erfolgen [328]. Random-Primer können an diversen Stellen an der RNA binden und so mehr als ein cDNA-Produkt bilden, was die Spezifität beeinträchtigt. Oligo-DT-Primer sind spezifischer, haben eine hohe Selektivität und eignen sich sehr gut für eine limitierte RNA-Probe, jedoch eignen sich diese Primer nicht für RNA-Fragmente [328]. Sie werden dennoch bevorzugt eingesetzt, da sie primär nur mRNA umsetzen [333]. Zielgenspezifische Primer haben die höchste Spezifität der Primer für die cDNA-Synthese, allerdings benötigen sie ein aufwendigeres experimentelles Design. Somit hat jede Wahl Vor- und Nachteile, wobei für vergleichbare Experimente immer die gleichen

Primer für die cDNA-Herstellung verwendet werden sollten. Möglicherweise können auch stabile RNA-Sekundärstrukturen die Umwandlung beeinträchtigen und zu fehlerhaften Ergebnissen führen, weswegen sich eine Optimierung durch einen zeitlich kurzen Inkubationsschritt mit circa 65 °C zur Denaturierung der RNA anbietet [328]. In vorliegender Arbeit wurden über Vorversuche mit den Oligo-DT-Primern im Vergleich zu den Random-Primern die kleineren c_t -Werte für alle verwendeten Gene ermittelt, sodass stets diese eingesetzt wurden (siehe Experimenteller Teil 7.3).

Für die PCR wurde eine 1:10 Verdünnung der hergestellten cDNA und mit einer definierten, für jeden Versuch äquivalenten Menge an Master-Mix, der industriell hergestellt wurde, die dem Zielgen entsprechenden Primer sowie PCR-Wasser gemischt (siehe Experimenteller Teil 7.4). Je nach Anzahl der Proben konnte es notwendig sein, diese auf mehr als einer PCR-Platte zu vermessen, allerdings ist zwischen jedem Lauf eine gewisse Variation im Ablauf möglich. Um diese auszuschließen, war eine sogenannte inter-run-control (IRC) essentiell. Hierbei wurden identische Proben an der gleichen Stelle der Platte, optimaler Weise im Triplikate, in jedem Lauf mitgeführt, um über deren c_t -Werte einen Korrekturfaktor für die nachfolgende Analyse zu entwickeln [335]. Die im vorherigen Absatz beschriebenen Kontrollen auf Verunreinigungen wurden ebenfalls immer im Duplikate zupipettiert sowie eine Verdünnungsreihe von insgesamt fünf Verdünnungen von cDNA im Triplikate gemessen.

5.1.1.3 Detektionsmöglichkeiten während der PCR

In vorliegender Arbeit wurde in den gesamten PCR-Versuchen aus dem großen Pool an Detektionsmethoden der DNA-Bindefarbstoff SYBR Green ausgewählt [321, 323, 327]. Dieser ist aufgrund seiner geringen Kosten, der einfachen Versuchsentwicklung und dem Fakt, dass für jeden Versuch die gleiche Detektionsmethode verwendet werden kann, eine sehr beliebte Option [333]. Auf die weiteren Detektionsmethoden, wie beispielsweise TaqMan-Sonden, wird daher in der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen. Die Farbstoffe zählen zu den unspezifischen Detektionsmethoden, können jedoch über nachfolgende Schmelzkurvenanalysen Aussagen über spezifische Amplifikationsprodukte liefern [334]. Diese Stoffe fluoreszieren im ungebundenen Zustand nicht, sondern emittieren erst sobald sie an die gebildete doppelsträngige DNA starr, in der sogenannten kleinen Furche, gebunden sind und mit ihr interkalieren (siehe Abbildung 50) [328, 333]. Je mehr DNA gebildet wird, desto mehr Farbstoff kann binden. Folglich steigt die Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA [333]. Die Intensität wird nach jedem Elongationsschritt gemessen, um den steigenden Gehalt an amplifizierter DNA zu überwachen [329].

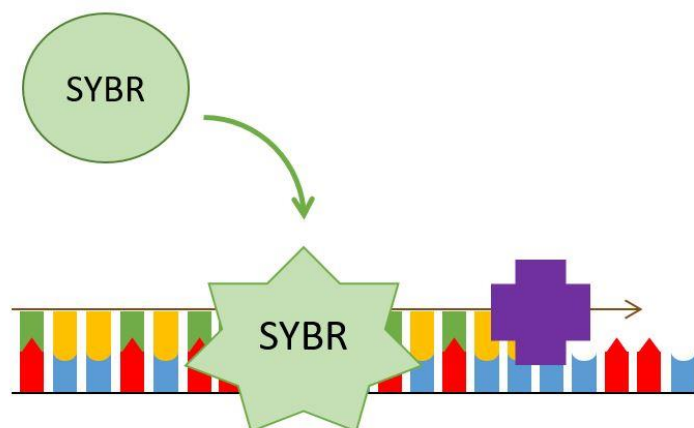


Abbildung 50 Wirkprinzip des SYBR Green Farbstoffes. Der komplementäre DNA-Strang wird im PCR-Prozess von der DNA-Polymerase (violette Kreuz) hergestellt. In ungebundenem Zustand zeigt der Farbstoff noch keine Fluoreszenz (grüner Kreis). Sobald er an die nachgebildete doppelsträngige DNA starr bindet und mit ihr interkaliert, fluoresziert er direkt proportional zur Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA (modifiziert nach [329, 333]).

Dem gegenüber steht der Nachteil der unspezifischen Bindung der Farbstoffe an jede DNA, weswegen der spezifischen Primerauswahl für die Fragestellung zur Minimierung dieser unerwünschten Nebenprodukte eine große Bedeutung zukommt [333]. Durch diese unspezifische Bindung kann es zu Fluoreszenzdetektionen in der sogenannten „no-template-control“ (NTC) von Primer-Dimeren kommen, was man durch die Anwendung der Zwei-Schritt-PCR minimieren möchte [334]. Diese Kontrolle stellt sicher, dass eine Messung nur aus der Probe stattfindet und keine Verunreinigung vorhanden ist [333]. Allerdings gilt allgemein, dass c_t -Werte der NTC von über 35 vernachlässigt werden können, da der Anteil an vorhandener möglicher Kontamination eher gering ist, sofern die Proben einen c_t -Wert von 30 nicht überschreiten oder mehr als zehn Zyklen niedriger als die NTC sind [333, 334]. Die NTC beinhaltet die Zugabe von lediglich PCR-Wasser statt der cDNA zum vorgelegten Mix im Well. Während den kompletten Versuchen wurde auf jeder PCR-Platte eine solche Kontrolle im Duplikat mitgeführt. Als weitere Überprüfung auf genomische DNA-Verunreinigungen sollte auf den Platten ebenso eine noRT-Kontrolle mitgeführt werden. Hierbei wird beim Schritt der Umwandlung von RNA in cDNA durch Ersatz von reverser Transkriptase mit PCR-Wasser kein Produkt gebildet, was zu keiner Fluoreszenz während der PCR führen sollte. Dies stellt eine wichtige Kontrolle zur Bestimmung der genomischen Kontamination in der Probe dar [333].

Darüber hinaus weist SYBR Green selbst einige Limitationen, wie die bevorzugte Bindung an Guanin/Cytosin-reiche Sequenzen sowie eine negative Beeinflussung der Schmelzkurvenanalyse, in unbekanntem Ausmaß auf. Vorteile dieses Fluoreszenzfarbstoffes sind die Kosteneffektivität, die Detektion generisch amplifizierter DNA und die Möglichkeit zur Unterscheidung verschiedener Produkte über die Schmelzkurvenanalyse (siehe Abbildung 51) [336], in der die negative erste Ableitung der Fluoreszenz gegen die

Temperatur aufgetragen wird. Über diese Analyse der Produkte lässt sich anschließend eine Aussage über die Qualität und Reinheit der PCR treffen. Die Temperatur wird langsam erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelztemperatur (T_m) wird durch den Punkt markiert, an dem es zu einem deutlichen Abfall der Fluoreszenz aufgrund der Trennung der DNA-Doppelstränge kommt. Dieser Punkt hängt von der Nukleotidzusammensetzung, vor allem dem Guanin/Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt), ab und ermöglicht so eine spezifische Identifikation des richtigen Produktes. Die Höhe dieses Peaks wird zudem sowohl von der Amplikonlänge, als auch von der gebildeten Menge bestimmt [329]. Jedoch sollte man dies nicht als alleiniges Qualitätsmerkmal für die Evaluierung der PCR-Produkte zu Rate ziehen, da unter Umständen manche Nebenprodukte über die gleiche Schmelztemperatur verfügen [337]. Für den Fall, dass in der Graphik mehr als ein Peak oder eine Schulter am Peak zu sehen ist, kann man davon ausgehen, dass mehr als ein Produkt gebildet wurde. Gründe hierfür könnten eine mangelnde Spezifität der Primer, die Bildung von Primer-Dimeren oder eine ineffektive Amplifikation der cDNA sein. Es empfiehlt sich daher, die PCR-Produkte im Anschluss mit einer Gelelektrophorese auf eine einheitliche Größe hin zu überprüfen.

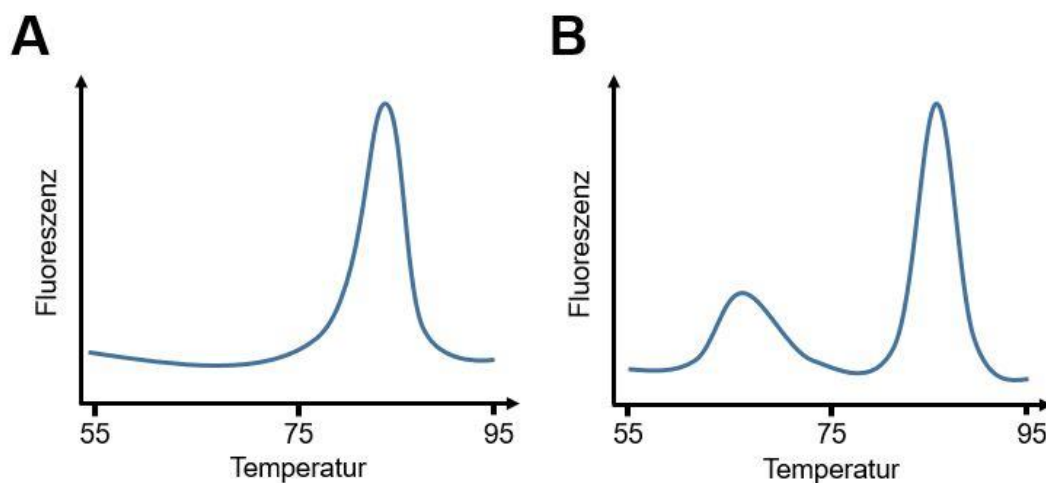


Abbildung 51 Schematische Darstellung zweier Schmelzkurvenanalysen mit gewünschtem Aussehen (A) und einem offensichtlichen Nebenprodukt aus dem PCR-Prozess (B). Im gewünschten Verlauf zeigt sich nur ein deutlicher Peak, dessen Fluoreszenz an einer gewissen Temperaturschwelle plötzlich abnimmt, was ein Indiz für ein einziges Produkt aus der PCR ist (A). In der rechten Schmelzkurve (B) ist vor diesem Peak ein weiterer kleinerer zu einer niedrigeren Temperatur zu erkennen, was für die Anwesenheit eines weiteren Produktes steht (modifiziert nach [333]).

5.1.1.4 Quantifizierung der PCR-Produkte

Sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Templates ermittelt, wird eine einheitliche Quantifizierung benötigt, um sie vergleichen zu können [327], was entweder absolut oder relativ geschehen kann. In der kostspieligen und zeitintensiven absoluten Quantifizierung werden die Daten auf Basis einer Kalibriergeraden aus diversen Verdünnungen reiner

Referenz-RNA kalkuliert, was eine nahezu gleiche Amplifikationseffizienz der Standards und der Proben voraussetzt [328]. Es ist möglich, die genaue Ausgangsmenge zu berechnen, was den Unterschied zur relativen Quantifizierung darstellt. Hier werden keine absoluten Mengen bestimmt, sondern man trifft lediglich eine Aussage über die relative Änderung der Expression eines Zielgenes gegenüber einer Kontrolle [333, 338]. Es lassen sich Trends in der Regulierung nach bestimmten Interventionen feststellen [321, 331, 339], da die Zielsequenz aus Zellen mit Behandlung als Probe und Zellen ohne Behandlung als Kontrolle mit der PCR bestimmt wird. Am häufigsten wird die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode für diese Art der Auswertung verwendet (siehe Formel 4), welche auf zwei Annahmen basiert. Einer Reaktionseffizienz von 100 %, also einer idealen Verdopplung der Templates mit jedem Zyklus, und einer konstanten Expression von einem oder mehreren Kontrollgenen in den Proben.

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(c_{t,TG}-c_{t,CG})_{treated}-(c_{t,TG}-c_{t,CG})_{control}}$$

Formel 4

$c_{t,TG}$ = Thresholdwert des Zielgens (target gene)

$c_{t,CG}$ = Thresholdwert des Kontrollgens (control gene)

Die geforderte Effizienz der PCR-Reaktion stellt den Grund für die willkürliche Festlegung des c_t -Wertes zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der exponentiellen Phase dar. *Bustin et al.* merken zurecht an, dass diese subjektive Festlegung die Verlässlichkeit der PCR-Ergebnisse minimiert [330] und dass mit dem Einsatz mehrerer Referenzgene eine höhere Robustheit erreicht werden kann [332]. Die Wahl geeigneter Referenzgene als endogene Kontrolle ist sehr wichtig, da über die Normalisierung auf entsprechende Gene eine Probenvariation, die die Datenanalyse möglicherweise stört, sowie eine Differenz in Menge und Qualität des Ausgangsmaterials und der Reaktionseffizienz ausgeglichen werden kann [333]. Eine Normalisierung auf Basis mehrerer Housekeepinggene sollte mittels deren geometrischen Mittelwert erfolgen, da dieser weniger von Ausreißern beeinflusst wird [340].

Optimalerweise sollen lediglich die wahren genspezifischen Variationen im Versuchsansatz detektiert werden [340], sowie darüber eine gute, reproduzierbare und biologisch relevante Quantifizierung der RNA sichergestellt werden [341]. Eine derartige Normalisierung stellt nur eine von mehreren Methoden dar und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet [342]. Diese Normalisierung beginnt mit dem Einsatz der gleichen Zellzahl oder derselben RNA-Menge für die cDNA-Herstellung viel früher in Experimenten zur Identifizierung von Genexpressionsänderungen [333].

Für die sogenannten Housekeepinggene gilt, dass sie robust gegenüber experimentellen Bedingungen sein, über die komplette PCR dieselbe Kinetik wie das Zielgen zeigen und in allen Proben konstant exprimiert werden sollten [328, 333]. Diese Gene kennzeichnet, dass sie in allen Zellen mit einem Nukleus synthetisiert werden und wichtig für das Überleben der Zellen sind [343]. Ein vorheriger Test auf Eignung der Kontrollgene für die Fragestellung ist daher unerlässlich, da sie zwar konstant in vorgegebenen Zelltypen oder Experimentbedingungen sind, jedoch für den Routinegebrauch doch variabel oder unbrauchbar sein können [343]. So kann es nur sehr schwer ein universelles Referenzgen für die PCR geben, da in unterschiedlichen experimentellen Designs, unter anderen Versuchsbedingungen und in diversen Zelltypen keine einheitliche Expression stattfinden kann [330, 340, 341]. Aus diesem Grund sollte in der Forschung das willkürliche Auswählen eines Referenzgenes nicht toleriert werden [342, 343]. Sobald die Expression des Kontrollgens sensibel auf die Experimentbedingungen reagiert, würde das zu falschen Ergebnissen der PCR führen, weswegen nachgewiesen werden sollte, dass die Referenz der Fragestellung genügt [333]. *Vandesompele et al.* sprechen sich in ihrer Arbeit sogar dafür aus, aufgrund der relativen großen Abweichung nicht nur auf ein einzelnes Gen als Kontrolle zu vertrauen, sondern mehrere Gene aus diversen funktionellen Klassen oder Gewebetypen auszuwählen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten [340]. Folglich ist es ratsam für jedes Experiment vorab eine entsprechende Validierung durchzuführen, welche Referenzgene für die entsprechende Fragestellung oder die zu untersuchenden Zell- oder Gewebetypen ausgewählt werden können [333]. Die Bestimmung von drei konstant exprimierten Kontrollgenen sollten im allgemeinen Fall für eine adäquate Normalisierung von Proben genügen, wobei unter Umständen auch noch mehr Gene nötig sein könnten, um die Variation zu verringern (siehe Abbildung 52).

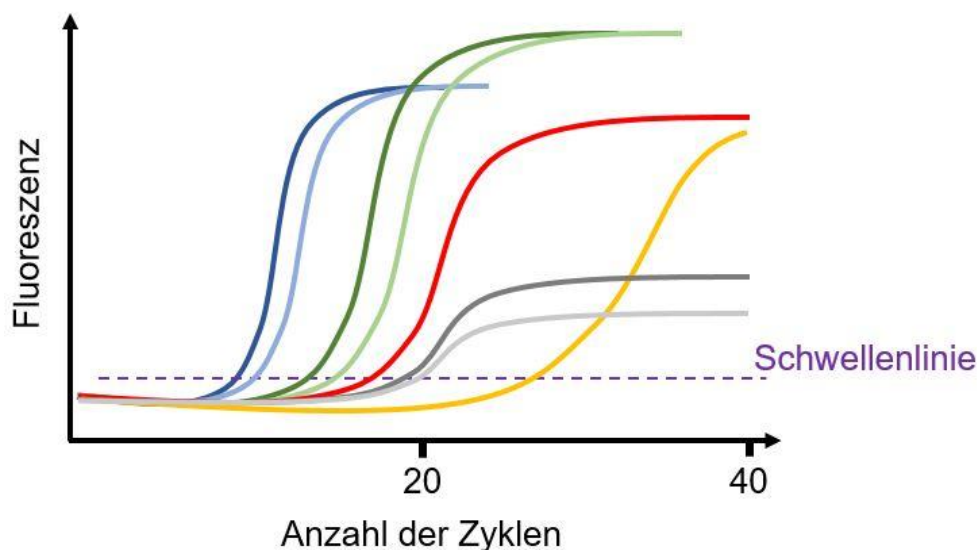


Abbildung 52 Übersicht über die Amplifikationskurven einer Probe mit ihrer Kontrolle (rot und gelb) sowie den drei Housekeepinggenen zur relativen Quantifizierung (blau, grün, grau). Zusätzlich ist die Schwellenlinie (lila) für den Thresholdzyklus dargestellt (modifiziert nach [321]).

Mit Hilfe des Relative Expression Software Tools (REST[®]) lässt sich eine relative Quantifizierung der qPCR-Daten durchführen [331, 339]. Das Programm kann die Auswertung von mehreren Ziel- und Kontrollgenen mit einer Vielzahl von Datenpunkten prozessieren, wohingegen andere Software hier limitiert ist und nur den Vergleich von einem Ziel- zu einem Kontrollgen zulassen [333]. REST[®] nutzt den c_t -Werten aus den Experimenten und bezieht auch verschiedene Effizienzen oder Housekeepinggene in die Normalisierung mit ein [333]. Darüber hinaus liefert es die Ergebnisse der relativen Expression als Box-Plots, berechnet die Expressionsverhältnisse basierend auf einer paarweisen Umverteilung der Werte für die analysierten Gene und bietet die Möglichkeit der Testung auf statistische Signifikanz. Die relative Expression des Zielgenes wird dann gegebenenfalls in einer Herauf- oder Herunterregulierung ausgedrückt.

5.1.2 Optimierung, Normalisierung und Validierung der RT-qPCR-Analytik

5.1.2.1 Primerentwurf sowie Primerspezifitätstest und -konzentrationstest

Für eine spezifische PCR ist die Auswahl und der optimale Einsatz der Primer von entscheidender Bedeutung. Die nicht-spezifische Amplifikation ist eine der größten Herausforderungen für die erfolgreiche Entwicklung einer PCR-Methode [333]. Der Primerentwurf wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Softwareprogramm Primer-BLAST durchgeführt [344], welches die zwei Stufen der Entwicklung durch die Kombination zweier Programme abdeckt. Primer3 ermöglicht es für eine vorgegebene Templatesequenz mögliche Primerpaare zu entwerfen [344]. BLAST bietet eine spezifische Überprüfung

dieser Primer auf Übereinstimmung mit der Zielsequenz [344]. Das Design der Primer basiert auf ihrer geschätzten Schmelztemperatur, der gewünschten Amplikonlänge und der Ausgangsprobe. So muss für ein gutes Primerdesign auch die Sekundärstruktur des RNA-Templates ebenso wie die Spezifität der Primer zum Template in Betracht gezogen werden, da dies die Primeranlagerung negativ beeinflussen kann [332, 335]. Für das Zielgen, die ATP-Bindekassette Subfamilie B Mitglied 1 (p-GP), wurden ebenfalls die optimalen Sequenzabschnitte evaluiert. Es kodiert für ein Transportprotein, welches am Transport von Stoffen über extra- oder intrazelluläre Membranen verantwortlich ist. Es ist auch in Resistenzvorgängen gegenüber Arzneimitteln oder sonstigen Xenobiotika involviert [340, 345].

Eine Reihe wichtiger Eigenschaften muss für die Primerentwicklung in das Programm eingepflegt werden. Für eine hohe Effizienz der PCR nach einer Detektion der Genexpression mit SYBR Green-Farbstoff sollte eine PCR-Produktgröße von maximal 200 Basenpaaren (bp) nicht überschritten werden, da die Effizienz ansonsten deutlich sinkt [333]. Die verwendete Polymerase kann um ungefähr 60 °C optimal arbeiten, daher sollte auch die Schmelztemperatur der Primer-Oligonukleotide in einem Bereich von 57 – 63 °C liegen. Diese Schmelztemperatur ist für die Festlegung der optimalen Annealingtemperatur der entscheidende Faktor und sollte für den Forward- (FW) sowie den Reverse (RW)-Primer annähernd identisch sein [333]. Für den Ausschluss einer Amplifikation der genomischen DNA sollten die Primer eine Exon-Exon-Schnittstelle überspannen, um zu gewährleisten, dass nur cDNA umgeschrieben wird [333]. Ebenso sollte eine Trennung der Primer-Paare durch mindestens ein Intron auf der korrespondierenden genomischen DNA vorhanden sein, um aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe zwischen der Amplifikation von mRNA und genomischer DNA unterscheiden zu können [333]. Die Produkte sind nach Vervielfältigung Letzterer merklich größer. Typischerweise haben Primer eine Länge von 16 bis 28 Basen, in denen der Cytosin- und Guaningehalt (GC-Gehalt) zwischen 35 und 65 % liegt, da ein zu hoher Gehalt das Mispriming und ein zu niedriger Gehalt eine schlechte Primerbindung und damit PCR-Effizienz zu verhindern [333]. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen sowie Primer-Dimerisierung gilt es nach Möglichkeit zu vermeiden, um ein Sinken der Amplifikationseffizienz und schlechte Primeranlagerung zu verhindern [333]. Hierbei sollte die maximale Selbst- und Paar-Komplementarität möglichst geringgehalten werden, nämlich 5 bp beziehungsweise 2 bp.

Die so erhaltenen Primer wurden noch mit weiteren Programmen, wie dem Oligo Analysis Tool [346] und dem OligoAnalyzer [347], zusätzlich analysiert. Zum einen wird hier noch mal ein Aspekt auf die Selbst- bzw. Paarkomplementarität, also der Anlagerung des Primers an sich selbst oder des Primerpaares, überprüft, zum anderen die Primerschmelztemperatur aus thermodynamischer Sicht berechnet und so eine Aussage über die

Stabilität getroffen. So sollte der Temperaturunterschied im Primerpaar möglichst gering sein, um unerwünschte Amplifikationen zu vermeiden. Primer werden allgemein in Konzentration von 50 bis 200 nM eingesetzt. Höhere Konzentrationen führen zu fehlerhafter Anlagerung und falschen Produkten. Falsche Anlagerung kann ebenso verhindert werden, indem nur Primer ausgewählt werden die am 3'-Ende lediglich ein bis zwei Guanin/Cytosin-Basen unter den letzten fünf Nukleotiden aufweisen. Dieses Merkmal macht sie für Hybridisierung und falsche Polymerisierung weniger anfällig [329].

Da das Design und die Evaluierung von geeigneten Primern sehr kosten- und zeitintensiv sein kann, gibt es die Möglichkeit mit der RTPimerDB auf eine frei zugängliche Datenbank zurückzugreifen [348]. Hier werden validierte Primersequenzen für eine Vielzahl von Fragestellungen veröffentlicht, die über diverse Primereigenschaften, wie Gensymbol oder Komplementärsequenz, gesucht werden können. Die Verlinkung zu weiteren Datenbanken soll jeweils die Richtigkeit und Spezifität sicherstellen, jedoch gibt es dabei immer den großen Nachteil der potentiellen Falsch-Veröffentlichung. Es gilt stets, dass veröffentlichte Primer oder ein veröffentlichter PCR-Versuch nicht automatisch ein optimales Ergebnis garantieren [333].

In Tabelle 9 ist eine Übersicht aller verwendeter Primer mit jeweiliger Sequenz und Länge aus der eigenen Recherche dargestellt, die entweder über Programme entworfen oder über die Datenbank gesucht wurden.

Sobald die in Auftrag gegebenen Primer vorlagen, war eine Bestimmung der Spezifität sowie der idealen Konzentration für eine möglichst effiziente PCR erforderlich [332]. Eine hohe Spezifität zeichnet sich dadurch aus, dass nur ein einziges Produkt in der PCR gebildet wird. Wenn während der Reaktion nur ein Fluoreszenzsignal detektierbar ist, kann das als erstes positives Indiz gewertet werden. Über eine Schmelzkurvenanalyse, in der die Temperatur schrittweise erhöht wird und von 55 °C bis 95 °C alle 0,5 °C ein Messpunkt aufgezeichnet wird, kann nachfolgend vor allem eine Primer-Dimer-Bildung ausgeschlossen werden. Auch aufgrund der Detektionsmethode, während der ein Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch an die gebildete DNA bindet, ist eine solche Analyse unerlässlich, da fehlerhafte Amplifikation durch Anlagerung der Primer an falsche Sequenzen auch zu falschen Ergebnissen führt [321]. Zur weiterführenden Analyse ist es daher essentiell, die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese zusätzlich einmalig auf ihre einheitliche Größe zu untersuchen [335]. In einem horizontalen Agarosegel, welches sich direkt im Puffer befindet, werden die Proben in Taschen aufgetragen. Mit Hilfe einer angelegten Spannung findet eine elektrophoretische Trennung nach der Größe statt, sofern mehrere Moleküle in einer Probe enthalten sind [328]. Eine schlechte Auswahl an Primern für die reverse Transkription, wie auch für die PCR führt zu einem ineffizienten und nicht robusten Versuch [332].

Tabelle 9 Basensequenzen mit jeweiliger Länge sämtlicher in der eigenen Methodenentwicklung und der Analyse verwendeter Primer als Forward (FW)- und Reverse (RW)-Primer.

Kürzel	Sequenz (5' → 3')	Länge [Basen]
p-GP (FW)	CCTTCAGGGTTTCACATTTGGC	22
p-GP (RW)	GAGCAGCATCATTGGCGAG	19
PPIA (FW)	GTCAACCCCACCGTGTCTT	20
PPIA (RW)	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	21
RPLP0 (FW)	GCTGCTGCCCGTGCTGGTG	19
RPLP0 (RW)	TGGTGCCCCTGGAGATTTTAGTGG	24
GAPDH (FW)	CGCTCTGCTCCTCCTGTT	20
GAPDH (RW)	CCATGGTGTCTGAGCGATGT	20
ACTB (FW)	TGAGCGCGGCTACAGCTT	18
ACTB (RW)	TCCTTAATGTCACGCACGATTT	22
18s RNA (FW)	GCCTGCGGCTTAATTTGACT	20
18s RNA (RW)	ACCAGACAAATCGCTCCACC	20
HPRT-1 (FW)	AGCCAGACTTTGTTGGATTTGA	22
HPRT-1 (RW)	ACTGGCGATGTCAATAGGACT	21
B2M (FW)	AAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACA	25
B2M (RW)	AATTCATCCAATCCAAATGCGGC	23
SDHA (FW)	AGACCTAAAGCACCTGAAGACG	22
SDHA (RW)	CTCATCAATCCGACCTTGATGC	24
UBC (FW)	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	19
UBC (RW)	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	21

Beim Spezifitätstest der zehn Primerpaare aus Tabelle 9 wies lediglich das Paar für UBC zwei Peaks in der Schmelzkurvenanalyse auf, weswegen es von den weiteren Versuchen ausgeschlossen wurde. In diesem Fall war es sehr wahrscheinlich, dass sich während des Amplifikationsprozesses Primer-Dimere gebildet haben. In einer Gelelektrophorese der neun verbleibenden Gene war jeweils nur eine Bande erkennbar, was darauf schließen lässt, dass sich hinter dem Peak der Schmelzkurvenanalyse dieser Gene auch nur jeweils ein Produkt verborgen hat.

Als nächsten Schritt galt es die optimale Konzentration der Primer in den eigenen Versuchen zu ermitteln (siehe Tabelle 10). Hierfür wurden für jedes Primerpaar drei Konzentrationen von 100 bis 300 nM und insgesamt neun verschiedene Kombinationen dieser Mengen getestet (siehe Experimenteller Teil 6.4 und Tabellarischer Anhang 5.2).

Eine Aussage lieferte auch hier der c_t -Wert, welcher in der besten Konzentration beziehungsweise Kombination am niedrigsten im Vergleich zu den anderen acht sein sollte [333]. Die Primerpaare für RPLP 0, 18s RNA und ACTB konnten in einer Konzentration von 300 nM FW und 300 nM RW die niedrigsten und somit besten Ergebnisse erzielen. Für die Primerpaare PPIA und B2M waren es 300 nM FW und 200 nM RW. Die Primerpaare SDHA und GAPDH hatten die kleinsten c_t -Werte mit 200 nM FW und 200 nM RW. Abweichend davon ergab sich für HPRT 1 eine Konzentration von 200 nM FW und 300 nM RW sowie für p-GP die niedrigsten Konzentrationen mit 100 nM FW und 100 nM RW. In den Untersuchungen wurde im weiteren Verlauf immer eine Konzentration von 200 nM FW und 200 nM RW für jeden Primer angenommen, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Unterschiede zwischen den besten Kombinationen betrug nur $\Delta c_t < 0,5$, was so gering war, dass diese Vereinheitlichung aller Primerpaare auf eine Konzentration vertretbar war.

Tabelle 10 Übersicht über die optimale Konzentration des Primerpaares für die jeweiligen Gene.

Gen	Konzentration FW [nM]	Konzentration RW [nM]
p-GP	100	100
PPIA	300	200
RPLP0	300	300
GAPDH	200	200
ACTB	300	300
18s RNA	300	300
HPRT-1	200	300
B2M	300	200
SDHA	200	200

5.1.2.2 Effizienz der PCR

Die Bestimmung der Effizienz eines jeden Zielgens in Versuchen sowie in der allgemeinen Methodenentwicklung der PCR ist ebenfalls ein sehr wichtiger Schritt und unerlässlich. Eine Berechnung kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden: diversen mathematischen Algorithmen, der Betrachtung des absoluten Fluoreszenzanstiegs in der exponentiellen Phase oder der Erstellung einer Standardkurve, welche nach aktuellem Stand das Mittel der Wahl ist [332, 349] und daher in vorliegender Arbeit verwendet wurde. So sollte auf jeder Platte eine Verdünnungsreihe an cDNA aufgetragen werden, um die

jeweilige Effizienz des Gens für einen jeden Lauf zu messen [333]. Im Anschluss wird durch lineare Regression die Steigung ermittelt und die Effizienz nach Formel 5 bestimmt [333].

$$\text{Effizienz} = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Formel 5

In der Bestimmung der Effizienz sollte auch immer der R^2 -Wert für die Gerade betrachtet werden, da dieser ein Maß für die Genauigkeit der Verdünnung und die Präzision des Pipettierens darstellt [333]. Der Wert der y-Achse dagegen ist ein Indikator für die Sensitivität des Versuches, wie genau das Template quantifiziert wurde und sollte optimalerweise einen c_t -Wert von 33 bis 37 haben [333].

Eine Vielzahl von Analysenmethoden haben als Grundannahme die ideale Verdopplung der DNA in jedem Zyklus, was einer Effizienz von 1 oder 100 % entspricht, und die konstanten Werte der Effizienzen mehrerer Gene in einem Versuch über die Zeit [332, 350]. So führen bereits kleine Variationen in den Effizienzen von Referenz- beziehungsweise Zielsequenz zu potentiell hohen Abweichung in den Ergebnissen [350]. In der Realität liegt die Effizienz jedoch meist zwischen 75 und 90 %, da PCR-Inhibitoren den Versuch negativ beeinflussen können [349].

Nach Überprüfung der Primer auf Spezifität und Bestimmung der optimalen Konzentration wurden sie hinsichtlich ihrer Reaktionseffizienz untersucht (siehe Experimenteller Teil 6.5 und Tabellarischer Anhang 5.3). Es sollte sichergestellt werden, dass die Primer in einem annehmbaren Rahmen arbeiteten. So ließ sich zeigen, dass sämtliche neun Primerpaare sehr gute Reaktionseffizienzen aufweisen, welche meist im Akzeptanzbereich oder sogar darüber lagen (siehe Tabelle 11). Für die Primerpaare PPIA, RPLP 0 und GAPDH konnte sogar eine Effizienz von über 100 % bestimmt werden. Da es jedoch eine mehr als ideale Verdopplung nicht gibt, wurde für diese Primer eine Effizienz von 100 % angenommen. Der höhere Wert kann mit natürlichen Variationen innerhalb der Versuche begründet werden. Diese hohe Effizienz von über 100 %, welche praktisch unmöglich aufgrund der PCR-Amplifikationstheorie ist, ist offensichtlich ein Nachteil dieser Methode und die reale Effizienz wird überschätzt [333].

Tabelle 11 Übersicht der Effizienzen in Prozent für die – nach der Überprüfung der Primer - übrigen neun Primerpaare. Es ließ sich erkennen, dass alle Primer in einem adäquaten Maßstab arbeiteten und somit für die Versuche verwendet werden konnten. Die Effizienz wurde aus der Steigung einer Geraden einer Verdünnungsreihe in n= 3 bestimmt.

Genkürzel	Effizienz [%]	Genkürzel	Effizienz [%]
p-GP	90,1	18s RNA	76,8
PPIA	106,5	GAPDH	102,0
RPLP 0	102,3	B2M	99,4
SDHA	96,4	ACTB	98,7
HPRT 1	87,5		

Für die folgenden Versuche zum Genexpressionseinfluss der Polyphenole wurde auf jeder Platte eine fünffache Verdünnung von cDNA von V1 (1:10) bis V5 (1:100000) zur Bestimmung der Effizienz des Gens jeweils im Triplikat mitgeführt (siehe Experimenteller Teil 7.4). Alle erhaltenen Effizienzen lagen zwischen 81 und 100 % und somit in einem annehmbaren Bereich für die PCR-Versuche. Sie wurden in den zur Auswertung über die REST[®]-Software verwendet.

5.1.2.3 Housekeeping-Gen-Validierung

Für die relative Quantifizierung einer PCR ist die eine stabile Expression von Referenzgenen, sogenannten Housekeepinggenen, von elementarer Bedeutung, um mögliche Hoch- oder Herunterregulationen unter bestimmten Bedingungen zeigen zu können [351]. Des Weiteren wird für sie eine stabile und sichere Synthese in verschiedenen Geweben auch unter experimentellen Bedingungen angenommen, allerdings zeigen viele Studien, dass sich auch die Regulation der Housekeepinggene unter Umständen über die Versuchsbedingungen [340, 352], sowie über das Ausgangsgewebe beeinflussen lässt [343].

Für die Methodenentwicklung wurde ein Pool aus insgesamt neun Housekeepinggenen gebildet (siehe Tabelle 12), um im Idealfall für die Analyse der Versuche mehrere Gene zur Verfügung zu haben. Das Primerpaar für das Gen für Ubiquitin C (UBC), welches, an unterschiedliche Proteine konjugiert, diverse Vorgänge in der Zelle, wie beispielsweise die Transkription, beeinflusst, wurde vor der eigenen Referenzgenvalidierung aufgrund der schlechten Ergebnisse nach der Primerevaluation ausgeschlossen. In der Validierung waren noch acht Gene zur Auswahl. So kodiert das Gen Peptidylprolylisomerase A (PPIA) für ein Enzym, welches die cis-trans-Isomerisierung von Prolin in Oligopeptiden katalysiert

und somit die Proteinfaltung beschleunigt. Die ribosomale Phosphoprotein P0 (RPLP0) ist ein Teil der 60S-Untereinheit der Ribosomen und als solches involviert in die Proteinsynthese. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT 1) ist am Purinstoffwechsel beteiligt. Das Gen Succinatdehydrogenasecomplexflavoprotein Untereinheit A (SDHA) kodiert für eine Succinat-Ubiquon-Oxidoreduktase, die ein zentrales Enzym in der mitochondrialen Atmungskette darstellt, und Beta-2-Mikroglobulin (B2M) kodiert für ein Oberflächenprotein in Zellen. Beta Aktin (ACTB) kodiert für ein zytoplasmatisches Strukturprotein, das zur Stabilisierung des Zytoskeletts beiträgt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein wichtiges Enzym in der Glykolyse und die ribosomale 18sRNA bildet einen Teil der Untereinheit 40S von Ribosomen [340, 343, 353, 354].

Tabelle 12 Übersicht der untersuchten Referenzgene mit ihrer Funktion im menschlichen Organismus, welche zur Normalisierung der p-GP-Genexpression in den CaCo-II-Zellen in den Versuchen zum Polyphenolgenexpressionseinfluss verwendet wurden [340, 343, 353, 354].

Genname	Abkürzung	Funktion
Peptidylprolylisomerase A	PPIA	Cis-trans-Isomerisierung von Prolin in der Proteinfaltung
Ribosomale PLP0	RPLP 0	Teil der 60 S Untereinheit der Ribosomen
Succinat-Dehydrogenase (SDH) (Flavoprotein-Untereinheit)	SDHA	Citratzyklus
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-1	HPRT-1	Purinstoffwechsel
18S RNA	18s RNA	ribosomale RNA der 40 S Untereinheit der 80 S-Ribosomen
Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	GAPDH	Glykolyse
β_2 - Mikroglobulin	B2M	Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes I
β - Actin	ACTB	Bestandteil des Zytoskeletts als Strukturprotein

Zur Evaluierung der passenden Referenzgene kann die Software BestKeeper[®] herangezogen werden [351]. Basierend auf den c_t -Werten jedes einzelnen zu testenden Housekeepinggens (siehe Experimenteller Teil 6.6 und Tabellarischer Anhang 5.4.2), werden verschiedene statistische Parameter, wie der geometrische Mittelwert oder der Varianzkoeffizient, bestimmt und miteinander verglichen. Nach dieser deskriptiven Statistik

werden die Expressionslevel für jedes Gen errechnet und, sobald die Standardabweichung größer 1 ist, kann das Gen als instabil bezeichnet werden. Folglich werden in der Methodenentwicklung die drei Referenzgene mit der kleinsten Standardabweichung ausgewählt [351]. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der BestKeeper®-Analyse zusammengetragen. Es ließen sich für die drei Primerpaare für die Gene PPIA (SDV= 0,38), RPLP 0 (SDV= 0,40) und SDHA (SDV= 0,42) die kleinsten Standardabweichungen erkennen, weswegen diese drei Gene zur Normalisierung in den Inkubationsversuchen verwendet wurden.

Tabelle 13 Übersicht der Auswertung durch die BestKeeper®-Software [351] im Rahmen der Housekeepinggenvalidierung mit den jeweiligen c_t -Werten. Angegeben werden für jedes untersuchte Gen die Stichprobenanzahl (n), der geometrische Mittelwert (g. MW), der arithmetische Mittelwert (a. MW), der minimale (min c_t) sowie der maximale (max c_t) threshold cycle, die Standardabweichung (SDV) und der Variationskoeffizient (CV). Keine der Standardabweichungen der acht potentiellen Referenzgene fiel laut Software zu hoch aus. Die drei fett markierten Gene fielen am kleinsten aus und wurden folglich für die Normalisierung verwendet.

	PPIA	RPLP 0	SDHA	HPRT 1	18s RNA	GAPDH	B2M	ACTB
n	20	20	20	20	20	20	20	20
g. MW	15,77	16,37	19,47	20,50	20,37	16,24	18,92	16,41
a. MW	15,78	16,37	19,48	20,50	20,39	16,26	18,93	16,42
min c_t	15,31	15,69	18,75	19,77	19,03	14,87	18,18	15,61
max c_t	16,50	17,67	20,52	21,48	22,02	17,33	20,12	17,52
SDV	0,38	0,40	0,42	0,49	0,75	0,53	0,52	0,50
CV [%]	2,42	2,44	2,15	2,40	3,68	3,26	2,73	3,05

Mit einer paarweisen Korrelationsanalyse lässt sich noch der Zusammenhang der Gene zueinander überprüfen und wird ab einem Wert von 0,75 als stark bewertet (siehe tabellarischer Anhang 5.4.3). Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse in einem Box- und Whiskerplot aufgetragen (siehe Abbildung 53), was die Auswertungsergebnisse auch visuell stützt.

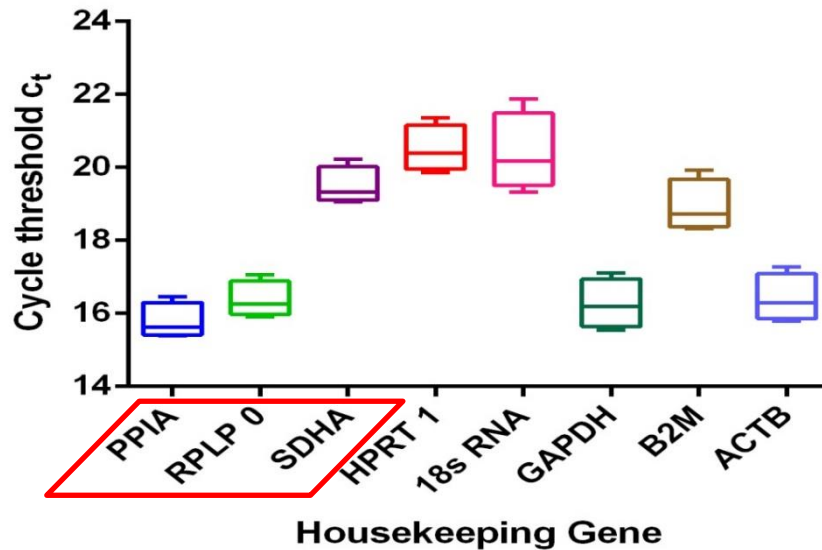


Abbildung 53 Box- und Whisker-Plots der acht getesteten Gene für die Housekeepinggenvalidierung. Aufgetragen ist der cycle threshold (c_t) gegen die Housekeepinggene. Man erkennt die geringste Schwankung in der Expression für die Gene PPIA, RPLP 0 sowie SDHA. Diese wurden als Referenzgene weiterverwendet.

Weiterführend lassen sich relative Expressionsraten von einem Zielgen in einer Probe mittels anderer Softwares berechnen, jedoch muss für jeden Versuch eine Spezifische ausgewählt werden, da sie jeweils anderes leisten können [331]. In der vorliegenden Arbeit geschah das mit der REST[®]-Software. Das Programm basiert auf einem mathematischen Modell, welches zur Berechnung die Reaktionseffizienzen und die c_t -Werte von einem Zielgen im Vergleich zu dem Mittelwert aus mindestens drei Referenzgenen sowohl in der Probe als auch in der Kontrolle einbezieht [352].

5.2 Fragestellung

Den Polyphenolen ist es möglich, in die Pharmakokinetik von Arzneistoffen über eine Interaktion mit Transportproteinen, wie p-Glykoprotein einzugreifen (siehe Allgemeiner Teil 4). Vor allem für Resveratrol konnte schon früher in zahlreichen Studien eine zeit- und konzentrationsabhängige Herunterregulierung der p-GP-Expression dargelegt werden [355-357]. Ebenso war Quercetin fähig die p-GP-Expression zusätzlich zur allgemeinen Funktionalität zu erniedrigen [358]. Auch für Polyphenole aus der Grapefruit, der Mango oder der Schale von Fuchsschwanzhirsenkleie wurde von mehreren Forschungsgruppen Senkung beziehungsweise Inhibition der Expression von p-GP nachgewiesen [70, 359, 360]. Dagegen konnte für pflanzliche Inhaltsstoffe aus Echinacea purpurea eine Induktion der p-GP-Genexpression nachgewiesen werden [361].

Im Licht des Potentials der Polyphenole hinsichtlich der Hoch- beziehungsweise Herunterregulierung des Arzneistofftransporters p-Glykoprotein wurden die in den Transportversuchen verwendeten Polyphenole (siehe Allgemeiner Teil 4.4) näher untersucht. Die Transportversuche sind in der Lage, Aussagen über die aktuelle funktionale Aktivität von p-GP und den diesbezüglichen Einfluss der pflanzlichen Testsubstanzen zu generieren. Additiv hierzu wurde evaluiert, inwieweit ein Eingriff in die Genexpression dieses Transportproteins stattfindet. In Untersuchungen wurden die CaCo-II-Zellen über 2 h, 24h oder 48 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert und die relative Expressionsänderung von p-GP im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf Basis der drei Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA bestimmt.

5.3 Ergebnisse der Genexpressionsversuche für p-GP

Zu jeder Inkubation mit einer Substanz über die jeweiligen Zeiträume wurde nach der Isolation der RNA die Reinheit und die Konzentration bestimmt sowie eine BestKeeper[®]-Analyse für die drei Housekeepinggene zur Überprüfung der Probenqualität durchgeführt (siehe Allgemeiner Teil 7 und Tabellarischer Anhang 6).

5.3.1 Inkubation mit Polyphenolen über zwei Stunden

Die Inkubation über zwei Stunden lieferte einheitliche Ergebnisse (siehe Tabellarischer Anhang 6.1.4). Die meisten der Substanzen waren nach dem ersten Versuch mit n= 9 nicht statistisch signifikant unterschiedlich von der unbehandelten Kontrolle. Die Expression von p-GP nach einer Inkubation mit Taxifolin (1,044), Silibinin (0,889), dem M1 (1,090) oder Dexamethason (0,951) schwankten nicht signifikant um eine relative Expression von 1, was keine Änderung der Genexpression von p-GP in unbehandelten CaCo-II-Zellen verglichen mit den Zellen nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz anzeigt. Ebenso streuten die Urolithine um diesen Wert für die relative Expression. Neben Urolithin A (0,859), Urolithin C (1,184) und Isourolithin A (0,833) war p-GP nach zweistündiger Inkubation mit Urolithin B in einer ersten Untersuchung mit 1,467 noch signifikant hochreguliert. In einem zweiten Experiment war diese Regulierung allerdings nicht mehr signifikant (1,137) (siehe Abbildung 54). Auch nach den Hydnocarpininkubationen lagen die einzelnen Enantiomere um eine relative Expression von 1 und zeigten sowohl Tendenzen einer Hochregulierung von p-GP als auch einer Herunterregulierung. (+)-Hydnocarpin D (0,922) und (-)-Hydnocarpin D (1,280) hatten im ersten Versuch nicht signifikante Werte, dagegen konnte für das racemische Hydnocarpin D zuerst noch eine signifikante Herunterregulierung von p-GP auf 0,643 beobachtet werden, was in einem erneuten Ansatz

als nicht mehr signifikant war und p-GP mit 1,121 sogar tendenziell höher reguliert war. Auch die Kontrolle Verapamil führte in einem ersten Experiment noch zu einer signifikanten Herunterregulierung (0,738), was in einem erneuten Versuch nicht mehr bestätigt werden konnte (1,183).

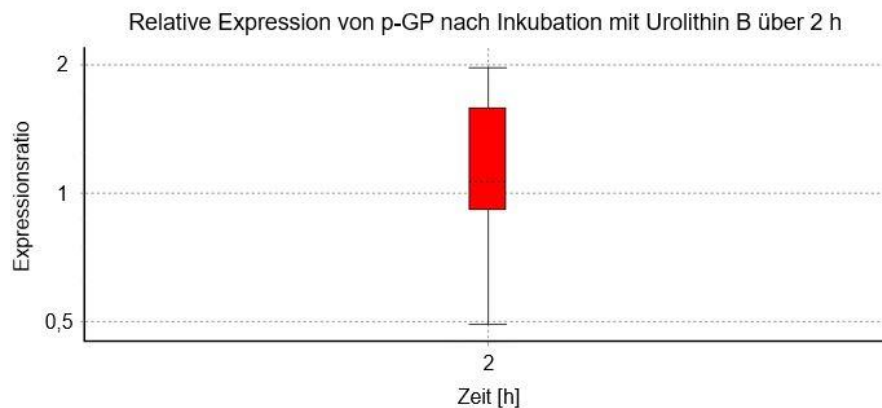


Abbildung 54 Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 μM Urolithin B über 2 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus $n=9$ Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 1,137 (Standardfehler 0,842 - 1,738) und war nicht signifikant unterschiedlich von der unbehandelten Kontrolle ($p=0,342$).

5.3.2 Inkubation mit Polyphenolen über 24 Stunden

Im zweiten der drei Zeiträume konnten in der Genexpression von p-Glykoprotein deutlichere Veränderungen nach den Inkubationen mit den pflanzlichen Stoffen detektiert werden (siehe Tabellarischer Anhang 6.2.4). Die Ergebnisse repräsentieren wiederum eine Stichprobenzahl von jeweils $n=9$. Die beiden Kontrollen für Hemmung und Stimulation von p-GP aus den Transportversuchen, Verapamil und Dexamethason, führten wiederum mit 1,032 (Verapamil) und 1,226 (Dexamethason) zu keiner signifikanten Änderung der Expression. Ebenso hatten Taxifolin (0,921) und Silibinin (0,963) keinen signifikanten Einfluss. Die Urolithine zeigten nach der Inkubation ein großes Potential als p-GP-Expressionsinduktoren. Eine starke signifikante Hochregulierung konnte in insgesamt drei Experimenten für Urolithin A bestätigt werden (2,013, 2,736 und 3,035) (2. Messung, siehe Abbildung 55) und auch für Urolithin B (1,386) sowie Urolithin C (1,776) wurde eine moderate signifikante Hochregulierung in jeweils einer Untersuchung ermittelt. Lediglich mit Isourolithin A (1,163) konnte keine signifikante Hoch- beziehungsweise Herunterregulierung detektiert werden. Für den M1 wurden insgesamt drei unabhängige Untersuchungen durchgeführt, von denen zwei gegenläufig und nicht signifikant waren (1,292 und 0,931) sowie eines mit einer signifikanten Hochregulierung (1,224) beobachtet wurde. Das racemische Hydnocarpin D führte zu einem diffusen Ergebnisbild, sodass der erste von drei Ansätzen eine signifikante Herunterregulierung (0,639) zeigte,

der zweite Versuch eine signifikante Hochregulierung (1,378) und der Dritte keine signifikante Änderung (1,094). Die beiden Enantiomere dieser Substanz führten in jeweils zwei Untersuchungen zu keiner signifikanten Modulierung der Genexpression von p-GP. (-)-Hydnocarpin D zeigte Tendenzen in beide Regulierungsrichtungen (1,188 und 0,500). (+)-Hydnocarpin D zeigte eine Tendenz zur Hochregulierung (1,325 und 9,232), der Effekt war beim zweiten Ansatz allerdings aufgrund seines enormen Standardfehlers von 0,083 bis 5403,4 nicht mehr signifikant.

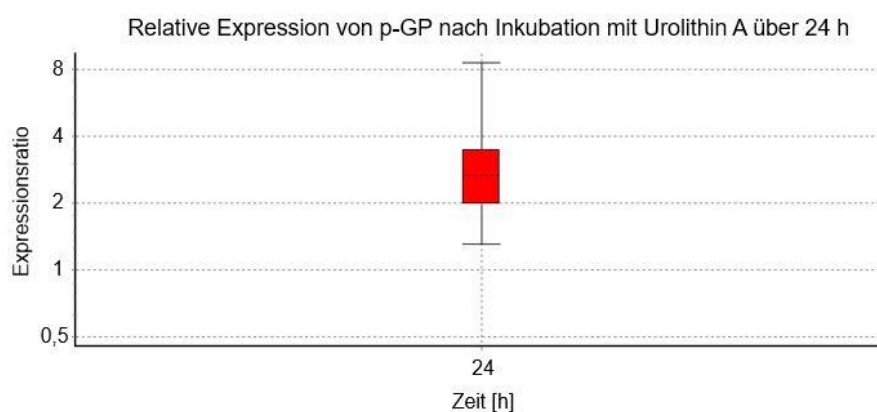


Abbildung 55 Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 μ M Urolithin A über 24 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus $n=9$ Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 2,736 (Standardfehler 1,612 - 4,292) und war signifikant hochreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p=0,0001$).

5.3.3 Inkubation mit Polyphenolen über 48 Stunden

Die Änderung der p-GP-Genexpression fiel über den längsten der drei Zeiträume nach wiederum $n=9$ Versuchen wenig deutlich aus (siehe Tabellarischer Anhang 6.3.4). Die Kontrollen Verapamil (0,779) und Dexamethason (0,909) aus den Transportversuchen konnten ebenso wie Taxifolin (0,856 und 0,969) und Silibinin (0,775 und 1,064) die Expression von p-GP über 48 h nicht signifikant verändern. Auch die Fähigkeit der Hochregulierung der Expression durch die Urolithine war nach einer Inkubation über zwei Tage weniger stark ausgeprägt, als über 24 Stunden. Urolithin A führte nach einer dreifachen Bestimmung (0,802, 0,848 und 0,820) genauso wie Urolithin B (1,081) und Isourolithin A (0,582) nach je einer Untersuchung zu keiner signifikanten Änderung der p-GP-Expression. Nur Urolithin C hatte nach 48 h die Expression signifikant und deutlich hochreguliert (3,824 und 3,057) (1. Messung, siehe Abbildung 56). Ähnlich zum zweiten Zeitraum wurde nach einer Inkubation mit dem M1 in zwei Experimenten keine signifikante Änderung (1,082 und 0,909) sowie nach einer Messung eine signifikante Herunterregulierung (0,580) detektiert. Die beiden Enantiomere von Hydnocarpin D konnten über die Inkubationszeit von 48 h die p-GP-Expression in jeweils zwei Ansätzen

nicht signifikant herauf oder herunter modulieren ((+)-Hydnocarpin D: 1,172 und 0,718; (-)-Hydnocarpin D: 0,923 und 0,657). Das racemische Hydnocarpin D zeigte in drei Untersuchungen immer die Tendenz einer Herunterregulierung von p-GP auf Genexpressionsebene, von denen zwei nicht signifikant (0,738 und 0,776) und die zweite Messung (0,697) signifikant waren.

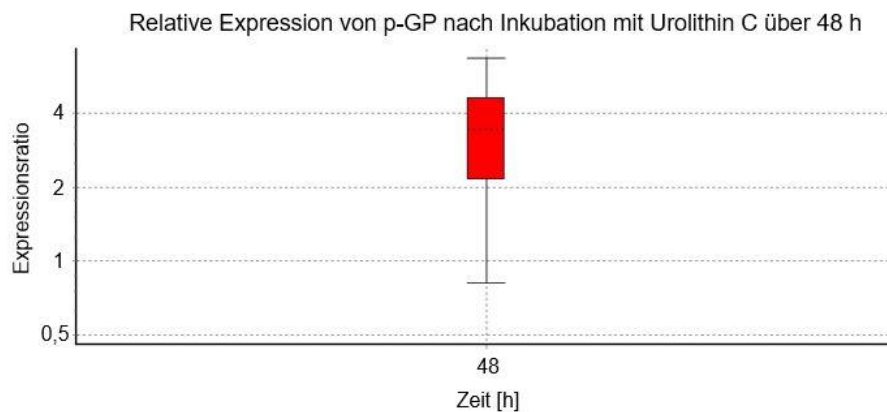


Abbildung 56 Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 μM Urolithin C über 48 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus $n=9$ Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 3,824 (Standardfehler 2,875 - 5,005) und war signifikant hochreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p=0,0001$).

5.4 Diskussion

Neben einem direkten Einfluss der pflanzlichen Testsubstanzen auf den p-GP-vermittelten Transport am Transportprotein selbst ließen sich in weiterführenden eigenen Untersuchungen diverse Einflüsse auf die p-GP-Genexpression durch die eingesetzten Stoffe detektieren. Auf Basis ihrer einzigartigen chemischen Diversität, entfalten sekundäre Pflanzenstoffe ein breites Feld an biologischen Aktivitäten, was sie zu vielversprechenden und innovativen Alternativen für die Beeinflussung einer Therapieresistenz via p-GP werden ließ [86]. Von den Naturprodukten zählen Flavonoide und Terpenoide zu den am häufigsten untersuchten Klassen und vor allem für die Flavonoide wurden bereits mehrere Wirkmechanismen am Transportprotein, wie eine Blockade der Arzneibindestelle, eine Interferenz mit der ATP Hydrolyse oder eine Modulierung der p-GP-Expression beschrieben [86]. Für Schisandrin B konnte beispielsweise eine konzentrationsabhängige Inhibition der Expression von p-GP belegt werden [362] und auch für die Polyphenole aus der Maulbeere ist eine Wirkung auf die Genexpression dieses Transportproteins beschrieben [363].

Für eine potentielle Erweiterung dieses Portfolios an pflanzlichen Expressionsmodulatoren wurden die Substanzen in den eigenen Untersuchungen hinsichtlich dieser Eigenschaft näher untersucht. Daher wurden insgesamt drei verschiedene Inkubationszeiten mit 2 h, 24 h und 48 h angesetzt, um eine mögliche zeitliche Abhängigkeit der Wirkung evaluieren zu können. Aufgrund erhöhter Zytotoxizitäten aller Substanzen nach 48 h sind die über diesen Zeitraum erhaltenen Resultate allerdings kritisch auf ihre Validität zu hinterfragen.

Über den kürzesten Zeitraum von zwei Stunden ließen sich aus den eigenen Versuchen keine klaren Effekte der Substanzen ableiten. Lediglich für Urolithin B (Hochregulierung), das racemische Hydnocarpin D (Herunterregulierung) und Verapamil (Herunterregulierung) wurden in einem ersten Ansatz signifikante Auswirkungen auf die p-GP-Expression beobachtet, welche sich jedoch in einem weiteren Experiment nicht mehr bestätigen ließen. Somit ist davon auszugehen, dass der signifikante Zusammenhang eher zufälliger Natur war. In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Expressionsänderung nach Substanzinkubation auf der Stufe der mRNA untersucht. Änderungen in diesem Bereich hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab. So ist von Relevanz in welcher Geschwindigkeit und über welchen Weg, zum Beispiel Diffusion oder aktiven Transport, die Substanz aufgenommen wird und in den Zellkern gelangt, wie groß das Gen ist und wie umfangreich die Prozessierung der mRNA ist. Allgemein ist von einer Diffusion in der Zelle von circa zehn Sekunden für 10 µm, einer Transkriptionsrate von 10 Minuten für ein Gen mit einer Größe von 10 kbp und einer Splicingzeit von unter 20 Minuten auszugehen [364]. Auf Basis dieser Zeitangaben war der ausgesuchte erste Versuchszeitraum von 2 h sinnvoll gewählt, war jedoch im Angesicht inkonsistenter Resultate für p-Glykoprotein nicht ausreichend, um eine klare Änderung zu detektieren. Diese Expressionsänderung kann unter Umständen schon sehr früh sichtbar werden und weitere Studien haben im Bereich von zwei Stunden schon Veränderungen für p-GP nach einer Inkubation mit natürlichem phosphoryliertem Inositol als Testsubstanz feststellen können [365]. Für die Detektion eines möglichen Einflusses auf die Proteinbildung von p-GP wurden auch in anderen Publikationen längere Zeiträume von mindestens 24 h untersucht [361, 366], weswegen in der eigenen Arbeit ebenfalls auch längere Zeiträume betrachtet wurden.

Für eine vollständige Abbildung der möglichen Effekte wurden die beiden Kontrollen für direkte Inhibition und Induktion des p-GP-vermittelten Transportes, Verapamil und Dexamethason, ebenso auf eine Wirkung auf die p-GP-Genexpression hin untersucht. Allerdings konnten weder nach 24 h noch nach 48 h mit einer Konzentration von jeweils 50 µM in den eigenen Untersuchungen signifikante Veränderungen der Expression von p-GP beobachtet werden. Ein Vergleich mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen liefert hierzu ein eher konträres Bild. In Versuchen über eine Inkubationszeit von vier Tagen mit HK-2-Nierenzellen konnte mit 10 µM Verapamil die Expression an p-GP und seine mRNA nicht gesteigert werden, jedoch führten 1 µM Dexamethason zu einer moderaten

Steigerung des p-GP-Levels und der mRNA dieses Proteins um circa 14 % [367]. Mittels Dexamethason wurde auch in einer anderen Zelllinie des humanen Intestines, LS180, ein schwacher Effekt über eine 1,5-fache Erhöhung der Expression nach 72 Stunden diskutiert [59]. In einer weiteren Studie konnte nach 48-stündiger Inkubation mit LS 180 die p-GP-Expression durch 50 μ M Dexamethason um das 1,72-fache gesteigert werden [284]. Da diese Zelllinie eine vergleichbare p-GP-Expression wie CaCo-II-Zellen zeigt [368] und im Versuch gleiche Zeit- und Konzentrationsmuster wie in den eigenen Untersuchungen verwendet wurden, stehen diese Erkenntnisse im Widerspruch zu den selbst erhaltenen Ergebnissen bezüglich Dexamethason, ohne dass eine Erklärung dafür angeboten werden kann. In Tierversuchen konnten für diese Substanz speziesabhängig konträre Effekte nachgewiesen werden. In Tests mit männlichen Ratten, denen Dexamethason über drei Tage in einer Dosis von 100 mg/kg/Tag verabreicht wurde, konnte eine fünffache Steigerung der p-GP-Expression in der Leber festgestellt [369] und eine Zeit- sowie Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes gezeigt werden [157]. Dagegen war Dexamethason in Untersuchungen an Schafen nicht in der Lage, die relative Expression von p-GP im Intestin signifikant zu steigern, sondern senkte sie tendenziell eher [285]. Eine Korrelation der Daten aus Tierversuchsmodellen mit in vitro Zelluntersuchungen gestaltet sich prinzipiell als eher schwierig und liefert allenfalls Tendenzen.

Die Inkubation der CaCo-II-Zellen mit 50 μ M an pflanzlicher Testsubstanz über ein oder zwei Tage hatte in den eigenen Versuchen Effekte auf die Expression von p-GP, jedoch konnte nicht jede Substanz eine Wirkung ausüben. Sowohl Taxifolin als auch Silibinin zeigten nach einer Inkubation nach 24 h und 48 h keinerlei Einflüsse auf die p-GP-Expression. In anderen Forschungsgruppen konnte durch eine Inkubation von CaCo-II-Zellen über 36 h mit 100 μ M Taxifolin die Expression des p-Glykoproteins im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant um 50 % gesteigert werden [174] oder durch eine Taxifolininkubation mit 10 μ M über insgesamt vier Wochen das Proteinlevel von p-GP sogar nahezu verdoppelt werden [82]. Diese Erkenntnisse aus der Literatur stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen aus den eigenen Untersuchungen, lassen sich allerdings durch die höhere eingesetzte Taxifolinkonzentration oder die längeren Versuchszeiträume erklären. *Wang et al.* belegten für ihre Studie eine unbedenkliche Zytotoxizität von 100 μ M Taxifolin über 48 h, was zusätzlich gegensätzlich zu den eigenen Experimenten hinsichtlich dieser Substanzcharakteristik war (siehe Allgemeiner Teil 1.1) [174]. Die Versuchszeit sowie die Konzentration der selbst durchgeführten Experimente war demnach scheinbar nicht ausreichend, um eine modulierende Eigenschaft von Taxifolin auf die Genexpression von p-GP zu detektieren. Auch muss die mangelnde Stabilität von Taxifolin nach 24 h kritisch im Hinblick auf die Resultate angemerkt werden (siehe Allgemeiner Teil 1.2). In KB-vin Zellen konnte in einer anderen Studie dosisabhängig die ABCB1 Expression nach Taxifolininkubation über 72 Stunden dagegen herunterreguliert werden [261], was wiederum einen deutlich größeren Zeitraum

als in den eigenen Ansätzen darstellt und andere Zelleigenschaften im Hinblick auf die Genexpression ebenso in Betracht gezogen werden müssen. Für Silibinin konnte aus der Literatur ein ähnliches widersprüchliches Bild erhalten werden, wenn auch hier vor allem der deutliche Unterschied in den Versuchszeiträumen der Publikationen zu den eigenen Versuchen als Begründung angeführt werden muss. So konnte durch eine Inkubation mit 10 µg/mL Silibinin über 15 Tage eine Erhöhung der MDR1-Expression gegenüber einer Kontrolle um das Dreifache herbeigeführt werden [286]. Eine andere Arbeitsgruppe erhielt nach zehn Tagen Inkubation mit Silibinin eine signifikante Steigerung der mRNA Expression um mehr als das 2,5 fache [57], was zeitlich deutlich über den Zeiträumen in den eigenen Versuchen lag. Lediglich das Silybin B konnte in einer Konzentration von 10 µM nach 48 h die Expression von p-GP signifikant um 79 % senken [370]. Dies lag im zeitlichen Rahmen der eigenen Versuche, jedoch betrug die Konzentration nur 20 % der selbst gewählten Konzentration und auch die Stereochemie des Silibininmoleküls variierte zu den eigenen Versuchen. Somit ließen sich für Taxifolin und Silibinin zwar zu den eigenen Erkenntnissen widersprüchliche Resultate in der Literatur finden, jedoch sind diese aufgrund mehrerer Unterschiede in den Versuchsbedingungen nur begrenzt vergleichbar.

Für den Catechinmetaboliten M1 konnten in eigenen Untersuchungen über 24 h und 48 h in jeweils insgesamt drei Ansätzen lediglich Tendenzen sowohl einer Hochregulierung (24 h) als auch einer Herunterregulierung (48 h) der p-GP-Expression erkannt, allerdings nicht statistisch bestätigt werden. Für diesen Metaboliten konnten keine Vergleichsdaten in der Literatur gefunden werden. Für die Gruppe der Catechine wurden jedoch Daten publiziert. So waren bestimmte Catechine aus grünem Tee, wie Epicatechin oder Epigallocatechin in einer Konzentration von 50 µM, in der Lage, die p-GP-Expression herunter zu regulieren [289, 371]. Bereits vorher nahm eine andere Studie eine Suppression der MDR1-Expression für Epicatechin und Epigallocatechin an [372]. Dagegen kamen andere Publikationen zu dem Schluss, dass Epigallocatechin die p-GP-Expression erhöhen konnte [373]. In der Literatur finden sich demnach Informationen zu einem eher heterogenen Einfluss dieser Substanzfamilie auf p-Glykoprotein im Hinblick auf dessen Genexpression. Nach dem Metabolismus, aus dem der M1 hervorgeht, ist somit fraglich inwieweit noch wirkungsrelevante Strukturmerkmale zur Beeinflussung der Genexpression von p-GP vorhanden sind. Zudem sind die Ergebnisse zum M1 auf Basis seiner ungenügenden Stabilität über einen Zeitraum von 24 h (siehe Allgemeiner Teil 1.2) kritisch zu hinterfragen.

Obwohl angenommen wird, dass etwa die Hälfte aller therapeutisch eingesetzten Substanzen chiralen Charakter besitzen, ist nur wenig über die stereoselektive Pharmodynamik in Verbindung mit Arzneistofftransportern bekannt [374]. Für manche Enantiomere, wie beispielsweise R- und S-Cetirizin, konnten mehrere regulatorische

Effekte auf die Genexpression von p-GP ermittelt werden [375]. 100 μ M des R-Enantiomeres konnten nach 24 Stunden das mRNA-Level von MDR1 um 47 % erhöhen, wohingegen das S-Enantiomere dieses um 28 % erniedrigen konnte [375]. An anderer Stelle konnte vorab eine Inhibition beziehungsweise eine Induktion des Transportproteines vom S-Enantiomer und dem R-Enantiomer aufgezeigt werden [376]. Tamsulosin konnte über die beiden Enantiomere sowie das Racemat eine unterschiedlich ausgeprägte und konzentrationsabhängige Induktion der ABCB1 mRNA erzeugen [290]. Diese beiden Arzneistoffbeispiele legen einen großen Einfluss der Stereochemie auf die Regulation von Transportproteinen nahe, die auch gegensätzlich ausgeprägt sein kann. Im Licht dieser Erkenntnisse wurden über die Versuchszeiträume von 24 h und 48 h das racemische Hydnocarpin D und seine beiden Enantiomere in eigenen Untersuchungen näher betrachtet. Für sowohl (+)-Hydnocarpin D als auch (-)-Hydnocarpin D konnten lediglich Tendenzen in Richtung einer Hoch- sowie einer Herunterregulierung ausgemacht werden, die sich allerdings in insgesamt zwei Ansätzen nicht bekräftigen ließen. Für das racemische Hydnocarpin D konnten in drei Messungen für jeden Zeitraum andere Werte erhalten werden. So bewirkte diese Substanz über 24 h einmal eine signifikante Hoch- und eine signifikante Herunterregulierung, welche auch über 48 h einmalig nachgewiesen werden konnte. Es ließ sich keine klare Tendenz dieses Substanzverhaltens dokumentieren, sodass von einem nicht signifikanten Effekt ausgegangen werden muss. Eine Bestätigung beziehungsweise kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse war aufgrund mangelnder Belege aus der Literatur zu diesen Substanzen nicht möglich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die erhaltenen Erkenntnisse zu den Hydnocarpinen aus den eigenen Versuchen neu sind. Einschränkend muss jedoch auf die nicht näher untersuchten zytotoxischen Einflüsse über den Versuchszeitraum durch die Hydnocarpine hingewiesen werden (siehe Allgemeiner Teil 1.2).

Ähnlich zu den Transportversuchen (siehe Allgemeiner Teil 4.7) erwiesen sich auch die Urolithine in den eigenen Genexpressionversuchen zu p-GP als die potentesten Induktoren dieses Transportproteins. Über beide Zeiträume von 24 h und 48 h waren sie in der Lage, in individuell unterschiedlichem Ausmaß die Expression von p-GP hoch zu regulieren. Diese Fähigkeit wurde im Anschluss noch einmal in Transportversuchen überprüft (siehe Allgemeiner Teil 4.7.3) und konnte weitestgehend bestätigt werden. Lediglich Isourolithin A zeigte über beide Zeiträume keinerlei Einfluss auf die p-GP-Expression, was im Widerspruch zu den Erkenntnissen aus den Transportversuchen steht. Allerdings wurde dieser Stoff aus Substanzmangel nur gegen zwei statt drei Housekeepinggene getestet, was eventuell einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte. Über 24 h führten die drei anderen Urolithine A, B und C jeweils zu einer signifikanten zwei- bis dreifachen Hochregulierung der Genexpression von p-GP, wobei Urolithin A das potenteste Urolithin war. Nach 48 h zeigten Urolithin A und B allerdings keinen statistisch signifikanten Einfluss mehr auf die Expression und nur Urolithin C konnte sein Potential der Hochregulierung der

p-GP-Expression im Vergleich zum 24 h-Zeitraum noch einmal steigern. Diese Tendenzen zur Verstärkung von p-GP-vermittelten Transportmechanismen der drei Urolithine spiegeln sich auch in den Transportversuchen wider (siehe Allgemeiner Teil 4.7.3). Für die Urolithine ist schon in mehreren Studien eine positive Wirkung auf mehrere Transportproteine dargelegt worden [178, 308, 310, 377]. Allerdings beschränkten sich diese Untersuchungen eher auf die Aussage zu einem generellen Einfluss der Urolithine auf diese Transporter und das Hauptaugenmerk lag nicht auf der Genexpression, weswegen die erhaltenen Ergebnisse aus den eigenen Versuchen erstmalig einen Einfluss der Urolithine auf die Genexpression von p-GP beschreiben. Darüber hinaus ist ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Analysen anderer Forschungsgruppen hinsichtlich des Einflusses auf p-GP nicht möglich, da die Datenlage zu diesem Zusammenhang sehr ungenügend ist und weitere Untersuchungen nötig wären, um den genauen Effekt der Urolithine auf die Genexpression von p-GP umfassend zu beurteilen.

Zusammenfassend ließ sich in der Reihe der pflanzlichen Testsubstanzen insbesondere für die Urolithine ein großes Potential für eine signifikante Hochregulierung der p-GP-Expression in eigenen Versuchen feststellen. Somit könnten diese Stoffe den Resistenzmechanismus via p-GP in der Arzneimitteltherapie verstärken. Bei den Urolithinen handelt es sich um Metabolite der Ellagsäure, welche im unterschiedlichen Ausmaß vom intestinalen Mikrobiom gebildet werden. Aus den eigenen Resultaten zu diesen Pflanzenstoffen lässt sich nun die Notwendigkeit ableiten, im Falle einer Therapie mit p-GP-Substraten für jeden Patienten die Ernährung sowie den Einsatz von Nahrungsergänzungsmitteln im Auge zu behalten, um einen möglichen negativen Einfluss auf die orale Therapie vorbeugen zu können. Auf der anderen Seite können diese Substanzen dazu beitragen, über eine Verstärkung des Schutzmechanismus gegen Xenobiotika oder Toxine via p-GP den Organismus im Falle einer Schädigung des Verdauungstraktes im Krankheitsfall vor schädlichen äußeren Einflüssen schützen zu können.

C Experimenteller Teil

1 Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

1.1 Häufig verwendete Reagenzien

Silibinin (Art.-Nr. S0417-10G, Reinheit \geq 98 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Taxifolin (Art.-Nr. T4512-100MG, Reinheit \geq 90 %)	
Urolithin A (Art.-Nr. SML1791-25MG, Reinheit \geq 97 %)	
Urolithin B (Art.-Nr. 05V000001-250MG)	
Gallensäuren (Art.-Nr. 48305-50G-F)	
Dexamethason (Art.-Nr. D4902-25MG, Reinheit \geq 97 %)	
Dimethylsulfoxid (Art.-Nr. D4540-100ML, Reinheit \geq 99,5 %)	
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	
Penicillin-Streptomycin	
Phosphate Buffered Saline	
Trypsin/EDTA 0,25 %	
Lucifer Yellow CH (Art.-Nr. L0259-25MG)	
Rhodamin 123 (Art.-Nr. R8004-25MG)	
Ciprofloxacin (Art.-Nr. 33434-100MG-R)	
Hank`s Balanced Salts	
Agarose (Art.-Nr. A0169-25G)	
RNase Away Lösung	
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Düren

High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Basel, Schweiz
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	
PCR-Wasser	
Individuell synthetisierte Primer	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg
iTaq Universal Sybr Green Supermix	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Fetales Bovines Serum	Biochrom GmbH, Berlin
Nicht-Essentielle Aminosäuren	
Urolithin C (Art.-Nr. K847015)	TRC Inc., Toronto, Kanada
Isourolithin A (Art.-Nr. I917520)	
δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (=M1)	AK Holzgrabe, Universität Würzburg
Hydnocarpin - Racemat D	AK Decker, Universität Würzburg
(+)-Hydnocarpin D	
(-)-Hydnocarpin D	
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	Chemikalienausgabe, Universität Würzburg
Natriumhydroxid-Plätzchen	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
Natriumhydrogencarbonat	
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure	
Borsäure	
Verapamil-hydrochlorid	
Millipore-Wasser	

1.2 Häufig verwendete Geräte und Materialien

Laborwaage, AT 21 Comporator Feinwaage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipettierhilfe, accu-jet pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Vortex 2 Genie	VWR, Ismaning
Sicherheitswerkbank, Herasafe KS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator, Heracell 240i	
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	
Nalgene Rapid Flow Flaschenfilter, 0,4 µm	
96-Well-Platte zur Fluoreszenzmessung	
Schüttler, UNIMAX 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Gefrierschrank -20 °C, Profi line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Zentrifuge, Microfuge 22R	Beckman – Coulter, Krefeld
Laborwaage, Kern 440-35 N	A. Hartenstein, Würzburg
Neubauer Zählkammer	
Mikroskop Eclipse TS100 + Lampe ELWD 0,3 T1-SNCO	Nikon, Düsseldorf
Lumineszenz Spektrometer, LS 50 B	Perkin Elmer, Waltham, USA
Vakuumpumpsystem, PC 2004 Vario	Vacuubrand GmbH+Co KG, Wertheim
EVOM ² Epithelial Voltohmmeter	WPI Germany, Friedberg
Chopstick Electrode Set Adj	
RNA Messgerät, Infinite F200 (+Laptop)	Tecan, Männedorf, Schweiz (+Acer, Neu-Taipeh, Taiwan)
Mx 3005P qPCR System mit MXPro Software	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Elektrophoresegerät, Model 3000 Xi Computer Controlled Electrophoresis Power Supply	BioRad, Hercules, USA
Elektrophoresekammer, 40-0708	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gel-Dokumentations-System, Gene Flash	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Video Graphic Printer	Sony, Tokio, Japan

Mikroliterpipetten, Eppendorf Research® plus 1 – 20 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Multikanalpipette, Eppendorf Research®, 10 – 100 µL	
Cellstar 12-Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Leipzig
Thincert TC-Einsätze 12-Well, 0,4 µm, transparent	
Serologische Pipetten 10 mL und 25 mL, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips 1 – 20 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1250 µL	
Pipettenspitzen 20 µL (farblos), 200 µL (gelb), 1000 µL (blau)	
Reagiergefäße 1,5 mL Protein LB	
8er-Kette optisch klar fl. Deckel	
96-Well-PCR-Platte, randlos	
Schraubröhre 15 mL und 50 mL, steril	
Reagiergefäße 1,5 mL und 2,0 mL	
Mikroschraubröhre, 2 mL	
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , mit Filterdeckel	
Mikrotiterplatten 96-Well, steril	

2 Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur

2.1 Untersuchung der Zytotoxizität der Substanzen mittels Neutralrotassay

2.1.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

2.1.1.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien

Neutralrot	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
0,1 N Salzsäure	VWR, Ismaning
Zink(II)-chlorid	Chemikalienausgabe, Universität Würzburg
1 N Natronlauge	
Ethanol 96 %	
Eisessig	

2.1.1.2 Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien

pH – Messgerät mit Elektrode, inoLab pH 720	WTW series, Weilheim
Magnetrührer, Electronicrührer Mono	Variomag, Daytona Beach, USA
Plattenlesegerät, SpectraMax 250	Tecan Group, Männedorf, Schweiz

2.1.2 Zytotoxizitäts-Testung mit Neutralrot

Der Zytotoxizitätstest mit dem Phenazinfarbstoff Neutralrot (siehe Abbildung 57) stellt im Vergleich zu anderen Tests eine sehr sensible Methode dar, um zelltoxische Vorgänge zu detektieren [153]. Bei Inkubation mit diesem Farbstoff penetriert dieser über die Zellmembran und reichert sich in seiner protonierten Form in den sauren Zellkompartimenten an, wodurch sich die Integrität der Membranen prüfen lässt. Die Experimente wurden nach der Vorlage von *Repetto et al.* [154] durchgeführt und mit einigen im Folgenden beschriebenen Änderungen versehen.

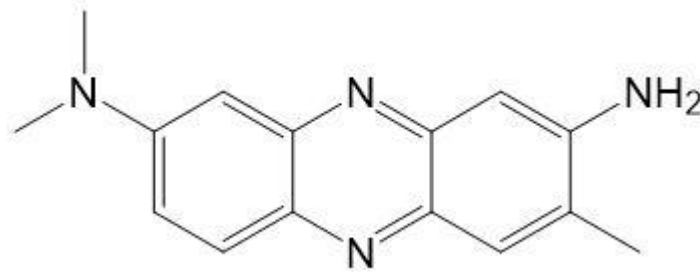


Abbildung 57 Strukturformel von Neutralrot.

Zunächst wurden die Caco-II-Zellen aus den Zellkulturflaschen wie unter 4.2.3 beschrieben trypsinisiert und 200 μL der Zellsuspension in einem speziellen Zellkulturmedium (siehe 4.2.1) mit einer Konzentration von 100.000 Zellen/mL in die inneren 60 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Diese Konzentration wurde gewählt, damit die Zellen binnen eines Tages möglichst dicht wachsen konnten. Die äußeren 36 Wells wurden mit 200 μL Phosphate Buffered Saline (PBS) versehen, um sogenannte Randeffekte zu vermeiden. Hierbei handelt es sich um ein vermindertes Zellwachstum in der Peripherie der Platte [154]. Die Platte wurde nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt im Brutschrank inkubiert. Eine Neutralrot-Stammlösung wurde hergestellt, indem 40 mg Neutralrot in 10 mL PBS gelöst wurden. Am nächsten Tag wurde für das jeweilige Polyphenol eine substanzspezifische Konzentrationsreihe aus acht verschiedenen Konzentrationen in einer zweiten 96-Well-Platte hergestellt. Hierfür wurde die Substanz in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler gelöst und schließlich mit Treatment Medium (=TM) auf das entsprechende Gesamtvolumen ergänzt. In jeder Stammlösung waren letztendlich maximal 1 % DMSO enthalten. Als Positivkontrolle diente eine 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZnCl_2 -Lösung. Das TM wurde vorab durch Zusatz von 1 % fetalem bovinem Serum (FBS), 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (PEST) und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) hergestellt. Nun wurde das Medium aus der Platte mit den Zellen vom Vortag dekantiert, die äußeren Wells mit 200 μL TM und die inneren Wells mit je 200 μL aus der Polyphenolkonzentrationsreihe versehen. Die Platte wurde 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert, ebenso wie eine Neutralrot-Arbeitslösung, bei der die Stammlösung 1:100 in TM verdünnt wurde. Die Arbeitslösung verweilte über den gleichen Zeitraum im Inkubator, damit Farbstoffpräzipitate ausfallen und sie die exakt gleiche Temperatur wie die Zellen hatte. Stellte sich nach der Auswertung eine der Substanzen in der Konzentration aus den Transportversuchen als zytotoxisch heraus, wurde der Neutralrotversuch über einen kürzeren Zeitraum, beispielsweise vier Stunden, für diesen Stoff wiederholt, um zu evaluieren, ob er unbedenklich in den Versuchen eingesetzt werden konnte. Für die Genexpressionsversuche wurde zusätzlich noch jeder Stoff auf seine Zytotoxizität nach 48 h hin untersucht und auch die Zugabe von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gallensäuren und ein pH-Wert von 6 getestet.

Am dritten Tag galt es zunächst die Extraktionslösung für das Neutralrotreagenz, bestehend aus 10 mL Milliporewasser, 10 mL Ethanol 96 % und 0,2 mL Eisessig frisch herzustellen, und die Neutralrot-Arbeitslösung für 15 min bei 10.000 rpm zu zentrifugieren, um Farbstoffpräzipitate abzutrennen. Das Medium wurde vollständig aus der 96-Well-Platte dekantiert und in jedes Well 100 μ L der Neutralrot-Arbeitslösung pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde diese Lösung ebenso wieder aus der Platte abgeschüttet. Nach einem Waschschrift mit 150 μ L auf 37 °C vorgewärmtem PBS in jedem Well wurde die Extraktionslösung in einem Volumen von 150 μ L pro Well hinzugegeben. Nach intensivem Schütteln auf dem Unimax 1010 für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wurde die Platte bei 540 nm vermessen. Die anschließende Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism: neben der Erstellung von IC₅₀-Kurven für jedes Polyphenol wurde zur statistischen Auswertung eine repeated-measures ANOVA und ein zusätzlicher Tukey-Posthoc-Test durchgeführt.

2.2 Untersuchung der Stabilität verwendeter Substanzen in Zellkultur- und Versuchsmedien

2.2.1 Verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

2.2.1.1 Reagenzien

Acetonitril	VWR, Ismaning
0,1 N Salzsäurelösung	

2.2.1.2 Geräte und Materialien

LCMS-2020 single quadrupole LC-MS LC20AB System DGU-20A3R controller SPD-20A UV/Vis Detector	Shimadzu, Kyoto, Japan
Synergi 4 U fusion RP18 (150x4.6 mm) Säule	Phenomenex, Torrance, USA
pH – Messgerät mit Elektrode, inoLab pH 720	WTW series, Weilheim
Magnetrührer, Electronicrührer Mono	Variomag, Daytona Beach, USA

2.2.2 Stabilität in Zellkulturmedium

Die Polyphenole und Flavonoide allgemein gelten über einen längeren Zeitraum in Bezug auf potentielle Oxidation und andere Abbauvorgänge als nicht sehr stabil (siehe Allgemeiner Teil 1.2). Für die weiterführenden Versuche war es jedoch essentiell zu

evaluieren, ob die Substanzen im angestrebten Versuchszeitraum eine hinreichende Stabilität für valide Ergebnisse aufweisen. Angelehnt waren die Versuche an die Vorlage von *Sawatzky et al.* [378].

Hierfür wurde mit 50 µM für jede Substanz die gleiche Konzentration wie in den Transportversuchen gewählt (vergleiche 5.2.1). Zunächst wurde in einer 15 mL Schraubröhre eine Stammlösung in Dulbecco's modified Eagle Medium mit Penicillin-Streptomycin (DMEM-PEST) unter der Verwendung von DMSO als Lösungsvermittler für jedes Polyphenol hergestellt und diese anschließend entsprechend verdünnt, um auf die angestrebte Konzentration zu kommen. Nach dem Verdünnungsschritt lag die Konzentration für DMSO bei maximal 1 %. Die Schraubröhren wurden nun im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Schütteln bei 120 rpm für bis zu 48 h inkubiert. Die Zeitpunkte für die Probenentnahme wurden nach dem Gesichtspunkt der möglichen Instabilität gewählt. Um einen frühzeitigen Abbau zu detektieren, wurden am Anfang sehr engmaschig und gegen Ende in immer größeren Zeitabständen Proben gezogen. Festgelegt wurden daher die Zeitpunkte 0, 15, 30 und 60 min sowie 2, 4, 6, 8, 24 und 48 h. Es wurden jeweils 500 µL entnommen und in ein 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Umgehend wurden 500 µL an eiskaltem Acetonitril dazugegeben und anschließend die Proben für 10 min bei 4 °C und 6100 g zentrifugiert, um die enthaltenen Proteine auszufällen. Ebenso wurde ein Blank aus reinem Medium behandelt, um den Substanzpeak besser identifizieren zu können. Es wurde jeweils der Überstand im Reagiergefäß nach der Zentrifugation direkt mit der LC-MS (ESI positiv, 300 - 800 m/z) vermessen. Injiziert wurden jeweils 100 µL und bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde folgender Gradient aus Methanol (Phase A) und Wasser (Phase B) mit je 0,01 % TFA gefahren: 0 - 8 min (10 - 80 % Phase A), 8 - 14 min (80 % Phase A), 14 - 14,3 min (80 - 90 % Phase A), 14,3 - 17 min (90 % Phase A), 17 - 17,3 min (90 - 10 % Phase A) und 17,3 - 18 min (10 % Phase A). Als Säule wurde eine RP18 Säule verwendet. Für die Auswertung wurde für jeden Zeitpunkt die Flächen der Peaks miteinander verglichen und die Probe zum Zeitpunkt 0 min als Kontrolle angenommen. Alle weiteren Messungen wurden auf diese bezogen, um die prozentuale Abnahme zu ermitteln.

Das Ergebnis dieser Stabilitätsuntersuchungen in DMEM-PEST war Grundlage für die Versuche zur Zytotoxizität, den Transportversuchen und der Untersuchung des Einflusses der Polyphenole auf die Genexpression.

2.2.3 Stabilität in Versuchsmedium

In sämtlichen Transportversuchen war Hank's balanced salt solution (HBSS) das eingesetzte Trägermedium. Dementsprechend mussten zusätzliche Stabilitäts-

untersuchungen mit diesem Medium durchgeführt werden. Hierbei erfolgte die Durchführung wie unter 2.2.2 beschrieben.

Ein weiteres Ziel stellte die Simulation physiologischer Bedingungen in den Versuchen dar, daher wurde neben der Stabilität in HBSS auch die Stabilität in HBSS mit Zusatz von 100 µg/mL Gallensäuren (siehe Allgemeiner Teil 4.3) und bei pH 6 gemessen.

3 Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole mittels FRAP-Assay

3.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

3.1.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien

2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin (= TPTZ) (Art.-Nr. 93285-1G, Reinheit \geq 99 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (= Trolox) (Art.-Nr. 23.881-3, Reinheit 97 %)	
Natriumacetat trihydrat	Chemikalienausgabe, Universität Würzburg
konzentrierte Essigsäure	
konzentrierte Salzsäure	
Eisen-III-chlorid-hexahydrat	
Eisen-II-sulfat	
Ascorbinsäure	
Methanol	

3.1.2 Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien

Einwegreservoirs	VWR, Ismaning
Plattenlesegerät, SpectraMax 250	Tecan Group, Männedorf, Schweiz

3.2 Durchführung des FRAP-Assays

Für den Versuch wurde das ferric reducing antioxidant power (FRAP)-Reagenz frisch hergestellt. Dieses setzte sich zusammen aus zehn Teilen eines 300 mM Natriumacetatpuffers, bestehend aus 3,1 g Natriumacetat trihydrat und 16 ml Essigsäure pro Liter Milliporewasser, einem Teil einer 10 mM TPTZ-Lösung in 40 mM Salzsäure und einem Teil einer 20 mM Eisen-III-chlorid-hexahydratlösung in Milliporewasser. Das Gesamtvolumen des FRAP-Reagenzes richtete sich nach der Gesamtzahl der zu vermessenden Proben.

Für die Substanzen wurden für entweder 10 mM – oder 1 mM – Stammlösungen eingewogen, je nachdem wieviel Substanz vorhanden war oder sich das

Löslichkeitsverhalten darstellte, und anschließend entsprechend verdünnt. Lösungsmittel für die Substanzen war Methanol, bei den Polyphenolen musste noch 10 % DMSO als Lösungsvermittler zugesetzt werden. Als Verdünnungsreihen wurden für Eisen-II-sulfat, Ascorbinsäure, Trolox und die Polyphenole jeweils mehrere Konzentrationsreihen von 1 mM bis 0,1 mM angefertigt.

Vor den Messungen wurde das FRAP-Reagenz im Thermomixer auf 37 °C erwärmt und das Plattenlesegerät auf diese Temperatur eingestellt. Reihe A der 96-Well-Platte wurde für den Blank aus FRAP-Reagenz, Methanol und DMSO, sofern dies auch zur Lösungsvermittlung zugesetzt wurde, benutzt. Die Konzentrationsreihen der Substanzen mit insgesamt sechs verschiedenen Konzentrationen, 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 mM (n= 5) befanden sich in den Reihen B bis G. Zu jedem Well wurden zuerst 220,6 µl FRAP-Reagenz pipettiert und je 22 µl Milliporewasser dazugegeben. Da die Reduktion sofort mit Zugabe der Testlösungen einsetzt, wurden 7,4 µl schnell mit einer Multikanalpipette zu pipettiert und sofort die Messung im Plattenlesegerät gestartet. Die Endverdünnung für die Substanzen lag somit bei 1/34, was man bei der abschließenden Auswertung zu berücksichtigen hatte. Alle 15 Sekunden über einen Zeitraum von insgesamt vier Minuten wurden die Absorptionen bei 593 nm gemessen.

3.3 Auswertung des FRAP-Assays

Von allen erhaltenen Absorptionen der Substanzen wurde der Blankwert abgezogen. Für die Auswertung galt es die Verdünnung der Testlösung während den Pipettierschritten mit einzurechnen. So ergab sich für jede Konzentrationsreihe für die jeweilige Substanz eine Reihe mit den Endkonzentrationen 2,9 - 5,9 - 11,8 - 17,6 - 23,5 - 29,4 µM. Eisen-II-sulfat diente als Vergleichssubstanz und die Auswertung der anderen Stoffe wurde jeweils auf den Mittelwert der Absorption der 1 mM Eisen-II-sulfat-Lösung aus den fünf Konzentrationsreihen bezogen. Für jeden weiteren Stoff wurden die Absorptionen der fünf Konzentrationsreihen gegen die Endkonzentration aufgetragen, um mit den so erhaltenen fünf Kalibriergeraden über Verwendung des Absorptionwertes für 1 mM Eisen-II-sulfat den stoffspezifischen FRAP-Wert zu berechnen.

Ascorbinsäure und Trolox wurden in diesem Versuch als Referenzsubstanzen verwendet, um die antioxidative Aktivität der Polyphenole auf diese zu beziehen. Es gilt, je höher der FRAP-Wert ist, desto geringer ist die antioxidative Aktivität. Ferner lässt sich noch die prozentuale Aktivität der Testsubstanzen und der Referenzen im Vergleich zu Eisen-II-sulfat bestimmen, indem man die erhaltenen FRAP-Werte auf die Endkonzentration von 29,4 µM als 100 Prozent normalisiert. Man erhält das Verhältnis der

Substanzen zu Eisen-II-sulfat, welches eine prozentual höhere oder niedrigere Aktivität wiedergibt.

Trägt man die Mittelwerte der Absorptionen aus den fünf Konzentrationsreihen für jede Konzentration nach vier Minuten gegeneinander auf, so erhält man ein Dosis-Effekt-Diagramm über das sich ablesen lässt, ob eine Erhöhung des Gehaltes an Substanz einen Einfluss auf die antioxidative Aktivität hat. Auch hier zeigt die Lage der Geraden, über oder unter der von Eisen-II-sulfat, eine höhere oder niedrigere Aktivität. Über eine Umrechnung der Konzentration von Mikromolar in Mikrogramm pro Milliliter ändert man die Steigung der Geraden, allerdings bleibt die Aussage die gleiche.

Eine Auswertung der Messwerte, die alle 15 Sekunden mit einer 0,1 mM Verdünnungslösung erhalten wurden, liefert eine Aussage über die Kinetik der antioxidativen Aktivität. Steigt die Gerade schnell bis zu einem Plateau an, ist die volle antioxidative Eigenschaft der Substanz sehr schnell ausgebildet. Steigt sie nur langsam an, dauert dies entsprechend länger. Ändert sie sich nicht, so findet bei dieser entsprechenden Substanz keine Änderung der Aktivität statt.

Zuletzt kann man noch sogenannte Eisen-II-Äquivalente berechnen. Normalisiert man die fünf FRAP-Werte für jede Substanz auf die Endkonzentration von 29,4 μM Eisen-II-sulfat und bildet daraus den Mittelwert, so erhält man den Äquivalentwert. Ergibt sich beispielsweise ein Wert von 2 für eine Substanz, dann führt eine direkte Reaktion von Eisen-II zu einer halb so großen Absorptionsänderung wie eine äquivalente molare Konzentration der betreffenden Substanz.

Statistisch wurden die Werte mittels einer ANOVA und nachfolgendem Tukey's Test analysiert, um statistisch signifikante Unterschiede erkennen zu können.

4 Verkürzung der Kulturzeit von CaCo-II-Zellen für Transportversuche

4.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

4.1.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien

Lookout Mycoplasma PCR Detection Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
JumpStart Taq DNA Polymerase	
Methanol (Art.-Nr. 34860-2,5L-R)	
ROTI-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	
Antikörper anti-hE-Cadherin	R&D Systems
Antikörper AlexaFluor 488	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
DAPI dilactat	

4.1.2 Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien

Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heizplatte, RCT basic	IKA, Staufen
Herafreeze -80 °C HFU 586 Basic	Heraeus, Hanau
PCR – Gerät, EdvoCycler	Edvotek, Washington DC, USA
Einweg-Skalpelle	P+W Medizintechnik, Berlin
Axio Observer.Z1 microscope mit A-Plan 10x/0.25 Ph1 Objektiv	Zeiss, Oberkochen

4.2 Routinetätigkeiten in der Zellkultur

4.2.1 Herstellung von Kulturmedium und Puffer

Generell fanden das Herstellen der Medien sowie die Handhabung und der Umgang mit den Zellen während den Versuchen unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung unter aseptischen Bedingungen zur Verhinderung von mikrobieller Kontamination und unter Anlehnung an *Natoli et al.* [230] statt.

Für eine adäquate Kultivierung der Zelllinie CaCo-II war ein spezielles Kulturmedium notwendig. Grundlage hierfür bildeten 500 mL Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), aus dem zunächst 60 mL mit einer serologischen Pipette entnommen wurden. Anschließend wurden zuerst 50 mL des fetalen bovines Serums (= 10 % Vol.) sowie jeweils 5 mL Penicillin/Streptomycin - Lösung (= 1 % Vol.) und nicht-essentielle Aminosäuren (= 1 % Vol.) hinzu pipettiert. Diese Lösungen und Supplemente sind ein wichtiger Bestandteil der verwendeten Flüssigkeiten in der Zellkultur (siehe Abbildung 58).



Abbildung 58 Überblick der Medien, Flüssigkeiten und Supplemente, die in der routinemäßigen CaCo-II-Zellkultur verwendet wurden. Zum Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 2) wurden hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum (FBS, 1), nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, 5) und Penicillin-Streptomycin (PEST, 6) zugesetzt. Mittels Phosphate Buffered Saline (PBS, 3) wurden die Zellen beim Passagieren gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung (T/E, 4) vom Zellkulturflaschenboden abgelöst.

Ein TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) wurde sowohl als Laufpuffer, als auch für das Agarosegel verwendet (vergleiche 7.3). Hierfür wurde vorab ein zehnfacher Puffer hergestellt, der vor Verwendung 1:10 mit Milliporewasser verdünnt wurde. Dazu wurden 1,86 g Natrium-EDTA in 10 mL Milliporewasser gelöst (0,5 M) und mit Natriumhydroxidplätzchen auf pH 8 eingestellt. In einem 1 L Kolben wurden 10,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 5,5 g Borsäure (= 0,089 mol/L) und 4 mL der 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung vorgelegt und mit Milliporewasser auf 900 mL aufgefüllt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf pH 8 wurde mit Milliporewasser auf 1 Liter ergänzt.

4.2.2 Auftauen und Kultivieren

Zur dauerhaften Lagerung der CaCo-II-Zellen diente ein Stickstofftank mit einer Temperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das gefrorene Zellaliquot wurde im Kryoröhrchen in der Hand angetaut und zügig zusammen mit 10 mL auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche gegeben, um das enthaltene DMSO zu verdünnen. Nach sechs Stunden Inkubation in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 -Gehalt wurde das Medium schließlich gewechselt, um das DMSO vollends aus der Flasche zu entfernen und somit dessen zelltoxische Einflüsse zu eliminieren. In der Folgezeit bildeten die Zellen unter diesen Kulturbedingungen adhärente Layer in den Flaschen aus.

Das Kulturmedium versorgt die Zellen während ihres Wachstums ausreichend mit Nährstoffen. Je mehr Zellen in der Kulturflasche durch Teilung entstehen, desto schneller werden die Nährmittel verbraucht. Daher muss das Medium in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Für CaCo-II-Zellen war ein Intervall von zwei Tagen angebracht, an denen unter der Werkbank das alte Nährmedium dekantiert und mittels einer serologischen Pipette durch frisches, auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes Medium ersetzt wurde. Gewöhnlich wurden die Zellen im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 -Gehalt als normale Kulturbedingungen inkubiert. Wird in der Zellkultur auf optimale Bedingungen für die CaCo-II-Zellen geachtet, so wachsen sie rasch zu konfluenten Monolayern zusammen (siehe Abbildung 59). Kam es während eines Versuches von diesen Bedingungen zu Abweichungen, wurde dies gesondert erwähnt.

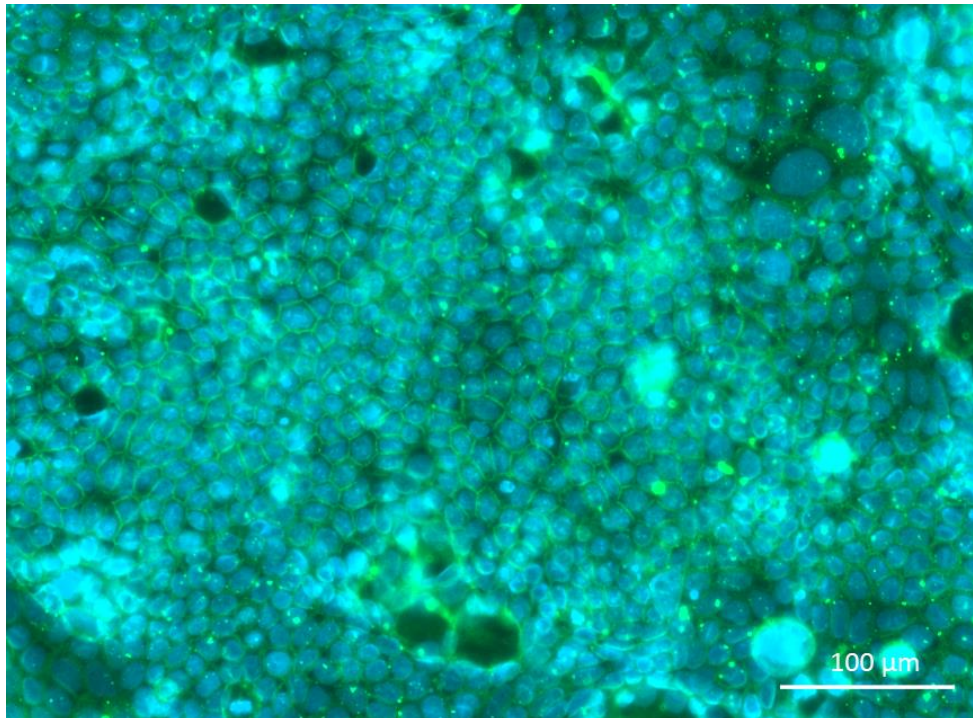


Abbildung 59 Eigene Aufnahme eines nahezu komplett dichten Monolayers von CaCo-II-Zellen mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop von Zeiss nach Fluoreszenzfärbung (vgl. 4.5). Erkennbar sind die Zellen mit ihrer charakteristischen eckigen Form durch die Färbung der Tight-junctions (grün). Die Zellkerne einer jeden Zelle sind in blau dargestellt.

4.2.3 Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen maximal 90 % der Oberfläche in der Kulturflasche bedeckt hatten, wurde das Nährmedium unter der Sicherheitswerkbank dekantiert und die Zellen wurden mit 12 mL PBS gewaschen, um den potentiell störenden Einfluss des Kulturmediums auf diesen Vorgang zu minimieren [92]. Dabei wurden die verwendeten Lösungen und Medien vorab auf 37 °C im Inkubator erwärmt. Nach dem Waschen wurden die adhärenenten Zellen im Inkubator für maximal sieben Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ mit zwei Milliliter einer speziellen Lösung aus 0,25 % Trypsin und 10 mM EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche abgelöst und verdünnt in eine neue Flasche gegeben [230]. Dieser Vorgang muss nach spätestens 15 Minuten durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt werden, da dieser Prozess ansonsten die Zellviabilität stark einschränken würde [92].

Zum Stoppen der Trypsinierung wurden 8 mL DMEM-PEST ergänzt und durch mehrmaliges Spülen des Bodens mit einer serologischen Pipette mit diesen insgesamt 10 mL die Zellen aus der Flasche in eine 50 mL Röhre überführt, um sie anschließend für vier Minuten bei Raumtemperatur und 244 g in der Megafuge zu zentrifugieren. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das so entstandene Zellpellet mit 10 mL Nährmedium resuspendiert. Sofern eine genaue Zellzahlbestimmung für einen weiterführenden Versuch notwendig war, wurden aus der Zellsuspension mit der Eppendorfpipette 10 μL entnommen

und auf eine Neubauer Zählkammer (siehe Abbildung 60) aufgebracht. Diese dient zur lichtmikroskopischen Quantifizierung der Zellzahl. Nach Abdeckung mit einem Deckglas wurden die vier Eckbereiche des markierten Kreuzes ausgezählt und die genaue Zellzahl pro Milliliter bestimmt, indem man die Durchschnittszahl aus den vier Quadranten bildete und diesen mit 10000 multiplizierte. So erhielt man die vorliegende Zellzahl in Zellen/mL.

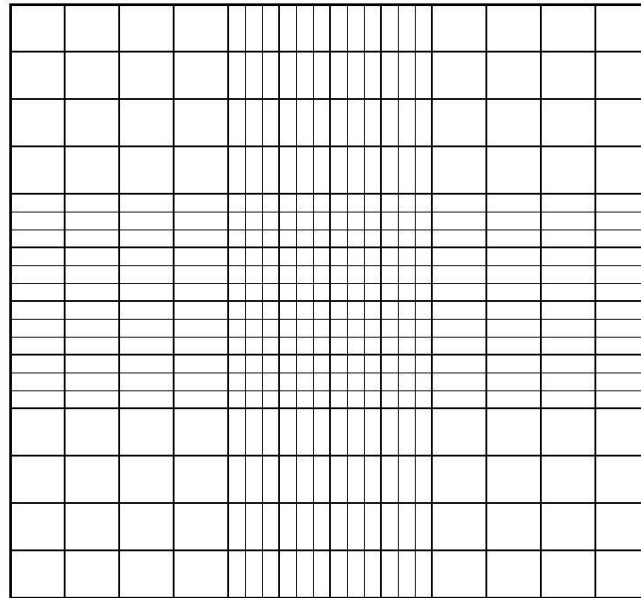


Abbildung 60 Darstellung der Gravur einer Neubauer Zählkammer. Die Zellzählung findet jeweils in den Ecken der Kammer in den vier großen Quadranten bestehend aus 16 kleinen Quadranten. Aus den vier Bereichen wird im Anschluss der Mittelwert gebildet.

Falls nur routinemäßig passagiert wurde, um die Zellen weiterhin in Kultur zu halten und ein Absterben durch zu hohe Zellzahl zu vermeiden, konnte auch vom Schritt der Zellzählung abgesehen werden und lediglich eine bestimmte Verdünnung, beispielsweise 2,5 mL Suspension mit 10 mL Medium (1:5), in eine neue Kulturflasche gegeben werden.

4.2.4 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellaliquots war es notwendig, vorab ein spezielles Gefriermedium aseptisch herzustellen. Dieses bestand aus einer 20 % DMSO-Mischung in FBS. Man benötigte für beispielsweise zehn Aliquots insgesamt 5 mL dieses Mediums. Daher wurden 1 ml DMSO mit 4 mL FBS in einer 15 mL Röhre gemischt und diese dann auf Eis gut gekühlt.

Die Zellen wurden wie unter 4.2.3 beschrieben passagiert. Nach dem Resuspendieren in Zellkulturmedium wurden die Zellen gezählt und so verdünnt, dass sich eine Konzentration

von circa 1.000.000 Zellen/mL ergab, welches eine adäquate Zellzahl zum Einfrieren darstellt. Anschließend wurden 5 mL der Suspension mit 5 mL des Gefriermediums in einer 15 mL Röhre zusammengegeben, um eine Endkonzentration an DMSO als Kryoprotektor von 10 % zu erreichen. Nach Aliquotieren zu je 1 mL in Mikroschraubröhren, wurden die Zellen über Nacht im Gefrierbehälter Mr. Frosty im -80 °C Schrank eingefroren. Dieser führt zu einer Abkühlung der Zellen um 1 °C/min, sodass sie möglichst schonend und langsam abgekühlt werden. Die Langzeitlagerung erfolgte wieder in einem Stickstofftank.

4.2.5 Test auf Mykoplasmenverunreinigung

Die CaCo-II-Zellen wurden in regelmäßigen festgelegten Zeitabständen routinemäßig auf Kontamination getestet. Für einen solchen Mykoplasmentest [379] wurde aus der Zellkulturflasche ein 1,0 mL Aliquot des überstehenden Zellkulturmediums entnommen und, nach fünfminütigem Kochen bei 95 °C, für einige Sekunden bei 3320 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Für die anschließende PCR war vorher ein Master-Mix herzustellen. Dieser setzte sich aus DNA-Polymerase und Rehydrationspuffer zusammen. In jedem der Eppendorfgeläße aus dem PCR-Kit sollten 0,5 µL der Polymerase im Mix enthalten sein. So wurde für beispielsweise fünf Proben sowie negativ und positiv Kontrolle in Mix aus 4,5 µL Polymerase und 208,5 µL Rehydrationspuffer hergestellt, um auch durch einen Überschuss Verluste beim Pipettieren auszugleichen. In den Reagiergefäßen waren jeweils schon weitere benötigte Substanzen, wie Nukleotide oder Primer vorgelegt. Die Primer sind spezifisch für die 16s rRNA Codierungsregion der Mykoplasmen und ermöglicht es diverse verschiedene Stämme zu detektieren. Für die Probe und die negative Kontrolle waren insgesamt 23 µL Mix und für die positive Kontrolle 25 µL nötig. In die Probengefäße wurden 2 µL der Probe und in die negative Kontrolle 2 µL Millipore-Wasser zugegeben. Im Anschluss sollten die Proben nur sanft geschüttelt werden, bevor sie dann fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Für die PCR war folgendes Programm beschrieben: Zuerst fand eine Denaturierung der DNA für zwei Minuten bei 94 °C statt. Danach folgten insgesamt 40 Zyklen mit einer Temperaturrampe von zunächst 94 °C über 30 s (Denaturierung), dann 55 °C für 30 s (Hybridisierung) und am Ende eines jeden Zyklus 72 °C für 40 s (Elongation). Zum Abschluss kühlte das Programm auf 4 - 8 °C herunter.

Für das Elektrophoresegel wurden 0,6 g Agarose in 50 mL TBE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Das verdampfte Volumen an Puffer wurde vor dem Ausgießen ergänzt. Nach kurzem Abkühlen wurden der Lösung noch 5 µL Midori Green-Farbstoff zugesetzt, die Lösung in die Form ausgegossen und im Kühlraum bis zur Verwendung in Puffer gelagert.

Nachdem der Laufpuffer in die Elektrophoresekammer (Modell 40-0708) gegeben wurde, befüllte man die einzelnen Geltaschen mit jeweils 8 μL der PCR-Produkte und Kontrollen. Die Elektrophorese fand nun bis zu einer klaren Bandentrennung bei 100 V statt. Dies war nach etwas eineinhalb bis zwei Stunden zu erwarten. Für die Auswertung sollte die Probenbande auf Höhe der negativen Kontrolle und nicht auf derjenigen der positiven Probe liegen (siehe Abbildung 61), um die Abwesenheit von Mykoplasmen nachzuweisen.



Abbildung 61 Bildaufnahme eines Agarosegels von einem Mykoplasmatest nach erfolgter Elektrophorese. Zu sehen sind insgesamt 6 Banden: die positive Kontrolle (erste von links), die negative Kontrolle (zweite von links) sowie vier Proben aus Zellkulturmedium. Da alle Proben auf Höhe der negativen Kontrolle liegen, ist von keiner Mykoplasmenkontamination auszugehen.

4.3 Langzeit - TEER - Messung

Um die Integrität eines Monolayers zu überprüfen, wurde eine Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) über 21 Tage durchgeführt. Während der Messung wird die Impedanz zwischen Lumen und dem basolateralen Gewebe über zwei Elektroden gemessen und über das Ohm'sche Gesetz der Widerstand der Zellen bestimmt [10, 91]. Die Elektrode misst damit den Widerstand gegen den passiven Ionentransport und reflektiert so die Dichte und Konfluenz des Monolayers [90]. Zunächst wurden die Zellen unter einer Sicherheitswerkbank passagiert, wie unter 4.2.3 beschrieben. Für das Kultivieren auf den Inserts und die Transportversuche allgemein stellen 300.000 Zellen je Well eine adäquate Anzahl dar [105]. Nach Resuspendierung wurde die Zellzahl

mit einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt und durch einen Verdünnungsschritt eine Suspension der Konzentration 600.000 Zellen/mL hergestellt.

Die Inserts wurden in die 12-Well-Platten eingesetzt und die Filter für mindestens fünf Minuten mit etwas Medium im Inkubator bei normalen Kulturbedingungen befeuchtet. Im Anschluss wurde das Medium mit dem Vakuumpumpensystem wieder entfernt. Dann wurde in den basolateralen Bereich 1,5 mL Nährmedium und in den apikalen 0,5 mL der verdünnten Zellsuspension gegeben. Die Inkubation erfolgte nun für sechs Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ um die Ausbildung von Tight-junctions anzuregen [105]. Ein Wechsel des apikalen Mediums nach dieser Zeit war essentiell, um der Bildung eines Bi- oder Multilayers entgegen zu wirken.

Über den Versuchszeitraum wurden die Zellen bei normalen Bedingungen kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Nährmedium sowohl apikal, als auch basolateral ersetzt, um dauerhaft optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Nach dem Mediumwechsel wurde der TEER-Wert aller Wells mittels Chopstick Elektrode und EVOM² Epithelial Voltohmmeter bestimmt (siehe Abbildung 62). Zur Verhinderung von Kontamination wurde die Elektrode vorab mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und im Anschluss mit Zellkultur- oder Transportmedium abgespült. Der Blankwert von einem Insert ohne Zellen wurde abgezogen und die erhaltenen Werte gegen die Zeit aufgetragen.

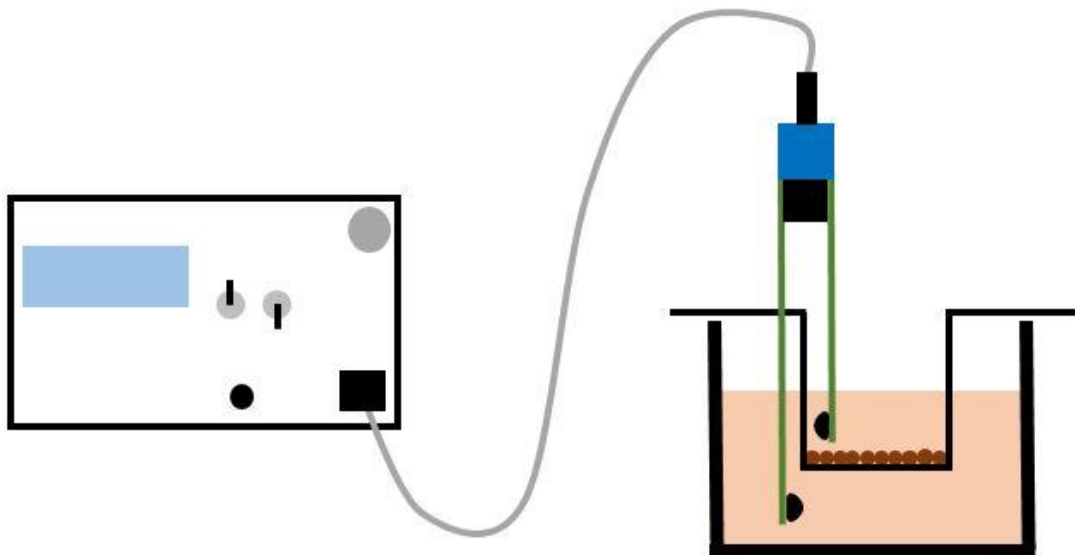


Abbildung 62 Schematisches Prinzip der TEER-Wert-Messung. Die beiden Elektroden der Chopstick Elektrode werden in ein Well mit Insert eingetaucht. Eine Elektrode befindet sich in der apikalen Kammer oberhalb der Zellen, die andere ist in der basolateralen Kammer. So lässt sich über den Vergleich des elektrischen Widerstands mit einem Blank-Well die Integrität des Monolayers (Zellen in braun) bestimmen.

4.4 Transport von Lucifer Yellow

Lucifer Yellow dient in der Zellkultur als Marker für den parazellulären Transport. Je weniger transportiert wird, desto besser ist der parazelluläre Weg durch beispielsweise Tight-junctions abgeriegelt (vergleiche Allgemeiner Teil 3.2.3). Passagiert wurden die Zellen wie unter 4.2.3 beschrieben und äquivalent zu der Langzeit-TEER-Messung (vergleiche 4.3) eine Zellsuspension der Konzentration 600.000 Zellen/mL für letztendlich 300.000 Zellen in jedem Well hergestellt. Sowohl die Handhabung der Inserts, als auch die erste Inkubation der 12-Well-Platten wurde bereits unter Punkt 4.3 erklärt. Unter normalen Kulturbedingungen über 21 d wurde das Nährmedium alle zwei Tage durch frisches Medium ersetzt.

Für die Durchführung der Transportversuche war ein Wechsel des Mediums von gewöhnlichem Zellmedium zu HBSS notwendig. Dieses wurde hergestellt, indem man HBS mit 5,96 g HEPES (= 0,025 mol/L) und 0,35 g NaHCO₃ (= 0,004 mol/L) versetzte. Sobald die Stoffe in einem Liter Millipore-Wasser gelöst waren, wurde der Puffer mit einem Nalgene Rapid Flow Flaschenfilter mit der Porengröße 0,4 µm und unter Ausbildung eines Vakuums in der Flasche steril filtriert.

Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs des prozentualen Lucifer-Yellow-Transports über den CaCo-II-Monolayer wurde in zuvor festgelegten Abständen aus jeweils drei Wells des Versuchsansatzes das Medium dekantiert und die Inserts zweimal mit HBSS apikal und basolateral gewaschen. Nach Transfer der drei Monolayer in eine neue Platte wurde vor sowie nach der Inkubation bei 37 °C und atmosphärischer CO₂-Konzentration für 20 min zwei weitere Male mit HBSS gewaschen. Für das Experiment wurde vorab eine 100 mikromolare Testlösung von Lucifer Yellow in HBSS hergestellt und dafür eine Lösung von 0,9145 mg dieser Substanz in 2 mL HBSS nochmals 1:10 verdünnt. In die Wells wurden basolateral 1,2 mL HBSS und apikal 0,55 mL der Testlösung gegeben. Für die Massenbilanz wurde sofort bei Beginn des Experiments und direkt nach Ende jeweils apikal eine Probe von 150 µL gezogen. Nach der Versuchsdauer von 120 min wurde basolateral eine weitere Probe gleichen Volumens gezogen.

Alle Proben wurden zunächst bei -20 °C zur Aufbewahrung über den Versuchszeitraum eingefroren. Eine Kalibriergerade mit insgesamt neun Lucifer Yellow Konzentrationen zwischen 2,5 und 0,001 µM wurde ebenso wie alle Proben mit dem Fluorimeter bei 428 nm und 536 nm vermessen. Es wurde der prozentuale Transport durch die Zellmonolayer für jeden einzelnen Tag bestimmt und in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

4.5 Fluoreszenzfärbung der Tight-junctions

Die CaCo-II-Zellen wurden wie unter 4.3 beschrieben auf den Inserts der 12-Well-Platten ausgesät. An den Tagen 1, 7, 12, 16 und 21 sollte jeweils ein Monolayer für die Färbung aus der Platte entnommen werden. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen sicherzustellen.

Am jeweiligen Tag wurde ein Insert unter aseptischen Bedingungen in eine neue 12-Well-Platte überführt. Dieses wurde zunächst zweimal mit 0,5 mL PBS apikal und 1 mL PBS basolateral gewaschen. Danach wurden apikal 0,5 mL und basolateral 1 mL Methanol zugesetzt und das Insert zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den Zellen das Wasser zu entziehen und die Zellwände durchlässig zu machen. Es schlossen sich wieder drei Waschschritte mit PBS an. Nun wurde der Filter mit einem Skalpell ausgeschnitten und im Folgenden immer mit jeweils 1 mL PBS gewaschen. Nach dreimaligem Waschen wurde der Monolayer für 60 min mit ROTI-Block, der vorher 1:10 mit PBS verdünnt wurde, im Kühlraum inkubiert. Hierbei werden sämtliche Positionen, an die ein Antikörper unspezifisch binden kann, besetzt. Auf dreimaliges Waschen folgte eine Inkubation des Monolayers mit einem Milliliter einer 1:100 Verdünnung des mouse anti-human IgG-Antikörpers e-Cadherin (entspricht 2 µg/mL), in PBS bei 4 °C über Nacht. Dieser verdrängt den ROTI-Block nur an den Tight-junctions und bindet an diese, sofern sie adäquat von den Zellen ausgebildet wurden. Am darauffolgenden Tag wurde der überschüssige Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit 1 mL PBS entfernt, der zweite goat anti-mouse IgG-Antikörper AlexaFluor488 in 1:200 PBS-Verdünnung (entspricht 1 µg/mL) zugegeben und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Essentiell war eine Inkubation im Dunkeln, da es sich um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper handelt. Dieser bindet nun an den 1. Antikörper und machte ihn dadurch für das Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Zuletzt wurden die porösen Zellwände noch für eine DAPI-Zellkern-Färbung ausgenutzt: dreimal wurde mit PBS gewaschen, danach für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur eine 1:1000 Verdünnung von DAPI-Farbstoff in PBS zugegeben und abschließend dreimal gewaschen. Hierbei penetriert der DAPI Farbstoff über die Zellwandlöcher in die Zelle und ist in der Lage den Zellkern anzufärben. Der Monolayer wurde auf einem Objektträger mit Mowiol unter dem Deckglas fixiert. Dieses ist ein flüssiges Polymer, welches die gleiche optische Dichte wie Wasser besitzt und den Monolayer haltbar macht. Nach einer Lagerung für einen Tag im Kühlraum zur Auspolymerisierung des Mowioms, konnten die Zelllayer unter dem Mikroskop betrachtet werden.

4.6 Aktivität der p-GP-Transporter

Soll die Kulturzeit für einen Transportversuch von 21 d reduziert werden, ist es essentiell, die Aktivität des p-GP-Transporters über diesen Zeitraum zu evaluieren, an welchem Tag er am stabilsten exprimiert wird. Hierfür wurde zunächst äquivalent zu 4.3 eine Zellkonzentration von 600.000/mL auf die Inserts in einer 12-Well-Platte ausgesät.

Daraufhin wurde an jedem zweiten Tag ab dem ersten Tag ein Insert aus der 12-Well-Platte entnommen und die Zellen für eine Expressionsbestimmung von p-GP mittels der Polymerase-Kettenreaktion vorbereitet, indem die RNA aus den Zellen isoliert, Konzentration der isolierten RNA bestimmt und anschließend in cDNA umgeschrieben wurde (siehe Experimenteller Teil 7.3).

Mit dem Mx3005P qPCR System wurden für diesen Versuch insgesamt fünf Platten vermessen. Die cDNA der Zellen von jedem Probetag wurde sechsfach sowie dessen noRT-Kontrolle dreifach aufgetragen. Zudem fand sich auf jeder Platte eine noTemplate-Kontrolle (NTC), je eine inter-run-Kontrolle (IRC) mit den Genen p-GP und SDHA und für die Effizienzbestimmung der Reaktion eine fünfstufige Verdünnungsreihe von cDNA jeweils im Triplikate. Drei weitere Platten wurden noch für die Housekeepinggene PPIA, RPLP 0, SDHA benötigt. Hier wurde jeder Probetag fünffach vermessen und auf jeder Platte befanden sich noch die fünffache Konzentrationsreihe im Triplikate, eine NTC im Triplikate und die IRC aus den Genen p-GP und SDHA jeweils im Triplikate. Der genaue PCR-Lauf ist unter Experimenteller Teil 7.4 näher beschrieben.

4.7 Vergleich des Rhodamintransportes nach 14 und nach 21 Tagen

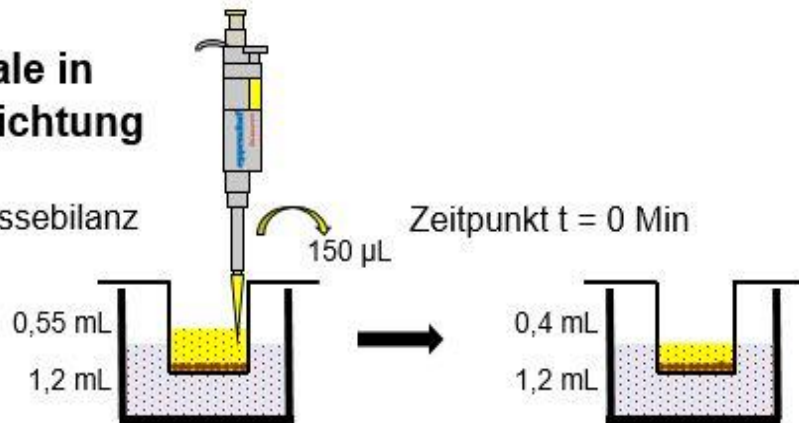
Der detaillierte Ablauf des Aussäens der Zellen auf den Inserts sowie die Kultivierung in den 12-Well-Platten ist bereits unter 4.3 beschrieben.

Im Gegensatz zum Lucifer Yellow-Transportversuch wurden hierbei die Zellen nur über 12 d und 14 d auf den Inserts belassen und nach dieser Zeit die P_{app} -Werte für Rhodamin 123 bestimmt, um sie mit den Werten nach 21 d zu vergleichen. Dafür wurde zunächst das Medium der Wells des Versuchsansatzes dekantiert und zweimal mit HBSS apikal und basolateral gewaschen. Anschließend wurden die Inserts mit den Zelllayern in eine neue Platte transferiert und jeweils vor und nach der Inkubation bei 37 °C und atmosphärischer CO₂-Konzentration für 20 min nochmals mit HBSS gewaschen. Für das Experiment wurde vorab eine 20 mikromolare Testlösung von Rhodamin 123 in HBSS hergestellt und dafür 0,272 mg dieser Substanz in 35,71 mL HBSS gelöst. Für eine Bestimmung der P_{app} -Werte

von Rhodamin 123 ist es nötig, den Transport sowohl von apikal nach basolateral als auch umgekehrt in zwei nebeneinanderliegenden Wells zu bestimmen. Folglich sollten diese beiden Wells auch vergleichbare TEER-Werte aufweisen, um eine ähnliche Ausprägung der Monolayer zu gewährleisten. Die TEER-Wert-Bestimmung fand wie unter 4.3 beschrieben statt. Für den Transport in basolaterale Richtung wurde apikal 0,55 mL der Rhodaminlösung und basolateral 1,2 mL HBSS zugegeben. Bei der Bestimmung in apikale Richtung wurde apikal 0,4 mL HBSS und basolateral 1,35 mL der Rhodaminlösung zugegeben (siehe Abbildung 63). Die Zugabe von 1,2 mL Flüssigkeit basolateral und 0,4 mL apikal war essentiell, um gleiche Level der Lösungen auf beiden Seiten zu haben und so Druckunterschiede zu verhindern. Auf der Seite des Rhodamins wurden jeweils 150 μ L zusätzlich zugegeben, um beim Zeitpunkt null Minuten auf dieser Seite jeweils eine 150 μ L Probe für die Massebilanz zu ziehen und wieder die gewünschten Volumina zu bekommen. Nach der Versuchsdauer von zwei Stunden wurde ebenso eine Probe gleichen Volumens gezogen. Nach 30, 60, 90 und 120 min wurden aus der Seite mit zu Beginn nur HBSS jeweils Proben zu je 150 μ L aus jedem Well gezogen und dieses Volumen sofort wieder mit reinem HBSS ersetzt.

a) Transport apikale in basolaterale Richtung

Probenzug für Massebilanz



b) Transport basolaterale in apikale Richtung

Probenzug für Massebilanz

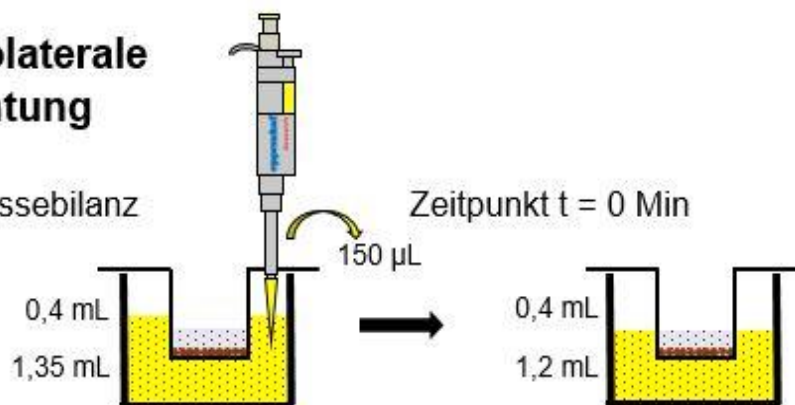


Abbildung 63 Schematische Darstellung des Prinzips des Transportversuches: apikale in basolaterale (a), sowie der Transport von basolaterale in apikale Richtung (b). Des Weiteren sind die Rhodaminlösung (gelb), die Zellen (braun) und HBSS (leicht bläulich, in Wirklichkeit jedoch farblos) dargestellt. Die Inhibitoren sind durch die roten Punkte dargestellt. Beim Transport in basolaterale Richtung (a) wird zunächst in der apikalen Kammer 0,55 mL Rhodaminlösung vorgelegt, um sogleich für die Massebilanz am Ende des Versuches eine Probe von 150 μL zu ziehen. Dadurch ergeben sich zum Zeitpunkt 0 min die Volumina 0,4 mL (apikal) und 1,2 mL (basolateral). Für den Transport in apikale Richtung (b) ist das Prinzip genau umgedreht.

Alle Proben wurden zunächst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Aufbewahrung eingefroren. Eine Kalibriergerade mit insgesamt zehn Rhodamin 123 Konzentrationen zwischen 5 und $0,001\text{ }\mu\text{M}$ wurde ebenso wie alle Proben mit dem Fluorimeter bei 505 nm und 525 nm vermessen. Anhand dieser Geraden wurde für jedes einzelne Well zu jedem Zeitpunkt die Konzentration an Rhodamin 123 auf der HBSS-Seite bestimmt und über eine Formel (Formel 2) die Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) von apikal nach basolateral oder umgekehrt berechnet. Darüber konnten letztendlich die P_{app} -Ratios errechnet werden und mit einem ungepaartem t-Test mit Welch's Korrektur über Graph Pad Prism mit den Ratios nach 21 Tagen verglichen werden.

5 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport

5.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

5.1.1 Zusätzlich verwendete Reagenzien

Fluorescein Natriumsalz (Art.-Nr. 28803-100G, Reinheit \geq 98,5 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lipopolysaccharid aus E. coli O55:B5 (Art.-Nr. L2637-10MG)	

5.1.2 Zusätzlich verwendete Geräte und Materialien

717plus Autosampler 1525 Binary HPLC Pump 2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters, Milford, USA
SunFire C18 5 μ m 4,6 x 150 mm Säule	Waters, Milford, USA
Breeze Version 3.30 Software	Waters, Milford, USA
1260 Infinity HiP Degasser	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

5.2 Vorbereitung zu den Transportversuchen

5.2.1 Herstellung der Lösungen und Medien

Für das Kultivieren der Caco-II-Zellen, sowohl in den Zellkulturflaschen als auch in den 12-Well-Platten, war ein spezielles Kulturmedium notwendig, dessen Herstellung bereits vorab beschrieben wurde (siehe 4.2.1).

Vor den Transportversuchen wurde das normale Zellkulturmedium durch HBSS ersetzt. Dieses Versuchsmedium wurde hergestellt, indem man HBS mit 5,96 g HEPES (= 0,025 mol/L) und 0,35 g NaHCO₃ (= 0,004 mol/L) versetzt. Sobald die Stoffe in einem Liter Millipore-Wasser gelöst waren, wurde der Puffer steril filtriert. In weiterführenden Versuchen sollte noch ein eventueller Unterschied evaluiert werden, falls die Bedingungen auf apikaler Seite, also sozusagen auf der Seite des Darmlumens im Modell, physiologischer gestaltet werden. Hierfür wurden zum HBSS zusätzlich noch 100 μ g/mL Gallensäuren zugesetzt und anschließend auf einen pH-Wert von 6 mit 0,1 M HCl-Lösung eingestellt.

Eine Reihe verschiedener Stammlösungen wurde für die Versuche jeweils in HBSS hergestellt. Das p-GP-Modellsubstrat Rhodamin 123 wurde als 20 mikromolare Lösung verwendet. Zum einen gelöst in reinem HBSS, als Positiv-Kontrolle in den Transportversuchen, oder zum anderen zusammen mit einem Polyphenol in HBSS gelöst, als Testlösung für die Evaluation des Einflusses dieser Substanzen auf die p-GP-Transporter (siehe Allgemeiner Teil 4). Analog zu Rhodamin 123 wurde mit Ciprofloxacin verfahren. Nach Überprüfung der Zytotoxizität der einzelnen Polyphenole auf die CaCo-II-Zellen (siehe Allgemeiner Teil 1.1) wurden jeweils 50 mikromolare Lösungen der Polyphenole in HBSS hergestellt, bei der die Einwaage zunächst in maximal einem Vol-% DMSO gelöst und anschließend das fehlende Volumen mit HBSS ergänzt wurde. Als Kontrollen wurden jeweils Lösungen des Modellinhibitors der p-GP-Transporter, Verapamil (Negativkontrolle), und des Modellinduktors, Dexamethason (Positivkontrolle), in den Konzentrationen 50 μM angefertigt (siehe Allgemeiner Teil 4.4). Neben diesen Kontrollen für die funktionale Aktivität von p-GP war die Prüfung der Integrität der Monolayer erforderlich. Lucifer Yellow wurde als Marker für die Ausbildung der Tight-junctions und somit der Verhinderung des parazellulären Transportes und Fluorescein als Marker für einen funktionalen transzellulären Transport verwendet (siehe Allgemeiner Teil 3.2.3 und 4.4). Hergestellt wurden jeweils 100 mikromolare Lösungen, indem die Einwaage in HBSS gelöst (entspricht 1000 μM) und anschließend mit HBSS 1:10 verdünnt wurde.

In zusätzlichen Versuchen wurde noch der potentielle Einfluss einer Inkubation der Zellinserts mit den vier Urolithinen für 24 h beziehungsweise 48 h vor den Transportversuchen mit Rhodamin 123 untersucht. Hierfür wurden 50 μM Lösungen der Urolithine in Zellkulturmedium hergestellt und mit diesen die Zellen über den gewünschten Zeitraum vor den Transportversuchen versorgt. Aufgrund der Erkenntnisse aus den Zytotoxizitätsversuchen (siehe Allgemeiner Teil 1.1) wurde das Zellkulturmedium alle 24 h gewechselt.

Darüber hinaus wurde neben der Beeinflussung des Rhodamintransportes noch der Einfluss der vier Urolithine auf den Arzneistofftransport von Ciprofloxacin, welcher als gutes p-GP-Substrat gilt, evaluiert (siehe Allgemeiner Teil 4.4). Ciprofloxacin wurde analog zu Rhodamin 123 ebenfalls in einer Konzentration von 20 μM in HBSS verwendet. Für die Vermessung der Proben aus diesen Experimenten via HPLC wurde vorab ein Fließmittel aus 13 % Acetonitril und 87 % einer Lösung von 3,11 μL Phosphorsäure 85 % in Milliporewasser, welches mit Triethylamin auf pH 3 eingestellt wurde, für jeden Messtag frisch angesetzt.

In weiteren Untersuchungen wurde eine akute inflammatorische Dysfunktion des Monolayers mittels Lipopolysaccharid (LPS) erzeugt und die Fähigkeit der vier Urolithine

evaluiert, inwieweit sie diese Prozesse umkehren können. Dabei wurde die benötigte Menge an LPS in Zellkulturmedium gelöst.

5.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung und das Passagieren der Zellen fanden wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben statt. Für die Transportversuche gilt eine Zellzahl von 300.000 Zellen pro Well als optimal, daher wurde nach dem Passagieren mittels Zellzählung eine Suspension von 600.000 Zellen/mL im Kulturmedium hergestellt. Die Inserts wurden in die einzelnen Wells der 12-Well-Platte eingesetzt und mit 0,5 mL Kulturmedium apikal und 1,5 mL basolateral für kurze Zeit befeuchtet.

Anschließend wurde das apikale Medium mit dem Vakuumpumpsystem entfernt und durch 0,5 mL der angefertigten Zellsuspension ersetzt. Für einen Transportversuch wurden so jeweils drei Platten hergestellt, welche, nach dem Aufbringen der Zellen auf die Inserts, für sechs Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank inkubiert wurden, um die Ausbildung von Tight-junctions anzuregen [105]. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium zur Reduktion der Bilayer- oder Multilayerbildung gewechselt. Im Anschluss wurde über 14 d an jedem zweiten Tag das Medium gewechselt, um für eine ausreichende Nährstoffversorgung zu sorgen. Ebenso wurde in diesem Zuge der TEER-Wert eines jeden Monolayers bestimmt, um eine Verlaufskontrolle der Monolayerintegrität durchzuführen (vgl. 4.3). Überschreitet dieser Wert eine bestimmte Schwelle, so kann man von einem gut ausgebildeten Layer ausgehen (siehe allgemeiner Teil 3.2.3).

5.3 Durchführung der Transportversuche

Aufgrund verschiedener Vorversuche (siehe Allgemeiner Teil 3 und Experimenteller Teil 4) wurde die Kulturzeit auf den Inserts von 21 Tage auf 14 Tage reduziert. Am Vortag des Transportversuches wurde ein letztes Mal das Medium gewechselt, um für adäquate Bedingungen zu sorgen.

Fand eine Vorinkubation mit den Urolithinen statt, wurde diese bereits an Tag 12, für eine Inkubation von 48 h, und spätestens ab der TEER-Messung an Tag 13, für eine Inkubation über lediglich 24 h, als Lösung in Kulturmedium zugegeben.

Am Versuchstag wurde zunächst das Kulturmedium mit dem Vakuumpumpsystem entfernt und die Inserts zweimal mit 0,5 mL HBSS apikal und 1,5 mL basolateral gewaschen. Auf eine Inkubation mit dem Versuchsmedium von 20 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 %

CO₂-Gehalt folgte einmaliges Waschen mit HBSS, bevor mit der Chopstick-Elektrode der transepitheliale elektrische Widerstand bestimmt wurde (siehe Experimenteller Teil 4.3). Dieser sollte im neuen Medium etwas niedriger sein als während der Kulturzeit, jedoch immer noch oberhalb des Schwellenwertes liegen. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Inserts so angeordnet, dass die für die P_{app} Ratio Bestimmung erforderlichen zwei Wells nebeneinander annähernd die gleichen TEER-Werte aufwiesen, um mögliche Unterschiede in der Zellintegrität nach Möglichkeit auszuschließen. Zwei Wells zur Berechnung der P_{app} Ratios sind nötig, da hierfür der Transport von Rhodamin 123 sowohl von apikal nach basolateral als auch umgekehrt durchgeführt wird, um die jeweiligen P_{app}-Werte zu ermitteln. Zu Anfang wurde für die Bestimmung des Transportes in basolateraler Richtung apikal 0,55 mL der Rhodaminlösung und basolateral 1,2 mL HBSS hinzugegeben. Bei der Bestimmung in apikale Richtung wurde apikal 0,4 mL HBSS und basolateral 1,35 mL der Rhodaminlösung zugegeben (siehe Experimenteller Teil 4.7, Abbildung 63). Je nachdem ob es sich um die Kontrolle des reinen Rhodamintransportes handelte oder um die Bestimmung des Einflusses eines Polyphenols, wurde entweder in der Rhodaminlösung und der Akzeptorkammer reines HBSS verwendet oder eine 50 mikromolare Lösung des jeweiligen Polyphenols in der Rhodaminlösung. Ebenso wurde für die Kontrollen der Induktion und der Inhibition der p-GP-Transporter entweder Verapamil- oder Dexamethason-Lösung für die Versuchsdauer von zwei Stunden zugesetzt. Die Zugabe von 1,2 mL Flüssigkeit basolateral und 0,4 mL apikal war essentiell, um auf beiden Seiten den gleichen Flüssigkeitsstand zu haben und so hydrostatische Diskrepanzen zu verhindern. Auf der Seite des Rhodamins wurden jeweils 150 µL zusätzlich zugegeben, um direkt zum Versuchsstart auf dieser Seite jeweils eine 150 µL Probe für die Konzentrationsbestimmung zu ziehen und die gewünschten Volumina zu erreichen. Ebenso musste nach der Versuchsdauer von 120 min wieder auf der Rhodaminseite eine Probe gleichen Volumens gezogen werden. Für die Durchführung der Versuche unter physiologischeren Bedingungen wurde dem HBSS auf der apikalen Seite Gallensäuren (100 µg/mL) hinzugefügt und der pH-Wert auf 6 eingestellt.

Bei Untersuchung des Einflusses der Urolithine auf den Transport des Arzneistoffes Ciprofloxacin wurde analog zu Rhodamin 123 verfahren.

Nach 30, 60, 90 und 120 min wurden aus der Seite ohne Rhodaminzusatz jeweils Proben zu je 150 µL aus jedem Well gezogen. Dieses Volumen wurde, entweder mit reinem, vorab auf 37 °C erwärmten HBSS oder der Lösung einer Testsubstanz in HBSS, ersetzt, je nachdem welche anfänglichen Bedingungen vorlagen. Mit den beiden Kontrollen für die Zellintegrität – Lucifer Yellow und Fluorescein – wurde genauso verfahren, allerdings erfolgte die Zugabe dieser Lösungen nur apikal und der Probenzug fand nur basolateral statt. Die Inkubation über zwei Stunden erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, atmosphärischem CO₂ und leichtem Schütteln bei 125 rpm auf einem Heidolph Unimax

Schüttler. Das Schütteln war notwendig, um eine starre Wasserschicht als Barriere für den Stofftransport zu verhindern [105]. Insgesamt war es möglich mit einem Versuchsansatz die Rhodaminkontrolle, zwei Polyphenole, eine Inhibitions- oder Induktionskontrolle sowie die Lucifer Yellow- und die Fluoresceinkontrolle im Triplikat zu vermessen (siehe Abbildung 64). Die gezogenen Proben wurden bis zur Auswertung bei -20 °C zunächst tiefgefroren.

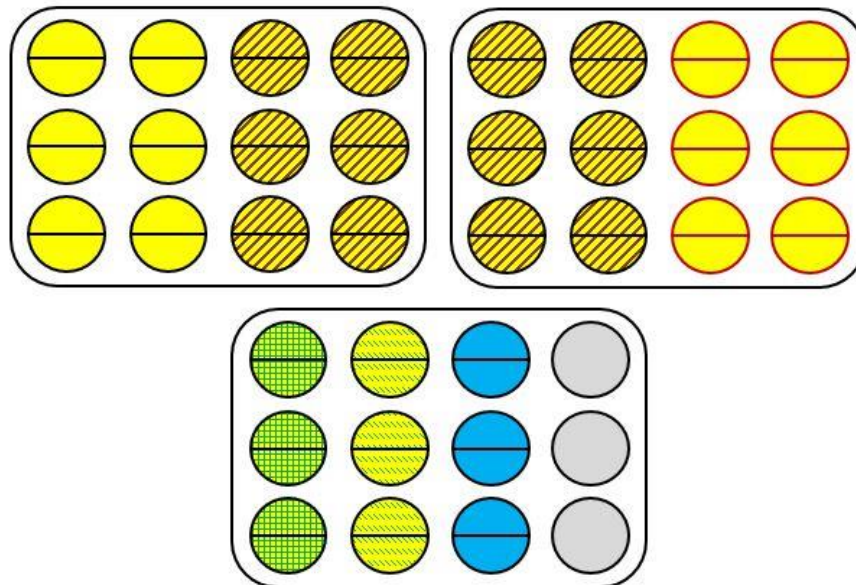


Abbildung 64 Schematische Darstellung einer möglichen Auftragung in einem Transportversuch. Auf der Platten oben links stellen die sechs gelben Kreise die reine Rhodaminkontrolle dar. Auf den beiden oberen Platten symbolisieren die 12 Kreise mit braunen Querstriche die Evaluation zweier verschiedener Polyphenole mit je drei Wellpaaren. Die sechs Kreise mit rotem Rand oben rechts zeigen die Inhibition des p-GP-vermittelten Transportes durch Verapamil in diesem Versuch. Auf der unteren Platte zeigen die jeweils drei Wells mit grünen Kästchen und grünen Querstrichen die beiden Kontrollen mit Fluorescein und Lucifer Yellow, die drei blauen Wells stellen die Blanks aus der Kulturzeit dar, welche für eine TEER-Messung nach dem Transportversuch noch benötigt wurden und die drei grauen Wells wurden nicht benutzt.

Bei den Versuchen zur LPS-induzierten Monolayerdysfunktion wurden die CaCo-II-Zellschichten für eine akute Schädigung über 6 h mit 200 µg/mL LPS inkubiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium durch 0,5 mL apikal und 1,5 mL basolateral LPS-Lösung ersetzt. Die eingesetzte Konzentration an LPS wurde in Evaluierungsversuchen mit einer Konzentrationsreihe von 10 bis 200 µg/mL Substanzinkubation über 6 h und nachfolgender TEER-Wert-Messung als praktikabelste Konzentration detektiert. Während den anschließenden Versuchen fand lediglich ein Transport mit Rhodamin 123 wie oben beschrieben statt. Der Effekt der vier Urolithine wurde untersucht, indem 24 h vor dem Start der LPS-Inkubation die Monolayer mit einer 50 µM Lösung des entsprechenden Urolithins inkubiert wurden.

In zwei orientierenden Versuchen wurde die Zeitspanne bis zum Einsetzen eines Effektes der Urolithine A, B und C sowie Dexamethason auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123 näher untersucht. Hierfür fand zunächst eine Vorinkubation über fünf Minuten mit jeweils 50 μM Lösungen der vier Substanzen und im Anschluss ein reiner Rhodamintransportversuch wie oben beschrieben statt. In einem zweiten Versuch wurde der allgemeine Ablauf eines Transportversuches in zwei Teile gegliedert und jeweils Messpunkte nach 15, 30 und 45 Minuten eingeführt. In der ersten Stunde fand nur ein Transport von Rhodamin statt und in der zweiten Stunde lief der Transport unter Inkubation mit den vier Substanzen ab.

5.4 Auswertung der Permeabilitätsversuche

Für die Bestimmung der Konzentration in den einzelnen Proben aus sämtlichen Rhodamintransportversuch wurde zunächst für Rhodamin 123, Lucifer Yellow und Fluorescein je eine Kalibriergerade hergestellt. Mit einem Lumineszenz Spektrometer wurde von jedem Stoff aus einer zehnstufigen Verdünnungsreihe von 5 μM bis 0,001 μM jeweils 100 μL in einer 96-Well-Platte zur Fluoreszenzmessung sowie reines HBSS als Blank vermessen und über das Auftragen der erhaltenen Absorption gegen die jeweilige Konzentration die Geradengleichung der Kalibriergeraden spezifiziert, nachdem der Blankwert subtrahiert wurde. Für Rhodamin 123 waren die Excitations- und die Emissionswellenlänge 505 nm und 525 nm, für Fluorescein 490 nm und 525 nm und für Lucifer Yellow 428 nm und 536 nm.

Nach dem Auftauen wurden je 100 μL sämtlicher Proben unverdünnt ebenso in der 96-Well-Platte vermessen. Ein Blank bestehend aus reinem HBSS wurde stets mitgeführt und dessen Absorption von den erhaltenen Absorptionen der einzelnen Proben subtrahiert.

Über die vorab definierten Kalibriergeraden wurde nun aus der Absorption der verschiedenen Proben die jeweilige Konzentration berechnet. Die Probennahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten war notwendig, um die zeitabhängige Permeabilitätsrate für Rhodamin 123 unter den verschiedenen Bedingungen zu ermitteln. Über die Formel für den Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) konnte aus der zeitabhängigen Permeabilitätsrate der P_{app} -Wert entweder von apikaler in basolaterale oder von basolateraler in apikale Richtung errechnet werden (siehe Einleitung 2.4.4).

Das Verhältnis dieser beiden P_{app} -Werte bildete die P_{app} Ratio, über die schließlich eine Aussage getroffen wurde, inwieweit die Polyphenole den p-GP-vermittelten Rhodamintransport im Vergleich zu Verapamil und Dexamethason beeinflussen können. Eine statistische Auswertung der erhaltenen P_{app} -Werte und P_{app} Ratios fand über

GraphPad Prism mit einer ANOVA und einem Tukey`s Post-hoc Test, nachdem über einen ROUT-Test vorab Ausreißer ausgeschlossen wurden, statt.

Die weiteren Versuche zur Beeinflussung des Transportes von Rhodamin 123 mittels Vorinkubation mit den verschiedenen Urolithinen über 24 h oder 48 h sowie die Transportversuche mit dem Arzneistoff Ciprofloxacin wurden äquivalent ausgewertet.

Bei den Untersuchungen mit Ciprofloxacin wurden die Proben nicht mit dem Lumineszenz Spektrometer, sondern mit der HPLC vermessen (siehe Experimenteller Teil 5.1.2). Das komplette Volumen der aufgetauten Proben für jeden Messtag wurde in eine 96-Well-Platte überführt, die Platte in der Megafuge unter Raumtemperatur und für 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert und 100 µL des Überstandes direkt in ein verjüngtes HPLC-Vial gegeben. Die HPLC-Methode orientierte sich an der Reinheitsprüfung zu verwandten Substanzen für Ciprofloxacin aus dem Arzneibuch [380]. Von den Proben wurden 50 µL in die HPLC injiziert und das Fließmittel (siehe Experimenteller Teil 5.2.1) unterlag einem isokratischen Fluss von 1,5 mL/min über insgesamt 12 Minuten pro Messung. Im Detektor fand eine Messung bei 278 nm statt. Als Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe von 0,001 bis 10 µg/mL Ciprofloxacin analog vermessen.

6 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression des p-GP-Transporters

6.1 Verwendete Primer und zusätzlich genutzte Reagenzien, Geräte und Materialien

6.1.1 Verwendete Primer

Die Synthese mit nachfolgender salzfreier Aufreinigung der für die RT-qPCR verwendeten Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) jeweils individuell in einem Maßstab von 0,01 μmol . Die Primersequenzen wurden, wie in 6.2 beschrieben, vorher entworfen.

6.1.2 Zusätzlich genutzte Reagenzien

GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, Waltham, USA
6x Loading Dye Solution	

6.1.3 Zusätzlich genutzte Geräte und Materialien

Zentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	
Heizplatte, RCT basic	IKA, Staufen

6.2 Primer-Design

Neben der potentiellen Veränderung des Rhodamintransportes über den Zellmonolayer, sollte als eine weitere Zielsetzung der Transportversuche eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die Testsubstanzen den Transporter nur an der Zelloberfläche hemmen oder auch schon in die Genexpression des p-Glykoproteins eingreifen und diese hoch- bzw. herunterregulieren können. Dazu sollte mittels qPCR eine relative Quantifizierung für die p-GP-Transporter durchgeführt werden. Um die Robustheit der Versuche zu gewährleisten, wurde in einem ersten Schritt mittels Literaturrecherche eine Datenbank an geeigneten Referenzgenen (Housekeepinggenen) angelegt [340, 343, 381]. Es galt für letztlich 10 ausgewählte Gene passende Primerpaare für eine Amplifikation der cDNA-Stränge mit

anschließender Detektion zu finden. In nachfolgender Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Recherche mit allen relevanten Informationen zusammengetragen.

Tabelle 14 Genkürzel des Arzneistofftransporters p-GP sowie der relevanten Housekeepinggene mit jeweiliger Identifikationsnummer aus der Gene Datenbank (Gene ID [345]), der Kennung der Nukleotide Datenbank für die zugehörige mRNA (NCBI Referenz-Sequenz [382]) und der Nukleotidanzahl der korrespondierenden mRNA-Sequenzen.

Protein-synonym	Genkürzel	Gene ID	NCBI Referenz-Sequenz (mRNA)	Nukleotid-Anzahl der mRNA-Sequenz
p-GP	ABCB1	5243	NM_000927.4 (Transkript Variante 3)	4718
-	PPIA	5478	NM_021130.4 (Transkript Variante 1)	2288
-	RPLP0	6175	NM_001002.3 (Transkript Variante 1)	1229
-	UBC	7316	NM_021009.5	2594
-	HPRT1	3251	NM_000194.2	1435
-	SDHA	6389	NM_004168.2	2405
-	B2M	567	NM_004048.2	987
-	ACTB	60	NM_001101.3	1852
-	GAPDH	2597	NM_002046.4 (Transkript Variante 1)	1401
-	18sRNA	100008588	NR_003286.2	1869

Die Housekeepinggene zeichnen sich im Allgemeinen dadurch aus, dass sie konstant exprimiert werden und für wichtige Vorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich sind (siehe Allgemeiner Teil 5.1). Das Zielgen stellt die ATP-Bindekassette Subfamilie B Mitglied 1 (p-GP) dar.

Mit Hilfe von Datenbanken des National Center for Biotechnology Information [345, 382] wurden Informationen bezüglich der Länge, den Transkriptvarianten und der FASTA-Schreibweise der mRNA-Sequenzen von den Housekeepinggenen und dem p-GP-Transporter gesammelt. Bei mehreren vorkommenden Varianten wurden diejenigen ausgewählt, bei denen die mRNA-Sequenz am längsten waren und die für das am häufigsten vorkommende Protein kodierten. Über die Suchmaschine Primer-BLAST [383], eine Kombination der Programme Primer 3 [384] und BLAST (Basic Local Alignment

Search Tool) [385], konnten unter Zuhilfenahme der nachfolgenden Kriterien für die Referenz-Sequenzen passende Primer-Paare detektiert werden:

PCR – Produktgröße:	70 – 200 bp
Primer-Schmelztemperatur (T _m):	57,0 – 63,0 °C; Optimum: 60 °C
Exon-Spanne:	Primer muss Exon-Exon-Schnittstelle einschließen
Intron-Einschluss:	Primer-Paar muss durch mindestens ein Intron der korrespondierenden genomischen DNA getrennt sein
Spezifitäts-Check:	Suche nach für das PCR-Target spezifischen Primer-Paaren
Primer-Größe [Basen]:	15 – 25; Optimum: 20
Primer GC-Gehalt:	35 – 65 %
Maximale Selbst-Komplementarität:	5 bp
Maximale Paar-Komplementarität:	2 bp

Hauptkriterien für die Auswahl der vorgeschlagenen Primer-Paare waren die geringste theoretische Selbst-Komplementarität und die geringsten berechneten Temperaturunterschiede in den Schmelztemperaturen der Oligonukleotid-Sequenzen.

Darüber hinaus wurde in der öffentlichen Datenbank RTPrimerDB [386] nach bereits veröffentlichten und getesteten Primer-Paaren für die Zielgene gesucht und diese ebenso in eine weitere Analyse mit weiteren Onlinetools eingeschlossen.

Mittels des Oligo Analysis Tool [346] der Firma eurofins wurden anschließend die entworfenen sowie die online bereits veröffentlichten Primer auf die Anzahl und Länge von potentiellen Dimeren und deren Länge sowohl in der Sequenz des Forward- und Reverseprimers an sich, als auch im Primerpaar hin untersucht (siehe Tabelle 15). So konnten optimaler Weise diejenigen Paare ausfindig gemacht werden, bei denen weder eine Dimerisierung innerhalb der Sequenz, noch eine zwischen Forward- (FW) und Reverseprimer (RW) detektiert wurde. Als weiteres Programm zur Einschränkung der Primerauswahl diente der OligoAnalyzer [347]. Hierbei werden die Primerpaare und -sequenzen nochmal aus thermodynamischer Sicht auf ihre möglichen Sekundärstrukturen und Dimerisierungen hin evaluiert. Das Augenmerk liegt hier auf der Stabilität dieser potentiellen Verbindungen. Wenn diese einen Schmelzpunkt unterhalb der Temperatur während der Amplifikation aufweisen, kommen sie für die Versuche in Frage.

Die zusätzliche Evaluierung mit diesen Programmen sollte verhindern, dass die ausgewählten Sequenzen zu einem Scheitern der PCR führen, beziehungsweise das Risiko hierfür möglichst geringhalten. Dieses Fehlschlagen kann sich beispielsweise in Primerdimeren, falschen Anlagerungen oder Nebenprodukten äußern. Nachfolgend aufgeführte Oligonukleotidsequenzen wurden zur Synthese in Auftrag gegeben.

Tabelle 15 Forward- (FW) und Reverse- (RW) Sequenzen der selbstentworfenen Primer mit der Basenlänge, der Schmelztemperatur (T_m), dem Molekulargewicht (MW) sowie dem Guanin/Cytosin- (GC) Gehalt. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

Kürzel	Sequenz (5' → 3')	Länge [Basen]	T_m [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt
p-GP (FW)	CCTTCAGGGTTTCACATTTGGC	22	60,3	6692	50,0 %
p-GP (RW)	GAGCAGCATCATTGGCGAG	19	58,8	5878	57,9 %
PPIA (FW)	GTCAACCCCACCGTGTTCTT	20	59,4	6004	55,0 %
PPIA (RW)	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	21	59,8	6410	52,4 %
RPLP0 (FW)	GCTGCTGCCCGTGCTGGTG	19	65,3	5828	73,7 %
RPLP0 (RW)	TGGTGCCCCTGGAGATTTTAGTGG	24	64,4	7431	54,2 %

Bei allen drei Primerpaaren handelt es sich um selbstentworfenene Sequenzen für diese Gene. Die weiteren Primer aus Tabelle 14 für UBC, HPRT1, SDHA, B2M, ACTB, GAPDH und 18sRNA waren bereits im Arbeitskreis vorhanden und wurden wiederverwendet.

6.3 Test der Primer auf Signalspezifität

Nach dem Design und virtuellem Testen der Primer war eine Prüfung der Spezifität mittels PCR unerlässlich. Die Paare wurden jeweils in einer Konzentration von 150 nM im Gesamtansatz von 20 μ L pro Well eingesetzt. Es zeigte sich für alle neun Referenzgene und das Zielgen je nur ein Fluoreszenzsignal, was darauf hindeutet, dass eine erfolgreiche

Amplifikation stattgefunden hat. Der RT-qPCR-Lauf erfolgte wie unter 7.4.3 beschrieben. Somit konnten alle Primer für weitere Optimierungsschritte verwendet werden.

Im nächsten Schritt betrachtete man die Schmelzpunktkurven für die einzelnen Gene. Hier wurde über einen Bereich von 55 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten die Fluoreszenz detektiert und gegen die Temperatur aufgetragen. So kann abgeschätzt werden, ob bei der PCR nur ein einziges Produkt entstanden ist sobald es sich um einen schmalen und hohen Peak handelt (siehe Allgemeiner Teil 5.1.1.3).

Für jedes der zu testenden Gene wurde auf diese Weise spezifisch die Schmelztemperatur des Produktes ermittelt (siehe Tabellarischen Anhang 5.3). Die negative erste Ableitung des Schmelzkurvenverlaufes stellt die Schmelztemperatur als Peak dar (siehe Abbildung 65).

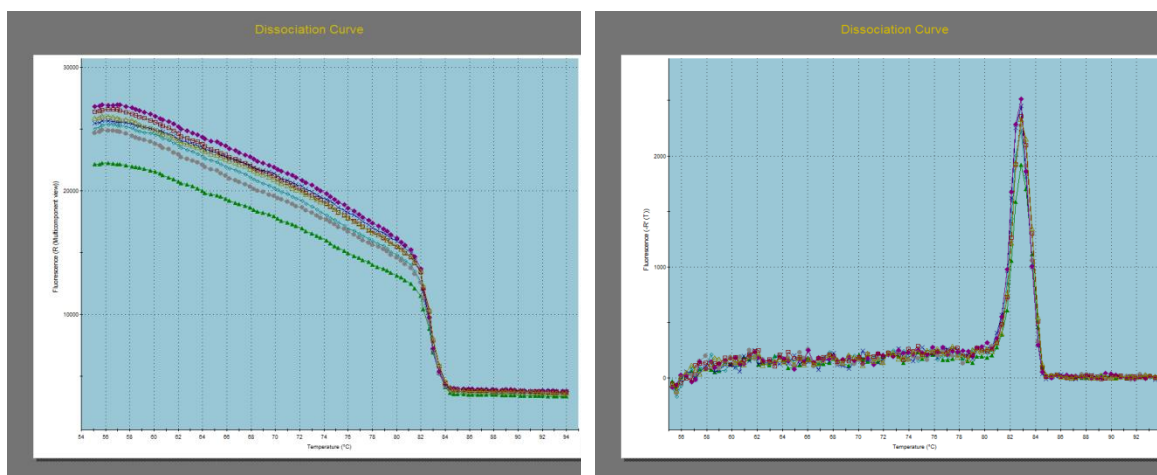


Abbildung 65 Darstellung des Schmelzkurvenverlaufs der p-GP-Produkte über den Temperaturbereich von 55 °C bis 95 °C ($n=7$). **Links:** Fluoreszenz R gegen die Temperatur aufgetragen. **Rechts:** Negative erste Ableitung der Fluoreszenz $-R'(T)$ gegen die Temperatur aufgetragen. Der experimentell bestimmte Schmelzpunkt des p-GP-Produktes lag bei 82,8 °C, was allen Peaks entsprach.

Für das Primer-Paar zu UBC konnten zwei Peaks in der Schmelzpunktkurve detektiert werden, sodass dieses Gen für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde (siehe Abbildung 66).

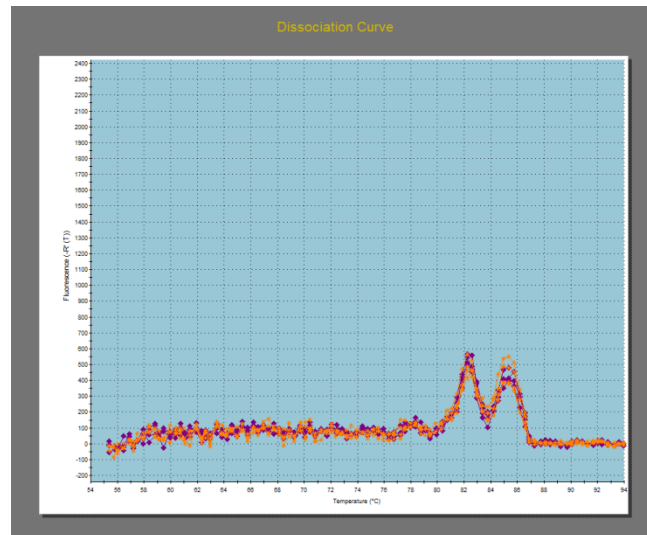


Abbildung 66 Negative erste Ableitung der Fluoreszenz ($-R_n'(T)$) gegen die Temperatur aufgetragen. Schmelzkurvenverlauf der UBC-Produkte ($n=7$). Kurve weist mehr als einen Peak auf, was für mehr als ein amplifiziertes Produkt spricht.

Allerdings kann es vorkommen, dass sich mehrere Produkte gebildet haben, die nur zufällig den gleichen Schmelzpunkt haben, obwohl die Schmelzkurvenkurve nur einen Peak abbildet. Daher wurde im Anschluss an die PCR die Produkte derjenigen Primerpaare mit nur einem Maximum zusätzlich auf einem Agarosegel (1,5 % Agarose in 50 g TBE-Puffer; 0,005 % Midori Green) getrennt. Die Elektrophorese wurde mit TBE-Laufpuffer (1x) durchgeführt. Herstellung des Puffers sowie des Gels siehe 4.2.1.

Die Elektrophorese wurde für 80 Minuten bei 140 V in TBE-Puffer durchgeführt. Hierbei diente Midori Green zur Darstellung der DNA-Bande. Die Auswertung fand unter UV-Licht statt (280 nm). Die Spezifität der Reaktion für das Zielgen ist gewährleistet, wenn nur eine Bande für jedes Produkt sichtbar ist, was für alle weiter verwendeten Primerpaare der Fall war (siehe Abbildung 67). Sie konnten also in den nächsten Schritt eingeschlossen werden.

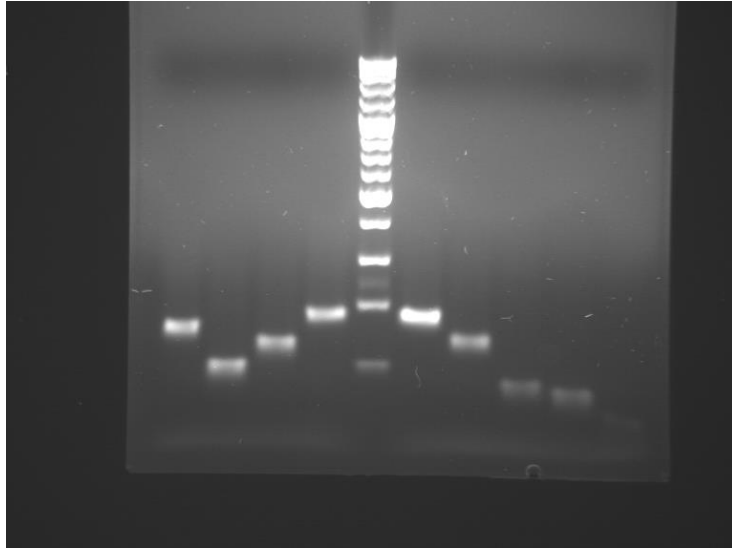


Abbildung 67 Aufnahme eines Agarosegels nach beendeter Elektrophorese. Rechts und links des DNA-Größenstandards sind die Banden der einzelnen Primer zu erkennen. Da jeweils nur eine Bande erkennbar ist, kann man von nur einem entstandenen Produkt ausgehen.

6.4 Optimierung der Primerkonzentration

Für eine effiziente PCR ist der Einsatz der optimalen Primerkonzentration für jedes Gen ein wichtiger Faktor. Hierfür wurde für jedes Oligonukleotidpaar die optimale Konzentration an FW und RW in einem Experiment bestimmt und nach einem Schema pipettiert (vgl. Tabelle 16). Der RT-qPCR-Lauf fand wie in 7.4.3 beschrieben statt.

Tabelle 16 Pipettierschema zur Bestimmung der optimalen Primzerkonzentration an FW- und RW-Primer. Es wurden jeweils unterschiedliche Volumina von einem bis drei Mikroliter je einer 2 μM FW- bzw. RW-Oligonukleotidlösung zusammen pipettiert. Die demensprechend entstandenen Endkonzentrationen pro Well lagen zwischen 100 und 300 nM je Primersequenz.

	1 μL FW (2 μM)	2 μL FW (2 μM)	3 μL FW (2 μM)
1 μL RW (2 μM)	100 nM FW + 100 nM RW	200 nM FW + 100 nM RW	300 nM FW + 100 nM RW
2 μL RW (2 μM)	100 nM FW + 200 nM RW	200 nM FW + 200 nM RW	300 nM FW + 200 nM RW
3 μL RW (2 μM)	100 nM FW + 300 nM RW	200 nM FW + 300 nM RW	300 nM FW + 300 nM RW

Es wurden entweder 1 μL , 2 μL oder 3 μL der zwei mikromolaren Lösung der jeweiligen Primer in eine Platte pipettiert und mit PCR-Wasser zu 8 μL ergänzt. Anschließend wurden noch 10 μL des iTaq Universal Sybr Green Supermix und 2 μL einer 1:10 verdünnten cDNA-Lösung (entspricht 100 ng totale RNA) aus CaCo-II-Zellen pro Well hinzugefügt. Somit ergaben sich FW- und RW-Primer Konzentrationen von 100 nM bis 300 nM in unterschiedlicher Zusammensetzung.

Die besten Primerkonzentrationen wurden über die c_t -Werte bestimmt, welche möglichst niedrig sein sollten. Dazu wurde für jeden Primer aus den neun verschiedenen Ansätzen derjenige mit dem niedrigsten c_t -Wert ausgewählt (siehe Tabellarischen Anhang 5.2). Für alle weiteren Versuche wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse für alle Primer eine Konzentration von 200 nM FW und 200 nM RW verwendet, da die Unterschiede zwischen den spezifisch für jedes Primerpaar optimalen Konzentration nur sehr gering waren ($\Delta c_t < 0,5$). Die einzige Ausnahme bildete 18s RNA, die außerhalb dieser Grenzen lag. Allerdings wurde auch das Primerpaar für 18s RNA in oben genannten Konzentrationen verwendet.

Im Anschluss wurden die ausgewählten Konzentrationen noch mittels Elektrophorese überprüft. Die Produkte ergaben jeweils nur eine Bande, wodurch, auch in Kombination mit der Auswertung der Schmelzpunktcurven, Primer-Dimere und weitere Sekundärstrukturen ausgeschlossen werden konnten.

6.5 Bestimmung der Reaktionseffizienz

Für den Vergleich der Expression der verschiedenen Gene mittels RT-qPCR sind Informationen über die Effizienz der Reaktionen bedeutsam (siehe Allgemeiner Teil 5.1). Weil keine genauen Ausgangskonzentrationen für die cDNA-Sequenzen vorlagen, fand eine relative Auswertung aus einer cDNA-Verdünnungsreihe für alle Primer statt. Ausgangsmaterial war hierbei in cDNA umgeschriebene RNA in fünf Konzentrationen aus 1:10-Verdünnungsschritten (1:10 / 1:100 / 1:1000 / 1:10000 / 1:100000). Für jedes Primerpaar wurden FW und RW jeweils in einer Konzentration von 200 nM im 20 μL Gesamtansatz pro Well verwendet. Im idealen Fall haben die Kurven dieser Verdünnungsreihe einen Abstand von 2,3 Zyklen (siehe Abbildung 68), was mit der exponentiellen Zunahme der DNA während der PCR zu erklären ist ($\ln 10 = 2,3$). In einem weiteren Schritt werden die so erhaltenen c_t -Werte gegen ihre Verdünnung aufgetragen. Durch lineare Regression und der errechneten Steigung einer Kalibriergeraden (siehe Abbildung 68) kann die PCR-Effizienz für jedes Primer-Paar bestimmt werden (siehe Allgemeiner Teil 5.1.2.2, Tabellarischen Anhang 5.3).

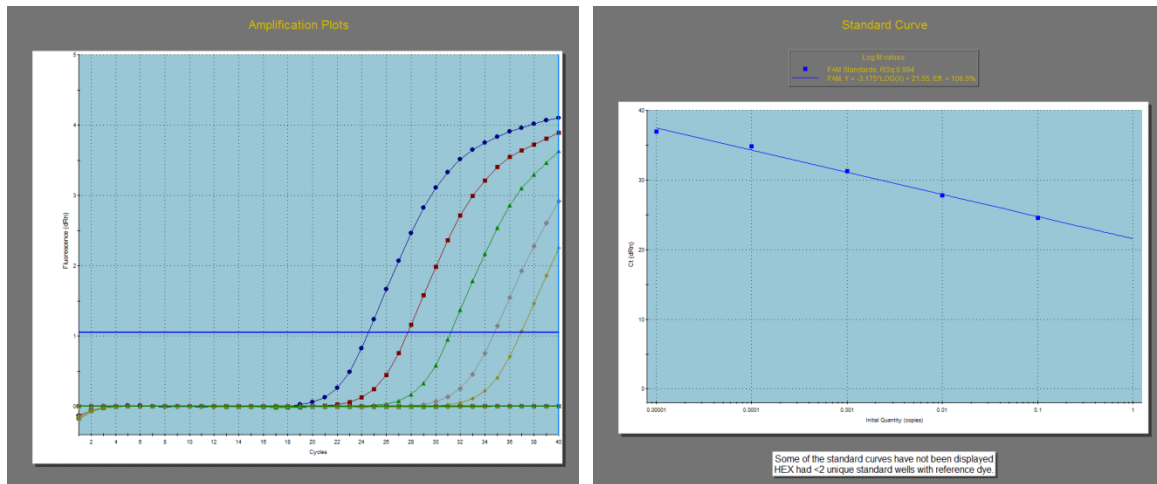


Abbildung 68 Darstellung von **Links**: einer optimal verlaufenden Amplifikationskurve der cDNA-Verdünnungsreihe V_1 (1:10, blau) bis V_5 (1:100000, gelb) von SDHA und **Rechts**: die entstandene Kalibriergerade mit der Geradengleichung von $y = -3,175 * \log (x) + 21,55$ und $R^2 = 0,994$. Die daraus resultierende Effizienz ergab 106,5 %.

Laut der MIQE-Guidelines [332] ist eine Detektion von mindestens drei Verdünnungsschritten im Abstand von etwa 2,3 Zyklen nötig, damit ein Primer verwendet werden kann. Es ließen sich bei allen Housekeepinggenen fünf und für p-GP vier Verdünnungsschritte erkennen. Somit konnten auch hier alle Primer weiterverwendet werden.

6.6 Referenzgenvalidierung

Die aussagekräftige Normalisierung auf Referenzgene (Housekeepinggene) hängt mit einer konstanten Expression unter verschiedenen Versuchsbedingungen zusammen (siehe Allgemeiner Teil 5.1.2.3). Hierfür standen nach Voruntersuchungen noch acht mögliche Referenzgene zur Auswahl, um für die weiterführenden PCR-Versuche zur p-GP-Expression im besten Fall drei geeignete Gene zu finden. Dazu wurde nach denjenigen Genen gesucht, welche über insgesamt vier Passagen der CaCo-II-Zellen die geringsten Schwankungen in ihrer Expression zeigten. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte wie unter 7.3 beschrieben.

Für jede Passage wurden 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend mit PCR-Wasser 1:10 verdünnt, sodass in jedem Well insgesamt 10 ng in cDNA umgeschriebene RNA verwendet wurden. Jede Passage wurde im fünffachen Replikat vermessen und der PCR-Lauf erfolgte wie unter Punkt 7.4.3 beschrieben. Für jedes Referenzgen wurde eine Platte mit allen Proben, einer Verdünnungsreihe V_1 (1:10) bis V_5 (1:100000) im Triplikate, eine no-template control mit Wasser statt cDNA im Triplikate sowie

die beiden Gene p-GP und SDHA als inter-run controls (IRC) im Triplikate an der gleichen Stelle jeder Platte pipettiert. Die Effizienz für jedes Referenzgen wurde mit den c_t -Werten der Verdünnungsreihe wie unter Punkt 7.5 bestimmt.

Zur Analyse wurde die BestKeeper® Software [351], ein Excel basiertes Programm, herangezogen, welches automatisch die Mittelwerte der gemessenen c_t -Werte für alle Proben unter Einbezug der jeweiligen Effizienz der Reaktionen auswertet (siehe Allgemeiner Teil 5.1.2.3).

Gegen diesen Bestkeeper-Wert wurden in wiederholten paarweisen Korrelations- und Regressionsanalysen die einzelnen Referenzgene verglichen. Für alle Gene zeigte sich hier eine signifikante Korrelation zum BestKeeper-Wert ($p < 0,05$). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass alle Gene konstant exprimiert werden, sodass sie theoretisch alle als Referenzgene in Genexpressionsanalysen bei CaCo-II-Zellen verwendet werden konnten (siehe Tabellarischen Anhang 5.4.3). Als weitere Option ließ sich über die Software die konstante Expression über alle Proben für die Housekeepinggene untersuchen. Hierbei wurde die intrinsische Varianz für jede Probe errechnet, die als x-fache Über- oder Unterexpression bezogen auf den Mittelwert der Referenzgene ausgedrückt wird [341]. Generell ließ sich hier erkennen, dass die c_t – Werte der Proben pro Primerpaar nur wenig voneinander abwichen und somit eine hohe Probenintegrität vorlag.

Zur Reduktion des experimentellen Aufwandes beim Einsatz mehrerer Referenzgene sollten aus den insgesamt acht potentiellen Genen mindestens drei für die Normalisierung der c_t -Werte ausgewählt werden. Das Kriterium für diese Auswahl stellte eine möglichst kleine Standardabweichung nach der BestKeeper-Auswertung dar, welche bei PPIA (0,38), RPLP 0 (0,40) und SDHA (0,42) am geringsten war und somit diese Gene als Housekeeping-Gene weiterverwendet wurden.

7 Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters

7.1 Zusätzlich verwendete Materialien

TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt, Nürnberg
-------------------------------	--------------------

7.2 Inkubation der CaCo-II-Zellen mit den Polyphenolen

Die Herstellung des Kulturmediums (siehe 4.2.1), die Kultivierung der Zellen in den Kulturflaschen (siehe 4.2.2) und das Passagieren (siehe 4.2.3) wurden bereits beschrieben. Zusätzlich zum gewöhnlichen Zellkulturmedium wurde ein spezielles Versuchsmedium für die Inkubationsversuche bestehend aus 5 % Vol. FBS, 1 % Vol. Penicillin/Streptomycin-Lösung und 1 % Vol. Nicht-essentiellen Aminosäuren hergestellt.

Nach dem Passagieren wurden die Zellen gezählt und die Suspension auf eine Konzentration von circa 220.000 Zellen/mL verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 3 mL in die Wells einer 6-Well-Platte pipettiert. Nach einem Tag wurde das Medium für die Sicherstellung einer adäquaten Nährstoffversorgung durch frisches ersetzt. Am zweiten Tag in den Platten waren die CaCo-II-Zellen so dicht gewachsen, dass sie für die Versuche verwendet werden konnten.

Für die Herstellung der 50 mikromolaren Stammlösung für jedes Polyphenol wurde dieses zunächst in maximal 1 % Vol. DMSO gelöst und mit dem speziellen Versuchsmedium auf das benötigte Volumen ergänzt. Ebenso wurde für die Kontroll-Wells eine einprozentige Lösung von DMSO in Versuchsmedium hergestellt. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass ein vermeintlicher Effekt durch das DMSO als Ergebnis gewertet wird, da es sowohl in Kontrolle als auch Probe enthalten ist. Anschließend wurden jeweils 4 mL der Kontroll- und der Probenlösung in je drei Wells der 6-Well-Platte gegeben.

Die Inkubation fand für jede Substanz über insgesamt drei verschiedene Zeiträume statt: 2 h sowie 24 h und 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Auf einem Schüttler wurde die Platte bei 100 rpm bewegt, um die Ausbildung einer starren Wasserschicht als Barriere zu unterbinden. Nach der Versuchszeit wurde das Medium mit dem Vakuumpumpsystem abgezogen und die Zellen einmal mit 4 mL PBS gewaschen. Um sie vom Boden der Wells abzulösen, wurden sie für sieben Minuten mit 0,3 mL einer 0,25 %igen Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde gestoppt, indem 1 mL des Versuchsmediums zugegeben wurde. Zur Vorbereitung auf die weiterführende Bearbeitung vor der PCR wurden die Zellen für fünf Minuten bei 18000 g und 4 °C in der

Mikrofuge zentrifugiert, damit sich am Boden des Eppendorfcaps ein Zellpellet bilden konnte.

7.3 RNA – Isolierung und cDNA - Synthese

7.3.1 RNA – Isolierung

Sauberkeit ist zur Vermeidung von Kontamination und Zerstörung der RNA ein entscheidender Faktor bei der PCR. Schon bei der RNA-Isolation aus Zellen ist ein Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank mit Laborkittel und Handschuhen notwendig. Vorab sollte die Werkbank deshalb auch mit 70 %igem Isopropanol und zusätzlich RNase Away gereinigt werden. Gearbeitet wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche.

Das abzentrifugierte Zellpellet wurde in 200 µL PBS resuspendiert und nach dem Zusatz von 400 µL Lysis/Binding Puffer (4,5 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Trishydrochlorid, 30 % (w/v) Triton X-100, pH 6,6) für 15 s auf dem Vortex gemischt, um die Zellen vollständig zu lysieren. Danach wurde das Lysat in das High Pure Filter Tube aus dem Kit, welches vorher in das Collection Tube gesetzt wurde, überführt. Mittels Zentrifugation für 15 s bei 8000 g und 4 °C fand dann ein erster Aufreinigungsschritt statt, bei dem RNA und DNA an das Glasfaservlies banden und von restlichen Zellbestandteilen getrennt wurden. Die DNA wurde im Anschluss mit einem Gemisch aus neun Teilen DNase I Inkubationspuffer (1 M Natriumchlorid, 20 mM Trishydrochlorid, 10 mM Magnesium-(II)-chlorid, pH 7,0) und einem Teil DNase I (10 kU Lyophilisat, vorab mit 550 µL Elutionspuffer resuspendiert) für 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Es schlossen sich nun zwei Waschschrte an: einmal mit 500 µL Waschpuffer I (5 M Guanidinhydrochlorid, 20 mM Trishydrochlorid, pH 6,6; vorab wurden 20 mL absoluten Ethanol hinzugefügt) und einmal mit 500 µL Waschpuffer II (20 mM Natriumchlorid, 2 mM Trishydrochlorid, pH 7,5; vorab 40 mL absoluten Ethanol hinzugefügt), nach denen jeweils eine Zentrifugation stattfand (15 s, 8000 g, 4 °C). Das Eluat wurde jeweils verworfen, noch einmal 200 µL Waschpuffer II zugegeben und drei Minuten bei 13000 g und 4 °C bis zur Trockne zentrifugiert.

Die aufgereinigte RNA wurde nun eluiert, indem man 100 µL des Elutionspuffers (PCR-Wasser) zugab und 1,5 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugierte. Eine Lagerung der RNA auf Eis war essentiell. So konnte sie entweder sofort für die Quantifizierung und cDNA-Herstellung weiterverwendet oder für maximal einen Monat bei -80 °C aufbewahrt werden.

7.3.2 RNA - Quantifizierung

Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist es wichtig, über die eingesetzte RNA Konzentration, sowohl bei der cDNA-Synthese als auch bei der qPCR zu kennen. Zur Bestimmung wurde die Nanodropmethode an einem Tecan Mikroplattenleser herangezogen.

Bevor 2 µL der RNA-Lösung auf der NanoQuant Platte bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 340 nm vermessen wurden, wurde das Gerät mit Nuklease-freiem Wasser kalibriert. Der Mikroplattenleser vermisst jede Probe automatisch nacheinander bei diesen Wellenlängen und benutzt 340 nm als Basis für die anderen Wellenlängen, da bei dieser die Absorption meist nahe 0 liegt. Bei 260 nm findet eine Absorption von RNA, DNA und Nucleotiden statt, weshalb die dabei gemessene Absorption für die Berechnung der dazu proportionalen RNA-Konzentration mit der i-control Software benutzt wurde. Nach der Messung werden vom Programm die jeweiligen Werte der Proben angegeben, die nach folgender Formel 6 berechnet werden können:

$$c_{RNA} = \frac{A_{260 \text{ nm}}}{d \times \varepsilon}$$

Formel 6

c_{RNA}	=	Konzentration der RNA-Lösung [ng/mL]
$A_{260 \text{ nm}}$	=	Absorption bei 260 nm
d	=	Schichtdicke der Messküvette (hier: 0,2 cm)
ε	=	Extinktionskoeffizient (für RNA = 40 mL/ng x cm ⁻¹)

Da nicht nur RNA bei dieser Wellenlänge absorbiert, wird zusätzlich das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Falls dieses bei ungefähr 2 liegt, kann die Probe als rein betrachtet werden. Für jede Probe wurden zwei Bestimmungen durchgeführt und, über den Mittelwert daraus, die RNA-Konzentration bestimmt. Im Durchschnitt konnte aus den Zellpellets eine Konzentration von 219,91 ng/µL (SDV= 52,25) gewonnen werden.

7.3.3 cDNA – Synthese

Im Anschluss an die Quantifizierung wurde das Volumen, welches 1000 ng totale RNA enthielt, in ein 1,5 mL-Reagiergefäß pipettiert. Die Reagenzien aus dem Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit wurden aufgetaut, kurz zentrifugiert und, wie sämtliche Lösungen und Proben, dauerhaft auf Eis gelagert.

In Vorversuchen wurde evaluiert, welche der im Kit enthaltenen Primer – Random Hexamer, oder anchored-oligo(dT)₁₈-Primer – am geeignetsten für die cDNA-Synthese sind. Hier ergaben sich bei den oligo(dT)₁₈-Primern im Vergleich zu den anderen Primern die niedrigeren c_t -Werte bei der anschließenden qPCR, weswegen diese für die weiteren Versuche ausgewählt wurden. Lediglich für 18s RNA waren die Random Hexamer Primer besser, jedoch wurde dieses Gen auch für die Oligoprimer miteingeschlossen.

Zu der RNA im Reagiergefäß wurde 1 µL der Primer gegeben und mit PCR-H₂O auf 13 µL ergänzt. Nach kurzem Mixen und Zentrifugieren schloss sich ein Inkubationsschritt für 10 min bei 65 °C und 300 rpm im Thermomixer an. Dieser diente dazu, die RNA Sekundärstrukturen zu zerstören und eine optimale Anlagerung der Primer zu gewährleisten.

Nun wurden die verbleibenden Komponenten für die Synthese hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µL pro Well erreicht wurde: 4 µL Transkriptor Reverse Transkriptase Reaktionspuffer, 0,5 µL Protector RNase Inhibitor (40 U/µL), 2 µL Desoxynukleotidmix (10 mM pro Nukleotid) und 0,5 µL Transkriptor Reverse Transkriptase (20 U/µL). Es wurde homogenisiert und kurz zentrifugiert. Die anschließende Synthese fand bei 300 rpm im Thermomixer für 30 min bei 55 °C statt. Inaktiviert wurde die Reverse Transkriptase mittels kurzzeitigen Erhitzens für fünf Minuten auf 85 °C, die Reaktion an sich wurde durch Lagerung auf Eis gestoppt.

Zu jeder Probe wurde außerdem eine Kontrolle mit gleicher RNA-Konzentration, jedoch ohne die Zugabe von Primern, Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und Reverser Transkriptase (noRT-Kontrolle) hergestellt, mit der identisch verfahren wurde. Das fehlende Volumen wurde mit reinem PCR-Wasser auf 20 µL ergänzt. Eine Langzeitlagerung konnte im -20 °C Gefrierschrank erfolgen oder für kurze Zeit bei Raumtemperatur, falls sich sofort eine qPCR anschloss.

7.4 Vermessung der Proben mittels RT - qPCR

7.4.1 Proben- und Lösungsvorbereitung

Jede verwendete cDNA-Probe wurde vorab 1:10 mit PCR-H₂O verdünnt, um eine Störung der Reaktion durch potentiell vorhandene PCR-Inhibitoren zu vermeiden. Sämtliche Proben wurden zu jeder Zeit auf Eis gelagert und behandelt, um einen Abbau der DNA oder einen Aktivitätsverlust der Substanzen zu verhindern.

iTaq Universal Sybr Green Supermix und PCR-Wasser wurden zu entweder 500 µL oder 1000 µL aliquotiert und im -20 °C Gefrierschrank gelagert.

Für die Vergleichbarkeit der Platten wurde bei jedem Lauf sogenannte Lauf-Vergleichsproben (inter run controls = IRC) mitgeführt, welche ebenfalls 1:10 Verdünnungen von nicht mehr benötigter cDNA aus der täglichen Zellkultur enthielten. Pro Platte wurde auch eine fünfstufige Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:100000 der cDNA hinzu pipettiert, damit parallel eine Effizienzbestimmung stattfinden konnte.

Die 18 μL Mastermix für jedes Gen bestanden pro Well aus fünf Teilen des iTaq Universal Sybr Green Supermix, zwei Teilen PCR-Wasser und je einem Teil FW- und RW-Primer (je 2 μM). Auf das so errechnete Volumen wurden noch einmal 40 % aufgeschlagen, um Verluste beim Pipettieren auszugleichen. Dieser Mix wurde ebenfalls auf Eis gelagert, um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden.

7.4.2 Probenorganisation

Generell wurden die Proben aus dem Versuch zur Bestimmung des Einflusses auf die Genexpression in 96-Well-Platten in einem neunfachen Replikat für den p-GP-Transporter und in je einem sechsfachen für die drei Housekeepinggene vermessen (siehe Abbildung 69).

In jedes Well der Platte wurde zunächst 18 μL des Master-Mix, bestehend aus Sybr Green Supermix, PCR-Wasser und dem spezifischen Primer-Paar (je 200 nM FW und 200 nM RW) vorgelegt. Zu dem vorgelegten Mastermix wurden 2 μL der 1:10 verdünnten cDNA-Lösung hinzugefügt. Die Finalkonzentration an RNA lag in jedem Well nun bei 10 ng. Auf jeder Platte wurde eine Leerprobe (NTC) im Triplikat zupipettiert, bei der statt cDNA 2 μL PCR-Wasser verwendet wurden. Für jedes Gen wurde noch zusätzlich eine Effizienzbestimmung mitgeführt. Hier wurden 2 μL der cDNA-Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 verwendet. Für eine Vergleichbarkeit der Platten untereinander wurde je eine IRC mit den Genen p-GP und SDHA verwendet, welche immer mit der gleichen cDNA-Lösung und in gleicher Konzentration durchgeführt sowie an der gleichen Stelle der Platte lokalisiert sein musste. Effizienzbestimmung und IRC wurden ebenso im Triplikat pipettiert. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde für jede Probenreihe noch die jeweils hergestellte noRT-Kontrolle in einem Duplikat mitgeführt.

Als letzte Vorbereitung wurde die Platte mit zwölf 8er-Ketten an durchsichtigen Deckeln verschlossen. Hierdurch soll ein Volumenverlust beim Erhitzen während der PCR verhindert werden. Die Platte wurde nun noch für zwei Minuten bei 201 g zentrifugiert, um störende Luftblasen zu entfernen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 1	K 1	K 1	K 1	K 1	K 1	K 1	K 1	K 1	noRT	noRT	
B	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	PP 1	noRT	noRT	
C	K 2	K 2	K 2	K 2	K 2	K 2	K 2	K 2	K 2	noRT	noRT	IRC
D	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	PP 2	noRT	noRT	IRC
E	K 3	K 3	K 3	K 3	K 3	K 3	K 3	K 3	K 3	noRT	noRT	IRC
F	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	PP 3	noRT	noRT	IRC
G	V1	V2	V3	V4	V5			NTC	NTC	NTC		IRC
H	V1	V2	V3	V4	V5	V1	V2	V3	V4	V5		IRC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		
B	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		
C	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		IRC
D	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		IRC
E	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		IRC
F	K 1	PP 1	K 2	PP 2	K 3	PP 3	K 4	PP 4	K 5	PP 5		IRC
G	V1	V2	V3	V4	V5			NTC	NTC	NTC		IRC
H	V1	V2	V3	V4	V5	V1	V2	V3	V4	V5		IRC

Abbildung 69 Schematische Darstellung der pipettierten 96-Well-PCR-Platte. **Oben:** Vermessung von maximal drei Inkubationen mit Polyphenolen (PP) und deren Kontrollen (K) ohne Inkubation jeweils n= 9 (blau). noRT-Kontrolle (noRT) im Duplikat (orange), fünfstufige Verdünnungsreihe (V) 1:10 - 1:100000 im Triplikat (grün), no-template control (NTC) im Triplikat (rot) und die zwei inter-run control (IRC)-Gene jeweils n= 3 (grau). **Unten:** Vermessung von einem Housekeepinggen für maximal fünf Inkubationen mit Polyphenolen und deren Kontrollen ohne Inkubation jeweils n= 6 (blau). noRT-Kontrolle im Duplikat (orange), fünfstufige Verdünnungsreihe 1:10 - 1:100000 im Triplikat (grün), NTC im Triplikat (rot) und die zwei IRC-Gene jeweils n= 3 (grau).

7.4.3 Durchführung der PCR

Der erste Schritt der qPCR bestand darin, die Platte für drei Minuten auf 95 °C zu erhitzen, um die im Sybr Green Supermix enthaltene DNA-Polymerase zu aktivieren. Im Anschluss reichten sich 40 Zyklen mit anfangs 95 °C für 10 s und dann 60 °C für 30 s aneinander: bei höherer Temperatur sollten die DNA-Doppelstränge getrennt werden und bei der niedrigeren Temperatur die Anlagerung der Primer und Komplementierung der Einzelstränge erfolgen. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die emittierte Fluoreszenz (R)

von Sybr Green bei 525 nm gemessen. Vom Programm wurde dann automatisch der gemessene Wert gegen ROX™ als passiven Referenzfarbstoff normalisiert (R_n), die Basislinie subtrahiert (ΔR_n) und gegen die Zyklenzahl aufgetragen (siehe Allgemeiner Teil 5.1.1). Nach Beendigung aller Zyklen wurde die Platte für eine Minute auf 95 °C erhitzt, dann für 30 s auf 55 °C abgekühlt und abschließend über einen Temperaturgradienten langsam nochmal auf 95 °C erhitzt, wobei alle 0,5 °C für jedes Well die Fluoreszenz gemessen wurde. Die Darstellung der Schmelzpunktkurve nach erfolgter PCR war essentiell für die Sicherstellung einer spezifischen Reaktion. War nur ein einziges Maximum in der Kurve vorhanden, konnten Primer-Dimere und Nebenprodukte nahezu ausgeschlossen werden (siehe Allgemeiner Teil 5.1.1).

7.5 Auswertung

7.5.1 Reaktionseffizienz

Die Bestimmung der Effizienz einer jeden spezifischen Reaktion ist unerlässlich, damit ein relativer Expressionsvergleich untereinander möglich ist (vergleiche Allgemeiner Teil 5.1.2). Dabei wurden bei jeder Platte eine Verdünnungsreihe von fünf Konzentrationen von 10 ng bis 0,001 ng in cDNA umgeschriebene RNA im Triplikat vermessen und bei jedem Lauf erneut bestimmt. Aus der berechneten Steigung der Verdünnungsreihe konnte somit die Effizienz in Prozent ermittelt werden. Für den p-GP-Transporter ließ sich so ein mittlerer Wert für die Reaktionen von 95,99 % bestimmen. Diese für jede Platte spezifische Effizienz wurde im Anschluss in die weitere Datenauswertung mit einbezogen, damit die Auswertung effizienzkorrigiert durchgeführt werden konnte [352].

7.5.2 IRC – Normalisierung

Sofern mehrere Platten bei einem Versuch miteinander verglichen werden müssen, ist es unerlässlich, die IRC-Werte (siehe Allgemeiner Teil 5.1.1) bei einem einheitlichen Schwellenwert (threshold line) zu betrachten. Für jedes der zwei Gene für die IRC-Wert-Bestimmung wurde der Durchschnitt aus dem Triplikat der c_t -Werte bestimmt, um daraus dann den Mittelwert für jedes Gen über die Anzahl der relevanten Platten zu bestimmen. Plattenspezifische Abweichungen erhält man nun, wenn man die Platte auf diese Zahl normiert. Über diese Abweichung lässt sich schließlich ein bestimmter plattenindividueller Faktor errechnen, auf den alle c_t -Werte der Platten normalisiert werden. Diese Faktoren variierten zwischen 0,94579184 und 1,12870146. Für eine hohe Vergleichbarkeit innerhalb der Versuche wurde bei der Auswertung immer eine IRC-Normalisierung der einzelnen Werte durchgeführt.

7.5.3 Referenzgennormierung

Die BestKeeper® Software dient zur Untersuchung der Expression von Genen in einer Probe hinsichtlich ihrer Konstanz (siehe 6.6). Es zeigte sich für die Referenzgene PPIA, RPLP 0 und SDHA, dass diese, nach Testung ihrer Mittelwerte der IRC-normalisierten c_t -Werte, konstant waren. Für den zu bestimmenden Arzneistofftransporter p-GP wurden zur relativen Quantifizierung der Genexpression die für jede Probe individuellen Werte der Housekeepinggene herangezogen.

7.5.4 REST®

Mit Hilfe des Relative Expression Software Tools (REST®) lässt sich über einen Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test® die relative Expression vom Zielgen in Bezug auf die Referenzgene effizienzkorrigiert berechnen [339]. Angelehnt ist diese Berechnung an die $2^{-\Delta\Delta c_t}$ -Methode (siehe Allgemeiner Teil 5.1.1.4) [338]. Für die Untersuchung des Einflusses der Polyphenole auf die Expression des p-GP-Transporters in den CaCo-II-Zellen wurden jeweils die IRC-korrigierten Werte der neunfachen Bestimmung des p-GP-Zielgenes auf die Werte der drei Housekeepinggene normalisiert. Es wurden somit die Zeitpunkte 2 h, 24 h und 48 h je untereinander und bezogen auf die Kontrolle verglichen.

D Tabellarischer Anhang

1 Charakterisierung der verwendeten Substanzen in der Zellkultur

1.1 Untersuchung der Zytotoxizität der Substanzen mittels Neutralrotassay

1.1.1 Zytotoxizität nach 24 h in Kulturmedium

n = Anzahl der Versuche MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

DMSO			Verdünnungsreihe [%]							
	Kontrolle	ZnCl 100 µg/ml	100	10	5	1	0,5	0,1	0,01	0,001
normalisierte Absorption	1,030	0,153	0,050	0,063	0,455	1,211	1,136	1,182	1,094	1,106
	0,990	0,167	0,054	0,265	0,365	1,411	1,244	1,280	1,335	1,362
	1,000	0,079	0,020	0,228	0,463	1,184	1,183	1,158	1,185	1,171
	1,100	0,149	0,035	0,156	0,304	1,256	1,527	1,356	1,257	1,409
	0,960	0,112	0,002	0,323	0,253	1,111	1,094	1,059	1,154	1,094
	1,100	0,091	0,061	0,056	0,147	1,205	1,159	1,253	1,048	1,172
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MW	1,030	0,125	0,037	0,182	0,331	1,230	1,224	1,214	1,179	1,219
SDV	0,059	0,036	0,023	0,109	0,122	0,101	0,157	0,104	0,105	0,134

ZnCl ₂			Verdünnungsreihe [µg/mL]							
	Kontrolle	ZnCl 100 µg/ml	1000	100	50	10	1	0,1	0,01	0,001
normalisierte Absorption	1,000	-	0,039	0,069	0,690	1,043	0,994	0,942	0,792	0,846
	1,000	-	0,114	0,199	0,606	0,847	0,691	0,646	0,630	0,699
	1,000	-	0,085	0,155	0,460	0,944	1,188	1,064	0,973	0,846
	1,000	-	0,061	0,261	1,014	1,252	1,070	1,180	1,190	1,162
	1,000	-	0,273	0,257	0,689	0,969	1,005	1,018	0,995	0,924
	1,000	-	0,323	0,469	0,768	1,179	1,144	1,180	1,237	1,194
n	6	-	6	6	6	6	6	6	6	6
MW	1,000	-	0,149	0,235	0,705	1,039	1,015	1,005	0,970	0,945
SDV	0,000	-	0,119	0,135	0,184	0,152	0,176	0,199	0,231	0,195

Gallensäuren			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,000	0,151	-0,019	0,175	0,478	0,670	0,855	0,932	0,881	0,775
	1,000	0,117	0,011	0,223	0,454	0,850	0,889	1,004	1,159	1,111
	1,000	0,083	0,022	0,307	0,530	0,983	0,964	1,118	1,170	1,252
	1,000	0,168	0,016	0,227	0,645	0,694	0,979	0,924	1,066	0,844
	1,000	0,115	0,003	0,129	0,441	0,919	1,009	1,226	1,194	1,242
	1,000	0,090	0,173	0,190	0,537	1,062	1,154	1,242	1,347	1,413
	1,000	0,238	0,026	0,180	0,530	1,011	1,152	1,401	1,088	1,233
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MW	1,000	0,137	0,033	0,204	0,516	0,884	1,000	1,121	1,129	1,124
SDV	0,000	0,054	0,064	0,056	0,069	0,154	0,117	0,179	0,142	0,233

pH			Verdünnungsreihe [pH]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	2,13	5,93	7,14	7,17	7,25	7,49	7,94	8,86
normalisierte Absorption	1,000	0,150	0,149	1,166	1,125	1,185	1,177	1,213	1,330	1,173
	1,000	0,089	0,042	1,838	1,417	1,831	1,780	1,825	1,460	1,359
	1,000	0,080	0,052	0,921	1,084	1,082	1,055	1,034	1,103	0,830
	1,000	0,145	0,024	1,178	1,158	1,097	1,199	0,996	1,118	1,143
	1,000	0,069	0,138	1,119	0,875	1,056	0,997	1,240	0,925	0,997
	1,000	0,164	0,091	1,057	0,810	0,985	1,234	1,314	1,235	1,122
	1,000	0,077	0,075	1,185	1,223	1,459	1,604	1,575	1,376	1,367
	1,000	0,168	0,075	0,887	0,931	1,064	0,943	0,937	1,021	0,855
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MW	1,000	0,188	0,081	1,169	1,078	1,220	1,241	1,267	1,196	1,106
SDV	0,000	0,043	0,044	0,294	0,200	0,286	0,298	0,304	0,186	0,203

Ciprofloxacin			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,000	0,210	0,724	1,002	1,156	1,136	1,125	1,078	0,989	1,022
	0,999	0,186	0,685	0,932	1,063	1,045	1,092	1,090	1,007	1,027
	1,002	0,185	0,676	0,927	1,051	1,040	1,086	1,086	1,000	1,010
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,194	0,695	0,954	1,090	1,074	1,101	1,085	0,999	1,020
SDV	0,002	0,014	0,025	0,042	0,058	0,054	0,021	0,006	0,009	0,009

Verapamil			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,000	0,179	0,030	0,198	0,255	0,690	0,939	1,016	1,142	1,062
	1,000	0,142	0,009	0,009	0,112	0,636	0,901	1,007	0,852	0,845
	1,000	0,067	0,011	0,014	0,030	0,125	0,446	1,245	1,247	1,267
	1,000	0,163	-0,001	0,013	0,056	0,464	1,378	1,190	1,068	1,250
	1,000	0,124	0,003	0,039	-0,006	0,226	0,667	0,904	0,949	0,746
	1,000	0,093	0,009	0,023	0,019	0,272	0,683	0,888	0,971	0,945
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MW	1,000	0,128	0,010	0,049	0,078	0,402	0,836	1,042	1,038	1,019
SDV	0,000	0,042	0,011	0,073	0,096	0,231	0,320	0,147	0,143	0,213

Dexamethason			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,992	0,077	0,916	0,963	1,068	1,135	1,238	1,124	0,969	1,116
	1,003	0,071	0,915	0,958	1,027	1,135	1,242	1,122	0,986	1,110
	1,005	0,068	0,898	0,951	1,053	1,124	1,233	1,120	0,978	1,100
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,072	0,910	0,957	1,050	1,132	1,238	1,122	0,978	1,109
SDV	0,007	0,004	0,010	0,006	0,021	0,006	0,004	0,002	0,009	0,008

Taxifolin			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,000	0,161	0,248	0,066	0,524	0,948	0,993	1,014	1,013	1,021
	1,000	0,155	0,176	0,034	0,086	0,985	1,119	0,982	1,270	1,309
	1,000	0,257	0,257	0,335	0,206	0,779	1,240	1,203	1,025	1,015
	1,000	0,192	0,336	0,108	0,201	1,068	1,038	0,974	1,207	1,097
	1,000	0,001	0,310	0,099	0,153	1,023	0,965	1,180	1,069	1,004
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MW	1,000	0,153	0,265	0,129	0,234	0,960	1,071	1,071	1,117	1,089
SDV	0,000	0,095	0,062	0,119	0,169	0,111	0,111	0,112	0,115	0,128

Silibinin			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	100	50	10	1	0,1	0,01	0,001
normalisierte Absorption	1,000	0,199	1,091	0,865	1,103	1,106	1,158	1,221	1,232	1,126
	1,000	0,014	1,067	0,613	0,737	0,971	0,949	0,901	1,065	0,964
	1,000	0,069	0,731	0,552	0,755	0,975	0,974	0,974	1,054	1,018
	1,000	0,123	0,405	0,653	0,652	0,854	0,935	0,862	0,925	0,899
	1,000	0,032	0,814	0,585	0,691	0,779	1,027	0,936	1,005	0,826
	1,000	0,230	0,783	0,598	0,815	0,941	1,226	1,169	1,232	1,017
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MW	1,000	0,111	0,815	0,644	0,792	0,937	1,045	1,010	1,085	0,975
SDV	0,000	0,089	0,251	0,113	0,162	0,112	0,120	0,149	0,124	0,104

Urolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,995	0,105	0,719	0,885	0,904	1,065	1,066	0,972	0,883	0,841
	1,000	0,104	0,71	0,872	0,899	1,042	1,062	0,952	0,879	0,846
	1,004	0,104	0,704	0,858	0,889	1,029	1,053	0,944	0,892	0,856
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,104	0,711	0,872	0,897	1,045	1,060	0,956	0,885	0,848
SDV	0,004	0,001	0,008	0,014	0,008	0,018	0,007	0,014	0,007	0,008

Urolithin B			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,983	0,153	0,246	0,625	0,694	0,85	1,012	1,126	1,130	1,030
	1,001	0,158	0,25	0,625	0,701	0,856	1,018	1,123	1,136	1,040
	1,016	0,156	0,249	0,615	0,683	0,849	0,994	1,110	1,123	1,037
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,156	0,248	0,622	0,693	0,852	1,008	1,120	1,130	1,035
SDV	0,016	0,003	0,002	0,006	0,009	0,003	0,013	0,009	0,007	0,005

Urolithin C			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,987	0,107	0,616	0,637	0,845	0,879	0,970	1,025	1,054	1,030
	1,002	0,110	0,615	0,640	0,844	0,891	0,974	1,011	1,044	1,018
	1,010	0,111	0,604	0,624	0,820	0,855	0,979	0,992	1,013	1,009
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,109	0,612	0,634	0,836	0,875	0,974	1,009	1,037	1,019
SDV	0,012	0,002	0,007	0,008	0,014	0,018	0,004	0,016	0,021	0,011

Isourolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,008	0,292	0,346	0,675	0,948	1,065	0,991	0,908	0,918	0,883
	0,995	0,274	0,310	0,611	0,882	1,002	0,957	0,920	0,939	0,927
	0,997	0,263	0,289	0,57	0,820	0,959	0,939	0,916	0,940	0,93
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,276	0,315	0,619	0,883	1,009	0,962	0,915	0,932	0,913
SDV	0,007	0,014	0,029	0,053	0,064	0,053	0,026	0,007	0,012	0,026

M1			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,005	0,101	0,099	0,094	0,047	0,048	0,032	0,842	0,920	0,830
	0,998	0,100	0,102	0,097	0,047	0,049	0,031	0,828	0,913	0,837
	0,997	0,101	0,104	0,100	0,049	0,053	0,033	0,820	0,914	0,854
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,101	0,102	0,097	0,048	0,050	0,032	0,830	0,916	0,840
SDV	0,005	0,001	0,002	0,003	0,001	0,003	0,001	0,011	0,004	0,012

racemisches Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,994	0,070	0,085	0,09	0,522	0,821	0,975	1,157	1,209	1,027
	1,000	0,051	0,045	0,029	0,456	0,776	0,964	1,161	1,211	1,041
	1,005	0,05	0,044	0,027	0,454	0,773	0,959	1,155	1,209	1,044
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,057	0,058	0,049	0,477	0,790	0,966	1,158	1,210	1,037
SDV	0,005	0,011	0,023	0,036	0,039	0,027	0,008	0,003	0,002	0,009

(+)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,986	0,142	0,284	0,063	0,439	0,593	0,747	1,123	1,118	1,035
	1,026	0,139	0,283	0,059	0,443	0,612	0,734	1,092	1,067	1,000
	0,989	0,144	0,269	0,064	0,453	0,592	0,713	1,086	1,055	0,953
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,142	0,279	0,062	0,445	0,599	0,731	1,100	1,080	0,996
SDV	0,022	0,002	0,008	0,003	0,007	0,011	0,017	0,020	0,033	0,041

(-)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,004	0,193	0,366	0,061	0,471	0,724	0,905	1,035	1,013	0,993
	1,010	0,190	0,361	0,060	0,471	0,728	0,908	1,023	1,004	0,927
	0,986	0,194	0,370	0,062	0,481	0,744	0,920	1,028	0,996	0,923
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,192	0,366	0,061	0,475	0,732	0,911	1,029	1,004	0,948
SDV	0,012	0,002	0,004	0,001	0,006	0,011	0,008	0,006	0,009	0,039

1.1.2 Zytotoxizität nach 4 h in Kulturmedium

n = Anzahl der Versuche MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

racemisches Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,003	0,163	0,435	0,425	0,797	0,869	0,964	1,004	1,002	0,977
	0,998	0,170	0,437	0,414	0,772	0,879	1,002	1,047	1,011	1,025
	1,000	0,188	0,419	0,390	0,757	0,854	0,985	1,036	0,962	0,998
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,00	0,174	0,430	0,410	0,775	0,867	0,984	1,029	0,992	1,000
SDV	0,003	0,012	0,010	0,018	0,020	0,013	0,019	0,022	0,026	0,024

(+) -Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,991	0,199	0,351	0,738	0,762	1,007	1,085	0,999	0,867	0,894
	1,006	0,191	0,325	0,713	0,721	0,984	1,103	1,029	0,855	0,884
	1,003	0,187	0,324	0,719	0,707	0,965	1,071	1,013	0,841	0,869
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,193	0,334	0,723	0,730	0,985	1,086	1,013	0,854	0,882
SDV	0,008	0,006	0,015	0,013	0,029	0,021	0,016	0,015	0,013	0,012

(-)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,975	0,242	0,844	0,736	1,063	1,074	1,219	1,277	1,217	1,186
	1,009	0,26	0,791	0,710	1,051	1,060	1,196	1,273	1,183	1,156
	1,016	0,268	0,755	0,692	1,034	1,041	1,159	1,251	1,154	1,107
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,256	0,797	0,713	1,049	1,058	1,191	1,267	1,185	1,150
SDV	0,022	0,013	0,045	0,022	0,014	0,017	0,030	0,014	0,032	0,040

1.1.3 Zytotoxizität nach 48 h in Kulturmedium

n = Anzahl der Versuche MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

DMSO			Verdünnungsreihe [%]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	10	5	1	0,5	0,1	0,01	0,001
normalisierte Absorption	0,989	0,158	-0,03	0,01	-0,03	0,837	0,807	0,82	0,809	0,926
	1,006	0,151	-0,03	0,007	-0,03	0,86	0,818	0,826	0,804	0,94
	1,004	0,148	-0,03	-0	-0,04	0,816	0,816	0,811	0,808	0,921
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,153	-0,028	0,005	-0,033	0,837	0,814	0,819	0,807	0,929
SDV	0,009	0,005	0,002	0,006	0,002	0,022	0,006	0,008	0,003	0,010

Verapamil			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	0,994	0,065	0,032	0,013	0,010	-0,010	0,179	0,963	1,025	1,047
	1,009	0,063	0,031	0,011	0,009	-0,010	0,181	0,976	1,029	1,042
	0,996	0,062	0,030	0,011	0,009	-0,010	0,183	0,977	1,043	1,061
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,063	0,031	0,011	0,009	-0,010	0,181	0,972	1,032	1,050
SDV	0,008	0,002	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,008	0,010	0,010

Dexamethason			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g}/\text{mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,013	0,254	0,936	0,86	0,871	0,949	0,963	1,033	1,002	1,037
	1,007	0,248	0,917	0,861	0,843	0,951	0,966	1,028	0,997	1,035
	0,979	0,251	0,907	0,868	0,845	0,968	0,98	1,035	1,026	1,048
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,251	0,920	0,863	0,853	0,956	0,970	1,032	1,009	1,040
SDV	0,018	0,003	0,014	0,004	0,015	0,010	0,009	0,004	0,015	0,007

Taxifolin			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g}/\text{mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500	250	100	50	25	10	1	0,1
normalisierte Absorption	0,990	0,171	0,055	0,187	0,659	0,757	0,798	0,799	0,869	0,860
	1,005	0,168	0,054	0,184	0,653	0,753	0,792	0,787	0,869	0,860
	1,005	0,168	0,054	0,186	0,652	0,752	0,793	0,786	0,870	0,864
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,169	0,054	0,186	0,655	0,754	0,794	0,791	0,869	0,861
SDV	0,008	0,002	0,001	0,001	0,004	0,003	0,003	0,007	0,001	0,002

Silibinin			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g}/\text{mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	500	250	100	50	25	10	1	0,1
normalisierte Absorption	0,994	0,100	0,035	0,017	0,402	0,551	0,678	0,861	0,723	0,806
	1,002	0,101	0,035	0,017	0,439	0,560	0,683	0,868	0,747	0,830
	1,004	0,101	0,035	0,017	0,462	0,556	0,692	0,862	0,757	0,836
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,101	0,035	0,017	0,434	0,555	0,685	0,864	0,742	0,824
SDV	0,006	0,001	0,000	0,000	0,030	0,004	0,007	0,004	0,018	0,016

Urolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,998	0,050	0,637	0,498	0,437	0,531	0,718	0,936	0,986	0,946
	0,997	0,046	0,637	0,502	0,439	0,539	0,724	0,947	0,974	0,951
	1,005	0,046	0,632	0,497	0,433	0,527	0,718	0,938	0,965	0,940
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,047	0,635	0,499	0,436	0,532	0,720	0,941	0,975	0,945
SDV	0,004	0,002	0,003	0,002	0,003	0,006	0,004	0,006	0,011	0,006

Urolithin B			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,003	0,046	0,130	0,219	0,329	0,577	0,807	0,976	0,949	0,947
	1,004	0,045	0,128	0,222	0,335	0,574	0,812	0,977	0,948	0,940
	0,993	0,044	0,128	0,220	0,341	0,568	0,812	0,972	0,948	0,948
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,045	0,129	0,220	0,335	0,573	0,810	0,975	0,948	0,945
SDV	0,006	0,001	0,001	0,001	0,006	0,004	0,003	0,002	0,001	0,004

Urolithin C			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,005	0,046	0,157	0,232	0,404	0,555	0,798	0,816	0,948	0,971
	1,005	0,045	0,155	0,236	0,398	0,556	0,798	0,751	0,950	0,966
	0,991	0,044	0,155	0,224	0,410	0,564	0,803	0,765	0,970	0,976
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,045	0,156	0,231	0,404	0,558	0,800	0,778	0,956	0,971
SDV	0,008	0,001	0,001	0,006	0,006	0,005	0,003	0,034	0,012	0,005

Isourolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,976	0,242	0,17	0,323	0,454	0,599	1,099	1,052	1,013	1,051
	1,017	0,226	0,161	0,304	0,447	0,558	1,01	0,987	1,041	1,112
	1,007	0,261	0,189	0,332	0,473	0,588	1,035	1,014	1,062	1,148
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,243	0,173	0,320	0,458	0,582	1,048	1,017	1,039	1,104
SDV	0,021	0,017	0,014	0,014	0,014	0,021	0,046	0,033	0,024	0,049

M1			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	500	250	100	50	25	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,002	0,103	0,016	0,018	0,023	0,131	0,727	0,954	1,140	1,076
	1,013	0,104	0,015	0,018	0,022	0,125	0,734	0,955	1,116	1,082
	0,984	0,107	0,016	0,019	0,023	0,129	0,752	0,986	1,150	1,124
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,105	0,016	0,019	0,023	0,128	0,738	0,965	1,135	1,094
SDV	0,015	0,002	0,000	0,000	0,001	0,003	0,013	0,018	0,017	0,026

racemisches Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,001	0,047	0,182	0,141	0,148	0,639	0,782	1,027	0,991	0,946
	0,994	0,010	0,118	0,027	0,024	0,540	0,752	1,050	1,052	1,011
	1,005	0,017	0,130	0,064	0,044	0,557	0,751	1,047	1,024	0,988
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,025	0,143	0,077	0,072	0,579	0,762	1,041	1,022	0,982
SDV	0,006	0,020	0,034	0,058	0,067	0,053	0,018	0,013	0,031	0,033

(+)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,000	0,071	0,918	0,229	0,113	0,452	0,487	0,862	1,002	1,053
	0,997	0,060	0,901	0,194	0,068	0,424	0,491	0,884	1,025	1,065
	1,003	0,056	0,891	0,185	0,059	0,420	0,485	0,884	1,004	1,046
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,062	0,903	0,203	0,080	0,432	0,488	0,877	1,011	1,055
SDV	0,003	0,008	0,013	0,023	0,029	0,017	0,003	0,013	0,013	0,010

(-)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,030	0,144	0,917	0,534	0,092	0,605	0,786	1,163	1,142	1,131
	1,016	0,135	0,842	0,519	0,071	0,535	0,743	1,209	1,168	1,116
	0,954	0,135	0,842	0,517	0,086	0,522	0,727	1,206	1,231	1,168
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,138	0,867	0,523	0,083	0,554	0,752	1,193	1,181	1,139
SDV	0,041	0,005	0,043	0,009	0,011	0,044	0,030	0,026	0,046	0,026

1.1.4 Zytotoxizität nach 2 oder 4 h in Kulturmedium mit 100 µg/ml Gallensäuren und pH 6

n = Anzahl der Versuche

MW = Mittelwert

SDV = Standardabweichung

Verapamil			Verdünnungsreihe [µg/mL]							
	Kontrolle	ZnCl 100 µg/ml	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,015	0,217	0,069	0,096	0,195	0,705	0,841	1,344	1,337	1,012
	0,993	0,205	0,052	0,082	0,185	0,698	0,837	1,346	1,316	1,014
	0,993	0,195	0,052	0,078	0,183	0,696	0,825	1,344	1,304	1,004
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,206	0,058	0,086	0,188	0,700	0,834	1,345	1,319	1,010
SDV	0,013	0,011	0,010	0,009	0,006	0,004	0,008	0,001	0,017	0,005

Dexamethason			Verdünnungsreihe [µg/mL]							
	Kontrolle	ZnCl 100 µg/ml	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,011	0,153	1,010	1,024	0,971	1,016	1,052	1,075	1,070	0,954
	0,993	0,148	1,002	1,026	1,001	1,077	1,056	1,094	1,086	0,982
	0,996	0,147	0,969	1,011	0,977	1,082	1,045	1,087	1,081	0,938
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,149	0,994	1,020	0,983	1,058	1,051	1,085	1,079	0,958
SDV	0,010	0,003	0,021	0,008	0,016	0,037	0,006	0,010	0,008	0,022

Taxifolin			Verdünnungsreihe [µg/mL]							
	Kontrolle	ZnCl 100 µg/ml	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	0,967	0,152	0,120	0,547	0,693	0,809	0,931	0,995	0,946	0,922
	1,010	0,154	0,105	0,519	0,678	0,731	0,848	0,905	0,890	0,876
	1,023	0,187	0,099	0,507	0,644	0,724	0,839	0,902	0,885	0,844
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,165	0,108	0,524	0,672	0,755	0,873	0,934	0,907	0,881
SDV	0,029	0,020	0,011	0,021	0,025	0,047	0,051	0,053	0,034	0,039

Silibinin (nach 2 h)			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	0,994	0,309	0,628	0,751	0,748	0,853	0,908	0,912	0,933	0,987
	1,004	0,307	0,621	0,749	0,749	0,845	0,921	0,915	0,952	0,976
	1,002	0,310	0,619	0,749	0,743	0,846	0,917	0,914	0,945	0,968
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,309	0,623	0,750	0,746	0,848	0,916	0,914	0,943	0,977
SDV	0,005	0,001	0,005	0,001	0,003	0,004	0,007	0,002	0,009	0,009

Urolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,015	0,076	0,704	0,722	0,826	0,908	0,979	0,908	0,834	0,865
	1,003	0,08	0,72	0,738	0,845	0,948	1,002	0,925	0,863	0,878
	0,983	0,082	0,722	0,723	0,848	0,947	1,009	0,941	0,878	0,901
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,079	0,715	0,728	0,840	0,934	0,997	0,925	0,858	0,881
SDV	0,016	0,003	0,010	0,009	0,012	0,023	0,016	0,016	0,022	0,018

Urolithin B			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,983	0,220	1,519	1,301	0,829	1,201	1,063	1,135	1,100	1,010
	1,009	0,204	1,474	1,286	0,823	1,075	1,043	1,148	1,099	0,997
	1,009	0,202	1,462	1,197	0,802	1,056	1,024	1,145	1,067	1,013
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,209	1,485	1,261	0,818	1,110	1,043	1,143	1,088	1,007
SDV	0,015	0,010	0,030	0,056	0,014	0,079	0,019	0,007	0,019	0,008

Urolithin C			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,993	0,366	1,111	0,989	1,065	1,125	1,091	1,130	1,037	1,040
	0,990	0,369	1,124	1,006	1,104	1,150	1,131	1,172	1,058	1,053
	1,017	0,362	1,114	0,974	1,035	1,101	1,100	1,088	1,027	1,024
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,366	1,116	0,990	1,068	1,125	1,107	1,130	1,041	1,039
SDV	0,015	0,004	0,007	0,016	0,035	0,024	0,021	0,042	0,016	0,014

Isourolithin A			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,994	0,074	0,776	0,565	0,639	0,998	1,041	1,084	1,085	1,001
	0,988	0,079	0,779	0,557	0,648	1,006	1,047	1,088	1,097	1,002
	1,019	0,07	0,75	0,537	0,617	0,963	0,984	1,045	1,022	0,959
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,074	0,768	0,553	0,635	0,989	1,024	1,072	1,068	0,987
SDV	0,016	0,004	0,016	0,014	0,016	0,023	0,035	0,024	0,041	0,025

M1			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	1000	500	250	100	50	10	1	0,1
normalisierte Absorption	1,009	0,299	0,745	0,790	0,810	0,821	0,879	0,906	0,863	0,847
	0,996	0,302	0,754	0,799	0,825	0,833	0,896	0,922	0,879	0,866
	0,995	0,306	0,754	0,802	0,828	0,835	0,902	0,925	0,875	0,870
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,302	0,751	0,797	0,821	0,830	0,892	0,918	0,872	0,861
SDV	0,008	0,003	0,005	0,006	0,010	0,008	0,012	0,010	0,008	0,013

racemisches Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,991	0,234	0,774	0,590	0,760	1,180	0,972	1,234	1,074	0,873
	1,003	0,210	0,738	0,508	0,702	1,137	1,004	1,272	1,080	0,833
	1,006	0,203	0,746	0,513	0,686	1,159	1,017	1,277	1,055	0,811
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,216	0,753	0,537	0,716	1,159	0,998	1,261	1,069	0,839
SDV	0,008	0,016	0,019	0,046	0,039	0,021	0,023	0,024	0,013	0,031

(+)-Hydnocarpin D			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	0,991	0,307	0,711	0,610	0,959	0,872	0,885	0,816	0,813	0,748
	0,994	0,302	0,713	0,609	0,974	0,884	0,888	0,799	0,802	0,739
	1,016	0,292	0,709	0,584	0,935	0,870	0,862	0,761	0,770	0,719
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,301	0,711	0,601	0,956	0,875	0,878	0,792	0,795	0,735
SDV	0,014	0,008	0,002	0,015	0,020	0,008	0,014	0,028	0,022	0,015

(-)-Hydnocarpin D (nach 2 h)			Verdünnungsreihe [$\mu\text{g/mL}$]							
	Kontrolle	ZnCl 100 $\mu\text{g/ml}$	100	50	25	10	5	1	0,1	0,01
normalisierte Absorption	1,013	0,376	0,401	0,455	0,796	0,704	0,938	1,073	1,068	0,954
	0,994	0,36	0,368	0,41	0,734	0,67	0,955	1,091	1,094	1,014
	0,994	0,366	0,37	0,416	0,731	0,664	0,956	1,085	1,056	0,984
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
MW	1,000	0,367	0,380	0,427	0,754	0,679	0,949	1,083	1,073	0,984
SDV	0,011	0,008	0,018	0,025	0,037	0,022	0,010	0,009	0,019	0,030

1.2 Untersuchung der Stabilität der Substanzen in Zellkultur- und Versuchsmedium

1.2.1 Stabilität in Zellkulturmedium

Pr.A. = prozentualer Anteil MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

Taxifolin	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	265731	100	259341	100	283780	100	100	0
24 Stunden	72852	27,42	74112	28,58	71459	25,18	27,06	1,73

Silibinin	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	375687	100	360988	100	370306	100	100	0
24 Stunden	299576	79,74	292476	81,02	298996	80,74	80,50	0,67

Urolithin A	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	903560	100	814915	100	776361	100	100	0
24 Stunden	976522	108,07	806097	98,92	772270	99,47	102,16	5,13

Urolithin B	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	1542188	100	1554283	100	1511097	100	100	0
24 Stunden	1959320	127,05	1998675	128,59	2065452	136,69	130,78	5,18

Urolithin C	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	4963276	100	4791841	100	4900717	100	100	0
24 Stunden	4231776	85,26	4810591	100,39	4604899	93,96	93,21	7,59

Isourolithin A	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2569009	100	2720922	100	2885408	100	100	0
24 Stunden	2643365	102,89	2740184	100,71	2912395	100,94	101,51	1,20

M1	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	79123	100	40971	100	83118	100	100	0
24 Stunden	0	0	0	0	0	0	0	0

racemisches Hydnocarpin D	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	1692637	100	1715699	100	1978371	100	100	0
24 Stunden	1895365	111,98	1814970	105,79	1774885	89,71	102,49	11,49

(+) - Hydnocarpin D	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2336751	100	2124748	100	2161841	100	100	0
24 Stunden	2352170	100,66	2189428	103,04	2257601	104,43	102,71	1,91

(-) - Hydnocarpin D	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2735300	100	2425982	100	2335444	100	100	0
24 Stunden	2664137	97,40	2606732	107,45	2718802	116,41	107,09	9,51

Verapamil	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	731927	100	513376	100	1183975	100	100	0
24 Stunden	748153	102,22	625722	121,88	1513151	127,80	117,30	13,39

Dexamethason	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2478871	100	2471216	100	2407717	100	100	0
24 Stunden	2094619	84,50	2519746	101,96	2114760	87,83	91,43	9,27

1.2.2 Stabilität in Versuchsmedium

Pr.A. = prozentualer Anteil MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

Taxifolin	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	253092	100	232930	100	223517	100	100	0
4 Stunden	205040	81,01	223059	95,76	228408	102,19	92,99	10,86

Silibinin	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	458147	100	411264	100	422243	100	100	0
4 Stunden	411438	89,80	416698	101,32	109239	96,92	96,02	5,81

Urolithin A	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	905174	100	770430	100	765017	100	100	0
4 Stunden	969762	107,14	1167283	151,51	926457	121,10	126,58	22,69

Urolithin B	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	762558	100	773954	100	758655	100	100	0
4 Stunden	665924	87,33	737690	95,31	753709	99,35	94,00	6,12

Urolithin C	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	1842525	100	2121330	100	2094311	100	100	0
4 Stunden	1900461	103,14	2001531	94,35	2080081	99,32	98,94	4,41

Isourolithin A	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2926411	100	2906041	100	2949367	100	100	0
4 Stunden	2766627	94,54	3146456	108,27	3010781	102,08	101,63	6,88

M1	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	25072	100	26943	100	31959	100	100	0
4 Stunden	29749	118,65	30373	112,73	28303	88,56	106,65	15,94

racemisches Hydnocarpin D	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	2997564	100	2994666	100	2781230	100	100	0
4 Stunden	2570994	85,77	2753490	91,95	2001025	71,95	83,22	10,24

Verapamil	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	32972	100	26673	100	10435	100	100	0
2 Stunden	34209	103,75	51601	193,46	14141	135,52	144,24	45,49

Dexamethason	1		2		3		MW	SDV
	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.	Area	Pr.A.		
0 Stunden	949677	100	941146	100	978757	100	100	0
4 Stunden	977943	102,98	973160	103,40	981453	100,28	102,22	1,70

2 Untersuchung der antioxidativen Kapazität der Polyphenole

2.1 Eisen(II)-sulfat

1.Messtag							
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Endkonzentration inklusive Verdünnung [μ M]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9
Absorption nach 4 Minuten	1	0,489	0,413	0,296	0,218	0,101	0,068
	2	0,496	0,408	0,321	0,215	0,112	0,073
	3	0,484	0,41	0,296	0,2	0,105	0,067
	4	0,453	0,401	0,299	0,211	0,107	0,078
	5	0,456	0,419	0,283	0,207	0,127	0,073
Mittelwert		0,4756	0,4102	0,2990	0,2102	0,1104	0,0718
Standardabweichung		0,0198	0,0066	0,0138	0,0070	0,0101	0,0044

2.Messtag							
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Endkonzentration inklusive Verdünnung [μ M]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9
Absorption nach 4 Minuten	1	0,441	0,422	0,316	0,184	0,091	0,045
	2	0,415	0,401	0,315	0,183	0,1	0,056
	3	0,433	0,419	0,329	0,187	0,08	0,043
	4	0,426	0,419	0,307	0,18	0,081	0,038
	5	0,388	0,393	0,295	0,17	0,075	0,04
Mittelwert		0,4206	0,4108	0,3124	0,1808	0,0854	0,0444
Standardabweichung		0,0206	0,0130	0,0125	0,0065	0,0100	0,0070

3.Messtag							
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1
Endkonzentration inklusive Verdünnung [μ M]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9
Absorption nach 4 Minuten	1	0,388	0,308	0,252	0,17	0,079	0,035
	2	0,389	0,313	0,246	0,159	0,077	0,035
	3	0,389	0,331	0,247	0,162	0,077	0,035
	4	0,4	0,313	0,247	0,158	0,071	0,037
	5	0,401	0,343	0,252	0,163	0,083	0,037
Mittelwert		0,3934	0,3216	0,2488	0,1624	0,0774	0,0358
Standardabweichung		0,0065	0,0148	0,0029	0,0047	0,0043	0,0011

2.2 Kontrollen

MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

Ascorbinsäure								Absorption	
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄	
Endkonzentration [μ M]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,4756
Absorption nach 4 Minuten	1	0,814	0,661	0,501	0,354	0,218	0,125	$y = 0,0257x + 0,0549$	16,37
	2	0,926	0,792	0,55	0,397	0,235	0,126	$y = 0,0305x + 0,0419$	14,22
	3	0,865	0,73	0,537	0,374	0,21	0,144	$y = 0,0279x + 0,0525$	15,16
	4	0,847	0,725	0,547	0,39	0,218	0,148	$y = 0,0271x + 0,0681$	15,04
	5	0,899	0,789	0,6	0,429	0,253	0,188	$y = 0,0279x + 0,1022$	13,38
MW		0,8702	0,7394	0,5470	0,3888	0,2268	0,1462		14,834 μM
SDV		0,0438	0,0540	0,0355	0,0279	0,0173	0,0256		1,118

Trolox								Absorption	
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄	
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,4756
Absorption nach 4 Minuten	1	0,793	0,601	0,483	0,309	0,175	0,113	$y = 0,0255x + 0,0258$	17,64
	2	0,878	0,745	0,555	0,396	0,197	0,16	$y = 0,0283x + 0,0585$	14,74
	3	0,861	0,716	0,526	0,381	0,219	0,133	$y = 0,0276x + 0,0535$	15,29
	4	0,716	0,627	0,468	0,328	0,177	0,099	$y = 0,0239x + 0,0398$	18,23
	5	0,868	0,733	0,55	0,389	0,206	0,117	$y = 0,0287x + 0,041$	15,14
MW		0,8232	0,6844	0,5164	0,3606	0,1948	0,1244		16,208 µM
SDV		0,0686	0,0657	0,0393	0,0394	0,0189	0,0233		1,603

2.3 Probesubstanzen

MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung

Taxifolin								Absorption	
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄	
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,4756
Absorption nach 4 Minuten	1	0,872	0,669	0,492	0,387	0,228	0,153	$y = 0,0263x + 0,0669$	15,43
	2	0,848	0,774	0,547	0,398	0,229	0,15	$y = 0,0276x + 0,0722$	14,62
	3	0,866	0,758	0,536	0,399	0,253	0,151	$y = 0,0273x + 0,0791$	14,52
	4	0,832	0,725	0,555	0,391	0,238	0,157	$y = 0,0261x + 0,0862$	14,92
	5	0,816	0,738	0,558	0,391	0,223	0,143	$y = 0,0265x + 0,0756$	15,09
MW		0,8468	0,7328	0,5376	0,3932	0,2342	0,1508		14,916 µM
SDV		0,0233	0,0403	0,0269	0,0051	0,0118	0,0051		0,367

Silibinin								Absorption	
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄	
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,4756
Absorption nach 4 Minuten	1	0,32	0,236	0,2	0,149	0,105	0,071	$y = 0,0096x + 0,0437$	44,99
	2	0,313	0,284	0,221	0,151	0,104	0,066	$y = 0,0091x + 0,0569$	46,01
	3	0,317	0,279	0,224	0,16	0,12	0,074	$y = 0,0088x + 0,046$	48,82
	4	0,319	0,279	0,223	0,142	0,11	0,07	$y = 0,0096x + 0,0451$	44,84
	5	0,298	0,278	0,222	0,164	0,111	0,072	$y = 0,0088x + 0,0575$	47,51
MW		0,3134	0,2712	0,218	0,1532	0,11	0,0706		46,434 µM
SDV		0,0090	0,0198	0,0101	0,0088	0,0064	0,0030		1,707

Urolithin A								Absorption	
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄	
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,4206
Absorption nach 4 Minuten	1	0,634	0,545	0,457	0,297	0,179	0,115	$y = 0,0201x + 0,0658$	17,65
	2	0,605	0,556	0,42	0,29	0,181	0,11	$y = 0,0195x + 0,0649$	18,24
	3	0,609	0,558	0,441	0,301	0,179	0,12	$y = 0,0194x + 0,0731$	17,91
	4	0,612	0,566	0,43	0,292	0,175	0,11	$y = 0,0199x + 0,0613$	18,06
	5	0,619	0,568	0,431	0,292	0,169	0,118	$y = 0,0201x + 0,0611$	17,89
MW		0,6158	0,5586	0,4358	0,2944	0,1766	0,1146		17,95 µM
SDV		0,0114	0,0092	0,0140	0,0045	0,0048	0,0046		0,219

Urolithin B									Absorption
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1		1 mM FeSO ₄
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,3934
Absorption nach 4 Minuten	1	0,007	0,005	0,004	0,002	0	0	$y = 0,0003x - 0,0012$	1315,33
	2	0,009	0,006	0,004	0,003	0,002	0	$y = 0,0003x - 0,0006$	1313,33
	3	0,007	0,005	0,004	0,001	0	-0,001	$y = 0,0003x - 0,0019$	1317,67
	4	0,006	0,007	0,002	0,001	0	-0,001	$y = 0,0003x - 0,002$	1318
	5	0,007	0,008	0,006	0,002	0,001	0	$y = 0,0003x - 0,0008$	1314
MW		0,0072	0,0062	0,0040	0,0018	0,0006	-0,0004		1315,666 µM
SDV		0,0011	0,0013	0,0014	0,0008	0,0009	0,0005		2,110

Urolithin C									Absorption
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1		1 mM FeSO ₄
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,3934
Absorption nach 4 Minuten	1	1,154	1,015	0,827	0,581	0,359	0,198	$y = 0,0364x + 0,1368$	7,05
	2	1,182	1,041	0,828	0,569	0,337	0,186	$y = 0,0383x + 0,1092$	7,42
	3	1,221	0,995	0,824	0,589	0,345	0,196	$y = 0,0381x + 0,1166$	7,27
	4	1,242	1,012	0,816	0,574	0,33	0,215	$y = 0,0388x + 0,1089$	7,33
	5	1,019	1,032	0,824	0,628	0,35	0,214	$y = 0,0325x + 0,1851$	6,41
MW		1,1636	1,0190	0,8238	0,5882	0,3442	0,2018		7,096 µM
SDV		0,0877	0,0180	0,0047	0,0235	0,0113	0,0125		0,407

Isourolithin A								Absorption
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden 0,3934
Absorption nach 4 Minuten	1	0,006	0,006	0,004	0,003	0,002	0,001	$y = 0,0002x + 0,0007$ 1963,5
	2	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	$y = 0,00007x + 0,0015$ 5598,57
	3	0,005	0,004	0,003	0,004	0,002	0,003	$y = 0,00008x + 0,0023$ 4888,75
	4	0,005	0,005	0,004	0,002	0,002	0,002	$y = 0,0001x + 0,0012$ 3922
	5	0,007	0,004	0,003	0,002	0,002	0,002	$y = 0,002x + 0,0007$ 1963,5
MW		0,0054	0,0044	0,0034	0,0026	0,0020	0,0020	3667,264 µM
SDV		0,0011	0,0011	0,0005	0,0009	0,0000	0,0007	1665,269

M1								Absorption
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	1 mM FeSO ₄
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden 0,4206
Absorption nach 4 Minuten	1	1,067	0,846	0,574	0,444	0,248	0,093	$y = 0,0355x + 0,0067$ 11,66
	2	0,985	0,803	0,541	0,425	0,22	0,092	$y = 0,0331x + 0,009$ 12,44
	3	0,988	0,823	0,543	0,399	0,219	0,091	$y = 0,0337x - 0,0008$ 12,5
	4	1,021	0,834	0,568	0,423	0,228	0,09	$y = 0,0346x + 0,0025$ 12,08
	5	1,039	0,827	0,567	0,422	0,204	0,09	$y = 0,0354x - 0,0122$ 12,23
MW		1,0200	0,8266	0,5586	0,4226	0,2238	0,0912	12,182 µM
SDV		0,0347	0,0158	0,0154	0,0160	0,0161	0,0013	0,336

Racemat D									Absorption
Konzentration [mM]		1	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1		1 mM FeSO ₄
Endkonzentration [µM]		29,4	23,5	17,6	11,8	5,9	2,9	Geraden	0,3934
Absorption nach 4 Minuten	1	0,158	0,138	0,125	0,1	0,061	0,036	$y = 0,0045x + 0,0351$	79,62
	2	0,159	0,15	0,122	0,098	0,06	0,036	$y = 0,0047x + 0,0328$	76,72
	3	0,163	0,146	0,124	0,097	0,059	0,035	$y = 0,0048x + 0,0311$	75,48
	4	0,161	0,15	0,128	0,1	0,058	0,035	$y = 0,0047x + 0,0332$	76,64
	5	0,163	0,146	0,118	0,102	0,061	0,036	$y = 0,0048x + 0,032$	75,29
MW		0,1608	0,146	0,1234	0,0994	0,0598	0,0356		76,75 µM
SDV		0,0023	0,0049	0,0037	0,0019	0,0013	0,0005		1,732

2.4 Zeitliche Absorptionsänderung einer 1 mM-Lösung

Zeit [sec]	Eisen(II)-sulfat	Ascorbinsäure	Trolox	Taxifolin	Silibinin
0	0,0694	0,1402	0,1208	0,1362	0,012
15	0,0708	0,1408	0,1198	0,1422	0,0166
30	0,0704	0,1398	0,121	0,1442	0,0234
45	0,0706	0,1426	0,1226	0,1444	0,0286
60	0,0692	0,1426	0,123	0,1462	0,0324
75	0,0716	0,1428	0,1226	0,147	0,0372
90	0,0718	0,143	0,1216	0,1474	0,042
105	0,0704	0,1436	0,1236	0,1474	0,0454
120	0,0706	0,1436	0,1236	0,1488	0,049
135	0,0698	0,1444	0,1222	0,1494	0,0528
150	0,0714	0,1426	0,1236	0,15	0,0554
165	0,0716	0,1444	0,1228	0,1498	0,0584
180	0,0708	0,1448	0,1242	0,1498	0,0612
195	0,0718	0,1458	0,1224	0,1504	0,064
210	0,071	0,1464	0,1244	0,1506	0,0648
225	0,0722	0,1446	0,1238	0,1502	0,0702
240	0,0718	0,1462	0,1244	0,1508	0,0706

Zeit [sec]	Urolithin A	Urolithin C	M1	racemisches Hydnocarpin D
0	0,0156	0,2028	0,088	0,0784
15	0,025	0,228	0,0886	0,0818
30	0,0336	0,2372	0,0884	0,085
45	0,0428	0,2436	0,089	0,087
60	0,0506	0,2472	0,089	0,0896
75	0,0586	0,2508	0,0894	0,091
90	0,066	0,2526	0,0894	0,0936
105	0,0732	0,255	0,0898	0,095
120	0,0794	0,2566	0,0898	0,097
135	0,0846	0,2574	0,0902	0,0974
150	0,0904	0,2596	0,09	0,0994
165	0,095	0,26	0,0902	0,1008
180	0,0998	0,2616	0,09	0,102
195	0,104	0,2618	0,0908	0,1028
210	0,108	0,263	0,0912	0,1038
225	0,1116	0,2636	0,0906	0,1042
240	0,1146	0,2644	0,0912	0,1054

3 Verkürzung der Kulturzeit in Transportversuchen

3.1 Werte der TEER-Messung der Zellmonolayer an den verschiedenen Versuchstagen der vier Experimente

Kulturtag	1	2	3	4	Mittelwert	SDV
1	68,42	128,378	238,77	303,01	184,64	105,8548756
3	274,86	455,39	396,6	514,22	410,27	102,246063
5	310,34	574,01	405,84	787,71	519,47	209,424468
7	376,77	638,9	366,19	700,63	520,62	174,1031884
9	447,27	693,92	363,79	695,16	550,04	170,3041745
11	521,1	477,68	405,16	628,69	508,16	93,51130869
13	653,31	452,58	527,37	770,39	600,91	140,0920097
15	470,7	587,09	446,73	854,42	589,73	186,8013092
17	576,78	692,11	465,73	865,65	650,07	170,8742373
19	539,49	866,68	454,64	735,15	648,99	186,7021197
21	521,99	834,45	242,44	676,6	568,87	252,2523268

SDV = Standardabweichung

3.2 Prozentualer Transport von Lucifer Yellow an den verschiedenen Versuchstagen zur Evaluierung der Monolayerqualität

Tag	1	3	4	7	9	11	13	15	17	19	21	ohne Zellen
	1,11	0,3	0,34	0,32	0,29	0,29	0,25	0,3	0,43	0,29	0,34	5,83
	1,12	0,28	0,33	0,31	0,31	0,28	0,27	0,28	0,47	0,36	0,34	5,84
	1,3	0,32	0,34	0,31	0,28	0,3	0,27	0,29	0,44	0,33	0,35	5,36
	0,64	0,26		0,27	0,29		0,38	0,41	0,37		0,42	5,31
	0,59	0,26		0,27	0,27		0,41	0,45	0,38		1,02	6,04
	0,73	0,54		0,23	0,37		0,4	0,45	0,42		0,38	4,93
	0,8	0,36		0,24	0,38		0,3	0,35			0,39	
	0,56	0,35		0,26	0,37		0,33	0,39			0,49	
	0,95	0,91		0,21	0,48		0,28	0,39			0,66	
	0,44			0,29			0,41	0,73				
	0,39			0,3			0,41	0,6				
	0,84			0,31			0,5	0,41				
n	12	9	3	12	9	3	12	12	6	3	9	6
MW	0,79	0,4	0,34	0,28	0,34	0,29	0,35	0,42	0,42	0,33	0,49	5,55
SDV	0,29	0,21	0,01	0,04	0,07	0,01	0,08	0,13	0,04	0,04	0,22	0,42

n = Stichprobenzahl

MW = Mittelwert

SDV = Standardabweichung

3.3 Aktivität der p-GP-Transporter

3.3.1 Konzentration und Reinheit der an den jeweiligen Versuchstagen aus CaCo-II-Zellen isolierten RNA zur Bestimmung der p-GP-Aktivität

Versuchstag	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
1	52,32	2,08	54,24	2
3	61,04	2,15	61,36	2,17
5	61,76	1,99	59,52	2,06
7	53,6	2,06	52,72	2
9	55,04	2,02	54,08	2,07
11	29,36	2,24	30,08	2,22
13	67,2	2,06	65,84	2,09
15	43,36	2,11	43,84	2,02
17	48,8	1,66	38,8	2,05
19	58,32	2,05	55,76	1,96
21	56,72	1,93	55,84	2,02

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

3.3.2 Reaktionseffizienzen und Schmelzpunkte

PCR-Platte	Geradengleichung der Kalibriergeraden	R ²	Effizienz [%]	T _m [°C]
1	$y = -3.377 * \log(X) + 22.47$	0,992	97,8	82,8
2	$y = -3.125 * \log(X) + 23.98$	0,995	108,9	83,0

R² = Bestimmtheitsmaß

T_m = experimentell ermittelte Schmelztemperatur des PCR-Produktes

3.3.3 Expression von p-GP an den verschiedenen Versuchstagen

Versuchstag	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert
1	0,859	0,674 - 1,064	0,150
3	0,357	0,305- 0,418	0,0001
5	0,648	0,575 - 0,713	0,001
7	1,102	1,023 - 1,164	0,013
9	1,327	1,146 - 1,564	0,004
11	0,758	0,630 - 0,909	0,0001
13	1,247	1,162 - 1,330	0,001
15	1,270	1,130 - 1,446	0,004
17	0,241	0,209 - 0,276	0,0001
19	0,821	0,736 - 0,934	0,0001

3.4 Vergleich des Rhodamintransportes nach 14 und 21 Tagen

baso = Rhodamintransport von apikaler in basolateraler Richtung

api = Rhodamintransport von basolateraler in apikaler Richtung

Ratio = Verhältnis baso/api n = Stichprobenzahl

SDV = Standardabweichung MW = Mittelwert

3.4.1 Permeabilitätskoeffizienten und Ratio für Rhodamin 123 nach 12 und 21 Tagen

	12 Tage			21 Tage		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	4,78407E-07	7,70169E-07	1,61	4,85111E-08	7,00705E-08	1,44
	5,4603E-07	8,46282E-07	1,55	4,602E-08	6,04161E-08	1,31
	6,36875E-07	7,81912E-07	1,23	4,84002E-08	6,93118E-08	1,43
	5,24009E-07	5,62833E-07	1,07	5,65026E-07	6,44889E-07	1,14
	5,26762E-07	6,10219E-07	1,16	5,14521E-07	6,66694E-07	1,30
	6,00947E-07	7,54444E-07	1,26	5,76637E-07	6,3435E-07	1,10
	4,74606E-07	5,83757E-07	1,23	8,36882E-07	1,00982E-06	1,21
	4,36085E-07	6,07067E-07	1,39	8,45412E-07	1,00951E-06	1,19
	4,95742E-07	4,88284E-07	0,98	8,44909E-07	1,10778E-06	1,31
	4,71026E-07	6,07851E-07	1,29	1,71814E-08	2,80765E-08	1,63
	6,54177E-07	5,56824E-07	0,85	1,80424E-08	2,0927E-08	1,16
	5,45571E-07	5,06555E-07	0,93	1,71672E-08	2,28424E-08	1,33
	5,23518E-07	4,99953E-07	0,95	1,69078E-07	2,67774E-07	1,58
	6,57797E-07	5,67599E-07	0,86	1,82717E-07	2,51833E-07	1,38
	5,31394E-07	4,8447E-07	0,91	1,80069E-07	2,64671E-07	1,47
n	15	15	15	15	15	15
MW	5,40E-07	6,15E-07	1,15	3,27E-07	4,09E-07	1,33
SDV	6,89E-08	1,17E-07	0,24	3,32E-07	4,00E-07	0,16

3.4.2 Normalisierung der Permeabilitätskoeffizienten und der Ratios für Rhodamin 123 nach 12 und 21 Tagen

	12 Tage			21 Tage		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	1,46	1,88	1,21	0,15	0,17	1,08
	1,67	2,07	1,16	0,14	0,15	0,98
	1,95	1,91	0,92	0,15	0,17	1,07
	1,60	1,38	0,81	1,73	1,58	0,86
	1,61	1,49	0,87	1,57	1,63	0,97
	1,84	1,85	0,94	1,76	1,55	0,83
	1,45	1,43	0,92	2,56	2,47	0,91
	1,33	1,49	1,04	2,58	2,47	0,90
	1,51	1,20	0,74	2,58	2,71	0,98
	1,44	1,49	0,97	0,05	0,07	1,23
	2,00	1,36	0,64	0,06	0,05	0,87
	1,67	1,24	0,70	0,05	0,06	1,00
	1,60	1,22	0,72	0,52	0,66	1,19
	2,01	1,39	0,65	0,56	0,62	1,03
	1,62	1,19	0,68	0,55	0,65	1,10
n	15	15	15	15	15	15
MW	1,65	1,51	0,86	1,00	1,00	1,00
SDV	0,210431	0,286930	0,18	1,013109	0,980004	0,12

3.4.3 Permeabilitätskoeffizienten und Ratio für Rhodamin 123 nach 14 und 21 Tagen

	14 Tage			21 Tage		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	1,56357E-07	1,5524E-07	0,99	4,85111E-08	7,00705E-08	1,44
	1,9086E-07	2,0993E-07	1,10	4,602E-08	6,04161E-08	1,31
	1,70966E-07	3,056E-07	1,79	4,84002E-08	6,93118E-08	1,43
	1,09466E-07	1,65E-07	1,51	5,65026E-07	6,44889E-07	1,14
	1,43188E-07	2,1604E-07	1,51	5,14521E-07	6,66694E-07	1,30
	1,87106E-07	2,5238E-07	1,35	5,76637E-07	6,3435E-07	1,10
	1,81559E-07	2,0753E-07	1,14	8,36882E-07	1,00982E-06	1,21
	1,65019E-07	2,509E-07	1,52	8,45412E-07	1,00951E-06	1,19
	1,96971E-07	3,7219E-07	1,89	8,44909E-07	1,10778E-06	1,31
	2,0295E-07	2,9203E-07	1,44	1,71814E-08	2,80765E-08	1,63
	2,35709E-07	1,5129E-07	0,64	1,80424E-08	2,0927E-08	1,16
	2,14228E-07	2,1925E-07	1,02	1,71672E-08	2,28424E-08	1,33
	2,02314E-07	2,9492E-07	1,46	1,69078E-07	2,67774E-07	1,58
	2,17451E-07	2,0634E-07	0,95	1,82717E-07	2,51833E-07	1,38
	1,15444E-07	2,1065E-07	1,82	1,80069E-07	2,64671E-07	1,47
n	15	15	15	15	15	15
MW	1,79E-07	2,34E-07	1,34	3,27E-07	4,09E-07	1,33
SDV	3,64E-08	6,14E-08	0,36	3,32E-07	4,00E-07	0,16

3.4.4 Normalisierung der Permeabilitätskoeffizienten und der Ratios für Rhodamin 123 nach 14 und 21 Tagen

	14 Tage			21 Tage		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	0,48	0,38	0,74	0,15	0,17	1,08
	0,58	0,51	0,83	0,14	0,15	0,98
	0,52	0,75	1,34	0,15	0,17	1,07
	0,33	0,40	1,13	1,73	1,58	0,86
	0,44	0,53	1,13	1,57	1,63	0,97
	0,57	0,62	1,01	1,76	1,55	0,83
	0,55	0,51	0,86	2,56	2,47	0,91
	0,50	0,61	1,14	2,58	2,47	0,90
	0,60	0,91	1,42	2,58	2,71	0,98
	0,62	0,71	1,08	0,05	0,07	1,23
	0,72	0,37	0,48	0,06	0,05	0,87
	0,65	0,54	0,77	0,05	0,06	1,00
	0,62	0,72	1,09	0,52	0,66	1,19
	0,66	0,50	0,71	0,56	0,62	1,03
	0,35	0,52	1,37	0,55	0,65	1,10
n	15	15	15	15	15	15
MW	0,55	0,57	1,01	1,00	1,00	1,00
SDV	0,111090	0,150386	0,27	1,013109	0,980004	0,12

4 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport

n = Anzahl der Versuche

MW = Mittelwert

baso = Transport in basolaterale Richtung [$\times 10^{-7}$ cm/s]

api = Transport in apikale Richtung [$\times 10^{-7}$ cm/s]

SDV = Standardabweichung

4.1 Einfluss auf den Transport von Rhodamin 123 in HBSS

4.1.1 P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios in HBSS

	Dexamethason			Verapamil			(-)-Hydrocarpin D			(+)Hydrocarpin D			n	MW	SDV	
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio				
	4,50	11,2	2,49	0,11	0,05	0,42	5,18	10,6	2,04	0,19	0,14	0,71	15	15	1,11	15
	4,97	13,9	2,80	0,11	0,05	0,43	5,49	9,83	1,79	0,47	0,24	0,51	15	15	5,36	15
	5,01	15,2	3,04	0,11	0,05	0,43	8,75	6,17	0,70	0,15	0,19	1,37	15	15	1,11	15
	6,19	20,8	3,37	1,04	0,82	0,79	4,81	6,09	1,27	0,35	0,09	0,28	15	15	6,19	15
	5,90	15,0	2,55	0,92	0,90	0,98	6,14	6,63	1,08	0,19	0,14	0,75	15	15	5,90	15
	6,12	16,7	2,73	0,91	0,79	0,86	6,21	7,95	1,28	0,17	0,12	0,71	15	15	6,12	15
	5,92	11,6	1,96	10,3	5,63	0,55	5,64	5,19	0,92	0,35	0,31	0,88	15	15	5,92	15
	5,56	12,8	2,31	9,16	5,89	0,64	5,66	5,24	0,93	0,13	0,49	3,82	15	15	5,56	15
	5,93	14,6	2,46	13,3	5,23	0,39	5,88	6,09	1,04	0,23	0,14	0,59	15	15	5,93	15
	6,74	11,9	1,76	4,15	3,37	0,81	7,15	9,74	1,36	0,12	0,08	0,66	15	15	6,74	15
	5,72	11,8	2,05	4,46	3,55	0,79	9,03	12,1	1,34	0,27	0,23	0,84	15	15	5,72	15
	7,01	11,5	1,64	4,52	3,34	0,74	6,95	8,72	1,25	0,19	0,19	0,95	15	15	7,01	15
	3,61	9,51	2,64	0,14	0,14	0,98	6,75	15,1	2,24	0,15	0,08	0,52	15	15	3,61	15
	3,42	10,1	2,97	0,16	0,13	0,81	4,45	10,1	2,26	0,33	0,06	0,18	15	15	3,42	15
	3,77	14,5	3,85	0,15	0,14	0,91	8,48	9,33	1,10	0,000	0,002	8,80	15	15	3,77	15
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	5,36	1,34	2,57	3,30	2,00	0,70	6,44	8,59	1,37	0,22	0,17	1,44	15	15	5,36	15
	1,11	2,89	0,59	4,34	2,25	0,21	1,41	2,79	0,49	0,12	0,12	2,21	15	15	1,11	15

Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			M1			rac. Hydrocarpin D		
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
1,17	1,98	1,69	2,08	6,11	2,93	1,74	3,43	1,97	1,16	1,96	1,70	0,29	0,66	2,25	1,62	4,59	2,82
1,01	1,76	1,73	2,34	7,68	3,28	1,98	3,25	1,64	1,48	2,55	1,72	0,25	0,48	1,94	2,95	1,01	0,34
1,28	2,41	1,88	1,64	6,86	4,17	1,91	3,03	1,59	1,24	2,61	2,11	0,28	0,49	1,77	2,05	2,45	1,19
2,59	8,26	3,19	2,07	7,01	3,38	1,67	6,40	3,84	0,92	2,37	2,58	13,3	43,2	3,24	3,53	6,89	1,95
2,93	9,42	3,21	2,38	8,33	3,50	1,78	5,95	3,34	0,90	2,81	3,12	13,5	52,9	3,93	1,88	3,05	1,62
2,76	9,46	3,43	2,47	8,27	3,35	1,89	4,90	2,58	0,89	2,59	2,90	14,6	39,4	2,69	5,13	10,9	2,13
3,69	4,74	1,28	3,91	9,15	2,34	1,32	5,87	4,42	0,87	2,42	2,78	8,60	18,5	2,15	2,22	2,43	1,09
3,43	4,80	1,40	4,09	7,73	1,89	1,55	5,67	3,66	1,12	2,61	2,33	12,8	12,9	1,01	3,71	1,94	0,52
4,13	4,38	1,06	3,89	7,27	1,87	1,51	5,30	3,51	0,80	2,65	3,30	11,9	13,5	1,14	2,98	0,99	0,33
			3,03	8,88	2,93	1,54	6,21	4,02	0,66	1,39	2,11				4,09	3,80	0,93
			3,65	9,98	2,73	1,63	5,05	3,10	0,67	1,46	2,19				4,26	2,60	0,61
			3,44	7,94	2,31	1,78	5,41	3,05	0,63	1,43	2,28				2,59	6,70	2,59
			3,08	8,93	2,89	1,67	6,14	3,67	0,76	1,51	1,97				3,45	2,32	0,67
			3,94	9,00	2,29	1,77	5,54	3,12	0,74	1,64	2,22				1,99	3,51	1,76
			3,20	1,04	3,25	1,69	5,44	3,22	0,71	1,51	2,11				2,89	1,05	0,36
9	9	9	15	15	15	15	15	15	15	15	15	9	9	9	15	15	15
2,56	5,25	2,10	3,02	8,23	2,87	1,7	5,17	3,12	0,90	2,10	2,36	8,39	20,2	2,24	3,02	3,62	1,26
1,15	3,09	0,92	0,80	1,18	0,65	0,17	1,09	0,84	0,25	0,55	0,48	6,31	2,01	0,94	1,00	2,72	0,84

	Rhodamin 123			Taxifolin			Silibinin		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	2,21	4,55	2,06	2,80	0,85	0,30	0,26	0,55	2,12
	2,26	4,81	2,10	2,42	0,97	0,40	0,24	0,53	2,19
	2,44	4,64	1,90	3,07	0,96	0,31	0,29	0,59	2,05
	0,49	0,7	1,44	0,11	0,29	2,59	0,64	0,79	1,24
	0,46	0,4	1,31	0,1	0,27	2,73	0,65	0,92	1,42
	0,48	0,69	1,43	0,12	0,34	2,97	0,65	0,81	1,25
	5,65	6,45	1,14	3,27	1,14	0,35	2,86	7,30	2,55
	5,14	6,67	1,30	3,20	1,18	0,37	2,88	7,48	2,60
	5,77	6,34	1,10	3,27	1,20	0,37	3,06	7,93	2,59
	8,37	10,1	1,21	5,53	7,43	1,35			
	8,45	10,1	1,19	5,43	7,53	1,39			
	8,45	11,1	1,31	4,78	7,43	1,56			
	0,17	0,28	1,63						
	0,18	0,21	1,16						
	0,17	0,23	1,33						
	1,69	2,68	1,58						
	1,83	2,52	1,38						
	1,8	2,66	1,47						
n	18	18	18	12	12	12	9	9	9
MW	3,11	4,18	1,45	2,84	2,47	1,22	1,28	2,99	2,00
SDV	3,03	3,64	0,30	1,93	3,03	1,04	1,25	3,44	0,56

4.1.2 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Verapamil			Dexamethason			n
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	
	0,04	0,01	0,29	1,45	2,68	1,72	15
	0,03	0,01	0,30	1,60	3,32	1,93	15
	0,04	0,01	0,29	1,61	3,64	2,10	15
	0,33	0,20	0,54	1,99	4,98	2,32	15
	0,30	0,22	0,68	1,90	3,60	1,76	15
	0,29	0,19	0,60	1,97	3,99	1,88	15
	3,31	1,35	0,38	1,90	2,78	1,36	15
	2,94	1,41	0,44	1,79	3,07	1,59	15
	4,27	1,25	0,27	1,90	3,49	1,70	15
	1,33	0,81	0,56	2,16	2,83	1,22	15
	1,43	0,85	0,55	1,84	2,81	1,42	15
	1,45	0,80	0,51	2,25	2,76	1,14	15
	0,04	0,03	0,67	1,16	2,27	1,82	15
	0,05	0,03	0,56	1,10	2,43	2,05	15
	0,05	0,03	0,63	1,21	3,46	2,66	15
n	15	15	15	15	15	15	15
MW	1,06	0,48	0,48	1,72	3,21	1,78	1,78
SDV	1,39	0,54	0,14	0,36	0,69	0,41	0,41

Urolithin C			Isourolithin A			M1			rac. Hydrocarpin D			(+)Hydrocarpin D			(-)Hydrocarpin D		
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
0,56	0,82	1,36	0,37	0,47	1,17	0,09	0,16	1,56	0,52	1,10	1,95	0,06	0,03	0,49	1,66	2,53	1,41
0,64	0,78	1,13	0,48	0,61	1,19	0,08	0,12	1,34	0,95	0,24	0,24	0,15	0,06	0,35	1,76	2,35	1,24
0,61	0,72	1,10	0,40	0,62	1,46	0,09	0,12	1,22	0,66	0,58	0,82	0,05	0,05	0,95	2,81	1,47	0,49
0,54	1,53	2,65	0,30	0,57	1,78	4,28	10,33	2,24	1,13	1,65	1,35	0,11	0,02	0,19	1,54	1,46	0,88
0,57	1,42	2,31	0,29	0,67	2,16	4,70	9,42	1,86	0,60	0,73	1,12	0,06	0,03	0,52	1,97	1,59	0,75
0,61	1,17	1,78	0,29	0,62	2,00	2,76	4,42	1,48	1,65	2,61	1,47	0,05	0,03	0,49	1,99	1,90	0,88
0,43	1,40	3,05	0,28	0,58	1,92	4,11	3,10	0,70	0,71	0,58	0,75	0,11	0,07	0,61	1,81	1,24	0,64
0,50	1,36	2,53	0,36	0,62	1,61	3,82	3,23	0,79	1,19	0,46	0,36	0,08	0,03	0,41	1,82	1,25	0,64
0,49	1,27	2,42	0,26	0,63	2,28				0,96	0,24	0,23	0,04	0,02	0,45	1,89	1,46	0,72
0,50	1,49	2,78	0,21	0,33	1,45				1,31	0,91	0,64	0,09	0,06	0,58	2,30	2,33	0,94
0,52	1,21	2,14	0,21	0,35	1,51				1,37	0,62	0,42	0,06	0,04	0,66	2,90	2,90	0,93
0,57	1,29	2,10	0,20	0,34	1,58				0,83	1,60	1,79	0,05	0,02	0,36	2,23	2,08	0,87
0,54	1,47	2,54	0,25	0,36	1,36				1,11	0,55	0,46	0,11	0,01	0,13	2,17	3,61	1,54
0,57	1,32	2,16	0,24	0,39	1,54				0,64	0,84	1,22				1,43	2,41	1,56
0,54	1,30	2,22	0,23	0,36	1,46				0,93	0,25	0,25				2,72	2,23	0,76
15	15	15	15	15	15	8	8	8	15	15	15	13	13	13	15	15	15
0,55	1,24	2,15	0,29	0,50	1,63	2,49	3,86	1,40	0,97	0,86	0,87	0,08	0,04	0,48	2,07	2,05	0,95
0,05	0,26	0,58	0,08	0,13	0,33	2,07	4,07	0,51	0,32	0,65	0,58	0,03	0,02	0,21	0,45	0,67	0,34

	Rhodamin 123			Taxifolin			Silibinin			Urolithin A			Urolithin B		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	0,71	1,09	1,42	0,90	0,20	0,21	0,08	0,13	1,46	0,38	0,47	1,17	0,67	1,46	2,03
	0,73	1,15	1,45	0,78	0,23	0,28	0,08	0,13	1,51	0,33	0,42	1,20	0,75	1,83	2,26
	0,78	1,11	1,32	0,98	0,23	0,21	0,09	0,14	1,42	0,41	0,58	1,30	0,53	1,64	2,88
	0,16	0,17	1,00	0,04	0,07	1,79	0,21	0,19	0,86	0,83	1,97	2,20	0,67	1,68	2,34
	0,15	0,14	0,91	0,03	0,06	1,89	0,21	0,22	0,98	0,94	2,25	2,22	0,76	1,99	2,42
	0,16	0,17	0,99	0,04	0,08	2,05	0,21	0,19	0,86	0,89	2,26	2,37	0,79	1,98	2,31
	1,81	1,54	0,79	1,05	0,27	0,24	0,92	1,75	1,76	1,19	1,13	0,89	1,26	2,19	1,61
	1,65	1,59	0,89	1,03	0,28	0,25	0,93	1,79	1,79	1,10	1,15	0,97	1,31	1,85	1,30
	1,85	1,52	0,76	1,05	0,29	0,25	0,98	1,90	1,79	1,33	1,05	0,73	1,25	1,74	1,29
	2,69	2,41	0,83	1,78	1,78	0,93							0,97	2,12	2,02
	2,72	2,41	0,82	1,74	1,80	0,96							1,17	2,39	1,89
	2,71	2,65	0,91	1,53	1,78	1,07							1,11	1,90	1,59
	0,06	0,07	1,13										0,99	2,13	2,00
	0,06	0,05	0,80										1,26	2,15	1,58
	0,06	0,05	0,92										1,03	2,49	2,24
	0,54	0,64	1,09												
	0,59	0,60	0,95												
	0,58	0,63	1,02												
n	18	18	18	12	12	12	9	9	9	9	9	9	15	15	15
MW	1,00	1,00	1,00	0,91	0,59	0,85	0,41	0,72	1,38	0,82	1,25	1,45	0,97	1,97	1,98
SDV	0,97	0,87	0,21	0,62	0,72	0,72	0,40	0,82	0,39	0,37	0,74	0,64	0,26	0,28	0,45

4.2 Einfluss auf den Transport von Rhodamin 123 in HBSS mit 100 µg/mL Gallensäuren und bei pH 6

4.2.1 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios in HBSS mit 100 µg/mL Gallensäuren und bei pH 6

rac. Hydrocarpin D			(+)Hydrocarpin D			(-)Hydrocarpin D			Verapamil			Dexamethason			
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	n
1,87	3,01	1,61	16,0	14,0	0,88	0,14	4,73	33,38	2,66	5,84	2,20	1,02	9,36	9,18	
1,97	3,01	1,53	15,4	14,2	0,93	0,73	2,77	3,78	3,28	6,13	1,87	1,02	12,5	12,20	
3,45	2,98	0,95	10,3	12,3	1,18	0,52	0,93	1,80	3,25	5,91	1,82	0,96	10,9	11,49	
10,9	4,66	0,43	13,4	10,6	0,80	1,22	0,40	0,33	2,98	5,68	1,91	0,60	2,96	4,91	
10,4	4,13	0,40	13,4	11,6	0,87	0,89	0,49	0,55	3,42	5,59	1,64	0,85	3,59	4,22	
12,9	6,93	0,53	13,3	11,2	0,84	0,92	0,68	0,74	3,43	5,11	1,49	0,76	3,91	5,11	
1,51	5,54	3,68	0,84	1,86	2,21	0,89	0,29	0,32	4,45	4,37	0,98	9,10	4,64	0,51	
2,62	5,14	1,97	1,08	2,02	1,86	0,79	0,39	0,49	5,62	4,64	0,83	9,11	4,55	0,50	
1,68	4,56	2,71	1,03	2,30	2,23	1,10	0,37	0,34	5,58	5,43	0,97	9,55	4,60	0,48	
									5,81	8,47	1,46				
									6,68	8,02	1,20				
									6,18	7,49	1,21				
9	9	9	9	9	9	9	9	9	12	12	12	9	9	9	n
5,23	4,44	1,53	9,41	8,90	1,31	0,80	1,23	4,64	4,45	6,06	1,46	3,66	6,35	5,40	MW
4,72	1,34	1,12	6,51	5,27	0,61	0,32	1,52	10,84	1,44	1,29	0,43	4,20	3,58	4,63	SDV

Silibinin			Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			M1		
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
0,21	0,76	3,56	1,17	5,86	5,00	8,06	2,11	0,26	0,04	0,72	20,18	0,95	2,30	2,44	0,69	0,42	0,61
0,21	0,29	1,35	1,01	5,77	5,70	8,14	2,34	0,29	0,02	0,81	44,57	0,94	2,64	2,81	0,73	0,36	0,50
0,23	0,82	3,65	1,63	7,40	4,53	8,36	2,60	0,31	0,03	0,58	23,29	1,01	2,33	2,32	0,65	0,31	0,47
0,45	1,22	2,71	1,74	4,38	2,53	6,08	1,80	0,30	0,03	0,65	24,44	1,09	2,38	2,18	0,65	0,69	1,06
0,42	0,99	2,35	1,38	5,72	4,15	6,38	2,07	0,32	0,03	0,67	25,49	1,19	2,85	2,39	0,49	0,43	0,87
0,57	0,82	1,44	1,44	7,47	5,19	6,94	2,53	0,36	0,03	0,59	23,46	1,04	2,52	2,41	0,56	0,41	0,73
1,97	2,69	1,37	1,76	7,33	4,16	5,65	2,47	0,44	0,09	0,78	9,08	0,83	2,18	2,61	4,21	4,12	0,98
2,03	3,37	1,66	2,05	6,60	3,23	6,22	2,64	0,42	0,05	0,63	14,06	0,91	2,17	2,39	4,06	4,18	1,03
2,74	3,29	1,20	2,97	7,19	2,42	6,55	2,91	0,44	0,03	0,63	20,02	0,77	1,89	2,45	4,43	4,21	0,95
1,17	4,05	3,47				2,04	2,57	1,26	0,75	3,94	5,26	0,66	1,86	2,83	5,81	4,28	0,77
1,66	4,89	2,95				2,04	2,77	1,35	0,82	4,11	5,04	0,69	1,96	2,87	5,51	4,02	0,73
1,84	3,79	2,06				1,88	2,69	1,43	0,74	3,87	5,20	0,59	1,61	2,74	5,46	3,81	0,70
12	12	12	9	9	9	12	12	12	12	12	12	15	15	15	12	12	12
1,12	2,25	2,32	1,68	6,41	4,10	5,70	2,46	0,60	0,22	1,50	18,34	0,88	2,01	2,29	2,75	2,27	0,78
0,89	1,59	0,93	0,58	1,05	1,16	2,40	0,32	0,46	0,33	1,50	11,51	0,17	0,55	0,54	2,27	1,92	0,20

	Rhodamin 123			Taxifolin		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	5,21	6,26	1,20	0,45	2,53	5,65
	4,71	6,53	1,39	0,46	3,08	6,72
	4,86	6,21	1,28	0,36	2,37	6,52
	4,84	6,97	1,44	0,48	2,51	5,24
	3,84	7,88	2,05	0,46	2,21	4,80
	3,92	7,35	1,88	0,41	2,11	5,14
	4,93	6,01	1,22	1,09	2,96	2,70
	6,44	6,09	0,94	1,08	2,54	2,35
	4,53	6,24	1,38	0,96	-0,27	-0,29
	20,9	50,9	2,44	4,25	4,58	1,08
	18,3	71,6	3,91	3,84	4,09	1,07
	17,5	61,3	3,51	4,49	6,35	1,41
				3,78	4,33	1,14
				4,24	4,33	1,02
				4,54	4,39	0,97
n	12	12	12	15	15	15
MW	8,33	20,3	1,89	2,06	3,21	3,03
SDV	6,44	25,1	0,95	1,83	1,53	2,37

4.2.2 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Verapamil			Dexamethason		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	0,32	0,29	1,16	0,12	0,46	4,87
	0,39	0,30	0,99	0,12	0,62	6,47
	0,39	0,29	0,96	0,11	0,54	6,09
	0,36	0,28	1,01	0,07	0,15	2,60
	0,41	0,28	0,87	0,10	0,18	2,24
	0,41	0,25	0,79	0,09	0,19	2,71
	0,53	0,22	0,52	1,09	0,23	0,27
	0,67	0,23	0,44	1,09	0,22	0,26
	0,67	0,27	0,52	1,15	0,23	0,26
	0,70	0,42	0,77			
	0,80	0,40	0,64			
	0,74	0,37	0,64			
8	12	12	12	9	9	9
0,11	0,53	0,30	0,78	0,44	0,31	2,86
0,03	0,17	0,06	0,23	0,50	0,18	2,45
8	8	8	8	8	8	8
0,11	0,04	0,04	0,55	0,04	0,04	0,55
0,03	0,04	0,04	0,64	0,04	0,04	0,64
n						
MW						
SDV						

Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			M1			rac. Hydnocarpin D			(±)-Hydnocarpin D		
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
0,97	0,10	0,14	0,00	0,04	10,70	0,11	0,11	1,29	0,08	0,02	0,32	0,23	0,15	0,85	1,92	0,69	0,46
0,98	0,12	0,15	0,00	0,04	23,63	0,11	0,13	1,49	0,09	0,02	0,26	0,24	0,15	0,81	1,84	0,70	0,49
1,00	0,13	0,16	0,00	0,03	12,35	0,12	0,12	1,23	0,08	0,02	0,25	0,38	0,15	0,50	1,24	0,60	0,63
0,73	0,09	0,16	0,00	0,03	12,96	0,13	0,12	1,16	0,08	0,03	0,56	1,31	0,23	0,23	1,60	0,52	0,42
0,77	0,10	0,17	0,00	0,03	13,51	0,14	0,14	1,27	0,06	0,02	0,46	1,25	0,20	0,21	1,60	0,57	0,46
0,83	0,12	0,19	0,00	0,03	12,44	0,13	0,12	1,28	0,07	0,02	0,39	1,56	0,34	0,28	1,60	0,55	0,44
0,68	0,12	0,23	0,01	0,04	4,81	0,10	0,11	1,38	0,51	0,20	0,52	0,18	0,27	1,95	0,10	0,09	1,17
0,75	0,13	0,22	0,01	0,03	7,45	0,11	0,11	1,26	0,49	0,21	0,55	0,31	0,25	1,04	0,13	0,10	0,99
0,79	0,14	0,24	0,00	0,03	10,61	0,09	0,09	1,30	0,53	0,21	0,50	0,20	0,22	1,43	0,12	0,11	1,18
0,24	0,13	0,67	0,09	0,19	2,79	0,08	0,09	1,50	0,67	0,21	0,41						
0,25	0,14	0,72	0,10	0,20	2,67	0,08	0,10	1,52	0,66	0,20	0,39						
0,23	0,13	0,76	0,09	0,19	2,76	0,07	0,08	1,45	0,66	0,19	0,37						
						0,10	0,06	0,75									
						0,11	0,06	0,70									
						0,10	0,05	0,65									
12	12	12	12	12	12	15	15	15	12	12	12	9	9	9	9	9	9
0,68	0,12	0,32	0,03	0,07	9,72	0,11	0,10	1,22	0,33	0,11	0,41	0,63	0,22	0,81	1,13	0,44	0,70
0,29	0,02	0,24	0,04	0,07	6,10	0,02	0,03	0,29	0,27	0,09	0,11	0,57	0,07	0,59	0,78	0,26	0,32

	Rhodamin 123			Taxifolin			Silibinin			Urolithin A		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	0,63	0,31	0,64	0,05	0,12	2,99	0,03	0,04	1,89	0,14	0,29	2,65
	0,57	0,32	0,73	0,06	0,15	3,56	0,03	0,01	0,72	0,12	0,28	3,02
	0,58	0,31	0,68	0,04	0,12	3,46	0,03	0,04	1,93	0,20	0,36	2,40
	0,58	0,34	0,76	0,06	0,12	2,78	0,05	0,06	1,44	0,21	0,22	1,34
	0,46	0,39	1,09	0,06	0,11	2,54	0,05	0,05	1,25	0,17	0,28	2,20
	0,47	0,36	0,99	0,05	0,10	2,73	0,07	0,04	0,76	0,17	0,37	2,75
	0,59	0,30	0,65	0,13	0,15	1,43	0,24	0,13	0,73	0,21	0,36	2,20
	0,77	0,30	0,50	0,13	0,13	1,24	0,24	0,17	0,88	0,25	0,33	1,71
	0,54	0,31	0,73	0,11	-0,01	-0,15	0,33	0,16	0,64	0,36	0,35	1,28
	2,50	2,51	1,29	0,51	0,23	0,57	0,14	0,20	1,84			
	2,20	3,53	2,07	0,46	0,20	0,57	0,20	0,24	1,57			
	2,10	3,02	1,86	0,54	0,31	0,75	0,22	0,19	1,09			
				0,45	0,21	0,61						
				0,51	0,21	0,54						
				0,55	0,22	0,51						
n	12	12	12	15	15	15	12	12	12	9	9	9
MW	1,00	1,00	1,00	0,25	0,16	1,61	0,13	0,11	1,23	0,20	0,32	2,17
SDV	0,77	1,24	0,50	0,19	0,08	1,28	0,11	0,08	0,49	0,07	0,05	0,62

4.3 Einfluss der Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin

4.3.1 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios

	Ciprofloxacin			Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			n	MW	SDV
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
	2,23	3,60	1,61	2,79	4,03	1,44	4,36	5,39	1,24	2,78	3,29	1,19	3,55	2,46	0,69			
	2,15	3,39	1,58	2,78	4,05	1,46	4,37	5,39	1,23	2,79	3,11	1,12	3,52	2,39	0,68			
	2,12	3,58	1,69	2,79	4,04	1,45	4,35	5,36	1,23	2,85	3,41	1,20	3,58	2,40	0,67			
	2,05	3,78	1,84	3,26	4,27	1,31	4,03	4,83	1,20	2,36	2,46	1,04	2,15	1,98	0,92			
	2,01	3,73	1,85	3,23	4,26	1,32	3,67	4,86	1,33	2,33	2,48	1,07	2,31	2,10	0,91			
	2,11	3,87	1,83	3,33	4,31	1,30	4,03	4,85	1,20	2,33	2,62	1,12	2,25	1,99	0,89			
	2,61	3,86	1,48	4,19	4,16	0,99	1,91	2,17	1,13	2,19	2,26	1,03	2,25	2,05	0,91			
	2,52	3,82	1,52	4,16	3,90	0,93	1,89	2,16	1,14	2,29	2,30	1,00	2,19	2,08	0,95			
	2,16	3,84	1,56	4,17	4,09	0,98	1,91	2,23	1,17	2,17	2,31	1,06	2,22	2,07	0,93			
	1,78	2,94	1,66	2,05	2,49	1,21	2,40	2,26	0,94	2,33	2,46	1,05	1,89	1,61	0,85			
	1,75	3,04	1,74	2,15	2,49	1,16	2,39	2,20	0,92	2,18	2,71	1,28	1,86	1,59	0,86			
	1,66	3,05	1,84	2,14	2,47	1,15	2,34	2,23	0,96	2,13	2,65	1,24	1,84	1,59	0,86			
	1,66	3,07	1,85	1,78	2,21	1,25	2,24	2,91	1,30	2,05	2,48	1,21	1,44	1,68	1,16			
	1,72	3,14	1,82	1,73	2,31	1,33	2,29	2,98	1,30	2,02	2,62	1,30	1,46	1,68	1,16			
	1,72	3,16	1,83	1,79	2,45	1,37	2,26	2,98	1,32	2,09	2,76	1,31	1,43	1,67	1,17			
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	n		
	2,04	3,46	1,71	2,82	3,44	1,24	2,96	3,52	1,17	2,32	2,66	1,15	2,26	1,96	0,91	MW		
	0,32	0,36	0,14	0,89	0,88	0,17	1,02	1,39	0,14	0,27	0,35	0,11	0,73	0,31	0,16	SDV		

4.3.2 P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Ciprofloxacin			Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	1,10	1,04	0,94	1,37	1,17	0,84	2,14	1,56	0,72	1,36	0,95	0,69	1,74	0,71	0,40
	1,05	0,98	0,92	1,36	1,17	0,85	2,15	1,56	0,72	1,37	0,90	0,65	1,73	0,69	0,40
	1,04	1,04	0,99	1,37	1,17	0,85	2,14	1,55	0,72	1,40	0,99	0,70	1,76	0,70	0,39
	1,01	1,09	1,07	1,60	1,24	0,76	1,98	1,40	0,70	1,16	0,71	0,61	1,06	0,57	0,54
	0,99	1,08	1,08	1,58	1,23	0,77	1,80	1,41	0,77	1,14	0,72	0,62	1,13	0,61	0,53
	1,04	1,12	1,07	1,63	1,25	0,76	1,98	1,40	0,70	1,14	0,76	0,66	1,10	0,58	0,52
	1,28	1,12	0,86	2,05	1,20	0,58	0,94	0,63	0,66	1,07	0,65	0,60	1,10	0,59	0,53
	1,24	1,11	0,88	2,05	1,13	0,55	0,93	0,62	0,67	1,13	0,67	0,59	1,08	0,60	0,55
	1,21	1,11	0,91	2,05	1,18	0,57	0,94	0,64	0,68	1,07	0,67	0,62	1,09	0,60	0,54
	0,87	0,85	0,97	1,01	0,72	0,71	1,18	0,65	0,55	1,14	0,71	0,61	0,93	0,47	0,50
	0,86	0,88	1,01	1,06	0,72	0,68	1,17	0,64	0,54	1,04	0,78	0,75	0,91	0,46	0,50
	0,81	0,88	1,07	1,05	0,71	0,67	1,15	0,65	0,56	1,05	0,77	0,73	0,90	0,46	0,50
	0,82	0,89	1,08	0,87	0,64	0,73	1,10	0,84	0,76	1,01	0,72	0,71	0,71	0,48	0,68
	0,85	0,91	1,06	0,85	0,67	0,78	1,12	0,86	0,76	0,99	0,76	0,76	0,72	0,49	0,67
	0,85	0,91	1,07	0,88	0,71	0,80	1,11	0,86	0,77	1,03	0,80	0,77	0,70	0,48	0,68
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
MW	1,00	1,00	1,00	1,39	0,99	0,73	1,45	1,02	0,69	1,14	0,77	0,67	1,11	0,57	0,53
SDV	0,16	0,10	0,08	0,43	0,25	0,09	0,49	0,40	0,08	0,13	0,10	0,06	0,36	0,09	0,09

4.4 Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten mit den Urolithinen auf den Transport von Rhodamin 123

4.4.1 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios

Urolithin B (48 Stunden)			Urolithin C (24 Stunden)			Urolithin C (48 Stunden)			Isoourolithin A (24 Stunden)			Isoourolithin A (48 Stunden)			n	MW	SDV
baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
1,59	11,4	7,20	4,11	48,1	11,72	0,63	4,89	7,74	1,10	3,52	3,18	0,49	3,50	7,19	15		
1,82	11,1	6,11	3,72	43,3	11,64	0,54	5,53	10,32	1,09	2,72	2,48	0,51	3,58	6,96	15		
1,78	11,9	6,72	3,87	44,1	11,39	0,49	3,62	7,28	1,09	2,53	2,33	0,48	3,29	6,91	15		
2,49	10,1	4,06	1,09	6,44	5,91	0,36	3,13	8,70	2,75	15,6	5,68	1,07	4,71	4,41	15		
2,43	9,77	4,02	1,18	5,84	4,96	0,36	3,16	8,77	2,96	16,2	5,46	1,13	5,60	4,95	15		
2,36	10,6	4,48	1,08	4,74	4,37	0,37	2,95	8,02	2,76	19,6	7,08	0,97	4,08	4,21	15		
0,93	5,22	5,59	1,26	4,33	3,43	0,39	2,71	6,97	2,77	19,1	6,89	1,11	5,03	4,53	15		
1,27	5,28	4,16	1,21	4,73	3,90	0,46	2,69	5,88	2,80	18,1	6,45	1,06	5,42	5,10	15		
1,07	5,68	5,33	1,01	4,47	4,40	0,47	2,79	5,93	2,55	18,3	7,18	1,04	4,66	4,47	15		
0,84	5,09	5,82	0,53	3,85	7,24	0,70	4,75	6,78	1,16	4,01	3,43	4,96	11,1	2,24	15		
0,92	5,33	5,81	0,67	4,25	6,40	0,69	5,89	8,45	1,10	3,94	3,57	5,86	13,1	2,23	15		
0,81	4,85	5,99	0,51	4,34	8,52	0,65	5,48	8,39	1,02	4,44	4,35	4,92	13,1	2,66	15		
0,24	1,06	4,48	0,57	5,84	10,24	0,67	4,82	7,16	1,25	4,14	3,31	1,69	10,5	6,18	15		
0,28	2,12	7,51	0,54	5,67	10,58	0,62	4,91	7,94	1,39	3,61	2,58	1,48	8,15	5,52	15		
0,25	0,76	3,02	0,62	5,09	8,24	0,58	4,35	7,44	1,38	4,46	3,23	1,59	11,4	7,17	15		
15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15		
1,27	6,69	5,35	1,46	13,0	7,53	0,53	4,11	7,72	1,81	9,35	4,48	1,89	7,14	4,98	15		
0,78	3,84	1,29	1,29	16,7	3,02	0,13	1,15	1,15	0,82	7,23	1,79	1,78	3,66	1,71	15		

	Urolithin A (24 Stunden)			Urolithin A (48 Stunden)			Urolithin B (24 Stunden)		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	7,07	56,9	8,05	1,16	7,07	6,10	6,48	61,4	9,47
	6,55	56,8	8,67	1,49	7,95	5,33	7,95	54,9	6,91
	6,59	61,7	9,36	1,36	9,34	6,86	5,65	6,45	11,41
	8,76	50,1	6,27	1,51	12,3	8,14	6,81	65,5	9,62
	8,59	50,0	5,82	1,56	12,9	8,27	7,02	66,3	9,44
	8,94	55,1	6,16	1,46	12,1	8,34	7,37	6,37	8,65
	0,75	4,25	5,63	0,99	5,24	5,28	4,71	9,26	1,97
	0,89	3,98	4,48	1,09	5,01	4,60	5,00	7,53	1,51
	0,97	4,99	5,14	0,90	5,58	6,20	5,66	7,96	1,41
	1,17	4,77	4,09	0,97	7,97	8,22	3,37	10,4	3,10
	1,15	4,71	4,09	1,14	7,74	6,78	2,78	8,43	3,03
	1,17	4,95	4,25	1,04	7,43	7,16	3,15	9,04	2,87
	0,60	4,37	7,24	0,86	7,16	8,37	0,71	4,13	5,84
	0,61	4,84	8,01	0,99	8,76	8,85	0,65	3,93	6,03
	0,59	4,65	7,87	0,89	6,95	7,75	0,64	3,18	4,96
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15
MW	3,63	25,1	6,34	1,16	8,24	7,08	4,53	29,3	5,75
SDV	3,56	26,1	1,76	0,25	2,49	1,34	2,52	28,4	3,37

4.4.2 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Isourolithin A (24 Stunden)			Isourolithin A (48 Stunden)			
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	
	0,35	0,84	2,20	0,16	0,84	4,96	n
	0,35	0,65	1,71	0,17	0,86	4,81	MW
	0,35	0,60	1,61	0,15	0,79	4,77	SDV
	0,88	3,74	3,92	0,34	1,13	3,05	
	0,95	3,86	3,77	0,36	1,34	3,42	
	0,89	4,68	4,89	0,31	0,98	2,91	
	0,89	4,56	4,76	0,36	1,20	3,13	
	0,90	4,32	4,45	0,34	1,30	3,52	
	0,82	4,38	4,96	0,34	1,11	3,08	
	0,38	0,96	2,37	1,59	2,66	1,55	
	0,35	0,94	2,46	1,88	3,12	1,54	
	0,33	1,06	3,00	1,58	3,12	1,84	
	0,40	0,99	2,29	0,55	2,51	4,27	
	0,45	0,86	1,78	0,47	1,95	3,81	
	0,44	1,07	2,23	0,51	2,72	4,95	
15	15	15	15	15	15	15	n
0,58	2,23	3,09	3,09	0,61	1,71	3,44	MW
0,26	1,73	1,24	1,24	0,57	0,88	1,18	SDV

	Urolithin A (24 Stunden)			Urolithin A (48 Stunden)			Urolithin B (24 Stunden)			Urolithin B (48 Stunden)			Urolithin C (24 Stunden)			Urolithin C (48 Stunden)		
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio
	2,27	13,62	5,56	0,37	1,69	4,21	2,08	14,67	6,54	0,51	2,73	4,97	1,32	11,51	8,10	0,20	1,17	5,35
	2,10	13,57	5,99	0,48	1,90	3,68	2,55	13,13	4,77	0,59	2,66	4,22	1,19	10,35	8,04	0,17	1,32	7,13
	2,12	14,75	6,46	0,44	2,23	4,74	1,81	15,41	7,88	0,57	2,86	4,64	1,24	10,54	7,87	0,16	0,86	5,03
	2,82	13,16	4,33	0,49	2,94	5,63	2,19	15,67	6,64	0,80	2,42	2,81	0,35	1,54	4,08	0,12	0,75	6,01
	2,76	11,96	4,02	0,50	3,08	5,71	2,25	15,84	6,52	0,78	2,34	2,78	0,38	1,40	3,43	0,12	0,76	6,06
	2,87	13,16	4,25	0,47	2,90	5,76	2,37	15,23	5,97	0,76	2,53	3,09	0,35	1,13	3,02	0,12	0,70	5,54
	0,24	1,02	3,89	0,32	1,25	3,64	1,51	2,21	1,36	0,30	1,25	3,86	0,41	1,04	2,37	0,12	0,65	4,81
	0,29	0,95	3,10	0,35	1,20	3,18	1,61	1,80	1,04	0,41	1,26	2,87	0,39	1,13	2,70	0,15	0,64	4,06
	0,31	1,19	3,55	0,29	1,33	4,28	1,82	1,90	0,97	0,34	1,36	3,68	0,33	1,07	3,04	0,15	0,67	4,09
	0,37	1,14	2,83	0,31	1,91	5,68	1,08	2,49	2,14	0,28	1,22	4,02	0,17	0,92	5,00	0,23	1,14	4,68
	0,37	1,13	2,82	0,37	1,85	4,68	0,89	2,01	2,09	0,29	1,27	4,01	0,21	1,02	4,42	0,22	1,41	5,83
	0,37	1,18	2,93	0,33	1,78	4,95	1,01	2,16	1,98	0,26	1,16	4,14	0,16	1,04	5,88	0,21	1,31	5,79
	0,19	1,04	5,00	0,27	1,71	5,78	0,23	0,99	4,03	0,08	0,25	3,09	0,18	1,40	7,07	0,22	1,15	4,95
	0,19	1,16	5,53	0,32	2,09	6,12	0,21	0,94	4,16	0,09	0,51	5,19	0,17	1,36	7,31	0,20	1,17	5,48
	0,19	1,11	5,44	0,29	1,66	5,35	0,21	0,76	3,42	0,08	0,18	2,08	0,20	1,22	5,69	0,19	1,04	5,14
n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
MW	1,17	6,01	4,38	0,37	1,97	4,89	1,45	7,01	3,97	0,41	1,60	3,70	0,47	3,11	5,20	0,17	0,98	5,33
SDV	1,14	6,24	1,22	0,08	0,59	0,92	0,81	6,79	2,33	0,25	0,92	0,89	0,41	3,99	2,09	0,04	0,27	0,79

4.5 Einfluss einer fünf Minuten Vorinkubation auf den Rhodamintransport

4.5.1 P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios

	Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Dexamethason			n	MW	SDV
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
	11,5	13,1	1,14	9,07	14,6	1,62	9,24	12,8	1,39	11,7	11,4	0,97			
	12,7	15,3	1,20	10,4	14,9	1,43	10,2	12,2	1,19	13,0	14,9	1,15			
	11,8	13,5	1,15	10,6	14,2	1,34	9,28	12,3	1,32	12,6	13,7	1,09			
										11,5	12,6	1,10			
										13,7	14,0	1,03			
										10,6	15,9	1,49			
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	6	6	6
MW	12,0	14,0	1,16	10,0	14,6	1,46	9,57	12,4	1,30	12,2	13,7	1,14			
SDV	0,63	1,18	0,04	0,84	0,36	0,14	0,54	0,35	0,10	1,11	1,60	0,18			

4.5.2 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Dexamethason			n	MW	SDV
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
	3,70	3,13	0,78	2,91	3,50	1,12	2,97	3,06	0,96	3,76	2,72	0,67	6		
	4,09	3,66	0,83	3,35	3,55	0,99	3,27	2,91	0,82	4,18	3,56	0,79	6		
	3,78	3,24	0,79	3,40	3,38	0,92	2,98	2,93	0,91	4,05	3,28	0,75	6		
										3,69	3,01	0,76	6		
										4,39	3,35	0,71	6		
										3,41	3,79	1,03	6		
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	6	6	6
MW	3,86	3,34	0,80	3,22	3,48	1,01	3,07	2,97	0,90	3,91	3,29	0,78	3,91	3,29	0,78
SDV	0,20	0,28	0,02	0,27	0,09	0,09	0,17	0,08	0,07	0,36	0,38	0,13	0,36	0,38	0,13

4.6 Vergleich zwischen reinem Rhodamintransport über 60 Minuten und Rhodamintransport unter Substanzinkubation über 60 Minuten

	0 - 60 Minuten			60 - 120 Minuten				
Rhodamin 123	baso	0,43	0,84	1,92	baso	1,43	1,93	1,35
	api	0,64	1,02	1,60	api	2,42	2,42	1,00
	Ratio	0,61	1,18	1,93	Ratio	2,28	2,91	1,28
Rhodamin 123	baso	0,34	0,99	2,93	baso	1,76	2,12	1,20
	api	0,39	1,17	3,02	api	1,96	2,80	1,43
	Ratio	0,38	1,20	3,18	Ratio	1,82	2,60	1,43
Rhodamin 123	baso	0,43	0,82	1,91	baso	0,24	0,65	2,69
	api	0,50	0,92	1,84	api	0,29	0,77	2,57
	Ratio	0,49	0,83	1,71	Ratio	0,25	0,74	2,95
Rhodamin 123	baso	0,34	0,88	2,55	baso	1,13	1,75	1,55
	api	0,45	0,99	2,22	api	0,92	1,85	2,01
	Ratio	0,39	0,98	2,48	Ratio	0,90	1,82	2,01
Rhodamin 123	baso	0,56	0,93	1,67	baso	0,91	1,24	1,36
	api	0,69	1,04	1,49	api	0,94	1,57	1,67
	Ratio	0,70	0,96	1,37	Ratio	1,03	1,53	1,49
+ Urolithin A	baso				baso			
	api				api			
	Ratio				Ratio			
+ Urolithin B	baso				baso			
	api				api			
	Ratio				Ratio			
+ Urolithin C	baso				baso			
	api				api			
	Ratio				Ratio			
+ Dexamethason	baso				baso			
	api				api			
	Ratio				Ratio			

4.7 Einfluss der Urolithine auf den Transport von Rhodamin 123 nach Inkubation mit Lipopolysaccharid

4.7.1 P_{app}-Werte und P_{app}-Ratios

	Rhodamin 123 mit 200 µg/mL LPS			Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			n	MW	SDV
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
	4,31	12,9	3,01	8,68	19,3	2,23	5,43	14,1	2,60	4,37	1,35	3,10	0,81	2,83	3,50			
	4,30	12,6	2,94	8,15	15,9	1,96	5,09	16,3	3,21	4,09	1,25	3,05	0,88	4,67	5,32			
	3,57	13,0	3,65	6,86	16,8	2,46	5,02	20,5	4,08	3,18	1,10	3,47	0,79	4,59	5,81			
	1,13	2,65	2,34	0,87	3,94	4,53	0,76	4,03	5,27	0,95	4,96	5,20	1,38	9,21	6,68			
	1,06	2,80	2,64	0,87	4,59	5,29	0,97	4,38	4,53	0,99	5,48	5,53	1,20	8,53	7,10			
	1,11	2,16	1,95	0,79	4,26	5,37	0,88	5,02	5,72	1,11	4,59	4,12	1,24	7,91	6,40			
	1,66	5,86	3,53	1,28	11,3	8,84	1,87	7,65	4,09	1,46	1,02	7,01						
	1,64	6,60	4,02	1,16	10,9	9,35	1,34	10,7	7,97	1,44	1,28	8,87						
	1,64	6,45	3,92	1,18	9,58	8,13	1,31	8,98	6,87	1,48	1,03	6,97						
	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	6	6	6	n	
	2,27	7,24	3,11	3,32	10,7	5,35	2,52	10,2	4,93	2,12	9,49	5,26	1,05	6,29	5,80			
	1,38	4,54	0,72	3,47	5,78	2,88	2,02	5,77	1,72	1,37	3,54	2,04	0,25	2,60	1,29			

4.7.2 P_{app} -Werte und P_{app} -Ratios mit Normalisierung auf die Kontrolle

	Rhodamin 123 mit 200 µg/mL LPS			Urolithin A			Urolithin B			Urolithin C			Isourolithin A			n	MW	SDV
	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio	baso	api	Ratio			
	1,38	3,10	2,08	2,79	4,63	1,54	1,74	3,38	1,80	1,40	3,23	2,14	0,26	0,68	2,42	6	6	6
	1,38	3,02	2,03	2,62	3,82	1,50	1,63	3,91	2,22	1,32	2,98	2,10	0,28	1,12	3,68	6	6	6
	1,15	3,11	2,52	2,20	4,04	1,70	1,61	4,90	2,82	1,02	2,64	2,40	0,25	1,10	4,02	6	6	6
	0,36	0,63	1,62	0,28	0,94	3,13	0,25	0,96	3,64	0,31	1,19	3,59	0,44	2,20	4,62	6	6	6
	0,34	0,67	1,83	0,28	1,10	3,65	0,31	1,05	3,13	0,32	1,31	3,82	0,39	2,04	4,90	6	6	6
	0,36	0,52	1,34	0,25	1,02	3,71	0,28	1,20	3,95	0,36	1,10	2,84	0,40	1,89	4,42	6	6	6
	0,53	1,40	2,44	0,41	2,69	6,10	0,60	1,83	2,82	0,47	2,45	4,84				6	6	6
	0,53	1,58	2,77	0,37	2,60	6,46	0,43	2,57	5,51	0,46	3,05	6,13				6	6	6
	0,53	1,54	2,71	0,38	2,29	5,62	0,42	2,15	4,75	0,48	2,46	4,81				6	6	6
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	6	6	6
MW	0,73	1,73	2,15	1,07	2,57	3,70	0,81	2,44	3,40	0,68	2,27	3,63	0,34	1,50	4,01			
SDV	0,44	1,09	0,49	1,12	1,38	1,99	0,65	1,38	1,19	0,44	0,85	1,41	0,08	0,62	0,89			

4.8 Permeabilitätskoeffizienten der Kontrollen für die Monolayerqualität Fluorescein und Lucifer Yellow

	Fluorescein	Lucifer Yellow
	8,16229E-06	1,52351E-05
	8,05041E-06	1,47448E-05
	7,89804E-06	1,77244E-05
	9,03327E-06	1,04245E-06
	8,97217E-06	1,01828E-06
	1,0063E-05	9,98791E-07
	3,62401E-05	8,97649E-06
	3,70724E-05	9,63892E-06
	3,60521E-05	9,86136E-06
	3,38917E-06	2,22571E-06
	3,41166E-06	2,10163E-06
	3,51038E-06	2,28251E-06
	1,03476E-05	7,58165E-06
	1,32964E-05	8,50518E-06
	1,34623E-05	7,37746E-06
	1,46508E-05	3,92355E-06
	1,55376E-05	4,0551E-06
	1,55839E-05	4,69628E-06
	4,06498E-05	0,000334397
	3,98635E-05	0,000339656
	4,46306E-05	0,000358172
	4,3135E-05	5,59456E-06
	4,53717E-05	5,88118E-06
	4,11487E-05	6,13009E-06
	2,30655E-06	2,08529E-06
	2,4867E-06	2,16227E-06
	2,47612E-06	2,07938E-06
	6,59996E-06	1,15686E-05
	6,50155E-06	1,2303E-05
	6,76455E-06	1,41337E-05
n	30	30
MW	1,78889E-05	4,05385E-05
SDV	1,55793E-05	0,000103068
Min	2,30655E-06	9,98791E-07
Max	4,53717E-05	0,000358172

n = Anzahl der Versuche MW = Mittelwert SDV = Standardabweichung
 Min = Minimaler Wert der Messungen Max = Maximaler Wert der Messungen

5 Entwicklung einer RT-qPCR-Methode zur Detektion der mRNA-Expression des p-GP-Transporters

5.1 Konzentration und Reinheit der aus CaCo-II-Zellen isolierten RNA zur Entwicklung einer RT-qPCR-Methode

Proben (je 1.000.000 Zellen)	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
1	245,44	2,13	175,76	2,1
2	231,44	2,1	187,6	2,14
3	202,4	2,09	188,72	2,12
4	231,84	1,95	230,88	1,96
5	248,4	2,14	178	2,1
6	236,4	2,12	197,12	2,12
7	203,76	2,1	192,4	2,12

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

5.2 Optimierung der Primerkonzentration

<u>p-GP</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	<u>PPIA</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	27,62	29,23	28,52	100 nM RW	19,11	18,66	19,02
200 nM RW	28,05	27,80	27,80	200 nM RW	18,66	18,68	18,22
300 nM RW	27,66	27,65	28,25	300 nM RW	18,27	18,62	18,74

c_t – Werte unterschiedlicher PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Forward- (FW-) und Reverse- (RW-) Primern von p-GP und PPIA

<u>RPLP 0</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	<u>SDHA</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	19,00	19,76	19,40	100 nM RW	25,12	24,76	-
200 nM RW	18,63	18,34	18,12	200 nM RW	22,59	22,20	22,27
300 nM RW	18,94	18,20	17,95	300 nM RW	22,42	22,48	22,33

c_t – Werte unterschiedlicher PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Forward- (FW-) und Reverse- (RW-) Primern von RPLP 0 und SDHA

<u>HPRT 1</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	<u>18s RNA</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	24,51	23,43	23,18	100 nM RW	28,55	23,85	20,63
200 nM RW	22,76	22,04	21,93	200 nM RW	30,01	22,75	19,86
300 nM RW	22,83	21,81	21,99	300 nM RW	28,61	21,9	20,13

c_t – Werte unterschiedlicher PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Forward- (FW-) und Reverse- (RW-) Primern von HPRT 1 und 18s RNA

<u>ACTB</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW	<u>GAPDH</u>	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	20,75	23,90	22,38	100 nM RW	18,87	18,22	18,58
200 nM RW	21,28	19,81	19,91	200 nM RW	18,68	17,51	17,74
300 nM RW	20,19	19,67	19,40	300 nM RW	18,99	17,63	17,58

c_t – Werte unterschiedlicher PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Forward- (FW-) und Reverse- (RW-) Primern von ACTB und GAPDH

B2M	100 nM FW	200 nM FW	300 nM FW
100 nM RW	25,28	24,18	23,75
200 nM RW	25,68	23,59	23,45
300 nM RW	24,54	23,69	24,15

c_t – Werte unterschiedlicher PCR-Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen an Forward- (FW-) und Reverse- (RW-) Primern von B2M

5.3 Schmelzpunkte und Reaktionseffizienzen

Genkürzel	Geradengleichung der Kalibriergeraden	R²	Effizienz [%]	T_m [°C]
p-GP	$y = -3,585 * \log(x) + 25,33$	0,995	90,1	82,8
PPIA	$y = -3,175 * \log(x) + 15,82$	1,000	106,5	84,9
RPLP 0	$y = -3,269 * \log(x) + 15,52$	0,999	102,3	85
SDHA	$y = -3,411 * \log(x) + 20,47$	1,000	96,4	86,5
HPRT 1	$y = -3,664 * \log(x) + 18,00$	0,992	87,5	78,7
18s RNA	$y = -4,041 * \log(x) + 19,63$	0,998	76,8	83,5
GAPDH	$y = -3,276 * \log(x) + 15,27$	1,000	102,0	83,8
B2M	$y = -3,337 * \log(x) + 21,28$	0,999	99,4	77,8
ACTB	$y = -3,354 * \log(x) + 16,37$	1,000	98,7	82,6

R² = Bestimmtheitsmaß

T_m = experimentell ermittelte Schmelztemperatur des PCR-Produktes

5.4 Housekeepinggen - Validierung

5.4.1 Konzentration und Reinheit der RNA

Passage	C ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	C ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
I	271,6	2,08	379,28	2,08
II	455,68	2,07	669,44	2,07
III	190,72	2,05	235,52	2,05
IV	299,76	2,08	315,12	2,08

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

5.4.2 c_t-Werte für die BestKeeper – Auswertung der Referenzgene

	PPIA	RPLP 0	SDHA	HPRT 1	18s RNA	GAPDH	B2M	ACTB	BK
c _t - Werte	15,38	16,28	19,14	20,07	19,03	14,87	18,39	15,84	17,27
	16,46	16,71	20,52	21,28	22,00	17,33	19,98	17,23	18,82
	15,41	15,89	19,44	20,21	20,40	16,19	18,37	16,18	17,66
	15,58	16,07	19,74	20,42	20,17	16,59	19,03	16,25	17,88
	15,38	16,29	18,95	19,77	19,42	15,63	18,42	15,61	17,34
	16,50	17,67	20,47	21,41	21,94	17,20	20,12	17,52	19,00
	15,44	15,70	19,30	20,19	20,34	15,73	18,18	16,03	17,50
	15,79	16,46	19,26	20,54	20,07	16,38	18,96	16,52	17,91
	15,46	16,10	19,22	19,77	19,55	15,73	18,54	15,95	17,45
	16,40	17,25	20,48	21,48	22,02	16,92	19,96	17,40	18,87
	15,55	16,03	19,06	20,29	20,26	15,84	18,26	16,24	17,59
	15,75	16,68	19,20	21,02	20,18	16,51	18,87	16,62	18,01
	15,49	16,08	18,75	19,77	19,36	15,71	18,65	15,68	17,35
	16,46	16,98	19,99	21,39	21,78	17,05	19,73	17,19	18,71
	15,35	16,21	19,30	20,14	20,45	15,94	18,37	15,83	17,59
	16,17	16,55	19,13	20,57	19,85	16,36	18,89	16,34	17,90
	15,31	16,10	19,21	19,91	19,30	15,73	18,57	15,86	17,41
	16,47	16,69	19,64	21,25	21,63	16,99	19,84	17,09	18,60
	15,56	15,69	19,08	20,32	20,02	15,89	18,48	16,19	17,55
	15,64	16,02	19,70	20,28	20,02	16,53	18,99	16,81	17,91

c_t = threshold cycle

5.4.3 Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper in den CaCo-II-Zellen (n = 20 Proben)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	HPRT 1	18s RNA	GAPDH	B2M	ACTB	BK
PPIA		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
RPLP 0	0,831		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
SDHA	0,765	0,709		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
HPRT 1	0,924	0,813	0,806		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
18s RNA	0,858	0,706	0,873	0,902		0,001	0,001	0,001	0,001
GAPDH	0,865	0,688	0,819	0,872	0,874		0,001	0,001	0,001
B2M	0,936	0,852	0,863	0,888	0,844	0,891		0,001	0,001
ACTB	0,911	0,780	0,874	0,945	0,893	0,904	0,917		0,001
BK	0,948	0,846	0,899	0,959	0,939	0,933	0,961	0,969	

r = Korrelationskoeffizient

p = p-Wert

BK = BestKeeper

6 Einfluss der Polyphenole auf die mRNA-Expression des p-GP-Transporters

6.1 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 2 Stunden

6.1.1 Konzentration und Reinheit der nach 2 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

Taxifolin 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	133,76	2,08	136,56	2,06
Kontrolle 2	184,32	2,06	202,24	2,05
Kontrolle 3	152,8	2,1	158,8	2,07
Probe 1	145,2	2,04	144,8	2,07
Probe 2	161,68	2,03	178,56	2,04
Probe 3	160,24	2,08	162,8	2,05

Silibinin 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	188,24	2,09	184,64	2,1
Kontrolle 2	148,08	2,05	168,08	2,08
Kontrolle 3	144	2,11	155,52	2,01
Probe 1	173,12	2,08	163,6	2,13
Probe 2	161,6	2,13	174,96	2,09
Probe 3	181,92	2,13	176	2,1

Urolithin A 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	192,32	2,05	189,12	2,04
Kontrolle 2	240,16	2,07	224	2,08
Kontrolle 3	207,28	2,38	245,36	2,07
Probe 1	249,44	2,03	202,16	2,03
Probe 2	205,2	2,05	229,84	2,02
Probe 3	177,36	2,06	190	2,04

Urolithin B 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	215,04	2,09	276,4	2,09
	165,44	2,11	190,48	2,13
Kontrolle 2	191,76	2,08	251,52	2,08
	142,64	2,1	149,12	2,05
Kontrolle 3	298,4	2,1	281,6	2,08
	185,52	2,08	208,4	1,94
Probe 1	190,88	2,01	129,36	1,82
	285,92	2,09	184,8	2,07
Probe 2	189,68	2,09	199,28	2,08
	181,92	2,1	188,96	2,05
Probe 3	289,68	2,08	217,12	2,13
	181,04	2,08	186	2,12

Urolithin C 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	282,48	2,11	292,4	2,09
Kontrolle 2	219,28	1,99	220,96	2,04
Kontrolle 3	213,68	2,01	273,28	2,02
Probe 1	245,76	2,1	220,72	2,1
Probe 2	198,56	2,12	283,76	2,11
Probe 3	312,56	2,08	281,68	2,08

Isourolithin A 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	138,16	2,07	147,2	2,11
Kontrolle 2	131,28	1,99	154	1,92
Kontrolle 3	184,08	2,12	196	2,09
Probe 1	156,48	2,17	182,72	2,11
Probe 2	162,8	2,04	165,6	2,08
Probe 3	114,08	2,06	113,04	2,07

M1 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	163,04	2,06	175,04	2,08
Kontrolle 2	190,4	2,08	200,24	2,07
Kontrolle 3	152,32	2,57	202,8	2,11
Probe 1	213,68	2,04	210,8	2,03
Probe 2	262,48	2,07	296,88	2,11
Probe 3	193,52	2,07	217,76	2,03

rac. Hydnocarpin D 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	215,28	2,07	236,8	2,08
	259,2	2,11	237,52	2,08
Kontrolle 2	285,44	2,08	251,68	2,08
	285,28	2,12	225,04	2,07
Kontrolle 3	162,16	2,09	164,72	2,03
	257,36	2,02	244,64	2,1
Probe 1	156,48	2,08	174,4	2,09
	38,48	2,07	43,28	2,06
Probe 2	223,2	2,11	201,92	2,07
	327,76	2,07	283,04	2,07
Probe 3	211,6	2,06	195,2	2,09
	232,48	2,08	253,2	2,08

(+)- Hydnocarpin D 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	200	2,02	229,44	2,05
Kontrolle 2	351,84	2,05	387,76	2,07
Kontrolle 3	3,6	1,73	204	2,04
Probe 1	423,52	2,06	342,08	2,06
Probe 2	336,72	2,08	5,76	0,89
Probe 3	257,28	1,9	246,64	2,03

(-)- Hydnocarpin D 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	197,6	2,09	196,64	2,1
Kontrolle 2	171,44	2,06	211,04	2,07
Kontrolle 3	203,76	2,07	214,24	2,04
Probe 1	192	2,01	183,6	2,08
Probe 2	144,32	1,95	128,72	1,95
Probe 3	141,92	1,95	137,6	2,03

Verapamil 2 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	124,24	2,06	126,4	2,06
	219,36	2,09	266,72	2,08
Kontrolle 2	165,36	2,08	173,6	2,07
	273,6	2,09	300,32	2,09
Kontrolle 3	159,52	2,11	166	2,03
	253,28	2,07	259,84	2,09
Probe 1	131,68	2,09	162,32	2,05
	260,8	2,1	400,8	2,08
Probe 2	111,28	2,04	124,08	2,03
	259,84	2,09	333,28	2,07
Probe 3	64,72	2,03	67,6	2,06
	370,16	2,08	375,68	2,05

Dexamethason 2 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	250,88	2,07	291,52	2,08
Kontrolle 2	224,08	1,98	233,44	2,08
Kontrolle 3	212,48	2,1	208,48	2,11
Probe 1	195,12	2,07	213,52	2,08
Probe 2	252,24	1,61	296,8	1,86
Probe 3	201,68	1,84	200,96	1,95

6.1.2 BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 2 Stunden

c _t =	threshold cycle	n =	Stichprobenzahl
g. MW =	geometrischer Mittelwert	min c _t =	minimaler threshold cycle
a. MW =	arithmetischer Mittelwert	max c _t =	maximaler threshold cycle
sdv =	Standardabweichung	CV =	coefficient of variance
BK =	BestKeeper		

Taxifolin 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c _t -Werte	16,62	16,99	21,25	18,17	17,97	17,82	22,01	19,17
	17,22	16,99	20,77	18,25	18,01	17,34	22,13	19,05
	16,30	16,64	21,36	17,96	16,55	16,55	20,69	17,83
	16,48	16,93	21,43	18,15	16,77	16,86	20,84	18,06
	17,12	17,09	21,72	18,52	16,68	17,03	20,95	18,12
	17,10	17,17	21,63	18,52	16,64	16,61	21,14	18,01
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	16,80	16,97	21,36	18,26	17,09	17,03	21,28	18,37
a. MW	16,81	16,97	21,36	18,26	17,10	17,03	21,29	18,37
min c _t	16,30	16,64	20,77	17,96	16,55	16,55	20,69	17,83
max c _t	17,22	17,17	21,72	18,52	18,01	17,82	22,13	19,17
SDV	0,34	0,12	0,23	0,17	0,59	0,36	0,52	0,49
CV [%]	2,02	0,72	1,09	0,94	3,46	2,14	2,43	2,67

Silibinin	Kontrolle				Proben				
	2 h	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte		17,52	17,75	21,51	18,84	17,27	17,49	21,65	18,70
		17,46	17,60	21,71	18,83	17,00	17,17	21,61	18,48
		17,21	17,03	21,84	18,57	17,97	16,97	21,49	18,71
		17,49	16,89	21,78	18,60	16,90	16,85	20,87	18,11
		17,52	17,55	21,98	18,90	16,52	16,21	21,01	17,78
		18,19	17,25	22,35	19,14	17,12	16,37	20,10	17,79
n	6	6	6	6	6	6	6	6	
g. MW	17,56	17,34	21,86	18,81	17,12	16,84	21,11	18,26	
a. MW	17,56	17,35	21,86	18,81	17,13	16,84	21,12	18,26	
min c_t	17,21	16,89	21,51	18,57	16,52	16,21	20,10	17,78	
max c_t	18,19	17,75	22,35	19,14	17,97	17,49	21,65	18,71	
SDV	0,21	0,29	0,20	0,15	0,33	0,37	0,46	0,37	
CV [%]	1,19	1,66	0,92	0,81	1,91	2,19	2,18	2,00	

Urolithin A	Kontrolle				Proben				
	2 h	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte		15,98	16,75	20,56	17,66	17,13	17,11	22,09	18,51
		15,30	16,45	20,43	17,26	16,77	17,25	21,74	18,49
		16,63	16,86	21,23	18,12	17,00	16,42	20,84	18,00
		17,05	17,96	21,67	18,79	16,84	15,80	20,56	18,16
		16,66	16,85	21,04	18,08	16,83	16,79	21,63	18,82
		16,53	16,56	21,12	17,95	16,78	17,22	21,26	18,88
n	6	6	6	6	6	6	6	6	
g. MW	16,35	16,90	21,00	17,97	16,89	16,76	21,34	18,47	
a. MW	16,36	16,91	21,01	17,98	16,89	16,77	21,35	18,47	
min c_t	15,30	16,45	20,43	17,26	16,77	15,80	20,56	18,00	
max c_t	17,05	17,96	21,67	18,79	17,13	17,25	22,09	18,88	
SDV	0,48	0,35	0,34	0,35	0,11	0,44	0,47	0,26	
CV [%]	2,92	2,07	1,63	1,97	0,68	2,61	2,18	1,43	

Urolithin B 2 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	14,43	13,71	18,78	15,49	15,19	14,46	19,37	16,20
	15,06	14,06	18,80	15,85	15,28	14,52	19,40	16,27
	14,60	14,11	18,94	15,75	14,89	14,33	19,39	16,05
	14,42	14,40	18,86	15,76	15,29	14,29	19,33	16,16
	15,11	14,40	19,35	16,15	15,47	14,19	19,21	16,16
	14,99	13,83	18,93	15,77	15,26	14,42	19,31	16,20
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	14,77	14,08	18,94	15,79	15,23	14,37	19,34	16,17
a. MW	14,77	14,08	18,95	15,80	15,23	14,37	19,34	16,17
min c_t	14,42	13,71	18,78	15,49	14,89	14,19	19,21	16,05
max c_t	15,11	14,40	19,35	16,15	15,47	14,52	19,40	16,27
SDV	0,28	0,22	0,13	0,14	0,13	0,10	0,05	0,05
CV [%]	1,92	1,55	0,71	0,86	0,83	0,68	0,27	0,30

Urolithin B 2 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,10	15,70	21,93	18,06	17,84	16,40	23,47	19,01
	17,22	15,96	22,22	18,28	18,31	16,81	23,53	19,35
	17,78	16,23	22,61	18,69	18,03	15,76	22,35	18,52
	17,97	16,45	22,75	18,87	18,06	16,26	22,83	18,85
	17,91	15,92	22,63	18,62	17,40	15,83	22,04	18,24
	17,71	16,21	22,92	18,74	17,89	15,67	22,55	18,49
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,61	16,08	22,51	18,54	17,92	16,12	22,79	18,74
a. MW	17,62	16,08	22,51	18,54	17,92	16,12	22,79	18,74
min c_t	17,10	15,70	21,93	18,06	17,40	15,67	22,04	18,24
max c_t	17,97	16,45	22,92	18,87	18,31	16,81	23,53	19,35
SDV	0,30	0,22	0,29	0,25	0,21	0,37	0,48	0,33
CV [%]	1,72	1,36	1,29	1,35	1,17	2,29	2,12	1,75

Urolithin C 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,13	14,30	19,34	16,11	15,87	14,46	19,40	16,45
	15,14	14,51	19,42	16,22	14,94	14,52	19,57	16,19
	14,97	14,17	19,08	15,94	15,39	14,17	18,98	16,06
	14,97	14,17	19,20	15,97	15,39	14,30	19,18	16,16
	15,52	14,53	19,36	16,34	15,11	14,31	18,58	15,90
	14,88	14,57	19,46	16,16	15,52	14,01	19,18	16,10
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,10	14,37	19,31	16,12	15,37	14,29	19,15	16,14
a. MW	15,10	14,37	19,31	16,12	15,37	14,30	19,15	16,14
min c_t	14,88	14,17	19,08	15,94	14,94	14,01	18,58	15,90
max c_t	15,52	14,57	19,46	16,34	15,87	14,52	19,57	16,45
SDV	0,16	0,16	0,12	0,12	0,23	0,13	0,25	0,13
CV [%]	1,07	1,11	0,60	0,72	1,49	0,94	1,28	0,78

Isourolithin A 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,52	15,57	-	16,04	16,79	15,92	-	16,35
	16,57	15,39	-	15,97	16,60	15,46	-	16,02
	17,29	15,80	-	16,52	17,70	16,37	-	17,02
	17,35	15,94	-	16,63	17,72	16,71	-	17,21
	17,01	15,99	-	16,49	16,64	15,23	-	15,92
	17,22	15,71	-	16,45	16,65	15,50	-	16,07
n	6	6	-	6	6	6	-	6
g. MW	16,99	15,73	-	16,35	17,01	15,86	-	16,42
a. MW	16,99	15,73	-	16,35	17,02	15,87	-	16,43
min c_t	16,52	15,39	-	15,97	16,60	15,23	-	15,92
max c_t	17,35	15,99	-	16,63	17,72	16,71	-	17,21
SDV	0,30	0,18	-	0,23	0,46	0,47	-	0,46
CV [%]	1,75	1,12	-	1,41	2,71	2,95	-	2,77

M1	Kontrolle				Proben				
	2 h	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte		15,83	16,62	19,59	17,27	17,13	17,11	22,09	18,63
		16,23	15,41	19,41	16,93	16,77	17,25	21,74	18,46
		17,22	17,23	21,16	18,45	17,00	16,42	20,84	17,99
		16,84	16,71	21,31	18,17	16,84	15,80	20,56	17,62
		16,74	17,18	21,59	18,38	16,83	16,79	21,63	18,29
		16,37	17,63	21,52	18,38	16,78	17,22	21,26	18,31
n	6	6	6	6	6	6	6	6	
g. MW	16,53	16,78	20,74	17,92	16,89	16,76	21,34	18,21	
a. MW	16,54	16,80	20,76	17,93	16,89	16,77	21,35	18,22	
min c_t	15,83	15,41	19,41	16,93	16,77	15,80	20,56	17,62	
max c_t	17,22	17,63	21,59	18,45	17,13	17,25	22,09	18,63	
SDV	0,40	0,55	0,84	0,55	0,11	0,44	0,47	0,28	
CV [%]	2,40	3,29	4,05	3,08	0,68	2,61	2,18	1,51	

rac. Hydnocarpin D 2 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,94	15,28	21,28	17,66	17,94	16,59	23,49	19,12
	16,99	15,74	21,55	17,93	17,97	17,09	23,43	19,31
	17,21	15,51	21,91	18,02	17,60	15,81	22,07	18,31
	17,35	15,91	21,95	18,23	17,71	15,89	22,18	18,41
	17,14	15,66	22,08	18,09	17,23	15,74	22,27	18,21
	17,40	16,07	21,95	18,31	18,19	16,57	22,87	19,03
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,17	15,69	21,79	18,04	17,77	16,27	22,71	18,73
a. MW	17,17	15,69	21,79	18,04	17,77	16,28	22,72	18,73
min c_t	16,94	15,28	21,28	17,66	17,23	15,74	22,07	18,21
max c_t	17,40	16,07	22,08	18,31	18,19	17,09	23,49	19,31
SDV	0,15	0,21	0,25	0,17	0,26	0,47	0,54	0,42
CV [%]	0,86	1,35	1,13	0,95	1,46	2,89	2,39	2,25

rac. Hydnocarpin D 2 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,94	15,28	21,28	17,66	17,94	16,59	23,49	19,12
	16,99	15,74	21,55	17,93	17,97	17,09	23,43	19,31
	17,21	15,51	21,91	18,02	17,60	15,81	22,07	18,31
	17,35	15,91	21,95	18,23	17,71	15,89	22,18	18,41
	17,14	15,66	22,08	18,09	17,23	15,74	22,27	18,21
	17,40	16,07	21,95	18,31	18,19	16,57	22,87	19,03
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,17	15,69	21,79	18,04	17,77	16,27	22,71	18,73
a. MW	17,17	15,69	21,79	18,04	17,77	16,28	22,72	18,73
min c_t	16,94	15,28	21,28	17,66	17,23	15,74	22,07	18,21
max c_t	17,40	16,07	22,08	18,31	18,19	17,09	23,49	19,31
SDV	0,15	0,21	0,25	0,17	0,26	0,47	0,54	0,42
CV [%]	0,86	1,35	1,13	0,95	1,46	2,89	2,39	2,25

(+) - Hydnocarpin D 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,26	16,21	22,07	18,35	17,20	16,18	22,20	18,35
	17,44	15,80	22,10	18,26	16,88	16,43	22,28	18,35
	17,93	16,45	22,48	18,79	16,99	15,39	21,54	17,79
	18,13	16,60	22,42	18,90	17,08	15,67	21,95	18,04
	17,44	15,68	22,19	18,24	15,66	16,16	22,72	17,91
	17,69	15,91	21,91	18,34	17,94	16,30	22,52	18,74
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,65	16,10	22,19	18,48	16,94	16,02	22,20	18,20
a. MW	17,65	16,11	22,19	18,48	16,96	16,02	22,20	18,20
min c_t	17,26	15,68	21,91	18,24	15,66	15,39	21,54	17,79
max c_t	18,13	16,60	22,48	18,90	17,94	16,43	22,72	18,74
SDV	0,27	0,31	0,17	0,24	0,46	0,33	0,30	0,28
CV [%]	1,53	1,94	0,76	1,32	2,72	2,05	1,37	1,55

(-)- Hydnocarpin D 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,25	15,44	21,24	17,47	16,94	15,54	22,19	18,01
	16,90	15,62	22,14	18,01	17,24	15,75	21,71	18,06
	16,08	15,43	21,50	17,47	18,14	16,45	22,93	18,99
	17,18	15,25	21,80	17,87	18,09	16,73	23,45	19,22
	16,61	15,29	21,42	17,59	18,32	16,72	23,43	19,29
	16,68	15,76	22,30	18,03	18,36	16,88	23,21	19,30
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	16,61	15,46	21,73	17,74	17,84	16,34	22,81	18,80
a. MW	16,62	15,46	21,73	17,74	17,85	16,35	22,82	18,81
min c_t	16,08	15,25	21,24	17,47	16,94	15,54	21,71	18,01
max c_t	17,18	15,76	22,30	18,03	18,36	16,88	23,45	19,30
SDV	0,30	0,15	0,35	0,23	0,50	0,47	0,58	0,52
CV [%]	1,82	0,97	1,60	1,31	2,82	2,87	2,54	2,75

Verapamil 2 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,13	17,24	20,89	18,34	17,42	17,86	21,88	18,95
	16,95	16,89	20,96	18,17	17,49	17,49	22,10	18,91
	17,41	17,28	21,38	18,60	17,78	17,48	22,07	19,00
	17,09	17,70	22,02	18,81	17,40	17,86	22,46	19,11
	16,75	16,29	21,23	17,96	17,49	17,82	22,30	19,08
	16,34	17,25	21,19	18,14	17,60	17,46	22,09	18,93
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	16,94	17,11	21,27	18,34	17,53	17,66	22,15	19,00
a. MW	16,94	17,11	21,28	18,34	17,53	17,66	22,15	19,00
min c_t	16,34	16,29	20,89	17,96	17,40	17,46	21,88	18,91
max c_t	17,41	17,70	22,02	18,81	17,78	17,86	22,46	19,11
SDV	0,27	0,35	0,28	0,25	0,11	0,19	0,15	0,07
CV [%]	1,58	2,02	1,32	1,34	0,62	1,05	0,69	0,35

Verapamil 2 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	14,39	13,60	18,56	15,37	15,02	14,96	19,75	16,43
	14,30	13,29	18,63	15,24	14,46	14,91	19,79	16,22
	14,86	14,45	19,08	16,00	14,50	14,81	19,31	16,07
	15,03	14,48	19,24	16,12	14,79	14,53	19,23	16,05
	14,96	14,02	19,08	15,88	16,14	14,61	20,07	16,79
	14,92	14,25	19,00	15,93	15,79	15,40	20,04	16,95
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	14,74	14,01	18,93	15,75	15,11	14,87	19,69	16,41
a. MW	14,74	14,02	18,93	15,76	15,12	14,87	19,70	16,42
min c_t	14,30	13,29	18,56	15,24	14,46	14,53	19,23	16,05
max c_t	15,03	14,48	19,24	16,12	16,14	15,40	20,07	16,95
SDV	0,27	0,38	0,22	0,30	0,56	0,22	0,29	0,31
CV [%]	1,81	2,71	1,19	1,90	3,72	1,48	1,45	1,86

Dexa- methason 2 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,84	17,08	22,95	19,13	17,35	16,13	22,65	18,51
	18,23	17,22	22,92	19,31	17,48	16,25	23,05	18,71
	18,37	17,38	23,33	19,53	18,37	17,01	23,95	19,56
	18,32	17,45	23,90	19,69	18,91	17,30	24,46	20,00
	17,66	16,32	22,45	18,63	18,30	17,68	23,93	19,78
	17,82	16,56	23,29	19,02	18,73	17,63	24,09	19,96
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,04	17,00	23,14	19,21	18,18	16,99	23,68	19,41
a. MW	18,04	17,00	23,14	19,22	18,19	17,00	23,69	19,42
min c_t	17,66	16,32	22,45	18,63	17,35	16,13	22,65	18,51
max c_t	18,37	17,45	23,90	19,69	18,91	17,68	24,46	20,00
SDV	0,27	0,37	0,37	0,29	0,52	0,54	0,56	0,54
CV [%]	1,47	2,20	1,59	1,52	2,84	3,18	2,36	2,79

6.1.3 Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 2 h-Inkubation (n= 6 Proben)

r = Korrelationskoeffizient

p = p-Wert

BK = BestKeeper

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,060	0,866	0,040
RPLP 0	0,793		0,618	0,011
SDHA	-0,089	0,262		0,357
BK	0,831	0,914	0,462	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,017	0,001	0,001
RPLP 0	0,892		0,036	0,006
SDHA	0,972	0,842		0,001
BK	0,991	0,937	0,972	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) sowie Proben (rechts) von Taxifolin

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,918	0,091	0,025
RPLP 0	0,057		0,528	0,325
SDHA	0,743	-0,326		0,203
BK	0,869	0,490	0,604	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,345	0,534	0,721
RPLP 0	0,470		0,078	0,906
SDHA	0,320	0,763		0,844
BK	0,106	0,013	0,035	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Silibinin

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,120	0,006	0,004
RPLP 0	0,701		0,059	0,018
SDHA	0,937	0,794		0,002
BK	0,946	0,888	0,968	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,689	0,410	0,010
RPLP 0	0,208		0,067	0,251
SDHA	0,417	0,779		0,105
BK	0,917	0,558	0,723	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,815	0,276	0,087
RPLP 0	0,125		0,240	0,102
SDHA	0,534	0,567		0,032
BK	0,749	0,725	0,851	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,637	0,120	0,198
RPLP 0	-0,246		0,093	0,185
SDHA	-0,702	0,740		0,881
BK	0,609	0,625	0,080	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin B (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,092	0,022	0,004
RPLP 0	0,741		0,059	0,015
SDHA	0,877	0,795		0,003
BK	0,946	0,899	0,953	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,229	0,166	0,070
RPLP 0	0,579		0,019	0,005
SDHA	0,646	0,886		0,003
BK	0,776	0,944	0,958	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin B (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,469	0,663	0,084
RPLP 0	0,372		0,013	0,021
SDHA	0,229	0,907		0,061
BK	0,753	0,878	0,790	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,689	0,751	0,174
RPLP 0	-0,208		0,391	0,333
SDHA	0,166	0,434		0,056
BK	0,636	0,481	0,799	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin C

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,086	-	0,002
RPLP 0	0,750		-	0,012
SDHA	-	-		-
BK	0,959	0,908	-	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,006	-	0,001
RPLP 0	0,937		-	0,001
SDHA	-	-		-
BK	0,982	0,986	-	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Isourolithin A

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,438	0,122	0,089
RPLP 0	0,395		0,044	0,019
SDHA	0,700	0,823		0,001
BK	0,746	0,886	0,973	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,903	0,637	0,683
RPLP 0	-0,066		0,046	0,006
SDHA	0,248	0,820		0,003
BK	0,216	0,935	0,958	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,008	0,010	0,002
RPLP 0	0,925		0,003	0,001
SDHA	0,917	0,958		0,001
BK	0,965	0,986	0,981	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,453	0,030	0,001
RPLP 0	-0,383		0,737	0,737
SDHA	0,855	-0,175		0,014
BK	0,979	-0,175	0,900	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,067	0,067	0,007
RPLP 0	0,780		0,196	0,012
SDHA	0,781	0,613		0,025
BK	0,930	0,910	0,868	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,061	0,145	0,032
RPLP 0	0,791		0,008	0,001
SDHA	0,670	0,924		0,004
BK	0,850	0,984	0,948	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,108	0,133	0,014
RPLP 0	0,718		0,122	0,007
SDHA	0,684	0,699		0,039
BK	0,903	0,932	0,834	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,963	0,605	0,126
RPLP 0	0,023		0,041	0,105
SDHA	-0,269	0,830		0,345
BK	0,694	0,722	0,473	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (+)-Hydnocarpin D

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,895	0,226	0,067
RPLP 0	-0,070		0,112	0,251
SDHA	0,582	0,712		0,003
BK	0,779	0,558	0,957	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,018	0,001
RPLP 0	0,980		0,009	0,001
SDHA	0,889	0,921		0,003
BK	0,981	0,992	0,957	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (-)-Hydnocarpin D

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,563	0,716	0,159
RPLP 0	0,300		0,289	0,031
SDHA	0,193	0,521		0,102
BK	0,654	0,854	0,726	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,090	0,599	0,650
RPLP 0	-0,745		0,528	0,159
SDHA	-0,272	0,326		0,046
BK	-0,239	0,654	0,819	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Verapamil (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,009	0,002	0,001
RPLP 0	0,920		0,012	0,001
SDHA	0,966	0,911		0,002
BK	0,975	0,980	0,968	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,730	0,081	0,012
RPLP 0	0,180		0,318	0,257
SDHA	0,757	0,494		0,013
BK	0,909	0,551	0,905	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Verapamil (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,012	0,140	0,006
RPLP 0	0,909		0,148	0,004
SDHA	0,677	0,668		0,031
BK	0,938	0,950	0,852	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,021	0,001	0,001
RPLP 0	0,878		0,021	0,003
SDHA	0,982	0,880		0,001
BK	0,979	0,954	0,978	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Dexamethason

6.1.4 Relative Expression von p-GP nach 2 h-Inkubation (n= 9)

Taxifolin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,044	0,823 – 1,452	0,767	-

Silibinin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,889	0,488 – 1,457	0,506	-

Urolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,859	0,613 – 1,188	0,208	-

Urolithin B	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,467	1,003 – 2,077	0,017	UP
2. Messung	1,137	0,842 – 1,738	0,342	-

Urolithin C	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,184	0,776 – 1,668	0,211	-

Isourolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,833	0,517 – 1,908	0,335	-

M1	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,090	0,675 – 1,985	0,712	-

rac. Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,643	0,349 – 0,962	0,002	DOWN
2. Messung	1,121	0,686 – 1,824	0,513	-

(+)- Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,922	0,552 – 1,543	0,621	-

(-)-Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,280	0,630 – 2,649	0,312	-

Verapamil	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,738	0,512 – 1,100	0,035	DOWN
2. Messung	1,183	0,725 – 2,413	0,439	-

Dexamethason	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,951	0,570 – 1,683	0,787	-

6.2 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 24 Stunden

6.2.1 Konzentration und Reinheit der nach 24 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

Taxifolin 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	189,28	2,08	165,92	2,02
Kontrolle 2	217,92	2,07	183,04	2,09
Kontrolle 3	222,24	2,06	184,72	2,03
Probe 1	154,64	2,05	232,56	2,06
Probe 2	163,2	2,1	172,88	2,07
Probe 3	117,84	2,06	111,84	2,07

Silibinin 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	214,88	1,88	186,48	1,77
Kontrolle 2	208,08	1,97	225,44	2,03
Kontrolle 3	184,56	2,02	164,16	2,02
Probe 1	184,24	1,76	219,76	1,76
Probe 2	204,56	2,08	209,04	2,04
Probe 3	184,88	1,99	160,56	1,96

Urolithin A 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	297,6	2,06	265,44	2,08
	240,08	2,08	208,72	2,04
	219,04	2,12	220,4	2,11
Kontrolle 2	102,32	2,01	107,76	1,94
	134,96	2,05	160,8	2,04
	292,32	2,11	323,36	2,1
Kontrolle 3	188,64	2,11	198,4	2,07
	230,96	2,07	217,68	2,09
	338,8	2,08	401,04	2,08
Probe 1	115,84	2,01	131,44	2,02
	264,16	2,08	293,92	2,08
	240,88	2,11	249,68	2,06
Probe 2	152,32	2,06	170,48	2,03
	269,6	2,09	312,32	2,07
	213,28	2,1	313,52	2,05
Probe 3	126,08	2,01	128,4	2,02
	415,2	2,08	297,84	2,05
	264,72	2,1	273,6	2,1

Urolithin B 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	215,52	2,09	223,28	2,07
Kontrolle 2	273,12	2,08	265,68	2,07
Kontrolle 3	269,12	2,08	273,44	2,08
Probe 1	198,24	2,06	206,08	2,04
Probe 2	209,68	2,07	243,2	2,1
Probe 3	220,88	2,07	244,88	2,06

Urolithin C 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	237,6	2,07	286,48	2,07
Kontrolle 2	249,92	2,09	277,36	2,08
Kontrolle 3	315,92	2,09	302,48	2,07
Probe 1	152,72	2,09	177,52	2,1
Probe 2	177,92	2,03	206,24	2,1
Probe 3	163,84	2,05	169,12	2,07

Isourolithin A 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	203,92	2,1	223,44	2,1
Kontrolle 2	199,84	2,09	235,84	2,1
Kontrolle 3	189,04	2,06	194,4	2,06
Probe 1	166,72	2,08	158,08	2,08
Probe 2	163,12	2,12	181,68	2,09
Probe 3	232,32	2,09	242,72	2,1

M1 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	195,52	2,09	212,56	2,07
	245,6	2,09	238,32	2,08
	314,88	2,08	306,08	2,11
Kontrolle 2	213,6	2,07	273,44	2,07
	262,56	2,09	316	2,08
	266,4	2,05	327,52	2,1
Kontrolle 3	222,56	2,07	236,4	2,06
	237,44	2,05	323,92	2,09
	300,96	2,03	249,28	2,09
Probe 1	240,4	2,05	286,4	2,06
	225,2	2,06	265,76	2,06
	223,76	2,08	186,8	2,1
Probe 2	168,96	1,98	159,6	1,68
	375,6	2,08	311,68	2,07
	264,56	2,06	229,2	2,06
Probe 3	163,28	2,02	178,72	2,02
	258,64	2,09	308,72	2,08
	263,28	2,1	224	2,06

rac. Hydnocarpin D 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	143,12	1,71	134,72	1,63
	175,04	2,1	188	2,12
	259,92	1,74	209,92	2,04
Kontrolle 2	271,68	2,07	280,48	2,08
	202,8	2,12	186,96	2,09
	220,64	2,05	274,96	2,06
Kontrolle 3	247,6	2,09	261,6	2,1
	183,36	2,14	190,16	2,11
	218,88	2,07	255,68	2,06
Probe 1	185,2	2,05	191,76	2,06
	132,8	2,2	134,4	2,21
	169,76	1,92	165,84	1,94
Probe 2	181,28	2,08	175,52	2,07
	195,76	2,15	188,8	2,17
	167,76	2,05	178,32	1,99
Probe 3	202,08	2,08	223,36	2,09
	240,32	2,1	245,84	2,1
	283,68	1,99	232,08	2,04

(+)- Hydnocarpin D 24 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	376,64	2,1	310	2,07
	218,48	2,03	247,28	2,06
Kontrolle 2	260,4	2,09	332,4	2,07
	217,36	2,06	168,96	2,14
Kontrolle 3	251,84	2,06	250,08	2,07
	222,88	2,06	238,8	2,06
Probe 1	7,36	1,53	305,36	2,09
	217,12	2,08	203,28	2,09
Probe 2	219,2	2,05	293,76	2,08
	244,48	2,08	214,72	2,05
Probe 3	257,28	2,08	329,44	2,05
	300,48	2,09	296,24	2,07

(-)-Hydnocarpin D 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	258,32	2,06	353,28	2,07
	231,36	2,1	267,84	2,1
Kontrolle 2	254,64	2,05	180,8	2,01
	165,52	1,99	173,04	2,01
Kontrolle 3	270,88	2,06	277,84	2,05
	269,76	2,1	266,08	2,09
Probe 1	417,52	2,05	468,08	2,08
	204,32	2,1	328,48	2,1
Probe 2	313,84	1,99	282,96	2
	222,08	2,12	265,12	2,05
Probe 3	153,68	1,93	194,4	1,98
	176,72	1,94	166,08	1,86

Verapamil 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	40,88	2,04	45,12	2,07
Kontrolle 2	189,68	2,07	228,08	2,03
Kontrolle 3	168	2,08	192,48	2,05
Probe 1	104,16	2,06	103,52	2,05
Probe 2	82	2,05	80,56	2,02
Probe 3	82,96	2,03	90,16	2,04

Dexamethason 24 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	208,16	2,12	273,28	2,1
Kontrolle 2	257,76	2,1	294,48	2,08
Kontrolle 3	229,92	2,09	193,92	2,05
Probe 1	269,2	2,06	329,92	2,05
Probe 2	187,04	2,1	180,56	2,08
Probe 3	237,44	2,08	214,72	2,08

6.2.2 BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 24 Stunden

c_t =	threshold cycle	n =	Stichprobenzahl
g. MW =	geometrischer Mittelwert	$\min c_t$ =	minimaler threshold cycle
a. MW =	arithmetischer Mittelwert	$\max c_t$ =	maximaler threshold cycle
sdv =	Standardabweichung	CV =	coefficient of variance
BK =	BestKeeper		

Taxifolin 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,77	19,50	22,79	19,53	17,07	17,48	20,12	18,17
	18,84	19,08	22,34	20,03	17,40	16,98	19,69	17,98
	19,00	18,85	21,98	19,89	18,28	18,54	21,87	19,50
	19,64	19,09	22,43	20,33	18,52	19,08	21,97	19,80
	19,37	18,51	22,23	19,98	18,94	18,48	20,14	19,17
	19,25	19,16	22,44	20,23	18,98	18,69	21,76	19,76
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,79	19,03	22,37	20,00	18,18	18,19	20,90	19,05
a. MW	18,81	19,03	22,37	20,00	18,20	18,21	20,92	19,06
$\min c_t$	16,77	18,51	21,98	19,53	17,07	16,98	19,69	17,98
$\max c_t$	19,64	19,50	22,79	20,33	18,98	19,08	21,97	19,80
SDV	0,68	0,23	0,18	0,20	0,64	0,65	0,94	0,66
CV [%]	3,62	1,23	0,83	0,99	3,53	3,59	4,49	3,45

Silibinin 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	19,09	19,59	22,93	20,47	17,89	17,88	20,69	18,78
	19,03	19,32	22,57	20,24	17,83	17,85	21,12	18,87
	18,65	19,04	22,24	19,92	18,04	18,13	21,69	19,21
	18,66	19,38	21,76	19,89	17,76	17,97	20,99	18,85
	18,77	18,94	21,80	19,79	18,11	17,71	21,80	19,12
	18,59	19,46	21,79	19,90	17,96	18,20	21,27	19,09
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,80	19,29	22,18	20,03	17,93	17,95	21,26	18,99
a. MW	18,80	19,29	22,18	20,03	17,93	17,95	21,26	18,99
min c_t	18,59	18,94	21,76	19,79	17,76	17,71	20,69	18,78
max c_t	19,09	19,59	22,93	20,47	18,11	18,20	21,80	19,21
SDV	0,17	0,20	0,40	0,21	0,11	0,14	0,33	0,15
CV [%]	0,91	1,03	1,80	1,07	0,59	0,80	1,54	0,81

Urolithin A 24 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,63	17,80	21,15	18,79	18,54	17,79	21,86	19,32
	17,42	17,54	20,98	18,57	17,92	18,87	22,01	19,52
	18,22	18,36	21,31	19,25	18,33	18,06	21,18	19,14
	18,03	18,13	21,41	19,13	18,20	17,61	21,82	19,12
	17,72	17,44	20,44	18,48	18,88	18,86	21,52	19,71
	17,66	18,15	20,81	18,82	18,24	18,77	21,70	19,51
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,78	17,90	21,01	18,84	18,35	18,32	21,68	19,39
a. MW	17,78	17,90	21,02	18,84	18,35	18,32	21,68	19,39
min c_t	17,42	17,44	20,44	18,48	17,92	17,61	21,18	19,12
max c_t	18,22	18,36	21,41	19,25	18,88	18,87	22,01	19,71
SDV	0,23	0,31	0,28	0,23	0,24	0,51	0,22	0,20
CV [%]	1,30	1,73	1,31	1,22	1,31	2,77	1,01	1,01

Urolithin A 24 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,14	15,09	18,72	16,58	15,84	14,93	18,63	16,39
	15,97	15,20	19,07	16,67	15,20	15,04	18,69	16,23
	15,26	14,76	19,09	16,26	15,92	14,71	18,46	16,29
	16,34	15,37	19,11	16,87	15,50	14,14	18,71	16,01
	15,10	14,91	18,38	16,05	15,23	15,67	19,39	16,66
	15,35	15,21	18,38	16,25	15,73	15,94	19,54	16,98
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,68	15,09	18,79	16,44	15,56	15,06	18,90	16,42
a. MW	15,69	15,09	18,79	16,45	15,57	15,07	18,90	16,43
min c_t	15,10	14,76	18,38	16,05	15,20	14,14	18,46	16,01
max c_t	16,34	15,37	19,11	16,87	15,92	15,94	19,54	16,98
SDV	0,46	0,17	0,30	0,26	0,26	0,49	0,37	0,26
CV [%]	2,91	1,14	1,60	1,58	1,68	3,23	1,98	1,61

Urolithin A 24 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,25	18,44	21,33	19,29	19,55	18,98	21,89	20,10
	18,38	18,56	21,41	19,41	19,51	19,27	21,99	20,22
	17,46	17,31	20,71	18,43	18,14	18,05	21,20	19,08
	17,60	17,61	20,65	18,57	18,32	18,53	21,00	19,25
	18,08	18,53	21,45	19,29	18,23	17,68	20,57	18,78
	18,25	19,05	21,65	19,60	18,45	19,22	21,21	19,59
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,00	18,24	21,20	19,09	18,69	18,61	21,31	19,50
a. MW	18,00	18,25	21,20	19,10	18,70	18,62	21,31	19,50
min c_t	17,46	17,31	20,65	18,43	18,14	17,68	20,57	18,78
max c_t	18,38	19,05	21,65	19,60	19,55	19,27	21,99	20,22
SDV	0,31	0,53	0,35	0,40	0,55	0,54	0,42	0,47
CV [%]	1,74	2,89	1,63	2,09	2,96	2,88	1,96	2,40

Urolithin B 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,09	14,55	18,70	16,01	15,17	14,70	18,81	16,12
	15,49	14,60	18,81	16,20	15,02	14,64	18,16	15,86
	15,40	15,06	18,18	16,15	14,63	13,75	17,73	15,28
	15,33	15,23	18,63	16,32	14,32	14,11	18,12	15,41
	15,02	14,23	17,70	15,59	15,53	14,33	18,27	15,96
	15,33	14,63	18,53	16,07	15,36	14,20	18,17	15,82
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,27	14,71	18,42	16,06	15,00	14,29	18,20	15,74
a. MW	15,28	14,72	18,42	16,06	15,00	14,29	18,21	15,74
min c_t	15,02	14,23	17,70	15,59	14,32	13,75	17,73	15,28
max c_t	15,49	15,23	18,81	16,32	15,53	14,70	18,81	16,12
SDV	0,14	0,29	0,32	0,17	0,35	0,27	0,22	0,26
CV [%]	0,94	1,95	1,75	1,07	2,34	1,87	1,21	1,68

Urolithin C 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,20	15,21	18,44	16,21	15,18	13,39	18,17	15,46
	15,48	14,41	18,73	16,10	15,01	13,95	18,21	15,62
	14,46	14,33	18,21	15,57	14,21	14,07	17,71	15,24
	15,24	14,38	17,89	15,77	14,33	13,50	17,92	15,14
	15,99	14,29	17,81	15,97	15,28	14,68	18,97	16,20
	14,96	14,28	18,30	15,75	15,41	14,49	19,06	16,20
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,21	14,48	18,23	15,89	14,90	14,01	18,33	15,64
a. MW	15,22	14,49	18,23	15,90	14,90	14,01	18,34	15,64
min c_t	14,46	14,28	17,81	15,57	14,21	13,39	17,71	15,14
max c_t	15,99	15,21	18,73	16,21	15,41	14,68	19,06	16,20
SDV	0,35	0,24	0,26	0,20	0,42	0,40	0,45	0,37
CV [%]	2,27	1,67	1,41	1,25	2,82	2,86	2,45	2,38

Isourolithin A 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,65	15,48	-	16,05	17,27	15,78	-	16,51
	16,66	16,00	-	16,33	17,23	15,99	-	16,60
	17,96	17,15	-	17,55	17,65	16,10	-	16,86
	18,13	17,04	-	17,58	17,68	16,15	-	16,90
	16,51	15,88	-	16,20	17,26	15,91	-	16,58
	16,50	15,47	-	15,98	17,21	16,07	-	16,63
n	6	6	-	6	6	6	-	6
g. MW	17,06	16,15	-	16,60	17,39	16,00	-	16,68
a. MW	17,07	16,17	-	16,61	17,39	16,00	-	16,68
min c_t	16,50	15,47	-	15,98	17,21	15,78	-	16,51
max c_t	18,13	17,15	-	17,58	17,68	16,15	-	16,90
SDV	0,65	0,62	-	0,63	0,19	0,11	-	0,13
CV [%]	3,80	3,81	-	3,81	1,07	0,66	-	0,79

M1 24 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,50	17,17	20,32	18,28	17,02	17,50	20,31	18,22
	16,74	16,74	19,88	17,73	17,23	17,31	20,14	18,18
	17,39	16,93	20,27	18,14	17,22	17,35	20,51	18,30
	17,09	17,07	19,99	18,00	17,49	17,29	21,02	18,52
	17,03	16,69	20,28	17,93	17,57	18,43	20,95	18,93
	17,09	16,98	20,31	18,06	18,07	18,03	21,54	19,15
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,14	16,92	20,18	18,02	17,43	17,64	20,74	18,55
a. MW	17,14	16,93	20,18	18,02	17,43	17,65	20,74	18,55
min c_t	16,74	16,69	19,88	17,73	17,02	17,29	20,14	18,18
max c_t	17,50	17,17	20,32	18,28	18,07	18,43	21,54	19,15
SDV	0,20	0,14	0,16	0,14	0,28	0,39	0,42	0,33
CV [%]	1,19	0,85	0,80	0,76	1,58	2,19	2,04	1,75

M1 24 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c _t -Werte	15,82	15,36	19,32	16,74	15,39	14,39	18,27	15,93
	15,35	15,31	19,29	16,55	15,30	14,73	18,33	16,04
	15,24	14,14	18,48	15,85	15,04	14,62	18,06	15,84
	15,44	14,43	18,55	16,05	15,17	14,35	18,47	15,90
	14,74	14,25	18,31	15,67	15,03	14,95	19,09	16,25
	14,93	14,23	18,75	15,85	15,09	15,25	19,02	16,36
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,25	14,61	18,78	16,11	15,17	14,71	18,53	16,05
a. MW	15,25	14,62	18,78	16,12	15,17	14,72	18,54	16,05
min c _t	14,74	14,14	18,31	15,67	15,03	14,35	18,06	15,84
max c _t	15,82	15,36	19,32	16,74	15,39	15,25	19,09	16,36
SDV	0,28	0,48	0,35	0,35	0,11	0,26	0,34	0,17
CV [%]	1,84	3,25	1,86	2,18	0,75	1,78	1,85	1,05

M1 24 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c _t -Werte	17,70	16,93	20,25	18,24	17,10	17,15	20,45	18,17
	17,37	17,26	20,25	18,24	17,84	17,14	20,79	18,52
	17,35	16,94	20,29	18,14	18,17	18,25	20,93	19,07
	17,32	17,36	20,48	18,33	18,23	17,89	20,83	18,94
	17,41	17,16	20,36	18,26	17,95	17,18	20,70	18,55
	17,77	17,13	20,61	18,44	18,21	17,66	20,67	18,80
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,49	17,13	20,37	18,27	17,91	17,54	20,73	18,67
a. MW	17,49	17,13	20,37	18,27	17,92	17,54	20,73	18,68
min c _t	17,32	16,93	20,25	18,14	17,10	17,14	20,45	18,17
max c _t	17,77	17,36	20,61	18,44	18,23	18,25	20,93	19,07
SDV	0,16	0,13	0,11	0,07	0,30	0,39	0,12	0,26
CV [%]	0,93	0,76	0,56	0,40	1,66	2,21	0,59	1,40

rac. Hydnocarpin D 24 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,77	18,25	22,85	19,85	17,56	16,45	20,39	18,06
	18,84	18,46	22,65	19,90	17,71	16,23	20,35	18,02
	17,27	16,56	20,78	18,11	17,28	15,62	20,07	17,56
	17,33	16,31	20,61	17,99	17,35	15,62	19,82	17,51
	17,38	16,58	20,06	17,95	17,62	16,32	20,75	18,14
	17,37	16,66	20,69	18,16	17,88	16,28	20,85	18,24
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,81	17,12	21,25	18,64	17,56	16,08	20,37	17,92
a. MW	17,82	17,14	21,27	18,66	17,57	16,09	20,38	17,92
min c_t	17,27	16,31	20,06	17,95	17,28	15,62	19,82	17,51
max c_t	18,84	18,46	22,85	19,90	17,88	16,45	20,85	18,24
SDV	0,65	0,81	0,98	0,81	0,17	0,31	0,29	0,26
CV [%]	3,67	4,73	4,61	4,34	0,97	1,94	1,43	1,43

rac. Hydnocarpin D 24 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,58	14,94	19,49	16,56	16,20	14,40	19,06	16,44
	15,52	14,89	19,44	16,50	16,19	14,38	19,52	16,56
	15,58	15,00	18,78	16,37	16,38	14,42	18,83	16,45
	15,55	15,01	18,57	16,30	16,30	14,62	18,48	16,39
	15,63	14,95	18,63	16,33	16,40	15,09	19,50	16,90
	15,50	14,90	18,41	16,20	16,79	15,22	19,36	17,04
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,56	14,95	18,88	16,38	16,37	14,69	19,12	16,63
a. MW	15,56	14,95	18,89	16,38	16,38	14,69	19,12	16,63
min c_t	15,50	14,89	18,41	16,20	16,19	14,38	18,48	16,39
max c_t	15,63	15,01	19,49	16,56	16,79	15,22	19,52	17,04
SDV	0,04	0,04	0,39	0,10	0,15	0,31	0,34	0,23
CV [%]	0,24	0,28	2,05	0,61	0,90	2,12	1,76	1,36

rac. Hydnocarpin D 24 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,74	17,46	21,06	18,69	18,55	17,56	21,37	19,10
	17,71	17,39	20,80	18,57	18,97	17,35	21,71	19,26
	17,94	17,29	20,73	18,60	18,30	16,92	20,44	18,50
	18,41	17,42	20,70	18,79	17,89	17,25	20,80	18,58
	17,58	17,18	20,58	18,39	19,07	17,46	20,95	19,11
	18,47	17,39	20,80	18,83	19,02	18,04	21,10	19,35
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,97	17,35	20,78	18,64	18,63	17,43	21,06	18,98
a. MW	17,97	17,35	20,78	18,64	18,63	17,43	21,06	18,98
min c_t	17,58	17,18	20,58	18,39	17,89	16,92	20,44	18,50
max c_t	18,47	17,46	21,06	18,83	19,07	18,04	21,71	19,35
SDV	0,31	0,08	0,11	0,13	0,38	0,26	0,33	0,29
CV [%]	1,73	0,45	0,52	0,68	2,06	1,48	1,57	1,55

(+) - Hydnocarpin D 24 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,31	15,45	18,16	16,26	16,38	15,86	18,11	16,76
	15,60	15,40	18,33	16,39	16,11	15,28	18,37	16,54
	15,39	14,88	17,91	16,01	17,49	14,84	18,01	16,72
	15,47	15,16	17,77	16,09	16,66	16,45	17,87	16,99
	16,63	15,94	17,68	16,74	16,66	16,40	19,22	17,38
	16,35	15,45	18,23	16,64	16,66	15,77	19,51	17,24
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,79	15,38	18,01	16,35	16,66	15,76	18,50	16,94
a. MW	15,79	15,38	18,01	16,35	16,66	15,77	18,51	16,94
min c_t	15,31	14,88	17,68	16,01	16,11	14,84	17,87	16,54
max c_t	16,63	15,94	18,33	16,74	17,49	16,45	19,51	17,38
SDV	0,47	0,24	0,23	0,24	0,28	0,47	0,56	0,27
CV [%]	2,96	1,57	1,25	1,44	1,66	3,00	3,05	1,57

(+)- Hydnocarpin D 24 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	24,77	24,97	28,32	25,97	18,94	18,63	21,26	19,58
	24,55	25,38	27,79	25,87	18,94	18,37	21,01	19,41
	27,18	27,66	30,75	28,48	19,03	18,41	21,35	19,56
	27,23	28,00	30,72	28,61	31,42	31,80	37,98	33,60
	23,37	25,15	32,04	26,60	31,33	32,78	27,59	30,49
	23,40	25,28	31,75	26,58	30,99	31,92	36,33	33,00
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	25,03	26,04	30,18	27,00	24,34	24,37	26,71	25,12
a. MW	25,08	26,07	30,23	27,02	25,11	25,32	27,59	25,94
min c_t	23,37	24,97	27,79	25,87	18,94	18,37	21,01	19,41
max c_t	27,23	28,00	32,04	28,61	31,42	32,78	37,98	33,60
SDV	1,41	1,17	1,45	1,02	6,14	6,85	6,38	6,43
CV [%]	5,64	4,48	4,79	3,77	24,46	27,05	23,12	24,77

(-)- Hydnocarpin D 24 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,49	15,21	18,08	16,21	15,59	14,86	18,10	16,13
	16,19	15,29	18,20	16,52	15,79	13,99	17,93	15,82
	16,46	16,20	19,18	17,23	16,30	15,88	18,44	16,84
	16,52	16,10	19,01	17,17	16,93	15,56	18,55	16,97
	16,86	16,53	20,07	17,75	17,18	16,67	19,90	17,86
	16,30	16,47	20,15	17,56	17,28	16,59	19,78	17,83
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	16,30	15,96	19,10	17,06	16,50	15,56	18,77	16,89
a. MW	16,30	15,97	19,12	17,07	16,51	15,59	18,78	16,91
min c_t	15,49	15,21	18,08	16,21	15,59	13,99	17,93	15,82
max c_t	16,86	16,53	20,15	17,75	17,28	16,67	19,90	17,86
SDV	0,31	0,48	0,69	0,47	0,62	0,79	0,71	0,65
CV [%]	1,90	3,00	3,59	2,77	3,73	5,07	3,76	3,82

(-)-Hydnocarpin D 24 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	27,25	27,87	30,44	28,49	30,67	31,80	35,29	32,53
	27,45	27,89	30,77	28,67	31,12	32,52	35,40	32,97
	29,97	31,71	32,71	31,45	26,22	28,10	34,61	29,44
	40,06	31,68	34,74	35,33	26,38	28,29	34,74	29,60
	32,93	33,37	37,39	34,51	30,92	32,40	35,29	32,82
	32,07	33,96	33,21	33,07	30,59	32,79	36,40	33,18
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	31,34	30,99	33,13	31,81	29,24	30,92	35,28	31,71
a. MW	31,62	31,08	33,21	31,92	29,32	30,98	35,29	31,75
min c_t	27,25	27,87	30,44	28,49	26,22	28,10	34,61	29,44
max c_t	40,06	33,96	37,39	35,33	31,12	32,79	36,40	33,18
SDV	3,40	2,13	1,90	2,38	2,01	1,86	0,41	1,49
CV [%]	10,75	6,87	5,73	7,47	6,86	6,00	1,15	4,70

Verapamil 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	19,43	19,18	22,16	20,21	18,27	18,69	22,05	19,60
	19,58	19,29	22,59	20,43	18,59	19,07	21,91	19,80
	17,41	17,02	20,12	18,13	18,42	17,76	22,31	19,40
	17,20	17,54	20,28	18,29	18,51	17,98	22,11	19,45
	18,37	18,14	21,37	19,24	19,08	18,23	22,18	19,76
	18,31	18,78	21,65	19,52	18,89	18,39	22,33	19,80
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,36	18,30	21,34	19,29	18,62	18,35	22,15	19,63
a. MW	18,38	18,32	21,36	19,31	18,62	18,35	22,15	19,63
min c_t	17,20	17,02	20,12	18,13	18,27	17,76	21,91	19,40
max c_t	19,58	19,29	22,59	20,43	19,08	19,07	22,33	19,80
SDV	0,75	0,76	0,77	0,75	0,24	0,36	0,13	0,15
CV [%]	4,07	4,15	3,62	3,90	1,28	1,98	0,57	0,77

Dexa- methason 24 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,99	16,93	19,11	17,65	17,78	17,50	19,86	18,35
	16,92	16,64	19,46	17,63	17,41	16,59	20,01	17,94
	17,72	18,57	20,89	19,01	16,43	16,56	19,93	17,57
	17,89	17,69	20,99	18,80	16,45	16,99	19,68	17,65
	16,93	17,21	19,85	17,95	16,83	17,42	20,33	18,13
	17,26	17,24	20,48	18,27	17,08	17,58	20,34	18,28
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,28	17,37	20,12	18,21	16,99	17,10	20,02	17,98
a. MW	17,28	17,38	20,13	18,22	17,00	17,10	20,02	17,99
min c_t	16,92	16,64	19,11	17,63	16,43	16,56	19,68	17,57
max c_t	17,89	18,57	20,99	19,01	17,78	17,58	20,34	18,35
SDV	0,34	0,50	0,66	0,47	0,43	0,39	0,21	0,27
CV [%]	2,00	2,87	3,27	2,61	2,52	2,30	1,04	1,48

6.2.3 Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 24 h-Inkubation (n= 6 Proben)

r = Korrelationskoeffizient

p = p-Wert

BK = BestKeeper

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,133	0,151	0,018
RPLP 0	-0,685		0,061	0,575
SDHA	-0,662	0,791		0,569
BK	0,888	-0,292	-0,297	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,036	0,237	0,025
RPLP 0	0,841		0,037	0,001
SDHA	0,571	0,839		0,017
BK	0,869	0,977	0,892	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) sowie Proben (rechts) von Taxifolin

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,495	0,024	0,017
RPLP 0	0,352		0,424	0,155
SDHA	0,871	0,407		0,005
BK	0,891	0,658	0,943	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,925	0,051	0,045
RPLP 0	-0,049		0,993	0,490
SDHA	0,809	-0,003		0,008
BK	0,821	0,357	0,924	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Silibinin

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,087	0,263	0,027
RPLP 0	0,748		0,146	0,007
SDHA	0,546	0,669		0,039
BK	0,864	0,929	0,835	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,985	0,410	0,506
RPLP 0	0,012		0,933	0,020
SDHA	-0,418	0,046		0,703
BK	0,344	0,882	0,200	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,099	0,251	0,001
RPLP 0	0,730		0,822	0,095
SDHA	0,556	0,119		0,127
BK	0,970	0,737	0,692	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,779	0,575	0,844
RPLP 0	-0,150		0,035	0,004
SDHA	-0,293	0,844		0,030
BK	0,104	0,951	0,855	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,009	0,009	0,002
RPLP 0	0,922		0,001	0,001
SDHA	0,920	0,976		0,001
BK	0,961	0,991	0,985	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,124	0,013	0,007
RPLP 0	0,696		0,066	0,015
SDHA	0,904	0,782		0,003
BK	0,933	0,897	0,956	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,226	0,273	0,057
RPLP 0	0,581		0,495	0,041
SDHA	0,535	0,353		0,063
BK	0,798	0,830	0,787	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,333	0,378	0,051
RPLP 0	0,483		0,042	0,020
SDHA	0,445	0,828		0,033
BK	0,810	0,881	0,849	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin B

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,970	0,663	0,187
RPLP 0	-0,021		0,490	0,141
SDHA	-0,231	0,357		0,383
BK	0,621	0,675	0,439	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,391	0,025	0,031
RPLP 0	0,431		0,093	0,041
SDHA	0,860	0,740		0,001
BK	0,852	0,830	0,975	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin C

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,003	-	0,001
RPLP 0	0,953		-	0,001
SDHA	-	-		-
BK	0,988	0,989	-	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,176	-	0,005
RPLP 0	0,633		-	0,026
SDHA	-	-		-
BK	0,940	0,865	-	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Isourolithin A

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,117	0,107	0,001
RPLP 0	0,705		0,605	0,061
SDHA	0,719	0,269		0,080
BK	0,970	0,790	0,759	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,213	0,006	0,007
RPLP 0	0,596		0,237	0,043
SDHA	0,935	0,572		0,008
BK	0,932	0,826	0,925	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,107	0,126	0,031
RPLP 0	0,719		0,006	0,001
SDHA	0,694	0,935		0,004
BK	0,854	0,969	0,949	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,293	0,365	0,517
RPLP 0	-0,517		0,081	0,012
SDHA	-0,456	0,757		0,009
BK	-0,334	0,911	0,923	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,383	0,495	0,273
RPLP 0	-0,441		0,458	0,361
SDHA	0,350	0,380		0,025
BK	0,535	0,458	0,867	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,148	0,050	0,012
RPLP 0	0,667		0,126	0,012
SDHA	0,811	0,694		0,025
BK	0,911	0,909	0,867	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,002	0,001
RPLP 0	0,992		0,002	0,001
SDHA	0,965	0,959		0,001
BK	0,994	0,993	0,985	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,059	0,033	0,010
RPLP 0	0,794		0,053	0,005
SDHA	0,848	0,806		0,005
BK	0,918	0,944	0,942	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,243	0,970	0,669
RPLP 0	0,564		0,528	0,829
SDHA	0,018	-0,325		0,001
BK	0,226	-0,115	0,970	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,043	0,703	0,061
RPLP 0	0,826		0,453	0,011
SDHA	0,201	0,385		0,124
BK	0,792	0,915	0,696	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,429	0,918	0,021
RPLP 0	0,402		0,055	0,067
SDHA	-0,056	0,801		0,396
BK	0,879	0,780	0,429	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,223	0,276	0,023
RPLP 0	0,585		0,370	0,049
SDHA	0,533	0,451		0,063
BK	0,874	0,814	0,787	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,082	0,663	0,011
RPLP 0	0,756		0,837	0,017
SDHA	-0,231	-0,107		0,881
BK	0,915	0,892	0,078	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,484	0,793	0,815
RPLP 0	-0,360		0,650	0,138
SDHA	-0,141	0,237		0,093
BK	0,122	0,679	0,740	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (+)-Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,007	0,844	0,039
RPLP 0	0,929		0,676	0,002
SDHA	-0,106	0,220		0,365
BK	0,835	0,964	0,455	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,017	0,001
RPLP 0	0,999		0,024	0,001
SDHA	0,891	0,871		0,004
BK	0,988	0,981	0,949	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (+)-Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,054	0,108	0,027
RPLP 0	0,805		0,002	0,001
SDHA	0,718	0,962		0,002
BK	0,864	0,987	0,967	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,026	0,018	0,004
RPLP 0	0,866		0,013	0,001
SDHA	0,887	0,904		0,002
BK	0,945	0,972	0,964	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (-)-Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,237	0,141	0,014
RPLP 0	0,571		0,065	0,034
SDHA	0,675	0,785		0,016
BK	0,901	0,845	0,894	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,111	0,001
RPLP 0	0,987		0,052	0,001
SDHA	0,714	0,808		0,054
BK	0,990	0,999	0,805	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (-)-Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,007	0,001	0,001
RPLP 0	0,929		0,001	0,001
SDHA	0,972	0,978		0,001
BK	0,981	0,981	0,997	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,955	0,551	0,164
RPLP 0	-0,028		0,087	0,104
SDHA	0,307	-0,749		0,624
BK	0,647	0,724	-0,254	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Verapamil

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,052	0,013	0,005
RPLP 0	0,808		0,054	0,007
SDHA	0,905	0,805		0,003
BK	0,944	0,932	0,956	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,474	0,822	0,061
RPLP 0	0,369		0,361	0,043
SDHA	0,119	0,457		0,267
BK	0,790	0,825	0,543	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Dexamethason

6.2.4 Relative Expression von p-GP nach 24 h-Inkubation (n= 9)

Taxifolin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,921	0,634 – 1,376	0,592	-

Silibinin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,963	0,756 – 1,229	0,669	-

Urolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	2,013	1,228 – 3,541	0,001	UP
2. Messung	2,736	1,612 – 4,292	0,0001	UP
3. Messung	3,035	1,725 – 5,120	0,0001	UP

Urolithin B	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,386	1,010 – 1,788	0,008	UP

Urolithin C	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,776	1,322 – 2,578	0,0001	UP

Isourolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,163	0,652 – 2,584	0,510	-

M1	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,292	0,903 – 1,832	0,051	-
2. Messung	0,931	0,685 – 1,339	0,496	-
3. Messung	1,224	0,988 – 1,500	0,019	UP

rac. Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,639	0,409 – 0,947	0,032	DOWN
2. Messung	1,378	0,926 – 1,962	0,022	UP
3. Messung	1,094	0,818 – 1,483	0,400	-

(+)- Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,325	0,720 – 2,962	0,210	-
2. Messung	9,232	0,083 – 5403,403	0,216	-

(-)-Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,188	0,647 – 2,070	0,418	-
2. Messung	0,500	0,063 – 5,022	0,347	-

Verapamil	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,032	0,553 – 1,351	0,924	-

Dexamethason	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,226	0,747 – 2,140	0,351	-

6.3 Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-Transporter nach einer Inkubation von 48 Stunden

6.3.1 Konzentration und Reinheit der nach 48 h-Inkubation mit Polyphenolen isolierten RNA

c = Konzentration an RNA OD = optische Dichte

Taxifolin 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	134,16	1,99	173,04	1,86
	322,72	2,11	370,16	2,1
Kontrolle 2	102,16	1,97	109,84	1,99
	321,6	2,11	294,56	2,1
Kontrolle 3	132,8	2,03	121,52	1,98
	248,96	2,09	271,84	2,11
Probe 1	128,88	2,11	130,08	2,08
	214,64	2,1	267,2	2,1
Probe 2	107,36	2,11	141,2	2,09
	295,36	2,11	336,48	2,1
Probe 3	87,52	1,86	86,32	1,84
	209,68	2,11	367,44	2,11

Silibinin 48 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	145,52	2,06	200,4	2,07
	309,44	2,1	418,08	2,1
Kontrolle 2	124,32	2,03	170,64	2,02
	263,44	2,07	369,84	2,1
Kontrolle 3	105,28	1,89	117,04	1,84
	252,16	2,11	223,28	2,11
Probe 1	117,68	1,85	112,96	1,85
	204,88	2,11	235,52	2,08
Probe 2	138,8	2,05	142,32	2,05
	251,36	2,09	247,6	2,08
Probe 3	122,56	2,04	139,44	2,02
	233,84	2,01	265,28	2,03

Urolithin A 48 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	192,32	2,08	190	2,09
	265,2	2,11	309,12	2,09
	399,84	2,11	340,64	2,08
Kontrolle 2	137,12	2,11	136,64	2,06
	252,56	2,1	285,84	2,08
	155,28	2,16	199,68	2,08
Kontrolle 3	122,88	2,14	135,12	2,07
	302,08	2,08	311,28	2,09
	180,64	2,09	216,96	2,12
Probe 1	117,6	2,08	137,12	2,08
	282,64	2,08	283,28	2,09
	302,56	2,07	268,8	2,08
Probe 2	123,6	2,01	134,24	2,02
	286,88	2,08	280,72	2,07
	239,92	2,09	283,36	2,08
Probe 3	116,48	2,04	123,68	2
	240,64	2,09	223,68	2,09
	208	2,12	266,96	2,09

Urolithin B 48 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	212,96	2,05	227,12	2,06
Kontrolle 2	221,28	2,03	304,8	2,08
Kontrolle 3	220,48	2,09	247,68	2,04
Probe 1	176	2,03	169,28	2,05
Probe 2	162,4	1,96	223,28	2,02
Probe 3	134,24	1,96	159,44	2

Urolithin C 48 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	155,2	2,02	170,24	2,05
	202,16	2,07	215,76	2,07
Kontrolle 2	151,68	2,01	172,32	2,06
	208	2,04	325,52	2,08
Kontrolle 3	206,16	2,03	177,92	1,96
	261,76	2,05	248,32	2,1
Probe 1	97,84	2	92,56	1,99
	142,56	2,03	140,56	2,08
Probe 2	116,64	2,01	115,6	1,97
	84,96	2,03	84	2
Probe 3	105,6	1,78	93,36	1,77
	141,76	1,84	178,4	1,45

Isourolithin A 48 h	c₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	185,68	2,08	211,6	2,07
Kontrolle 2	118	2,06	118,64	2,03
Kontrolle 3	320,32	2,09	329,68	2,09
Probe 1	209,44	2,04	202,96	2,09
Probe 2	213,04	2,07	191,12	2,08
Probe 3	162	2,07	157,36	2,05

M1 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	119,52	2,08	147,92	2,06
	244,8	2,11	347,28	2,1
	342,32	2,03	380,56	1,84
Kontrolle 2	139,44	2,09	136,88	2,05
	224,48	2,06	332,64	2,09
	194,8	1,96	287,36	2,07
Kontrolle 3	135,76	2,09	152,96	2,04
	138,72	2,11	211,76	2,09
	244,96	2,11	252,88	2,12
Probe 1	149,92	2,02	153,6	2,07
	365,2	2,09	318,48	2,08
	148,48	2,17	227,12	2,12
Probe 2	97,2	1,96	94,64	1,99
	319,6	2,1	190,8	2,05
	228,24	2,12	252,16	2,08
Probe 3	104,8	2,06	114,88	1,96
	1,28	2,67	232,48	1,73
	224,8	2,1	254,88	2,15

rac. Hydnocarpin D 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	174,56	2,1	176	2,05
	165,68	2,05	172,56	2,06
	219,36	2,09	256,4	2,09
Kontrolle 2	213,28	2,08	214,4	2,07
	214	2,09	202	2,07
	256,72	2,06	195,12	2,1
Kontrolle 3	199,84	2,07	225,2	2,07
	217,12	2,06	216,56	2,15
	374,4	2,09	272,56	2,11
Probe 1	169,28	2,05	174	2,08
	140,72	2,06	148,48	2,11
	294	2,11	347,12	2,11
Probe 2	156,8	2,08	168,16	2,07
	221,44	2,08	195,84	2,09
	355,2	2,1	346,96	2,08
Probe 3	172	2,05	127,52	2,01
	284,08	2,08	325,6	2,08

(+)- Hydnocarpin D 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	258,72	2,08	250,8	2,09
	311,04	2,07	377,28	2,07
Kontrolle 2	222,24	2,01	235,2	2,03
	340,88	2,1	386,24	2,07
Kontrolle 3	394,96	2,09	351,68	2,12
	281,2	2,04	295,04	2,1
Probe 1	132,08	2,06	135,36	2,04
	233,04	2,11	198,96	2,06
Probe 2	143,76	2	148,24	2,11
	208,88	2,06	212,88	2,05
Probe 3	218,64	2,11	207,52	2,05
	181,2	2,09	234,8	2,06

(-)- Hydnocarpin D 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	244,32	2,09	208,56	2,12
	226,96	2	246,72	2,07
Kontrolle 2	362,64	2,1	315,44	2,1
	174,48	2,09	171,92	2,03
Kontrolle 3	277,92	2,15	264,72	2,12
	149,36	2,06	216,16	2,1
Probe 1	216,64	2,1	192,4	2,08
	223,44	1,89	180,72	1,66
Probe 2	248,08	2,11	251,52	2,08
	231,28	2,04	218	2,03
Probe 3	1,52	9,5	3,28	2,05
	190,16	2	182,88	2,03

Verapamil 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	207,92	2,07	212,32	2,07
Kontrolle 2	135,6	2,1	148,64	1,53
Kontrolle 3	134,64	2,05	151,76	2,1
Probe 1	129,36	2,14	133,44	2,08
Probe 2	125,92	2,03	112,48	2,04
Probe 3	108,16	2,04	102,8	2,04

Dexamethason 48 h	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
Kontrolle 1	292,8	2,1	313,6	2,09
Kontrolle 2	326,16	2,1	379,2	2,1
Kontrolle 3	267,04	2,1	299,92	2,09
Probe 1	293,84	2,05	253,6	2,09
Probe 2	355,12	2,07	358	2,08
Probe 3	276,72	2,1	241,92	2,11

6.3.2 BestKeeper – Auswertung der Referenzgene für die jeweiligen Inkubationen nach 48 Stunden

c _t =	threshold cycle	n =	Stichprobenzahl
g. MW =	geometrischer Mittelwert	min c _t =	minimaler threshold cycle
a. MW =	arithmetischer Mittelwert	max c _t =	maximaler threshold cycle
sdv =	Standardabweichung	CV =	coefficient of variance
BK =	BestKeeper		

Taxifolin 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c _t -Werte	17,79	16,97	20,84	18,46	17,15	16,56	20,28	17,92
	17,69	16,89	20,85	18,40	17,08	16,56	20,87	18,07
	18,18	17,65	21,56	19,05	16,95	16,43	20,38	17,84
	17,85	17,84	21,55	19,01	17,19	16,53	20,30	17,93
	18,47	17,57	21,61	19,14	19,42	18,76	22,69	20,22
	18,10	17,40	21,51	18,92	19,09	18,76	22,62	20,08
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,01	17,38	21,32	18,83	17,78	17,23	21,16	18,65
a. MW	18,01	17,39	21,32	18,83	17,81	17,26	21,19	18,68
min c _t	17,69	16,89	20,84	18,40	16,95	16,43	20,28	17,84
max c _t	18,47	17,84	21,61	19,14	19,42	18,76	22,69	20,22
SDV	0,24	0,30	0,32	0,27	0,96	1,00	0,98	0,98
CV [%]	1,32	1,75	1,49	1,42	5,40	5,76	4,61	5,26

Taxifolin 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,84	14,80	17,54	16,02	14,57	15,29	17,31	15,68
	15,09	13,64	17,80	15,42	15,37	14,56	17,41	15,73
	14,90	13,66	17,53	15,28	15,50	14,64	17,87	15,95
	15,30	14,14	17,49	15,58	15,31	14,58	17,73	15,82
	14,92	14,21	16,88	15,30	16,23	15,18	17,75	16,35
	14,54	13,49	17,53	15,09	15,94	15,04	17,72	16,19
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,09	13,98	17,46	15,45	15,48	14,88	17,63	15,95
a. MW	15,10	13,99	17,46	15,45	15,49	14,88	17,63	15,95
min c_t	14,54	13,49	16,88	15,09	14,57	14,56	17,31	15,68
max c_t	15,84	14,80	17,80	16,02	16,23	15,29	17,87	16,35
SDV	0,31	0,39	0,19	0,24	0,40	0,29	0,18	0,21
CV [%]	2,08	2,82	1,12	1,53	2,60	1,94	1,03	1,33

Silibinin 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,44	16,36	20,09	17,55	18,46	18,24	21,87	19,45
	16,35	16,28	19,66	17,37	18,41	17,62	21,91	19,22
	17,20	16,45	20,25	17,90	16,73	16,42	20,00	17,64
	17,45	16,60	20,10	17,99	16,60	16,45	20,02	17,62
	18,89	17,90	21,91	19,50	17,35	16,46	20,59	18,05
	18,35	18,11	22,06	19,43	17,37	16,69	20,14	18,01
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,43	16,93	20,66	18,27	17,47	16,97	20,74	18,32
a. MW	17,45	16,95	20,68	18,29	17,49	16,98	20,75	18,33
min c_t	16,35	16,28	19,66	17,37	16,60	16,42	20,00	17,62
max c_t	18,89	18,11	22,06	19,50	18,46	18,24	21,91	19,45
SDV	0,78	0,70	0,87	0,78	0,63	0,63	0,75	0,67
CV [%]	4,49	4,15	4,21	4,28	3,62	3,72	3,64	3,66

Silibinin 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,61	15,29	17,81	16,20	16,16	15,13	18,40	16,51
	15,51	15,13	17,84	16,12	15,91	15,09	18,15	16,33
	14,78	13,49	16,98	15,01	15,45	13,69	17,48	15,46
	14,98	13,64	17,06	15,17	15,67	14,09	17,12	15,58
	14,67	14,54	17,69	15,57	16,09	14,72	17,26	15,99
	15,23	14,67	17,62	15,79	16,01	14,94	18,00	16,27
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,13	14,44	17,50	15,64	15,88	14,60	17,73	16,02
a. MW	15,13	14,46	17,50	15,64	15,88	14,61	17,74	16,02
min c_t	14,67	13,49	16,98	15,01	15,45	13,69	17,12	15,46
max c_t	15,61	15,29	17,84	16,20	16,16	15,13	18,40	16,51
SDV	0,32	0,60	0,32	0,39	0,21	0,48	0,45	0,35
CV [%]	2,11	4,13	1,82	2,52	1,35	3,29	2,52	2,16

Urolithin A 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,26	16,68	20,33	18,02	17,68	17,86	21,26	18,87
	16,99	16,37	20,24	17,79	17,27	17,36	21,25	18,54
	17,41	17,14	20,58	18,31	16,84	16,80	20,20	17,88
	17,41	17,29	20,90	18,46	16,77	16,77	20,40	17,90
	17,27	17,29	20,86	18,40	17,24	17,31	21,02	18,45
	17,89	17,28	21,08	18,68	17,17	17,22	21,47	18,51
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,37	17,01	20,66	18,28	17,16	17,22	20,93	18,35
a. MW	17,37	17,01	20,67	18,28	17,16	17,22	20,93	18,36
min c_t	16,99	16,37	20,24	17,79	16,77	16,77	20,20	17,88
max c_t	17,89	17,29	21,08	18,68	17,68	17,86	21,47	18,87
SDV	0,20	0,32	0,28	0,25	0,24	0,29	0,42	0,31
CV [%]	1,13	1,89	1,36	1,35	1,39	1,69	2,02	1,70

Urolithin A 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	14,95	15,11	17,77	15,89	14,86	14,30	17,75	15,57
	15,26	14,95	18,39	16,13	14,43	14,91	17,63	15,60
	14,36	14,11	17,20	15,16	13,96	14,29	17,37	15,13
	14,72	14,45	17,47	15,49	14,06	14,35	17,28	15,16
	14,24	15,05	18,13	15,72	13,97	14,21	16,99	15,00
	14,32	14,61	18,01	15,56	14,08	14,28	17,24	15,13
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	14,64	14,71	17,82	15,66	14,22	14,39	17,38	15,26
a. MW	14,64	14,71	17,83	15,66	14,23	14,39	17,38	15,27
min c_t	14,24	14,11	17,20	15,16	13,96	14,21	16,99	15,00
max c_t	15,26	15,11	18,39	16,13	14,86	14,91	17,75	15,60
SDV	0,33	0,32	0,35	0,25	0,28	0,17	0,21	0,21
CV [%]	2,28	2,19	1,95	1,62	1,97	1,21	1,20	1,38

Urolithin A 48 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,57	18,68	21,25	19,46	17,34	17,69	20,22	18,37
	18,17	18,55	21,05	19,22	17,54	18,06	19,99	18,50
	17,63	18,53	20,71	18,91	17,31	17,89	19,95	18,35
	17,92	18,68	20,71	19,07	17,09	17,78	20,29	18,34
	16,79	17,45	20,09	18,06	16,75	16,91	19,58	17,70
	17,05	17,77	20,00	18,23	17,10	17,37	19,53	17,97
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,68	18,27	20,63	18,82	17,19	17,61	19,92	18,20
a. MW	17,69	18,28	20,64	18,82	17,19	17,62	19,93	18,20
min c_t	16,79	17,45	20,00	18,06	16,75	16,91	19,53	17,70
max c_t	18,57	18,68	21,25	19,46	17,54	18,06	20,29	18,50
SDV	0,53	0,44	0,39	0,45	0,21	0,32	0,25	0,25
CV [%]	3,00	2,42	1,91	2,41	1,20	1,80	1,24	1,35

Urolithin B 48 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	14,09	13,96	17,50	15,10	15,60	14,43	17,92	15,92
	14,29	14,84	17,80	15,57	15,10	14,42	17,74	15,69
	14,58	12,82	17,92	14,96	14,27	13,51	17,44	14,98
	14,20	13,40	17,96	15,06	14,32	14,18	17,66	15,31
	14,21	13,78	17,28	15,01	14,01	13,75	17,84	15,09
	14,32	14,72	17,75	15,52	14,64	14,00	18,03	15,46
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	14,28	13,90	17,70	15,20	14,65	14,04	17,77	15,40
a. MW	14,28	13,92	17,70	15,20	14,66	14,05	17,77	15,41
min c_t	14,09	12,82	17,28	14,96	14,01	13,51	17,44	14,98
max c_t	14,58	14,84	17,96	15,57	15,60	14,43	18,03	15,92
SDV	0,11	0,59	0,21	0,23	0,46	0,30	0,16	0,28
CV [%]	0,79	4,21	1,18	1,50	3,16	2,10	0,89	1,83

Urolithin C 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,18	14,64	17,73	15,79	14,92	13,92	17,79	15,46
	14,99	14,31	18,06	15,70	14,94	14,08	17,73	15,51
	14,82	14,26	17,68	15,52	15,15	13,70	17,50	15,37
	14,62	14,20	17,82	15,46	15,12	13,70	17,50	15,36
	14,66	14,12	17,82	15,45	15,03	13,85	17,64	15,43
	14,97	14,66	18,08	15,83	15,03	13,85	17,64	15,43
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	14,87	14,36	17,87	15,63	15,03	13,85	17,63	15,43
a. MW	14,87	14,36	17,87	15,63	15,03	13,85	17,63	15,43
min c_t	14,62	14,12	17,68	15,45	14,92	13,70	17,50	15,36
max c_t	15,18	14,66	18,08	15,83	15,15	14,08	17,79	15,51
SDV	0,17	0,19	0,14	0,15	0,07	0,10	0,09	0,04
CV [%]	1,17	1,33	0,76	0,96	0,47	0,73	0,50	0,26

Urolithin C 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,72	18,00	20,32	18,64	17,54	17,50	20,42	18,44
	17,76	17,99	20,35	18,66	17,57	17,39	20,62	18,47
	18,69	18,94	20,60	19,39	18,52	18,21	20,49	19,05
	18,67	19,20	21,18	19,65	18,60	18,46	20,83	19,27
	18,89	19,11	20,78	19,58	19,01	18,42	21,01	19,45
	18,87	19,51	21,50	19,93	18,90	18,73	21,14	19,56
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,43	18,78	20,78	19,30	18,35	18,11	20,75	19,03
a. MW	18,43	18,79	20,79	19,31	18,36	18,12	20,75	19,04
min c_t	17,72	17,99	20,32	18,64	17,54	17,39	20,42	18,44
max c_t	18,89	19,51	21,50	19,93	19,01	18,73	21,14	19,56
SDV	0,46	0,53	0,37	0,44	0,53	0,45	0,24	0,39
CV [%]	2,50	2,84	1,77	2,27	2,91	2,47	1,16	2,05

Isourolithin A 48 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,41	15,25	-	15,82	17,91	16,74	-	17,31
	16,22	14,87	-	15,53	17,84	16,52	-	17,17
	16,75	15,86	-	16,30	18,53	17,62	-	18,07
	17,23	16,04	-	16,63	18,61	17,33	-	17,96
	16,39	15,54	-	15,96	17,29	16,10	-	16,68
	16,18	15,31	-	15,74	17,33	16,00	-	16,65
n	6	6	-	6	6	6	-	6
g. MW	16,53	15,48	-	15,99	17,91	16,71	-	17,30
a. MW	16,53	15,48	-	16,00	17,92	16,72	-	17,31
min c_t	16,18	14,87	-	15,53	17,29	16,00	-	16,65
max c_t	17,23	16,04	-	16,63	18,61	17,62	-	18,07
SDV	0,31	0,34	-	0,31	0,43	0,51	-	0,47
CV [%]	1,86	2,17	-	1,95	2,42	3,07	-	2,74

M1 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,81	17,44	21,54	18,84	17,23	16,67	20,41	18,03
	17,64	17,32	21,30	18,67	17,08	16,51	20,25	17,87
	17,69	17,18	21,19	18,60	16,71	16,53	20,21	17,74
	17,58	17,16	20,78	18,44	16,64	16,41	20,37	17,72
	17,64	17,41	21,01	18,62	17,45	16,80	20,78	18,27
	17,57	17,14	21,04	18,50	17,41	16,98	20,69	18,29
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,65	17,27	21,14	18,61	17,09	16,65	20,45	17,98
a. MW	17,65	17,27	21,15	18,61	17,09	16,65	20,45	17,99
min c_t	17,57	17,14	20,78	18,44	16,64	16,41	20,21	17,72
max c_t	17,81	17,44	21,54	18,84	17,45	16,98	20,78	18,29
SDV	0,06	0,12	0,20	0,10	0,28	0,17	0,19	0,21
CV [%]	0,35	0,68	0,94	0,53	1,63	1,00	0,92	1,16

M1 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,07	15,09	18,25	16,07	14,61	15,27	18,47	16,03
	15,15	14,95	18,30	16,06	15,07	15,11	18,52	16,16
	15,05	14,92	18,45	16,06	15,01	15,79	19,15	16,56
	15,10	14,69	18,27	15,95	15,47	15,79	19,04	16,69
	15,13	15,03	18,40	16,11	15,68	15,87	19,16	16,83
	15,52	15,09	18,64	16,34	15,95	16,01	18,98	16,92
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,17	14,96	18,38	16,10	15,29	15,64	18,88	16,53
a. MW	15,17	14,96	18,38	16,10	15,30	15,64	18,89	16,53
min c_t	15,05	14,69	18,25	15,95	14,61	15,11	18,47	16,03
max c_t	15,52	15,09	18,64	16,34	15,95	16,01	19,16	16,92
SDV	0,12	0,11	0,11	0,09	0,40	0,30	0,26	0,29
CV [%]	0,77	0,70	0,60	0,53	2,63	1,91	1,37	1,76

M1 48 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	19,10	20,31	20,74	20,04	17,84	19,47	20,01	19,08
	19,17	20,97	20,67	20,25	18,35	19,76	20,12	19,40
	19,14	20,26	20,89	20,08	18,85	19,91	20,71	19,81
	19,15	21,66	20,89	20,54	18,61	21,35	20,44	20,10
	19,22	20,07	20,45	19,91	19,29	21,18	20,58	20,33
	19,02	21,86	20,31	20,36	19,66	23,64	20,63	21,24
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	19,13	20,84	20,66	20,20	18,76	20,84	20,41	19,98
a. MW	19,13	20,85	20,66	20,20	18,77	20,88	20,41	19,99
min c_t	19,02	20,07	20,31	19,91	17,84	19,47	20,01	19,08
max c_t	19,22	21,86	20,89	20,54	19,66	23,64	20,71	21,24
SDV	0,05	0,64	0,19	0,19	0,50	1,17	0,23	0,56
CV [%]	0,25	3,08	0,90	0,93	2,66	5,60	1,14	2,82

rac. Hydnocarpin D 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,66	15,85	20,02	17,42	16,97	15,56	19,45	17,25
	16,52	15,90	19,28	17,17	16,88	15,27	19,55	17,14
	18,26	17,30	20,77	18,72	17,69	16,29	20,22	17,99
	18,26	17,22	21,07	18,78	18,09	16,36	20,65	18,28
	16,85	15,97	20,22	17,59	18,30	16,75	21,12	18,64
	16,93	16,01	20,22	17,63	18,25	16,89	21,16	18,68
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,23	16,36	20,26	17,88	17,69	16,17	20,35	17,99
a. MW	17,25	16,38	20,26	17,89	17,70	16,18	20,36	18,00
min c_t	16,52	15,85	19,28	17,17	16,88	15,27	19,45	17,14
max c_t	18,26	17,30	21,07	18,78	18,30	16,89	21,16	18,68
SDV	0,68	0,59	0,44	0,58	0,52	0,51	0,62	0,54
CV [%]	3,93	3,60	2,16	3,23	2,93	3,17	3,04	2,97

rac. Hydnocarpin D 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,34	14,88	18,61	16,20	15,68	15,19	18,84	16,49
	15,37	15,00	18,29	16,15	15,67	15,25	18,62	16,45
	15,32	14,72	18,05	15,97	15,63	15,77	18,58	16,60
	15,49	15,24	18,07	16,22	15,04	14,93	17,75	15,86
	15,21	14,36	17,84	15,74	15,17	14,65	17,94	15,86
	15,00	14,40	17,95	15,71	15,60	14,95	17,95	16,12
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,29	14,76	18,13	15,99	15,46	15,12	18,28	16,23
a. MW	15,29	14,77	18,13	16,00	15,46	15,12	18,28	16,23
min c_t	15,00	14,36	17,84	15,71	15,04	14,65	17,75	15,86
max c_t	15,49	15,24	18,61	16,22	15,68	15,77	18,84	16,60
SDV	0,12	0,27	0,21	0,19	0,24	0,28	0,40	0,29
CV [%]	0,80	1,86	1,16	1,21	1,54	1,85	2,19	1,76

rac. Hydnocarpin D 48 h 3. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,80	19,35	20,26	19,46	18,29	19,82	20,18	19,41
	18,33	19,79	20,28	19,45	18,85	20,09	20,21	19,71
	18,48	20,30	21,04	19,91	18,57	18,92	19,77	19,08
	19,13	21,72	20,83	20,53	18,51	20,20	19,86	19,51
	19,14	21,00	21,49	20,52	17,81	19,33	19,83	18,97
	19,42	21,89	21,30	20,84	18,07	20,47	20,00	19,48
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,88	20,65	20,86	20,11	18,35	19,80	19,97	19,36
a. MW	18,88	20,67	20,87	20,12	18,35	19,80	19,97	19,36
min c_t	18,33	19,35	20,26	19,45	17,81	18,92	19,77	18,97
max c_t	19,42	21,89	21,49	20,84	18,85	20,47	20,21	19,71
SDV	0,34	0,86	0,41	0,51	0,29	0,45	0,15	0,22
CV [%]	1,82	4,17	1,96	2,54	1,60	2,29	0,77	1,16

(+)-Hydnocarpin D 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	15,59	14,63	17,73	15,93	16,09	14,44	17,85	16,07
	15,89	15,02	18,24	16,33	16,08	14,79	17,73	16,16
	16,13	14,96	17,80	16,26	16,38	14,94	17,80	16,33
	16,13	14,94	17,67	16,21	16,48	14,52	17,71	16,18
	15,48	15,08	17,69	16,04	15,53	14,00	17,42	15,59
	15,69	14,47	17,72	15,90	15,36	14,00	16,86	15,36
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,82	14,85	17,81	16,11	15,98	14,44	17,56	15,94
a. MW	15,82	14,85	17,81	16,11	15,99	14,45	17,56	15,95
min c_t	15,48	14,47	17,67	15,90	15,36	14,00	16,86	15,36
max c_t	16,13	15,08	18,24	16,33	16,48	14,94	17,85	16,33
SDV	0,23	0,20	0,14	0,15	0,36	0,30	0,28	0,32
CV [%]	1,46	1,35	0,81	0,95	2,26	2,10	1,61	1,98

(+)-Hydnocarpin D 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,93	19,86	21,34	20,02	18,86	18,65	19,76	19,08
	19,05	20,18	21,39	20,18	18,67	18,56	20,05	19,08
	18,02	19,29	20,49	19,24	18,25	20,16	20,32	19,56
	17,80	19,65	20,14	19,17	18,83	20,55	20,14	19,83
	18,49	20,54	20,43	19,80	18,37	19,49	19,64	19,16
	18,62	20,50	20,29	19,79	18,52	19,72	19,49	19,24
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,48	20,00	20,67	19,70	18,58	19,51	19,90	19,32
a. MW	18,48	20,01	20,68	19,70	18,58	19,52	19,90	19,32
min c_t	17,80	19,29	20,14	19,17	18,25	18,56	19,49	19,08
max c_t	19,05	20,54	21,39	20,18	18,86	20,55	20,32	19,83
SDV	0,38	0,40	0,46	0,33	0,20	0,62	0,27	0,25
CV [%]	2,07	2,02	2,21	1,67	1,09	3,20	1,36	1,27

(-) Hydnocarpin D 48 h 1. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	16,02	15,09	17,80	16,27	16,42	14,15	17,67	16,01
	16,05	15,06	18,14	16,37	16,22	14,37	18,15	16,17
	15,29	15,06	17,31	15,85	15,92	14,45	17,77	15,99
	15,57	15,09	18,17	16,22	16,07	14,64	18,03	16,19
	14,74	14,74	17,77	15,69	16,16	14,83	18,17	16,33
	15,80	14,40	17,67	15,90	16,16	14,55	18,20	16,23
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	15,57	14,90	17,81	16,05	16,16	14,50	18,00	16,15
a. MW	15,58	14,91	17,81	16,05	16,16	14,50	18,00	16,15
min c_t	14,74	14,40	17,31	15,69	15,92	14,15	17,67	15,99
max c_t	16,05	15,09	18,17	16,37	16,42	14,83	18,20	16,33
SDV	0,38	0,22	0,23	0,23	0,11	0,18	0,19	0,10
CV [%]	2,43	1,49	1,28	1,46	0,67	1,21	1,04	0,64

(-) Hydnocarpin D 48 h 2. Messung	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,62	18,56	19,47	18,53	19,91	19,82	22,41	20,68
	17,63	18,92	19,73	18,74	20,29	20,64	22,23	21,04
	18,71	20,63	20,71	20,00	18,71	20,30	20,65	19,87
	18,84	21,31	20,81	20,29	19,45	21,01	20,62	20,35
	18,63	20,20	20,76	19,84	18,25	20,58	20,67	19,80
	19,11	20,94	20,74	20,25	19,04	20,58	20,85	20,14
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,41	20,07	20,36	19,60	19,26	20,49	21,22	20,31
a. MW	18,42	20,09	20,37	19,61	19,28	20,49	21,24	20,31
min c_t	17,62	18,56	19,47	18,53	18,25	19,82	20,62	19,80
max c_t	19,11	21,31	20,81	20,29	20,29	21,01	22,41	21,04
SDV	0,53	0,90	0,51	0,65	0,61	0,29	0,72	0,38
CV [%]	2,89	4,49	2,52	3,30	3,16	1,40	3,40	1,85

Verapamil 48 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	17,25	17,17	21,14	18,43	17,08	16,66	21,17	18,19
	17,30	17,09	21,00	18,38	17,00	16,54	21,41	18,19
	17,15	16,60	20,68	18,06	16,86	16,57	21,28	18,11
	17,30	16,62	20,45	18,05	17,71	16,41	21,32	18,37
	17,74	17,38	21,08	18,66	16,16	15,14	19,26	16,77
	17,69	17,29	21,08	18,62	15,70	14,79	19,76	16,62
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	17,40	17,02	20,90	18,36	16,74	16,00	20,68	17,69
a. MW	17,41	17,02	20,91	18,36	16,75	16,02	20,70	17,71
min c_t	17,15	16,60	20,45	18,05	15,70	14,79	19,26	16,62
max c_t	17,74	17,38	21,14	18,66	17,71	16,66	21,41	18,37
SDV	0,21	0,28	0,23	0,21	0,55	0,70	0,79	0,68
CV [%]	1,19	1,63	1,09	1,14	3,27	4,37	3,82	3,83

Dexa- methason 48 h	Kontrolle				Proben			
	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
c_t-Werte	18,17	19,12	20,53	19,25	19,34	20,74	20,67	20,24
	18,49	19,22	20,58	19,41	18,99	20,81	20,73	20,16
	18,15	19,56	20,30	19,32	18,50	19,57	20,36	19,46
	18,57	20,49	20,48	19,82	18,44	19,72	20,59	19,56
	18,47	21,07	21,25	20,22	18,49	19,46	20,04	19,32
	19,27	21,20	21,39	20,60	18,37	19,31	20,16	19,27
n	6	6	6	6	6	6	6	6
g. MW	18,52	20,09	20,75	19,76	18,69	19,93	20,42	19,66
a. MW	18,52	20,11	20,76	19,77	18,69	19,93	20,42	19,67
min c_t	18,15	19,12	20,30	19,25	18,37	19,31	20,04	19,27
max c_t	19,27	21,20	21,39	20,60	19,34	20,81	20,73	20,24
SDV	0,26	0,81	0,38	0,44	0,32	0,56	0,24	0,35
CV [%]	1,43	4,03	1,81	2,25	1,69	2,82	1,17	1,80

6.3.3 Pearson-Korrelation zwischen Referenzgenen und BestKeeper für die 48 h-Inkubation (n= 6 Proben)

r = Korrelationskoeffizient

p = p-Wert

BK = BestKeeper

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,254	0,077	0,045
RPLP 0	0,553		0,007	0,008
SDHA	0,764	0,930		0,001
BK	0,821	0,927	0,989	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,001	0,001
RPLP 0	0,994		0,001	0,001
SDHA	0,975	0,984		0,001
BK	0,996	0,998	0,990	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) sowie Proben (rechts) von Taxifolin (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,025	0,751	0,001
RPLP 0	0,868		0,551	0,024
SDHA	0,169	-0,311		0,723
BK	0,995	0,872	0,185	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		1,000	0,133	0,010
RPLP 0	0,001		0,605	0,479
SDHA	0,684	-0,270		0,168
BK	0,918	0,362	0,644	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) sowie Proben (rechts) von Taxifolin (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,010	0,009	0,001
RPLP 0	0,919		0,001	0,001
SDHA	0,920	0,989		0,001
BK	0,969	0,986	0,987	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,009	0,002	0,001
RPLP 0	0,920		0,008	0,001
SDHA	0,961	0,927		0,001
BK	0,982	0,970	0,983	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Silibinin (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,076	0,192	0,036
RPLP 0	0,765		0,001	0,001
SDHA	0,617	0,975		0,005
BK	0,841	0,991	0,943	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,011	0,283	0,023
RPLP 0	0,913		0,094	0,001
SDHA	0,528	0,739		0,029
BK	0,874	0,977	0,857	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Silibinin (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,122	0,053	0,021
RPLP 0	0,700		0,009	0,004
SDHA	0,806	0,920		0,001
BK	0,879	0,949	0,972	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,071	0,001
RPLP 0	0,998		0,071	0,001
SDHA	0,774	0,773		0,013
BK	0,971	0,969	0,906	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,443	0,523	0,105
RPLP 0	0,393		0,069	0,021
SDHA	0,329	0,777		0,034
BK	0,723	0,879	0,846	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,540	0,024	0,016
RPLP 0	0,317		0,296	0,130
SDHA	0,872	0,514		0,005
BK	0,894	0,688	0,942	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,012	0,001	0,001
RPLP 0	0,911		0,018	0,003
SDHA	0,972	0,889		0,001
BK	0,988	0,956	0,977	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,012	0,296	0,013
RPLP 0	0,911		0,127	0,001
SDHA	0,513	0,692		0,054
BK	0,906	0,976	0,803	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin A (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,443	0,283	0,903
RPLP 0	-0,390		0,723	0,010
SDHA	0,527	-0,185		0,723
BK	-0,063	0,917	0,186	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,051	0,433	0,003
RPLP 0	0,810		0,353	0,008
SDHA	0,397	0,464		0,234
BK	0,954	0,926	0,573	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin B

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,038	0,737	0,015
RPLP 0	0,837		0,569	0,005
SDHA	0,177	0,294		0,303
BK	0,899	0,941	0,507	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,014	-	0,006
RPLP 0	-0,902		0,021	0,001
SDHA	-1,009	0,879		0,016
BK	-0,934	0,987	0,895	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin C (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,002	0,074	0,002
RPLP 0	0,968		0,014	0,001
SDHA	0,770	0,902		0,010
BK	0,961	0,999	0,916	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,002	0,069	0,001
RPLP 0	0,963		0,069	0,001
SDHA	0,777	0,777		0,032
BK	0,985	0,983	0,850	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Urolithin C (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,024	-	0,002
RPLP 0	0,872		-	0,001
SDHA	-	-		-
BK	0,963	0,971	-	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	-	0,001
RPLP 0	0,976		-	0,001
SDHA	-	-		-
BK	0,992	0,995	-	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Isourolithin A

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,124	0,026	0,007
RPLP 0	0,697		0,198	0,040
SDHA	0,866	0,610		0,004
BK	0,929	0,832	0,948	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,025	0,061	0,002
RPLP 0	0,869		0,039	0,003
SDHA	0,791	0,835		0,012
BK	0,962	0,952	0,908	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,429	0,050	0,016
RPLP 0	0,404		0,414	0,100
SDHA	0,812	0,415		0,022
BK	0,896	0,729	0,877	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,074	0,176	0,010
RPLP 0	0,770		0,012	0,003
SDHA	0,634	0,909		0,021
BK	0,916	0,953	0,878	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,237	0,563	0,429
RPLP 0	-0,572		0,710	0,007
SDHA	0,301	-0,198		0,765
BK	-0,404	0,932	0,156	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,038	0,034	0,004
RPLP 0	0,836		0,243	0,002
SDHA	0,847	0,566		0,090
BK	0,946	0,966	0,744	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von M1 (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,017	0,001
RPLP 0	0,992		0,040	0,001
SDHA	0,893	0,831		0,008
BK	0,997	0,981	0,924	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,001	0,001	0,001
RPLP 0	0,975		0,002	0,001
SDHA	0,983	0,966		0,001
BK	0,994	0,990	0,991	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,018	0,419	0,021
RPLP 0	0,890		0,283	0,003
SDHA	0,411	0,526		0,092
BK	0,880	0,954	0,742	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,170	0,051	0,018
RPLP 0	0,640		0,130	0,021
SDHA	0,810	0,688		0,008
BK	0,887	0,880	0,928	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,057	0,174	0,022
RPLP 0	0,798		0,098	0,002
SDHA	0,636	0,732		0,032
BK	0,875	0,967	0,850	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,881	0,528	0,213
RPLP 0	0,080		0,263	0,040
SDHA	0,326	0,545		0,094
BK	0,594	0,831	0,739	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von racemischem Hydnocarpin D (3. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,581	0,716	0,092
RPLP 0	0,288		0,534	0,076
SDHA	0,191	0,322		0,181
BK	0,741	0,766	0,629	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,035	0,034	0,002
RPLP 0	0,843		0,078	0,007
SDHA	0,847	0,763		0,011
BK	0,960	0,933	0,915	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (+)-Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,254	0,047	0,001
RPLP 0	0,554		0,970	0,172
SDHA	0,818	0,019		0,069
BK	0,988	0,638	0,777	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,575	0,895	0,993
RPLP 0	-0,291		0,534	0,013
SDHA	-0,071	0,324		0,206
BK	-0,003	0,907	0,603	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (+)-Hydnocarpin D (2. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,723	0,463	0,036
RPLP 0	0,185		0,624	0,223
SDHA	0,376	0,256		0,129
BK	0,840	0,585	0,691	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,303	0,815	0,982
RPLP 0	-0,508		0,138	0,054
SDHA	-0,123	0,678		0,010
BK	0,009	0,804	0,917	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (-)-Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,002	0,002	0,001
RPLP 0	0,961		0,003	0,001
SDHA	0,959	0,952		0,001
BK	0,985	0,990	0,979	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,815	0,043	0,001
RPLP 0	-0,123		0,257	0,859
SDHA	0,825	-0,552		0,027
BK	0,983	-0,097	0,863	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von (-)-Hydnocarpin D (1. Messung)

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,074	0,318	0,040
RPLP 0	0,768		0,010	0,001
SDHA	0,494	0,919		0,018
BK	0,831	0,993	0,890	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,022	0,035	0,006
RPLP 0	0,876		0,005	0,001
SDHA	0,843	0,941		0,002
BK	0,938	0,980	0,966	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Verapamil

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,106	0,082	0,027
RPLP 0	0,721		0,051	0,002
SDHA	0,756	0,810		0,012
BK	0,863	0,959	0,911	

r \ p	PPIA	RPLP 0	SDHA	BK
PPIA		0,007	0,120	0,004
RPLP 0	0,933		0,030	0,001
SDHA	0,702	0,855		0,022
BK	0,948	0,994	0,877	

Korrelation zwischen den drei Referenzgenen und BestKeeper für Kontrolle (links) und Proben (rechts) von Dexamethason

6.3.4 Relative Expression von p-GP nach 48 h-Inkubation (n= 9)

Taxifolin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,856	0,164 – 4,437	0,786	-
2. Messung	0,969	0,708 – 1,303	0,745	-

Silibinin	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,775	0,301 – 3,030	0,511	-
2. Messung	1,064	0,706 – 1,609	0,729	-

Urolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,802	0,580 – 1,128	0,080	-
2. Messung	0,848	0,641 – 1,152	0,172	-
3. Messung	0,820	0,474 – 1,415	0,276	-

Urolithin B	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	1,081	0,874 – 1,329	0,290	-

Urolithin C	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	3,824	2,875 – 5,005	0,0001	UP
2. Messung	3,057	1,735 – 5,280	0,0001	UP

Isourolithin A	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,582	0,208 – 1,412	0,094	-

M1	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,082	0,853 – 1,532	0,435	-
2. Messung	0,580	0,405 – 0,822	0,0001	DOWN
3. Messung	0,909	0,470 – 1,768	0,674	-

rac. Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,738	0,430 – 1,220	0,164	-
2. Messung	0,697	0,463 – 0,976	0,009	DOWN
3. Messung	0,776	0,496 – 1,211	0,102	-

(+)- Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	1,172	0,770 – 1,757	0,247	-
2. Messung	0,718	0,468 – 1,111	0,062	-

(-)- Hydnocarpin D	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
1. Messung	0,923	0,715 – 1,182	0,322	-
2. Messung	0,657	0,296 – 1,420	0,148	-

Verapamil	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,779	0,308 – 1,768	0,360	-

Dexamethason	Relative Expression	Standardfehler	p - Wert	Ergebnis
	0,909	0,536 – 1,335	0,531	-

E Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Die Permeabilität von Substanzen über Biomembranen erfolgt auf Basis ihrer Größe und Lipophilie, wird jedoch auch zu einem großen Anteil vom aktiven Transport bestimmt. Speziell im menschlichen Verdauungstrakt ist dieser Transportmechanismus neben seinen essentiellen physiologischen Aufgaben, wie den Transport von Nährstoffen, an einer Resistenz gegen exogene Stoffe und Xenobiotika beteiligt, der die Aufnahme in den Organismus über einen Rücktransport in das Darmlumen limitiert. Dabei hat die membranständige Effluxpumpe p-Glykoprotein (p-GP) als ein Baustein dieses Schutzmechanismus auch einen großen Einfluss auf die Arzneimitteltherapie. Über eine Modulierung der Pharmakokinetik von Arzneistoffen beschränkt sie die Aufnahme von Medikamenten und senkt dadurch deren Bioverfügbarkeit. Es wird auch für pflanzliche Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Polyphenole ein möglicher Einfluss auf dieses Transportprotein diskutiert. Diese Beeinflussung kann sich entweder in einer Induktion oder einer Inhibition des Proteins äußern, was positive wie negative Effekte haben kann. Eine Hemmung des Transportproteins führt zu einer erhöhten Aufnahme einiger Arzneistoffe, die mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit und einer potentiellen Dosissenkung einhergeht. Induziert man p-GP dagegen, so wird es beispielsweise ermöglicht, potentiell schädliche Xenobiotika noch intensiver auszuscheiden und nachteilige Plasmaspiegel zu verhindern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss ausgewählter Polyphenole auf die Funktionalität und die Genexpression im CaCo-II-Zellkulturmodell näher untersucht, sowie vorab charakteristische Eigenschaften der pflanzlichen Inhaltsstoffe - Taxifolin, Silibinin, M1, Urolithin A, Urolithin B, Urolithin C, Isourolithin A, racemisches Hydnocarpin D, (+)-Hydnocarpin D, (-)-Hydnocarpin D - vergleichend bestimmt werden.

Diese stoffspezifischen Charakteristika umfassten die Zytotoxizität, die Stabilität und die antioxidative Kapazität. Vor allem die Zytotoxizität und die Stabilität sind essentielle Parameter für aussagekräftige Resultate. Die Substanzen waren in der eingesetzten Konzentration von 50 µM mehrheitlich, mit Ausnahme des Hydnocarpins D, nicht-toxisch innerhalb der relevanten Versuchszeiträume, 4 h und 24 h, und den verwendeten Kulturmedien, DMEM-Pest und HBSS. Vor allem im Hinblick auf die Genexpressionsversuche war es die Basis für valide Ergebnisse, den Zeitraum bis 24 h als nicht-toxisch sicherstellen zu können. Hinsichtlich der Stabilität waren nur Taxifolin (27 % Restkonzentration) und der M1 (0 % Restkonzentration) nach 24 h in Zellkulturmedium kritisch.

Auf Basis ihrer antioxidativen Kapazität werden pflanzlichen Inhaltsstoffen eine Reihe von gesundheitsförderlichen Merkmalen nachgesagt, weswegen dieser Aspekt für die Testsubstanzen zusätzlich vergleichend evaluiert wurde. Der Eintritt von Pathogenen kann

zum Beispiel durch oxidative Schädigung des Darmepithels erleichtert werden, was zusätzlich zu einem Effekt auf p-GP durch die Polyphenole unter Umständen positiv beeinflusst werden kann. Taxifolin, der M1 sowie die Urolithine A und C konnten so als antioxidativ aktive Stoffe erstmals vergleichend analysiert und die Resultate sinnvoll zu bestehenden Daten in Relation gesetzt werden. Sie konnten nach antioxidativer Potenz in der Reihenfolge Urolithin C > M1 > Taxifolin > Urolithin A geordnet werden.

Zur Analyse des Einflusses der ausgewählten Polyphenole auf die Funktionalität von p-GP sollten Transportversuche über einen CaCo-II-Monolayer mit Rhodamin 123 als Markersubstanz durchgeführt werden. Diese Untersuchungen benötigen typischerweise eine vorbereitende Kulturzeit der Zellen von insgesamt drei Wochen, sodass sich eine Verkürzung dieser Zeitspanne aus Zeitersparnis- und Kostengründen positiv auf den Durchsatz der Versuche auswirken würde. In einem umfassenden Ansatz mit kombinierter Bestimmung der Qualifizierung der Zellschichten im Hinblick auf Qualität des Monolayers (TEER-Messung, Lucifer-Yellow-Transportrate, Fluoreszenzfärbung der Tight-junctions) sowie der Funktionalität und Expression von p-GP gelang der Nachweis, dass 14 Tage hinreichend und sinnvoll waren.

Zentraler Bestandteil war in der vorliegenden Arbeit die Identifizierung der Effekte der Urolithine auf sowohl p-GP direkt, als auch auf die Genexpression dieses Transportproteins. Diese Polyphenole werden im menschlichen Verdauungstrakt über einen bakteriellen Metabolismus aus Ellagtanninen und Ellagsäure hergestellt und sind aufgrund ihrer vielfältigen gesundheitsförderlichen Charakteristiken in der Forschung von steigendem Interesse. Hierfür konnten nach unserem Kenntnisstand mit den gewählten Versuchsansätzen neue Erkenntnisse gewonnen werden.

In den Transportversuchen mit Rhodamin 123 als Modellsubstrat von p-GP konnten die Urolithine den p-GP-vermittelten Transport positiv beeinflussen. Die Urolithine B (P_{app} -Ratio 1,98), C (P_{app} -Ratio 2,15) und das Isourolithin A (P_{app} -Ratio 1,63) steigerten den Rhodamintransport signifikant und lediglich für Urolithin A (P_{app} -Ratio 1,45) konnte keine Signifikanz belegt werden. Der Einfluss der Urolithine lag jeweils im Bereich des Modellinduktors Dexamethason. Ebenso konnte eine positive Modulation der Genexpression nach 24 h detektiert werden. Die Hochregulierungen durch die Urolithine A (zwei- bis dreifach), B (1,4-fach) und C (1,8-fach) waren konsistent und statistisch signifikant. Urolithin A konnte hierbei als potentester Induktor charakterisiert werden, wohingegen sein Isomer Isourolithin A keinerlei signifikante Beeinflussung der Expression zeigte. In diesen Inkubationsversuchen wurde die Eigenschaft zur Erhöhung der Genexpression über den Einfluss auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport bestätigt. Die Urolithine A, B, C und Isourolithin A konnten nach einer Vorinkubation über 24 h und 48 h auch den Transport von Rhodamin 123 nochmals signifikanter zu den klassischen

Transportversuchen ohne Vorinkubation steigern. Relevanz hierfür hatte der erste Zeitraum über 24 h, da hier ein deutlicher Anstieg der Rhodamintransportrate zu erkennen war. Nach 48 h stieg der Rhodamintransport nur noch geringfügig an oder ging sogar leicht zurück (Urolithin B). Hinsichtlich der Genexpression konnte nach 48 h nur noch Urolithin C p-GP signifikant hochregulieren, allerdings sind diese Erkenntnisse auf Basis der Zytotoxizität der Substanzen über diesen Zeitraum kritisch zu betrachten.

In der Analyse des Effektes der weiteren Polyphenole auf die Genexpression von p-GP konnten für die meisten Stoffe nur zufällige Zusammenhänge hinsichtlich Hoch- und Herunterregulierung bestimmt werden. In den Transportversuchen konnte jedoch (+)-Hydnocarpin (P_{app} -Ratio 0,48) den Transport in gleichem Ausmaß wie der Modellinhibitor Verapamil (P_{app} -Ratio 0,48) hemmen.

Durch Modifizierung des Versuchsmediums zur Annäherung an physiologischeren Bedingungen (Gallensäuren, pH 6) konnte für manche Substanzen ein deutlich verändertes Verhalten beobachtet werden. Die Rhodamintransportrate nahm unter Einfluss von Urolithin B, Isourolithin A und dem M1 signifikant nun ab und bei Urolithin C signifikant zu. Dies legt nahe, dass mit dem klassischen Transportversuchsmodell lediglich Tendenzen für die Substanzen bestimmt werden können. Weitere Untersuchungen näher an der Physiologie des Verdauungstraktes sind nötig, um ein genaueres Bild des Stoffeinflusses zu gewinnen.

Die Frage nach zeitlichem Einsetzen beziehungsweise der Kontinuität des Effektes auf p-GP konnte mit den Urolithinen A, B und C sowie Dexamethason geklärt werden. Eine Substanzexposition von lediglich fünf Minuten war nicht ausreichend, um in den nachfolgenden zwei Stunden einen Effekt zu beobachten. Dies legt eine Reversibilität der zugrundeliegenden Mechanismen und eine notwendige dauerhafte Anwesenheit der Substanzen über die Versuchszeit nahe.

Neben Rhodamin 123 wurden noch Transportversuche mit dem Fluorchinolonantibiotikum Ciprofloxacin als Modellsubstanz durchgeführt, da es aufgrund dessen Substratcharakters für p-GP von therapeutischer Relevanz sein kann, wenn das Transportverhalten durch Polyphenole beeinflusst wird. Im Gegensatz zu Rhodamin 123 wurde der Transport von Ciprofloxacin durch die vier Urolithine verringert, was für diese Metabolismusprodukte eine zusätzliche Wirkung auf weitere Transportproteine nahelegt, weil Ciprofloxacin unter anderem auch über BRCP transportiert wird.

Mittels des bakteriellen Endotoxins LPS konnte eine Schädigung des CaCo-II-Monolayers erzeugt werden, welche sich über erniedrigte TEER-Werte und einen erhöhten Rhodamintransport nachweisen ließ. Eine Vorinkubation der vier Urolithine war nicht in der Lage, diese Schädigung abzumildern, jedoch nicht komplett zu verhindern. Die TEER-

Werte konnten zwar wieder etwas gesteigert werden, jedoch maskierte die starke Stimulation dieser Pflanzenstoffe auf p-GP und den damit verbundenen Transport von Rhodamin 123 mögliche positive Effekte auf diese oxidative Stresssituation.

Zusammenfassend war es mit der vorliegenden Arbeit erstmals durch systematische vergleichende Untersuchung und Kombination von Charakterisierungsansätzen möglich, eine deutliche Beeinflussung der Genexpression und Funktionalität des p-Glykoproteins durch vor allem die Urolithine aufzuzeigen, was eine Relevanz sowohl des Mikrobioms als auch der Ernährung in der Arzneimitteltherapie nahelegt. Zudem gelang es den klassischen Transportassay durch Verkürzung um eine Woche zu verbessern.

2 Summary

The permeability of substances across biomembranes is dependent on their size and lipophilicity, but is also determined to a large extent by active transport. This transport mechanism is involved in resistance to exogenous substances in the human digestive tract. It limits absorption into the organism via a reverse transport into the intestinal lumen. In addition, there are some essential physiological functions, such as the transport of nutrients. In this context, the membrane-bound efflux pump P-glycoprotein (P-gp), as a part of this protective mechanism, also has a major influence on drug therapy. The uptake of drugs is limited and their bioavailability is reduced by modulating the pharmacokinetics. Herbal compounds from the class of polyphenols are discussed to potentially influence this transport. This influence can present itself either in an induction or an inhibition of the protein. Inhibition of the transport protein leads to increased uptake of some drugs, which is associated with increased bioavailability and a potential dose reduction. Inducing P-gp support, excreting potentially harmful xenobiotics and to prevent toxic plasma levels, for example.

In the context of the present study, the influence of selected polyphenols on the functionality and gene expression in the CaCo-II cell culture model was to be investigated. Characteristic properties of plant derived compounds - taxifolin, silibinin, M1, urolithin A, urolithin B, urolithin C, isourolithin A, racemic hydroxycarpiol D, (+)-hydroxycarpiol D, (-)-hydroxycarpiol D - were to be determined comparatively.

The substance-specific characteristics included cytotoxicity, stability and antioxidant capacity. Cytotoxicity and stability are essential prerequisites for meaningful results. With the exception of hydroxycarpiol D, the compounds were mostly non-toxic within the relevant experimental periods, 4 h and 24 h, and the culture media used, DMEM-F12 and HBSS. The basis for valid results in the gene expression experiments were non-toxic effects over 24 h. In the stability experiments, only taxifolin (27 % residual concentration) and M1 (0 % residual concentration) were critically unstable after 24 h in cell culture medium.

Plant constituents are discussed to have a number of health-promoting characteristics based on their antioxidant capacity. An entry of pathogens is facilitated by oxidative damage at the intestinal epithelium, which can possibly be influenced by polyphenols in addition to an effect on P-gp. Taxifolin, M1 and urolithins A and C were analysed in indirect comparison for the first time. They were active as antioxidants and the results were consistent with existing data. Their antioxidant potency ranked in the order urolithin C > M1 > taxifolin > urolithin A.

Transport experiments via a CaCo-II monolayer with rhodamine 123 as marker substance were to be performed to analyse the influence of the selected polyphenols on the functionality of P-gp. These investigations typically require a preparatory culture time of the cells of three weeks. A reduction of this period would have a positive effect on the throughput and costs of the experiments. In a comprehensive approach with combined determination of the qualification of the cell layers with regard to the quality of the monolayer (TEER measurement, Lucifer yellow transport rate, fluorescence staining of the tight junctions) as well as the functionality and expression of P-gp, it was possible to prove that 14 days of culture time was sufficient and reasonable.

A central component of the present work was the identification of the effects of urolithins on the functionality and on the gene expression of P-gp. Urolithins are produced in the human digestive tract via a bacterial metabolism from ellagittannins and ellagic acid and are of increasing interest in research due to their diverse health-promoting characteristics. To the best of our knowledge, new insights were gained with the selected experimental approaches.

In transport experiments with rhodamine 123 as a model substrate of P-gp, the urolithins enhanced the P-gp-mediated transport. Urolithins B (Papp ratio 1.98), C (Papp ratio 2.15) and isourolithin A (Papp ratio 1.63) significantly increased rhodamine transport. Only urolithin A (Papp ratio 1.45) failed to show significant effects. The influence of the urolithins was in the range of the model inducer dexamethasone. A positive modulation of gene expression after 24 h was also detected. The upregulations by urolithins A (two- to threefold), B (1.4-fold) and C (1.8-fold) were consistent and statistically significant. Urolithin A was characterised as the most potent inducer, whereas its isomer isourolithin A showed no significant effect on expression. The increase of gene expression was confirmed via the influence on P-gp-mediated rhodamine transport. After a pre-incubation period of 24 h and 48 h, the urolithins A, B, C and isourolithin A also increased the transport of rhodamine 123 even more significantly than in the classical transport experiments without pre-incubation. The first period over 24 h was relevant, as a clear increase in the rhodamine transport rate was seen. After 48 h, the rhodamine transport further increased only slightly or even slightly decreased (urolithin B). Only urolithin C significantly upregulated the gene expression of p-GP after 48 h. However, these findings must be viewed critically on the basis of the cytotoxicity of the substances over this period.

In the analysis of the effect of the other polyphenols on the gene expression of P-gp, only random correlations with regard to up- and down-regulation were determined for most compounds. (+)-Hydnocarpine (Papp ratio 0.48) was able to inhibit transport to the same extent as the model inhibitor verapamil (Papp ratio 0.48).

By modifying the experimental medium to approximate more physiological conditions (bile acids, pH 6), a clearly altered behaviour was observed for some substances. The rhodamine transport rate decreased significantly under the influence of urolithin B, isourolithin A and the M1, and increased significantly with urolithin C. This suggests that only tendencies for the substances can be determined with the classical transport experiment model. Further studies, closer to the physiology of the digestive tract, are necessary to get more distinct results of the influence of the substances.

The question of temporal onset or continuity of the effect on P-gp was determined for urolithins A, B and C, as well as dexamethasone. A substance exposure of only five minutes was not sufficient to observe an effect in the following two hours. This suggested a reversibility of the underlying mechanism and that a permanent presence of the substances over the experimental period was required.

In addition to rhodamine 123, transport experiments were also carried out with the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin as a model compound. It may be of therapeutic relevance due to ciprofloxacin's substrate character for P-gp if the transport behaviour was influenced by polyphenols. In contrast to rhodamine 123, the transport of ciprofloxacin was reduced by the four urolithins, which suggested an additional effect on additional transport proteins since ciprofloxacin is known to be also transported via e.g. BRCP.

By exposure to the bacterial endotoxin LPS, damage to the CaCo-II monolayer was induced. This was detected by lowered TEER values and increased rhodamine transport. Pre-incubation of the four urolithins attenuated this damage, but not completely prevented it. The TEER values recovered slightly, but the strong stimulation of these plant substances on P-gp and the associated transport of rhodamine 123 masked possible positive effects in this oxidative stress situation.

In summary, the present work was the first to demonstrate, through systematic comparative analysis and combination of characterisation approaches, a clear influence of urolithins in particular on the gene expression and functionality of the P-glycoprotein, suggesting a relevance of both the microbiome and nutrition in drug therapy. In addition, it was possible to improve the classical transport assay by decreasing the culture time by one week.

F Abkürzungsverzeichnis

18s RNA	18 S Untereinheit der ribosomalen RNA
A	Adenin
ABC	ATP-binding cassette
ACTB	actin beta (= Beta-Aktin)
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance (= Varianzanalyse)
ATP	Adenosinriphosphat
ATPase	Adenosinriphosphatasen
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BCRP	breast cancer resistance protein
BCS	biopharmaceutical classification system (= biopharmazeutisches Klassifizierungssystem)
BIEDE	Biocoat Intestinal Epithelium Differentiation Environment
BK	Best Keeper (= geometrisches Mittel aus Referenzgenen)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CaCo-II	Carcinoma Colon
cDNA	complementary DNA (= komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CO ₂ - Gehalt	Kohlenstoffdioxidgehalt
c _t	Threshold cycle (= Zyklus an dem die Fluoreszenzkurve die Schwellenlinie schneidet)
CV	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom P450

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMEM-PEST	Dulbecco`s modified eagle medium mit 10 % Fetalem bovine Serum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % non- essential amino acids
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	equivalent concentration (= Äquivalenzkonzentration)
ECGM	endothelial cell growth medium (= endotheler Zellenwachstumsfaktor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (= epidermale Wachstumsfaktor)
EMA	European Medicine Agency
FAM	6-Carboxyfluorescein
FaSSIF	Fasted State Simulated Intestinal Fluid
FBS	Fetales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
FeSSIF	Fed State Simulated Intestinal Fluid
FRAP	ferric reducing antioxidant power
FW	Forward Primer
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GLUT4	Glucosetransporter Typ 4
HBSS	Hank`s balanced salt solution

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT 1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
i.v.	intra venös
IgG	Immunglobulin G
IRC	inter-run control (= Lauf-Vergleichskontrolle)
LC - MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
LY	Lucifer Yellow
M1	δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDR	multidrug resistance
MeOH	Methanol
MIQE	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
mRNA	messenger RNA (= Boten-Ribonukleinsäure)
MRP	multidrug resistance associated protein
MW	molecular weight (= Molekulargewicht)
n	Stichprobenanzahl
NaEDTA	Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NEA	non-essential amino acids (= nicht-essentielle Aminosäuren)
noRT	Kontrolle ohne Reversetranskriptase
NTC	no-template control (= Leerprobe)
OCT1	organische-Kationen-Transporter 1
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
P_{app}	Permeabilitätskoeffizient
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (= Polymerase Kettenreaktion)
PEPT	Di-/Tripeptidtransporter
PEST	Penicillin-Streptomycin
p-GP	P-Glykoprotein = Multidrug-Resistance Protein 1
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
REST [®]	Relative Expression Software Tool
Rn	Auf Referenzfarbstoff normalisierte Fluoreszenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonukleasen (Enzyme zur RNA hydrolyse)
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamin 123
RPLP 0	ribosomale PLP0, Teil der 60 S Untereinheit der Ribosomen
RT - qPCR	Reverse Transkriptase – quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion
RTPrimerDB	Real-Time Primer Database
RW	Reverse Primer
SDHA	Succinat-Dehydrogenase, Untereinheit A

SDV	Standardabweichung
T	Thymin
T/E	Trypsin/EDTA
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEER	Transepitheliale elektrische Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur eines PCR-Produktes
TM	Treatment Medium (für die Zytotoxizitätsversuche)
TMD	Transmembrandomäne
TMS	Transmembran- α -Helix-Segmente
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Uracil
UBC	Ubiquitin C
UV-Licht	ultraviolettes Licht
vgl	vergleiche
WST	water soluble tetrazolium
ZnCl ₂	Zink(II)-chlorid

G Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Wandaufbau im Gastrointestinaltrakt mit den verschiedenen Bereichen und Unterbereichen von innen nach außen: Mukosa und Epithel (braun, grün), Lamina propria (dunkelblau), Muscularis mucosae (blau, gelb), Submukosa (orange), Muskularis mit Ringmuskel- und Längsmuskelschicht (Felder mit Strichen und Punkten) und Serosa (dunkelrot) (modifiziert nach [1, 4])	23
Abbildung 2	Schematischer Aufbau des menschlichen Verdauungstraktes (modifiziert nach [8]).	25
Abbildung 3	Schematischer Aufbau der intestinalen Mukosa mit den ungleichmäßig angeordneten und geformten Villi von innen nach außen: Epithelzellschicht (braun), Lamina propria (grün) und muskuläre Mukosa (blau) (modifiziert nach [7])	27
Abbildung 4	Schematische Darstellung von Verbindungen zwischen zwei Zellen von oben nach unten: Tight-junctions als Verschlusskontakte (grün/blau), Desmosomen als Haftkontakte (lila/blau/rot) und Gap-junctions als Kommunikationskontakte (gelb) (modifiziert nach [4]).....	29
Abbildung 5	Schematische Darstellung der möglichen Transportwege über eine Epithelzellschicht mit passivem transzellulärem Weg (A), der passiven parazellulären Route (B), dem carriervermittelten, erleichterten Transportweg (C) und der Transcytose (D) (modifiziert nach [26])	31
Abbildung 6	Schematische Darstellung von vier möglichen erleichterten Transportwegen über eine Biomembran mit Symport (A), Antiport (B), erleichterter Diffusion (C) und einem primär aktiven Transport unter Verbrauch von ATP (D) (modifiziert nach [26])	34
Abbildung 7	Schematische Darstellung des funktionellen Tandems des Enzyms CYP 3A4 und dem Transportprotein p-GP für ein Substrat. Der Substanz (rot) wird in die Zelle aufgenommen, durch CYP 3A4 zum Metabolit (lila) abgebaut und dann in den Körper aufgenommen. Parallel transportiert p-GP den Stoff wieder aus der Zelle und ermöglicht so eine weitere Exposition gegenüber CYP 3A4 bevor der Stoff unverstoffwechselt in den Körper gelangt (modifiziert nach [54])	39
Abbildung 8	Schematische Darstellung von p-Glykoprotein in einer Membran mit seinen beiden homologen Hälften bestehend aus einer Transmembrandomäne (TMD) und einer Nukleotid-Bindedomäne (NBD). Jede TMD besteht aus sechs Transmembran- α -Helix-Segmenten (TMs) (modifiziert nach [41])	44

-
- Abbildung 9** Darstellung des Biopharmaceutical Classification System (BCS) mit seinen vier Klassen: Klasse 1 mit hoher Löslichkeit und Permeabilität (grün), Klasse 2 mit niedriger Löslichkeit und hoher Permeabilität (blau), Klasse 3 aus Hoher Löslichkeit und niedriger Permeabilität (blau) und Klasse 4 mit niedriger Löslichkeit und niedriger Permeabilität (orange) (modifiziert nach [27]).....48
- Abbildung 10** Schematische Darstellung des Grundgerüsts der Flavonoide mit den charakteristischen drei Ringen und dem Sauerstoffatom (modifiziert nach [40]).....61
- Abbildung 11** Übersicht über die sechs Hauptklassen der Flavonoide mit Anthocyanen (A), Flavanole (B), Flavanone (C), Flavone (D), Flavonole (E) und Isoflavone (F). Mit einem roten Kreis sind relevante Strukturunterschiede zwischen den Klassen gekennzeichnet. (modifiziert nach [40]).62
- Abbildung 12** Darstellung der, für die Struktur-Wirkungs-Beziehung, wichtigen Bestandteile der Flavonoide mit den 5- und 3-Hydroxylgruppen, der 2,3-Doppelbindung und dem planaren Molekül (modifiziert nach [40]).65
- Abbildung 13** Zytotoxizität von Verapamil auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 24 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 1000 µg/mL Verapamil sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n= 6 und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierten Säulen (*) stellen die nicht statistisch signifikant unterschiedlichen Konzentrationen von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 22,73 µg/mL als unbedenklich kennzeichnete.78

Abbildung 14 Zytotoxizität von Urolithin A auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 24 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin A sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n= 3 und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt hier die statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 11,41 µg/mL als unbedenklich kennzeichnete..... 79

Abbildung 15 Zytotoxizität von dem Racemat D des Hydnocarpins auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über vier Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL racemischem Hydnocarpin D sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n= 3 und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierten Säulen (*) stellen hier die statistisch signifikant unterschiedlichen Konzentrationen von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar. Die in Versuchen verwendete Konzentration von 23,22 µg/mL war signifikant verschieden von der Negativ-Kontrolle, konnte jedoch mit der in der Literatur beschriebenen Grenze von 0,7 als verwendbar gekennzeichnet werden. 80

Abbildung 16 Zytotoxizität von Urolithin B auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation über 48 Stunden in Zellkulturmedium. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin B sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n= 3 und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt die von der unbehandelten Negativ-Kontrolle statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 10,61 µg/mL als wenig toxisch kennzeichnet. 82

-
- Abbildung 17** Zytotoxizität von Urolithin C auf CaCo-II-Zellen bei einer Inkubation mit 100 µg/mL Gallensäuren und pH 6 über vier Stunden in HBSS. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 100 µg/mL Urolithin A sowie 100 µg/mL Zink(II)-chlorid als Positiv-Kontrolle versetzt. Als Negativ-Referenz wurden unbehandelte Zellen vermessen und nach erfolgtem Neutralrottest die Absorptionen jeweils auf die Negativ-Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit n= 3 und der Standardabweichung vom Mittelwert. Die markierte Säule (*) stellt hier die statistisch signifikant unterschiedliche Konzentration von 10 µg/mL von der unbehandelten Negativ-Kontrolle dar, was die in Versuchen verwendete Konzentration von 12,21 µg/mL als unbedenklich kennzeichnet.....83
- Abbildung 18** Stabilität von Silibinin in Zellkulturmedium DMEM-Pest über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dargestellt sind die Referenzfläche in Prozent zum Zeitpunkt 0 sowie nach erfolgter Inkubation mit jeweils n= 3. Zwar war die Stabilität nach dieser Zeitspanne signifikant niedriger als zum Ausgangszeitpunkt (*), allerdings konnte die Substanz dennoch als ausreichend stabil angesehen werden.90
- Abbildung 19** Stabilität von Taxifolin in Versuchsmedium HBSS über einen Zeitraum von 4 Stunden. Dargestellt sind die Referenzfläche in Prozent zum Zeitpunkt 0 sowie nach erfolgter Inkubation mit jeweils n= 3. Die Stabilität nach dieser Zeitspanne war nicht signifikant niedriger als die der Kontrolle, weswegen die Substanz als ausreichend stabil angesehen wurde.91
- Abbildung 20** Schematische Darstellung der Grundstruktur der Flavonoide mit relevanten Merkmalen für die antioxidative Aktivität. Die ortho-Dihydroxylstruktur, die Doppelbindung, die Ketogruppe sowie die beiden Hydroxylgruppen sind farbig markiert (modifiziert nach [206]).96
- Abbildung 21** EC₁-Werte aus den FRAP-Versuchen für die beiden Kontrollen und die einzelnen Substanzen. Im Vergleich zu den zwei Referenzen waren Urolithin C und der M1 signifikant aktiver. Taxifolin hatte eine äquivalente Aktivität. Urolithin A war signifikant aktiver als Ascorbinsäure, jedoch nicht verglichen mit Trolox. Silibinin sowie racemisches Hydnocarpin D waren deutlich inaktiver als die Referenzen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert mit n= 5 und die jeweilige Standardabweichung. Die markierten Säulen (**) waren statistisch signifikant unterschiedlich zu beiden Kontrollen, die andere markierte Säule (*) nur zur Ascorbinsäure. Taxifolin war nicht signifikant unterschiedlich zu den Referenzen. Urolithin B und Isourolithin A wurden hier nicht mit aufgeführt.....99

Abbildung 22 Dosis-Effekt-Diagramm für die Substanzen. Sämtliche Geraden für die Substanzen sind linear steigend, was eine konstante Zunahme der antioxidativen Kapazität mit höheren Konzentrationen nahelegt. Je steiler eine Gerade ist, desto schneller bildet sich dieser Effekt aus. Dieser nimmt mit steigender allgemeinen antioxidativen Aktivität zu, sodass Urolithin C mit der größten Kraft auch die größte Steigung aufweist. Die Geraden für Urolithin C und den M1 liegen über denen der Referenzen und Taxifolin kann als nahezu deckungsgleich bezeichnet werden. Sämtliche weitere Substanzen inklusive Eisen(II)-sulfat selbst liegen darunter entsprechend ihrer sinkenden Aktivität. Dargestellt sind die Geraden der Stoffe aus einer Reihe von sechs Konzentrationen mit $n=5$ 100

Abbildung 23 Zeitliche Verläufe einer ein millimolaren Lösung der jeweiligen Substanzen über den Versuchszeitraum von vier Minuten. Ascorbinsäure, Trolox, Eisen(II)-sulfat und der M1 zeigten eine konstante Absorption und folglich keine Änderung der antioxidativen Kapazität. Urolithin C und Taxifolin näherten sich schnell einem Plateau an, bildeten somit ihre Fähigkeiten recht schnell aus. Urolithin A, Silibinin und das racemische Hydnocarpin D dagegen zeigten über den Zeitraum eine stetig steigende Absorption und damit eine konstante Erhöhung der reduktiven Kraft. Messungen fanden für jede Substanz alle 15 Sekunden statt. 101

Abbildung 24 Zeitlicher Ablauf des Wachstums von CaCo-II-Zellen auf den Inserts vom Zeitpunkt des Aussäens bis zum Versuch. Aufgrund fehlender Adhäsion von manchen Zellen sinkt die Zelldichte nach einem Tag wieder etwas. Ab diesem Punkt wachsen sie in zwei bis drei Tagen konfluent. Nach sechs bis zehn Tagen erreichen die Zellen ihre stationäre Wachstumsphase, von der aus sich die Zellschicht nur noch differenziert. In Subkonfluenz haben die Zellen noch ein homogen undifferenziertes Erscheinungsbild und wandeln sich ab Tag 2 - 3 hin zu heterogen differenzierten Zellen. 107

Abbildung 25 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123, der als Modellsubstanz für den p-GP-vermittelten Transport eingesetzt wird..... 111

Abbildung 26 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow, welcher als Marker für die Integrität des Monolayers durch Evaluierung des parazellulären Transportweges benutzt wird..... 112

-
- Abbildung 27** Zeitlicher Verlauf der TEER-Werte über den Kulturzeitraum von 21 Tagen. Eine Messung fand ab Tag 1 an jedem zweiten Tag in insgesamt vier Experimenten statt (n= 4). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus den vier Untersuchungen. Bereits am dritten Tag überschritten die TEER-Werte die gesetzte Schwelle von 300 Ωcm^2 und lagen schon an Tag fünf über 500 Ωcm^2 . Ab dem dreizehnten Tag pendelten sich die Werte um 600 Ωcm^2 ein.115
- Abbildung 28** Repräsentative Darstellung einer Antikörper- und DAPI-Färbung des CaCo-II-Monolayers an Tag 12. Die Tight-junctions wurden mit zwei Antikörpern, von denen einer fluoreszenzmarkiert war, angefärbt, was einen grünen „Kasten“ um die Zellen ergab. Die DAPI-Färbung der Zellkerne brachte eine bläuliche Farbe hervor. Auf dem Bild links ist der komplette Monolayer dargestellt. Die Risse am Rand stammen von der Bearbeitung und dem Heraustrennen aus den Inserts. Ansonsten lässt sich eine homogene und dicht gewachsene Zellschicht ohne größere Löcher erkennen. Das rechte Bild zeigt eine Vergrößerung aus der Mitte des Monolayers, was die Zellen mit ihren Begrenzungen deutlich macht. Bildliche Darstellung des zwölften Tages ist exemplarisch und weitere Bilder der anderen Tage können auf Nachfrage eingesehen werden.....116
- Abbildung 29** Zeitlicher Verlauf des prozentualen Lucifer Yellow Transportes über den Kulturzeitraum. Aus insgesamt vier Versuchen wurden alle ein bis drei Kulturtage Transportversuche mit Lucifer Yellow als Marker für die Integrität der Layer durchgeführt (n= 3-12). Nach einem Tag lag der Prozentsatz an transportiertem Fluoreszenzfarbstoff unter einem Prozent, war allerdings mit einer großen Standardabweichung behaftet. Den geringsten Wert wurde an Tag 7 erreicht und in der Folge stiegen die Werte wieder leicht an, pendelten sich dann jedoch um ungefähr 0,4 % ein.....117
- Abbildung 30** Vergleich der Genexpression von p-Glykoprotein an jedem zweiten Tag während der Kulturzeit von drei Wochen ab dem ersten Tag. Dargestellt ist die relative Expression als Expressionsratio bezogen auf die Expression dieses Transportproteins an Tag 21 aus jeweils n= 6. Eine starke Schwankung der Expression über den Kulturzeitraum ist erkennbar. Meistens lagen die relativen Expressionen teilweise deutlich unter der Referenz von 21 Tagen, allerdings auch an insgesamt vier Tagen knapp darüber. An Tag 11 war die Expression mit 0,758 signifikant erniedrigt und schon zwei Tage später sowie an Tag 15 mit 1,247 und 1,270 signifikant höher. Dies stellte den interessantesten Bereich für eine Verkürzung dar...118

-
- Abbildung 31** Vergleich der Genexpression von p-Glykoprotein gegen die drei Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA an jedem zweiten Tag während der Kulturzeit von drei Wochen ab dem ersten Tag. Dargestellt ist die relative Expression als Expressionsratio bezogen auf die Expression der drei Housekeepinggene aus jeweils n= 5. Eine starke Schwankung der Expression über den Kulturzeitraum ist erkennbar. Die Tage 11, 13 und 15 stellten den interessanten Bereich für eine Verkürzung dar. Die Analyse gegen die Housekeepinggene SDHA, RPLP 0 und PPIA wies die relevanten Tage mit einer signifikanten Überexpression von p-GP auf (Tag 11: 1,757; Tag 13: 2,891; Tag 15: 2,944)..... 119
- Abbildung 32** Vergleich des Transportes von Rhodamin 123 als Markersubstanz für die Funktionalität von p-Glykoprotein nach 14 und 21 Tagen. Dargestellt sind die P_{app} -Ratios von Rhodamin 123 aus den jeweiligen Versuchen mit n= 15. Erkennbar sind annähernd identische P_{app} -Ratios und auch eine statistische Analyse mittels eines t-Testes ergab keinen signifikanten Unterschied. Lediglich die Standardabweichung zeigte sich nach der Kulturzeit von 14 Tagen etwas größer..... 120
- Abbildung 33** Schematische Darstellung eines Wells aus einer 12-Well-Platte mit einem Insert und Zellbewuchs. Sowohl apikal als auch basolateral der CaCo-II-Zellen befindet sich das Versuchsmedium in den entsprechenden Volumina, die zu einem ausgeglichenen Flüssigkeitsstand führen und somit hydrostatische Druckunterschiede verhindern. Die mögliche unbewegte Wasserschicht ist oberhalb des Zelllayers eingezeichnet (blaue Striche) (modifiziert nach [105]). 125
- Abbildung 34** Schematische Darstellung der angepassten Versuchsbedingungen. Im apikalen Raum wurden dem Versuchsmedium Gallensäuren supplementiert und der pH-Wert einmalig vor dem Versuch auf 6 eingestellt (blau-braun). In der basolateralen Kammer befindet sich normales Versuchsmedium mit seinem natürlichen, neutralen pH-Wert von 7,4 (modifiziert nach [105]). 127
- Abbildung 35** Übersicht der, in den Transportversuchen, verwendeten Polyphenole mit Taxifolin (A), Silibinin (B), Urolithin A (C), Urolithin B (D), Urolithin C (E), Isourolithin A (F), dem Catechinmetaboliten M1 (G) sowie dem racemischen Hydnocarpin D (H). 132
- Abbildung 36** Strukturformel von Verapamil, das als Modellinhibitor für den p-GP-vermittelten Transport verwendet wurde..... 133
- Abbildung 37** Strukturformel von Dexamethason, das als Modellinduktor für den Transport via p-Glykoprotein gebraucht wurde..... 134

-
- Abbildung 38** Strukturformel von Ciprofloxacin, was als weiteres Substrat von p-GP in den Versuchen verwendet wurde.135
- Abbildung 39** Strukturformel von Fluorescein, das als Marker für die Integrität des CaCo-II-Monolayers benutzt wurde. Ein intakter Monolayer zeigt eine geringe Permeabilität für diese Substanz, die unter $0,5 - 1 \times 10^{-6}$ cm/s liegen sollte.135
- Abbildung 40** Strukturformel von Lipopolysaccharid (LPS), welches als bakterielles Endotoxin im Körper oxidativen Stress auslösen kann.137
- Abbildung 41** Einfluss der Polyphenole auf den p-GP-vermittelten Transport von Rhodamin 123. Dargestellt ist der jeweilige Einfluss der Substanz als Normalisierung auf die Rhodaminkontrolle als Mittelwert mit Standardabweichung aus $n= 8 - 18$. Zusätzlich wurden die beiden Kontrollen, Verapamil und Dexamethason, mit dargestellt. Substanzen mit statistisch signifikanten Einflüssen auf den Rhodamintransport sind gekennzeichnet (*).140
- Abbildung 42** Vergleich des Einflusses der Substanzen auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport zwischen reinem HBSS und HBSS, welches mit $100 \mu\text{g/mL}$ Gallensäuren (GS) versetzt und auf pH 6 eingestellt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert mit Standardabweichung aus $n= 8 - 18$. Substanzen, deren Effekt auf den Rhodamin 123 statistisch signifikant höher oder niedriger zwischen den zwei Bedingungen war, wurden gekennzeichnet (*).142
- Abbildung 43** Einfluss der vier Urolithine auf den Transport von Ciprofloxacin durch eine CaCo-II-Zellschicht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n= 15$. Alle vier Urolithine zeigten nach der Normalisierung auf reines Ciprofloxacin eine statistisch signifikante Erniedrigung der P_{app} -Ratio von Ciprofloxacin (*).143
- Abbildung 44** Änderung des p-GP-vermittelten Transportes von Rhodamin 123 durch zwei längere Vorinkubationszeiten mit den vier Urolithinen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus $n= 15$. Alle Inkubationen mit den Urolithinen über 24 und 48 Stunden vor den Transportversuchen mit Rhodamin 123 waren statistisch signifikant unterschiedlich zu den normalen Transportversuchen ohne Vorinkubation (*).145

Abbildung 45 Vergleich des p-GP-vermittelten Rhodamintransportes mit und ohne fünfminütiger Vorinkubation mit Urolithin A, B, C und Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n= 3 - 18. In den normalen Transportversuchen fand eine Inkubation mit den Substanzen während der Versuche statt. Eine Inkubation mit den Substanzen während der Versuche entfiel nach der fünfminütigen Vorinkubation. Sämtliche Stoffe konnten nach lediglich fünf Minuten ihre teilweise signifikanten induktiven Effekte (*) auf den Rhodamintransport nicht ausbilden und aufrecht erhalten. 146

Abbildung 46 Repräsentative Darstellung der kumulativen Stoffmengen an transportiertem Rhodamin 123 in den beiden Zeitintervallen. Zwischen 0 und 60 Minuten handelte es sich um reines Rhodamin 123, zwischen 60 und 120 Minuten fand eine zusätzliche Inkubation mit Dexamethason statt. Dargestellt ist jeder Zeitpunkt in n= 3. Die kumulativen Werte aus dem zweiten Intervall lagen teilweise deutlich über denen aus dem ersten Zeitintervall und auch die Steigung der Geraden fiel steiler aus. 147

Abbildung 47 Einfluss des LPS-Zusatzes auf den p-GP-vermittelten Rhodamintransport und Effekt einer zusätzlichen Vorinkubation über 24 h mit den vier Urolithinen (je 50 µg/mL). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus n= 6 - 9. Der Zusatz von 200 µg/mL LPS zum Kulturmedium über sechs Stunden vor den Transportversuchen führte zu einer signifikanten Steigerung des Rhodamintransportes (+). Die Vorinkubation mit den Urolithinen vor dem Zusatz von LPS konnte den Transport von Rhodamin 123 nochmal signifikant erhöhen (*). 150

Abbildung 48 Schematische Darstellung des PCR-Prozesses (A) und der Amplifikation (B). Beim PCR-Prozess wird zunächst die doppelsträngige DNA im ersten Schritt über Hitze denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die Einzelstränge an (Annealing). Zuletzt findet schließlich im dritten Schritt die Elongation und damit die Bildung der komplementären DNA-Stränge über Polymerasen statt. In der idealen exponentiellen Amplifikation findet basierend auf n DNA-Stücken in jedem Zyklus eine Verdopplung der Ausgangsmenge statt (modifiziert nach [326]). 166

-
- Abbildung 49** Schematische Darstellung einer idealen Amplifikationskurve eines PCR-Prozesses mit den vier Phasen sowie der Thresholdlinie (Schwellenlinie, grün), dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der Schwellenlinie (C_P , rot) sowie der daraus resultierende Thresholdzyklus (C_T , rot). Die Kurve unterteilt sich in eine lineare Phase (a), in der nur Basislinienfluoreszenz detektiert werden kann, und eine frühe exponentielle Phase (b), während dieser die Amplifikation des Zielgenes messbar wird und die Schwellenlinie überschreitet. Darauf folgt die log-lineare Phase (c), in der im Idealfall eine Verdopplung der Ausgangsmenge an DNA in jedem Zyklus erreicht wird. Den Abschluss bildet die Plateauphase (d), die keine weitere Steigung der Fluoreszenz mehr beinhaltet (modifiziert nach [319, 331]).....168
- Abbildung 50** Wirkprinzip des SYBR Green Farbstoffes. Der komplementäre DNA-Strang wird im PCR-Prozess von der DNA-Polymerase (violettes Kreuz) hergestellt. In ungebundenem Zustand zeigt der Farbstoff noch keine Fluoreszenz (grüner Kreis). Sobald er an die nachgebildete doppelsträngige DNA starr bindet und mit ihr interkaliert, fluoresziert er direkt proportional zur Menge an amplifizierter doppelsträngiger DNA (modifiziert nach [327, 331])171
- Abbildung 51** Schematische Darstellung zweier Schmelzkurvenanalysen mit gewünschtem Aussehen (A) und einem offensichtlichen Nebenprodukt aus dem PCR-Prozess (B). Im gewünschten Verlauf zeigt sich nur ein deutlicher Peak, dessen Fluoreszenz an einer gewissen Temperaturschwelle plötzlich abnimmt, was ein Indiz für ein einziges Produkt aus der PCR ist (A). In der rechten Schmelzkurve (B) ist vor diesem Peak ein weiterer kleinerer zu einer niedrigeren Temperatur zu erkennen, was für die Anwesenheit eines weiteren Produktes steht (modifiziert nach [331]).....172
- Abbildung 52** Übersicht über die Amplifikationskurven einer Probe mit ihrer Kontrolle (rot und gelb) sowie den drei Housekeepinggenen zur relativen Quantifizierung (blau, grün, grau). Zusätzlich ist die Schwellenlinie (lila) für den Thresholdzyklus dargestellt (modifiziert nach [319]).....175
- Abbildung 53** Box- und Whisker-Plots der acht getesteten Gene für die Housekeepinggenvalidierung. Aufgetragen ist der cycle threshold (C_T) gegen die Housekeepinggene. Man erkennt die geringste Schwankung in der Expression für die Gene PPIA, RPLP 0 sowie SDHA. Diese wurden als Referenzgene weiterverwendet.....184

-
- Abbildung 54** Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 µM Urolithin B über 2 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus n= 9 Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 1,137 (Standardfehler 0,842 - 1,738) und war nicht signifikant unterschiedlich von der unbehandelten Kontrolle (p= 0,342)..... 186
- Abbildung 55** Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 µM Urolithin A über 24 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus n= 9 Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 2,736 (Standardfehler 1,612 - 4,292) und war signifikant hochreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p= 0,0001). 187
- Abbildung 56** Relative Genexpressionsänderung von p-GP nach einer Inkubation mit 50 µM Urolithin C über 48 h. Der Box-Whisker-Plot stellt das Ergebnis aus n= 9 Versuchen dar. Nach Inkubation war der Wert für die relative Expression von p-GP 3,824 (Standardfehler 2,875 - 5,005) und war signifikant hochreguliert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p= 0,0001). 188
- Abbildung 57** Strukturformel von Neutralrot..... 201
- Abbildung 58** Überblick der Medien, Flüssigkeiten und Supplemente, die in der routinemäßigen CaCo-II-Zellkultur verwendet wurden. Zum Dulbecco's Modfied Eagle Medium (DMEM, **2**) wurden hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum (FBS, **1**), nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, **5**) und Penicillin-Streptomycin (PEST, **6**) zugesetzt. Mittels Phosphate Buffered Saline (PBS, **3**) wurden die Zellen beim Passagieren gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung (T/E, **4**) vom Zellkulturflaschenboden abgelöst..... 209
- Abbildung 59** Eigene Aufnahme eines nahezu komplett dichten Monolayers von CaCo-II-Zellen mit dem Axio Observer.Z1 Mikroskop von Zeiss nach Fluoreszenzfärbung (vgl. 4.5). Erkennbar sind die Zellen mit ihrer charakteristischen eckigen Form durch die Färbung der Tight-junctions (grün). Die Zellkerne einer jeden Zelle sind in blau dargestellt. 211
- Abbildung 60** Darstellung der Gravur einer Neubauer Zählkammer. Die Zellzählung findet jeweils in den Ecken der Kammer in den vier großen Quadraten bestehend aus 16 kleinen Quadraten. Aus den vier Bereichen wird im Anschluss der Mittelwert gebildet. 212

-
- Abbildung 61** Bildaufnahme eines Agarosegels von einem Mykoplasmatest nach erfolgter Elektrophorese. Zu sehen sind insgesamt 6 Banden: die positive Kontrolle (erste von links), die negative Kontrolle (zweite von links) sowie vier Proben aus Zellkulturmedium. Da alle Proben auf Höhe der negativen Kontrolle liegen, ist von keiner Mykoplasmenkontamination auszugehen.....214
- Abbildung 62** Schematisches Prinzip der TEER-Wert-Messung. Die beiden Elektroden der Chopstick Elektrode werden in ein Well mit Insert eingetaucht. Eine Elektrode befindet sich in der apikalen Kammer oberhalb der Zellen, die andere ist in der basolateralen Kammer. So lässt sich über den Vergleich des elektrischen Widerstands mit einem Blank-Well die Integrität des Monolayers (Zellen in braun) bestimmen.....215
- Abbildung 63** Schematische Darstellung des Prinzips des Transportversuches: apikale in basolaterale (a), sowie der Transport von basolaterale in apikale Richtung (b). Des Weiteren sind die Rhodaminlösung (gelb), die Zellen (braun) und HBSS (leicht bläulich, in Wirklichkeit jedoch farblos) dargestellt. Die Inhibitoren sind durch die roten Punkte dargestellt. Beim Transport in basolaterale Richtung (a) wird zunächst in der apikalen Kammer 0,55 mL Rhodaminlösung vorgelegt, um sogleich für die Massebilanz am Ende des Versuches eine Probe von 150 µL zu ziehen. Dadurch ergeben sich zum Zeitpunkt 0 min die Volumina 0,4 mL (apikal) und 1,2 mL (basolateral). Für den Transport in apikale Richtung (b) ist das Prinzip genau umgedreht. 220
- Abbildung 64** Schematische Darstellung einer möglichen Auftragsung in einem Transportversuch. Auf der Platten oben links stellen die sechs gelben Kreise die reine Rhodaminkontrolle dar. Auf den beiden oberen Platten symbolisieren die 12 Kreise mit braunen Querstriche die Evaluation zweier verschiedener Polyphenole mit je drei Wellpaaren. Die sechs Kreise mit rotem Rand oben rechts zeigen die Inhibition des p-GP-vermittelten Transportes durch Verapamil in diesem Versuch. Auf der unteren Platte zeigen die jeweils drei Wells mit grünen Kästchen und grünen Querstrichen die beiden Kontrollen mit Fluorescein und Lucifer Yellow, die drei blauen Wells stellen die Blanks aus der Kulturzeit dar, welche für eine TEER-Messung nach dem Transportversuch noch benötigt wurden und die drei grauen Wells wurden nicht benutzt.....225

-
- Abbildung 65** Darstellung des Schmelzkurvenverlaufs der p-GP-Produkte über den Temperaturbereich von 55 °C bis 95 °C (n= 7). **Links:** Fluoreszenz R gegen die Temperatur aufgetragen. **Rechts:** Negative erste Ableitung der Fluoreszenz (-R'(T)) gegen die Temperatur aufgetragen. Der experimentell bestimmte Schmelzpunkt des p-GP-Produktes lag bei 82,8 °C, was allen Peaks entsprach. 232
- Abbildung 66** Negative erste Ableitung der Fluoreszenz (-Rn'(T)) gegen die Temperatur aufgetragen. Schmelzkurvenverlauf der UBC-Produkte (n= 7). Kurve weist mehr als einen Peak auf, was für mehr als ein amplifiziertes Produkt spricht. 233
- Abbildung 67** Aufnahme eines Agarosegels nach beendeter Elektrophorese. Rechts und links des DNA-Größenstandards sind die Banden der einzelnen Primer zu erkennen. Da jeweils nur eine Bande erkennbar ist, kann man von nur einem entstandenen Produkt ausgehen. 234
- Abbildung 68** Darstellung von **Links:** einer optimal verlaufenden Amplifikationskurve der cDNA-Verdünnungsreihe V₁ (1:10, blau) bis V₅ (1:100000, gelb) von SDHA und **Rechts:** die entstandene Kalibriergerade mit der Geradengleichung von $y = -3,175 * \log(x) + 21,55$ und $R^2 = 0,994$. Die daraus resultierende Effizienz ergab 106,5 %. 236
- Abbildung 69** Schematische Darstellung der pipettierten 96-Well-PCR-Platte. **Oben:** Vermessung von maximal drei Inkubationen mit Polyphenolen (PP) und deren Kontrollen (K) ohne Inkubation jeweils n= 9 (blau). noRT-Kontrolle (noRT) im Duplikat (orange), fünfstufige Verdünnungsreihe (V) 1:10 - 1:100000 im Triplikat (grün), no-template control (NTC) im Triplikat (rot) und die zwei inter-run control (IRC)-Gene jeweils n= 3 (grau). **Unten:** Vermessung von einem Housekeepinggen für maximal fünf Inkubationen mit Polyphenolen und deren Kontrollen ohne Inkubation jeweils n= 6 (blau). noRT-Kontrolle im Duplikat (orange), fünfstufige Verdünnungsreihe 1:10 - 1:100000 im Triplikat (grün), NTC im Triplikat (rot) und die zwei IRC-Gene jeweils n= 3 (grau). 243

H Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Beispielhafte Übersicht der beiden Familien aus der ATP-binding cassette (ABC)-Superfamilie, die unter anderem für den apikalen Arzneistoffefflux verantwortlich sind. Die Familie multidrug resistance (MDR) mit den Beispielen p-Glykoprotein (p-GP) und breast cancer resistance protein (BCRP) und ihrem jeweiligen Vorkommen sowie exemplarischen Funktionen. Ebenso die Familie multidrug resistance associated protein (MRP) mit Transporterbeispielen und Vorkommen sowie Funktion [9, 11, 40].	36
Tabelle 2	Tabellarische Übersicht von beispielhaften Substraten von p-GP, BCRP und MRP2 aus der Familie der ABC-Transporter [65-68]	41
Tabelle 3	Übersicht über die sieben Subfamilien der ABC-Transporterfamilie mit Synonym, Anzahl der Gene und Pseudogene sowie einem Transporterbeispiel [58].....	43
Tabelle 4	Übersicht über mögliche Substanzklassen mit beispielhaften Arzneistoffen, deren Absorption von p-Glykoprotein beeinflusst wird [40].	58
Tabelle 5	Übersicht über die verwendeten Substanzen mit ihren molaren Massen [$\mu\text{g}/\mu\text{mol}$] und ihren in den Versuchen eingesetzten Konzentration in 50 μM (für Ciprofloxacin 20 μM) sowie ihrer entsprechenden Konzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$	76
Tabelle 6	Einteilung der Polyphenole hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität.....	98
Tabelle 7	Übersicht der TEER-Werte nach einer Inkubation mit einer Konzentrationsreihe an LPS über sechs Stunden.....	148
Tabelle 8	Übersicht der TEER-Werte nach einer Inkubation mit den vier Urolithinen zu je 50 μM vor einer sechststündigen Inkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS.	149
Tabelle 9	Basensequenzen mit jeweiliger Länger sämtlicher in der eigenen Methodenentwicklung und der Analyse verwendeter Primer als Forward (FW)- und Reverse (RW)-Primer.....	178
Tabelle 10	Übersicht über die optimale Konzentration des Primerpaares für die jeweiligen Gene.....	179
Tabelle 11	Übersicht der Effizienzen in Prozent für die – nach der Überprüfung der Primer – übrigen neun Primerpaare. Es ließ sich erkennen, dass alle Primer in einem adäquaten Maßstab arbeiteten und somit für die Versuche verwendet werden konnten. Die Effizienz wurde aus der Steigung einer Geraden einer Verdünnungsreihe in $n=3$ bestimmt.....	181

Tabelle 12 Übersicht der untersuchten Referenzgene mit ihrer Funktion im menschlichen Organismus, welche zur Normalisierung der p-GP-Genexpression in den CaCo-II-Zellen in den Versuchen zum Polyphenolgenexpressionseinfluss verwendet wurden [338, 341, 351, 352].	182
Tabelle 13 Übersicht der Auswertung durch die BestKeeper [®] -Software [349] im Rahmen der Housekeepinggenvalidierung mit den jeweiligen c_t -Werten. Angegeben werden für jedes untersuchte Gen die Stichprobenanzahl (n), der geometrische Mittelwert (g. MW), der arithmetische Mittelwert (a. MW), der minimale (min c_t) sowie der maximale (max c_t) threshold cycle, die Standardabweichung (SDV) und der Variationskoeffizient (CV). Keine der Standardabweichungen der acht potentiellen Referenzgene fiel laut Software zu hoch aus. Die drei fett markierten Gene fielen am kleinsten aus und wurden folglich für die Normalisierung verwendet.	183
Tabelle 14 Genkürzel des Arzneistofftransporters p-GP sowie der relevanten Housekeepinggene mit jeweiliger Identifikationsnummer aus der Gene Datenbank (Gene ID [343]), der Kennung der Nukleotide Datenbank für die zugehörige mRNA (NCBI Referenz-Sequenz [380]) und der Nukleotidanzahl der korrespondierenden mRNA-Sequenzen	229
Tabelle 15 Forward- (FW) und Reverse- (RW) Sequenzen der selbstentworfenen Primer mit der Basenlänge, der Schmelztemperatur (T_m), dem Molekulargewicht (MW) sowie dem Guanin/Cytosin- (GC) Gehalt. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin	231
Tabelle 16 Pipettierschema zur Bestimmung der optimalen Primzerkonzentration an FW- und RW-Primer. Es wurden jeweils unterschiedliche Volumina von einem bis drei Mikroliter je einer 2 μ M FW- bzw. RW-Oligonukleotidlösung zusammen pipettiert. Die demensprechend entstandenen Endkonzentrationen pro Well lagen zwischen 100 und 300 nM je Primersequenz.	234

I Literaturverzeichnis

-
1. Faller, A., Schünke, M., *Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion*. 2016, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 2. Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., *Histologie*. 2004, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
 3. Martini, F.H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B., *Anatomie*. 2012, München: Pearson Studium.
 4. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 5. Speckmann, E., J., Hescheler, J., Köhling, R., *Physiologie - Das Lehrbuch*. 2019, München: Elsevier GmbH.
 6. Huppelsberg, J., Walter, K., *Kurzlehrbuch Physiologie*. 2013, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
 7. Bommas-Ebert, U., Teubner, P., Voß, R., *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. 2011, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 8. Braxmaier, H. *Verdauung*. 2021 [23.03.2021]; Available from: <https://pixabay.com/de/vectors/verdauung-darm-magen-darm-m%C3%BCndliche-303364/>.
 9. Hidalgo, I.J., *Assessing the absorption of new pharmaceuticals*. *Curr Top Med Chem*, 2001. **1**(5): p. 385-401.
 10. Lea, T., *Epithelial Cell Models; General Introduction*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 95-102.
 11. Awortwe, C., P.S. Fasinu, and B. Rosenkranz, *Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges*. *J Pharm Pharm Sci*, 2014. **17**(1): p. 1-19.
 12. Kramer, S.D., *Quantitative aspects of drug permeation across in vitro and in vivo barriers*. *Eur J Pharm Sci*, 2016. **87**: p. 30-46.
 13. Lennernas, H., *Human intestinal permeability*. *J Pharm Sci*, 1998. **87**(4): p. 403-10.
 14. Seithel, A., et al., *Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells*. *Eur J Pharm Sci*, 2006. **28**(4): p. 291-9.
 15. Artursson, P., *Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1991. **8**(4): p. 305-30.
 16. Goto, M., et al., *Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(1): p. 163-70.
 17. Barthe, L., J. Woodley, and G. Houin, *Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies*. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999. **13**(2): p. 154-68.
 18. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
 19. Brooke, M.A., D. Nitoiu, and D.P. Kelsell, *Cell-cell connectivity: desmosomes and disease*. *J Pathol*, 2012. **226**(2): p. 158-71.
 20. Amasheh, M., et al., *Barrier effects of nutritional factors*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1165**: p. 267-73.
 21. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
 22. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 660-9.

-
23. Balimane, P.V., Y.H. Han, and S. Chong, *Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction*. AAPS J, 2006. **8**(1): p. E1-13.
 24. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 27-43.
 25. Camenisch, G., et al., *Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight*. Eur J Pharm Sci, 1998. **6**(4): p. 317-24.
 26. Heinrich, C.P., Müller, M., Graeve, L., *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Heidelberg: Springer Medizin.
 27. Smetanova, L., et al., *Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2011. **54**(1): p. 3-8.
 28. Kobayashi, S., et al., *Transport mechanisms for soy isoflavones and microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(11): p. 2210-7.
 29. Lin, X., et al., *Attenuation of intestinal absorption by major efflux transporters: quantitative tools and strategies using a Caco-2 model*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(2): p. 265-74.
 30. Yazdaniyan, M., et al., *Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds*. Pharm Res, 1998. **15**(9): p. 1490-4.
 31. Lee, E.J., C.B. Lean, and L.M. Limenta, *Role of membrane transporters in the safety profile of drugs*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009. **5**(11): p. 1369-83.
 32. Graber-Maier, A., H. Gutmann, and J. Drewe, *A new intestinal cell culture model to discriminate the relative contribution of P-gp and BCRP on transport of substrates such as imatinib*. Mol Pharm, 2010. **7**(5): p. 1618-28.
 33. Yang, N.J. and M.J. Hinner, *Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins*. Methods Mol Biol, 2015. **1266**: p. 29-53.
 34. Hayashi, M. and M. Tomita, *Mechanistic analysis for drug permeation through intestinal membrane*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. **22**(2): p. 67-77.
 35. Inokuchi, H., et al., *The effect of hyperosmosis on paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers*. Biosci Biotechnol Biochem, 2009. **73**(2): p. 328-34.
 36. Schutte, M.E., et al., *An in vitro and in silico study on the flavonoid-mediated modulation of the transport of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) through Caco-2 monolayers*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **217**(2): p. 204-15.
 37. Anderle, P., et al., *P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels*. J Pharm Sci, 1998. **87**(6): p. 757-62.
 38. Spahn-Langguth, H., et al., *P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1998. **36**(1): p. 16-24.
 39. Chiou, W.L., et al., *A comprehensive account on the role of efflux transporters in the gastrointestinal absorption of 13 commonly used substrate drugs in humans*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2001. **39**(3): p. 93-101.
 40. Ferreira, A., et al., *Flavonoid compounds as reversal agents of the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: biology, chemistry and pharmacology*. Phytochemistry Reviews, 2015. **14**(2): p. 233-272.

-
41. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. **204**(3): p. 216-37.
 42. Yee, S.W., L. Chen, and K.M. Giacomini, *Pharmacogenomics of membrane transporters: past, present and future*. *Pharmacogenomics*, 2010. **11**(4): p. 475-9.
 43. Giacomini, K.M. and S.M. Huang, *Transporters in drug development and clinical pharmacology*. *Clin Pharmacol Ther*, 2013. **94**(1): p. 3-9.
 44. Benet, L.Z. and C.L. Cummins, *The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **50 Suppl 1**: p. S3-11.
 45. Doppenschmitt, S., et al., *Role of P-glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: An approach using passive membrane permeability and affinity to P-glycoprotein*. *J Pharm Sci*, 1999. **88**(10): p. 1067-72.
 46. Loo, T.W. and D.M. Clarke, *Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux*. *J Membr Biol*, 2005. **206**(3): p. 173-85.
 47. Shen, L.Z., et al., *Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma in vivo*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(7): p. 1060-4.
 48. Cordon-Cardo, C., et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues*. *J Histochem Cytochem*, 1990. **38**(9): p. 1277-87.
 49. Molnar, J., et al., *Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants*. *Curr Top Med Chem*, 2010. **10**(17): p. 1757-68.
 50. Vazquez, R.N., et al., *Molecular factors influencing the affinity of flavonoid compounds on P-glycoprotein efflux transporter*. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2014. **10**(3): p. 250-8.
 51. Benet, L.Z., C.L. Cummins, and C.Y. Wu, *Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes*. *Int J Pharm*, 2004. **277**(1-2): p. 3-9.
 52. Wachter, V.J., L. Salphati, and L.Z. Benet, *Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 89-102.
 53. Glaeser, H., et al., *Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans*. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **81**(3): p. 362-70.
 54. Suzuki, H. and Y. Sugiyama, *Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **12**(1): p. 3-12.
 55. Wandel, C., et al., *P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3944-8.
 56. Yumoto, R., et al., *Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **289**(1): p. 149-55.
 57. Pal, D. and A.K. Mitra, *MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions*. *Life Sci*, 2006. **78**(18): p. 2131-45.
 58. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. *Hum Genomics*, 2009. **3**(3): p. 281-90.
 59. Schuetz, E.G., W.T. Beck, and J.D. Schuetz, *Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells*. *Mol Pharmacol*, 1996. **49**(2): p. 311-8.
 60. Bhardwaj, R.K., et al., *Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **302**(2): p. 645-50.

-
61. Leveque, D. and F. Jehl, *P-glycoprotein and pharmacokinetics*. Anticancer Res, 1995. **15**(2): p. 331-6.
 62. Netsomboon, K., et al., *Novel in vitro transport method for screening the reversibility of P-glycoprotein inhibitors*. Eur J Pharm Biopharm, 2016. **100**: p. 9-14.
 63. MacLean, C., et al., *Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multidrug resistance-associated protein 2 in male and female rats*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(7): p. 1249-54.
 64. Mouly, S., C. Meune, and J.F. Bergmann, *Mini-series: I. Basic science. Uncertainty and inaccuracy of predicting CYP-mediated in vivo drug interactions in the ICU from in vitro models: focus on CYP3A4*. Intensive Care Med, 2009. **35**(3): p. 417-29.
 65. Uchida, Y., et al., *Quantitative targeted absolute proteomics for 28 human transporters in plasma membrane of Caco-2 cell monolayer cultured for 2, 3, and 4 weeks*. Drug Metab Pharmacokinet, 2015. **30**(2): p. 205-8.
 66. Elsby, R., et al., *Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 1140-64.
 67. Mitra, P., et al., *A comprehensive study demonstrating that p-glycoprotein function is directly affected by changes in pH: implications for intestinal pH and effects on drug absorption*. J Pharm Sci, 2011. **100**(10): p. 4258-68.
 68. Kawahara, I., et al., *Assessment of contribution of BCRP to intestinal absorption of various drugs using portal-systemic blood concentration difference model in mice*. Pharmacol Res Perspect, 2020. **8**(1): p. e00544.
 69. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
 70. Chieli, E., et al., *In vitro modulation of ABCB1/P-glycoprotein expression by polyphenols from Mangifera indica*. Chem Biol Interact, 2010. **186**(3): p. 287-94.
 71. Murakami, T., E. Bodor, and N. Bodor, *Modulation of expression/function of intestinal P-glycoprotein under disease states*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020. **16**(1): p. 59-78.
 72. Ayrton, A. and P. Morgan, *Role of transport proteins in drug discovery and development: a pharmaceutical perspective*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 676-708.
 73. Heredi-Szabo, K., et al., *A P-gp vesicular transport inhibition assay - optimization and validation for drug-drug interaction testing*. Eur J Pharm Sci, 2013. **49**(4): p. 773-81.
 74. Meng, X., et al., *Reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by alpha-asarone and beta-asarone, bioactive cis-trans isomers from Acorus tatarinowii*. Biotechnol Lett, 2014. **36**(4): p. 685-91.
 75. Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. J Lipid Res, 2001. **42**(7): p. 1007-17.
 76. Jodoin, J., M. Demeule, and R. Beliveau, *Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1542**(1-3): p. 149-59.
 77. Faassen, F., et al., *Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs*. Int J Pharm, 2003. **263**(1-2): p. 113-22.
 78. Berger, V., et al., *Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2)*. Toxicol Lett, 2003. **140-141**: p. 465-76.

-
79. Kawaguchi, H., et al., *Permeability modulation of human intestinal Caco-2 cell monolayers by interferons*. Eur J Pharm Biopharm, 2005. **59**(1): p. 45-50.
 80. Langmann, T., et al., *Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues*. Clin Chem, 2003. **49**(2): p. 230-8.
 81. Larsen, U.L., et al., *Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin*. Scand J Clin Lab Invest, 2007. **67**(2): p. 123-34.
 82. Lohner, K., et al., *Flavonoids alter P-gp expression in intestinal epithelial cells in vitro and in vivo*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(3): p. 293-300.
 83. Paine, M.F., L.Y. Leung, and P.B. Watkins, *New insights into drug absorption: studies with sirolimus*. Ther Drug Monit, 2004. **26**(5): p. 463-7.
 84. Hunter, J., B.H. Hirst, and N.L. Simmons, *Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers*. Pharm Res, 1993. **10**(5): p. 743-9.
 85. Fillpits, M., et al., *Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in colorectal carcinomas*. Br J Cancer, 1997. **75**(2): p. 208-12.
 86. B, M.F.G., S.P.C. D, and U.F. MJ, *Overcoming Multidrug Resistance: Flavonoid and Terpenoid Nitrogen-Containing Derivatives as ABC Transporter Modulators*. Molecules, 2020. **25**(15).
 87. Ekins, S., et al., *Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(5): p. 974-81.
 88. Vilas-Boas, V., et al., *Mechanisms of P-gp inhibition and effects on membrane fluidity of a new rifampicin derivative, 1,8-dibenzoyl-rifampicin*. Toxicol Lett, 2013. **220**(3): p. 259-66.
 89. Balimane, P.V. and S. Chong, *A combined cell based approach to identify P-glycoprotein substrates and inhibitors in a single assay*. Int J Pharm, 2005. **301**(1-2): p. 80-8.
 90. Galkin, A., J. Pakkanen, and P. Vuorela, *Development of an automated 7-day 96-well Caco-2 cell culture model*. Pharmazie, 2008. **63**(6): p. 464-9.
 91. Kamiloglu, S., et al., *Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells--A Review*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(9): p. 21555-74.
 92. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 103-111.
 93. Senarathna, S.M. and A. Crowe, *The influence of passage number for Caco2 cell models when evaluating P-gp mediated drug transport*. Pharmazie, 2015. **70**(12): p. 798-803.
 94. Fang, Y., et al., *Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells*. Nutrients, 2017. **9**(12).
 95. Bruck, S., et al., *Caco-2 cells - expression, regulation and function of drug transporters compared with human jejunal tissue*. Biopharm Drug Dispos, 2017. **38**(2): p. 115-126.
 96. Koljonen, M., et al., *Evaluation of cocktail approach to standardise Caco-2 permeability experiments*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **64**(3): p. 379-87.
 97. Maubon, N., et al., *Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR*. Fundam Clin Pharmacol, 2007. **21**(6): p. 659-63.
 98. Volpe, D.A., *Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines*. Future Med Chem, 2011. **3**(16): p. 2063-77.

-
99. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. Cell Biol Toxicol, 2005. **21**(1): p. 1-26.
 100. Behrens, I. and T. Kissel, *Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers?* Eur J Pharm Sci, 2003. **19**(5): p. 433-42.
 101. Braun, A., et al., *Cell cultures as tools in biopharmacy*. Eur J Pharm Sci, 2000. **11 Suppl 2**: p. S51-60.
 102. Kauffman, A.L., et al., *Alternative functional in vitro models of human intestinal epithelia*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 79.
 103. Crivori, P., et al., *Computational models for identifying potential P-glycoprotein substrates and inhibitors*. Mol Pharm, 2006. **3**(1): p. 33-44.
 104. Shah, P., et al., *Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption*. Biotechnol Prog, 2006. **22**(1): p. 186-98.
 105. Hubatsch, I., E.G. Ragnarsson, and P. Artursson, *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2111-9.
 106. Griffiths, N.M., B.H. Hirst, and N.L. Simmons, *Active secretion of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human intestinal epithelial Caco-2 cell layers*. Br J Pharmacol, 1993. **108**(3): p. 575-6.
 107. Balimane, P.V., A. Marino, and S. Chong, *P-gp inhibition potential in cell-based models: which "calculation" method is the most accurate?* AAPS J, 2008. **10**(4): p. 577-86.
 108. Ho, N.F., et al., *A biophysical model of passive and polarized active transport processes in Caco-2 cells: approaches to uncoupling apical and basolateral membrane events in the intact cell*. J Pharm Sci, 1995. **84**(1): p. 21-7.
 109. Naruhashi, K., et al., *Experimental demonstration of the unstirred water layer effect on drug transport in Caco-2 cells*. J Pharm Sci, 2003. **92**(7): p. 1502-8.
 110. Poquet, L., M.N. Clifford, and G. Williamson, *Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(1): p. 190-7.
 111. Delie, F. and W. Rubas, *A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1997. **14**(3): p. 221-86.
 112. Briske-Anderson, M.J., J.W. Finley, and S.M. Newman, *The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1997. **214**(3): p. 248-57.
 113. Peng, Y., et al., *Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development*. Eur J Pharm Sci, 2014. **56**: p. 120-30.
 114. Bohn, T., et al., *Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites--a position paper focusing on carotenoids and polyphenols*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(7): p. 1307-23.
 115. da Silva Junior, J.B., et al., *Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption*. Mini Rev Med Chem, 2015. **15**(10): p. 858-71.
 116. Lakeram, M., et al., *Optimisation of the caco-2 permeability assay using experimental design methodology*. Pharm Res, 2008. **25**(7): p. 1544-51.
 117. Oga, E.F., et al., *P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of herbals on digoxin transport*. J Ethnopharmacol, 2012. **144**(3): p. 612-7.

-
118. Engdal, S. and O.G. Nilsen, *Inhibition of P-glycoprotein in Caco-2 cells: effects of herbal remedies frequently used by cancer patients*. *Xenobiotica*, 2008. **38**(6): p. 559-73.
 119. Hennessy, M., et al., *St Johns wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions*. *Br J Clin Pharmacol*, 2002. **53**(1): p. 75-82.
 120. Hellum, B.H. and O.G. Nilsen, *In vitro inhibition of CYP3A4 metabolism and P-glycoprotein-mediated transport by trade herbal products*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008. **102**(5): p. 466-75.
 121. Ingels, F.M. and P.F. Augustijns, *Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2*. *J Pharm Sci*, 2003. **92**(8): p. 1545-58.
 122. Lee, S.D., J.A. Osei-Twum, and K.M. Wasan, *Dose-dependent targeted suppression of P-glycoprotein expression and function in Caco-2 cells*. *Mol Pharm*, 2013. **10**(6): p. 2323-30.
 123. Nagira, M., et al., *Ischemia/reperfusion injury in the monolayers of human intestinal epithelial cell line caco-2 and its recovery by antioxidants*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006. **21**(3): p. 230-7.
 124. Kishimoto, W., et al., *In vitro predictability of drug-drug interaction likelihood of P-glycoprotein-mediated efflux of dabigatran etexilate based on [I]2/IC50 threshold*. *Drug Metab Dispos*, 2014. **42**(2): p. 257-63.
 125. Yoshimura, S., et al., *Inhibitory effect of flavonoids on the efflux of N-acetyl 5-aminosalicylic acid intracellularly formed in Caco-2 cells*. *J Biomed Biotechnol*, 2009. **2009**: p. 467489.
 126. Li, Y. and J.W. Paxton, *The effects of flavonoids on the ABC transporters: consequences for the pharmacokinetics of substrate drugs*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(3): p. 267-85.
 127. Nait Chabane, M., et al., *Quercetin and naringenin transport across human intestinal Caco-2 cells*. *J Pharm Pharmacol*, 2009. **61**(11): p. 1473-83.
 128. Chen, Y., et al., *Transepithelial transport mechanisms of 7,8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB receptor agonist, in human intestinal Caco-2 cells*. *Food Funct*, 2019. **10**(8): p. 5215-5227.
 129. Gomez-Juaristi, M., et al., *Experimental confounding factors affecting stability, transport and metabolism of flavanols and hydroxycinnamic acids in Caco-2 cells*. *Food Res Int*, 2020. **129**: p. 108797.
 130. Tahiri, I., et al., *Urinary flavanone concentrations as biomarkers of dietary flavanone intakes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. *Br J Nutr*, 2020. **123**(6): p. 691-698.
 131. Li, H., et al., *Flavones Produced by Mulberry Flavone Synthase Type I Constitute a Defense Line against the Ultraviolet-B Stress*. *Plants (Basel)*, 2020. **9**(2).
 132. Radhakrishnan, R., T. Leelapriya, and B.D. Kumari, *Effects of pulsed magnetic field treatment of soybean seeds on calli growth, cell damage, and biochemical changes under salt stress*. *Bioelectromagnetics*, 2012. **33**(8): p. 670-81.
 133. Murkovic, M., U. Adam, and W. Pfannhauser, *Analysis of anthocyanine glycosides in human serum*. *Fresenius J Anal Chem*, 2000. **366**(4): p. 379-81.
 134. Diukendjieva, A., et al., *In vitro and in silico studies of the membrane permeability of natural flavonoids from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. and their derivatives*. *Phytomedicine*, 2019. **53**: p. 79-85.
 135. Zhu, X., et al., *Transport characteristics of tryptanthrin and its inhibitory effect on P-gp and MRP2 in Caco-2 cells*. *J Pharm Pharm Sci*, 2011. **14**(3): p. 325-35.

-
136. Kobayashi, S. and Y. Konishi, *Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **368**(1): p. 23-9.
 137. Lies, B., et al., *Flavone potently stimulates an apical transporter for flavonoids in human intestinal Caco-2 cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2012. **56**(11): p. 1627-35.
 138. Wen, X. and T. Walle, *Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(10): p. 1786-92.
 139. Abdallah, H.M., et al., *P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review*. *J Adv Res*, 2015. **6**(1): p. 45-62.
 140. Mohana, S., et al., *Flavonoids modulate multidrug resistance through wnt signaling in P-glycoprotein overexpressing cell lines*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 1168.
 141. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction*. *Mol Aspects Med*, 2013. **34**(2-3): p. 95-107.
 142. Bailey, D.G., et al., *Grapefruit juice-felodipine interaction: effect of naringin and 6',7'-dihydroxybergamottin in humans*. *Clin Pharmacol Ther*, 1998. **64**(3): p. 248-56.
 143. Spahn-Langguth, H. and P. Langguth, *Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol*. *Eur J Pharm Sci*, 2001. **12**(4): p. 361-7.
 144. Dahan, A. and G.L. Amidon, *Grapefruit juice and its constituents augment colchicine intestinal absorption: potential hazardous interaction and the role of p-glycoprotein*. *Pharm Res*, 2009. **26**(4): p. 883-92.
 145. Lim, S.L. and L.Y. Lim, *Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport pathways of Caco-2 cell monolayers*. *Int J Pharm*, 2006. **307**(1): p. 42-50.
 146. Xu, J., M.L. Go, and L.Y. Lim, *Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo*. *Pharm Res*, 2003. **20**(2): p. 169-76.
 147. Kawaii, S., et al., *Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits*. *J Agric Food Chem*, 1999. **47**(9): p. 3565-71.
 148. Walgren, R.A. and T. Walle, *The influence of plasma binding on absorption/exsorption in the Caco-2 model of human intestinal absorption*. *J Pharm Pharmacol*, 1999. **51**(9): p. 1037-40.
 149. Saeki, K., et al., *Apoptosis-inducing activity of polyphenol compounds derived from tea catechins in human histiolytic lymphoma U937 cells*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999. **63**(3): p. 585-7.
 150. Konsoula, R. and F.A. Barile, *Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells*. *Toxicol In Vitro*, 2005. **19**(5): p. 675-84.
 151. Abdillahi, H.S., et al., *Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African Podocarpus species*. *J Ethnopharmacol*, 2012. **139**(3): p. 728-38.
 152. Babich, H. and E. Borenfreund, *Cytotoxic effects of food additives and pharmaceuticals on cells in culture as determined with the neutral red assay*. *J Pharm Sci*, 1990. **79**(7): p. 592-4.
 153. Weyermann, J., D. Lochmann, and A. Zimmer, *A practical note on the use of cytotoxicity assays*. *Int J Pharm*, 2005. **288**(2): p. 369-76.
 154. Repetto, G., A. del Peso, and J.L. Zurita, *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(7): p. 1125-31.
 155. Yamashita, S., et al., *Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **10**(3): p. 195-204.
 156. Hosoya, K.I., K.J. Kim, and V.H. Lee, *Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers*. *Pharm Res*, 1996. **13**(6): p. 885-90.

-
157. Zhao, J.Y., et al., *Modulation of multidrug resistance gene expression by dexamethasone in cultured hepatoma cells*. *Endocrinology*, 1993. **133**(2): p. 521-8.
 158. Da Violante, G., et al., *Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures*. *Biol Pharm Bull*, 2002. **25**(12): p. 1600-3.
 159. Zemann, N., et al., *Differentiation- and polarization-dependent zinc tolerance in Caco-2 cells*. *Eur J Nutr*, 2011. **50**(5): p. 379-86.
 160. Maares, M., et al., *The impact of apical and basolateral albumin on intestinal zinc resorption in the Caco-2/HT-29-MTX co-culture model*. *Metallomics*, 2018. **10**(7): p. 979-991.
 161. Palm, K., et al., *Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **291**(2): p. 435-43.
 162. Fallingborg, J., et al., *pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1989. **3**(6): p. 605-13.
 163. Boisset, M., et al., *Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and in vivo: importance of drug ionisation in the in vitro prediction of in vivo absorption*. *Eur J Pharm Sci*, 2000. **10**(3): p. 215-24.
 164. Takahama, U. and S. Hirota, *Inhibition of buckwheat starch digestion by the formation of starch/bile salt complexes: possibility of its occurrence in the intestine*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(11): p. 6277-83.
 165. Mallory, A., et al., *Patterns of bile acids and microflora in the human small intestine. I. Bile acids*. *Gastroenterology*, 1973. **64**(1): p. 26-33.
 166. Xiao, L., et al., *Transporter-Targeted Bile Acid-Camptothecin Conjugate for Improved Oral Absorption*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2019. **67**(10): p. 1082-1087.
 167. Enright, E.F., et al., *Gut Microbiota-Mediated Bile Acid Transformations Alter the Cellular Response to Multidrug Resistant Transporter Substrates in Vitro: Focus on P-glycoprotein*. *Mol Pharm*, 2018. **15**(12): p. 5711-5727.
 168. Alfaro-Viquez, E., et al., *An extract from date palm fruit (Phoenix dactylifera) acts as a co-agonist ligand for the nuclear receptor FXR and differentially modulates FXR target-gene expression in vitro*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0190210.
 169. Bermudez-Soto, M.J., et al., *Up-regulation of tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice*. *J Nutr Biochem*, 2007. **18**(4): p. 259-71.
 170. Kudera, T., et al., *In Vitro Selective Growth-Inhibitory Activities of Phytochemicals, Synthetic Phytochemical Analogs, and Antibiotics against Diarrheagenic/Probiotic Bacteria and Cancer/Normal Intestinal Cells*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020. **13**(9).
 171. Lesjak, M., et al., *Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102900.
 172. Lesjak, M., et al., *Quercetin inhibits intestinal non-haem iron absorption by regulating iron metabolism genes in the tissues*. *Eur J Nutr*, 2019. **58**(2): p. 743-753.
 173. Aherne, S.A. and N.M. O'Brien, *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*. *Nutrition*, 2002. **18**(1): p. 75-81.
 174. Wang, X.D., et al., *Permeation of astilbin and taxifolin in Caco-2 cell and their effects on the P-gp*. *Int J Pharm*, 2009. **378**(1-2): p. 1-8.
 175. Ben Rahal, N., et al., *Supercritical CO(2) extraction of oil, fatty acids and flavonolignans from milk thistle seeds: Evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities in Caco-2 cells*. *Food Chem Toxicol*, 2015. **83**: p. 275-82.

-
176. Perez-Sanchez, A., et al., *Intestinal Permeability Study of Clinically Relevant Formulations of Silibinin in Caco-2 Cell Monolayers*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(7).
177. Gonzalez-Sarrias, A., et al., *Gene expression, cell cycle arrest and MAPK signalling regulation in Caco-2 cells exposed to ellagic acid and its metabolites, urolithins*. *Mol Nutr Food Res*, 2009. **53**(6): p. 686-98.
178. Gonzalez-Sarrias, A., et al., *Phase-II metabolism limits the antiproliferative activity of urolithins in human colon cancer cells*. *Eur J Nutr*, 2014. **53**(3): p. 853-64.
179. Gimenez-Bastida, J.A., et al., *The gut microbiota metabolite urolithin A, but not other relevant urolithins, induces p53-dependent cellular senescence in human colon cancer cells*. *Food Chem Toxicol*, 2020. **139**: p. 111260.
180. Kim, J.A., et al., *NF-kappaB inhibitors from Brucea javanica exhibiting intracellular effects on reactive oxygen species*. *Anticancer Res*, 2010. **30**(9): p. 3295-300.
181. Song, Q., et al., *Enhanced uptake and transport of (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate in niosomal formulation by human intestinal Caco-2 cells*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 2157-65.
182. Akagawa, M., T. Shigemitsu, and K. Suyama, *Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003. **67**(12): p. 2632-40.
183. Chai, P.C., L.H. Long, and B. Halliwell, *Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **304**(4): p. 650-4.
184. Plochmann, K., et al., *Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **460**(1): p. 1-9.
185. Schweigert, N., A.J. Zehnder, and R.I. Eggen, *Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals*. *Environ Microbiol*, 2001. **3**(2): p. 81-91.
186. Actis-Goretta, L., et al., *Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines*. *J Nutr Biochem*, 2008. **19**(12): p. 797-808.
187. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1 Suppl): p. 230S-242S.
188. Sehm, J., J. Polster, and M.W. Pfaffl, *Effects of varied EGCG and (+)-catechin concentrations on proinflammatory cytokines mrna expression in cona-stimulated primary white blood cell cultures*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(17): p. 6907-11.
189. Cseh, R. and R. Benz, *Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change*. *Biophys J*, 1999. **77**(3): p. 1477-88.
190. Garcia-Villalba, R., J.C. Espin, and F.A. Tomas-Barberan, *Chromatographic and spectroscopic characterization of urolithins for their determination in biological samples after the intake of foods containing ellagitannins and ellagic acid*. *J Chromatogr A*, 2016. **1428**: p. 162-75.
191. Sang, S., et al., *Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(24): p. 9478-84.
192. Xiao, J. and P. Hogger, *Stability of dietary polyphenols under the cell culture conditions: avoiding erroneous conclusions*. *J Agric Food Chem*, 2015. **63**(5): p. 1547-57.
193. Walle, T., T.S. Vincent, and U.K. Walle, *Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(10): p. 1603-10.

-
194. Kurlbaum, M. and P. Hogger, *Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP)*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **54**(1): p. 127-32.
 195. Zhu, Q.Y., et al., *Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(6): p. 1700-5.
 196. Spencer, J.P., et al., *Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(1): p. 236-41.
 197. Rios, L.Y., et al., *Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(5): p. 1106-10.
 198. Mena, P., et al., *Gastrointestinal stability of urolithins: an in vitro approach*. Eur J Nutr, 2017. **56**(1): p. 99-106.
 199. Gimenez-Bastida, J.A., et al., *Ellagitannin metabolites, urolithin A glucuronide and its aglycone urolithin A, ameliorate TNF-alpha-induced inflammation and associated molecular markers in human aortic endothelial cells*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(5): p. 784-96.
 200. Bayle, M., et al., *Development and validation of a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of urolithin C in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study*. J Pharm Biomed Anal, 2016. **131**: p. 33-39.
 201. Feng, Y., et al., *An efficient in vitro and in vivo HPLC method for hydnocarpin in nanomicelles formulation*. Biomed Chromatogr, 2016. **30**(3): p. 432-9.
 202. Bilia, A.R., et al., *Stability of the constituents of Calendula, milk-thistle and passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS*. J Pharm Biomed Anal, 2002. **30**(3): p. 613-24.
 203. Tian, X.J., et al., *Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model*. Int J Pharm, 2009. **367**(1-2): p. 58-64.
 204. Alfei, S., B. Marengo, and G. Zuccari, *Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins?* Antioxidants (Basel), 2020. **9**(8).
 205. Youdim, K.A., B. Shukitt-Hale, and J.A. Joseph, *Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(11): p. 1683-93.
 206. Record, I.R., I.E. Dreosti, and J.K. McInerney, *Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture*. Br J Nutr, 2001. **85**(4): p. 459-64.
 207. Cos, P., et al., *Proanthocyanidins in health care: current and new trends*. Curr Med Chem, 2004. **11**(10): p. 1345-59.
 208. Croft, K.D., *The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 435-42.
 209. Halliwell, B., *Antioxidants and human disease: a general introduction*. Nutr Rev, 1997. **55**(1 Pt 2): p. S44-9; discussion S49-52.
 210. Pulido, R., L. Bravo, and F. Saura-Calixto, *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(8): p. 3396-402.
 211. Cai, Y.Z., et al., *Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants*. Life Sci, 2006. **78**(25): p. 2872-88.
 212. Saint-Cricq De Gaulejac, N., C. Provost, and N. Vivas, *Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(2): p. 425-31.

-
213. Fauconneau, B., et al., *Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests*. Life Sci, 1997. **61**(21): p. 2103-10.
214. Ou, B., et al., *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(11): p. 3122-8.
215. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
216. Pellegrini, N., et al., *Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays*. J Nutr, 2003. **133**(9): p. 2812-9.
217. Grimm, T., A. Schafer, and P. Hogger, *Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol)*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(6): p. 811-22.
218. Milic, N., et al., *Phytochemical characterization and effects on cell proliferation of Pinus nigra Arn. bark*. Arch Pharm (Weinheim), 2021: p. e2000416.
219. Shen, S., et al., *Phenolic Compositions and Antioxidant Activities Differ Significantly among Sorghum Grains with Different Applications*. Molecules, 2018. **23**(5).
220. Shah, M., et al., *Synthesis of bio-mediated silver nanoparticles from Silybum marianum and their biological and clinical activities*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020. **112**: p. 110889.
221. Valentova, K., et al., *Sulfated Metabolites of Flavonolignans and 2,3-Dehydroflavonolignans: Preparation and Properties*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
222. Reddy, S.V., et al., *Free radical scavenging, enzyme inhibitory constituents from antidiabetic Ayurvedic medicinal plant Hydnocarpus wightiana Blume*. Phytother Res, 2005. **19**(4): p. 277-81.
223. Pfundstein, B., et al., *Pilot walnut intervention study of urolithin bioavailability in human volunteers*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(42): p. 10264-73.
224. Bialonska, D., et al., *Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(21): p. 10181-6.
225. Ishimoto, H., et al., *In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(19): p. 5901-4.
226. Kallio, T., et al., *Urolithins display both antioxidant and pro-oxidant activities depending on assay system and conditions*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(45): p. 10720-9.
227. Tomas-Barberan, F.A., et al., *Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status*. Mol Nutr Food Res, 2017. **61**(1).
228. Henning, S.M., et al., *Strawberry consumption is associated with increased antioxidant capacity in serum*. J Med Food, 2010. **13**(1): p. 116-22.
229. Prymont-Przyminska, A., et al., *Addition of strawberries to the usual diet increases postprandial but not fasting non-urate plasma antioxidant activity in healthy subjects*. J Clin Biochem Nutr, 2016. **59**(3): p. 191-198.
230. Natoli, M., et al., *Good Caco-2 cell culture practices*. Toxicol In Vitro, 2012. **26**(8): p. 1243-6.
231. Lentz, K.A., et al., *Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system*. Int J Pharm, 2000. **200**(1): p. 41-51.

-
232. Warriar, A., H. Gunosewoyo, and A. Crowe, *Efflux transporters and tight junction expression changes in human gastrointestinal cell lines cultured in defined medium vs serum supplemented medium*. *Life Sci*, 2018. **207**: p. 138-144.
233. Natoli, M., et al., *Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(6): p. 1531-43.
234. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 736-49.
235. Liang, E., K. Chessic, and M. Yazdanian, *Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model*. *J Pharm Sci*, 2000. **89**(3): p. 336-45.
236. Chong, S., S.A. Dando, and R.A. Morrison, *Evaluation of Biocoat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity*. *Pharm Res*, 1997. **14**(12): p. 1835-7.
237. Yamashita, S., et al., *New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system*. *J Pharm Sci*, 2002. **91**(3): p. 669-79.
238. Cai, Y., et al., *Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2014. **70**(2): p. 175-81.
239. Sevin, E., et al., *Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2013. **68**(3): p. 334-9.
240. Tan, H.Y., et al., *A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies*. *PLoS One*, 2018. **13**(5): p. e0197101.
241. Stormer, E., et al., *Methadone inhibits rhodamine123 transport in Caco-2 cells*. *Drug Metab Dispos*, 2001. **29**(7): p. 954-6.
242. Wakuda, H., et al., *Highly sensitive measurement of P-glycoprotein-mediated transport activity in Caco-2 cells*. *Biol Pharm Bull*, 2010. **33**(7): p. 1238-41.
243. Troutman, M.D. and D.R. Thakker, *Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells*. *Pharm Res*, 2003. **20**(8): p. 1192-9.
244. Mukherjee, T., et al., *Transepithelial electrical resistance is not a reliable measurement of the Caco-2 monolayer integrity in Transwell*. *Drug Deliv*, 2004. **11**(1): p. 11-8.
245. Fernandes, I., et al., *A new approach on the gastric absorption of anthocyanins*. *Food Funct*, 2012. **3**(5): p. 508-16.
246. Deferme, S., et al., *P-glycoprotein attenuating effect of human intestinal fluid*. *Pharm Res*, 2003. **20**(6): p. 900-3.
247. Lu, S., et al., *Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes*. *J Pharm Sci*, 1996. **85**(3): p. 270-3.
248. van der Helm, M.W., et al., *Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organs-on-chips using impedance spectroscopy*. *Lab Chip*, 2019. **19**(3): p. 452-463.
249. Mathieu, F., et al., *Influence of different calcic antagonists on the Caco-2 cell monolayer integrity or "TEER, a measurement of toxicity?"*. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2005. **30**(1-2): p. 85-90.
250. Konishi, Y., K. Hagiwara, and M. Shimizu, *Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in in vitro evaluation of phenolic acid availability*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002. **66**(11): p. 2449-57.

-
251. Walgren, R.A., U.K. Walle, and T. Walle, *Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells*. *Biochem Pharmacol*, 1998. **55**(10): p. 1721-7.
252. Akbari, P., et al., *Galacto-oligosaccharides Protect the Intestinal Barrier by Maintaining the Tight Junction Network and Modulating the Inflammatory Responses after a Challenge with the Mycotoxin Deoxynivalenol in Human Caco-2 Cell Monolayers and B6C3F1 Mice*. *J Nutr*, 2015. **145**(7): p. 1604-13.
253. Dunkoksung, W., N. Vardhanabhuti, and S. Jianmongkol, *Potential P-glycoprotein-mediated herb-drug interaction of phyllanthin at the intestinal absorptive barrier*. *J Pharm Pharmacol*, 2019. **71**(2): p. 213-219.
254. Gao, Y., et al., *Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively*. *Toxins (Basel)*, 2017. **10**(1).
255. Sumsakul, W. and K. Na-Bangchang, *Permeability of plumbagin across human intestinal cell in vitro*. *Arch Pharm Res*, 2016. **39**(3): p. 380-9.
256. Antoine, D., et al., *Biorelevant media resistant co-culture model mimicking permeability of human intestine*. *Int J Pharm*, 2015. **481**(1-2): p. 27-36.
257. Fossati, L., et al., *Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs*. *Int J Pharm*, 2008. **360**(1-2): p. 148-55.
258. Vissenaekens, H., et al., *The response of five intestinal cell lines to anoxic conditions in vitro*. *Biol Cell*, 2019. **111**(9): p. 232-244.
259. Zeitouni, N.E., et al., *Measuring oxygen levels in Caco-2 cultures*. *Hypoxia (Auckl)*, 2015. **3**: p. 53-66.
260. Jalili-Firoozinezhad, S., et al., *A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip*. *Nat Biomed Eng*, 2019. **3**(7): p. 520-531.
261. Chen, H.J., et al., *Taxifolin Resensitizes Multidrug Resistance Cancer Cells via Uncompetitive Inhibition of P-Glycoprotein Function*. *Molecules*, 2018. **23**(12).
262. Doehmer, J., et al., *Assessment of drug-drug interaction for silymarin*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(3): p. 610-7.
263. Mao, X., et al., *Transport of Corilagin, Gallic Acid, and Ellagic Acid from Fructus Phyllanthi Tannin Fraction in Caco-2 Cell Monolayers*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016. **2016**: p. 9205379.
264. Garcia-Villalba, R., et al., *Gastrointestinal Simulation Model TWIN-SHIME Shows Differences between Human Urolithin-Metabotypes in Gut Microbiota Composition, Pomegranate Polyphenol Metabolism, and Transport along the Intestinal Tract*. *J Agric Food Chem*, 2017. **65**(27): p. 5480-5493.
265. 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**(3): p. 177-84.
266. Rapposelli, S., et al., *Development of classification models for identifying "true" P-glycoprotein (P-gp) inhibitors through inhibition, ATPase activation and monolayer efflux assays*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(6): p. 6924-43.
267. Schmitt, U., et al., *Cyclosporine A (CsA) affects the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the atypical antipsychotic amisulpride probably via inhibition of P-glycoprotein (P-gp)*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006. **113**(7): p. 787-801.
268. Pauli-Magnus, C., et al., *Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **293**(2): p. 376-82.
269. Baumert, C. and A. Hilgeroth, *Recent advances in the development of P-gp inhibitors*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. **9**(4): p. 415-36.

-
270. Narang, V.S., et al., *Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(2): p. C440-50.
271. Griffiths, N.M., B.H. Hirst, and N.L. Simmons, *Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?* J Pharmacol Exp Ther, 1994. **269**(2): p. 496-502.
272. Cavet, M.E., M. West, and N.L. Simmons, *Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(8): p. 1567-78.
273. Park, M.S., H. Okochi, and L.Z. Benet, *Is Ciprofloxacin a Substrate of P-glycoprotein?* Arch Drug Inf, 2011. **4**(1): p. 1-9.
274. Jager, H., et al., *Transport of alkaloids from Echinacea species through Caco-2 monolayers*. Planta Med, 2002. **68**(5): p. 469-71.
275. Bian, Y., et al., *Protective Effect of Kaempferol on LPS-Induced Inflammation and Barrier Dysfunction in a Coculture Model of Intestinal Epithelial Cells and Intestinal Microvascular Endothelial Cells*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(1): p. 160-167.
276. Denis, M.C., et al., *Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53725.
277. Guo, H., et al., *Kuwanon G Preserves LPS-Induced Disruption of Gut Epithelial Barrier In Vitro*. Molecules, 2016. **21**(11).
278. Nallathambi, R., et al., *Proanthocyanidin-Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells*. Nutrients, 2020. **12**(6).
279. Hirotani, Y., et al., *Protective effects of lactoferrin against intestinal mucosal damage induced by lipopolysaccharide in human intestinal Caco-2 cells*. Yakugaku Zasshi, 2008. **128**(9): p. 1363-8.
280. Kaulmann, A., et al., *Inflammation related responses of intestinal cells to plum and cabbage digesta with differential carotenoid and polyphenol profiles following simulated gastrointestinal digestion*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(5): p. 992-1005.
281. Mastrogiovanni, F., et al., *Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants*. Nutrients, 2019. **11**(3).
282. Silva, A.M., et al., *Thymus zygis subsp. zygis an Endemic Portuguese Plant: Phytochemical Profiling, Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Activities*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(6).
283. Volpe, D.A., *Permeability classification of representative fluoroquinolones by a cell culture method*. AAPS J, 2004. **6**(2): p. 1-6.
284. Abuznait, A.H., S.G. Patrick, and A. Kaddoumi, *Exposure of LS-180 cells to drugs of diverse physicochemical and therapeutic properties up-regulates P-glycoprotein expression and activity*. J Pharm Pharm Sci, 2011. **14**(2): p. 236-48.
285. Ballent, M., et al., *P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: gene expression and transport efflux activity*. J Vet Pharmacol Ther, 2013. **36**(6): p. 576-82.
286. Patel, J., et al., *In vitro interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3A4 activity*. Am J Ther, 2004. **11**(4): p. 262-77.
287. Lee, C.K. and J.S. Choi, *Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats*. Pharmacology, 2010. **85**(6): p. 350-6.

-
288. Oda, K. and T. Murakami, *Pharmacokinetic interaction of green tea beverage containing cyclodextrins and high concentration catechins with P-glycoprotein substrates in LLC-GA5-COL 150 cells in vitro and in the small intestine of rats in vivo*. *J Pharm Pharmacol*, 2017. **69**(12): p. 1736-1744.
289. Satonaka, H., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate Down-regulates Doxorubicin-induced Overexpression of P-glycoprotein Through the Coordinate Inhibition of PI3K/Akt and MEK/ERK Signaling Pathways*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(11): p. 6071-6077.
290. Dorcakova, A., et al., *Differential effects of the enantiomers of tamsulosin and tolterodine on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2017. **390**(1): p. 49-59.
291. Zhu, C.J., et al., *Stereoselective Regulation of P-gp Activity by Clausenamide Enantiomers in Caco-2, KB/KBv and Brain Microvessel Endothelial Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0135866.
292. He, Y., Y. Liu, and S. Zeng, *Stereoselective and multiple carrier-mediated transport of cetirizine across Caco-2 cell monolayers with potential drug interaction*. *Chirality*, 2010. **22**(7): p. 684-92.
293. Chambers, C.S., K. Valentova, and V. Kren, *"Non-Taxifolin" Derived Flavonolignans: Phytochemistry and Biology*. *Curr Pharm Des*, 2015. **21**(38): p. 5489-500.
294. Huang, G., et al., *Unconventional application of the Mitsunobu reaction: Selective flavonolignan dehydration yielding hydnocarpins*. *Beilstein J Org Chem*, 2016. **12**: p. 662-9.
295. Bueno Perez, L., et al., *Potentiating effect of the flavonolignan (-)-hydnocarpin in combination with vincristine in a sensitive and P-gp-expressing acute lymphoblastic leukemia cell line*. *Phytother Res*, 2013. **27**(11): p. 1735-8.
296. Chae, H.W., et al., *Effect of ion-pair formation with bile salts on the in vitro cellular transport of berberine*. *Arch Pharm Res*, 2008. **31**(1): p. 103-10.
297. Alminger, M., et al., *In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility*. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2014. **13**(4): p. 413-436.
298. Naumann, S., et al., *Mechanisms of Interactions between Bile Acids and Plant Compounds-A Review*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(18).
299. Ogawa, K., et al., *Interaction between Tea Polyphenols and Bile Acid Inhibits Micellar Cholesterol Solubility*. *J Agric Food Chem*, 2016. **64**(1): p. 204-9.
300. Ngamukote, S., et al., *Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed*. *Molecules*, 2011. **16**(6): p. 5054-61.
301. Hakala, K.S., et al., *Development of LC/MS/MS methods for cocktail dosed Caco-2 samples using atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization*. *Anal Chem*, 2003. **75**(21): p. 5969-77.
302. Li, S., et al., *Transport of Flavanolic Monomers and Procyanidin Dimer A2 across Human Adenocarcinoma Stomach Cells (MKN-28)*. *J Agric Food Chem*, 2019.
303. Alsenz, J. and E. Haenel, *Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis*. *Pharm Res*, 2003. **20**(12): p. 1961-9.
304. Hwang, Y.H., et al., *Inhibitory Effects of Multiple-Dose Treatment with Baicalein on the Pharmacokinetics of Ciprofloxacin in Rats*. *Phytother Res*, 2017. **31**(1): p. 69-74.
305. Haslam, I.S., et al., *Intestinal ciprofloxacin efflux: the role of breast cancer resistance protein (ABCG2)*. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(12): p. 2321-8.

-
306. Kristl, A., *Membrane permeability in the gastrointestinal tract: the interplay between microclimate pH and transporters*. Chem Biodivers, 2009. **6**(11): p. 1923-32.
307. Zhang, Y., et al., *Inhibitory Effect of Berberine on Broiler P-glycoprotein Expression and Function: In Situ and In Vitro Studies*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
308. Gonzalez-Sarrias, A., et al., *The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP)*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(18): p. 4352-9.
309. Kawahara, I., et al., *The Impact of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) on Drug Transport Across Caco-2 Cell Monolayers*. Drug Metab Dispos, 2020. **48**(6): p. 491-498.
310. Cisneros-Zevallos, L., W.Y. Bang, and C. Delgadillo-Puga, *Ellagic Acid and Urolithins A and B Differentially Regulate Fat Accumulation and Inflammation in 3T3-L1 Adipocytes While Not Affecting Adipogenesis and Insulin Sensitivity*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
311. Belliard, A.M., et al., *Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells*. J Pharm Sci, 2004. **93**(6): p. 1524-36.
312. Belliard, A.M., et al., *Effect of hr-IL2 treatment on intestinal P-glycoprotein expression and activity in Caco-2 cells*. J Pharm Pharmacol, 2002. **54**(8): p. 1103-9.
313. Verstraelen, J. and S. Reichl, *Upregulation of P-glycoprotein expression by ophthalmic drugs in different corneal in-vitro models*. J Pharm Pharmacol, 2015. **67**(5): p. 605-15.
314. Wakuda, H., et al., *Effects of Anticholinergic Drugs Used for the Therapy of Overactive Bladder on P-Glycoprotein Activity*. Biol Pharm Bull, 2019. **42**(12): p. 1996-2001.
315. Yoo, H.H., et al., *Effects of diosmin, a flavonoid glycoside in citrus fruits, on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal Caco-2 cells*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(18): p. 7620-5.
316. Chen, S.W., et al., *Protective effect of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial tight junction injury in caco-2 cell monolayers*. Inflammation, 2015. **38**(1): p. 375-83.
317. Hering, N.A., et al., *The Punicalagin Metabolites Ellagic Acid and Urolithin A Exert Different Strengthening and Anti-Inflammatory Effects on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Function In Vitro*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 610164.
318. Singh, R., et al., *Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 89.
319. Piwowarski, J.P., et al., *Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(11): p. 2168-77.
320. Han, Q.A., et al., *Urolithin A attenuates ox-LDL-induced endothelial dysfunction partly by modulating microRNA-27 and ERK/PPAR-gamma pathway*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(9): p. 1933-43.
321. VanGuilder, H.D., K.E. Vrana, and W.M. Freeman, *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*. Biotechniques, 2008. **44**(5): p. 619-26.
322. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
323. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ, 2005. **29**(3): p. 151-9.

-
324. Janning, W., Knust, E., *Genetik*. 2008, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
325. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
326. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. Biotechnology (N Y), 1992. **10(4)**: p. 413-7.
327. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39(1)**: p. 75-85.
328. Jansohn, M., Rothhämel, S., *Gentechnische Methoden*. 2012, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
329. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25(2)**: p. 169-93.
330. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34(3)**: p. 597-601.
331. Pabinger, S., et al., *A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data*. Biomol Detect Quantif, 2014. **1(1)**: p. 23-33.
332. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55(4)**: p. 611-22.
333. Dorak, M.T., *Real-time PCR*. 2006, Abingdon: Taylor & Francis Group.
334. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. **15(3)**: p. 155-66.
335. Derveaux, S., J. Vandesompele, and J. Hellemans, *How to do successful gene expression analysis using real-time PCR*. Methods, 2010. **50(4)**: p. 227-30.
336. Gudnason, H., et al., *Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature*. Nucleic Acids Res, 2007. **35(19)**: p. e127.
337. Wilkening, S. and A. Bader, *Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model*. J Biomol Tech, 2004. **15(2)**: p. 107-11.
338. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25(4)**: p. 402-8.
339. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30(9)**: p. e36.
340. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3(7)**: p. RESEARCH0034.
341. Tricarico, C., et al., *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. Anal Biochem, 2002. **309(2)**: p. 293-300.
342. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6(4)**: p. 279-84.
343. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75(2-3)**: p. 291-5.
344. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
345. *Gene Database*. 12.5.2017]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

-
346. Genomics, E. *Oligo Analysis Tool*. 12.5.2017]; Available from: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis.aspx>.
347. Technologies, I.D. *OligoAnalyzer*. 12.5.2017]; Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
348. Pattyn, F., et al., *RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(1): p. 122-3.
349. Bar, T., M. Kubista, and A. Tichopad, *Validation of kinetics similarity in qPCR*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(4): p. 1395-406.
350. Ramakers, C., et al., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. *Neurosci Lett*, 2003. **339**(1): p. 62-6.
351. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. *Biotechnol Lett*, 2004. **26**(6): p. 509-15.
352. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
353. Tchorzewski, M., et al., *The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(2): p. 203-11.
354. Krzystek-Korpacka, M., et al., *Serum availability affects expression of common house-keeping genes in colon adenocarcinoma cell lines: implications for quantitative real-time PCR studies*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(6): p. 2503-2517.
355. Wang, L., et al., *Resveratrol Increases Anti-Proliferative Activity of Bestatin Through Downregulating P-Glycoprotein Expression Via Inhibiting PI3K/Akt/mTOR Pathway in K562/ADR Cells*. *J Cell Biochem*, 2016. **117**(5): p. 1233-9.
356. Borska, S., et al., *Classical and atypical resistance of cancer cells as a target for resveratrol*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(3): p. 1562-8.
357. Wang, Z., et al., *Resveratrol induces AMPK-dependent MDR1 inhibition in colorectal cancer HCT116/L-OHP cells by preventing activation of NF-kappaB signaling and suppressing cAMP-responsive element transcriptional activity*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(12): p. 9499-510.
358. Borska, S., et al., *Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin*. *Molecules*, 2010. **15**(2): p. 857-70.
359. Zhao, B.X., et al., *Grape seed procyanidin reversal of p-glycoprotein associated multi-drug resistance via down-regulation of NF-kappaB and MAPK/ERK mediated YB-1 activity in A2780/T cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71071.
360. Lu, Y., et al., *Reversal Effects of Bound Polyphenol from Foxtail Millet Bran on Multidrug Resistance in Human HCT-8/Fu Colorectal Cancer Cell*. *J Agric Food Chem*, 2018. **66**(20): p. 5190-5199.
361. Awortwe, C., et al., *Interaction of Phytochemicals of Echinacea purpurea with ABCB1 and ABCG2 Efflux Transporters*. *Mol Pharm*, 2021. **18**(4): p. 1622-1633.
362. Yoganathan, S., et al., *Ellagic Acid and Schisandrins: Natural Biaryl Polyphenols with Therapeutic Potential to Overcome Multidrug Resistance in Cancer*. *Cells*, 2021. **10**(2).
363. Hsu, P.W., et al., *Potential risk of mulberry-drug interaction: modulation on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A*. *J Agric Food Chem*, 2013. **61**(18): p. 4464-9.
364. Shamir, M., et al., *SnapShot: Timescales in Cell Biology*. *Cell*, 2016. **164**(6): p. 1302-1302 e1.

-
365. Li, L., et al., *Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux in Caco-2 Cells by Phytic Acid*. J Agric Food Chem, 2018. **66**(4): p. 988-998.
366. Rusli, N., et al., *The inhibitory effects of mitragynine on P-glycoprotein in vitro*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2019. **392**(4): p. 481-496.
367. Romiti, N., G. Tramonti, and E. Chieli, *Influence of different chemicals on MDR-1 P-glycoprotein expression and activity in the HK-2 proximal tubular cell line*. Toxicol Appl Pharmacol, 2002. **183**(2): p. 83-91.
368. Li, Q., et al., *Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines*. Pharm Res, 2003. **20**(8): p. 1119-24.
369. Salphati, L. and L.Z. Benet, *Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P450 3A inducers in male and female rat livers*. Biochem Pharmacol, 1998. **55**(4): p. 387-95.
370. Dobiasova, S., et al., *Multidrug Resistance Modulation Activity of Silybin Derivatives and Their Anti-inflammatory Potential*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(5).
371. Choi, E.H., et al., *Impact of Bioconversion of Gallated Catechins and Flavonol Glycosides on Bioaccessibility and Intestinal Cellular Uptake of Catechins*. J Agric Food Chem, 2019. **67**(8): p. 2331-2339.
372. Liang, G., et al., *Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer*. Int J Oncol, 2010. **37**(1): p. 111-23.
373. Wang, Y., et al., *Using Caffeine and Free Amino Acids To Enhance the Transepithelial Transport of Catechins in Caco-2 Cells*. J Agric Food Chem, 2019. **67**(19): p. 5477-5485.
374. Akamine, Y., *[Determinants of the stereoselective pharmacokinetics of fexofenadine]*. Yakugaku Zasshi, 2015. **135**(3): p. 473-81.
375. Zhou, Q., L.S. Yu, and S. Zeng, *Stereoselectivity of chiral drug transport: a focus on enantiomer-transporter interaction*. Drug Metab Rev, 2014. **46**(3): p. 283-90.
376. Shen, S., Y. He, and S. Zeng, *Stereoselective regulation of MDR1 expression in Caco-2 cells by cetirizine enantiomers*. Chirality, 2007. **19**(6): p. 485-90.
377. Bayle, M., et al., *The ellagitannin metabolite urolithin C is a glucose-dependent regulator of insulin secretion through activation of L-type calcium channels*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(20): p. 4065-4078.
378. Sawatzky, E., et al., *A Novel Way To Radiolabel Human Butyrylcholinesterase for Positron Emission Tomography through Irreversible Transfer of the Radiolabeled Moiety*. ChemMedChem, 2016. **11**(14): p. 1540-50.
379. *Nachweis von Mykoplasmen mit Lookout Mycoplasma Detection Kit*. Sigma Aldrich, 2016.
380. *Europäisches Arzneibuch*. Band 3 Monographien C-L, amtliche deutsche Ausgabe. Vol. 10. 2020, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
381. Sharungbam, G.D., et al., *Identification of stable endogenous control genes for transcriptional profiling of photon, proton and carbon-ion irradiated cells*. Radiat Oncol, 2012. **7**: p. 70.
382. *Nucleotide Database*. 12.5.2017]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.
383. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *Primer-BLAST*. 12.5.2017]; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome.
384. Research, W.I.f.B. *Primer3 web version 4.1.0*. 12.5.2017]; Available from: <http://primer3.ut.ee/>.

-
385. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *BLAST*. 12.5.2017]; Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
386. Lefever, S., et al., *RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(Database issue): p. D942-5.

Erklärung

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich die Dissertation

„Analyse des Einflusses ausgewählter Polyphenole auf Funktionalität und Genexpression von p-Glykoprotein im CaCo-II-Zellkulturmodell“

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Florian Lang