

Metabolomische Untersuchung von Humanserum nach der Einnahme eines Kiefernextraktes (Pycnogenol®)



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Charlotte Beier

aus Würzburg

Würzburg 2023

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

.....

Gutachterinnen der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachterin

2. Gutachterin

Prüfer*innen des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüferin

2. Prüferin

3. Prüfer*in

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie

des Institutes für Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Högger für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die Betreuung meiner Doktorarbeit und die stetige Unterstützung bedanken. Im wahrsten Sinne des Wortes stand Ihre Tür jederzeit für alle Belange offen und auch in der Studierendenbetreuung haben Sie mir immer Ihr vollstes Vertrauen entgegengebracht und mir freie Hand gelassen. Vielen Dank, Frau Högger!

Mein Dank und meine Anerkennung gebührt natürlich auch den Proband*innen der Klinischen Studie, die bereit waren sich polyphenolfrei zu ernähren und sich Blut abnehmen zu lassen. Aus eigener Erfahrung kann ich sagen, dass die deutlichen Einschränkungen bei der Essenswahl nicht unbedingt für die beste Laune sorgen. Selbstverständlich möchte ich mich auch bei den Studienpartner*innen der Comenius Universität in Bratislava bedanken, die die Organisation vor Ort übernommen haben.

Danke sagen möchte ich auch Agi, Maria und Herrn Prof. Dr. Müller vom Metabolomics Core Unit des Biozentrums, die mir erste Messungen am qTOF ermöglicht haben und mich an das Thema Metabolomics herangeführt haben.

Ein Dankeschön geht zudem an Herrn Prof. Dr. Sörgel und an alle weiteren Mitarbeiter*innen des Instituts für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung in Heroldsberg für die Möglichkeit die Proben im Rahmen der Klinischen Studie zu vermessen. In diesem Kontext gilt mein Dank auch Herrn Dr. Schreiber von Sciex, der einige Male zur Unterstützung nach Würzburg oder Heroldsberg kam. Vielen Dank auch an Jonas für die gemeinsame Zeit dort und die eine oder andere Problembewältigung.

Für die Zusammenarbeit bei der Betreuung von KlinPharm und Pharmakotherapie möchte ich mich bei Linda, Bettina, Flo und Olli bedanken. Wir waren ein eingeschworenes Team und ich werde sicher unsere legendären Geschichten der Pharmakotherapie-Klausuren nicht vergessen.

Ein sehr großer Dank geht natürlich auch an alle Mitarbeiter*innen des Arbeitskreises für jegliche Hilfe und Zusammenarbeit während meiner Zeit dort, nämlich an Dr. Maike Scherf-Clavel, Dr. Stoyan Dirimanov, Andreas Pospiech, Linda Volpp, Jasmin Bayer, Arthur Felker, Theresa Häfner, Dr. Florian Lang, Christian Scherg und Roswitha Scheblein.

Bedanken möchte ich mich in gleicher Weise bei Prof. Dr. Oliver Scherf-Clavel und Bettina Gerner, Sebastian Zimmermann und Maximilian Stapf vom Arbeitskreis Scherf-Clavel. Olli, du warst immer bereit zu helfen und geduldig zu erklären, auch wenn man manchmal mit großen, unwissenden Augen vor dir saß. Vielen Dank dafür.

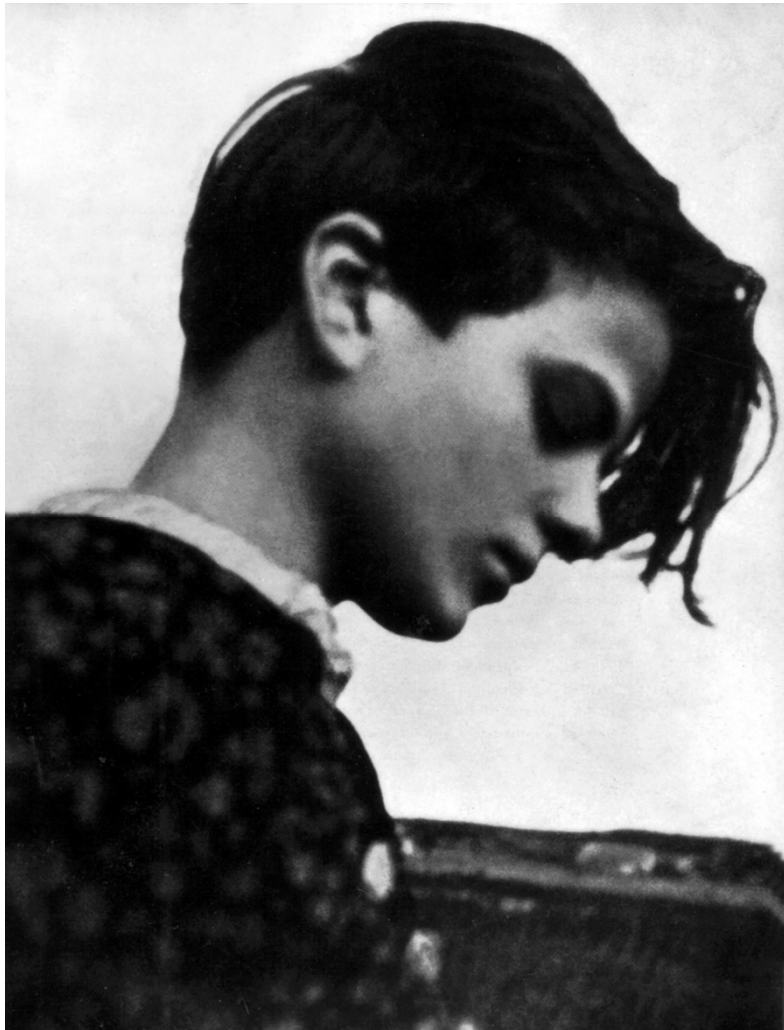
Bert, Lindi und Jasmin, ihr wart die besten Kolleg*innen, die ich mir habe wünschen und vorstellen können. Gemeinsam haben wir so viel gelacht, geweint, diskutiert, erlebt und tatsächlich auch gearbeitet. Egal ob Überschwemmung auf dem Flur, Weinwanderung in Randersacker oder unser Ausflug in den Europapark, ich konnte mich immer auf euch verlassen. Ihr musstet mich mehr als einmal nachhaltig überzeugen, dass ich bleibe und nicht verzweifle. Dabei habt ihr meinem Pessimismus stets getrotzt! Diese Zeit möchte ich auf keinen Fall missen, weil ich euch dadurch kennenlernen durfte. Es war mir eine große Freude!

Lindi, Jasmin, Bettina und Maike, unvergessen bleiben natürlich auch die zahlreichen Mädelsabende mit wildesten Batida de Coco-Mischungen, Nagellack, Bachelor und Co. Unsere Treffen waren jedes Mal ein echtes Highlight. Danke für die grandiose Zeit!

Besonders erwähnen möchte ich die Freundschaft zu Lindi und Jasmin. Ich konnte wirklich jederzeit auf euch und eure bedingungslose Unterstützung zählen, obwohl es manchmal bestimmt nicht einfach mit mir war. Ich werde immer an unsere gemeinsame Zeit zurückdenken, #polyphenolsforlife. DANKE für allesallesalles! Und wer hätte gedacht, dass ich durch dich und mit dir die geheime Mission Sport starte, Lindi.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Familie, Mama & Papa, Bebi & Dani und Ditz & Flo für den immensen Rückhalt während meiner Würzburger Zeit mit Höhen und Tiefen. Ihr habt mich unterstützt, motiviert und wart einfach für mich da. Immer.

„SO EIN HERRLICHER, SONNIGER TAG UND ICH MUSS GEHEN. [...] WAS LIEGT AN MEINEM TOD, WENN DURCH UNSER HANDELN TAUSENDE VON MENSCHEN AUFGERÜTTELT UND GEWECKT WERDEN.“



SOPHIE SCHOLL

* 09. Mai 1921 † 22. Februar 1943

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	5
1	Der polyphenolreiche Kiefernextrakt Pycnogenol	7
1.1	Polyphenole als Nahrungskomponenten	7
1.2	Herkunft, Gewinnung und Bestandteile von Pycnogenol	9
1.3	Bislang postulierte Wirkung von Pycnogenol in vivo	9
1.4	Pharmakokinetik von Polyphenolen	11
1.4.1	Resorption, Biozugänglichkeit und Bioverfügbarkeit	11
1.4.2	Hepatischer und enteraler Metabolismus	12
1.4.3	Verteilung und Elimination	14
1.4.4	Rolle des enteralen Mikrobioms	15
2	Bedeutung des Endothels bei pathophysiologischen Prozessen	19
2.1	Aufbau des Endothels und der Glycocalyx	19
2.2	Pathophysiologische Prozesse mit endothelialer Beteiligung	21
2.2.1	Endothel und Immunmodulation	21
2.2.2	Endothel bei Sepsis	22
2.2.3	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	23
2.2.4	Endothel, Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen	23
2.3	Endotheliale Permeabilität auf molekularer Ebene	24
3	Ziele der Arbeit	27
B	Allgemeiner Teil	29
1	Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro	31
1.1	Analyse von Lektinen in Pycnogenol	31
1.1.1	Hintergrund und Fragestellung	31
1.1.2	Ergebnisse	33
1.1.3	Diskussion	37
1.2	Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile auf die Atmungskette in vitro	38
1.2.1	Hintergrund und Fragestellung	38
1.2.2	Ergebnisse	40
1.2.3	Diskussion	42
2	Pharmakokinetische Studie mit oraler Mehrfachgabe von Pycnogenol	45
2.1	Diätvorgaben	45
2.2	Kollektiv der Studienteilnehmenden	45
2.3	Ablauf der Klinischen Studie und Probengewinnung	46
3	Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol	49
3.1	Bereits in Humanserum detektierte Analyten nach der Einnahme von Pycnogenol	49
3.2	Vorversuche	50
3.2.1	Probenvorbereitung	50
3.2.2	Quellenparameter und SWATH® windows	52
3.3	Ergebnisse	55
3.4	Diskussion	67

3.4.1	Polyphenolische Sulfatkonjugate.....	67
3.4.2	Bedeutung und Einfluss von Phase-II-Enzymen.....	68
3.4.3	Einfluss des enterohepatischen Kreislaufes	69
3.4.4	Stellenwert von Prä-Analytik und LC-MS-Bedingungen.....	69
3.4.5	Analytische Eigenschaften von Phase-II-Konjugaten.....	70
3.4.6	Grundsätzliches Vorgehen bei der Identifizierung von Unbekannten mittels UHPLC-qTOF-MS	71
3.4.7	Regioselektivität von Sulfotransferasen.....	72
3.4.8	Enteraler mikrobieller Metabolismus.....	74
3.4.9	Bioaktivität von Sulfatkonjugaten.....	75
3.4.10	Vergleich mit bisherigen Ergebnissen nach Pycnogenol-Einnahme	76
4	Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum.....	77
4.1	Schutz vor inflammatorischen Endothelschäden	77
4.1.1	Ex vivo-Modell.....	77
4.1.2	Ergebnisse der Vorversuche	78
4.1.3	Versuchsdurchführung	82
4.1.4	Ergebnisse der MTT-Assays	85
4.1.5	Abschließende Diskussion	87
4.2	Schutz der Zellbarriere vor Schäden durch TNF- α	89
4.2.1	Vorversuche mit 4 kDa FITC-Dextran.....	90
4.2.2	Versuchsdurchführung	91
4.2.3	Weiterführender Versuch und Diskussion.....	92
4.2.4	Ergebnisse der MTT-Assays	98
C	Experimenteller Teil	101
1	Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien.....	103
1.1	Reagenzien	103
1.2	Geräte und Instrumente	104
1.3	Materialien	105
2	Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro.....	107
2.1	Analyse von Lektinen in Pycnogenol	107
2.1.1	Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien.....	107
2.1.2	Hämagglutinations-Assay.....	109
2.1.3	Inhibition der Hämagglutination durch ausgewählte Saccharide.....	110
2.1.4	Isolierung eines Lektins aus Pycnogenol mittels Affinitätschromatographie.....	111
2.1.5	SDS-PAGE zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.....	114
2.2	Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Polyphenole auf die Atmungskette in vitro.....	116
2.2.1	Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien.....	116
2.2.2	Kultivierung humaner kolorektaler Adenokarzinomzellen (CaCo-II).....	117
2.2.3	Lumineszenz-Assay	120
3	Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol.....	123
3.1	Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien.....	123
3.1.1	Reagenzien.....	123

3.1.2	Geräte, Instrumente und Software	123
3.1.3	Materialien	124
3.2	Auswahl der geeigneten Probenvorbereitung für Humanserum	124
3.2.1	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)	124
3.2.2	Herstellung benötigter Lösungen	124
3.2.3	Ersatzmatrix.....	125
3.2.4	Standardvorgehen bei der Proteinfällung zur Probenvorbereitung	125
3.2.5	Überprüfung des Einflusses von Ameisensäure.....	126
3.2.6	Überprüfung des Einflusses des Extraktionsmittel-Volumens	127
3.3	Optimierung der Quellenparameter für die Massenspektrometrie und Ermittlung der SWATH® windows	127
3.3.1	Probenvorbereitung	127
3.3.2	Durchführung der Quellenparameter-Optimierung	128
3.3.3	Ermittlung der SWATH® windows	129
3.4	Analyse von Humanserum-Proben der Klinischen Studie	129
3.4.1	Probenvorbereitung	129
3.4.2	UHPLC-SWATH®-Methode.....	130
3.4.3	Regelmäßige Überprüfung der X500R-Systemperformance	131
3.4.4	Auswertung.....	132
4	Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum	133
4.1	Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien	133
4.1.1	Reagenzien	133
4.1.2	Geräte, Instrumente und Materialien.....	134
4.2	Kultivierung der Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) ...	134
4.2.1	Herstellung des Nährmediums.....	135
4.2.2	Gelatine-Beschichtung der Zellkulturgefäße	135
4.2.3	Kultivierung und Passagieren der HUVEC.....	135
4.3	Bestimmung des transendothelialen Widerstandes (TEER) zur Überprüfung der Integrität des HUVEC-Monolayers	136
4.4	Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Endothelintegrität.....	137
4.4.1	Herstellung häufig benötigter Lösungen.....	137
4.4.2	Vorversuche zur Zellzahl und Kulturzeit.....	137
4.4.3	Vorversuche zur Humanserum-Konzentration und zur Auswahl der inflammatorischen Stimuli	138
4.4.4	Vorversuch zur Verkürzung der Dauer der inflammatorischen Stimulation.....	138
4.4.5	Finale Versuchsdurchführung unter optimierten Bedingungen	139
4.4.6	Bestimmung des humanen Heparansulfats mittels ELISA	139
4.4.7	Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate mittels Bicinchoninsäure-Assay.....	140
4.5	Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Störung der Barrierefunktion des Endothels.....	140
4.5.1	Herstellung häufig benötigter Lösungen.....	140
4.5.2	Apikale Konzentration von FITC-Dextran im FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assay.....	141
4.5.3	Finale Versuchsdurchführung unter optimierten Bedingungen	142

4.5.4	Optimierung der Kultivierungsdauer, der inflammatorische Stimulation und der Permeabilitätsmessung	144
4.6	Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT-Assay	144
D	Tabellarischer Anhang.....	147
1	Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro	149
1.1	Detektion und Charakterisierung von Lektinen in Pycnogenol	149
1.1.1	Bradford-Assay vor Ultrafiltration.....	149
1.1.2	Bradford-Assay nach Ultrafiltration	149
1.2	Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Polyphenolen auf die Atmungskette in vitro.....	150
2	Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol.....	153
3	Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum.....	165
3.1	Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Endothelintegrität	165
3.1.1	Vorversuche	165
3.1.2	Versuchsdurchführung	169
3.1.3	Zellviabilität mittels MTT-Assay	170
3.2	Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Störung der Barrierefunktion des Endothels	171
3.2.1	Vorversuch zur apikalen FITC-Dextran-Konzentration.....	171
3.2.2	Versuchsdurchführung	172
3.2.3	Weiterführender Versuch.....	175
E	Zusammenfassung.....	181
1	Zusammenfassung.....	183
2	Summary.....	185
F	Abkürzungsverzeichnis	187
G	Literaturverzeichnis	193

A Einleitung

1 Der polyphenolreiche Kiefernrintenextrakt Pycnogenol

1.1 Polyphenole als Nahrungskomponenten

Polyphenole sind Substanzen mit einem phenolischen Grundgerüst, welches aus mindestens einem Aromaten mit einer unterschiedlichen Anzahl von Hydroxy-Substituenten besteht. Als sekundäre Naturstoffe kommen sie ubiquitär im Pflanzenreich vor und werden dementsprechend auch mit der Nahrung konsumiert [1]. Abhängig vom pflanzlichen Anteil der zugeführten Lebensmittel ist von einer täglichen Polyphenol-Aufnahme von etwa 1 g auszugehen [2, 3]. Sekundäre Pflanzenstoffe sind im Gegensatz zu Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten für das Zellwachstum bzw. die -entwicklung nicht-essentielle Metabolite. Dennoch haben sie wichtige Funktion für die Pflanze, wie beispielsweise die Abwehr von Fressfeinden oder das Anlocken von Insekten in Form von Duft- oder Farbstoffen [4]. Die Gruppe der Polyphenole ist sehr heterogen und kann anhand von strukturellen Merkmalen in Phenolsäuren, Stilbene und Lignane (Nicht-Flavonoide) und Flavonoide mit Flavan-Grundgerüst eingeteilt werden [5, 6]. Flavonoide, insbesondere Flavanole, liegen in der Pflanze meist als Glucose- und Rhamnose-Glycoside vor [7, 8], ebenso wie Benzoessäure-Derivate [9]. Zimtsäuren sind variabel verknüpft; sie gibt es gebunden an Cellulose, organische Säuren (z. B. Weinsäure), Zucker und anderen Sekundärstoffen [10]. Das natürliche Vorkommen von Polyphenolen ist sehr vielschichtig [1, 2, 8, 11-13]. Am weitesten verbreitet im Pflanzenreich und somit in der Nahrung sind Flavonole; größere Mengen Quercetin kommen in Zwiebeln, Grünkohl oder Lauch vor. Im Gegensatz dazu findet man Flavone deutlich seltener in z. B. Petersilie oder Getreide. Ebenfalls in Getreiden anzutreffen sind Zimtsäuren, aber auch in weiteren Früchten und diversen Gemüsesorten. Entsprechend des Namens ist die Kaffeesäure ein typischer Vertreter der Inhaltsstoffe von Kaffee. Flavanone sind oft in Zitrusfrüchten enthalten, Anthocyanidine als farbgebende Komponenten in Früchten wie Brombeeren und Kirschen sowie Blüten. Flavanole stellen charakteristische Bestandteile von grünem/schwarzem Tee, Wein und Schokolade dar. Als Flavanonol ist Taxifolin in Olivenöl, Zwiebeln und Zitrusfrüchten anzutreffen (Abbildung 1). Soja und Sojaprodukte gelten als typische Quellen für Isoflavone.

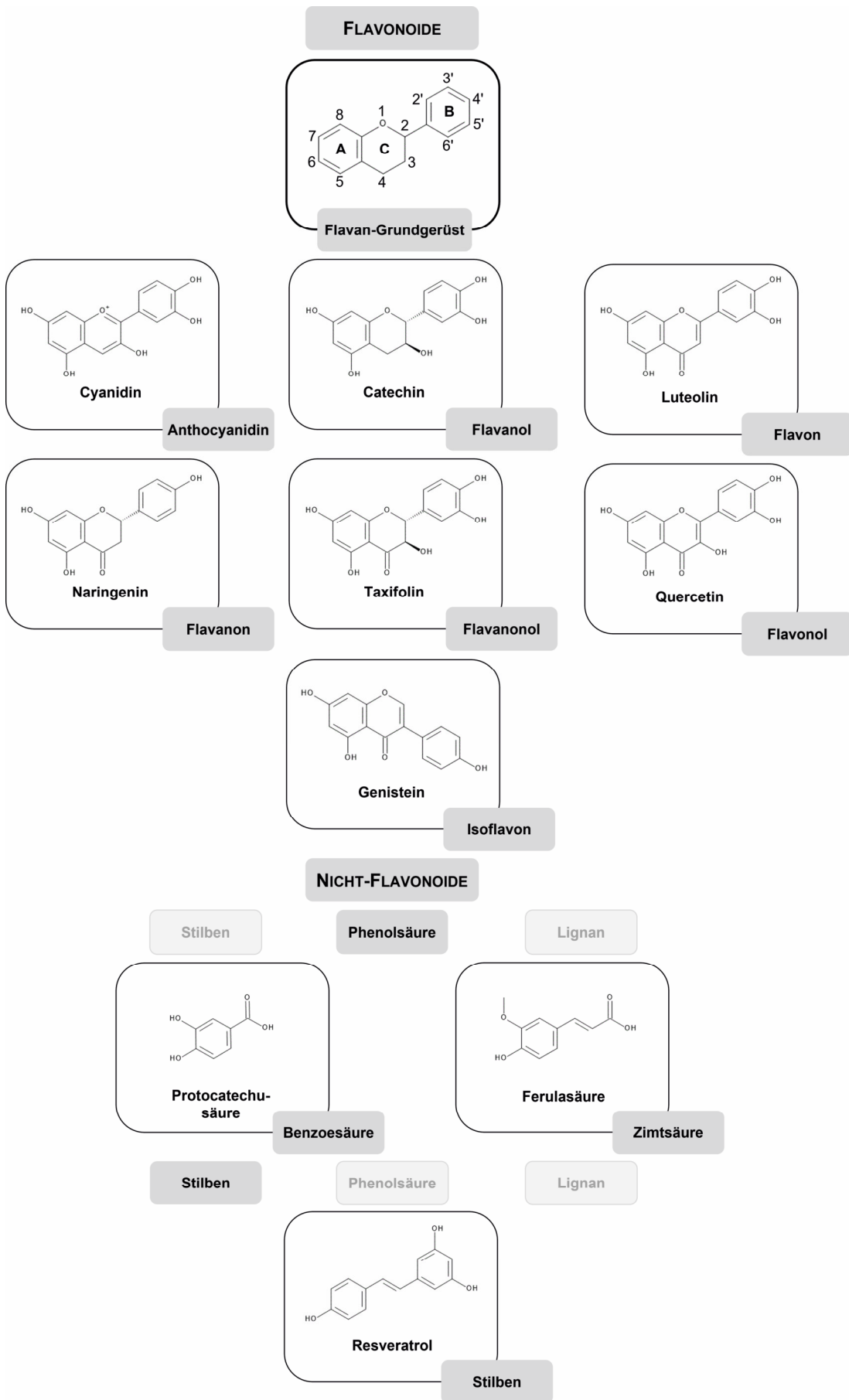


Abbildung 1: Einteilung Polyphenole anhand struktureller Merkmale mit exemplarischen Vertretern.

1.2 Herkunft, Gewinnung und Bestandteile von Pycnogenol

Pycnogenol ist ein polyphenolreicher Extrakt, der aus der frischen Rinde der Meeres-Kiefer (*Pinus pinaster*) gewonnen wird. Diese Kiefernart wird ausschließlich im Südwesten von Frankreich kultiviert. Pycnogenol ist ein eingetragenes, geschütztes Warenzeichen der Firma Horphag Research, Genf (Schweiz); Einfachheitshalber wird in der vorliegenden Arbeit auf das Warenzeichen verzichtet. Pycnogenol wird durch wässrig-ethanolische Extraktion der Rinde mit anschließender Sprühtrocknung gewonnen [14].

Der Extrakt ist im US-amerikanischen Arzneibuch (*USP*) als *Dietary supplement* (Nahrungsergänzungsmittel) monographiert und weltweit kommerziell erhältlich [15]. Die Einnahme von Pycnogenol gilt gemäß Hersteller nach Einteilung der amerikanischen Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde FDA als sicher (*generally recognized as safe*, GRAS). Je nach Anwendungsgebiet werden dabei Tagesdosen von 20 – 100 mg bei dauerhafter Einnahme empfohlen und sind bis auf hauptsächlich gastrointestinale Beschwerden und Kopfschmerzen verträglich.

Pycnogenol wird auf einen Gehalt von 70 ± 5 % Procyanidine standardisiert. Procyanidine sind oligomere Moleküle unterschiedlicher Kettenlänge bestehend aus (+)-Catechin- und (-)-Epicatechin-Monomeren [16]. Auf diesen charakteristischen Bestandteilen basiert der Name des Extraktes, der sich von den griechischen Wörtern *puknos* (kondensiert) und *genos* (Klasse) ableiten lässt. Ursprünglich wurde damit die Klasse der Flavan-3-ole (A1.1) in Form von kondensierten, also polymeren Flavanolen bezeichnet [17]. Weitere Inhaltsstoffe sind neben dem Flavanol-Monomer (+)-Catechin die Zimtsäure-Derivate Ferulasäure, Kaffeesäure und p-Cumarsäure, die Benzoessäure-Derivate Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoessäure, Gallussäure und Vanillinsäure, sowie Vanillin und das Flavanonol Taxifolin (A1.1) [18]. Die bekannten Bestandteile liegen frei und vor allem als D-Glucose- oder Rhamnose-Glycoside vor und machen damit etwa 90 % des Extraktes aus [19].

1.3 Bislang postulierte Wirkung von Pycnogenol in vivo

Im Allgemeinen sind Polyphenole aus der Nahrung oder in Form von Nahrungsergänzungsmitteln mit einer Vielzahl von protektiven Effekten auf den Gesundheitszustand verbunden, wozu antioxidative, antiinflammatorische, antiatherosklerotische, antiallergische und antikancerogene Wirkungen zählen [20-26]. Gleichmaßen kann auch Pycnogenol als polyphenolreicher Extrakt mit positiven Auswirkungen in Verbindung gebracht werden. Dabei steht vor allem die antioxidative Wirkung im Vordergrund [16, 27-31].

Belcaro et al. untersuchten den Einfluss von Pycnogenol bei Osteoarthritis. In einer randomisiert-kontrollierten Studie profitierten Proband*innen von der Pycnogenol-Verabreichung (100 mg pro Tag), indem sich die mittels eines spezifischen Index ermittelten Symptome

signifikant verbesserten und deutlich weniger Schmerzmittel eingenommen werden mussten [32]. Diese Beobachtung zeigte sich später auch bei klinisch-chemischen Auswertungen, wobei in der Behandlungsgruppe freie Radikale und das C-reaktive Protein (CRP) als Entzündungsmarker im Plasma signifikant zurückgingen [33]. Cisar et al. kamen bei einer höheren Pycnogenol-Dosis von 150 mg zu übereinstimmenden Ergebnissen [34]. Auf molekularer Ebene betrachteten Jessberger et al. die Wirkung des Extraktes aus der Meereskiefer bei Knie-Osteoarthritis, ebenfalls im Rahmen einer Interventionsstudie [35]. Dabei konnte die Expression von Knorpel-degradierenden Enzymen, z. B. MMP-3/-13, durch Pycnogenol verringert werden, nach einer Bereinigung der Daten von Protokollverstößen war diese Beobachtung trotz einer geringen Stichprobengröße statistisch signifikant.

Bei Frauen mit klimakterischen Beschwerden reduzierte Pycnogenol nach mehrwöchiger Einnahme von 200 mg im Rahmen einer Klinischen Studie im Vergleich zu Placebo signifikant Schlafstörungen sowie Hitzewallungen und Herzrasen [36]. Allerdings zeigte sich nicht bei allen Symptomen ein derartiger Effekt. Wilson et al. betrachteten die Wirkung des Extraktes in einem Studienteilnehmenden-Kollektiv mit saisonaler allergischer Rhinokonjunktivitis mit Birkenpollen als Allergen [37]. Wurde mindestens fünf Wochen vor Beginn der Pollensaison Pycnogenol supplementiert, so berichteten die Proband*innen über signifikant weniger Symptome; auf zellulärer Ebene zeigte sich bezüglich der allergiespezifischen Immunglobuline E jedoch kein Effekt. Eine positive Wirkung auf die Symptome einer bestehenden Psoriasis-Erkrankung wie Rötungen und Schuppungen hatte die dreimonatige Anwendung von Pycnogenol in einer weiteren Studie von Belcaro et al. [38]. Daneben verbesserte sich auch die Hydratation der Haut und die krankheitsbezogene Lebensqualität.

Bezüglich Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises bzw. des metabolischen Syndroms gibt es zur Anwendung von Pycnogenol eine Vielzahl von Berichten in der Literatur. Nahmen Patient*innen mit metabolischem Syndrom den Extrakt über einen Zeitraum von drei Monaten ein, so verbesserten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe Lipidparameter, Blutdruck und Nüchternblutzucker signifikant, welche wesentliche Risikofaktoren für eine erhöhte Mortalität und Morbidität darstellen [39]. Eine ähnliche Risikoreduktion konnten Zibadi et al. auch bei Proband*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 feststellen [40]. Dort sanken unter anderem HbA_{1c} und LDL signifikant nach dreimonatiger Gabe. Diabetes mellitus Typ 2 führt bei Progression hauptsächlich durch Mikro- und Makroangiopathien zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Nierenschäden bis hin zur Dialysepflichtigkeit [41]. In diesem Kollektiv ist die Pycnogenol-Einnahme zudem mit einer endothel-protectiven Wirkung assoziiert. Bei Enseleit et al. besserte sich im Rahmen einer randomisiert-kontrollierten Studie die endotheliale Funktion nach acht Wochen Einnahme; Entzündungsmarker wie das CRP blieben jedoch unbeeinflusst, was eine antioxidative Wirkung des polyphenolreichen Extraktes vermuten ließ [42]. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von Nishioka et al.

überein, wo Pycnogenol vermutlich durch eine Erhöhung der NO-Produktion ebenfalls die endothelabhängige Gefäßerweiterung förderte [43].

Bei der Betrachtung der pharmakodynamischen Effekte von Pycnogenol muss allerdings erwähnt werden, dass es durchaus Einschränkungen gibt. Laut einem Cochrane-Review ist die Datenlage nicht ausreichend, um daraus konkrete Empfehlungen zur Behandlung diverser chronischer Krankheiten, beispielsweise Osteoarthritis, Diabetes mellitus Typ 2 oder arterielle Hypertonie abzuleiten [44].

Obwohl es wie bereits eingangs geschildert zahlreiche Veröffentlichungen zur Wirkung bei der Anwendung bzw. beim Konsum von polyphenolhaltigen Extrakten gibt, so sind die bioaktiven Komponenten kaum bekannt; Einzelsubstanzen zeigen häufig auf molekularer Ebene nur einen geringen oder gar keinen Effekt, werden nur unzureichend resorbiert und liegen zudem häufig *in vivo* in einer geringen Konzentration im nanomolaren Bereich vor, wodurch die Beobachtungen insgesamt nicht erklärt werden können [2, 45-47]. Von Bedeutung sind hier auch die Matrix in der die Polyphenole eingebettet sind, ggf. die Extraktgewinnung sowie der Metabolismus, welche allesamt hochvariabel sind und demzufolge die Bioaktivität wesentlich beeinflussen können [48, 49].

1.4 Pharmakokinetik von Polyphenolen

1.4.1 Resorption, Biozugänglichkeit und Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen ist definiert als der Anteil der applizierten Dosis, der die systemische Zirkulation unmetabolisiert erreicht [50]. Da Nahrungsbestandteile oder pflanzliche Extrakte jedoch deutlich komplexer in ihrer Zusammensetzung sind und initial meist nicht ungebunden im Gastrointestinaltrakt vorliegen, hat hier der Begriff der Biozugänglichkeit (*“bioaccessibility“*) eine größere Bedeutung. Diese beschreibt in welchem Ausmaß eine Substanz am Resorptionsort zur Verfügung steht und anschließend in den systemischen Kreislauf gelangt [51]. Maßgeblich beeinflusst wird dieser Vorgang von Verdauungsprozessen, bei denen ein Stoff aus der Matrix freigesetzt wird aber auch bereits enzymatisch verändert werden kann [52]. Sowohl bei Arzneistoffen als auch bei pflanzlichen Sekundärstoffen spielt der präsystemische Metabolismus im Darmepithel oder in der Leber eine große Rolle, welcher die Bioverfügbarkeit reduziert (First-Pass-Effekt) [53].

Die chemische Struktur von Polyphenolen ist äußerst heterogen, sie reicht von kleineren Molekülen mit einzelnen Hydroxygruppen bis hin zu komplexen Polymeren mit hohem Molekulargewicht [54, 55]. Zudem gibt es *in vivo* eine Reihe von wesentlichen Faktoren, die die Substanzen auf dem Weg von der Mundhöhle bis zum Zielgewebe bzw. bis zur Elimination wesentlich beeinflussen [56]. Bereits die Grundstruktur oder Matrix, in der die Polyphenole vorliegen, kann die Biozugänglichkeit ändern. Beispielsweise können Ballaststoffe

die sekundären Naturstoffe adsorbieren und somit die Freisetzung verzögern oder verringern [57]. Schon der Speichel enthält verschiedene Proteine und Enzyme, die zum einen die Grundstruktur degradieren, aber zum anderen auch polyphenolische Substanzen binden können [58, 59]. Trotz des im Magen vorherrschenden pH-Wertes von etwa zwei kommt es dort nur vereinzelt zu Hydrolysen; der niedrige pH-Wert kann jedoch die Degradation der Matrix begünstigen und die Freisetzung von Polyphenolen aus z. B. Proteinen ermöglichen [60]. Resorbiert werden dort mit der Ausnahme von Anthocyanidin-Glycosiden kaum Stoffe, welche aktiv über einen organischen Anionen-Transporter aufgenommen werden [61]. Da ein Großteil der Polyphenole glycosidisch verknüpft ist (A1.1), gelten diese gemäß biopharmazeutischen Klassifizierungssystem als Substanzen mit guter Löslichkeit, aber schlechter Membranpermeabilität [62]. Demnach werden diese überwiegend im Dünndarmepithel durch die Lactase-Phlorizin-Hydrolase gespalten, bevor sie resorbiert werden können. Ebenfalls beteiligt ist die cytosolische β -Glucosidase [63]. Je nach Lipophilie erfolgt danach die Aufnahme mittels passiver Diffusion oder teilweise via aktiven Transport, an dem zum Beispiel bei Glucosiden ein Natrium-Glucose-Cotransporter (SGLT) beteiligt ist [64]. Insgesamt ist das Ausmaß der Resorption im Dünndarm abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, am bedeutendsten sind Molekulargewicht und Lipophilie. Kleinere unkonjugierte Moleküle wie z. B. die Gallussäure können einfacher absorbiert werden als dimere Procyanidine oder Moleküle mit stereochemisch günstigen Hydroxygruppen, die die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken fördern [2, 64]. Ferulasäure und andere Zimtsäuren werden mutmaßlich mittels eines Natrium-abhängigen Transporters resorbiert, es gibt jedoch auch Berichte über passive Diffusionsprozesse [52, 65]. Etwa 80 % des aufgenommenen Epicatechins erreicht die systemische Zirkulation [1]. Das als vergleichsweise eher lipophil einzustufende Taxifolin, ein weiterer Bestandteil von Pycnogenol, wird trotzdem nur zu einem sehr geringen Anteil aufgenommen, Schätzungen gehen von unter 1 % aus [13]. Überdies können Polyphenole in vitro und in vivo im Tiermodell einem Efflux durch Transporter mit ATP-bindender Kasette (ABC-Transporter) unterliegen, wodurch die Substanzen nach anfänglicher Resorption wieder ins Darmlumen transportiert werden [51, 66, 67].

1.4.2 Hepatischer und enteraler Metabolismus

Im Anschluss an eine duodenale, jejunale oder ileale Resorption gelangen Xenobiotika, also auch polyphenolische Stoffe, über die Portalvene in die Leber und unterliegen dort einer intensiven Metabolisierung oder Konjugation mit dem Ziel der Erhöhung der Hydrophilie zur Forcierung der renalen oder hepatobiliären Elimination [53]. Die funktionalisierenden Enzyme sind zwar größtenteils in der Leber lokalisiert, aber auch in den intestinalen Epithelzellen können bereits unmittelbar nach der Resorption die genannten Reaktionen stattfinden [68]. Diese umfassenden Funktionalisierungen lassen sich in zwei Phasen einteilen und beeinflussen die systemische Verfügbarkeit in Form des First-Pass-Effektes. Phase-I besteht vornehmlich aus Redoxreaktionen und Hydrolysen, um funktionelle

Gruppen im Molekül einzuführen, welche dann in Phase-II mit verschiedenen hydrophilen Substraten, z. B. Glucuronsäure, Sulfat oder Glutathion konjugiert, aber auch methyliert werden [68].

Flavonoide werden typischerweise am Aromaten an Position 3' (Abbildung 1) durch Cytochrom P450-Enzyme (CYP) der CYP1A-Familie hydroxyliert, an der Hydroxylierung von unter anderem Taxifolin sind jedoch keine CYP-Enzyme beteiligt [69]. Wird eine Hydroxygruppe auf p-Cumarsäure übertragen, so entsteht Kaffeesäure, aus der wiederum durch Methylierung Ferulasäure gebildet werden kann (Abbildung 2) [66]. Durch die zusätzliche in vivo Entstehung von originären Bestandteilen eines polyphenolreichen Extraktes kann ein typisches biphasisches Serumprofil entstehen, wobei die Serumkonzentration durch die Entstehung des Metaboliten nach einer Latenzzeit erneut ansteigt und dadurch ein zweites Maximum erreicht [70]. Ein derartiges kinetisches Profil kann ebenfalls bei einem intensiven enterohepatischen Kreislauf beobachtet werden [71]. Grundsätzlich ist bei Polyphenolen ein sehr hohes Maß an Konjugation im Rahmen von Phase-II-Reaktionen zu erwarten [72-74]; dabei können Glucuronidierung und Sulfatierung auch simultan auftreten, wodurch Sulfoglucuronide entstehen [70, 74, 75]. Sulfatierung durch Sulfotransferasen (SULT) und Glucuronidierung durch UGT-Glucuronosyltransferasen (UGT) machen etwa 40 % der Reaktionen von Fremdstoffen aus, wovon polyphenolische Xenobiotika nicht ausgenommen sind [76]. Insgesamt überwiegen bei der Biotransformation derer Phase-II-Metabolite deutlich [69]. Flavonoide werden vornehmlich im Dünndarmepithel durch UGT1 glucuronidiert, während Sulfatierungen durch SULTA1/SULTA3 und Methylierungen durch lösliche Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) weitgehend in der Leber ablaufen [69, 77, 78]. Methyliert wird häufig die Hydroxygruppe an Position 3', wobei andererseits beispielsweise Epigallocatechingallat die COMT durch Komplexierung des Co-Faktors Magnesium inhibieren kann [56, 79]. Überdies kann zum Beispiel durch die Übertragung einer Methylgruppe an Position 3 auf Protocatechusäure in vivo Vanillinsäure entstehen (Abbildung 2) [80].

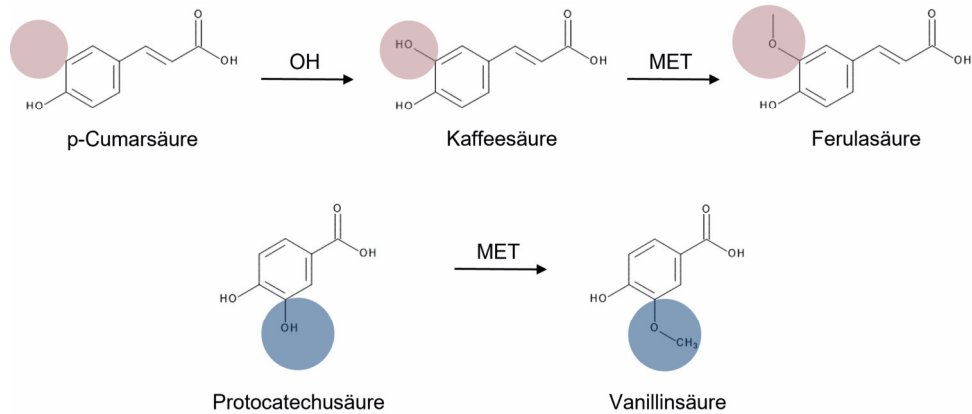


Abbildung 2: Biotransformation von p-Cumarsäure und Protocatechusäure. OH = Hydroxylierung, MET = Methylierung.

1.4.3 Verteilung und Elimination

Nach erfolgter hepatischer Biotransformation gibt es mehrere Möglichkeiten, welchen Weg die Metabolite nachfolgend beschreiten. Gelangen diese in den systemischen Kreislauf, so können die Substanzen in die Zielgewebe transportiert werden, aber auch renal über den Urin ausgeschieden werden [81]. Renal eliminiert werden im Allgemeinen hydrophile Substanzen, wohingegen lipophile Stoffe meist über die Gallenflüssigkeit in den Dünndarm (Duodenum) sezerniert werden und dort über die Faeces ausgeschieden werden [53]. Für polyphenolische Metabolite sind grundsätzlich beide Eliminationswege möglich, eine allgemeine Aussage zu treffen ist schwierig. Der Anteil der über den Urin ausgeschiedenen ursprünglich aufgenommenen Menge reicht von 0,3 – 43 % [2]. Als Faustregel für Polyphenole gilt, dass kleinere und insbesondere mikrobielle Metabolite eher renal eliminiert werden [77]. Eine Zusammenfassung der wesentlichen Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik von polyphenolischen Substanzen ist in Abbildung 3 zu sehen.

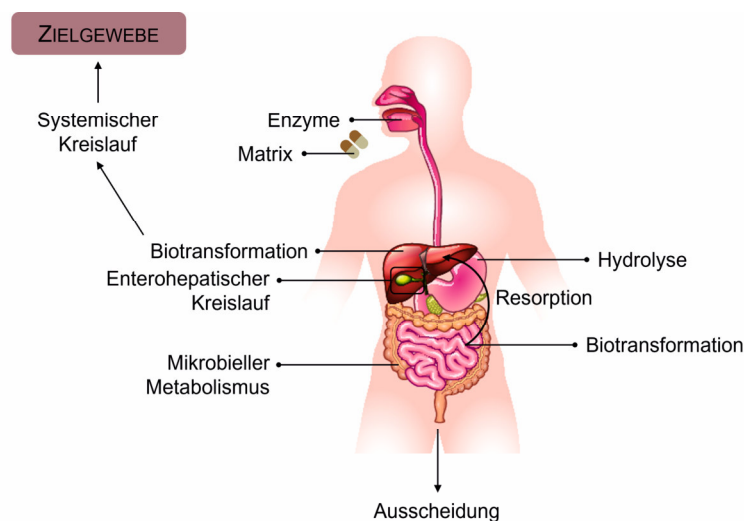


Abbildung 3: Darstellung der wichtigsten Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik von Polyphenolen nach oraler Aufnahme. Abbildung modifiziert nach [55].

1.4.4 Rolle des enteralen Mikrobioms

Das Darmmikrobiom stellt die Gesamtheit aller Mikroorganismen dar und spielt eine wesentliche Rolle bei der Metabolisierung im Allgemeinen und von Bestandteilen polyphenolreicher Nahrungsmittel oder Extrakte im Speziellen [59, 82-84]. Im Dünndarm werden im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs Phase-II-Konjugate mit hepatobiliärem Ursprung durch Bakterien dekonjugiert, infolgedessen diese erneut resorbiert oder im Dickdarm durch das dortige Mikrobiom weiter metabolisiert und ebenfalls aufgenommen werden [67, 85]. Im Anschluss kann nochmals eine enterale oder hepatische Metabolisierung stattfinden. Aber auch die Konjugate selbst können durch aktiven Transport erneut resorbiert werden [5]. Weil nur etwa 5 – 10 % der initial zugeführten pflanzlichen Polyphenole im Dünndarm in den systemischen Kreislauf gelangen, wird der Rest in den Dickdarm weitertransportiert und unterliegt ebenfalls einem ausgeprägten Metabolismus durch die dortigen Mikroorganismen [86]. Dies trifft insbesondere auf oligomere Procyanidine zu, die aus mehr als zwei Monomeren aufgebaut sind [77]. Zu den mikrobiell gebildeten Metaboliten von Catechin oder oligomeren Procyanidinen, den Hauptbestandteilen von Pycnogenol, sind Valerolacton-Derivate bzw. die ringoffenen Formen sowie Benzoessäurederivate zu zählen (Abbildung 4) [52, 87, 88]. Verantwortlich für die Bildung derer sind meist Clostridien bzw. Eubakterien [77].

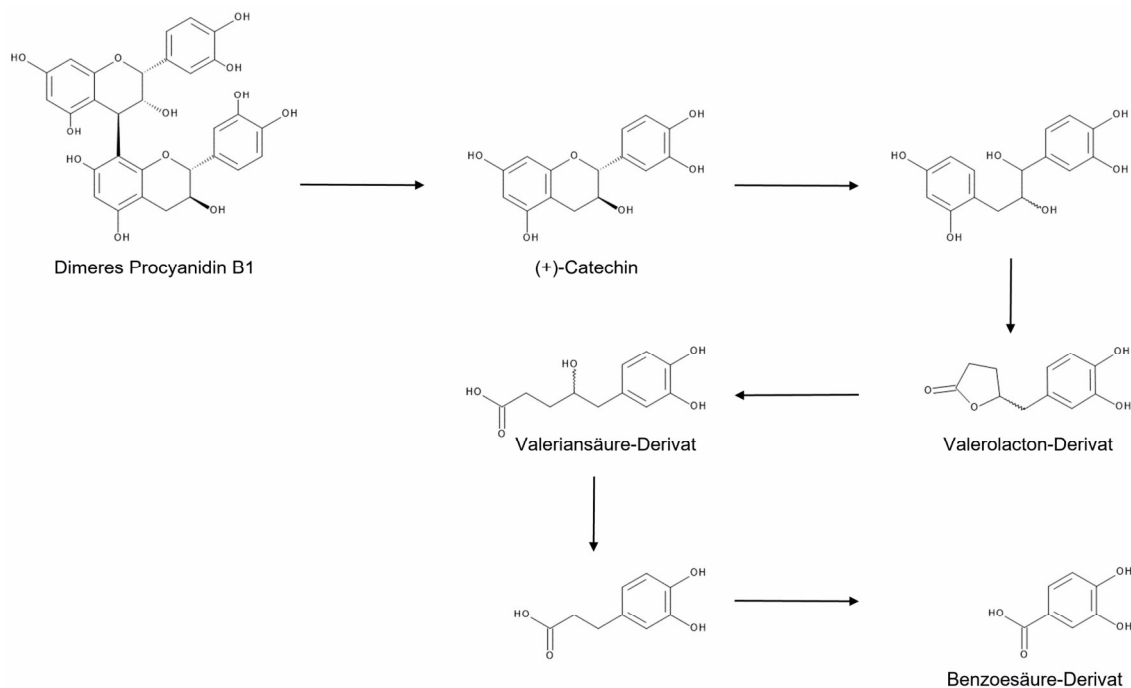


Abbildung 4: Mikrobieller Metabolismus von oligomeren Procyanidinen und Catechinen am Beispiel von Procyanidin B1 und (+)-Catechin [52, 87-89].

Das intestinale Mikrobiom besteht insgesamt aus etwa 10^{14} Bakterien, die zu etwa 1.000 verschiedenen Spezies gehören [90]. Dabei zeigt sich eine hohe interindividuelle Variabilität, wobei jedoch die Zusammensetzung des physiologischen Mikrobioms eines

Erwachsenen relativ stabil ist. Die Entwicklung der Gesamtheit der Mikroorganismen beginnt mit der Geburt und entspricht im Alter von zwei Jahren der eines Erwachsenen [91]. Die Zusammensetzung selbst wird durch multiple Faktoren stark beeinflusst, zum Beispiel durch die Ernährung, den Gesundheitszustand und das Immunsystem des Wirtes und variiert auch innerhalb der Abschnitte des Gastrointestinaltraktes deutlich, beispielsweise durch den Mucus [91, 92]. Aufgrund harscher Bedingungen durch etwa Gallensäuren, einen eher niedrigen pH-Wert und antimikrobielle Peptide, z. B. durch Paneth-Zellen gebildetes Lysozym C oder α -Defensine [93], dominieren im Dünndarm schnellwachsende Spezies wie Enterobakterien, Bifidobakterien und Laktobazillen [94]. Im Dickdarm sinkt der intestinale Sauerstoffgehalt weiter, gleichzeitig steigt die Verweilzeit der Nahrungsreste, die dort vornehmlich noch aus unverdaulichen Ballaststoffen bzw. Polysacchariden bestehen. Dadurch wird das Wachstum von anaeroben Bakterien gefördert, die diese als Kohlenstoffquelle nutzen können. Dazu zählen unter anderem die Gattungen *Bacteroides* oder *Prevotella* (Abbildung 5) [95, 96].

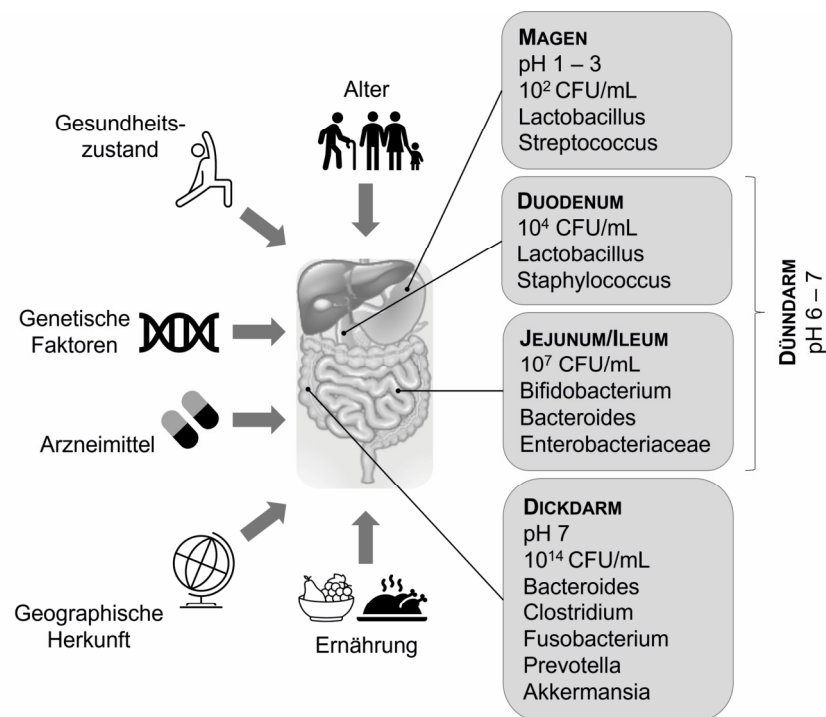


Abbildung 5: Variabilitätsbestimmende Faktoren und Charakteristika des intestinalen Mikrobioms. CFU = Koloniebildende Einheit. Abbildung modifiziert nach [94, 97].

Die genaue Bedeutung des intestinalen Mikrobioms ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Allerdings gibt es deutliche Hinweise, dass diese mikrobielle Gesamtheit eine essentielle Bedeutung für den Gesundheits- bzw. Krankheitszustand des Wirtsorganismus hat und eine Dysbiose insbesondere bei metabolischen oder immunologischen Erkrankungen relevant ist [98-100]. Diskutiert wird hierbei beispielsweise eine Beteiligung bei der Pathogenese von Diabetes mellitus oder bei der Modulation des Immunsystems durch Stillen im Säuglingsalter. Eine Ernährung reich an tierischen Fetten und Proteinen und gleichzeitig

eine unzureichende Aufnahme von Ballaststoffen fördern das Wachstum von Bakterien (u. a. *Bacteroides vulgatus* und *Ruminococcus gnavus*), welche wiederum durch spezifische Stoffwechselprodukte wie verzweigte, kurzkettige Fettsäuren die Blutglucose erhöhen sowie eine Insulinresistenz begünstigen [98, 101].

Ein typisches akutes Krankheitsbild, welches durch eine Störung des physiologischen Darmmikrobioms verursacht wird, ist eine durch *Clostridioides difficile* hervorgerufene (pseudomembranöse) Colitis [102]. Ausgelöst wird die Disruption sehr oft durch den Einsatz von Antibiotika mit breitem Wirkspektrum, wie z. B. Carbapeneme, Fluorchinolone oder Cephalosporine der dritten und vierten Generation. Dadurch kann sich bei Kolonisation der Sporenbildner enteral ausbreiten und die toxinvermittelte Inflammation auslösen, welche bis hin zum toxischen Megacolon mit Sepsis führen kann [103, 104]. Etwa ein Viertel der Patient*innen erleidet nach initial erfolgreicher antibiotischer Therapie mit Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomicin mindestens ein Rezidiv [102]. Für dieses Kollektiv steht seit Dezember 2022 zumindest in den USA das erste zugelassene Arzneimittel (*Rebyota*[®]) mit gepooltem Spenderstuhl zur Verfügung, wodurch die insbesondere nach drei Rückfällen empfohlene Stuhltransplantation zur Wiederherstellung des Mikrobioms deutlich vereinfacht wird [105].

Grundsätzlich können gastrointestinale Bakterien bei polyphenolischen Substanzen verschiedene Reaktionen katalysieren; dazu gehören Hydrolysen von Glycosiden und Phase-II-Konjugaten, aber auch Ringöffnungen, Reduktionen, Demethylierungen und der Abbau von Polymeren [51, 106]. Betrachtet man diese Vielzahl an möglichen chemischen Modifikationen im Kontext der Variabilität des Mikrobioms, so ist die Bildung eines Metaboliten aus originären Bestandteilen polyphenolhaltiger Extrakte von Person zu Person ausgesprochen heterogen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Polyphenole oder deren Metabolite das Mikrobiom beeinflussen, entweder durch eine antimikrobielle Wirkung gegenüber pathogener Spezies und/oder durch präbiotische Effekte [107-112]. Konkret können beispielsweise diverse Catechine die Anzahl an Bifidobakterien und Laktobazillen signifikant erhöhen, während gleichzeitig einer der Erreger des Gasbrandes, *Clostridium histolyticum*, deutlich abnimmt [113]. Durch den Stoffwechsel von Bifidobakterien und Laktobazillen, auch Milchsäurebakterien genannt, wird der luminale pH-Wert im Darm konstant niedrig gehalten. Dadurch wird das Wachstum pathogener Spezies vermindert, synergistisch wirken antimikrobielle Metabolite; zudem können diese Erreger quantitativ verdrängt werden [114]. Ähnliche Effekte zeigen sich auch bei der Gattung Akkermansia [115, 116], sowie bei Phenolsäuren [109, 117]. Dieser Aspekt und mikrobielle Metabolite als potentiell bioaktive Substanzen können folglich eine mögliche Erklärung für die beobachtete Bioaktivität der Polyphenole trotz insgesamt niedriger Bioverfügbarkeit bzw. Biozugänglichkeit sein (*“low bio-availability-high bioactivity paradox“*) [25, 49, 108, 118].

2 Bedeutung des Endothels bei pathophysiologischen Prozessen

2.1 Aufbau des Endothels und der Glycocalyx

Das Endothel ist eine einzellige Schicht, die die Blutgefäße zum Lumen hin auskleidet. Unterhalb dieser Zellschicht befindet sich zellarmes Bindegewebe, mit welchem die Endothelzellen auf einer Basalmembran verankert sind. Die mittlere ist die breiteste Lage der Gefäßwand und besteht hauptsächlich aus Muskelzellen und Extrazellulärmatrix. Die sich anschließende Bindegewebsschicht fixiert letztlich die Blutgefäße in der Umgebung. Je nach Art und physiologischen Bedingungen variiert die Ausprägung des Aufbaus. Bei Venen sind die einzelnen Schichten beispielsweise weniger differenziert (Abbildung 6) [119].

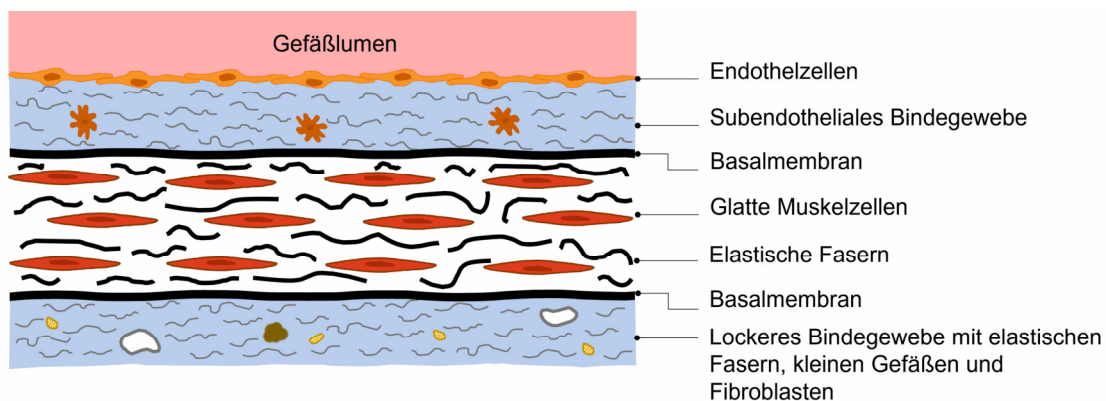


Abbildung 6: Schematischer Querschnitt durch eine Gefäßwand mit zum Gefäßlumen hin befindlichen Endothelzellen. Abbildung modifiziert nach [119].

Bindegewebe besteht zu einem großen Teil aus der sogenannten Extrazellulärmatrix; daneben sind auch einzelne Zellen zu finden, beispielsweise Fibroblasten, aber auch dendritische Zellen als Bestandteile der Immunabwehr. Die extrazelluläre Matrix setzt sich wiederum zusammen aus einem komplexen Netzwerk aus strukturgebenden Fasern (Kollagen, elastische Fasern), verschiedenen Makromolekülen und interstitieller Flüssigkeit. Charakteristische Makromoleküle sind Glycosaminoglycane und Proteoglycane. Glycosaminoglycane (z. B. Heparansulfat, Chondroitinsulfat) sind saure Polysaccharide, die aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind. Zum Disaccharid glycosidisch verknüpft sind meist Glucuronsäure oder Iduronsäure und (N-Acetyl-)Glucosamin oder (N-Acetyl-)Galactosamin. Da alle Glycosaminoglycane mit der Ausnahme von Hyaluronan zudem mehrfach sulfatiert sind, ergeben sich multiple negative Ladungen was schließlich zu einem hohen Wasserbindungsvermögen führt (Abbildung 7). Sind Glycosaminoglycane an ein sogenanntes Core Protein gebunden, so spricht man von Proteoglycanen, z. B. Syndecane oder Glypicane (Abbildung 8).



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus von (sulfatierten) Glycosaminoglycanen. GlucA = Glucuronsäure, IduA = Iduronsäure, NAGlu = N-Acetylglucosamin, NAGal = N-Acetylgalactosamin, Sulf = Sulfatgruppe.

Beide enthalten hauptsächlich Heparansulfat. Proteoglycane sind nicht nur im Interstitium lokalisiert, sondern auch an Zelloberflächen oder intrazellulär in Granula; im Vergleich zu Glycoproteinen überwiegt bei ihnen der Anteil an Kohlenhydraten [120-124].

Die endotheliale Glycocalyx bedeckt die luminale Oberfläche der Endothelzellen und besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten in Form von Glycosaminoglycanen, Proteoglycanen, Glycolipiden und -proteinen, die sowohl frei als auch membrangebunden vorliegen können. Diese Strukturen bilden ein Gerüst für die Assoziation von löslichen Plasmabestandteilen, beispielsweise Albumin. Dadurch entsteht eine dynamische Schicht mit einer durchschnittlichen Dicke von etwa $0,5 \mu\text{M}$ in Kapillaren [125]. Diese Schicht steht durch permanenten Stoffaustausch im Gleichgewicht mit dem vorbeifließenden Plasma. Physiologisch betrachtet spielen Endothel und Glycocalyx eine entscheidende Rolle bei einer Reihe von Prozessen. Die vaskuläre Permeabilität wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Zum einen sorgt die negative Ladung der Glycosaminoglycane zur elektrostatischen Abstoßung von positiv geladenen Stoffen sowie zur oben beschriebenen Entstehung einer Makromolekül-Plasma-Schicht, die als mechanische Barriere fungiert [126]. Zum anderen wird diese Barrierefunktion der Endothelzellen durch die Zell-Zell-Kontakte Adherence junctions und Tight junctions gefördert (Abbildung 8) [121, 126-128]. Tight junctions bestehen vornehmlich aus Occludinen und regulieren den parazellulären Transport, indem sie die endotheliale Barriere verstärken. Adherence junctions verknüpfen mit Cadherinen hauptsächlich das Cytoskelett benachbarter Zellen, stabilisieren so den Zellverband und tragen damit ebenfalls zur Regulation der Permeabilität bei (siehe auch A2.3) [129, 130]. Eine weitere bedeutsame Funktion hat die endotheliale Glycocalyx bei der Regulation des Blutdrucks inne. Mechanische Scherkräfte aufgrund des Blutflusses werden durch verschiedene funktionale Komplexe in elektrochemische Reize umgewandelt, woraufhin in Endothelzellen zelluläre Signalkaskaden aktiviert werden und auch die Genexpression vasoaktiver Substanzen beeinflusst wird [131, 132]. Beispielsweise gelangt vermehrt Calcium durch die Aktivierung von scherstress-abhängigen Ionenkanälen in die Zelle, welches intrazellulär die endotheliale NO-Synthase stimuliert und somit vermehrt vasorelaxierendes NO gebildet wird (siehe auch A2.2.2) [133]. Als äußerst potenter vasokonstriktorisches Gegenspieler fungiert Endothelin-1 durch irreversible Bindung an dessen Rezeptor vom A-Subtyp [134, 135]; aktiviert wird die Expression von Endothelin durch beispielsweise Hypoxämien [136].

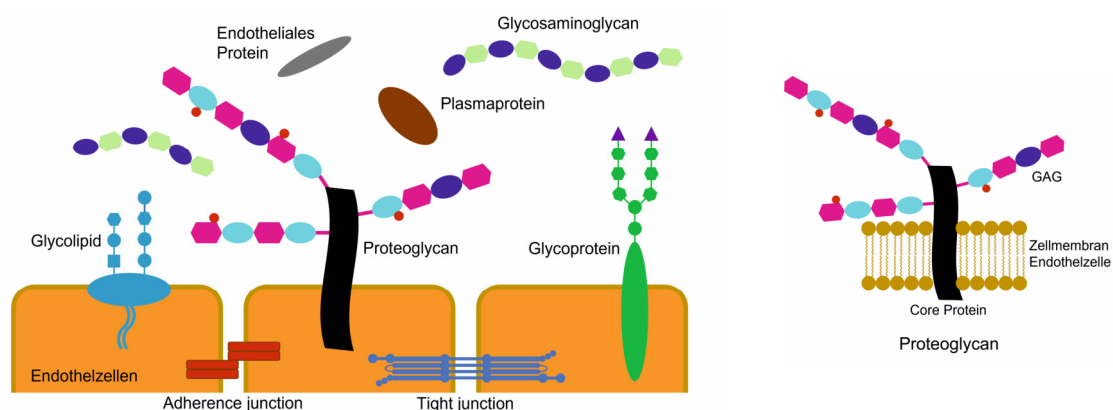


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Glycocalyx von Endothelzellen (links). Sind Glycosaminoglycane (GAG) gebunden an ein sogenanntes Core Protein, so bilden diese ein Proteoglycan, welches membrangebunden (rechts) oder frei im Interstitium vorliegen kann. Abbildung modifiziert nach [127, 128, 137, 138].

2.2 Pathophysiologische Prozesse mit endothelialer Beteiligung

2.2.1 Endothel und Immunmodulation

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel A2.1 geschildert, unterliegt die endotheliale Glycocalyx einem ständigen Umbau durch die Synthese neuer Bestandteile, den Stoffaustausch mit dem Blut und den enzymatischen Abbau (Shedding). Die beteiligten Enzyme sind dabei variabel und werden durch reaktive Sauerstoffspezies oder pro-inflammatorische Zytokine aktiviert [131]. Die Heparanase spaltet als Glucuronidase spezifisch Heparansulfat [139], ebenso wie die Matrixmetalloproteasen-Isoformen 9 und 13 [140]. Aus der Gruppe der Disintegrin-Metalloproteasen (ADAM) sind neben ADAM-15 vermutlich auch weitere Vertreter beteiligt [141-143]. Bei pathophysiologischen Prozessen mit endothelialer Beteiligung kommt es durch verstärktes Shedding zu einer Degradation der Glycocalyx, wodurch wiederum weitere Kaskaden aktiviert werden [144]. Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel nicht permeabel für Immunzellen; kommt es aber durch Entzündungsstimuli zu einer Expression von Selektinen und Integrinen auf der Oberfläche von Endothelzellen, so können Leukozyten an der Gefäßwand entlangrollen und schließlich unter dem Einfluss weiterer Mediatoren gebunden werden und transendothelial migrieren [145]. Dabei werden durch vermehrt exprimierte und freigelegte endotheliale Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM) neben Leukozyten auch Thrombozyten an membranständigen Integrinen gebunden, was neben der geschilderten Immunreaktion zusätzlich mit einer Aktivierung der Blutgerinnung einhergeht; beide Prozesse beeinträchtigen maßgeblich die mikrovaskuläre Durchblutung [146, 147]. Daneben führt die gestörte Barrierefunktion des Endothels durch Auflösung der Zellverknüpfungen und Apoptose endothelialer Zellen zu einem Flüssigkeitsverlust bzw. Ödembildung durch erhöhte Kapillarpermeabilität und einer verringerten

Adaptationsfähigkeit der Gefäße an den Blutfluss. Grundsätzlich gelten diese Prozesse in Form einer induzierten Permeabilität als physiologisch, dienen der lokalen Immunabwehr und werden durch antiinflammatorische Kontrollmechanismen reguliert [148].

2.2.2 Endothel bei Sepsis

Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine fehlgerichtete bzw. überschießende, unkontrollierte Immunreaktion (siehe A2.2.1) auf Pathogene hervorgerufen wird, wobei zahlenmäßig grampositive Bakterien dominieren [149]. Durch diese lokal unbegrenzte, systemische Entzündungsreaktion kommt es letztlich durch den eingeschränkten Blutfluss bzw. die Hypotonie und den dadurch verminderten Sauerstofftransport zu den genannten Organschäden. Hierbei gilt NO als der zentrale Mediator bei der Regulation des Gefäßtonus, das exzessiv durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) gebildet wird, während die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) verringert ist (Abbildung 9) [150, 151].

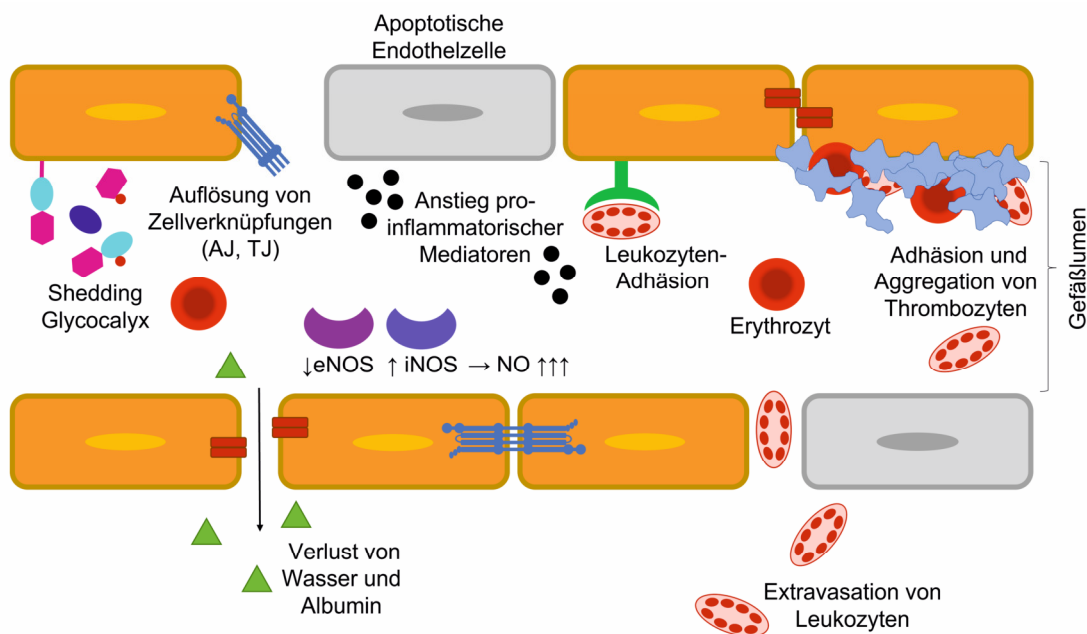


Abbildung 9: Schematische Darstellung der wichtigsten endothelialen Prozesse auf molekularer Ebene bei der Entstehung einer Sepsis. AJ, TJ = Adherence/Tight junctions, eNOS/iNOS = endotheliale/induzierbare NO-Synthase. Abbildung modifiziert nach [152].

Zeitgleich tritt eine ausgeprägte intravasale Hämostase auf, die zum einen die Immunreaktion verstärkt und zum anderen im Extremfall zu einer Verbrauchskoagulopathie (Disseminierte intravasale Gerinnung, DIC) führen kann, bei der durch einen ausgeprägten Mangel an Gerinnungsfaktoren im Verlauf schwerwiegende Blutungen auftreten [153]. Die Sepsis wird aufgrund der molekularen Pathogenese auch als maligne intravaskuläre Entzündung bezeichnet, wobei bis dato der konkrete Auslöser für die systemische Ausbreitung unklar ist. Vermutet wird ein multifaktorielles Geschehen mit einer ausgeprägten Überstimulation von Immunzellen [154].

2.2.3 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Auch bei chronischen Erkrankungen vor allem des kardiovaskulären Formenkreises spielt die vornehmlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufene endotheliale Dysfunktion eine bedeutende Rolle [155, 156], wobei ROS sowohl freie Sauerstoffradikale (Superoxid, Hydroxyl- und Peroxylverbindungen) als auch nicht-radikalische Moleküle (Peroxide, Ozon, Hypochlorit) sein können [157]. Im Rahmen von physiologischen Prozessen entstehen ROS zwar auch als Signaltransmitter und Transkriptionsfaktoren in geringen Mengen, werden aber normalerweise effizient durch diverse enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen detoxifiziert; dazu gehören beispielsweise Superoxid-Dismutasen, Katalasen, Glutathion und Tocopherol [158]. Liegt jedoch aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen ein Überschuss dieser Spezies vor, so schädigen diese teils massiv zelluläre Strukturen in Form von Proteinen, Lipiden und DNA [159]. Daneben bewirkt dieser oxidative Stress eine Inaktivierung des Co-Faktors Tetrahydrobiopterin (BH₄) der eNOS, wodurch das Enzym vermutlich durch Monomerisierung entkoppelt wird und anstelle von NO ebenfalls Superoxid bildet [160, 161]. Dadurch wird die endotheliale Funktion zusätzlich wesentlich beeinträchtigt, da NO neben Prostaglandinen als essentieller Transmitter für die vasculäre Homöostase und Protektion fungiert und unter anderem die Thrombozytenaggregation hemmt, eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt und die Adhäsion von Leukozyten vermindert [162-164]. Durch die Reaktion von Superoxid mit NO selbst entstehen wiederum Peroxynitrite, was zu weiteren oxidativen Schäden und Nitrierungen von Proteinen führen kann [165].

2.2.4 Endothel, Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen

Ischämische kardiovaskuläre Erkrankungen wie Koronare Herzerkrankung (KHK) und ischämischer Schlaganfall entstehen im Wesentlichen auf der Grundlage von atherosklerotischen Veränderungen, welche mit endothelialer Dysfunktion und Inflammation einhergehen [166]. Im Falle der typischen Co-Morbiditäten und Risikofaktoren Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Dyslipidämie und Rauchen führt die Aktivierung einer NADPH-abhängigen Oxidase zur ROS-Synthese und dadurch zur Induktion der in A2.2.3 beschriebenen endothelialen Dysfunktion [167]. Auf direktem Weg wird das Endothel ebenfalls negativ beeinflusst; hyperglykämische Zustände bei Diabetes mellitus stören das metabolische Gleichgewicht der Endothelzellen, Raucher inhalieren mit dem Zigarettenrauch bereits ROS und übermäßiger vaskulärer Scherstress bei arterieller Hypertonie schädigt unmittelbar das Endothel [168, 169]. Daneben werden reaktiv im Zuge der Immunantwort durch die qualitativen Veränderungen des Endothels vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert, wodurch unter anderem Makrophagen und Leukozyten angezogen werden und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen. Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose hat die Einlagerung von cholesterinreichem LDL und anderen Lipoproteinen in der Gefäßwand inne, was insbesondere bei Dyslipidämien und bei bereits geschädigtem Endothel mit

erhöhter Permeabilität zum Tragen kommt [170]. Initial wird zwar zur Detoxifizierung das im Anschluss durch ROS oxidierte LDL unkontrolliert von Makrophagen aufgenommen, wodurch die lipidreichen sogenannten Schaumzellen gebildet werden [171]. Allerdings führt dies im Verlauf sowohl zur Apoptose mit Freisetzung von Cholesterin als auch zur weiteren Aktivierung inflammatorischer Prozesse, sowie zur vermehrten Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand [172]. Letztendlich entstehen durch die geschilderten Prozesse in Summe die typischen atherosklerotischen Plaques mit lipidreichem Kern [173, 174]. Kann dieser Circulus vitiosus nicht durch Lebensstilveränderungen oder diverse pharmazeutische Maßnahmen unterbrochen werden, so manifestiert sich die kardiovaskuläre Erkrankung [175].

2.3 Endotheliale Permeabilität auf molekularer Ebene

Im Kapitel A2.1 wurde bereits beschrieben, dass das Endothel grundsätzlich die Permeabilität für gelöste Stoffe, Flüssigkeiten und Zellen zwischen Blut und dem die Gefäße umgebenden Körpergewebe reguliert. Diese selektive Permeabilität ist abhängig von der Art des Gefäßes, der anatomischen Lage und der Lokalisation im Herz-Kreislauf-System. Venen stellen sich im Vergleich zu Arterien als durchlässiger dar, ebenso verhält es sich bei Kapillaren versus größere Gefäße. Dies rührt unter anderem daher, dass Kapillaren ausschließlich aus Endothelzellen und der Basalmembran bestehen, wodurch demnach die distalen Strukturen fehlen. Bei kontinuierlichen Kapillaren ist der Stofftransport durch Tight junctions und einer geschlossenen Basalmembran deutlich eingeschränkt, während bei fenestrierten Typen siebartige Öffnungen aus negativ geladenen Glycoproteinen analog der Glycocalyx (Diaphragmata) zwischen den Zellen Transportprozesse zum Beispiel in der Niere erleichtern. Die höchste Permeabilität besitzen Kapillaren vom diskontinuierlichen Typ beispielsweise in der Leber, die durch ausgeprägte interzelluläre Öffnungen und einer lückenhaften oder komplett fehlenden Basalmembran charakterisiert sind [176, 177]. Insgesamt findet ein Großteil des Stoffaustausches zwischen Blut und Körpergewebe in den Kapillaren statt, wobei kontinuierlich ein basaler Austausch erfolgt [178, 179]. Am strengsten reguliert wird die Durchlässigkeit im Gehirn, wo Endothelzellen mit hochspezifischen Charakteristika die kontinuierliche Blut-Hirn-Schranke bilden [180]. Die endotheliale Permeabilität ist jedoch auch abhängig von den Eigenschaften des zu transportierenden Stoffes selbst, z. B. Lipophilie/Hydrophilie, Größe bzw. Masse und Ladungszustand [181]. Für Wasser liegt zwar theoretisch eine vollständige Permeabilität vor, allerdings wirkt maßgeblich Albumin dieser durch den kolloidosmotischen Druck entgegen [182]; reguliert wird der Wassertransport vornehmlich über Aquaporine, es kommen aber auch parazelluläre Transportmechanismen zum Tragen [183]. Schlussendlich bestimmen alle genannten Aspekte die Art des Transportes durch das physiologische Endothel, welcher durch die Zellen hindurch, transzellulär, oder zwischen den Zellen, parazellulär via Poren, erfolgen kann [184].

Parazellulär transportiert werden dabei bevorzugt kleine ionische Verbindungen wie Natrium oder neutrale Moleküle mit einer Masse von maximal 600 Da, z. B. Glucose [185, 186]. Makromoleküle wie Albumin und weitere Proteine überwinden die Endothelbarriere transzellulär über als Caveolae bezeichnete Vesikel; dabei kommt es nach der Bindung an spezifische Rezeptoren zur Caveolin-vermittelten Internalisierung und Vesikelbildung [187, 188]. Insbesondere bei Tumoren und entzündlichen Prozessen spielen auch vesikulo-vakuoläre Organellen eine Rolle, welche aus traubenförmig gruppierten Vesikeln und Vakuolen unterschiedlicher Größe bestehen [189, 190]. Überwiegend findet der endotheliale Transport jedoch parazellulär statt, wobei Adherence junctions vorherrschen [191-193]. Bei Endothelschäden können insbesondere hochmolekulare Stoffe über Lecks durch degradierte zelluläre Junctions oder durch apoptotische Lücken im Zellverband vereinfacht bzw. nahezu ungehindert das Endothel passieren (Abbildung 10) [194].

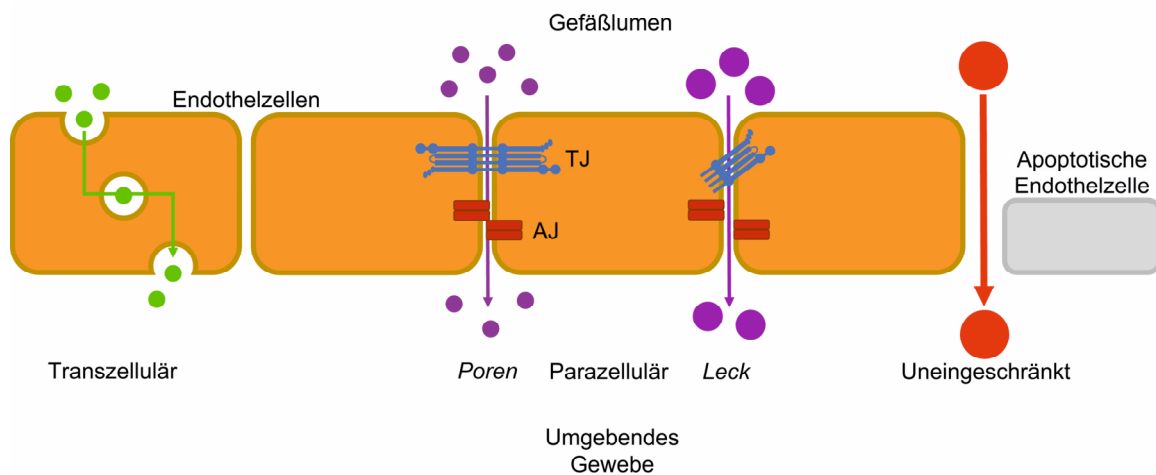


Abbildung 10: Schematische Darstellung der möglichen Transportmechanismen im Endothel. AJ, TJ = Adherence/Tight junctions. Abbildung modifiziert nach [195].

3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen einer klinischen Studie mit gesunden Proband*innen bislang nicht beschriebene Substanzen und Metabolite nach Einnahme des polyphenolreichen Kiefernextraktes Pycnogenol in Humanserum identifiziert werden. Mittels eines ungerichteten, metabolischen Ansatzes sollten durch eine entsprechende UHPLC-qTOF-MS-Analytik mit adäquater vorangegangener Probenvorbereitung diejenigen Analyten erfasst werden, die auf die Pycnogenol-Anwendung zurückzuführen waren. Dazu wurde als Referenzprobe vor Beginn der Einnahmesequenz Humanserum abgenommen, um den späteren Vergleich mit den Serumproben nach der Anwendung zu ermöglichen. Zudem konnte damit eine proband*innenweise Auswertung realisiert werden, was den pharmakokinetischen Charakteristika polyphenolischer Substanzen gerecht werden sollte (B3.4.1, B3.4.8).

Im Anschluss war eine umfassende Untersuchung der Bioaktivität der aufgefundenen Bestandteile bzw. Metabolite *in vitro* vorgesehen. Diese Versuche waren auf der Grundlage des bereits erfolgreich angewendeten *ex vivo*-Modells geplant (B4.1.1) [196]. Der Vorteil dieses Modells bestand darin, dass Serumproben nach Einnahme des Kiefernextraktes in Zellkulturversuchen als „bioaktives Agens“ eingesetzt werden können, ohne die genaue Identität, mögliche synergistische Effekte oder die Konzentration potentiell vorhandener wirksamer Substanzen zu kennen.

Damit sollte zum einen ein Beitrag zur Charakterisierung von Pycnogenol geleistet werden und zum anderen eventuell bislang nicht beschriebene bioaktive Substanzen identifiziert werden. Dies sollte bei der weiteren Aufklärung der Wirkung von Polyphenolen helfen. Das Endothel sollte bei diesen Untersuchungen aufgrund der Beteiligung bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen im Fokus stehen, da die Einnahme von Pycnogenol bereits mit einer positiven Wirkung auf eine endotheliale Dysfunktion in Verbindung gebracht werden konnte (A1.3).

B Allgemeiner Teil

1 Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro

1.1 Analyse von Lektinen in Pycnogenol

1.1.1 Hintergrund und Fragestellung

Lektine sind spezialisierte Proteine, die spezifisch, jedoch nicht immunologisch freie und gebundene Kohlenhydrate (Glycoproteine, -lipide, komplexe Kohlenhydrate, einfache Zucker) polyvalent binden und somit in ihrer Aktivität Antikörpern ähneln [197]. Anfänglich wurden Lektine in Pflanzen detektiert, mittlerweile aber auch in Mikroorganismen oder Tieren. Von der initialen Entdeckung und der Fähigkeit bei Erythrozyten eine Agglutination zu verursachen, rührt auch das Synonym (Phyto-)Hämagglutinin [198]. Das wohl bekannteste Lektin ist Rizin aus *Ricinus communis* L. (Wunderbaum), welches aufgrund der inaktivierenden Wirkung auf Ribosomen als hochgiftig gilt und als biologische Kriegswaffe gelistet ist [199]. Endogene Lektine sind bedeutsam für den Schutz vor Fressfeinden, aber auch für Zelldifferenzierung und -wachstum [200]. Humanpathogene machen sich Lektine bei der Adhäsion von Wirtszellen zu Nutze; das HI-Virus bindet mit dem Virusprotein GP120 an das Lektin DC-SIGN auf der Oberfläche von dendritischen Zellen oder CD4+ T-Zellen, fördern den Zelluntergang bzw. die Infektion der T-Zellen und somit auch die Immundefizienz [201]. Ein weiterer bekannter Vertreter in diesem Kontext ist das Influenza-Virus, welches mit dem Hüllprotein/Lektin Hämagglutinin an membranständige Sialinsäure-Reste der Wirtszelle bindet und so die Infektion derer ermöglicht. Influenza A-Viren werden charakterisiert anhand der verschiedenen Subtypen von Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N), einem weiteren Oberflächenprotein. Gegen Ende des Ersten Weltkrieges grassierte der Typ H1N1 als sogenannte Spanische Grippe [202]. Die oben genannte Spezifität kann sehr präzise sein; beispielsweise bindet Concanavalin A ausschließlich die α -Anomere von D-Mannose und D-Glucose. Bei komplexeren Kohlenhydraten zeigt beispielsweise das Lektin der Erdnuss eine Affinität zur Sequenz Gal- β (1-3)-GalNAc [203]. Heute spielen Lektine eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Anwendungen, z. B. bei der Untersuchung von zellulären Glycosylierungsmustern, bei der Untersuchung der T-Zellfunktion als Mitose-Stimulans oder bei der Isolierung von Polysacchariden aus komplexen Matrices [4]. Aufgrund der genannten Spezifität gelten Lektine als vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung von Systemen zur zielgerichteten Abgabe von Arzneistoffen am Wirkort (Targeted drug delivery), wodurch unter Umständen die Wirksamkeit erhöht werden kann sowie unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduziert werden können [204]. Grundsätzlich könnte dabei entweder ein Arzneistoff-Lektin-Konjugat an ein membranständiges Kohlenhydrat binden oder ein Arzneistoff-Kohlenhydrat-Konjugat an ein membranständiges Lektin (Abbildung 11).

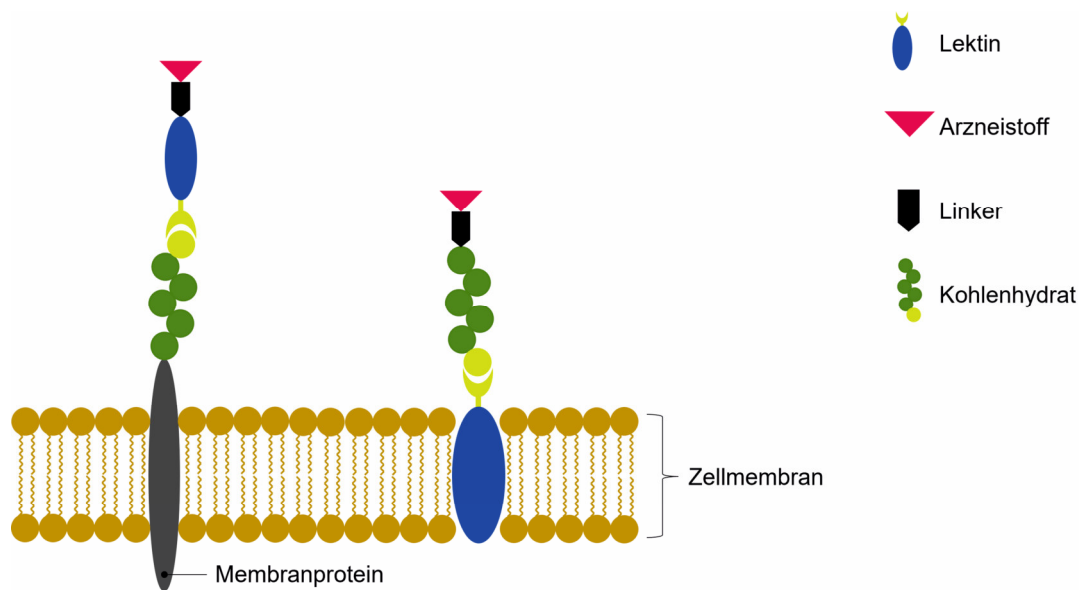


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Nutzung von Lektinen zur zielgerichteten Abgabe von Arzneistoffen. Links: Bindung Arzneistoff-Lektin-Konjugat an membranständiges Kohlenhydrat, rechts: Bindung Arzneistoff-Kohlenhydrat-Konjugat an membranständiges Lektin. Abbildung modifiziert nach [205].

Auch die spezifische und selektive Adressierung veränderter Glykosylierungsmuster durch Lektin-Wirkstoff-Konjugate ist eine potenzielle therapeutische Anwendungsmöglichkeit [206]. Ein vergleichbares Prinzip gibt es z. B. bereits bei der immunologischen Therapie des Mammakarzinoms bei den Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten Trastuzumab-Deruxtecan oder -Emtansin; Trastuzumab selbst adressiert und inhibiert den auf Tumorzellen überexprimierten epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2; nach der zellulären Aufnahme des Konjugates mit anschließender Spaltung dessen wird die Wirkung von Trastuzumab durch die Cytotoxizität der Wirkstoffe bzw. deren Metabolite verstärkt [207, 208]. Denkbar ist ebenfalls eine Erhöhung der gastrointestinalen Resorption, welche mit einer verbesserten oder überhaupt mit einer oralen Bioverfügbarkeit einhergehen würde [205]. Möglich ist auch eine antineoplastische Aktivität der Lektine an sich, welche wiederum durch die Spezifität von Vorteil bezüglich unerwünschter Arzneimittelwirkungen sein kann. Dazu am häufigsten untersucht wurden bislang Lektine aus der Mistel (*Viscum album*). Zumindest in vitro zeigen diese einen wachstumshemmenden Effekt gegenüber Zellen verschiedener Krebsarten, z. B. bei Leukämien, hepatozellulären Karzinomen oder malignen Melanomen [209, 210]. Es ist jedoch zu betonen, dass dies explizit keine ausreichende Evidenz für eine Anwendung am Menschen ist.

Bislang gibt es nur vereinzelt Literaturberichte über Lektine aus der Rinde und/oder in Pflanzenextrakten. Tazaki et al. gelang beispielsweise die Isolierung eines Lektins aus der Rinde der Robinie (*Robinia pseudoacacia*) [211]. Derartige Extrakte und auch Pycnogenol werden durch den Auszug mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln und/oder wässrigen Auszügen variabler Temperatur gewonnen. Somit ist unklar, ob durch das Extraktions-

Verfahren zum einen Proteine gewonnen werden können und zum anderen diese ihre Funktionalität erhalten. Frederich et al. untersuchten in vitro die Wachstumsinhibition verschiedener Extrakte europäischer Bäume, vornehmlich gewonnen mittels Ethylacetat oder Methanol [212]. Dabei zeigten unter anderem Extrakte aus der Rinde der Hainbuche bzw. der Schwarzerle inhibierende Eigenschaften auf das Wachstum diverser Krebszellen. Diese Bioaktivität konnte jedoch mangels weiterführender Analysen nicht kausal auf Lektine zurückgeführt werden.

Wie bereits in A1.3 dargelegt, ist die Einnahme von Pycnogenol mit einer Vielzahl von pharmakodynamischen Effekten assoziiert; gleichwohl ist allerdings nicht eindeutig geklärt auf welche Substanzen die Bioaktivität zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnten bislang nicht alle Bestandteile des Kiefernextraktes identifiziert werden, zudem wurden bei den bisherigen Charakterisierungen (siehe A1.2 und A1.3) in der Regel Methoden (z.B. HPLC-UV-Vis) angewandt, mit denen Proteine nur schwierig erfasst werden können. Aus diesem Grund sollte Pycnogenol in der vorliegenden Arbeit bezüglich möglicher Lektine evaluiert werden.

1.1.2 Ergebnisse

1.1.2.1 Hämagglutinations-Assay

Die Agglutination von Erythrozyten durch Lektine beruht auf einer Quervernetzung derer durch Bindung an membranständige Kohlenhydrat-Reste (Abbildung 12), was sich dieser Assay zunutze machte.

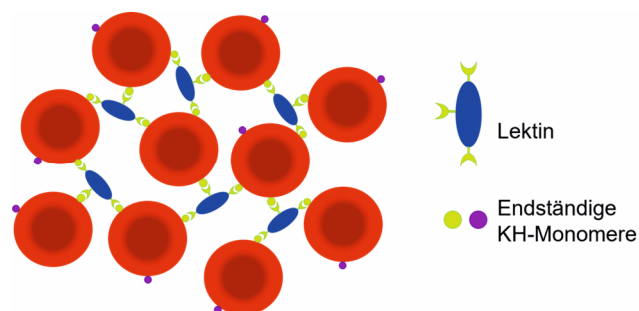


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Hämagglutination durch Quervernetzung der Erythrozyten durch Bindung von polyvalenten Lektin-Molekülen an endständige Kohlenhydrat-Monomere der Membran. KH = Kohlenhydrat. Abbildung modifiziert nach [213].

Ein positives Ergebnis, also eine stattgefundene Hämagglutination, war durch eine diffuse Sedimentation der Erythrozyten mit trübem und rot gefärbtem Überstand gekennzeichnet. Blieb die Hämagglutination aus, so bildeten die Erythrozyten ein scharf abgegrenztes Sediment mit klarem Überstand (Abbildung 13).

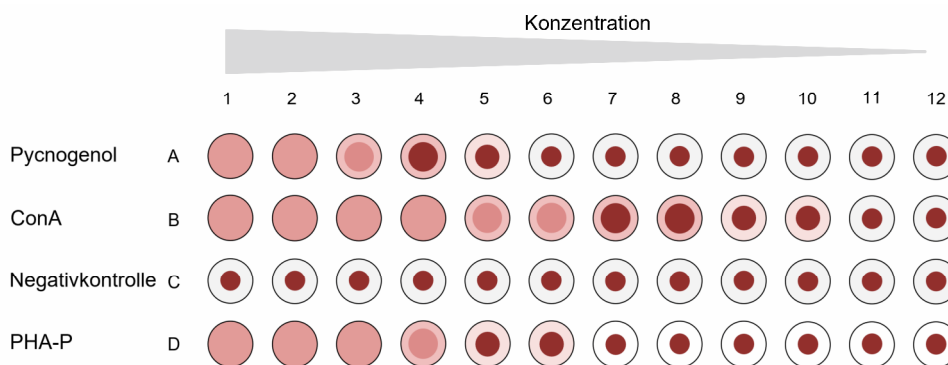


Abbildung 13: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses eines Hämagglutinations-Assays. Die Konzentration der untersuchten Substanzen nahm von links nach rechts ab; initial betrug diese jeweils 500 $\mu\text{g/mL}$ bzw. bei den Fraktionen zusätzlich 5 mg/mL (siehe C2.1.2.1 und C2.1.2.2). Erfolgte eine Hämagglutination, so sedimentierten die Erythrozyten verschwommen und der Überstand war rot gefärbt, anderenfalls zeigte sich ein deutliches Sediment derer mit farblosen Überstand. ConA = Concanavalin A, PHA-P = Phytohämagglutinin-P.

Es zeigte sich, dass sowohl mit Pycnogenol als auch mit dessen Fraktionen 2 – 4 eine Hämagglutination stattfand, siehe C2.1.2.2. Dabei wurde die minimale hämagglutinierende Konzentration als diejenige Analyten-Konzentration definiert, die noch eine Agglutination der Erythrozyten vermochte. Bei Pycnogenol lag diese mit 7,8 $\mu\text{g/mL}$ im Bereich der Konzentration der Positivkontrolle Concanavalin A, Fraktion 4 wies mit 39,1 $\mu\text{g/mL}$ eine ähnliche Potenz wie die zweite Positivkontrolle Phytohämagglutinin-P auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: Minimale hämagglutinierende Konzentrationen derjenigen Analyten, die eine positive Reaktion hervorriefen. ConA = Concanavalin A, PHA-P = Phytohämagglutinin-P. N = 3 in drei Untersuchungsreihen.

Substanz	Konzentration ($\mu\text{g/mL}$)
Pycnogenol	7,8
ConA	7,8
PHA-P	31,3
Fraktion 2	2.500
Fraktion 3	313
Fraktion 4	39,1

1.1.2.2 Inhibition der Hämagglutination durch Saccharide

Die Hemmung der Hämagglutination durch spezifische Kohlenhydrate beruht auf einer Bindung derer an Lektine bei vorheriger Zugabe, sodass diese die Erythrozyten nicht mehr quervernetzen und folglich agglutinieren können (Abbildung 14). Die Positivkontrolle Concanavalin A bindet hierbei spezifisch D-Mannose und D-Glucose ohne enzymatische

Aktivität (B1.1.1), wohingegen Phytohämagglutinin-P eine Spezifität für komplexe Oligosaccharide hat [214].

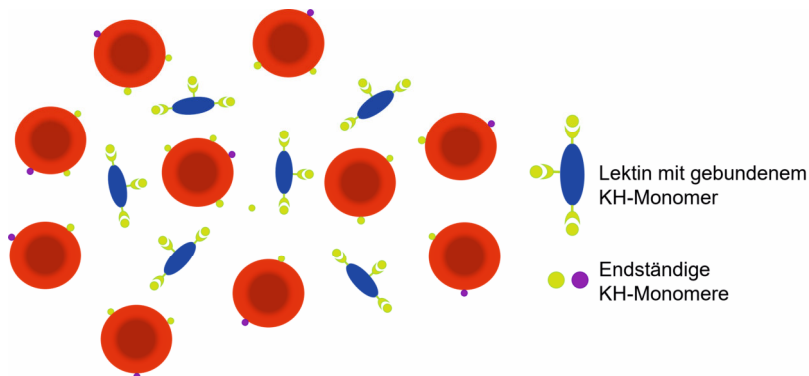


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Inhibition der Hämagglutination durch vorherige Zugabe einer spezifischen Kohlenhydrat-Lösung zum Lektin. Die Kohlenhydrat-Monomere binden an das Lektin und verhindern so die Hämagglutination durch bereits besetzte Bindungsstellen. KH = Kohlenhydrat. Abbildung modifiziert nach [213].

Es stellte sich heraus, dass im vorliegenden Assay D-Mannose, D-Xylose, D-Melibiose, D-Fructose und D-Glucose die Hämagglutination verstärkten, weswegen diese nicht weiter untersucht wurden. Keinen Einfluss auf die Agglutination der Erythrozyten hatten N-Acetyl-D-glucosamin, L-Rhamnose, D-Arabinose und L-Arabinose. Eine Inhibition der Hämagglutination zeigten nur D-Glucosamin-HCl und D-Galactose; hier konnte bei einer Pycnogenol-Konzentration von 0,04 mg/mL im Vergleich zur Referenz ohne Kohlenhydrat eine vollständige Hemmung hervorgerufen werden (Abbildung 15). Diese Konzentration wurde im Anschluss zur weiteren Untersuchung der minimal notwendigen Konzentration der beiden Saccharide zur vollständigen Aufhebung der Hämagglutination verwendet. Letztlich betrug die minimale Inhibitor-Konzentration bei D-Glucosamin-HCl 15 mg/mL und bei D-Galactose 150 mg/mL.

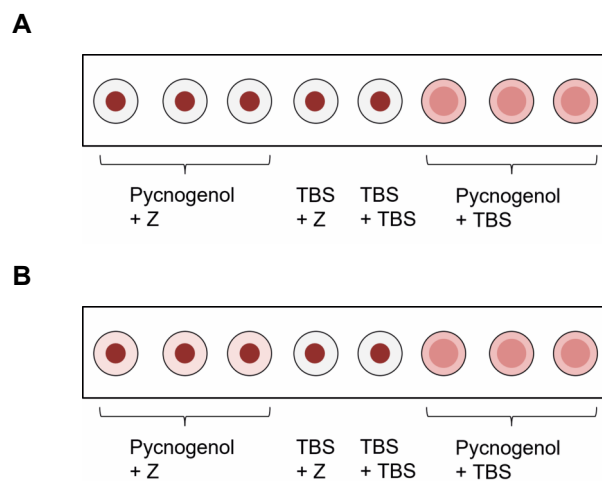


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer vollständigen (A) bzw. teilweisen (B) Inhibition der Hämagglutination durch den korrespondierenden Zucker Z bei einer Pycnogenol-Konzentration von 0,04 mg/mL. TBS = Tris-Puffer.

Für die Fraktionen 2 – 4 gelang keine reproduzierbare bzw. verlässliche Durchführung des Versuchsaufbaus, weswegen auf weitere Untersuchungen derer verzichtet wurde.

1.1.2.3 Isolierung eines Lektins aus Pycnogenol mittels Affinitätschromatographie

Die in B1.1.2.2 beschriebene Spezifität eines vermuteten Lektins in Pycnogenol für D-Galactose wurde sich beim Versuch der Isolierung bzw. Aufreinigung mittels einer Affinitätschromatographie zunutze gemacht. Die Affinitätschromatographie beruht auf einer reversiblen Bindung und späteren Elution eines Liganden, hier das Lektin, an eine spezifische immobilisierte Matrix, welche hier ein D-Galactose-gebundenes Agarose-Gel in einer Säule darstellte. Auf diese Art und Weise können ohne großen apparativen Aufwand Substanzen aus komplexen Matrices isoliert werden. Das Durchwandern des Säulenbetts durch die Lösungen erfolgte allein durch Schwerkraft; auf diesem Weg war es für das Monitoring der Lektin-Elution möglich, Fraktionen eines Volumens von je 1 mL zu sammeln. Ursprünglich war geplant über eine Messung der Absorption bei 280 nm diejenigen Fraktionen zu identifizieren, die das mutmaßliche Lektin enthalten. Die photometrische Erfassung von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm beruht vornehmlich auf der Absorption aromatischer Aminosäuren. Da jedoch die Entfernung der in Pycnogenol enthaltenen polyphenolischen Substanzen durch mehrere Waschschriffe nicht suffizient gelang und diese ebenfalls bei dieser Wellenlänge eine Absorption zeigen, wurde diese Überlegung verworfen (C2.1.4.2). Aus diesem Grund wurde mit allen Fraktionen ein Hämagglutinations-Assay analog C2.1.2.2 durchgeführt. Dabei zeigten zwar die verschiedenen Fraktionen trotz der Anwesenheit von D-Galactose eine mehr oder minder ausgeprägte Hämagglutination, allerdings auch die Wasch- und Konditionierlösung in Form von TBS (C2.1.4.1); die stärkste Reaktion zeigten dabei die Fraktionen 9 – 22. Daher konnte auch nach Durchführung des Hämagglutinations-Assay nicht mit Sicherheit gesagt bzw. differenziert werden, ob Pycnogenol ein D-Galactose spezifisches Lektin enthält und in welcher Fraktion der Affinitätschromatographie sich dieses befindet. Eine Proteinquantifizierung in ausgewählten Eluaten mit unterschiedlichen Agglutinations-Verhalten mittels Bradford-Assay (C2.1.4.4) zeigte keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt (Daten im tabellarischen Anhang D1.1.1). Ursprünglich sollten damit diejenigen Fraktionen identifiziert werden, die aufgrund einer ausgeprägteren Hämagglutination größere Mengen des Lektins enthalten. Diese Hypothese konnte demzufolge auf diesem Weg nicht bestätigt werden.

Als nächster Schritt wurde daher eine Ultrafiltration der Fraktionen erwogen, welche zudem die Entfernung der in der weiteren Charakterisierung interferierenden D-Galactose forcieren und zur Aufkonzentrierung der Probe führen sollte. Damit sollte eine eindeutige Proteinquantifizierung durch einen erneuten Bradford-Assay und die Bestimmung des Molekulargewichts des vermuteten Lektins mittels SDS-PAGE ermöglicht werden. Aufgrund der Volumenreduktion im Verlauf der Ultrafiltration kam es jedoch teilweise zu einer Verstopfung der Membran durch Pycnogenol-Bestandteile, weswegen auch dieses Vorhaben nur in

begrenztem Umfang möglich war. Exemplarisch wurde demzufolge eine ausgewählte Fraktion im Vergleich zu einer auf identische Weise ultrafiltrierte Pycnogenol-Lösung einer ursprünglichen Konzentration von 1 mg/mL einem Bradford-Assay unterzogen. Zwischen Pycnogenol und dem Konzentrat der Fraktion ergab sich kein Unterschied bezüglich der Protein-Konzentration (jeweils $0,1 \pm 0,04$ bzw. $\pm 0,007$ mg/mL, $n = 3$). Prinzipiell hat die Ultrafiltration unter den gewählten Bedingungen jedoch funktioniert, da der Proteingehalt der BSA-Probe außerhalb des Kalibrierbereichs lag und es somit hier zu einer Konzentrierung kam (siehe tabellarischer Anhang D1.1.2). Zum Abschluss der versuchten Charakterisierung wurden ausgewählte Fraktionen, Pycnogenol-Lösungen variabler Konzentrationen und Concanavalin A als Referenzprotein einer SDS-PAGE unterzogen. Beim Referenzprotein lag die Nachweisgrenze bei 1 ng pro Tasche. Weder bei Pycnogenol noch bei den Fraktionen gelang bei keinem Gel unterschiedlicher Bedingungen (C2.1.5.2) aufgrund der während des Färbeprozesses entstandenen intensiven braunen Hintergrundfärbung die Detektion eines Lektins. Aufgrund der nicht zielführenden Ergebnisse wurde schließlich beschlossen dieses Vorhaben einzustellen.

1.1.3 Diskussion

Die Ergebnisse belegten, dass es zwar Hinweise auf die Anwesenheit von Lektinen in Pycnogenol gab, nämlich in Form der Agglutination der Erythrozyten und der Inhibition derselben durch D-Glucosamin und D-Galactose; eine weitere Charakterisierung bzw. Isolierung misslang jedoch. Zwar ist das beobachtete Verhalten im Hämagglutinations-Assay typisch für Lektine, allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass andere Substanzen diesen Effekt hervorgerufen oder mit dem Assay interferiert haben. In Immunoassays sind beispielsweise sogenannte Matrixeffekte von großer Bedeutung. Insbesondere durch komplexe Matrices kann das Ergebnis unspezifisch verfälscht werden, ohne die interferierenden Substanzen exakt zu kennen [215]. Ähnliches ist auch für den Hämagglutinations-Assay denkbar, auch wenn dieser nicht auf immunologischen Prinzipien basiert. Eine weitere Möglichkeit für eine positive Reaktion trotz der Abwesenheit von Lektinen ist die Quervernetzung der Erythrozyten durch die Polyphenole selbst [216]. Wie ausführlich auch in A1.4.1 und B3.2.1 geschildert, können Polyphenole mit Proteinen zahlreiche kovalente und nicht-kovalente Interaktionen eingehen, was überdies auch für Lipide und Kohlenhydrate gilt [217-219]. Phenolsäuren wie Ferulasäure und Kaffeesäure sind nach der vorangegangenen Oxidation zu Chinonen in der Lage Proteine zu vernetzen [220]. Bei Pérot et al. reduzierten vornehmlich Cranberry-Procyanidine durch die Interaktion mit dem Weizenprotein Gliadin die Immunreaktion auf diesen Gluten-Bestandteil [221]. Quercetin zeigte in den Untersuchungen von Wu et al. eine Inhibition der Infektion mit dem Influenza-Virus via Bindung an das Oberflächenprotein/Lektin Hämagglutinin (B1.1.1) [222]. Die Annahme, dass die detektierte Hämagglutination durch Polyphenole und nicht durch Lektine verursacht wurde, würde allerdings nicht die spezifische Inhibition durch

D-Glucosamin und D-Galactose erklären. Diese Beobachtung könnte aber genutzt werden, um einen zukünftigen Versuchsaufbau zu planen. Mittels eines Sandwich-ELISA erfassten Wang et al. unbekannte Lektine aus verschiedenen Pflanzenextrakten [223]. In diesem Fall fungierten spezifische Kohlenhydrat-Polymere sowohl als immobilisierte Antikörper als auch als biotinylierte Fangantikörper, sodass die Anwesenheit eines Lektins mittels Streptavidin-Meerrettichperoxidase und Tetramethylbenzidin als Substrat nachgewiesen werden konnte. Bis dahin ist aber eine valide Aussage zur Anwesenheit von Lektinen in Pycnogenol nicht möglich.

1.2 Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile auf die Atmungskette in vitro

1.2.1 Hintergrund und Fragestellung

Die Atmungskette stellt einen wesentlichen Bestandteil bei der aeroben, eukaryotischen Energiegewinnung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) dar und besteht aus vier verschiedenen an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Proteinkomplexen I – IV. In vorherigen Reaktionszyklen werden durch Oxidation der Makronährstoffe Lipide, Kohlenhydrate und Proteine Coenzyme gewonnen, die dort als Elektronendonatoren fungieren und somit den Elektronentransport innerhalb der Atmungskette durch Redoxreaktionen katalysieren. Der vierte und letzte Komplex überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wodurch dieser in Anwesenheit von Protonen zu Wasser reduziert wird. Durch den Elektronentransport der Atmungskette entsteht gleichzeitig ein Protonengradient zwischen mitochondrialer Matrix und Intermembranraum. Dieser Gradient ist letztlich der Treiber für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP durch die ATP-Synthase, deren Funktion somit eng an die der Komplexe I – IV gekoppelt ist. Der komplette Prozess aus Elektronentransport in der Atmungskette durch vorherige Oxidation von Makronährstoffen und ATP-Synthese wird demnach als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (Abbildung 16) [123].

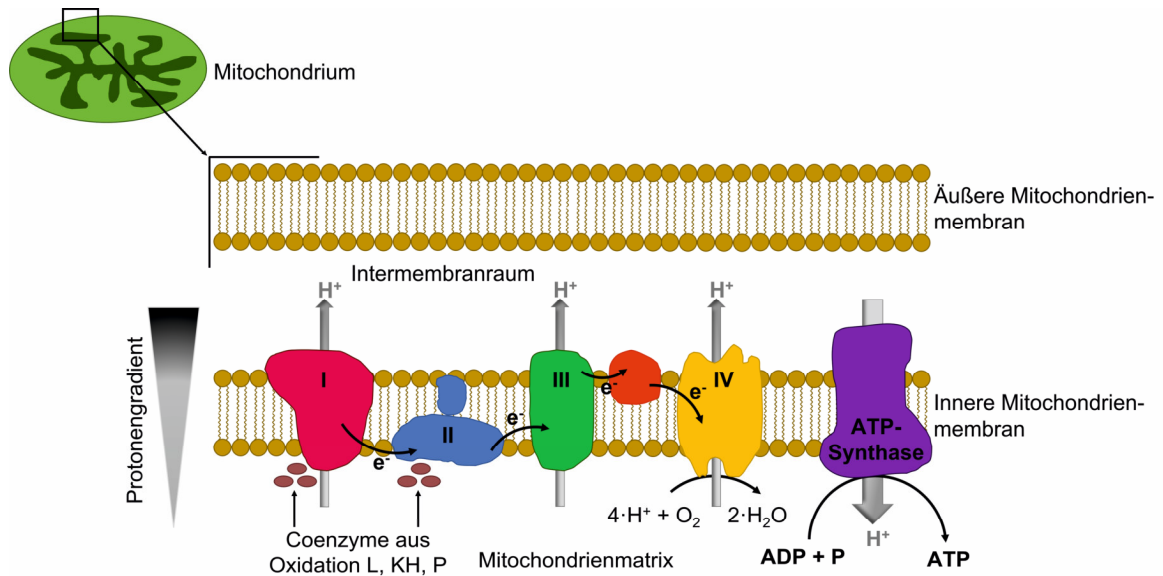


Abbildung 16: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Energiegewinnung von Eukaryoten in Form von ATP in Mitochondrien durch Kopplung von Atmungskette und ATP-Synthase. I – IV: Komplexe der Atmungskette, L, KH, P: Lipide, Kohlenhydrate, Proteine. Abbildung modifiziert nach [123].

Mitochondrien spielen aber nicht nur eine wichtige Rolle bei der ATP-Produktion, sondern sind unter anderem beteiligt an der Apoptose, der Regulation des Calcium-Stoffwechsels und der Synthese von Porphyrinen, welche Grundgerüste für zahlreiche essentielle Proteinkomplexe darstellen, z. B. dem Hämoglobin [224, 225]. Mitochondrien besitzen eine eigene DNA, auf der Gene für viele Bestandteile der Atmungskette lokalisiert sind [123].

Bei der oben beschriebenen Elektronenübertragung auf O_2 an Komplex IV der Atmungskette entstehen als Zwischenschritt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), nämlich das Superoxidion bzw. das Peroxid. Im Körper stellen Mitochondrien die bedeutendste Quelle für ROS dar [226]. Unter physiologischen Bedingungen werden diese allerdings nahezu komplett zu Wasser reduziert oder anderweitig detoxifiziert. Kommt es aber zu einer mitochondrialen Dysfunktion oder werden durch die Zufuhr exogener Noxen oder durch ischämische Ereignisse vermehrt ROS gebildet, so können zelluläre Strukturen oxidiert und geschädigt werden („oxidativer Stress“). Dies wurde bereits in A2.2.3 im Detail beschrieben und aus diesem Grund sind neben kardiovaskulären Erkrankungen auch COPD oder neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson mit ROS assoziiert [227-231]. In A1.3 wurde erläutert, dass Pycnogenol mit zahlreichen positiven Effekten sowohl in vitro als auch in vivo in Verbindung steht. Besonders hervorzuheben ist im Kontext von Mitochondrien bzw. neben der antioxidativen Wirkung von polyphenolischen Substanzen auch die Fähigkeit als Radikalfänger zu wirken [232-234]. Aufgrund der heterogenen Pathogenese von Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung ist die Identifikation möglicher Wirkstoffe jedoch eine Herausforderung. Bislang häufig untersucht innerhalb der Klasse der Polyphenole wurde Resveratrol [235]. Bei Pallas et al. stimulierte Resveratrol das Enzym SIRT1, welches wiederum Transkriptionsfaktoren der mitochondrialen Biogenese aktiviert [236].

In vitro hemmte Resveratrol die Bildung von ROS nach inflammatorischer Stimulation der Colonkarzinom-Zellen HT-29 stärker als 5-Aminosalicylsäure, ein zur Therapie von Colitis ulcerosa eingesetzter antiinflammatorischer Wirkstoff; zudem verringerte Resveratrol die Expression von COX-2 [237]. Robb et al. konnten in vitro zeigen, dass Resveratrol nicht nur selbst antioxidativ wirkt, sondern durch die Induktion der mitochondrialen Superoxid-Dismutase auch die Detoxifizierung innerhalb der Zelle durch dieses Enzym verbessert [238]. Resveratrol ist innerhalb der Polyphenole der Klasse der Stilbene zuzuordnen (siehe auch A1.1); diese kommen zwar nicht in Pycnogenol vor, jedoch bestand durchaus die Möglichkeit, dass die bei Resveratrol beobachtete Bioaktivität ein Klasseneffekt ist und damit grundsätzlich auch bei anderen polyphenolischen Substanzen zu beobachten sein könnte. Deswegen sollten Pycnogenol und ausgewählte Bestandteile hinsichtlich der Wirkung auf die Atmungskette charakterisiert werden.

1.2.2 Ergebnisse

Der zur Überprüfung des Einflusses von Pycnogenol, M1, Ferulasäure und Taxifolin auf die Atmungskette eingesetzte Assay beruhte auf dem Prinzip der Lumineszenz (siehe C2.2.3). Dabei wurde initial durch die Lyse humaner kolorektaler Adenokarzinomzellen (CaCo-II) mitochondriales ATP freigesetzt. Im Anschluss setzte eine rekombinant-hergestellte Luciferase dieses und das Substrat Luciferin mit Sauerstoff zu Oxyluciferin, Adenosinmonophosphat und CO₂ um, wobei Energie in Form von emittiertem Licht frei wurde. Dieses Lichtsignal konnte durch ein Luminometer erfasst werden (Abbildung 17).

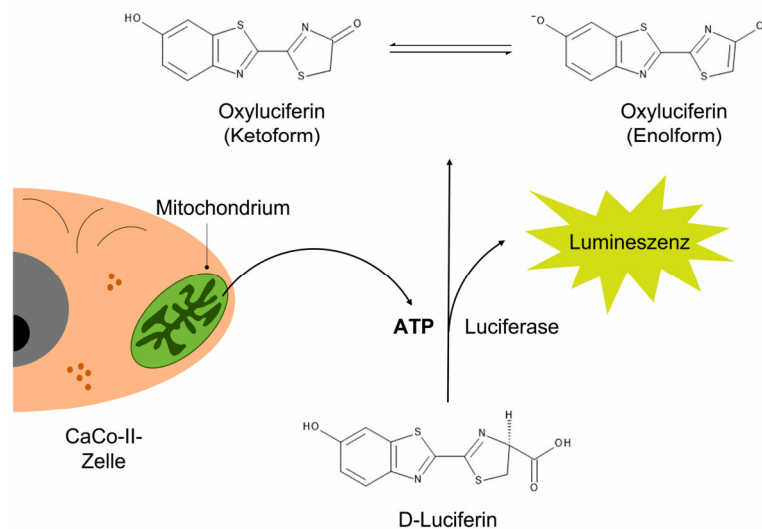


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Reaktion während des Lumineszenz-Assays zur Überprüfung des Einflusses von Pycnogenol und dessen Bestandteilen auf die Atmungskette.

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Pycnogenol, M1, Ferulasäure und Taxifolin (jeweils 25 µg/mL, n = 6) auf die Funktion der Atmungskette in Form von ATP im Vergleich zur Negativkontrolle. Einzig Resveratrol in einer Konzentration von 23 µg/mL führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der

mitochondrialen ATP-Produktion ($119 \pm 7 \%$, $n = 6$, Abbildung 18). Die bei Resveratrol eingesetzte Konzentration von $23 \mu\text{g/mL}$ entspricht $100 \mu\text{M}$, welche in der Literatur eine mitochondriale Dysfunktion verhinderte [239].

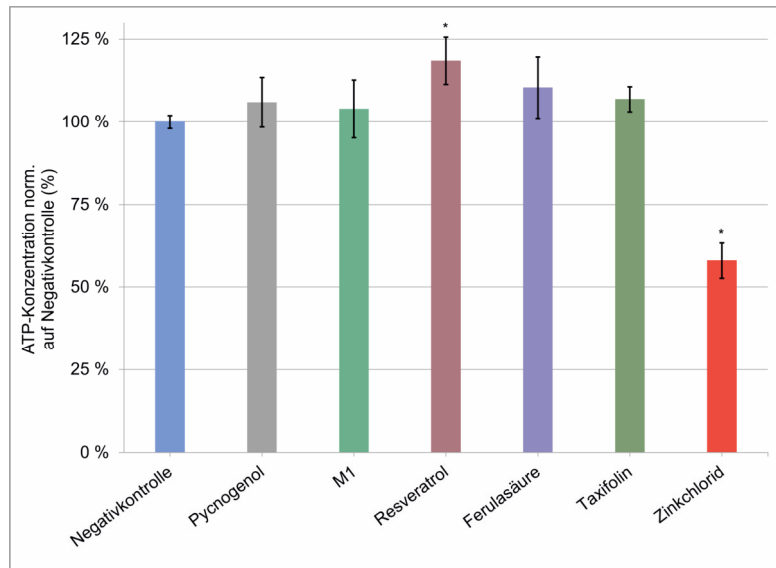


Abbildung 18: Einfluss der sechsständigen Inkubation von $25 \mu\text{g/mL}$ Pycnogenol, M1, Ferulasäure und Taxifolin auf die Atmungskette in Form der ATP-Produktion. Die bestimmten ATP-Konzentrationen wurden auf die Negativkontrolle normiert (%). Resveratrol $23 \mu\text{g/mL}$ fungierte als Positivkontrolle. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 6$). *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test). Negativkontrolle = unbehandelte Zellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nachfolgend exemplarisch untersucht werden, ob eine mögliche Wirkung der polyphenolischen Substanzen ausschließlich in Anwesenheit von exogenen Noxen zu beobachten ist. In Anlehnung an Carrasco-Pozo et al. wurde hierfür Indometacin ausgewählt, da Quercetin und Resveratrol der durch Indometacin hervorgerufenen mitochondrialen Dysfunktion entgegenwirkten [239, 240]. Indometacin gehört zu den nicht-steroidalen Antiphlogistika, hemmt unselektiv COX-1 und COX-2 und verursacht dadurch die für diese Arzneistoffklasse typischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen in Form von beispielsweise gastrointestinalen Läsionen [241]. Für die Untersuchungen dazu wurden alle Schritte analog zu C2.2.3.2 und C2.2.3.3 durchgeführt, wobei jedoch die Zellen insgesamt für 60 Minuten mit den Substanzen und $50 \mu\text{M}$ Indometacin bzw. ohne als Kontrolle inkubiert wurden (Abbildung 19, Daten im tabellarischen Anhang D1.2).

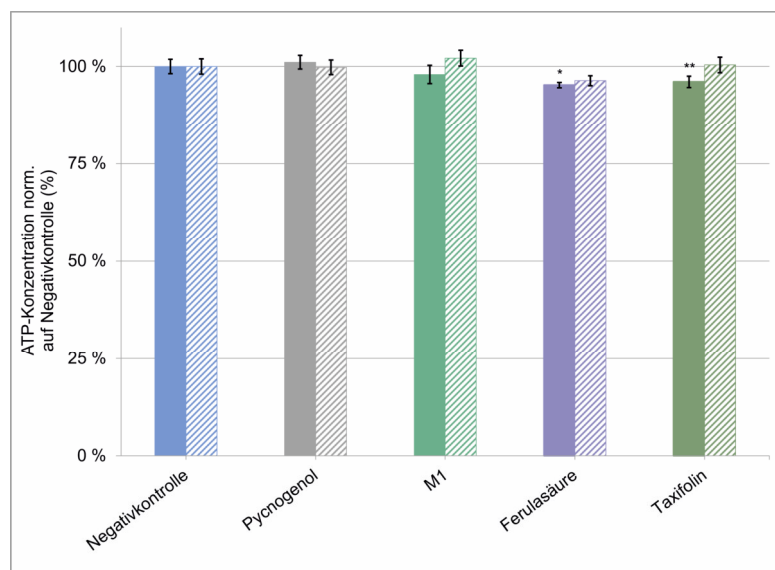


Abbildung 19: Einfluss der 60-minütigen Inkubation von 25 µg/mL Pycnogenol, M1, Ferulasäure und Taxifolin auf die Atmungskette in Form der ATP-Produktion in Anwesenheit von 50 µM Indometacin (linke Säule) bzw. in Abwesenheit (rechte, gemusterte Säule) als Kontrolle. Die bestimmten ATP-Konzentrationen wurden auf die Negativkontrolle normiert (%). Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar (n = 3). *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz. **: Ergebnis statistisch signifikant, Probe ohne Indometacin-Inkubation als Referenz (p < 0,05, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test). Negativkontrolle = Zellen ohne Polyphenol-Inkubation.

Dabei konnte durch die simultane Inkubation mit Indometacin keine verringerte mitochondriale ATP-Produktion induziert werden. Dies war insofern überraschend, da im Vergleich zu Carrasco-Pozo et al. die Zellen dreimal so lange mit Indometacin behandelt wurden. Ferulasäure alleine bewirkte im Gegensatz zum vorherigen Versuch eine statistisch signifikant geringere ATP-Bildung ($95 \pm 1 \%$, n = 3), wobei das Ausmaß vergleichsweise gering war und deswegen nicht von einer Relevanz ausgegangen wurde. Bei Taxifolin zeigte sich überdies bei der Co-Inkubation mit Indometacin im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Synthese von ATP ($100 \pm 2 \%$ bzw. $96 \pm 1 \%$, n = 3). Gleichwohl war auch hier nicht von einer Relevanz auszugehen. Weitere Untersuchungen wurden als nicht zielführend erachtet und deswegen zugunsten anderer Vorhaben verworfen. Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Kontamination mit Mykoplasmen detektiert (C2.2.2.5).

1.2.3 Diskussion

Bei den Untersuchungen zur mitochondrialen Bioaktivität von Pycnogenol und der Substanzen M1, Ferulasäure und Taxifolin konnte kein relevanter Effekt beobachtet werden, weder alleine noch in Anwesenheit von Indometacin als exogene Noxe (B1.2.2). Unter dem Einfluss von Taxifolin zeigte sich zwar bei gleichzeitiger Indometacin-Stimulation eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte ATP-Synthese, allerdings nicht über diejenige der Negativkontrolle hinaus. Dies stand zumindest im Einklang mit den Ergebnissen von Dorta et al., wo Taxifolin in isolierten Rattenmitochondrien keinen Einfluss auf die ATP-Konzentration hatte [242]. Die erhaltenen Daten zu Ferulasäure waren nicht eindeutig; teilweise konnte eine

verringerte mitochondriale Funktion festgestellt werden. Die Relevanz schien jedoch aufgrund des geringen Ausmaßes fraglich. Erwartungsgemäß konnte Resveratrol als Positivkontrolle die ATP-Produktion signifikant steigern. Damit konnte zumindest davon ausgegangen werden, dass der Assay grundsätzlich geeignet war, um einen Einfluss der untersuchten Polyphenole auf die Atmungskette festzustellen. Überdies gilt der ATP-Assay in der Literatur als anerkannter und empfindlicher Assay zur Untersuchung der Zellviabilität [243, 244]. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung in der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass polyphenolische Substanzen ihre antioxidative Wirkung entfalten, indem sie nicht direkt mit ROS interagieren, sondern intrazelluläre Signalwege beeinflussen; wenn dieser Effekt erst nach einer gewissen Latenzzeit zum Tragen kommt, dann war die Inkubationszeit von sechs Stunden ungenügend [245, 246]. Hingegen zeigen aktuellere Daten, dass selbst die deutlich niedrigeren in vivo erreichten Konzentrationen suffizient sind, um Radikale effizient zu inaktivieren [247]. In Untersuchungen von Nauser et al. zum Mechanismus waren nicht die OH-Gruppen für die radikalfangenden Eigenschaften von Polyphenolen (z. B. Morin) verantwortlich, sondern aromatische Gruppen, indem sie mit C-zentrierten Radikalen reagierten [248]. Dieser Aspekt ist insofern interessant, weil somit auch sulfatierte oder glucuronidierte Metabolite als mögliche bioaktive Strukturen infrage kommen (B3.4.9, B4). Interessant dazu sind die Beobachtungen von Kawai et al. [249]. Zumindest die Aktivität einer Glucuronidase war bei mitochondrialer Dysfunktion erhöht, wodurch das Quercetin-Glucuronid hydrolysiert und in die Zellen aufgenommen wurde und dort antiinflammatorisch wirkte. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis von Fiorani et al., dass sich Quercetin in vitro deutlich in Mitochondrien anreicherte und vor freien Radikalen schützte [250]. Da sowohl Sulfatasen als auch Glucuronidasen ubiquitär vorkommen, erscheint eine Übertragbarkeit auf Polyphenole durchaus plausibel. Skemiene et al. untersuchten den Einfluss von verschiedenen Anthocyanen auf isolierte Rattenmitochondrien, welche zuvor ischämischen Bedingungen ausgesetzt waren; Cyanidin-3-Glucosid fungierte als Elektronenakzeptor, wodurch die Funktion der Atmungskette trotz vorangegangenen Sauerstoffmangels aufrechterhalten werden konnte [251]. Dies könnte ein spannender Aspekt bei mit ischämischen Episoden einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen sein, wie zum Beispiel Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Ähnliche Effekte sind somit auch für andere Polyphenole denkbar. Dazu müssen aber weitere Untersuchungen erfolgen, die insbesondere auch den molekularen Mechanismus der protektiven Wirkung auf Mitochondrien berücksichtigen, wenn die ATP-Produktion kein suffizienter Surrogat-Parameter dafür ist. Bestrebungen dazu haben Moini et al. angestellt [252]. Interessanterweise hemmte zwar Pycnogenol in einer Konzentration von 50 µg/mL den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in vitro, allerdings nicht die einzelnen Bestandteile Taxifolin oder Catechin. Die Bioaktivität von Pycnogenol erstreckte sich dabei auf alle Komplexe. Es gelang zwar keine Aufklärung des exakten Mechanismus, die Untersuchungen ließen jedoch den Schluss zu, dass andere Bestandteile des Kiefernextraktes für die detektierte Wirkung verantwortlich sein

mussten. Auf den ersten Blick scheint der Mitochondrien-inhibierende Effekt irritierend, so führt er doch zu einer verringerten Energieproduktion, welche im äußersten Fall den Zelluntergang induziert [253]. Therapeutisch bereits genutzt wird diese Wirkung allerdings beim oralen Antidiabetikum Metformin, welches den Komplex I der Atmungskette hemmt und dadurch über folgende Signalkaskaden die hepatische Gluconeogenese vermindert [254, 255]. Dieser Aspekt könnte sich auch bei der Entwicklung von neuartigen, zytostatisch wirksamen Arzneimitteln zunutze gemacht werden, sogenannte Mitocane in der Onkologie oder in der Infektiologie [256]. Therapeutisch bereits eingesetzt wird beispielsweise Bedaquilin als Hemmstoff der mykobakteriellen ATP-Synthase bei (multi-)resistenter Tuberkulose [257]. Der Inhibitor IACS-010759 des Komplexes I befindet sich aktuell in Phase I einer Klinischen Studie und ist vorgesehen zur Therapie von akuten myeloischen Leukämien (AML) [258]. Die Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen sowie die daraus resultierenden möglichen Einsatzgebiete von polyphenolischen Substanzen wären somit dementsprechend äußerst vielseitig.

2 Pharmakokinetische Studie mit oraler Mehrfachgabe von Pycnogenol

2.1 Diätvorgaben

Wie bereits in A1.1 im Detail geschildert, kommen Polyphenole als sekundäre Naturstoffe ubiquitär in der Nahrung vor. Damit also detektierte Analyten in humanem Serum eindeutig auf die Einnahme von Pycnogenol und nicht auf etwaige Nahrungsbestandteile zurückzuführen waren, war eine polyphenolfreie Diät vor Beginn und während der Klinischen Studie notwendig. Als Nahrungsmittel und Getränke erlaubt waren ausschließlich Wasser, Kefir, Hart- und Weichkäse, Naturjoghurt und weitere vergleichbare Milchprodukte sowie Fleisch, Schinken, Butter, Weißbrot und Eier. Mit der Diät musste bereits 48 Stunden vor Beginn der Studie bzw. vor Abnahme der ersten Blutprobe begonnen werden, damit noch im Blut befindliche Polyphenole aus der Nahrung eliminiert werden konnten (Wash-out). Basierend auf vorangegangenen Daten [70, 259] und Literaturangaben [2] wurde angenommen, dass dieser Zeitraum auch für bislang noch nicht identifizierte Bestandteile und Metabolite ausreichend sein sollte. Zur Überprüfung der Adhärenz mit den Diätvorgaben wurden die Studienteilnehmenden angehalten, ein Ernährungsprotokoll zu führen.

2.2 Kollektiv der Studienteilnehmenden

Die fünfzehn Proband*innen der Klinischen Studie waren freiwillige und gesunde Frauen und Männer im Alter von 28 bis 46 Jahren (36 Jahre \pm 5,7 Jahre). 47 % der Teilnehmenden waren Frauen; der Body Mass Index (BMI) betrug dabei 26,3 kg/m² (\pm 3,3 kg/m²), somit war das Kollektiv im Durchschnitt eher übergewichtig (Tabelle 2). Vor Einschluss in die Studie wurde eine körperliche Untersuchung zur Erfassung des Gesundheitsstatus durchgeführt. Zudem wurde das körperliche Befinden einmalig vor Beginn und während der Studie täglich in Form eines Protokolls dokumentiert.

Die Studie wurde unter dem Titel „Identifizierung und Quantifizierung neuer Bestandteile und Metabolite eines Rindenextraktes der Meeres-Kiefer (Pycnogenol) in menschlichem Blut nach oraler Einnahme“ von der Ethikkommission nach ICH GCP 135/95 der Medizinischen Fakultät der Comenius Universität Bratislava, Slowakei, genehmigt.

Tabelle 2: Basischarakteristika der fünfzehn Studienteilnehmenden.

Nr.	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)	Nr.	Ge- schlecht	Alter (Jahre)	BMI (kg/m ²)
1	♀	28	23,0	9	♂	30	28,6
2	♂	31	23,2	10	♂	41	30,0
3	♀	40	25,9	11	♂	42	24,7
4	♂	33	24,8	12	♀	36	24,7
5	♂	46	25,3	13	♀	28	24,0
6	♂	40	30,9	14	♀	30	34,0
7	♀	33	27,3	15	♂	39	25,8
8	♀	39	21,9	-	-	-	-

2.3 Ablauf der Klinischen Studie und Probengewinnung

Die Studienphase erstreckte sich über einen Zeitraum von vier Tagen, zwei zusätzliche Tage vor Studienbeginn dienten dem Wash-out (B2.1). Jedem Teilnehmenden wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die erste Blutabnahme (D1-S1) erfolgte am ersten Tag unmittelbar vor Beginn der Einnahme von Pycnogenol. Diese diente bei der späteren Auswertung als Referenzprobe, in der keine Polyphenole zu detektieren sein sollten. Analyten, die nicht in dieser Referenz, aber in mindestens einer der anderen drei verbleibenden Proben nachgewiesen wurden, waren demzufolge sehr wahrscheinlich auf die Einnahme von Pycnogenol zurückzuführen (B3.3). Nach der ersten Blutentnahme wurde die erste Dosis von 200 mg Pycnogenol (Initialdosis) verabreicht. Die Studienteilnehmenden waren angehalten, die Kapseln mit reichlich Wasser zu schlucken. Zwei Stunden nach Einnahme der Initialdosis erfolgte die zweite Blutentnahme (D1-S2). Die dritte Blutprobe (D1-S3) wurde zehn Stunden nach der Gabe der Initialdosis gewonnen. Nach der initialen Dosis wurden jeweils 100 mg Pycnogenol zweimal pro Tag oral angewendet, bis am vierten Tag 4 Stunden nach der letzten Einnahme von Pycnogenol die letzte Blutprobe (D4-S4) gewonnen wurde (Abbildung 20).

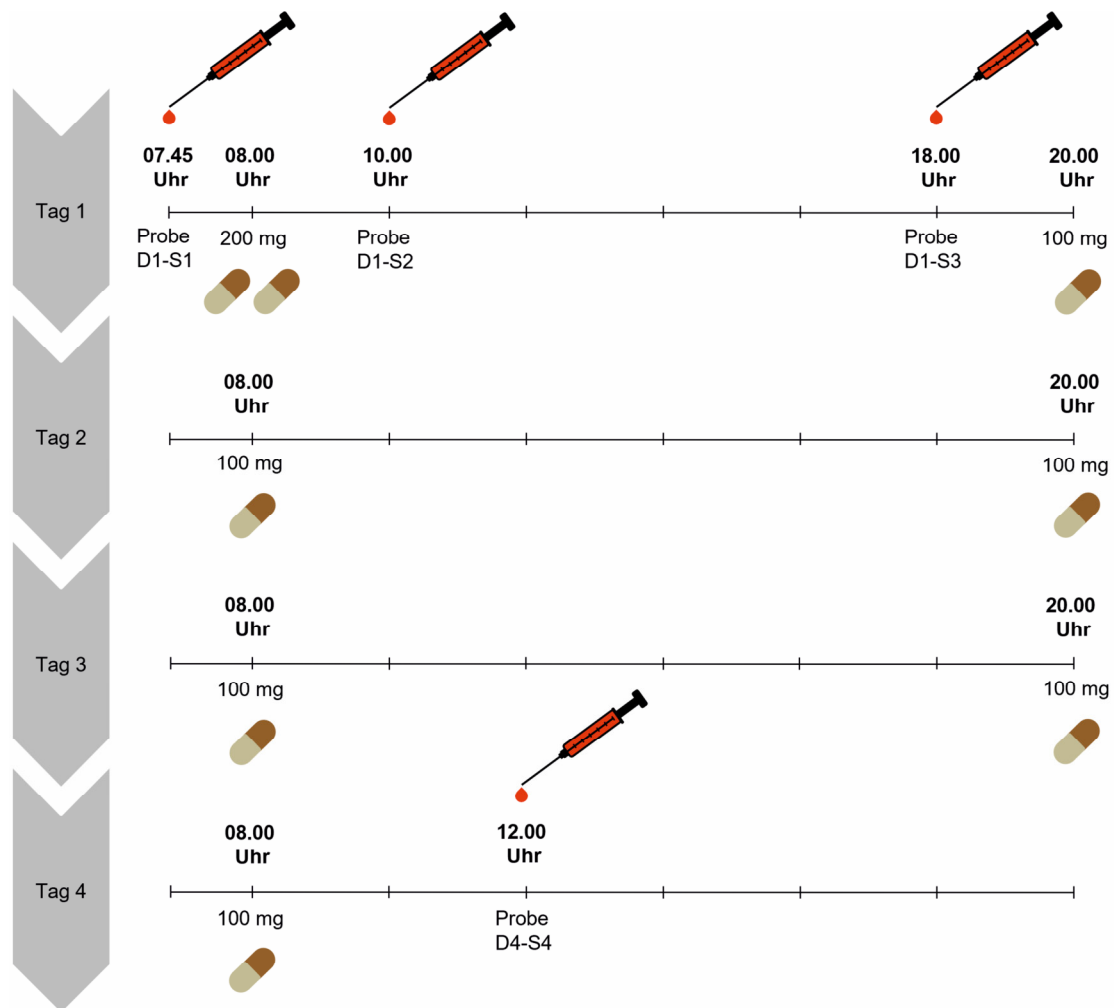


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Ablaufs der Probengewinnung in der klinischen Studie über insgesamt vier Tage mit vorangegangener zweitägiger polyphenolfreier Ernährung.

Grimm et al. konnten in einer früheren ähnlich konzipierten pharmakokinetischen Studie nach der Einnahme von Pycnogenol zehn bis heute noch nicht identifizierte Analyten in humanem Plasma nachweisen [70]. Diese Substanzen zeigten in deren Untersuchungen eine ausgeprägte interindividuelle Heterogenität; zum einen konnte nicht jede bei allen Teilnehmenden nachgewiesen werden, zum anderen war auch das Ausmaß verschieden, in dem diese bei den Proband*innen detektiert werden konnten. Außerdem wiesen die Substanzen selbst ein divergierendes pharmakokinetisches Verhalten auf. Die Zeitpunkte des maximalen Ausmaßes im Plasma (t_{\max}) nach Einmalgabe reichten von vier Stunden bis hin zu zwölf Stunden; teilweise war t_{\max} aufgrund großer Variabilität jedoch nicht eindeutig zu bestimmen. Diesen Aspekten wurde mit der Auswahl der Probenzeitpunkte in der vorliegenden Arbeit Rechnung getragen. Bei der Probe D1-S2 ($t = 2$ h) war davon auszugehen, dass Resorption und Verteilung von Pycnogenol-Bestandteilen abgeschlossen waren. Somit wurde angenommen, dass in dieser Probe vornehmlich Bestandteile und Metabolite mit früher t_{\max} zu detektieren waren. Bekanntermaßen unterliegen Polyphenole einem ausgeprägten mikrobiellen Metabolismus durch das gastrointestinale Mikrobiom; diese Metabolite werden mit einer gewissen Latenzzeit gebildet und sind daher erst verzögert im Blut bzw.

Serum nachzuweisen (siehe auch A1.4) [69, 75, 77, 260]. Die Detektion dieser Metabolite und von Substanzen mit spätem t_{\max} sollte mit der Probe D1-S3 ($t = 10$ h) gelingen. Schließlich sollte die letzte Blutprobe D4-S4 ($t = 4$ h nach letztmaliger Einnahme) Aufschluss über Substanzen im Steady State geben.

Zu jedem Zeitpunkt wurde etwa 20 mL Blut entnommen, Serum und Blutzellen wurden getrennt, aliquotiert und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert (C3.4.1).

Keine*r der Studienteilnehmenden berichtete über relevante unerwünschte Wirkungen oder Veränderungen des Gesundheitszustandes.

3 Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol

3.1 Bereits in Humanserum detektierte Analyten nach der Einnahme von Pycnogenol

Wie schon in A1.2 geschildert, ist die Zusammensetzung von Pycnogenol weitestgehend bekannt. Durch variable Bioverfügbarkeit, heterogenen Metabolismus, hepatisch und enteral durch das Darmmikrobiom, sowie analytischer Zugänglichkeit sind diese bekannten Bestandteile allerdings nicht zwangsläufig diejenigen, die nach der Pycnogenol-Einnahme in humanem Serum detektiert werden können. Grimm et al. charakterisierten als Erste umfassend das pharmakokinetische Profil in Humanplasma nach der oralen Einmal- und Mehrfachgabe von Pycnogenol [70]. Dabei konnten insgesamt 15 Analyten erfasst werden, nämlich (+)-Catechin, Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M1, Abbildung 21) und 10 unbekannte Substanzen, deren Charakteristika bereits in B2.3 beschrieben wurden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass diese unbekannt Polyphenole p-Coumarsäure, (-)-Epicatechin, Gallussäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure, oder (δ -(3-Methoxy-4-hydroxy-phenyl)- γ -valerolacton (M2) darstellen.

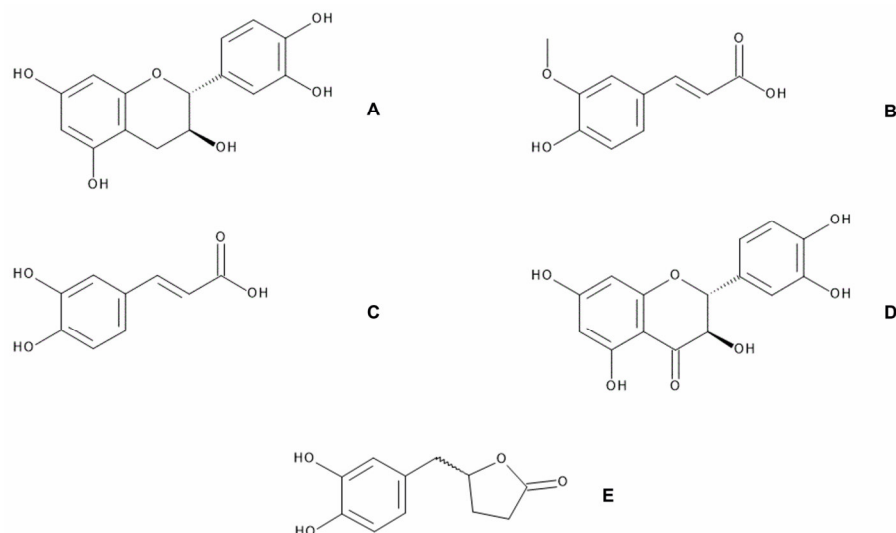


Abbildung 21: Strukturen der nach Pycnogenol-Einnahme bereits in Humanplasma nachgewiesenen Substanzen (+)-Catechin (A), Ferulasäure (B), Kaffeesäure (C), Taxifolin (D) und δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M1, E).

Auch Mülek et al. betrachteten im Rahmen einer klinischen Studie die Pharmakokinetik von Pycnogenol-Bestandteilen und -Metaboliten in Humanserum nach einer mehrwöchigen Gabe [261]. Sie konnte die genannten Substanzen nicht nur nachweisen, sondern auch mit einer weiteren analytischen Methodik (LC-MS/MS) quantifizieren. Dennoch blieb unklar, welcher Natur die 10 unbekannt Substanzen aus den Untersuchungen von Grimm et al. waren.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Probenvorbereitung

Für alle im Nachfolgenden geschilderten Vorversuche (C3.2.5, C3.2.6) wurden Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und M1 als beispielhafte Substanzen verwendet. Damit sollte sichergestellt werden, dass die angewandten Bedingungen und Methoden grundsätzlich für diverse Polyphenole funktionieren. Es konnte zumindest von einer teilweisen Übertragbarkeit auf bislang nicht identifizierte Verbindungen ausgegangen werden. Sulfatierte oder glucuronidierte Vergleichssubstanzen standen zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung (A1.4.2). Polyphenolische Analyten gelten zwar aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Hydroxy-Gruppen als eher polare Substanzen, für Wechselwirkungen mit Proteinen scheinen aber eher die hydrophoben Bereiche in Form der Aromaten im Molekül maßgeblich verantwortlich zu sein [262, 263]. Daneben spielen aber auch Wasserstoffbrücken oder die Reaktion oxidierter Hydroxygruppen von Polyphenolen mit nukleophilen Aminosäuregruppen eine Rolle [264]. Da Polyphenole insgesamt als sauer einzuschätzen sind [265], erschien es plausibel durch Säurezugabe während der Proteinvorbereitung die Interaktion der Polyphenole mit Serumproteinen (vornehmlich Albumin) zu minimieren, um eine möglichst hohe Ausbeute von insbesondere konjugierten Polyphenolen bei der Probenvorbereitung zu erreichen [266-268]. Wie in Abbildung 22 dargestellt, hatte die initiale Ameisensäure-Konzentration in Humanserum vor der Zugabe von Methanol als Agens zur Proteinfällung interessanterweise bei Ferulasäure und Kaffeesäure keinen relevanten Einfluss, was auch unabhängig vom eingesetzten Methanolvolumen war. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung könnte eine grundsätzlich geringe Serumproteinbindung dieser Substanzen sein oder eine geringe Affinität bei der Bindung, die allein durch Methanol aufgehoben werden konnte; denkbar ist auch eine ausgeprägte konstante Proteinbindung, auf die die Säurekonzentration keinen Einfluss hatte [269]. Der Catechin-Metabolit M1 zeigte durchgehend das beste Extraktionsverhalten bei einer Ameisensäure-Konzentration von 0,5 %. Am deutlichsten manifestierte sich die Auswirkung der Säurekonzentration bei Taxifolin, wo wie bereits für Ferula- und Kaffeesäure beobachtet, das eingesetzte Methanolvolumen ebenfalls keine Rolle spielte. Im Vergleich zur nicht-angesäuerten Probe vervielfachte sich das Peakflächenverhältnis von Analyten zu internem Standard etwa um den Faktor 4 – 7, was für eine durch Säure beeinflussbare, ausgeprägte Proteinbindung sprach. Da Taxifolin aufgrund des aromatischen Grundgerüsts (Abbildung 21) im Vergleich zu den anderen Polyphenolen lipophiler ist, korrelierte dies gut mit den beteiligten hydrophoben Bindungen [262] und den Beobachtungen von Xiao et al. [270]. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde beschlossen, das Humanserum der Klinischen Studie initial mit 0,5 % Ameisensäure zu versetzen, um eine verbesserte Extraktion durch verminderte Proteinbindung zu erreichen.

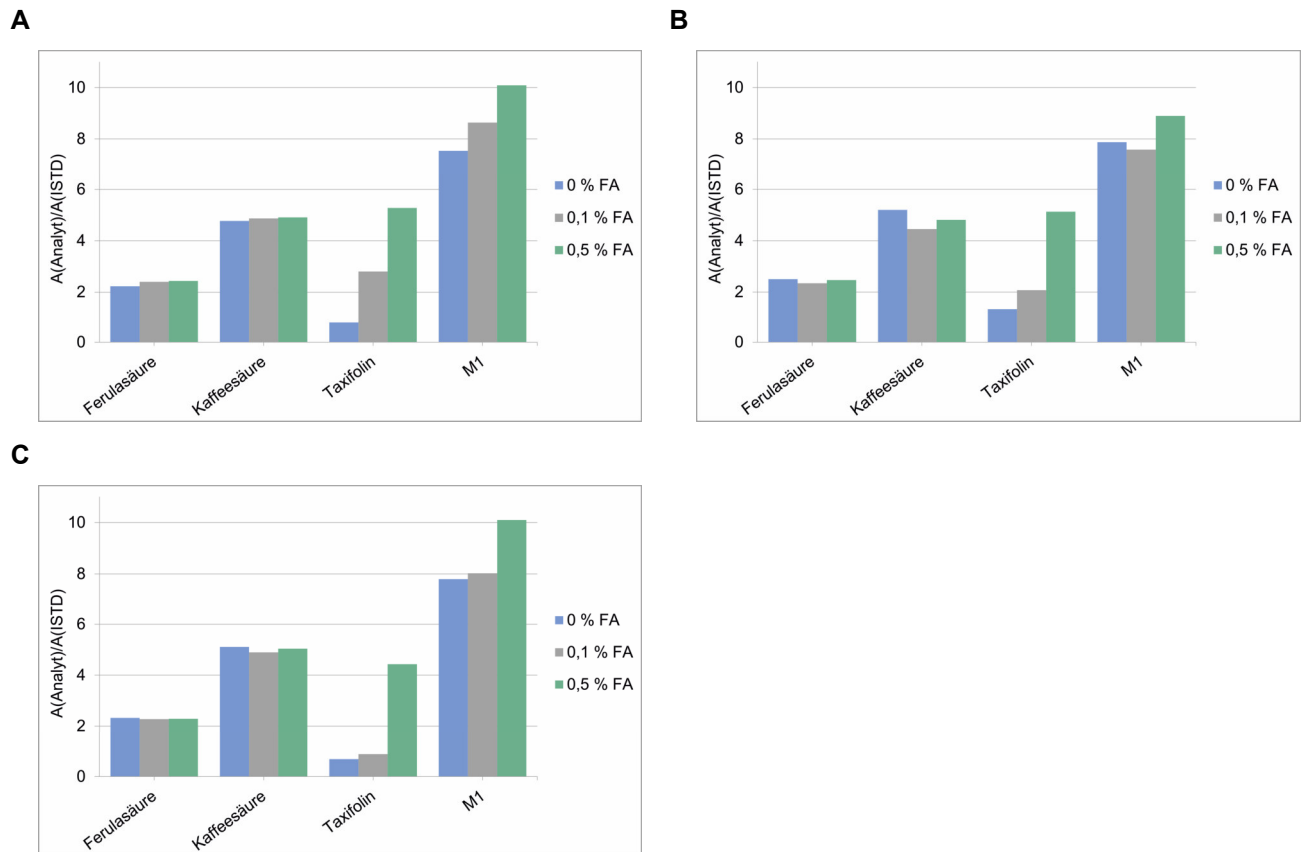


Abbildung 22: Einfluss von 0 %, 0,1 % bzw. 0,5 % Ameisensäure im Humanserum vor der Zugabe von 750 µL (A), 1.000 µL (B) oder 1.250 µL (C) Methanol zur Proteinpräzipitation auf die Extraktion der beispielhaften Analyten Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und M1. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der Peakflächen von Analyten zu internem Standard (ISTD, ^{13}C -Ferulasäure; $n = 1$). FA = Ameisensäure.

Bei der Überprüfung des Methanolvolumens zur Proteinfällung des Humanserums als Probenvorbereitung für die nachfolgende Analyse zeigte sich keine deutliche Abweichung bezüglich der Effizienz der Extraktion der beispielhaften Polyphenole zwischen 750 µL, 1.000 µL oder 1.250 µL, wenn das Humanserum vorher mit 0,5 % Ameisensäure versetzt wurde (Abbildung 23). Da bei der Analytik mittels Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) durch störende Matrixbestandteile mit einer abnehmenden Empfindlichkeit zu rechnen war, wurden letztendlich 1.250 µL Methanol als Volumen der Wahl verwendet. Damit sollte eine möglichst effiziente Proteinpräzipitation sichergestellt werden.

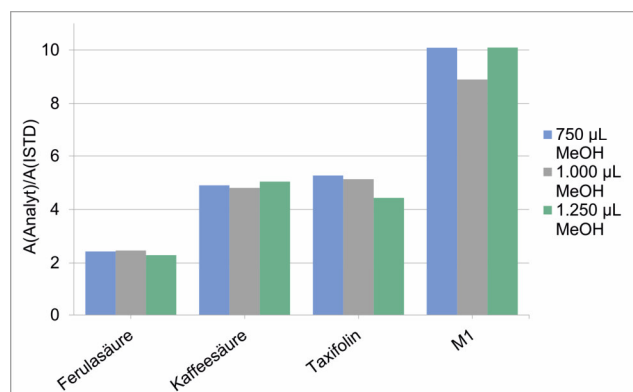


Abbildung 23: Einfluss von 750 µL, 1.000 µL oder 1.250 µL Methanol (MeOH) zur Proteinpräzipitation in Anwesenheit von 0,5 % Ameisensäure im Humanserum auf die Extraktion der beispielhaften Analyten Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und M1. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis der Peakflächen von Analyten zu internem Standard (ISTD, ^{13}C -Ferulasäure; $n = 1$).

Die Vorversuche zur Probenvorbereitung erfolgten mit einer C18-Säule (B3.2.1), für die Analyse der Serumproben der Klinischen Studie wurde jedoch die PFP-Säule verwendet (C3.4.2). Der Säulenwechsel war aufgrund einer potentiellen Kontamination mit Tributylamin durch andere Messungen am LC-MS-Gerät nötig; für eine Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse unter Verwendung der PFP-Säule blieb aufgrund limitierter Messkapazitäten jedoch keine Zeit. Es ist allerdings aufgrund der oben geschilderten Aspekte nicht davon auszugehen, dass dies für die Analyse der Unbekannten von Nachteil war, wenngleich die Bestätigung der Probenvorbereitung allerdings erstrebenswert gewesen wäre.

3.2.2 Quellenparameter und SWATH® windows

Für die Optimierung der Elektronenspray-Ionisation-Quellenparameter (ESI, B3.2.2) wurden analog zu B3.2.1 ebenfalls die Analyten Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und M1 für eine Näherung der unbekannt Substanzen eingesetzt. In der Quelle wird die von der UHPLC-Anlage kommende mobile Phase durch eine Sonde versprüht, unterstützt wird das Vernebeln vom Zerstäubergas Gas 1. Die an der Sonde angelegte Spannung (IonSpray voltage) sorgt für eine Ionisierung der in Lösung befindlichen Analyten. Das erhitzte Trocknungsgas Gas 2 sorgt im elektrischen Feld innerhalb der Quelle für ein Verdampfen der Flüssigkeitstropfen (Ionenverdampfung), sodass letztlich (Analyt-)Ionen in der Gasphase über den Einlass (Orifice) in das Vakuumsystem des Massenspektrometers übergehen; hierbei schützt das Curtain gas in Kombination mit dem Declustering potential vor etwaigen Kontaminationen. Das Declustering potential stellt die am Einlass angelegte Spannung dar und reduziert zudem das Auftreten von Ionenclustern. Zwischen dieser und der an der Sonde angelegten Spannung entsteht das elektrische Feld, in dem die Ionen über den Ion guide zum MS-Vakuumsystem geleitet werden (Abbildung 24).

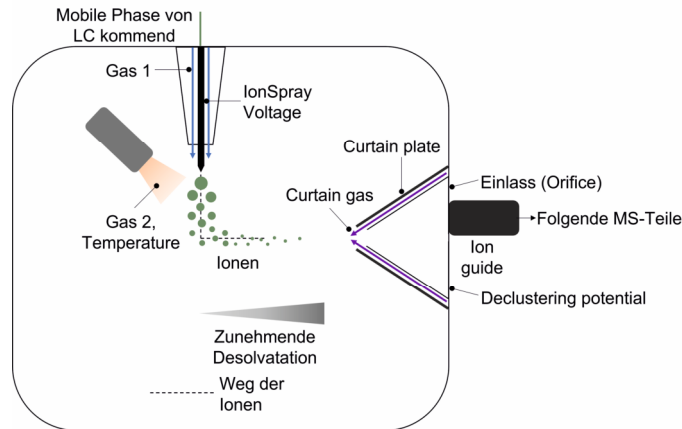


Abbildung 24: Schematische Darstellung der verwendeten ESI-Quelle nach [271]. Gas 2 wird innerhalb der Quelle durch zwei Zuleitungen eingebracht, zur Vereinfachung ist jedoch nur eine davon abgebildet.

Die beste Empfindlichkeit für alle Analyten im verwendeten MS-System zeigte sich bei einer Gas 2 Temperatur von 500 °C und einer IonSpray voltage von 2.500 V. Dabei betrug Gas 1 60 psi, Gas 2 ebenfalls 60 psi und das Curtain gas 35 psi bei einem Declustering potential von 65 V. Mit diesen optimierten Parametern war im Vergleich zu den Standardparametern im Negativmodus eine verbesserte Empfindlichkeit der Polyphenole ersichtlich, was insbesondere auf M1 zutrif (Abbildung 25). Da Polyphenole im ESI-Positiv-Modus schlecht zu ionisieren sind, wurde für diesen Modus keine separate Optimierung vorgenommen, sondern die Parameter des ESI-Negativ-Modus übernommen.

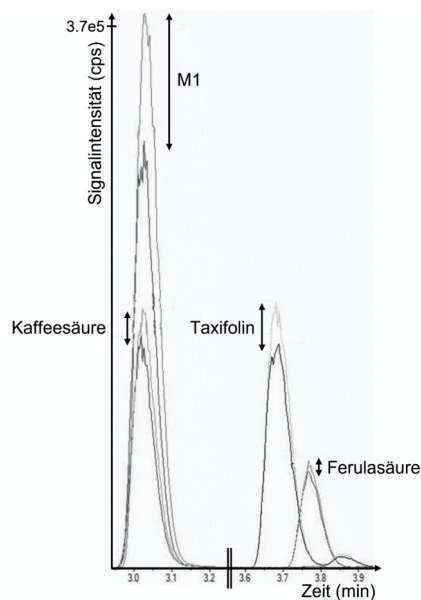


Abbildung 25: Signalintensitäten von Ferulasäure, Kaffeesäure, Taxifolin und M1 im ESI-Negativ-Modus vor und nach der Optimierung der Quellenparameter. Die intensiveren Signale der optimierten Bedingungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

„Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra“ (SWATH®) gehört zu den sogenannten data-independent acquisition-Methoden der Massenspektrometrie, bei denen grundsätzlich alle Analyten bzw. Ionen eines definierten Massenbereiches (hier: 100 – 1.000 Da) fragmentiert werden; somit erfolgt die Fragmentierung unabhängig von wie bei anderen MS-Methoden vorher zu treffenden Einschränkungen, z. B. bezüglich der konkreten Masse der Vorläufersubstanz. Sehr häufig angewendet wird diese Methode daher wie in der vorliegenden Arbeit bei der ungerichteten Suche nach unbekannt Substanzen [272-276]. Aufgrund der dabei notwendigen hohen Massengenauigkeit mit Abweichungen von wenigen ppm wird ein Time-of-flight-Massenspektrometer (TOF) genutzt; gekoppelt mit einem Quadrupol (qTOF) wie in der vorliegenden Arbeit, ermöglicht dies zudem die exakte Bestimmung der Fragmente zur finalen Identifizierung der Unbekannten (Abbildung 26).

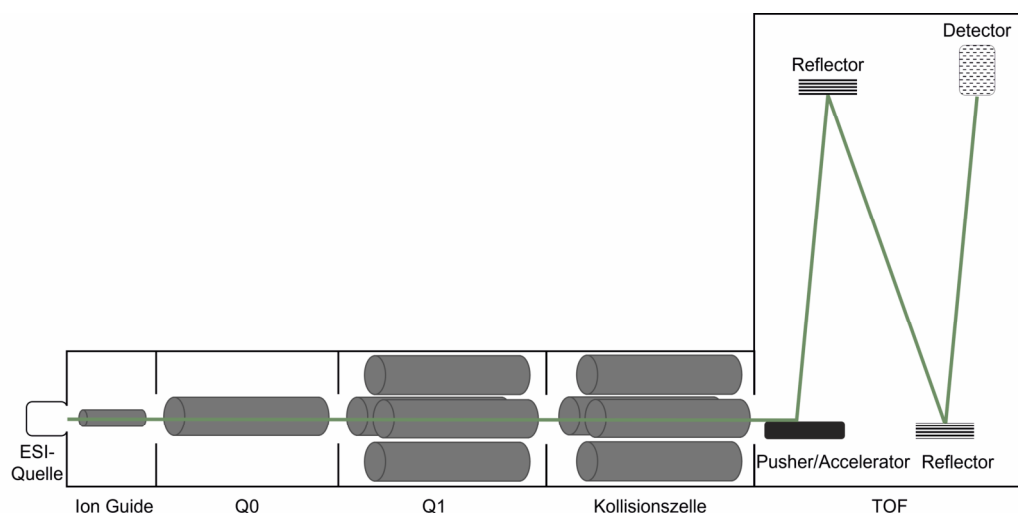


Abbildung 26: Schematische Darstellung des qTOF-Massenspektrometers. Nach der Ionisation und Desolvatation der Ionen wurden diese durch den Ion guide und Q0 fokussiert. Mittels Q1 wurde der zu analysierende Massenbereich in der vorliegenden Arbeit auf 100 – 1.000 Da eingeschränkt. Bei allen Ionen innerhalb dieses Bereichs fand die Fragmentierung in der Kollisionszelle statt, anschließend erfolgte die Trennung der Fragmente im TOF anhand ihrer von der Masse abhängigen unterschiedlichen Flugzeit und die Detektion. Dabei beschleunigte der Pusher die Ionen beim Eintritt in das TOF-Flugrohr, welche sodann zweimal durch einen Reflektor umgelenkt wurden, bevor sie letztlich detektiert wurden. Ion guide und Q0 stellten ebenfalls Quadrupole dar, sind aber zur Abgrenzung der Funktion vereinfacht dargestellt. Q = Quadrupol, TOF = Time of flight.

Bei SWATH® wird der MS-Massenbereich in verschiedene Fenster (Windows) eingeteilt, die nacheinander der MS/MS-Analyse unterzogen werden [275, 277]. Herstellerseits werden für niedermolekulare Verbindungen acht bis 15 Windows empfohlen. Die Anzahl von acht Windows in den vorliegenden Untersuchungen wurde vorab anhand der Peakbreiten der vier oben genannten Referenzsubstanzen gewählt, sodass für Polyphenole eine suffiziente Anzahl von etwa 15 Datenpunkten pro Peak unter Anwendung der in C3.4.2 geschilderten Methoden im ESI-Negativ-Modus erhalten wurden. Die Breite der Windows war abhängig von der jeweiligen Anzahl der in diesem Massenbereich erfassten Ionen und wurde anhand einer für die Studienproben repräsentativen Serumprobe bestimmt (Tabelle 14, C3.4.2). Hieraus ergab sich für alle Windows eine ähnliche Ionendichte, was sich positiv

auf die Spezifität auswirken sollte (Abbildung 27) [278]. Im ESI-Negativ-Modus lag der Großteil der Ionen im m/z -Bereich von 100 – 350, wobei das Maximum etwa 190 betrug. Die maximale Ionendichte des ESI-Positiv-Modus zeigte sich bei einer m/z von ungefähr 320, wobei die meisten Ionen bis zu einer m/z von 600 detektiert wurden.

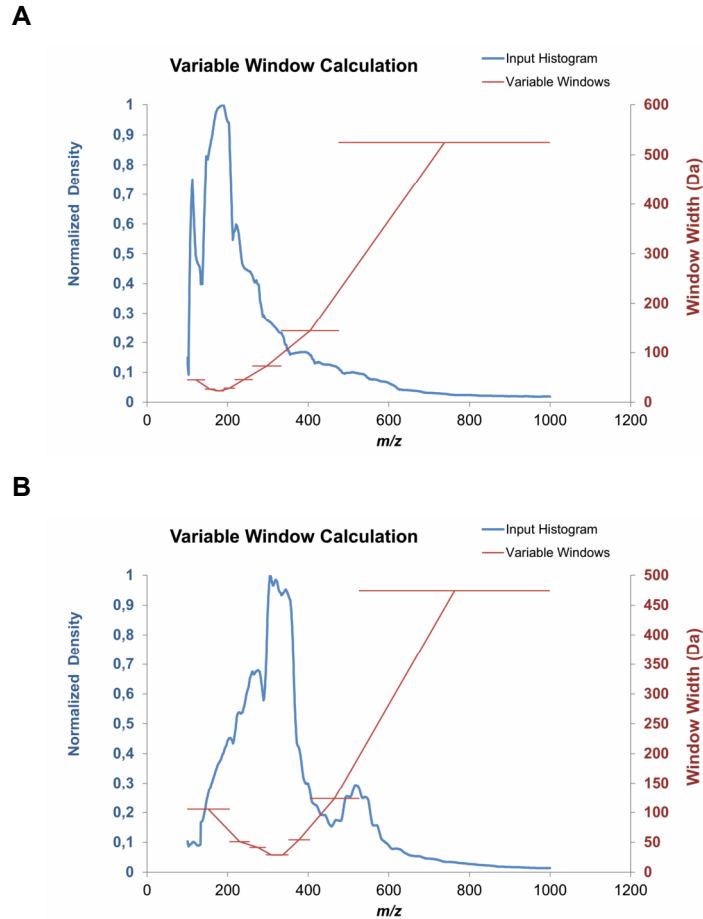


Abbildung 27: Ermittelte SWATH® windows (insgesamt jeweils acht) für den MS-Massenbereich von 100 – 1.000 Da im ESI-Negativ- (A) bzw. ESI-Positiv-Modus (B). Normalized Density = Normalisierte Ionendichte aller detektierten Ionen des genannten Massenbereichs, Window Width = Breite des berechneten windows. Verwendet wurde der vom Hersteller zur Verfügung gestellte SWATH® Variable window calculator V1.1.

3.3 Ergebnisse

Insgesamt konnten im ESI-Negativ-Modus 48 bzw. im ESI-Positiv-Modus sechs Marker erfasst werden, die in der Referenzprobe D1-S1 nicht zu detektieren waren, aber in mindestens einer der weiteren drei Proben. Von diesen Markern konnten 23 bzw. fünf als interessant eingestuft werden (B2.3, C3.4.4). Der sich anschließende Datenbank-Abgleich erfolgte für alle Marker und lieferte für den ESI-Positiv-Modus kein Ergebnis; im ESI-Negativ-Modus konnten neun interessante Marker möglichen polyphenolische Strukturen zugeordnet werden, welche ausschließlich sulfatiert vorlagen. Diese waren die Zimtsäurederivate Kaffeesäure-Sulfat und Ferulasäure-Sulfat, die Flavonoide (Epi-)Catechin-Sulfat und Taxifolin-

Sulfat, die Aromaten Vanillin-Sulfat, Trihydroxybenzol-Sulfat (z. B. Pyrogallol-Sulfat) und Dihydroxymethoxybenzol-Sulfat (z. B. Methylpyrogallol-Sulfat), das Phenylvaleriansäurederivat Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat und das Benzoessäurederivat Protocatechusäure-Sulfat. Zusätzlich waren bei je einer Person Vanillinsäure-Sulfat und Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat zu finden (Abbildung 28). Die Detektion bereits bekannter Substanzen (B3.1) bestätigte, dass die angewandte Methode grundsätzlich geeignet war, um auch neuartige Analyten zu erfassen. Indes ist allerdings zu beachten, dass die MS-Messungen keine Information über das konkrete Strukturisomer lieferten und die dargestellten Strukturen ausschließlich Vorschläge sind, jedoch auf vorangegangenen Erkenntnissen (A1.2, B3.1) und den in der Tabelle 3 genannten Referenzen für in vivo Untersuchungen im Menschen basieren. Dihydrokaffeesäure, δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M2), p-Cumarsäure, Protocatechualdehyd, Scopoletin, Sinapinaldehyd, Syringaaldehyd, Syringasäure als bekannte Bestandteile bzw. Metabolite von Pycnogenol wurden bei keinem Studienteilnehmenden erfasst, weder glucuronidiert oder sulfatiert noch unkonjugiert.

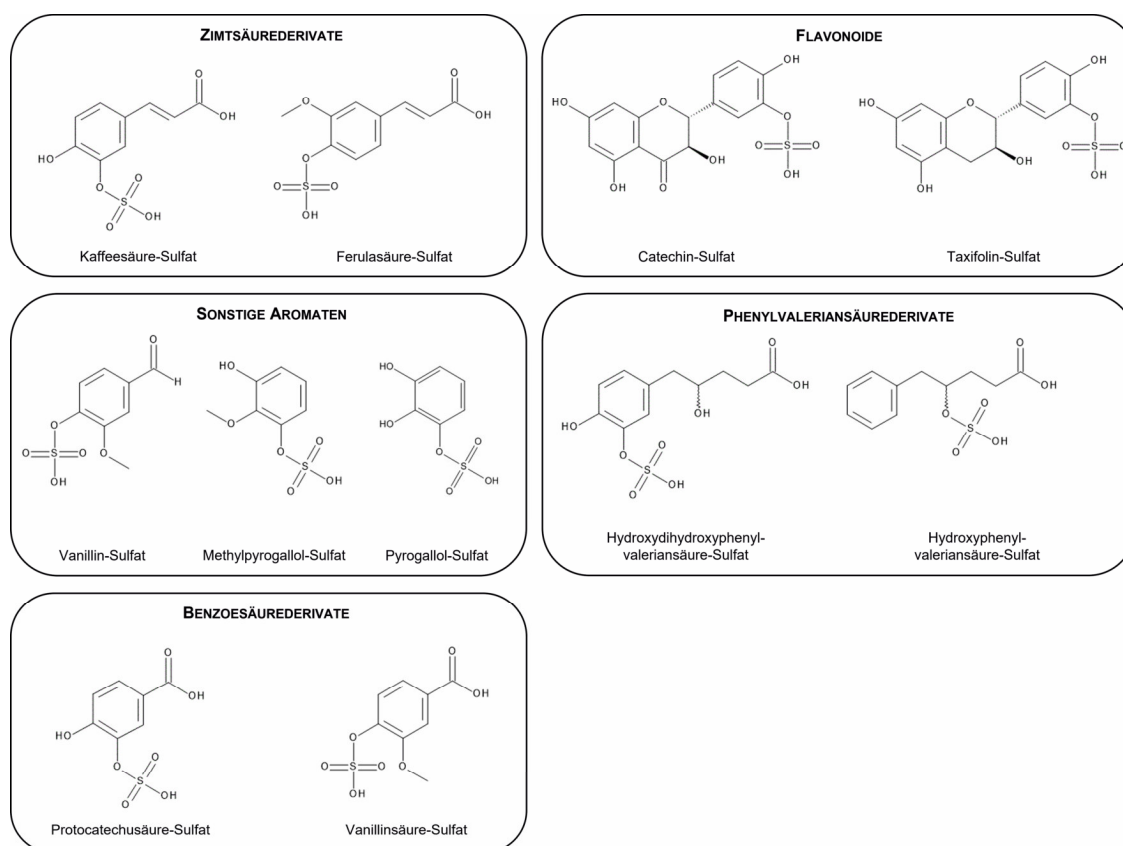


Abbildung 28: Mögliche Strukturformeln der in Humanserum nach Einnahme von Pycnogenol detektierten Bestandteile und Metabolite im Rahmen der Klinischen Studie.

Die korrespondierenden Retentionszeiten, Addukte und gegebenenfalls die Summenformeln der Marker sind für den ESI-Negativ-Modus in Tabelle 3 und für den ESI-Positiv-Modus in Tabelle 4 dargestellt. Im ESI-Negativ-Modus lagen die Retentionszeiten der zugeordneten Substanzen alle im Bereich zwischen 3,5 und 4,9 Minuten; in dieser Spanne waren

auch sechs der 14 Unbekannten, nämlich UN2 und UN5 – UN9. Von daher erscheint es grundsätzlich denkbar, dass diese Analyten ebenfalls den Polyphenolen zuzuordnen waren. Eine weitere Interpretation, auch bezüglich des ESI-Positiv-Modus war nicht zuverlässig möglich.

Tabelle 3: LC-MS-Charakteristika und ggf. Summenformel (C3.4.4) der Marker im ESI-Negativ-Modus. Die monoisotopische Masse (M_{mi}) wurde anhand der Summenformel berechnet. Der Massenfehler (ppm) war die maximale Abweichung, die im Proband*innenkollektiv erreicht wurde (siehe tabellarischer Anhang D2). T_{ret} = Retentionszeit, NM_{mi} = Neutrale monoisotopische Masse, Nf = keine SF gefunden, SF = Summenformel, Abk. = Abkürzung, UN = unbekannter Analyt im ESI-Negativ-Modus.

Zugeordnete Substanz	T_{ret} (min)	Addukt	NM_{mi} (Da)	Error (ppm)	Summenformel	Abk.	Ref.
Catechin-Sulfat	3,9	[M-H] ⁻	370,0359	2,6	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	C-Sulf	[69, 279-281]
Dihydroxymethoxybenzol-Sulfat	3,8	[M-H] ⁻	220,0042	3,7	C ₇ H ₈ O ₆ S	DHMB-Sulf	[89, 282, 283]
Ferulasäure-Sulfat	4,2	[M-H] ⁻	274,0147	-3,9	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	FS-Sulf	[281, 282, 284-286]
Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat	3,5	[M-H] ⁻	306,0409	2	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	HDPVS-Sulf	[77, 89, 287-290]
Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat	4,9	[M-H] ⁻	274,0511	0,7	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S	HPVS-Sulf	[87, 89, 291]
Kaffeesäure-Sulfat	4,1	[M-H] ⁻	259,9991	5,1	C ₉ H ₈ O ₇ S	KS-Sulf	[282, 285, 286, 292]
Protocatechusäure-Sulfat	3,5	[M-H] ⁻	233,9834	3,3	C ₇ H ₆ O ₇ S	PS-Sulf	[282, 283, 292, 293]
Taxifolin-Sulfat	4,8	[M-H] ⁻	384,0151	5,5	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	T-Sulf	[294]
Trihydroxybenzol-Sulfat	3,7	[M-H] ⁻	205,9885	1,3	C ₆ H ₆ O ₆ S	TB-Sulf	[89, 282, 293, 295]
Vanillinsäure-Sulfat	4,6	[M-H] ⁻	247,9991	1,5	C ₈ H ₈ O ₇ S	VS-Sulf	[282, 284, 293]

Zugeordnete Substanz	T _{ret} (min)	Addukt	NM _{mi} (Da)	Error (ppm)	Summenformel	Abk.	Ref.
Vanillin-Sulfat	3,8	[M-H] ⁻	232,0042	3,7	C ₈ H ₈ O ₆ S	V-Sulf	[292, 296]
UN1	2,9	[M-H] ⁻	-	-6,9	Nf	-	-
UN2	4,0	[M-H] ⁻	-	-4,6	Nf	-	-
UN3	1,9	[M-H] ⁻	-	-5,2	Nf	-	-
UN4	1,8	[M-H] ⁻	-	-6,6	Nf	-	-
UN5	4,7	[M-H] ⁻	-	-4,8	Nf	-	-
UN6	3,7	[M-H] ⁻	-	-9,5	Nf	-	-
UN7	4,2	[M+Na-2H] ⁻	200,1049	1,4	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	-	-
UN8	3,7	[M+FA-H] ⁻	188,0143	2,6	C ₇ H ₈ O ₄ S	-	-
UN9	4,5	[M-H] ⁻	-	-4,7	Nf	-	-
UN10	1,9	[M-H] ⁻	256,2402	-1,3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-	-
UN11	3,1	[M-H] ⁻	-	-9,1	Nf	-	-
UN12	2,3	[M+FA-H] ⁻	-	-4,2	Nf	-	-
UN13	2,8	[M-H] ⁻	-	-2,6	Nf	-	-
UN14	2,8	[M-H] ⁻	-	-3,0	Nf	-	-

Tabelle 4: LC-MS-Charakteristika und ggf. Summenformel (C3.4.4) der Marker im ESI-Positiv-Modus. Die monoisotopische Masse (M_{mi}) wurde anhand der Summenformel berechnet. Der Massenfehler (ppm) war die maximale Abweichung, die im Proband*innenkollektiv erreicht wurde (siehe tabellarischer Anhang D2). T_{ret} = Retentionszeit, NM_{mi} = Neutrale monoisotopische Masse, Nf = keine SF gefunden, SF = Summenformel, Abk. = Abkürzung, UP = unbekannter Analyt im ESI-Positiv-Modus.

Zugeordnete Substanz	T_{ret} (min)	Addukt	NM_{mi} (Da)	Error (ppm)	Summenformel	Abk.
UP1	2,0	$[M+H]^+$	-	2,8	Nf	-
UP2	2,1	$[2M+H]^+$	-	-2,5	Nf	-
UP3	1,4	$[M+H]^+$	253,9885	-6,9	$C_{10}H_6O_6S$	-
UP4	3,0	$[M+H]^+$	292,0922	-1,5	$C_{19}H_{16}OS$	-
UP5	6,4	$[M+H]^+$	-	-0,9	Nf	-

Der Massenfehler (Error) wurde nach Formel (1) berechnet. Bei denjenigen Markern, für die eine Summenformel bestimmt werden konnte, wurde deren m/z in der entsprechenden Polarität als theoretische m/z verwendet. Ansonsten galt der von der Software definierte Precursor (siehe tabellarischer Anhang D2) als Bezugsgröße zur Berechnung.

$$\text{Error (ppm)} = \frac{m/z_{\text{gemessen}} - m/z_{\text{theoretisch}}}{m/z_{\text{theoretisch}}} * 10^6 \quad (1)$$

Im Median wurde ein Marker bei zwei Proband*innen bestimmt (Abbildung 29). Am häufigsten konnte UP14 einem Studienteilnehmenden zugeordnet werden, nämlich insgesamt 14-mal. Von den bereits bekannten Substanzen wurden Taxifolin-Sulfat (13 Proband*innen) und Catechin-Sulfat (12 Proband*innen) bei den meisten Studienteilnehmenden erfasst.

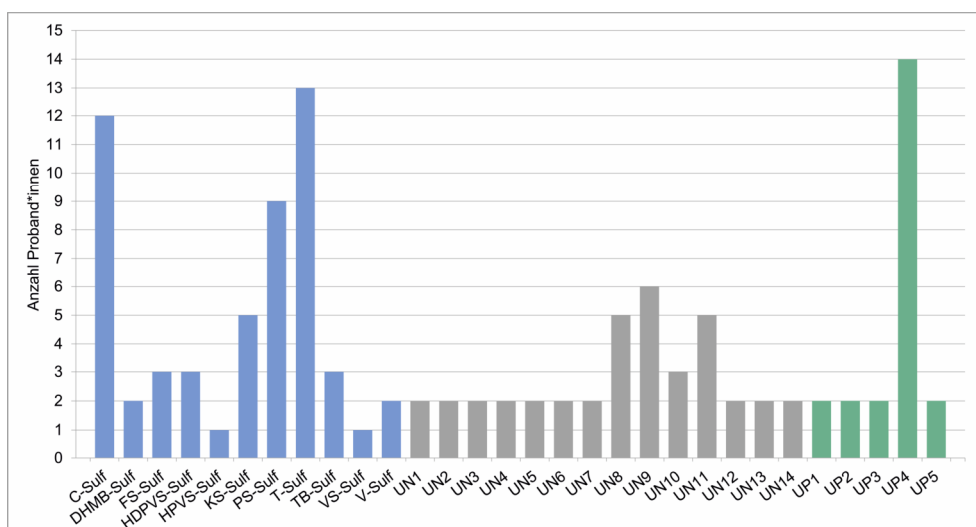


Abbildung 29: Anzahl der Proband*innen, bei denen der jeweilige Marker detektiert werden konnte (ESI-Negativ- und -Positiv-Modus). Abkürzungen siehe Tabelle 3 bzw. Tabelle 4.

Berücksichtigt man die Zeitpunkte D1-S1, D1-S2, D1-S3 und D4-S4 der Probennahme (B2.3) bei den elf bekannten Substanzen, so wurden diese am häufigsten zum Zeitpunkt D4-S4 detektiert (Abbildung 30). Dabei wurde zunächst Blut zum Zeitpunkt D1-S1 vor Beginn der Pycnogenol-Einnahme abgenommen; dadurch sollten im Optimalfall keine polyphenolischen Substanzen detektiert werden, weswegen diese Probe als Referenz für die Auswertung diente (C3.4.4). Die Entnahme von D1-S2 erfolgte zwei Stunden nach der ersten Einnahme von Pycnogenol, die von D1-S3 zehn Stunden danach. Als letzte Probe wurde D4-S4 vier Stunden nach der letztmaligen Anwendung von Pycnogenol gewonnen. Catechin-Sulfat wurde jeweils in D1-S2 und D4-S4 ermittelt, Taxifolin-Sulfat zusätzlich noch bei einem Probanden in D1-S3. Daraus kann geschlossen werden, dass beide Analyten in der Klinischen Studie tendenziell eher früh nach Einnahme im Serum zu erfassen waren. Zu allen Zeitpunkten außer D1-S1 detektiert wurden Trihydroxybenzol-Sulfat und Vanillin-Sulfat und zeigten somit kein eindeutiges pharmakokinetisches Profil; grundsätzlich denkbar ist daher, dass diese beständig als Monomere aus oligo- oder polymeren Polyphenolen freigesetzt wurden oder längere Halbwertszeiten besaßen. Allerdings ist dies allenfalls als Trend zu sehen, da diese Beobachtung nur bei einer geringen Zahl der Studienteilnehmenden gemacht werden konnte. Ferulasäure-Sulfat wurde als einziges Polyphenol auch in der Referenzprobe D1-S1 ermittelt. Aus diesem Grund ist denkbar, dass entweder die zweitägige vorausgegangene Wash-out-Phase nicht ausreichend war oder es partiell zu Verstößen bezüglich der Ernährungsvorgaben kam (B2.1 und B2.3). Unklar bleibt dabei jedoch, wieso bei diesen beiden Möglichkeiten nur Ferulasäure-Sulfat betroffen war und nicht weitere der bereits bekannten Analyten. Kaffeesäure-Sulfat und Protocatechusäure-Sulfat wurden bei einer mittleren Anzahl von fünf bzw. neun Proband*innen zum Zeitpunkt D1-S2 detektiert und in Ausnahmefällen in D4-S4, weswegen eher frühe maximale Serumkonzentrationen nach Absorption als Charakteristika zu vermuten sind. Dieser Aspekt traf mit limitierter Aussagekraft auch auf Vanillinsäure-Sulfat zu, allerdings nur bei einer Probandin. Wird Dihydroxymethoxybenzol-Sulfat als methylierter Metabolit von Trihydroxybenzol-Sulfat gesehen, so erscheint die ausschließliche Detektion zum späten Zeitpunkt D1-S3 als durchaus plausibel, wenn der Metabolit erst mit einer gewissen Latenzzeit gebildet wurde.

Die beiden Valeriansäure-Derivate Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat (HDPVS-Sulfat) und Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat (HPVS-Sulfat) konnten nur vereinzelt erfasst werden. Bei letzterer Substanz gelang die Detektion bei einem Probanden in D1-S3 und D4-S4. HDPVS-Sulfat wurde zu zwei Zeitpunkten der Probennahme bei insgesamt drei Proband*innen ermittelt, bei einer Probandin in D1-S3 und D4-S4, bei einer anderen Probandin in D1-S3 und bei einem weiteren Probanden in D4-S4. Somit ist zwar eine eindeutige Aussage bezüglich der Pharmakokinetik nicht möglich, tendenziell wurden diese beiden Analyten aber erst mit einer gewissen Latenzzeit nach Einnahme im Serum erfasst. Dieser Aspekt ist insofern schlüssig, da HDPVS und HPVS als mikrobielle Metabolite gelten

und erst vom intestinalen Mikrobiom verstoffwechselt werden müssen, bevor sie sulfatiert werden und in die systemische Zirkulation gelangen (A1.4) [75, 77, 108, 287, 289, 297].

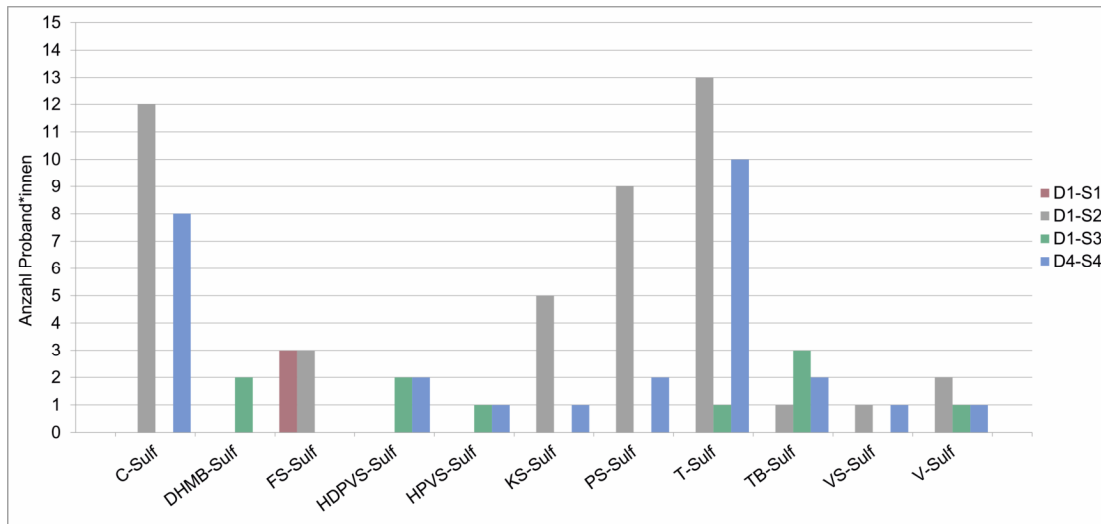


Abbildung 30: Anzahl der Proband*innen, bei denen die entsprechende zuordenbare Substanz im ESI-Negativ-Modus in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme (B2.3) detektiert werden konnte. Abkürzungen siehe Tabelle 3.

Die 14 unbekannt Marker im ESI-Negativ-Modus wurden insgesamt seltener als die oben beschriebenen Polyphenole bestimmt (Abbildung 31), am häufigsten wurden dabei UN8 (fünf Proband*innen) und UN9 (sechs Proband*innen) erfasst. Ebenfalls gegensätzlich zu den polyphenolischen Substanzen stellte sich der Zeitpunkt dar, zu dem am meisten Marker detektiert wurden; hier war dieser D1-S3. Zu allen Zeiten der Probennahmen außer D1-S1 konnten UN5, UN6, UN8 und UN11 ermittelt werden. Ansonsten zeigte sich diesbezüglich ein heterogenes Bild.

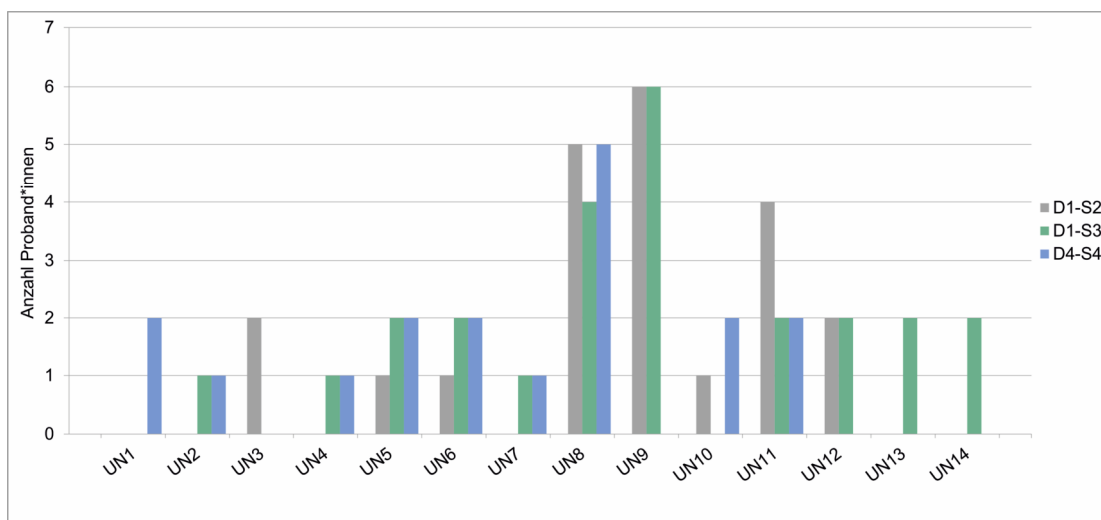


Abbildung 31: Anzahl Proband*innen, bei denen UN1 – 14 (ESI-Negativ-Modus) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme (B2.3) detektiert werden konnte. Keiner der Marker wurde zum Zeitpunkt D1-S1 bestimmt. Abkürzungen siehe Tabelle 3.

Im ESI-Positiv-Modus konnten im Vergleich zum ESI-Negativ-Modus noch weniger Marker detektiert werden, sprich fünf und diese bei einer maximalen Anzahl von zwei Proband*innen (Abbildung 32). Eine Ausnahme stellte allerdings UP4 dar, welcher bei vierzehn Proband*innen zu allen Zeitpunkten außer D1-S1 erfasst wurde. UP1 wurde auch in der Referenzprobe D1-S1 bestimmt. Neben den beiden oben schon bei Ferulasäure-Sulfat genannten möglichen Gründen, besteht hier zusätzlich die Möglichkeit, dass dieser Marker nicht auf die Einnahme von Pycnogenol zurückzuführen war und deswegen beispielsweise als endogene Substanz zu diesem Zeitpunkt ermittelt wurde.

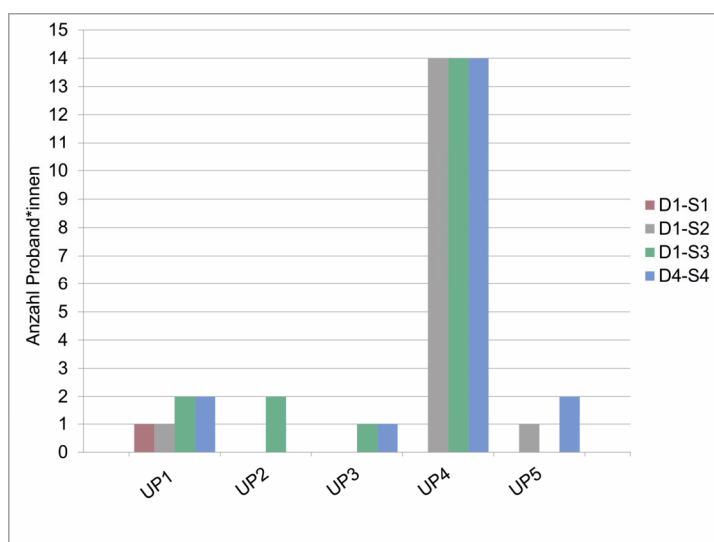


Abbildung 32: Anzahl Proband*innen, bei denen UP1 – 5 (ESI-Positiv-Modus) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme (B2.3) detektiert werden konnte. Abkürzungen siehe Tabelle 4.

In der nachfolgenden Tabelle 5 ist für jeden Marker detailliert dargestellt, zu welchem Zeitpunkt der Probennahme dieser bei welchem Studienteilnehmenden detektiert wurde.

Tabelle 5: Übersicht über Zeitpunkte der Probennahme im Rahmen der Klinischen Studie (B2.3), bei denen alle Marker bei den Proband*innen 1 – 15 detektiert wurde. Abkürzungen siehe Tabelle 3 bzw. Tabelle 4.

Zugeordnete Substanz	D1-S1	D1-S2	D1-S3	D4-S4
Catechin-Sulfat	-	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15	-	2, 4, 5, 8, 10, 11, 14, 15
Dihydroxymethoxybenzol-Sulfat	-	-	2, 12	-
Ferulasäure-Sulfat	2, 11, 12	2, 11, 12	-	-
Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat	-	-	1, 12	1, 15

Zugeordnete Substanz	D1-S1	D1-S2	D1-S3	D4-S4
Hydroxyphenyl-valeriansäure-Sulfat	-	-	5	5
Kaffeensäure-Sulfat	-	1, 8, 10, 12, 14	-	10
Protocatechusäure-Sulfat	-	1, 2, 4, 5, 7, 8, 12, 14, 15	-	5, 14
Taxifolin-Sulfat	-	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15	10	2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 15
Trihydroxybenzol-Sulfat	-	3	3, 8, 14	3, 14
Vanillinsäure-Sulfat	-	1	-	1
Vanillin-Sulfat	-	9, 12	9	9
UN1	-	-	-	9, 14
UN2	-	-	15	4
UN3	-	3, 6	-	-
UN4	-	-	15	4
UN5	-	10	5, 10	5, 10
UN6	-	8	8,14	8, 14
UN7	-	-	15	11
UN8	-	2, 3, 5, 12, 14	2, 5, 12, 14	2, 3, 5, 12, 14
UN9	-	1, 2, 3, 5, 7, 8	1, 2, 3, 5, 7, 8	-
UN10	-	6	-	4, 11
UN11	-	5, 10, 12, 15	10, 12	10, 12
UN12	-	2, 7	2, 7	-
UN13	-	-	2, 7	-
UN14	-	-	2, 7	-

Zugeordnete Substanz	D1-S1	D1-S2	D1-S3	D4-S4
UP1	12	1	1, 12	1, 12
UP2	-	-	2, 7	-
UP3	-	-	10	4
UP4	-	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15
UP5	-	3	-	3, 12

Werden nun die insgesamt 15 Proband*innen der Klinischen Studie genauer betrachtet (B2.2), so betrug der Median der detektierten Marker acht (Abbildung 33). Insgesamt wurden 28 Marker gefunden, davon 23 im ESI-Negativ-Modus und 5 im ESI-Positiv-Modus. Die meisten Marker wurden mit zwölf bei Proband 2 und Probandin 12 bestimmt. Bei Probandin 13 hingegen konnten nur zwei Marker erfasst werden.

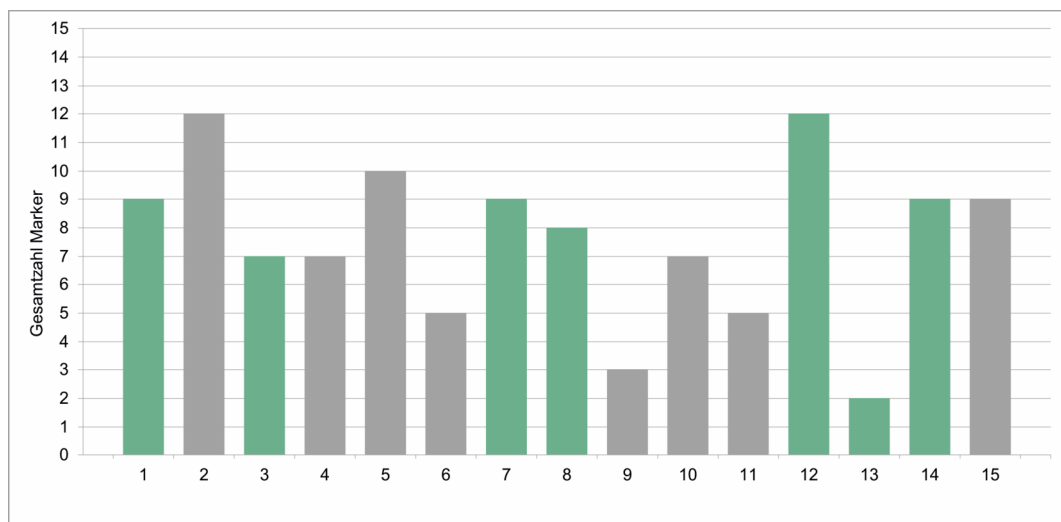


Abbildung 33: Gesamtzahl detektiertes Marker der Proband*innen 1 – 15. Insgesamt wurden 28 Marker gefunden, davon 23 im ESI-Negativ-Modus und fünf im ESI-Positiv-Modus. Grün = Probandin, grau = Proband.

In Tabelle 6 und Abbildung 34 sind die Marker anhand der einzelnen Zeitpunkte der Probenahme D1-S1, D1-S2, D1-S3 und D4-S4 aufgeschlüsselt.

Tabelle 6: Übersicht über die detektierten Marker der Proband*innen 1 – 15 in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme im Rahmen der Klinischen Studie (B2.3). Abkürzungen siehe Tabelle 3 bzw. Tabelle 4.

Proband*in	D1-S1	D1-S2	D1-S3	D4-S4
1	-	C-Sulf, KS-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf, VS-Sulf UN9 UP1, UP4	HDPVS-Sulf UN9 UP1, UP4	HDPVS-Sulf, VS-Sulf UP1, UP4
2	FS-Sulf	C-Sulf, FS-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN8, UN9, UN12 UP4	DHMB-Sulf UN8, UN9, UN12, UN13, UN14 UP2, UP4	C-Sulf, T-Sulf UN8 UP4
3	-	C-Sulf, TB-Sulf UN3, UN8, UN9 UP4, UP5	TB-Sulf UN9 UP4	TB-Sulf UN8 UP4, UP5
4	-	C-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN10 UP4	UP4	C-Sulf, T-Sulf UN2, UN10 UP3, UP4
5	-	C-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN8, UN9, UN11	HPVS-Sulf UN5, UN8, UN9 UP4	C-Sulf, HPVS- Sulf, PS-Sulf, T- Sulf UN5, UN8 UP4
6	-	C-Sulf, T-Sulf UN3, UN10 UP4	UP4	T-Sulf UP4
7	-	C-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN9, UN12 UP4	UN9, UN12, UN13, UN14 UP2, UP4	UP4
8	-	C-Sulf, KS-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN6, UN9 UP4	TB-Sulf UN6, UN9 UP4	C-Sulf, T-Sulf UN6 UP4

Proband*in	D1-S1	D1-S2	D1-S3	D4-S4
9	-	V-Sulf UP4	V-Sulf UP4	V-Sulf UN1 UP4
10	-	C-Sulf, KS-Sulf, T-Sulf UN5, UN11 UP4	T-Sulf UN5, UN11 UP3, UP4	C-Sulf, KS-Sulf, T-Sulf UN5, UN11 UP4
11	FS-Sulf	C-Sulf, FS-Sulf, T-Sulf UN10	-	C-Sulf, T-Sulf UN7, UN10
12	FS-Sulf UP1	FS-Sulf, KS- Sulf, PS-Sulf, T- Sulf, V-Sulf UN8, UN11 UP4	DHMB-Sulf HDPVS-Sulf UN8, UN11 UP1, UP4	T-Sulf UN8, UN11 UP1, UP4, UP5
13	-	T-Sulf UP4	UP4	UP4
14	-	C-Sulf, KS-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN8 UP4	TB-Sulf UN6, UN8 UP4	C-Sulf, PS-Sulf, TB-Sulf, T-Sulf UN1, UN6, UN8 UP4
15	-	C-Sulf, PS-Sulf, T-Sulf UN11 UP4	UN2, UN4, UN7 UP4	C-Sulf, HDPVS- Sulf, T-Sulf UP4

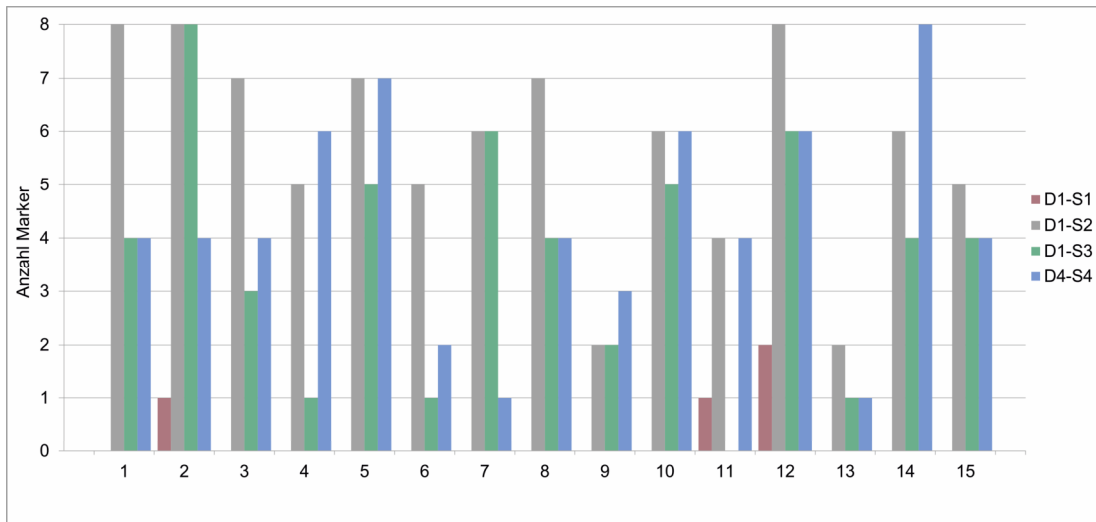


Abbildung 34: Anzahl detektierter Marker der Proband*innen 1 – 15 in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme (B2.3). Insgesamt wurden 28 Marker gefunden, davon 23 im ESI-Negativ-Modus und fünf im ESI-Positiv-Modus.

Alle weiteren Daten sind dem tabellarischen Anhang D2 zu entnehmen.

3.4 Diskussion

3.4.1 Polyphenolische Sulfatkonjugate

Alle nach der Einnahme von Pycnogenol detektierten Analyten, denen eine Struktur zugeordnet werden konnte, wurden ausschließlich als Sulfatkonjugate erfasst. Keine der Substanzen lag unkonjugiert oder glucuronidiert vor. Ein hohes Maß an Konjugation polyphenolischer Xenobiotika war zwar zu erwarten gewesen (A1.4) [70, 74, 75, 298], dass diese allerdings ausschließlich sulfatiert vorlagen war ein neuartiger Aspekt. Bezüglich des alleinigen bzw. dominierenden Vorkommens von sulfatierten Analyten gibt es hingegen bereits Veröffentlichungen. Nardini et al. fokussierten sich bei pharmakokinetischen Untersuchungen in vivo auf Phenolsäuren, beispielsweise Ferulasäure, Kaffeesäure, Protocatechusäure und Vanillinsäure [299, 300]. Alle Substanzen lagen nach dem Konsum von Bier oder Weißwein fast ausschließlich konjugiert vor; Ferulasäure, Kaffeesäure und Vanillinsäure aus Bier wurden vorrangig sulfatiert erfasst. Pimpao et al. detektierten im Urin mehrere Phenolsäuren nach vorangegangenem Verzehr eines Fruchtpürees, wobei ebenfalls Sulfatkonjugate in unterschiedlichem Ausmaß vorherrschten [301]. Anschließend gelang in einer weiteren Klinischen Studie auch der Nachweis von z. B. Kaffeesäure-Sulfat, Ferulasäure-Sulfat, Protocatechusäure-Sulfat, Pyrogallol-Sulfat und Methylpyrogallol-Sulfat in Humanplasma [293]. Zimtsäurederivate scheinen generell im Rahmen der Biotransformation hauptsächlich sulfatiert zu werden [302]. Insgesamt besteht also durchaus die Möglichkeit, dass polyphenolische Substanzen ausschließlich als Sulfatkonjugate vorliegen, was im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie steht.

3.4.2 Bedeutung und Einfluss von Phase-II-Enzymen

Sulfatierung und Glucuronidierung durch Sulfotransferasen (SULT) bzw. UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) sind die beiden häufigsten der sogenannten Phase-II-Reaktionen, die die Wasserlöslichkeit von exogenen und endogenen Substanzen erhöhen und somit die Elimination forcieren. Diese Biotransformation dient somit in erster Linie der Detoxifizierung (siehe auch A1.4.2) [303]. In vivo ist der Grad der Konjugation sowohl abhängig von der enzymatischen Ausstattung als auch von der vorliegenden Substratkonzentration, weswegen sich eine interindividuelle Heterogenität zeigt [298, 304]. Mangels kommerziell verfügbarer Konjugate als Referenzsubstanzen werden in pharmakokinetische Studien häufig lediglich die unkonjugierten Substanzen nach einer enzymatischen Dekonjugation der Muttersubstanzen quantifiziert [305]. Meist werden dabei aber Glucuronidasen mit simultaner Sulfatase-Aktivität verwendet, z. B. aus *Helix pomatia*, mit denen keine Differenzierung bezüglich des konkret vorliegenden Konjugates möglich ist [306, 307]. Reine Sulfatasen waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht käuflich zu erwerben. Dieser Ansatz wäre bezüglich der eindeutigen Identifizierung von Vorteil gewesen, da nach der Hydrolyse der Sulfatkonjugate die Bestätigung der Identität mit den entsprechenden Referenzsubstanzen hätte vorgenommen werden können [284]. Jedoch besteht bei der enzymatischen Dekonjugation zur Untersuchung von polyphenolischen Phase-II-Konjugaten grundsätzlich die Gefahr, dass Analyten nicht erfasst werden, weil eine unzureichende Effizienz der Hydrolyse aufgrund geringer Affinität des Substrates zum Enzym möglich ist [306-308]. Dazu gibt es beispielsweise Berichte zu Ferulasäure- und Kaffeesäure-Sulfaten [309]. Grundsätzlich ist es schwierig vorherzusagen, welche Konjugationsreaktionen in vivo auftreten, da Enzym-Affinität und -Kapazität bezüglich der einzelnen Substrate hochvariabel sind und SULT und UGT besonders bei phenolischen Hydroxygruppen um die enzymatische Konjugation konkurrieren. Dennoch gibt es Hinweise, dass UGT vornehmlich eine hohe Kapazität besitzen, wohingegen SULT eine hohe Substrataffinität haben [69]. Das würde im Umkehrschluss bedeuten, dass bei hohen Substratkonzentrationen Glucuronide als Phase-II-Metabolite dominieren, da dann SULT schnell erschöpft sind. Liegen die Substrate jedoch nur in geringer Menge vor, hätten die SULT durch die Affinität einen Vorteil, wodurch dann Sulfate vorherrschen [310]. Im Falle von (Epi)-Catechin bestärken Literaturberichte diese Annahme. In einer pharmakokinetischen Studie von Mullen et al. nahmen Proband*innen umgerechnet etwa 15 mg Catechin und das diastereomere Epicatechin in Form eines Kakaotränkes zu sich; im Plasma überwogen dabei sulfatierte Metabolite [311]. Nach der Einnahme einer deutlich größeren Catechin- bzw. Epicatechin-Menge von gut 150 mg stieg der Anteil an Glucuronsäure-Konjugaten [312]. Im Anschluss an den Konsum von Kaffee konnten Fumeaux et al. in humanem Plasma ausschließlich Sulfatkonjugate nachweisen, wohingegen in Urin auch Glucuronide zu detektieren waren. Zurückzuführen war diese Beobachtung auf niedrigere, nicht nachweisbare Konzentrationen der Glucuronide in Serum oder eine schnellere Elimination [285]. Auch Gomez-Juaristi et al. untersuchten unter

anderem Humanplasma bezüglich resorbierter Inhaltsstoffe bzw. Metabolite nach Kaffeegenuss (geröstet und ungeröstet) und fanden neben methylierten Derivaten vornehmlich Sulfatkonjugate [286]. Dasselbe Autor*innenkollektiv konnte nach der Einnahme von polyphenolreichen Kakaoprodukten vor allem Phenylvalerolactone und Phenylvaleriansäure-Konjugate sowohl in Plasma als auch in Urin identifizieren, welche mikrobielle (Epi-)Catechin-Metabolite darstellen (siehe B3.3) [290, 313]. Auch hier dominierte die Sulfatkonjugation im Phase-II-Metabolismus, ebenso wie in früheren Untersuchungen zum Epicatechin-Metabolismus nach Grüntee-Konsum [314]. Über das konkrete Ausmaß des dominanten Vorkommens bestimmter Konjugate herrscht bislang jedoch keine Einigkeit [69, 280, 315].

3.4.3 Einfluss des enterohepatischen Kreislaufes

Eine weitere Möglichkeit für die bevorzugte Bildung von Sulfatkonjugaten ist der enterohepatische Kreislauf (A1.4.4) und die hepatische Glucuronidase-Aktivität. Mullen et al. stellten fest, dass in Humanplasma nach dem Konsum von Zwiebeln Quercetin-Sulfat als Metabolit vorherrschte. Nachfolgende Inkubations-Untersuchungen mit isolierten Hepatozyten zeigten, dass das initial gebildete Quercetin-Glucuronid ex vivo in das Sulfatkonjugat überführt wurde [268]. Dies würde bedeuten, dass das intestinale Mikrobiom die bereits gebildeten und in das Darmlumen sezernierte Phase-II-Metabolite kaum oder nur in einem geringen Ausmaß dekonjugiert und diese dann über die Portalvene erneut in die Leber gelangen, wo sie hydrolysiert und anschließend rekonjugiert werden [316]. Alternativ ist auch denkbar, dass die initial gebildeten Glucuronide durch bakterielle Hydrolasen gespalten werden und anschließend im Darmepithel sulfatiert werden. Die letztere Möglichkeit erscheint insofern plausibler, da im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes typischerweise die Konjugate zunächst gespalten werden [106]. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen angestrebt werden.

3.4.4 Stellenwert von Prä-Analytik und LC-MS-Bedingungen

Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bedingungen der Prä-Analytik oder die LC-MS-Bedingungen dazu geführt haben, dass in den Studienproben keinerlei Glucuronide detektiert werden konnten. Eine potentielle Schwachstelle ist die Probenvorbereitung; stellt sich diese als komplex dar, so werden zwar störende Matrixbestandteile mit größerer Wahrscheinlichkeit entfernt, aber mutmaßlich auch Analyten von Interesse. Bei einer inadäquaten Probenvorbereitung kann aber auch die Empfindlichkeit des LC-MS-Systems beeinträchtigt werden, wodurch die Detektion unbekannter Substanzen in geringer Konzentration ausbleibt. Zudem erhöht sich meist mit der Anzahl der einzelnen Aufarbeitungsschritte auch die Variabilität der Resultate [273, 317]. Die Hypothese der suboptimalen Probenbehandlung in der vorliegenden Arbeit wird jedoch nicht durch die Untersuchungen von Tulipani et al. gestützt, bei denen unter anderem die Wiederfindung von (Epi-)Catechin als Sulfat und Glucuronid unter Verwendung verschiedener Techniken der Probenvorbereitung

im Rahmen von ungerichtetem Screening von Humanplasma nach Kakaokonsum betrachtet wurde [318]. Das Glucuronsäure-Konjugat konnte mit allen untersuchten Techniken detektiert werden. Das Sulfatderivat wurde zwar nur nach einer Proteinfällung mit Methanol, Acetonitril bzw. einer Festphasenextraktion erfasst, allerdings bei dem auch hier verwendeten Methanol zu einem deutlich höheren Ausmaß als das Glucuronid, was wiederum die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Interessanterweise fanden Roura et al. [279] und Tomas-Barberan et al. [319] ebenfalls nach Kakaokonsum hauptsächlich Glucuronsäure-Konjugate als Phase-II-Metabolite in Humanplasma, wobei beide für die Probenvorbereitung eine Festphasenextraktion nutzten. Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von Feliciano et al. [282]. Diese verwendeten zur Aufreinigung von Plasma ebenfalls die Technik der Festphasenextraktion und wiesen zwar auch Glucuronide als Metabolite von Cranberry-Polyphenolen nach, aber in höherem Maß Sulfatkonjugate [282]. Auch bei der Probenvorbereitung als möglicher Einflussfaktor gilt die gleiche Annahme wie bei der enzymatischen Konjugation weiter oben; grundsätzlich kann diese einen wesentlichen Faktor dargestellt haben, für genaue Erkenntnisse bezüglich der einzelnen Substanzen wären weiterführende Analysen notwendig. Dazu müsste zunächst Humanserum mit einer definierten Menge von Glucuronsäure-Konjugaten der detektierten Polyphenole versetzt werden und im Anschluss mittels methanolischer Proteinfällung gemäß C3.4.1 für die LC-MS-Analyse vorbereitet werden. Können diese Metabolite nicht oder nur in deutlich geringerem Ausmaß im Vergleich zu einer methanolischen Probelösung qualitativ nachgewiesen werden, so kann dafür eine unzureichende Probenvorbereitung als Ursache in Betracht gezogen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren jedoch diese konjugierten Substanzen nicht käuflich zu erwerben.

3.4.5 Analytische Eigenschaften von Phase-II-Konjugaten

Eine weitere Erklärung für die Abwesenheit von Glucuronsäure-Konjugaten als Phase-II-Metabolite kann die Instabilität derer sein, sowohl bei der Probenvorbereitung als auch der Analyse mittel LC-MS. Glucuronidiert werden eine Vielzahl von nucleophilen Gruppen, beispielsweise aliphatische Alkohole oder Phenole, wodurch Ether entstehen [320]. Wird die Glucuronsäure hingegen mit Carbonsäuren konjugiert, so werden als Ester Acylglucuronide gebildet, welche instabiler oder reaktiver als andere Konjugate sind und je nach Bedingungen in unterschiedlichem Ausmaß hydrolysieren [321-323]. Im Falle einer Hydrolyse müsste dann allerdings der unkonjugierte Analyt zu detektieren sein, was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war. Zudem war der pH-Wert der Serumproben während der Probenvorbereitung (B3.2.1) zu jeder Zeit sauer, wodurch Acylglucuronide grundsätzlich stabilisiert werden können [324, 325]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass zunächst gebildete Acylglucuronide aufgrund einer erhöhten Reaktivität derer mit z. B. Serumprotein interagiert haben und demzufolge nach der Proteinfällung nicht mehr für die Analytik zur Verfügung standen [326, 327]. Um diese Hypothesen zu bestätigen oder zu widerlegen, müssten aber

dahingehend Untersuchungen mit kommerziell verfügbaren Glucuronsäure-Konjugaten der detektierten Polyphenole durchgeführt werden. Würde man zusätzlich zu dem oben geschilderten Vorgehen im Rahmen der Probenvorbereitung (B3.4.4) Humanserum nach der Proteinpräzipitation mit den Glucuronsäure-Konjugaten versetzen, so könnte die Prä-Analytik gänzlich als Einflussfaktor bestätigt oder ausgeschlossen werden. Denkbar ist zudem das Erstellen einer Art eigenen Bibliothek mit den theoretischen Hydrolyse-Produkten und/oder Fragmenten der denkbaren Glucuronsäure-Konjugaten und ein systematischer Vergleich der erhaltenen Daten mit der Bibliothek.

3.4.6 Grundsätzliches Vorgehen bei der Identifizierung von Unbekannten mittels UHPLC-qTOF-MS

Als akzeptabler Fehler bei der Abweichung zwischen theoretischer (Precursor) und detektierter Masse (m/z) eines Markers gelten 30 ppm [328], moderne MS-Systeme erreichen in der Regel sogar 3 – 5 ppm [308, 329, 330]. Die zugrundeliegende Berechnung ist in B3.3 aufgeführt. In den vorliegenden Untersuchungen lag dieser Fehler im Median bei 3,7 ppm und immer unterhalb von 10 ppm, detaillierte Angaben sind im tabellarischen Anhang D2 zu finden. Die Summenformel wurde durch die Hersteller-Software anhand von MS/MS-Daten und Isotopenmuster berechnet. Der Score zum qualitativen Vergleich der berechneten Summenformel wiederum wurde ebenfalls mittels der Software anhand der erhaltenen MS- und MS/MS-Daten ermittelt. Trotz der verwendeten SWATH[®]-Methode zeigten sich die MS/MS-Spektren unspezifisch, d.h. die Spektren mehrerer Vorläufer-Ionen waren derart überlagert, dass keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Fragmente möglich war. Da abhängig von der Massengenauigkeit bzw. des Massenfehlers grundsätzlich auch mehrere berechnete Summenformeln möglich waren, wurde diese nur aufgeführt, wenn sie für alle Marker zutraf. Dabei konnte jedoch nicht für jeden Marker bei jedem Studienteilnehmenden eine Summenformel berechnet werden, was wahrscheinlich aufgrund der mangelnden Spezifität der MS/MS-Spektren zustande kam. Das bedeutet deswegen nicht zwingend, dass der entsprechende Analyt falsch zugeordnet wurde. Gleiches gilt auch für den Score zur qualitativen Bewertung der berechneten Summenformel. Auf ein erneutes Vermessen der Studienproben für spezifische MS/MS-Daten wurde verzichtet, um den Fokus auf die Untersuchungen zur Bioaktivität der Sulfatkonjugate zu ermöglichen und weil die in diesem Kontext zur eindeutigen Identifizierung notwendigen sulfatierten Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung standen.

Im ESI-Positiv-Modus konnte kein interessanter Marker in Form einer polyphenolischen Substanz näher beschrieben werden, was jedoch aufgrund der Molekülstruktur zu erwarten war. Aufgrund der Vielzahl an Hydroxygruppen werden Polyphenole dort deutlich schlechter ionisiert als im ESI-Negativ-Modus, wo bevorzugt Protonen der genannten funktionellen Gruppen abgespalten werden. Jedoch konnte UP4 mit einer m/z von 293,1000 im ESI-Positiv-Modus bei allen Studienteilnehmenden außer bei Proband 11 und somit mit Abstand

am häufigsten nachgewiesen werden. Auch aufgrund der Häufigkeit, der im Vergleich zu den detektierten Polyphenolen um den Faktor 10 deutlich höheren Peakfläche und der möglichen Summenformel von $C_{19}H_{16}OS$ wurde nicht davon ausgegangen, dass diese Substanz einen Marker von interessanter Natur darstellte. Betrachtet man nur die monoisotopische Masse, so kommt theoretisch mit einem Massenfehler von 7 ppm Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Frage, welches häufig Blutentnahmeröhrchen als Antikoagulans zugesetzt wird [331]. Allerdings wurden derartige Entnahmesysteme in der durchgeführten Klinischen Studie nicht benutzt, da diese der Gewinnung von Plasma und nicht von Serum dienen. Eine andere mögliche Herkunft für EDTA ist nicht plausibel. Außerdem kann EDTA grundsätzlich in beiden ESI-Modi detektiert werden [332], was hier nicht der Fall war. Häufig werden bei ungerichteten Analysen auch endogene Substanzen erfasst, wofür es in der vorliegenden Arbeit aber keinen Hinweis oder Treffer in Datenbanken gab. Am wahrscheinlichsten scheint somit wohl eine stickstoffhaltige und nicht näher identifizierbare Kontamination des LC-MS-Systems [333], da Stickstoffatome bevorzugt Protonen aufnehmen und daher im ESI-Positiv-Modus mit meist ausgezeichneter Empfindlichkeit erfasst werden können. Daran kann gesehen werden, dass die gewonnenen Daten und Informationen der Software kritisch und mit Bedacht in der Gesamtheit evaluiert werden müssen, um keine falschen Schlüsse zu ziehen. Nichtsdestotrotz müssten die Vermutungen durch weitere Messungen überprüft werden.

3.4.7 Regioselektivität von Sulfotransferasen

Wie bereits in B3.3 erwähnt, konnte die jeweilige Sulfatierungsposition der Substanzen anhand der erhaltenen MS-Daten nicht exakt bestimmt werden. Dabei ist die Position der Phase-II-Konjugation abhängig von der Isoform des Enzyms, sowie von der Substanz selbst [106, 334]. Für eine sichere Unterscheidung der Strukturisomere bzw. der enzymatischen Regioselektivität wären ergänzende NMR-Messungen oder bei spezifischen, abweichenden Fragmentierungsmuster MS/MS-Daten von Referenzsubstanzen notwendig gewesen. Wong et al. untersuchten ebenfalls die Position der Sulfatierung bei Hydroxymitsäure-Derivaten [302]; im Urin von Proband*innen wurde nach Kaffeekonsum vornehmlich Kaffeesäure-3-Sulfat detektiert, wobei das Ausmaß in vitro von der Isoform der SULT abhängig war. Pimpao et al. kamen zu einem übereinstimmenden Ergebnis bezüglich der Kaffeesäure, beim Sulfatkonjugat der Protocatechusäure gelang jedoch aus analytischen Gründen keine Differenzierung [293]. Bei Flavonoiden wird im Allgemeinen in vitro durch SULT1A3 am häufigsten die Hydroxy-Gruppe an C7 sulfatiert, danach folgt C4' [335]. Welches Isomer jedoch häufiger in vivo gebildet wird, ist bis dato bei Catechin und Taxifolin unklar. Klare Literaturangaben bezüglich der Regioselektivität gibt es ebenfalls nicht für Pyrogallol und dessen Methylderivat; einzig van der Hoof et al. bestimmten Pyrogallol-2-Sulfat in vivo [89]. Zumindest in humanem Urin wurde Protocatechusäure-3-Sulfat als Metabolit nach polyphenolreicher Ernährung nachgewiesen [283], weitere Untersuchungen

bezüglich dieses Analyten gibt es nicht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durchaus Hinweise und Literaturdaten bezüglich der Regioselektivität gibt, diese aber je nach Struktur des Analyten sehr spezifisch ist.

Grundsätzlich werden durch Sulfotransferasen aromatische und aliphatische Hydroxygruppen konjugiert, wobei typischerweise phenolische Gruppen bevorzugt werden [69, 299, 334, 336]. Die Konjugation einer aliphatischen funktionellen Hydroxygruppe fand beim mikrobiellen Metaboliten Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat (HPVS-Sulf) statt. Valeriansäure-Derivate stellen dabei die ringoffenen Formen von γ -Valerolactonen dar [87, 88, 287, 337], wozu auch Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat (HDPVS-Sulf) zu zählen ist. HDPVS-Sulf ist somit die ringgeöffnete Form von M1 (B3.1). Diese zyklischen Ester können im Sauren reversibel hydrolysiert werden (Abbildung 35). Aus diesem Grund ist bei der mit Ameisensäure angesäuerten angewandten Proteinfällung die ausschließliche Detektion der Valeriansäure-Derivate plausibel, jedoch wurden bei Grimm et al. [70] und Mülle et al. [338] lediglich die Ringform von M1 erfasst. Eine mögliche Erklärung für die differierenden Ergebnisse könnten insbesondere bei Mülle die angewandten MS-Methoden sein. Die Ermittlung der Fragmentionen zur Quantifizierung bzw. zur Kontrolle erfolgt anhand von Stammlösungen mit organischem Lösungsmittel der definierten m/z der Muttersubstanz. Dadurch kann das Valeriansäure-Derivat aufgrund der abweichenden m/z nicht erfasst werden, sowohl bei der Methodenentwicklung als auch bei der abschließenden Quantifizierung. Dabei ist zumindest bei der Probenvorbereitung durchaus von einer Esterhydrolyse auszugehen. Bei metabolischen Untersuchungen der Inkubationsversuche von Blutzellen mit M1 konnte Mülle nämlich ebenfalls nach methanolischer Proteinfällung ringoffene Derivate der Valeriansäure detektieren [339], nicht jedoch im Rahmen der Quantifizierung bekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol [261]. Verantwortlich für die abweichenden Resultate könnte zum einen die Probenvorbereitung sein, da Mülle das Serum mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufarbeitete. Denkbar ist aus diesem Grund eine schlechtere Extraktion der ringoffenen Derivate durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion, was durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt wird, da hier ebenfalls Methanol als Agens für die Proteinpräzipitation benutzt wurde. Zum anderen wurden für die Inkubationsversuche deutlich höhere M1-Konzentrationen verwendet als diejenigen, die in vivo erreicht werden. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass die in vivo erreichten Konzentrationen von Valeriansäure-Metaboliten bei Mülle unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

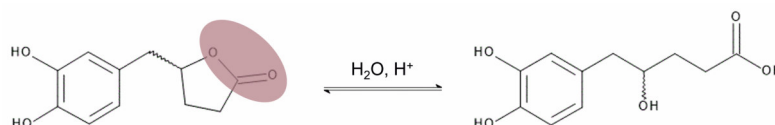


Abbildung 35: Beispielhafte Lactonhydrolyse von M1 zum Valeriansäure-Derivat im sauren Milieu.

3.4.8 Enteraler mikrobieller Metabolismus

Wie bereits in A1.4.4 geschildert, kommt dem intestinalen Mikrobiom eine wesentliche Bedeutung bei der Biotransformation und somit auch bei der Bioverfügbarkeit von polyphenolischen Xenobiotika zu. Aus diesem Grund ist grundsätzlich zu erwarten gewesen, dass nicht alle Marker bei jedem Studienteilnehmenden und in ähnlichem Ausmaß erfasst werden würden. Dies konnten bereits Grimm et al. in ihren Untersuchungen feststellen [70]. Da die Zusammensetzung des Mikrobioms hochvariabel und zudem auch abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren wie beispielsweise des Ernährungszustandes ist (A1.4), ist die festgestellte interindividuelle Heterogenität durchaus plausibel. Grimm konnte an dem zu D4-S4 korrespondierenden Zeitpunkt Ferulasäure ebenfalls nicht bei allen Proband*innen detektieren, ebenso Kaffeesäure und M1. Überdies erfasste sie Catechin bei jedem Studienteilnehmenden, in der vorliegenden Arbeit war dies bei acht von 15 Personen der Fall. Dafür gelang hier im Gegensatz zu Grimm der Nachweis von Taxifolin in zwei Drittel der Freiwilligen. Somit spiegeln die Unterschiede zwischen den beiden Arbeiten die hohe interindividuelle Variabilität bei Resorption und Metabolismus von Polyphenolen wider.

Zu den gastrointestinal gebildeten Metaboliten sind im Wesentlichen die beiden Valeriansäure-Derivate Hydroxyphenylvaleriansäure (HPVS), Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure (HDPVS), sowie Dihydroxymethoxybenzol, Trihydroxybenzol, Protocatechusäure, Vanillinsäure und Vanillin zu zählen, wobei die drei letztgenannten Substanzen auch im Extrakt selbst vorkommen. Dabei stellen HPVS und HDPVS Catechin-Metabolite dar [88, 89, 290]. Dihydroxymethoxybenzol und Trihydroxybenzol sind Derivate der Gallussäure [295, 301] bzw. von Anthocyanidin [340], die bislang jedoch nicht in Pycnogenol selbst oder in vivo nach der Einnahme nachgewiesen wurden. Protocatechusäure ist ein Bestandteil von Pycnogenol, gehört aber auch zu den Anthocyanidin-Metaboliten [7], die bislang nicht mit der Pycnogenol-Einnahme assoziiert waren. Allerdings wurden Protocatechusäure und der methylierte Abkömmling Vanillinsäure auch schon nach der Einnahme von Procyanidinen nachgewiesen [108, 341]. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass die beiden Substanzen mikrobiell aus Kaffeesäure gebildet wurden [340]. Eine klare Unterscheidung, ob originärer Bestandteil oder mikrobieller Metabolit ist mit den vorliegenden Ergebnissen jedoch nicht möglich, sondern allenfalls z. B. mittels der Applikation radioaktiv markierter Substanzen [88, 342].

Eine besondere Rolle könnten mikrobielle Metabolite und auch Sulfatkonjugate (B3.4.9) bei der Bioaktivität von Pycnogenol spielen. Wie eingangs in A1.3 erklärt, ist die Einnahme von Pycnogenol mit einer Vielzahl von positiven Effekten auf die Gesundheit verbunden, wozu auch die Verbesserung der endothelialen Funktion gehört [42]. Obwohl bioaktive Bestandteile und Metabolite bereits identifiziert werden konnten, sind weder alle Substanzen bekannt noch deren Beitrag zu den postulierten Effekten in vivo. Zudem zeigen diese häufig nur geringe (Einzel-)Effekte und liegen in vivo nur in niedrigen Konzentrationen vor [16, 27].

Deswegen ist denkbar, dass mikrobielle Metabolite für einen Teil der pharmakodynamischen Effekte verantwortlich sind [343, 344].

3.4.9 Bioaktivität von Sulfatkonjugaten

Im Allgemeinen kann zwar davon ausgegangen werden, dass durch die Biotransformation in Phase-II die korrespondierenden Konjugate keine oder eine geringere biologische Wirkung innehaben [53]; trotzdem ist nicht ausgeschlossen, dass von Sulfatkonjugaten eine Bioaktivität ausgeht, entweder direkt oder nach Abspaltung der Sulfatgruppe im Zielgewebe durch unspezifische Sulfatasen [106]. Zur Bioaktivität von sulfatierten Polyphenolen gibt es mangels kommerziell erhältlicher Substanzen nur vereinzelt Literaturberichte, welche allerdings durchaus vielversprechend sind. Das Isorhamnetin-Sulfatkonjugat Persicarin zeigte im Vergleich der beiden Substanzen in humanen Endothelzellen eine stärkere gerinnungshemmende und fibrinolytische Wirkung [345]. Verschiedene Phase-II-Metaboliten einiger Flavonoide, einschließlich Protocatechusäure-Sulfat, verringerten die TNF α -Sekretion in Endotoxin-behandelten Monozyten [346]. In mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen konnten die beiden Strukturisomere des Protocatechusäure-Sulfats die sVCAM-1-Sekretion verringern [347]; das Protein sVCAM-1 stellt einen wichtigen Entzündungsmediator in Endothelzellen dar. Bemerkenswert war die konzentrationsabhängige Bioaktivität von Quercetinkonjugaten bezüglich der COX-2-Expression in CaCo-2-Zellen; lagen diese Konjugate in niedrigen Konzentrationen vor, so erhöhten sie die Expression; hingegen bei hohen Konzentrationen wurde die Expression reduziert. Wenn die Zellen jedoch zusätzlich mit Interleukin-1 β stimuliert wurden, so hemmten die sulfatierten Metaboliten die COX-2-Expression stärker als die Mutterverbindung Quercetin [348]. Bei Untersuchungen sowohl in isolierten Mäusearterien als auch in vivo bewirkte Ferulasäure-Sulfat eine Vasorelaxation, wohingegen Ferulasäure inaktiv war [349]. Fang et al. untersuchten den Einfluss von Morin und dessen Sulfatkonjugat auf die TNF- α - und Interleukin-12-Sekretion, zwei bei Entzündungsgeschehen hochrelevante Zytokine [350]. Dabei hemmte sulfatiertes Morin die Sekretion signifikant stärker als die unkonjugierte Form. Auch bei Anthocyanidinen konnte ein Unterschied hinsichtlich der Bioaktivität von Muttersubstanz und Phase-II-Metaboliten festgestellt werden. Cyanidin-3-Glucosid hatte keinen Einfluss auf die Interleukin-6-Sekretion (IL-6) in stimulierten humanen Endothelzellen, während alle Phase-II-Metabolite die IL-6-Konzentration deutlich reduzierten [351]. Die größte Sekretionsinhibition wurde hier durch sulfatierte Metabolite verursacht; Protocatechusäure-Sulfat zeigte die größte Wirkung und hemmte die IL-6-Sekretion fast vollständig, was sich interessanterweise auch auf mRNA-Ebene widerspiegelte. Die Stimulation erfolgte dabei jeweils durch oxidierte Lipoproteine. Bei Untersuchungen von Figueira et al. waren polyphenolische Sulfatkonjugate in drei verschiedenen Zellkulturmodellen nicht nur in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, sondern zeigten ebenfalls neuroprotektive Effekte [352]. Pyrogallol-Sulfat schützte dabei vor Endothelverletzungen und reduzierte nach einem

inflammatorischen Stimulus neben der TNF α -Konzentration auch die weiterer Entzündungsmarker. Darüber hinaus konnte der mikrobielle Metabolit Hydroxyphenyl- γ -valerolacton-Sulfat im Tiermodell die Blut-Hirn-Schranke überwinden [297].

Daher besteht durchaus die Möglichkeit, dass Sulfatkonjugate zur beobachteten Wirkung von Pycnogenol beitragen können [108, 346, 351, 353]. Aufgrund der eigenen Ergebnisse und der geschilderten Literaturangaben sollte bei den nachfolgenden Versuchen zur Bioaktivität der Fokus auf Sulfatkonjugate von Pycnogenol-Bestandteilen und Metaboliten gelegt werden (B4, C4).

3.4.10 Vergleich mit bisherigen Ergebnissen nach Pycnogenol-Einnahme

In den Kapiteln B2.3 und B3.1 wurde bereits beschrieben, dass Grimm et al. zehn Substanzen (U1 – U10) in Humanplasma nach der Einnahme von Pycnogenol aufgrund zu diesem Zeitpunkt fehlender technischer Möglichkeiten nicht identifizieren konnten [70]. Letztlich kann aufgrund fehlender Plasmaproben für Vergleichsmessungen und aufgrund unterschiedlicher chromatographischer Methoden nicht gesagt werden, inwiefern die in der vorliegenden Arbeit detektierten Marker mit diesen übereinstimmen. Das von Grimm et al. mutmaßlich bestimmte Procyanidin B1 (U1) wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst. Dimere Procyanidine besitzen zwar eine relativ große molare Masse, im Falle von Procyanidin B1 579 Da, können jedoch zumindest zu einem geringen Ausmaß resorbiert werden, wenngleich es dazu aber konträre Angaben gibt; daher ist bis dato unklar, welche Rolle Procyanidine in der Bioaktivität spielen [2, 92, 354, 355]. Plausibel ist dabei auch eine Wirkung über mikrobielle Metabolite, die direkt im Darm wirken oder dort resorbiert werden und systemisch ihre Wirkung entfalten [87, 337, 356]. Anhand der *Rule of 5* nach Lipinski können Substanzen bezüglich ihrer oralen Bioverfügbarkeit grob eingeschätzt werden [357]. Dabei sollten für eine adäquate Resorption nicht mehr als fünf H-Brücken-Donatoren (z. B. Hydroxy-Gruppen) bzw. nicht mehr als zehn -Akzeptoren (z. B. Sauerstoff mit negativer Partialladung), sowie ein logP-Wert von maximal fünf und eine maximale molekulare Masse von 500 Da vorliegen. Die theoretischen Werte für Procyanidin B1 würden somit gegen eine orale Bioverfügbarkeit sprechen [358]. In diesem Kontext ist vermutlich auch UP5 (B3.3) mit einer *m/z* von etwa 620 nicht auf die Einnahme von Pycnogenol zurückzuführen. Die molekularen Massen aller anderen detektierten Substanzen liegen mit einem Median von ca. 247 Da jedoch deutlich unter 500 Da und könnten damit auf resorbierte Bestandteile oder Metabolite des Pycnogenols zurückzuführen sein.

4 Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum

4.1 Schutz vor inflammatorischen Endothelschäden

4.1.1 Ex vivo-Modell

Wie in B3.3 bereits geschildert, wurden keine neuartigen Bestandteile oder Metabolite in humanem Serum nach der Einnahme von Pycnogenol detektiert. Allerdings wurde gezeigt, dass alle der detektierten bereits bekannten Substanzen ausschließlich als Sulfatkonjugate vorlagen. Sulfatkonjugate waren für in vitro Versuche zum Zeitpunkt der Arbeit jedoch kaum kommerziell erhältlich und eine Synthese zeitlich zu aufwendig. Darüber hinaus bestand auch die Möglichkeit, dass unbekannte, also nicht detektierte Analyten eine Bioaktivität aufweisen (B3.4.9). Aus diesen Gründen sollte für die Untersuchung der Bioaktivität für eine weitere Charakterisierung der Substanzen eine Option gewählt werden, die die beiden genannten Herausforderungen berücksichtigen konnte. Grimm hat für diese Zwecke ein sogenanntes ex vivo-Modell entwickelt [196], welches für die eigenen Untersuchungen modifiziert werden sollte. Dieses Modell basierte darauf, dass die entsprechenden Komponenten nicht isoliert, sondern in ihrer natürlichen Matrix (hier: Humanserum) bezüglich ihrer Wirkung im Zellkulturmodell charakterisiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte humanes Serum nach der Einnahme von Pycnogenol bezüglich der protektiven Wirkung auf inflammatorisch stimulierte Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht werden (Abbildung 36). Die Arbeitshypothese war, dass die Sulfatkonjugate in der Lage sein könnten eine Endothelbeeinträchtigung abzumildern, siehe dazu auch B3.4.9.

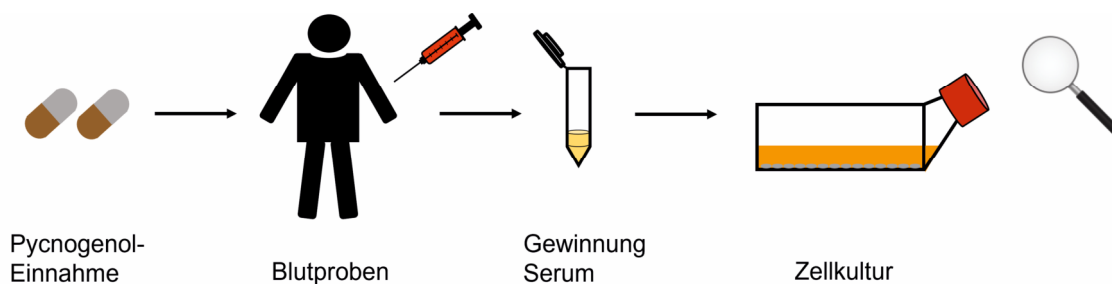


Abbildung 36: Schematische Darstellung des ex vivo-Modells. Nach der Einnahme von Pycnogenol wird das anschließend gewonnene Serum hinsichtlich der Wirkung in inflammatorisch stimulierten Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht.

Der ex vivo-Ansatz hatte somit den Vorteil, dass hier simultan die Wirkungen der Sulfatkonjugate und unbekannter Analyten erfasst werden konnte. Dies traf ebenfalls auf einen möglichen Synergismus bezüglich der biologischen Aktivität zu. Außerdem war grundsätzlich auch ein Einfluss der Matrixbestandteile auf die beobachtete biologische Wirkung denkbar. Zudem spiegelten die Versuchsbedingungen die in vivo erreichbaren Serumkonzentrationen wider, da bei in vitro Versuchen häufig unphysiologisch hohe Konzentrationen

eingesetzt werden, um einen Effekt zu provozieren. Überdies ist vorher nicht die Quantifizierung der verschiedenen Analyten notwendig, um die in vivo erreichten Konzentrationen zu ermitteln. Abzugrenzen ist das hier angewandte ex vivo-Modell von denjenigen Modellen, in denen beispielsweise Gewebe isoliert wird und außerhalb des Organismus untersucht wird. Beim oben genannten Versuchsaufbau von Grimm verringerte nach mehrtägiger Einnahme von Pycnogenol gewonnenes Plasma die Freisetzung von MMP-9 in inflammatorisch stimulierten Monozyten, zudem wurde ein ähnlicher Effekt bei der NF-κB-Aktivierung festgestellt [359]. Lomholt et al. konnten später in einem ähnlichen Ansatz zeigen, dass Resveratrol ex vivo die Immunreaktion bei Rheumatoider Arthritis abmildert [360].

4.1.2 Ergebnisse der Vorversuche

In den Vorversuchen wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Etablierung des ex vivo-Modells beleuchtet. Die Parameter sollten so gewählt werden, dass durch die initiale Entzündungsreaktion ein maximales Shedding von Glycocalyx-Bestandteilen bzw. im Speziellen Heparansulfat induziert wurde. Damit konnte davon ausgegangen werden, dass auch bei nur geringer Bioaktivität der ausgewählten Polyphenole und deren Sulfatkonjugate ein möglicher protektiver Effekt detektiert werden konnte. Die Heparansulfat-Konzentration x wurde bei allen Versuchen mittels folgender Formel (2) berechnet (C4.4.6):

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} \quad (2)$$

a = theoretische Absorption bei Konzentration von 0, b = Steigung, c = Wendepunkt, d = theoretische Absorption bei unendlicher Konzentration.

Es war geplant Studienproben in dem ex vivo Modell einzusetzen, in denen die Sulfatkonjugate detektiert werden konnten (B3.3). Im Verlauf der Vorversuche wurden verschiedene prozentuale Humanserum-Anteile im Kulturmedium evaluiert. Erstrebenswert war ein möglichst hoher Serumanteil, damit die Endkonzentration der polyphenolischen Substanzen im Modell möglichst hoch war. Als maximal verträgliche Konzentration wurde 50 % Humanserum in Medium im Rahmen eines MTT-Assays (B4.1.4, D3.1.3) ermittelt. Dies gab die Balance wieder zwischen Verfügbarkeit des Humanserums der Studienproben, größtmöglicher Konzentration der Sulfatkonjugate (siehe oben) und protektiver Wirkung von größeren Serummengen im Sinne einer stark wachstumsfördernden Wirkung, wodurch die inflammatorische Stimulation hätte verringert sein können. Aus diesem Grund werden bei in vitro Versuchen teilweise Zellen vorab ohne Serum jeglicher Genese inkubiert, um unter anderem durch den resultierenden Nährstoffmangel eine größtmögliche Empfindlichkeit gegenüber z. B. Noxen zu generieren [361]. Zudem entsprechen 50 % Humanserum etwa dem physiologischen flüssigen Anteil des Blutes. In der Zellkultur ist Serum, aus finanziellen Gründen meist ein gerade hinreichender Anteil fetales Rinderserum, ein essentieller Lieferant für Proteine, diverse Wachstumsfaktoren, Hormone und Nährstoffe, beispielsweise

Endothelial cell growth factor (ECGF), Insulin sowie Lipoproteine und Triglyceride. Demzufolge stellt Serum eine wichtige Nahrungsquelle für die adäquate Zellproliferation dar [362]. Entscheidend für die Ausbildung eines Endothels mit Glycocalyx aus einem Zellmonolayer (A2.1) war neben der initialen Zellzahl pro Well auch die Zeit zwischen dem Aussäen der Zellen und dem Beginn des jeweiligen Versuchs. Typisch ist eine Wartezeit von zwölf bis 24 Stunden [363, 364]. Daher wurde beim ersten Vorversuch zur Bestimmung der adäquaten Zellzahl und der Kulturzeit 48 Stunden bis zu Beginn der inflammatorischen Stimulation für acht oder 24 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS, 100 ng/mL, 1.000 ng/mL) oder TNF- α (10 ng/mL, 100 ng/mL) gewartet. Die verschiedenen Kulturbedingungen wurden demnach exploratorisch so gewählt, dass ein Shedding mit großer Wahrscheinlichkeit stattfand. Als Negativkontrolle fungierten Endothelzellen, die keinem inflammatorischen Stimulus ausgesetzt wurden, sondern mit einem äquivalenten Volumen Medium bzw. 50 % Humanserum inkubiert wurden. Allerdings konnte in keinem der Zellkulturüberstände des ersten Vorversuches Heparansulfat detektiert werden. Aus diesem Grund wurden im folgenden Versuchsansatz die Zellen in Zellkultureinsätzen kultiviert, damit der transendotheliale Widerstand (TEER) als Marker für die Endothelintegrität während einer verlängerten Kulturzeit von insgesamt 16 Tagen überwacht werden konnte (C4.3). So war es zum einen möglich die Ausbildung des Monolayers zu überprüfen und zum anderen konnte eine insuffiziente Glycocalyx aufgrund kurzer Kulturzeit ausgeschlossen werden. In der Literatur gab es Hinweise, dass die Bildung der Glycocalyx in vitro erst mit einer gewissen Latenzzeit nach dem Aussäen erfolgt. Möckl et al. konnten nach zehntägiger Kultivierung Bestandteile der Glycocalyx auf der kompletten Zelloberfläche nachweisen [365]. Jimenez et al. untersuchten zwar nicht die Glycocalyx, charakterisierten aber unter anderem Bestandteile von Tight und Adherence junctions nach einer Kulturzeit der HUVEC von sieben Tagen, wodurch eine suffiziente Kulturzeit angenommen werden konnte [366]. Zusätzlich erfolgte der letzte Mediumwechsel im Folgenden immer zwölf bis 24 Stunden vor Beginn des Versuchs, um unnötigen Scherstress zu vermeiden. Neben den oben genannten inflammatorischen Stimulanzen LPS (1.000 ng/mL, 24 h) und TNF- α (100 ng/mL, 24 h) wurden diese um H₂O₂ in einer Konzentration von 50 μ M ergänzt. Hiermit sollte ein zusätzlicher Pfad zur Induktion von endothelialeem Shedding adressiert werden. Diebel et al. nutzten Wasserstoffperoxid, um bei HUVEC die protektive Wirkung von Tranexamsäure auf die Degradation der Glycocalyx zu evaluieren; erfasst wurde dies durch die Quantifizierung von u. a. Syndecan-1 im Zellüberstand, einem Heparansulfat-Proteoglycan [367]. Überprüft wurde in der vorliegenden Arbeit für H₂O₂ eine Inkubationszeit von acht und 24 Stunden, sodass erneut mit großer Wahrscheinlichkeit Heparansulfat detektiert werden konnte, wenn ein Shedding stattfand. Letztlich gelang zwar die Detektion von Heparansulfat mittels ELISA sowohl apikal als auch basolateral, allerdings unterlagen die Ergebnisse einer sehr starken Schwankung und ermöglichten deswegen auch keine Abstufung zwischen LPS, TNF- α und H₂O₂ als optimales Stimulans.

Nach der Inkubation mit TNF- α betrug die Heparansulfatmenge $1,62 \pm 0,49$ pg pro μg Protein ($n = 2$), bei H_2O_2 $0,49 \pm 0,15$ pg pro μg Protein ($n = 2$). Da unter dem Einfluss von LPS kein Heparansulfat bestimmt werden konnte, wurden die Vorversuche bezüglich dieses Stimulans eingestellt (Abbildung 37).

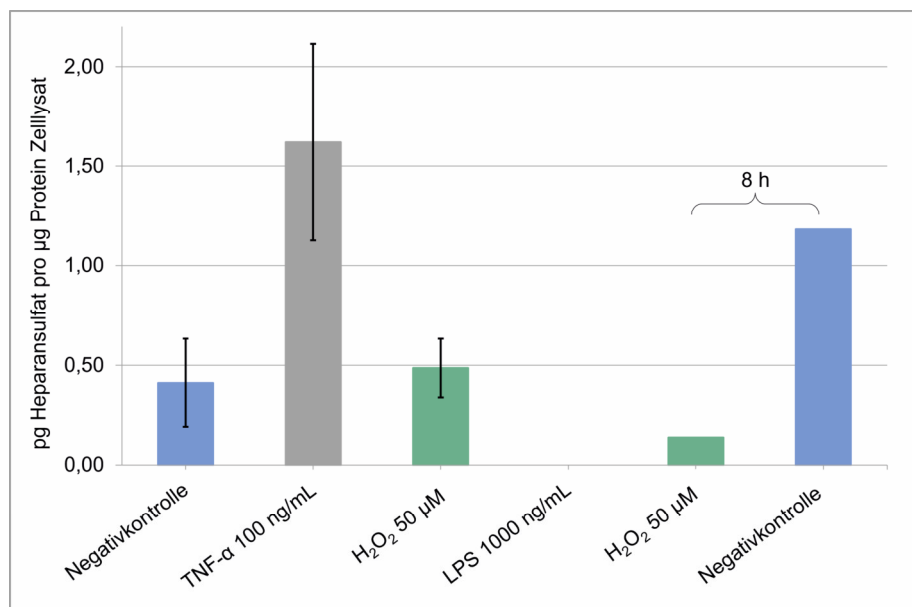


Abbildung 37: Gesamtmenge Heparansulfat (pg, apikal und basolateral) in Anwesenheit von 50 % Humanserum, normiert auf den Proteingehalt des Zelllysates (μg) nach 24 h bzw. zusätzlich achtstündiger Inkubation mit dem jeweiligen inflammatorischen Stimulans. $N = 2$ bzw. 1 aufgrund limitierter Ressourcen. Die vertikalen Striche stellen die Standardabweichung dar, soweit verfügbar. Die Zelllysate nach achtstündiger Inkubation mit H_2O_2 standen nicht zur Verfügung, weswegen hier der Mittelwert aller Zelllysate zur Normierung auf den Proteingehalt verwendet wurde. Negativkontrolle = unstimulierte Zellen.

In Anwesenheit von 10 % Humanserum wurde ausschließlich bei achtstündiger Inkubation mit H_2O_2 $0,21$ pg Heparansulfat pro μg Protein ($n = 1$) im apikalen Überstand erfasst, weswegen im Folgenden diese Humanserum-Konzentration weggelassen wurde. Zudem lag diese Menge deutlich unterhalb der Negativkontrolle ($1,18$ pg Heparansulfat pro μg Protein, $n = 1$). Der transendotheliale Widerstand stieg im Verlauf der Kulturzeit erwartungsgemäß kontinuierlich an und korrelierte daher gut mit der Integrität des Monolayers, jedoch konnte nach der inflammatorischen Stimulation keine Korrelation mit den erhaltenen Ergebnissen hergestellt werden (Daten im tabellarischen Anhang D3.1.1.2). Zu erwarten wäre gewesen, dass bei den Proben, bei denen Heparansulfat quantifiziert werden konnte, der Widerstand aufgrund des erfolgten Sheddings deutlich geringer wäre. Da dies nicht der Fall war, wurde im abschließenden Vorversuch zur Verkürzung der inflammatorischen Stimulation auf die Kultivierung der endothelialen Zellen in Zellkultureinsätzen verzichtet. Zudem waren diese Einsätze für Untersuchungen der Glycocalyx nicht zwingend notwendig. Die genannte Verkürzung der inflammatorischen Stimulation wurde aufgrund finanzieller Ersparnisse und limitierter Kapazitäten erwogen. Zudem gab es verschiedene Berichte in der Literatur, dass eine zum Teil deutlich kürzere Stimulationsdauer von sechs Stunden für TNF- α bzw.

60 Minuten für H_2O_2 bei ähnlichen Untersuchungen ausreicht [367-369]. Außerdem bestand die Hoffnung auf eindeutigere Ergebnisse in einem neuen Ansatz. Aus diesem Grund wurden die HUVEC mit 100 ng/mL TNF- α für sechs Stunden und 50 μM H_2O_2 für zwei Stunden stimuliert, wobei die Inkubationszeit von 24 Stunden 100 ng/mL TNF- α als zusätzliche Kontrolle fungierte (Abbildung 38).

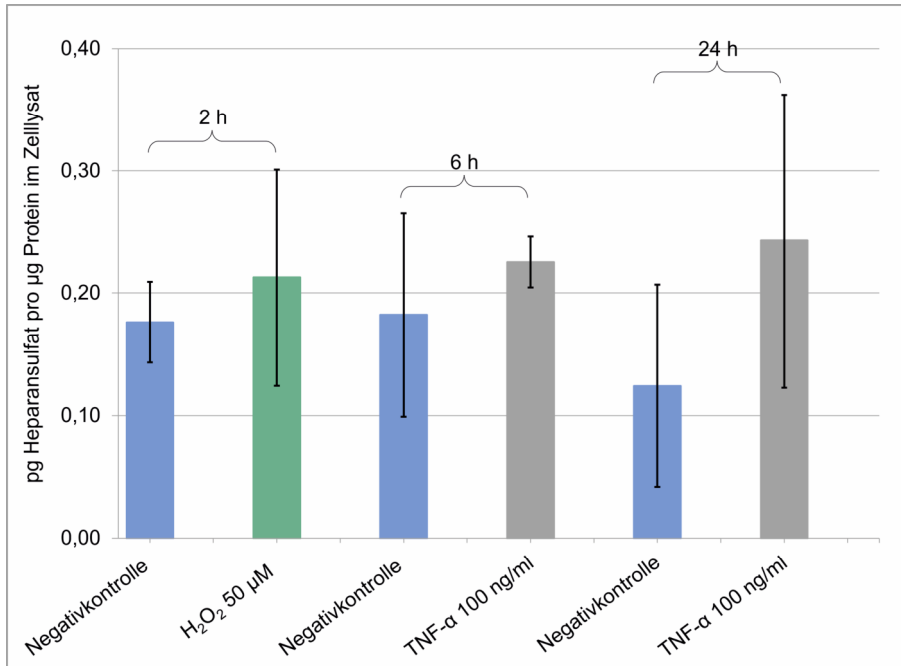


Abbildung 38: Gesamtmenge Heparansulfat (pg) in Anwesenheit von 50 % Humanserum, normiert auf den Proteingehalt des Zelllysates (μg) nach zwei Stunden Inkubation mit 50 μM H_2O_2 und sechs bzw. 24 Stunden Inkubation mit 100 ng/mL TNF- α . N = 2 aufgrund limitierter Ressourcen. Die vertikalen Striche stellen die Standardabweichung dar, soweit verfügbar. Negativkontrolle = unstimulierte Zellen.

Es fiel auf, dass im Vergleich zum vorherigen Versuch (Abbildung 37) insgesamt ein geringeres Maß an Heparansulfat erfasst wurde und die Streuung der Ergebnisse noch deutlicher ausgeprägt war. Bei der 24-stündigen Inkubation mit TNF- α betrug die bestimmte Menge $0,24 \pm 0,12$ pg Heparansulfat pro μg Protein ($n = 2$), diese lag vorher bei $1,62 \pm 0,49$ pg pro μg Protein ($n = 2$). Aufgrund der starken Streuung gestaltete sich eine Interpretation der Ergebnisse als nicht verlässlich, weswegen auch vorerst nicht - wie ursprünglich geplant - Humanserum der Studienproben in den Untersuchungen eingesetzt wurde. Es wurde beschlossen, zunächst ausgewählte Polyphenole und deren korrespondierenden Sulfatkonjugate bezüglich einer protektiven Wirkung im Modell zu charakterisieren. Erst wenn hier eine Bioaktivität zu beobachten gewesen wäre, hätten die Studienproben betrachtet werden sollen.

Für diesen Versuch (B4.1.3) wurden die Kulturbedingungen des vorher geschilderten Ansatzes übernommen, die inflammatorische Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α aber über

einen Zeitraum von 24 Stunden belassen. Die Nachweisgrenze des ELISA lag jeweils bei 5 pg/mL Heparansulfat.

4.1.3 Versuchsdurchführung

Um zu eruieren ob grundsätzlich die Möglichkeit bestand, dass von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten eine protektive Bioaktivität beim Shedding der Glycocalyx ausgeht, wurden Ferulasäure, Ferulasäure-Sulfat, Protocatechusäure und Protocatechusäure-Sulfat gewählt, da von den Muttersubstanzen Sulfatkonjugate kommerziell verfügbar waren. Die im Versuch eingesetzten Konzentrationen lagen mit 0,1 und 0,5 μM in 50 % Humanserum höher als zuvor in vivo nach Pycnogenol-Einnahme bestimmt, um mit größtmöglicher Sicherheit einen Effekt detektieren zu können, sofern dieser vorlag. Bei Mülek betrug die nach Pycnogenol-Einnahme in Serum vorliegende mittlere Ferulasäure-Konzentration beispielsweise 2 nM [338]. Hingegen ermittelten Pimpao et al. nach dem Verzehr einer größeren Menge eines polyphenolreichen Fruchtpürees Plasmakonzentrationen ähnlich der für den Versuch gewählten [293]. Nach einer zweistündigen Prä-Inkubation mit den genannten Substanzen erfolgte die inflammatorische Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α für einen Zeitraum von 24 Stunden mit anschließender Heparansulfat-Quantifizierung im Überstand mittels ELISA (Abbildung 39).

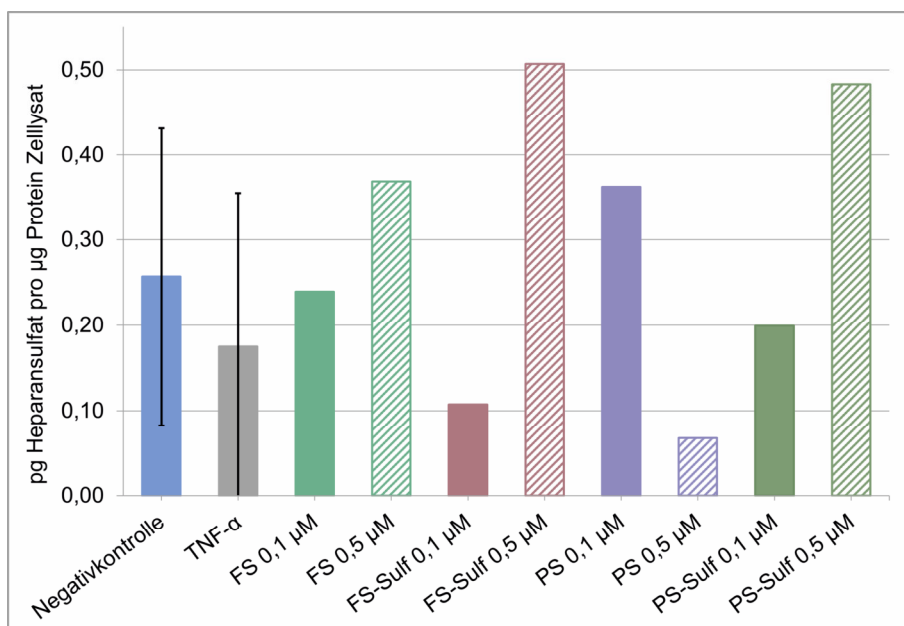


Abbildung 39: Gesamtmenge Heparansulfat (pg) in Anwesenheit von 50 % Humanserum, normiert auf den Proteingehalt des Zelllysates (μg). Nach einer zweistündigen Prä-Inkubation mit den polyphenolischen Substanzen (Endkonzentration 0,1 bzw. 0,5 μM) erfolgte die inflammatorische Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α für 24 Stunden. FS = Ferulasäure, PS = Protocatechusäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat. N = 2 bzw. 1 aufgrund limitierter Ressourcen. Die vertikalen Striche stellen die Standardabweichung dar, soweit verfügbar. Negativkontrolle = unstimulierte Zellen.

Wie bereits in den Vorversuchen in B4.1.2 beobachtet, zeigte sich auch hier bei der Negativkontrolle in Form von unstimulierten HUVEC mit 0,13 und 0,38 pg Heparansulfat pro μg

Protein und bei mit 100 ng/mL TNF- α stimulierten Zellen mit 0,05 und 0,30 μ g Heparansulfat pro μ g Protein eine deutliche Streuung der Ergebnisse; dies machte eine verlässliche Interpretation der Versuchsergebnisse unmöglich. Insgesamt kann jedoch gesagt werden, dass TNF- α in der vorliegenden Arbeit nicht in der Lage war den gewünschten Effekt zu erzielen, nämlich ein signifikantes Shedding und somit eine deutliche Erhöhung der Heparansulfat-Konzentration im Überstand. Bei der Betrachtung der eingesetzten Polyphenole wurde angenommen, dass beim grundsätzlichen Vorliegen einer Glycocalyx-protectiven Wirkung von Polyphenolen bzw. deren Sulfatkonjugaten bei der höheren der beiden eingesetzten Konzentration von 0,5 μ M weniger Heparansulfat zu detektieren wäre. Diese Hypothese traf auf keine der Substanzen mit der Ausnahme von Protocatechusäure zu. Zusätzlich sollte unter der Annahme einer Bioaktivität durch die Sulfatkonjugate bei der Inkubation mit diesen im Vergleich zur korrespondierenden unkonjugierten Muttersubstanz ebenfalls weniger Heparansulfat bestimmt werden. Diese Vermutung bestätigte sich deutlich bei einer Konzentration von jeweils 0,1 μ M sowohl bei Ferulasäure bzw. -Sulfat als auch bei Protocatechusäure bzw. -Sulfat. Eine gegensätzliche Beobachtung bezüglich der Bioaktivität von Protocatechusäure und dessen Sulfatkonjugaten machten allerdings Warner et al. [347]. Hier wurden verschiedene Flavonoide und deren Metabolite bzw. sulfatkonjugierte Derivate bezüglich der Wirkung auf die Expression von sVCAM-1 in mit TNF- α stimulierten HUVEC untersucht. sVCAM-1 ist eine lösliche Isoform von Zelladhäsionsmolekülen im Endothel, die durch Bindung von Immunzellen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt [370]. Protocatechusäure reduzierte die Proteinexpression stärker als seine Sulfatkonjugate und zeigte somit eine ausgeprägtere Bioaktivität. Bei Koga et al. konnten Catechin-Metabolite in Form von Sulfaten und Glucuroniden aus Rattenplasma im Gegensatz zur Muttersubstanz die Monozyten-Adhäsion von mit Interleukin- β stimulierten humanen Endothelzellen aus der Aorta signifikant senken [371]. Catechin ist als Monomer und als Procyanidin-Bestandteil in Pycnogenol enthalten (A1.2). Allerdings ist nicht klar, ob Catechin in der Ratte einer ähnlichen Metabolisierung wie beim Menschen unterliegt. Amin et al. betrachteten die Interleukin-6-Sekretion in mit oxidiertem LDL inflammatorisch stimulierten HUVEC nach der Inkubation mit verschiedenen Cyanidin-Metaboliten [351]. Cyanidin ist zwar kein bekannter Bestandteil von Pycnogenol, aber zu dessen Metaboliten gehören unter anderem Ferulasäure und Protocatechusäure. Am potentesten zeigte sich in der Studie von Amin et al. Protocatechusäure-Sulfat, das bereits bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,1 μ M die Interleukin-6-Konzentration drastisch senkte und dabei eine deutlich höhere Bioaktivität aufwies als Protocatechusäure selbst. Interessanterweise hatten alle untersuchten Sulfatkonjugate eine protektive Wirkung. Zusätzlich war die Bioaktivität der Protocatechusäure-Sulfatkonjugate stärker als die der korrespondierenden Glucuronide. Di Gesso et al. bestimmten die TNF- α -Konzentration als Erfolgsparameter bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Flavonoide und deren Metabolite in mit LPS stimulierten humanen Monozyten [346]. Im Gegensatz zum Glucuronid-Konjugat

verminderte dabei Protocatechusäure-Sulfat ab einer Konzentration von 1 μM die inflammatorische Reaktion, allerdings nicht auf mRNA-Ebene. Jedoch zeigten nicht nur Metabolite eine Wirkung, sondern auch zwei Ausgangssubstanzen. In vivo wirkte Ferulasäure-Sulfat im Gegensatz zu Ferulasäure bei Mäusen blutdrucksenkend und ex vivo vasorelaxierend, wengleich van Ryment et al. eine Beteiligung des Endothels ausschlossen [349]. Insgesamt zeigt sich also ein heterogener Eindruck der Glycocalyx-protectiven Bioaktivität von Muttersubstanz und Metaboliten. Weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene wären nötig, um ein eindeutiges Bild zu bekommen. Letztlich ist bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu beachten, dass diese aufgrund limitierter Ressourcen nur Einmalversuche waren, weswegen die Ergebnisse nur qualitative Tendenzen darstellen und allenfalls als Anhaltspunkte für weitere Analysen dienen sollten. Aufgrund der inkonsistenten und insuffizienten Datenlage wurde folglich beschlossen, die Bestrebungen bezüglich des ex vivo-Modells einzustellen.

4.1.4 Ergebnisse der MTT-Assays

Keine der untersuchten Humanserum-Konzentrationen von 10 % und 50 % erwies sich bei Inkubationszeiten von zwei, acht oder 24 Stunden im Vergleich zu reinem Medium (0 % Humanserum) als cytotoxisch (Abbildung 40, C4.6). Vielmehr zeigte sich unter allen Bedingungen eine erhöhte Zellviabilität; interessanterweise trat dieser Effekt bereits bei einer niedrigen Serumkonzentration von 10 % und bereits nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von zwei Stunden (119 ± 11 %) auf. Humanserum der verwendeten Konzentration von 50 % zeigte eine Zellviabilität von 146 ± 2 % nach zwei Stunden, von 135 ± 3 % nach acht Stunden und von 135 ± 7 % nach 24 Stunden. Da bei allen Untersuchungen die jeweils äquivalente Konzentration Humanserum als Kontrolle fungierte, stellte das vermehrte Zellwachstum kein Problem dar. Eine ausführliche Darlegung zur Wirkung von Humanserum in vitro ist im folgenden Kapitel B4.1.5 zu finden.

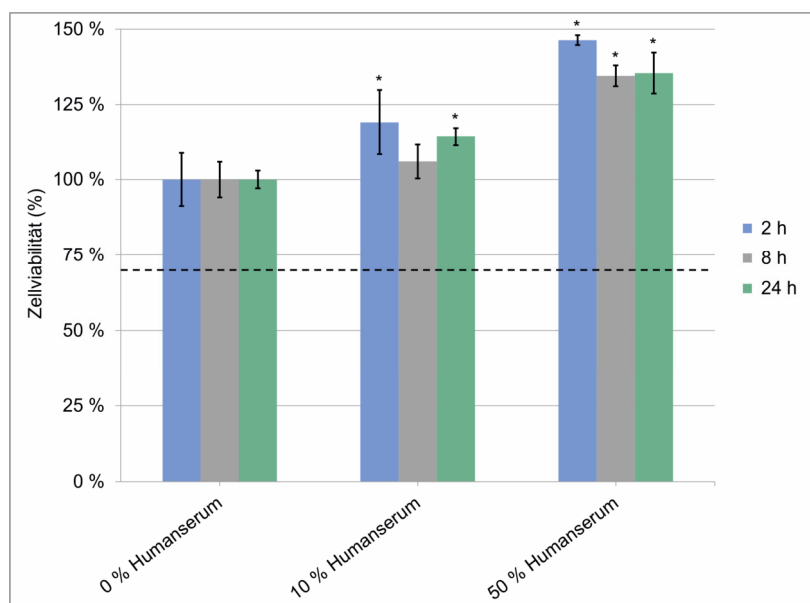
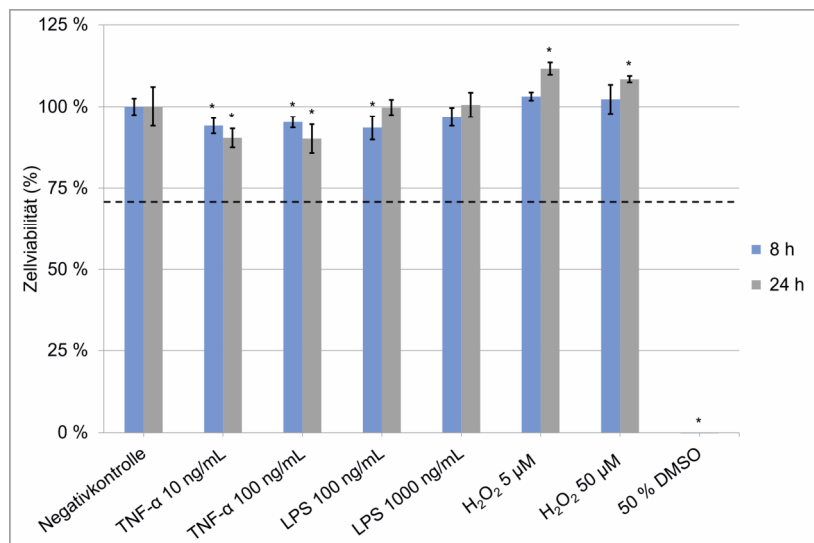


Abbildung 40: Einfluss von 10% und 50 % Humanserum auf die Zellviabilität nach einer Inkubationszeit von zwei, acht bzw. 24 Stunden. Die Absorptionen wurden auf 0 % Humanserum normiert (%). Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 6$). Die waagrechte gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze von 70 % Zellviabilität gemäß DIN EN ISO 10993-5 (C4.6). *: Ergebnis statistisch signifikant, 0 % Humanserum als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

Die Analyse der inflammatorischen Stimuli TNF- α , LPS und H₂O₂ bei Humanserum-Konzentrationen von 10 % und 50 % zeigte bei Inkubationszeiten von acht bzw. 24 Stunden zwar zu einem gewissen Grad eine reduzierte Zellviabilität, allerdings lag diese immer deutlich über der gemäß DIN EN ISO 10993-5 empfohlenen Grenze von 70 % (Abbildung 41) [372].

A



B

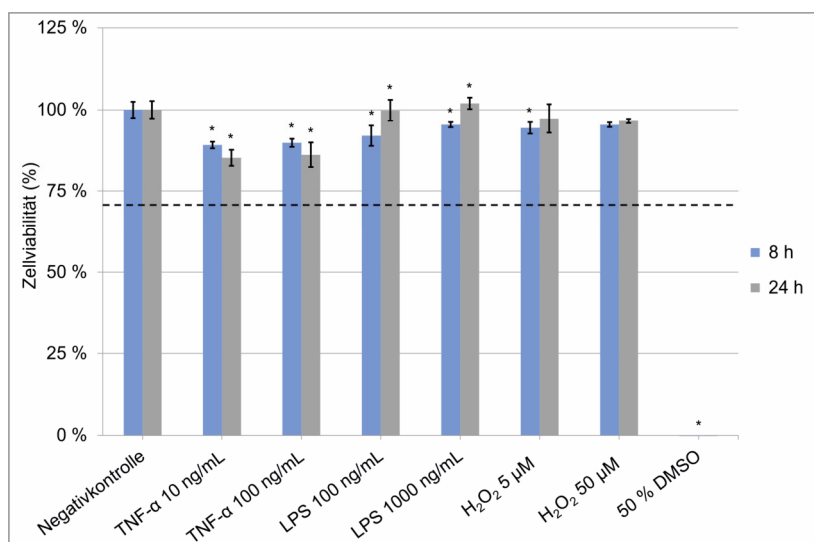


Abbildung 41: Zellviabilität der inflammatorischen Stimuli TNF- α (10 ng/mL, 100 ng/mL), LPS (100 ng/mL, 1.000 ng/mL) und H₂O₂ (5 μ M, 50 μ M) in Anwesenheit von 10 % (A) bzw. 50 % (B) Humanserum nach einer Inkubationszeit von acht bzw. 24 Stunden. Die Absorptionen wurden auf die Negativkontrolle (10 % bzw. 50 % Humanserum, ohne Zugabe inflammatorisches Stimulans) normiert (%). 50 % DMSO fungierte als Positivkontrolle. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar (n = 6). Die waagrechte gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze von 70 % Zellviabilität gemäß DIN EN ISO 10993-5 (C4.6). Die Ergebnisse wurden in einer zweiten unabhängigen Versuchsreihe bestätigt. *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

Die in B4.1.3 applizierte TNF- α -Konzentration von 100 ng/mL in 50 % Humanserum für einen Zeitraum von 24 Stunden wies eine Zellviabilität von $86 \pm 4\%$ auf. Auffällig war die Tatsache, dass die höhere Humanserum-Konzentration von 50 % (B) im Vergleich zur niedrigeren 10%igen Konzentration (A) keine deutlich abmildernde Wirkung der inflammatorischen Stimuli hatte. Die konnte zwar ähnlich auch schon bei der Untersuchung des Einflusses von Humanserum beobachtet werden (Abbildung 41), es wäre allerdings zu erwarten gewesen, dass durch ein suffizientes Angebot an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren der dadurch bedingte protektive Effekt von 50 % Humanserum bei Noxen stärker zum Tragen

kommt [373], zumal in Serum lösliche Proteine zirkulieren, die TNF- α binden und möglicherweise inaktivieren können [374]. Abschließend konnte insgesamt davon ausgegangen werden, dass die evaluierten Bedingungen keinen negativen Einfluss auf die Aussagekraft der Untersuchungen hatten.

4.1.5 Abschließende Diskussion

Als Zielstruktur für die Untersuchung der Wirkung ausgewählter Polyphenole wurde das Glycosaminoglycan Heparansulfat gewählt, weil dieses das häufigste endotheliale Glycosaminoglycan darstellt und bereits in vitro bei humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) nachgewiesen werden konnte (A2.1) [375-377]. Aus diesem Grund wurde es als plausibler Marker erachtet. Die Disaccharid-Einheiten des Heparansulfats bestehen aus Glucuronsäure oder Iduronsäure und Glucosamin, die jeweils variabel N- bzw. O-sulfatiert sind, woraus ein heterogener Aufbau resultiert [378]. Zusammen mit unterschiedlichen Core Proteinen und deren Substitutionsmustern ergeben sich vielfältige biologische Funktionen, auf die bezüglich der Pathophysiologie bereits in A2.2 eingegangen wurde.

Die durchgeführten Untersuchungen zum Glycocalyx-Shedding inflammatorisch stimulierter HUVEC waren geprägt von heterogenen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen gleichermaßen; dies traf auch auf die exemplarisch analysierten Substanzen Ferulasäure, -Sulfat, Protocatechusäure und -Sulfat zu (B4.1.3). Als mögliche Gründe können mehrere Aspekte in Betracht gezogen werden. Zunächst scheint es möglich, dass in vitro keine suffiziente Glycocalyx ausgebildet wurde und folglich auch kein Shedding derer quantifizierbar war. Zu diesem Schluss kamen beispielsweise Potter et al. mit Hilfe von fluoreszenzbasierter Mikropartikel-Velocimetrie [379]. Im Gegensatz dazu gelang Chappell et al. sehr wohl die Ausbildung einer endothelialen Glycocalyx bei HUVEC, allerdings unter Flussbedingungen ähnlich des in vivo Blutflusses [375]. Diese Glycocalyx war jedoch deutlich weniger ausgeprägt als das Pendant in isolierten Nabelschnurvenen. Nichtsdestotrotz konnten Heparansulfat und Syndecan-1 als endotheliale Marker immunhistochemisch nachgewiesen werden. Jimenez et al. konnten zeigen, dass HUVEC nach Isolierung aus Nabelschnurvenen mit nachfolgender statischer Kultur zwar die typischen Charakteristika wie die Kieselstein-Morphologie aufwiesen [380] und Tight junctions sowie Adherence junctions ausbildeten, jedoch wurden die Ausbildung der Glycocalyx nicht überprüft [366]. Anhand dieser Literaturdaten besteht auch die Möglichkeit, dass HUVEC unter Flussbedingungen kultiviert werden müssen, damit eine Glycocalyx in vitro exprimiert wird; diese Überlegung wird durch aktuelle Daten von Delgadillo et al. bestätigt [381]. Deren Untersuchungen zeigten, dass in vitro sehr wohl eine endotheliale Glycocalyx ausgebildet wird, wenn ein bestimmter Scherstress appliziert wird. Deswegen gelang auch der Nachweis des Sheddings von Heparansulfat und Hyaluronan nach TNF- α -Stimulation anhand von Fluoreszenzmikroskopie. Im Zellüberstand wurden die beiden Komponenten zwar nicht nachgewiesen, aber es

erscheint plausibel, dass dies grundsätzlich möglich gewesen wäre. Zu einem ähnlichen Resultat kamen überdies Wang et al. [382]. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass in der vorliegenden Arbeit die Kultivierung der HUVEC unter Flussbedingungen die Quantifizierung von Heparansulfat ermöglicht hätte [383]. Nicht auszuschließen als Einflussfaktor auf die erhaltenen Ergebnisse sind die verwendeten HUVEC selbst, da diese als Primärzellen bezüglich adäquater Kultur- und Versuchsbedingungen anspruchsvoller als permanente Zelllinien sind. Eine weiterführende Optimierung diesbezüglich war jedoch aufgrund limitierter zeitlicher Ressourcen nicht möglich. Zudem muss die natürliche Variabilität von Primärzellen in Betracht gezogen werden. Die verwendeten HUVEC wurden herstellerseits gepoolt, um etwaige Unterschiede der Spender*innen auszuschließen [384]; ob dies ausreichend war, hätte durch Verwendung von anderen Chargen aus verschiedenen Bezugsquellen überprüft werden können. Eine weitere Ursache für die insuffizienten Ergebnisse ist Heparansulfat als ausgewählter Erfolgsparameter selbst. Heparansulfat ist zwar wie oben geschildert das häufigste endotheliale Glycosaminoglycan, aber deswegen kann nicht davon ausgegangen werden, dass bei einem inflammatorisch stimulierten Shedding auch Heparansulfat am häufigsten davon betroffen ist. Singh et al. stellten jedoch fest, dass bei glomerulären Endothelzellen nach einer Behandlung mit H₂O₂ dies mit einer deutlich erhöhten Heparansulfat-Konzentration im Zellüberstand korrelierte, was auf Hyaluronan nicht zutraf [385]. Die Übertragbarkeit auf HUVEC ist jedoch natürlich nicht zwangsläufig möglich. Ein Übersichtsarbeit von Villalba et al. legte dagegen dar, dass Hyaluronan und Chondroitinsulfat am anfälligsten gegenüber ROS sind [131]. Offen bleibt, ob dies sich auch auf andere inflammatorische Stimulanzen als zutreffend erweist. Um diesen Aspekt zu überprüfen, wäre eine Quantifizierung des entsprechenden Parameters mittels ELISA nötig gewesen. Eine alternative Option hätte auch die Fluoreszenzmarkierung von Glycocalyx-Bestandteilen vor/nach der inflammatorischen Behandlung der Zellen dargestellt. Aus finanziellen Gründen wurde darauf verzichtet. Überdies gibt es die Möglichkeit, dass die untersuchten inflammatorischen Bedingungen nicht suffizient für die Induktion des Glycocalyx-Shedding waren. Aufgrund der Vielzahl an überprüften Parameter scheint dies jedoch nicht plausibel. Ein interessanter Aspekt ist auch eine in Summe protektive Wirkung größerer Mengen Humanserum, dessen wachstumsfördernder Effekt schädlichen Stimuli entgegenwirkt und nivelliert; in der vorliegenden Arbeit wurden 50 % Humanserum verwendet. Dieser Einfluss auf die Zellviabilität war bereits im MTT-Assay zu beobachten gewesen (B4.1.4). Russell et al. gelang es zu zeigen, dass bei dem Medium zugesetzten größeren Mengen fetales Rinderserum (20 %) der Einfluss von TNF- α auf die Superoxid-Bildung im Vergleich zu 2 % Serum deutlich reduziert war [373]. Da Serum in der Zellkultur als Nährstofflieferant dient (B4.1.2), ist es daher grundsätzlich denkbar, dass durch den Entzug bzw. der Reduktion diverser Nährstoffe die HUVEC anfälliger gegenüber inflammatorischen Noxen gewesen wären und ein Shedding ausgeprägter stattgefunden hätte. Die hohe Humanserum-Konzentration wurde gewählt, um später die HUVEC-Zellen mit einer möglichst

hohen Endkonzentration der Metabolite im ex vivo-Modell zu exponieren (B4.1.1). Eine Verringerung der Serum-Konzentration wäre somit auch mit einer reduzierten Bioaktivität einhergegangen. Eine weitere in Erwägung zu ziehende Ursache für die inkonsistenten Ergebnisse ist eine Phänotyp-Änderung der Endothelzellen, die sogenannte endothelial-mesenchymale Transition (EndoMT) [386]. Während dieses komplexen zellulären Differenzierungsprozesses verändern Endothelzellen ihren Phänotyp hin zu mesenchymalen Zellen und verlieren ihre morphologischen und funktionellen Charakteristika; dabei kommt es auch zu einer verminderten Expression endothelspezifischer Proteine, wie z. B. VE-Cadherine. Typischer Triggerfaktor sind die Isoformen des Zytokin TGF- β , aber auch verschiedene Interleukine und TNF- α können diesen Prozess initiieren [387]. Maleszewska et al. konnten bei Stimulation mit Interleukinen und TGF- β zeigen, dass HUVEC bereits nach 24 Stunden Veränderungen aufwiesen [388]. Mikrovaskuläre Endothelzellen exprimierten nach 96-stündiger Inkubation mit 100 ng/mL TNF- α deutlich weniger endotheliale Marker und dafür umso mehr mesenchymale Marker. Aber auch bereits nach 24 Stunden wurden diesbezüglich Veränderungen berichtet [386]. 20 % septisches Serum zeigten nach 12 Stunden bei HUVEC eine ähnliche Wirkung [389]. Wie in B4.1.3 geschildert, gibt es durchaus Studien über eine das Endothel betreffende Bioaktivität von Sulfatkonjugaten. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen waren jedoch keine validen Aussagen diesbezüglich möglich, weswegen ein alternatives Modell etabliert werden sollte. Dieses sollte auf molekularer Ebene eine andere vaskuläre Funktion adressieren, da es pharmakodynamisch plausible Effekte gibt, welche das Endothel als Zielstruktur implizieren. Beispielsweise konnte die mehrwöchige Einnahme von Pycnogenol durch Proband*innen mit chronischer koronarer Herzerkrankung die mittels Ultraschall an der Oberarmarterie bestimmte flussvermittelte Vasodilatation (FMD) im Vergleich zu Placebo signifikant erhöhen [42], welche mit der Endothelfunktion positiv korreliert. Weitere Effekte sind in A1.3 geschildert.

4.2 Schutz der Zellbarriere vor Schäden durch TNF- α

In B4.1.5 wurde erwähnt, dass ein alternatives Modell entwickelt werden sollte, um die Bioaktivität von Metaboliten, insbesondere Sulfatkonjugaten, in Humanserum nach Pycnogenol-Einnahme zu untersuchen. Hierbei lag der Fokus weiterhin auf der vasoprotektiven Wirkung der Substanzen unter inflammatorischen Bedingungen in Anwesenheit von 50 % Humanserum und 100 ng/mL TNF- α . In der Einleitung A2 wurde ausführlich geschildert, welche konkrete Rolle das Endothel als Barriere innehat. Im Folgenden sollte nun analysiert werden, welchen Einfluss die polyphenolischen Analyten auf die durch TNF- α induzierte Schädigung eines Monolayers von Endothelzellen (HUVEC) haben. Genutzt wurde hierzu Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) als Permeabilitätsmarker. FITC-Dextran ist ein aus Glucose-Monomeren bestehendes makromolekulares Polysaccharid mit unterschiedlicher Kettenlänge, an das FITC als Fluorophor gebunden ist. Aufgrund dessen

Größe ist das Endothel im gesunden Zustand nicht bzw. kaum permeabel; erst bei Schädigung des Endothels kann FITC-Dextran dieses passieren (A2.3) [365, 390]. In vitro korreliert dies nach apikaler Applikation mit einer fluorimetrischen Detektion von FITC-Dextran im basolateralen Kompartiment (C4.3). Je höher der detektierte Wert war, desto ausgeprägter fand der Transport von FITC-Dextran durch den Zellmonolayer statt und desto stärker war die Barrierefunktion gestört. Zur ergänzenden Überprüfung der Integrität des Monolayers wurde der transendotheliale Widerstand bestimmt (C4.3).

4.2.1 Vorversuche mit 4 kDa FITC-Dextran

Aufgrund heterogener Literaturangaben bezüglich der optimalen apikalen FITC-Dextran-Konzentration war es zunächst nötig, die später einzusetzende Konzentration zu bestimmen. Als zu evaluierende Endkonzentrationen wurden 10 µg/mL und 250 µg/mL einer FITC-Dextran-Größe von 4 kDa gewählt [194, 390]. Normiert wurden die Messwerte auf eine ansonsten identische Probe ohne Zellen; durch die Abwesenheit der Zellen und deren Barrierefunktion zwischen apikalen und basolateralen Kompartiment konnte hier von einem maximalen Transport ausgegangen werden. Dabei stellte sich heraus, dass bei der geringeren der beiden Konzentrationen die Proben der inflammatorisch stimulierten HUVEC nach 60 und 90 Minuten eine deutlich ausgeprägte Streuung aufwiesen (7.450 ± 6.152 % bzw. 4.975 ± 3.991 %, $n = 2$), was zudem biologisch nicht plausibel war (Abbildung 42). Deswegen wurde eine initiale FITC-Dextran-Konzentration von 250 µg/mL im apikalen Kompartiment als geeignet erachtet.

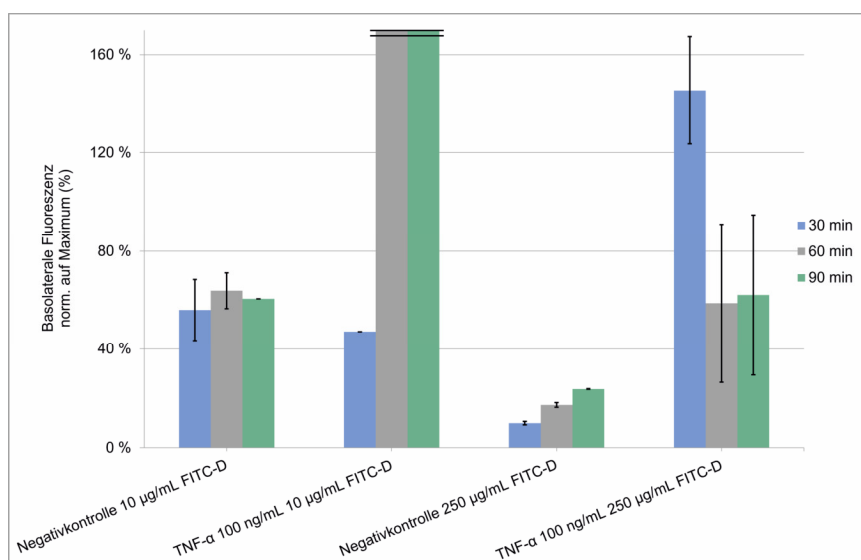


Abbildung 42: Basolaterale Fluoreszenz nach zweistündiger Inkubation mit 100 ng/mL TNF-α in Anwesenheit von 50 % Humanserum und einer initialen apikalen FITC-Dextran-Konzentration von 10 bzw. 250 µg/mL in HUVEC. Die Probenahme zur Fluoreszenzmessung erfolgte nach 0, 30, 60 und 90 Minuten, wobei zum Zeitpunkt 0 keine Fluoreszenz zu detektieren war. Normiert wurden die erhaltenen Werte auf eine Probe ohne Zellen, in der der Flux von FITC-Dextran somit maximal war. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 2$). Die beiden mit dem doppelten Strich markierten Säulen stellten deutliche Ausreißer dar, weswegen diese nicht vollständig dargestellt sind.

4.2.2 Versuchsdurchführung

Nach dem entsprechenden Vorversuch zu den Versuchsbedingungen (B4.2.1) wurde in Analogie zu B4.1.3 zunächst erneut die Bioaktivität der Einzelsubstanzen Ferulasäure, Ferulasäure-Sulfat, Protocatechusäure, Protocatechusäure-Sulfat und Taxifolin untersucht. Taxifolin wurde trotz Fehlen eines Sulfatkonjugat-Standards als zusätzlicher Analyt gewählt, weil es mit dem Flavan-Grundgerüst einen strukturellen Gegensatz zu den Phenol-(carbon)säuren darstellte, siehe A1.2 und B3.3. Normiert wurden bei diesem Versuchsansatz die erhaltenen Fluoreszenzwerte aus dem basolateralen Kompartiment der Polyphenolproben auf die Werte der TNF- α -Probe, da so eine protektive Wirkung der Analyten am besten zum Ausdruck gebracht werden konnte (Abbildung 43).

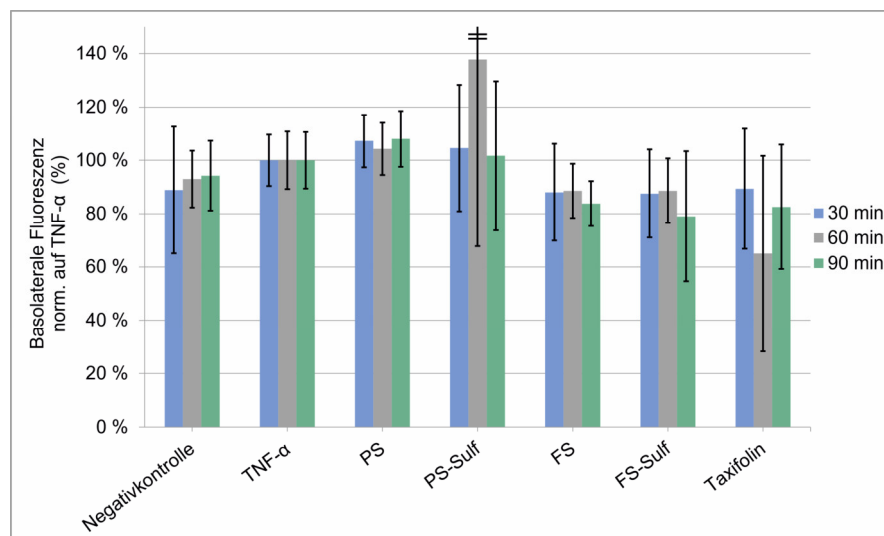


Abbildung 43: Einfluss der zweistündigen Prä-Inkubation verschiedener Polyphenole einer Konzentration von 0,5 μ M in 50 % Humanserum mit anschließender zweistündiger Inkubation mit 100 ng/mL TNF- α auf die Permeabilität von FITC-Dextran (4 kDa, 250 μ g/mL) in HUVEC. Die basolaterale Probenahme zur Fluoreszenzbestimmung erfolgte nach 0, 30, 60 und 90 Minuten, wobei zum Zeitpunkt 0 keine Fluoreszenz zu detektieren war. Die Werte wurden jeweils auf TNF- α normiert (%). Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar (n = 5/6). Bei der mit dem doppelten Strich gekennzeichneten Probe war die Streuung ausgeprägt, weswegen der Fehlerbalken nicht vollständig abgebildet ist. PS = Protocatechusäure, FS = Ferulasäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat. Kein Ergebnis statistisch signifikant, TNF- α als Referenz ($p > 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

Insgesamt unterschieden sich die drei Zeitpunkte 0, 30, 60 und 90 Minuten aller Proben nur unwesentlich; zum Zeitpunkt 0 Minuten konnte bei keinem Ansatz eine Fluoreszenz detektiert werden. Es fiel auf, dass die Fluoreszenz der Negativkontrolle nur geringfügig niedriger war als die der mit TNF- α stimulierten Zellen. Dieser Aspekt erschien insofern widersprüchlich, da nach einer Kultivierung der HUVEC für insgesamt etwa 12,5 Tage ein intakter Monolayer zu erwarten gewesen wäre; dann hätte bei den unstimulierten Zellen allerdings keine bzw. kaum Fluoreszenz detektiert werden dürfen und hingegen bei den inflammatorisch stimulierten Zellen unter der Annahme eines geschädigten Monolayers ein umso höheres Fluoreszenz-Signal. Außerdem konnte keine der polyphenolischen Substanzen

Protocatechusäure, -Sulfat, Ferulasäure, -Sulfat und Taxifolin eine signifikante Reduktion der durch TNF- α induzierten Monolayer-Permeabilität bewirken.

Bei der Betrachtung des transendothelialen Widerstandes fällt auf, dass der Ausgangswert im Bereich zwischen $24,2 \pm 4,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und $35 \pm 2,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 5/6$) bis zur Zugabe des Humanserum sukzessive stieg, wobei durch die Inkubation mit dessen eine deutliche Zunahme zu verzeichnen war (Abbildung 44). Damit lag der TEER vor Beginn der inflammatorischen Stimulation bei minimal $50,4 \pm 5,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. maximal $57 \pm 2,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 5/6$). Die Wirkung des Stimulans TNF- α ging mit einer Abnahme des transendothelialen Widerstandes einher, wenngleich kein deutlicher Unterschied weder zwischen den einzelnen Polyphenolen und noch im Vergleich derer zu TNF- α alleine auszumachen war. Die Werte lagen in einem Bereich von $38 \pm 11,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bis hin zu $42,4 \pm 6,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 5/6$). Zudem war auch bei der Negativkontrolle eine Abnahme zu verzeichnen. Dieser Aspekt ist nicht nachvollziehbar, da bei diesen unstimulierten Zellen als Kontrolle keine wesentliche Änderung zu erwarten war.

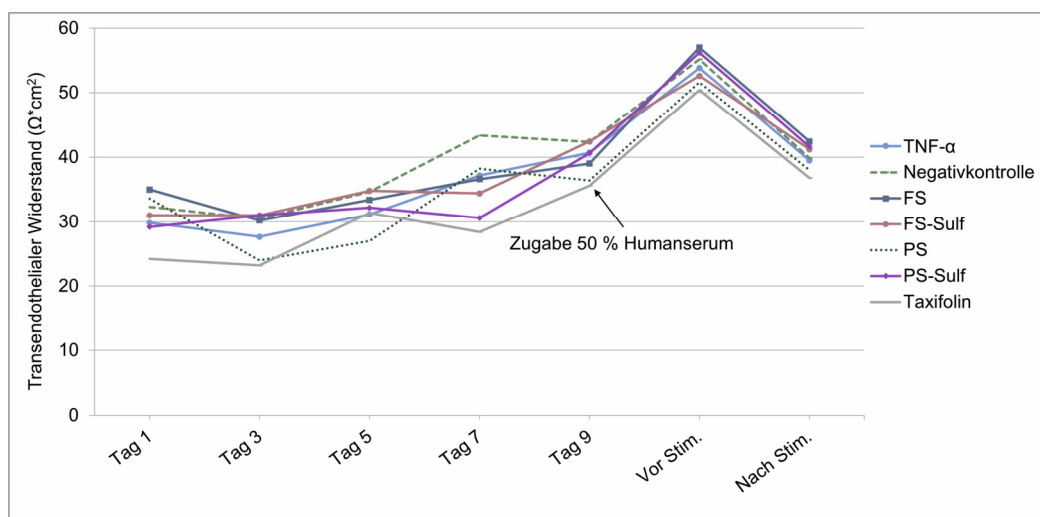


Abbildung 44: Zeitlicher Verlauf des transendothelialen Widerstands der in Zellkultureinsätzen kultivierten HUVEC im Vorfeld des FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assays zur Kontrolle der Monolayer-Ausbildung. Dargestellt ist der Mittelwert ($n = 5/6$). Die Standardabweichungen wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt, sie sind dem tabellarischen Anhang zu entnehmen (D3.2.2). PS = Protocatechusäure, FS = Ferulasäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat.

Aus den vorstehend genannten Gründen war letztlich eine Bewertung der Versuchsergebnisse schwierig. Daher wurde beschlossen den FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assay zunächst zu optimieren, bevor das Humanserum der Studienproben (B2.3, B4.1.1) analysiert werden sollte.

4.2.3 Weiterführender Versuch und Diskussion

Wie bereits in A2.3 dargelegt, gibt es bezüglich des endothelialen Stofftransportes diverse Mechanismen. Zudem liegen Berichte vor, dass zumindest bei der Betrachtung der intestinalen Permeabilität des dortigen Epithels durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten

Molekülen unterschiedlicher Größe eine Differenzierung hinsichtlich des parazellulären Permeabilitätsmechanismus über Poren oder Lecks möglich ist [194]. Daher wurde für den weiterführenden Versuch nicht nur FITC-Dextran eines Molekulargewichts von 4 kDa eingesetzt, sondern auch 70 kDa. Darüber hinaus wurde abermals die Dauer der inflammatorischen Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α variiert (zwei, sechs, 12 bzw. 24 h), um eine unzureichende Inkubationsdauer auszuschließen. Zusätzlich wurde als Vergleich in Analogie zu B4.2.1 zu jeder Bedingung jeweils eine Zero-Probe untersucht, bei der in den Zellkultureinsätzen keine Zellen kultiviert wurden, die aber ansonsten identisch behandelt wurde. Damit sollte in Ergänzung zur Messung des transendothelialen Widerstandes (TEER, C4.3) die Qualität des ausgebildeten Monolayers beurteilt werden (B4.2.1). Allerdings wurde bei den mit TNF- α stimulierten HUVEC im Vergleich zu unstimulierten Zellen, wie bereits in B4.2.2 beschrieben, erneut nur wenn überhaupt eine geringfügig erhöhte Fluoreszenz ermittelt. Dies betraf sowohl die verschiedenen Zeiträume der inflammatorischen Stimulation als auch die beiden Molekulargewichte des FITC-Dextran von 4 und 70 kDa; folglich ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 45). Als kritisch zu sehen war die Tatsache, dass bei den Zero-Proben kein einheitlicher Trend bezüglich der basolateralen Fluoreszenz zu sehen war. Unter der Annahme einer suffizienten Monolayer-Ausbildung und einer Disintegrität durch die TNF- α -Stimulation war von einem ähnlichen Ausmaß der Permeabilität in diesen Proben auszugehen; gleichzeitig wäre im Vergleich zu den Negativproben bei den Zero-Proben eine deutlich höhere Permeabilität zu erwarten gewesen, was ebenfalls nicht zutraf. Watts et al. gelang ebenfalls nicht durch 1.000 U/mL TNF- α die FITC-Dextran-Permeabilität von HUVEC nach sechsständiger Inkubation zu erhöhen [391]; allerdings gibt es keine Informationen über die TNF- α -Konzentration oder das Molekulargewicht von FITC-Dextran. Außerdem erklärt eine unzureichende Endotheldisintegrität nicht die Permeabilität der Negativkontrollen. Hier scheint eine unzureichende Monolayer-Ausbildung wahrscheinlicher. Zudem stellte sich heraus, dass 50 % DMSO keine geeignete Positivkontrolle war, da es durch den großen Anteil an organischem Lösungsmittel zu einer Proteinpräzipitation kam, die zur Bildung einer gelartigen Schicht auf den Zellkultureinsätzen führte. DMSO fungiert zwar unter anderem als Lösungsmittel für Proteine sowie als Schutz beim Einfrieren von Zellen, allerdings ist dies temperatur- und konzentrationsabhängig, weswegen DMSO auch denaturierend wirken kann und in höheren Konzentrationen cytotoxisch ist (B4.2.4) [392]. Mutmaßlich behinderte diese Schicht unspezifisch die FITC-Dextran-Diffusion, weswegen nicht wie ursprünglich angenommen eine maximale basolaterale Fluoreszenz bestimmt werden konnte. Durch den cytotoxischen Effekt von 50 % DMSO wurde die Zellbarriere mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zerstört (B4.2.4), was in einem maximalen Transport von FITC-Dextran hätte resultieren müssen. Diese Fluoreszenz hätte zudem ähnliche Werte wie die Proben ohne Zellen, also ebenfalls ohne Zellbarriere, aufweisen müssen. Beides traf in der vorliegenden Arbeit nicht zu. Die genauen Werte dazu sind im tabellarischen Anhang D3.2.3 aufgeführt.

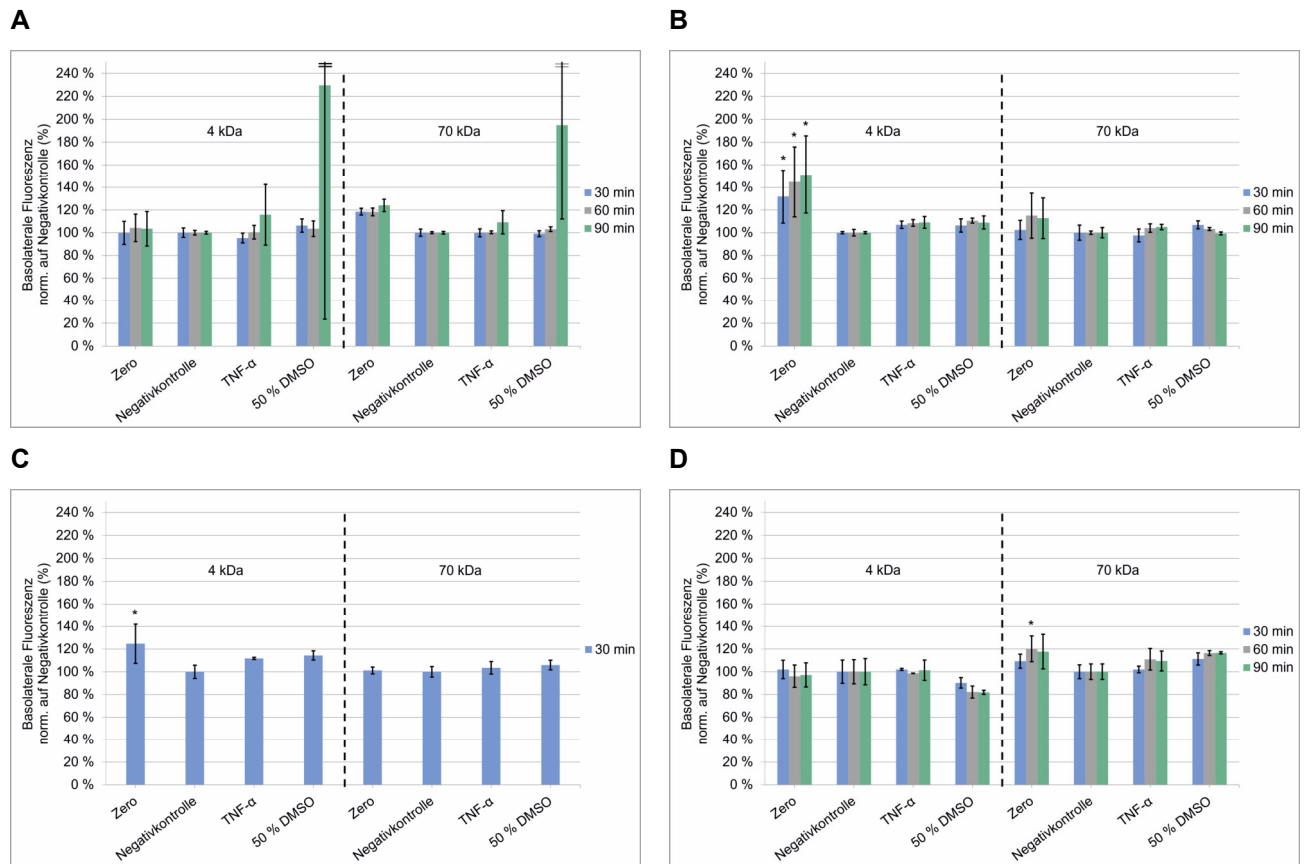


Abbildung 45: Einfluss der inflammatorischen Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α für zwei (A), sechs (B), 12 (C) oder 24 (D) Stunden in 50 % Humanserum auf die Permeabilität von 4 kDa oder 70 kDa FITC-Dextran 250 μ g/mL in HUVEC. Als cytotoxische Kontrolle fungierte 50 % DMSO. Die basolaterale Probenahme zur Fluoreszenzbestimmung erfolgte nach 0, 30, 60 und 90 Minuten, wobei zum Zeitpunkt 0 keine Fluoreszenz zu detektieren war. Die Werte wurden jeweils auf unstimulierte Zellen (Negativkontrolle) normiert (%). Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 3$). Die Proben zu den Zeitpunkten 60 und 90 Minuten standen bei zwölfstündiger Inkubation mit TNF- α nicht zur Verfügung. Bei der mit den doppelten Strichen gekennzeichneten Proben war die Streuung ausgeprägt, weswegen der Fehlerbalken nicht vollständig abgebildet ist. *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

Beim transendothelialen Widerstand aller verwendeter Zellkultureinsätze war über den gesamten Zeitraum der Kultivierung kein Anstieg von anfänglich $23 \pm 2,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an Tag 1 bis hin zu $23 \pm 4,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an Tag 19 beobachten. Nach der Zugabe von 50 % Humanserum kam es durch dessen wachstumsfördernde Eigenschaften zu einem deutlichen Anstieg auf $38 \pm 4,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ unmittelbar vor Beginn der inflammatorischen Stimulation (Abbildung 46). Die Eigenschaften von Humanserum in der Zellkultur wurden bereits in den vorherigen Kapiteln ausführlich dargelegt.

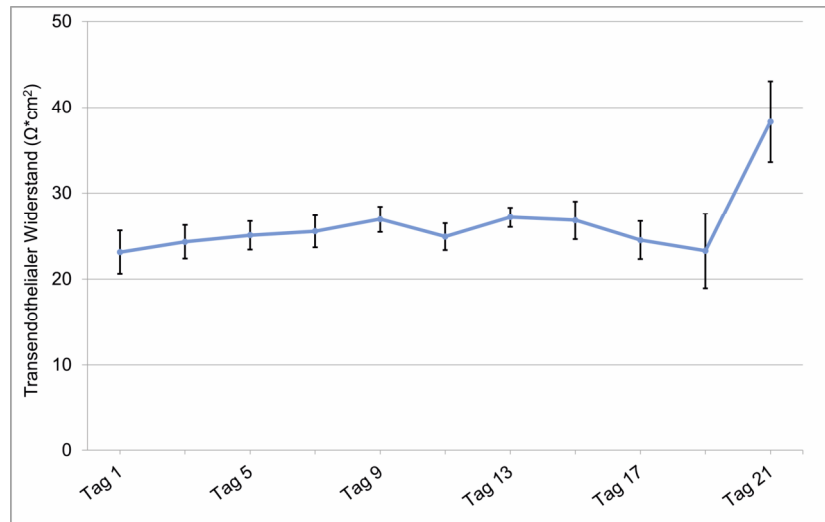


Abbildung 46: Zeitlicher Verlauf des transendothelialen Widerstands der in Zellkultureinsätzen kultivierten HUVEC im Vorfeld des FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assays zur Kontrolle der Monolayer-Ausbildung. Dargestellt ist der Mittelwert inklusive Standardabweichung ($n = 18$).

Wird die Auswirkung der inflammatorischen Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α auf den endothelialen Widerstand betrachtet, so fallen mehrere Punkte ins Auge (Abbildung 47). Zum einen hatte die Dauer der inflammatorischen Stimulation keinen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der TEER-Abnahme. Zum anderen konnte auch bei unstimulierten Zellen eine deutliche Reduktion des TEER ($-20 \pm 3,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, alle Proben) beobachtet werden. Unter der Annahme einer gleichbleibenden Zellviabilität im Verlauf des Permeabilitätsversuchs (B4.2.4) stellte sich diese Beobachtung als biologisch nicht plausibel dar, da keine relevante Änderung des transendothelialen Widerstands hätte auftreten dürfen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Störung des Monolayers bzw. der Zellbarriere durch eine übermäßige Manipulation durch den Versuchsaufbau bzw. der Messung des transendothelialen Widerstandes sein. Dieser Aspekt ließ sich allerdings nicht überprüfen, da die Untersuchung der Zellviabilität mittels MTT-Assay in einem separaten, kleineren Ansatz erfolgte, weil der Versuchsaufbau dies nicht anders ermöglichte. Dabei waren auch die Abnahme des TEER der TNF- α -Proben im Vergleich zu den Negativkontrollen nur geringfügig höher ($-32 \pm 2,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei zwei Stunden, $-29 \pm 4,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei sechs Stunden, $-38 \pm 3,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 12 Stunden und $-38 \pm 4,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 24 Stunden). Wie bereits oben geschildert, kam es durch 50 % DMSO zu einer auf den Zellkultureinsätzen aufgelagerten ausgeprägten Proteinpräzipitation; dadurch kam es vermutlich zu einer Erhöhung des Widerstandes, was zu dieser Beobachtung entgegen der initialen Erwartung einer ausgeprägten TEER-Verringerung führte. Miyazaki et al. untersuchten unter anderem die FITC-Dextran-Permeabilität (70 kDa) von HUVEC, die über einen Zeitraum von 82 Stunden mit einem TNF- α -Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2,5 ng/mL behandelt wurden [393]. Trotz deutlich niedrigerer Konzentrationen des inflammatorischen Stimulans als in der vorliegenden Arbeit konnte bei allen Ansätzen eine Abnahme des transendothelialen Widerstandes von initial $8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf ein Minimum von etwa $2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beobachtet werden. Der TEER war damit deutlich niedriger

als in den eigenen Untersuchungen. Interessanterweise begann sich der Monolayer nach etwa 24 Stunden zu regenerieren, was mit einem Anstieg des TEER korrelierte. Allerdings wurde dort eine im Vergleich deutlich präzisere Methode in Form einer automatisierten, kontinuierlichen Messung verwendet. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass die hier verwendete Methode nicht empfindlich genug war, um Unterschiede in diesem Bereich festzustellen [394]. Darüber hinaus gibt es für Endothelzellen diverse Literaturberichte, dass in vivo teils das Zwanzigfache an TEER ($> 1.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) gemessen wird, im Vergleich dazu $20 - 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ in vitro [395]. Die in vivo Bestimmung in Ratten basiert auf der Messung einer Spannungsabnahme zwischen zwei in ein Blutgefäß eingebrachte Mikroelektroden eines definierten Abstands. Die Abnahme der Spannung beruht auf der Permeabilität des entsprechenden Gefäßes; unter Berücksichtigung der Wanddicke und des Innenwiderstands des Gefäßes kann schließlich der transendotheliale Widerstand berechnet werden [396]. Dieser Aspekt würde im Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen für eine unzureichende Ausbildung des Zellmonolayers sprechen. Darüber hinaus zeigte sich, dass der TEER in vitro sehr variabel ist und kaum als alleiniger valider Marker zur Beurteilung einer Zellbarriere dienen kann, sondern allenfalls als ergänzender Parameter.

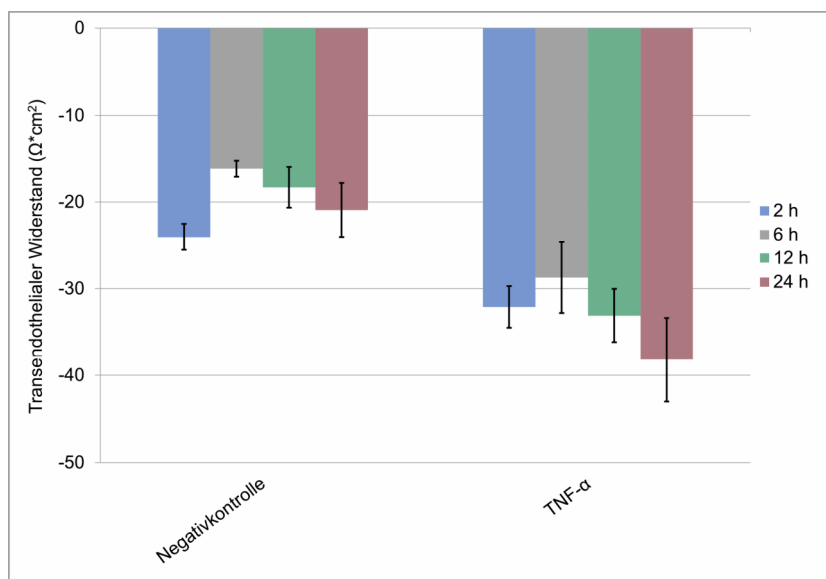


Abbildung 47: Absolute Abnahme des transendothelialen Widerstandes der HUVEC nach inflammatorischer Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α für zwei, sechs, 12 bzw. 24 Stunden. Die Bestimmung erfolgte unmittelbar vor Durchführung des FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assays. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 6$).

Insgesamt lässt sich sagen, dass kein Versuchsaufbau valide Aussagen bezüglich der Endotheldisintegrität in HUVEC ermöglicht hätte. Hierzu kommen verschiedene Ursachen in Betracht, die sich größtenteils mit den Überlegungen in B4.1.5 decken und weswegen im Folgenden nicht auf alle erneut im Detail eingegangen wird. Zu nennen sind hier beispielsweise ungeeignete Kulturbedingungen zur Ausbildung eines Monolayers und eine unzureichende inflammatorische Stimulation. Auch die mögliche protektive Wirkung von Humanserum muss hier in Betracht gezogen werden. Einen Anhaltspunkt für eine

unzureichende Monolayer-Ausbildung lieferten die Ergebnisse der Negativkontrollen, die sich größtenteils kaum von denen der Zero-Proben unterschieden. Zwar wurde jeweils der transendotheliale Widerstand zur Qualitätskontrolle des Zellmonolayers bestimmt, allerdings ist die Messung dessen grundsätzlich von höherer Variabilität geprägt [397]. Daher wäre es erstrebenswert gewesen, als weiteren Qualitätsindikator die Tight junctions oder Adherence junctions mittels Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren oder Bestandteile dieser zu quantifizieren. Ein besonders relevanter Bestandteil wären Proteine der Gruppe der VE-Cadherine gewesen, welche als Marker für Adherence junction gelten (A2.1, A2.2) und gleichzeitig durch TNF- α adressiert werden [193, 398, 399]. VE-Cadherin scheint bei HUVEC die parazelluläre Permeabilität deutlich stärker zu beeinflussen als bei anderen Endothelzellen [400]. Der FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assay gilt im Gegensatz zu TEER-Messungen als robust und etabliert [383, 401], weswegen eine Dysfunktionalität dessen überraschte. Eine weitere Optimierung des FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assay war aufgrund fehlender zeitlicher Valenzen nicht möglich, weswegen erneut auf eine Untersuchung des Humanserums der Klinischen Studie (B3.3, B4.2.2) verzichtet werden musste.

4.2.4 Ergebnisse der MTT-Assays

Sowohl FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4 kDa als auch die ebenfalls eingesetzte Substanz mit 70 kDa zeigten in der eingesetzten Konzentration von 250 µg/mL keine relevante Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 48, C4.6), da diese in beiden Fällen oberhalb der gemäß DIN EN ISO 10993-5 empfohlenen Grenze von 70 % lag [372]. Zwar war bei beiden Fluoreszenzmolekülen nach einer zwölfstündigen (4 kDa: 94 ± 4 %, 70 kDa: 85 ± 4 %) bzw. 24-stündigen (4 kDa: 95 ± 2 %, 70 kDa: 92 ± 2 %) Inkubation mit 100 ng/mL TNF-α die Abnahme statistisch signifikant, allerdings wurde diese als nicht relevant eingeschätzt.

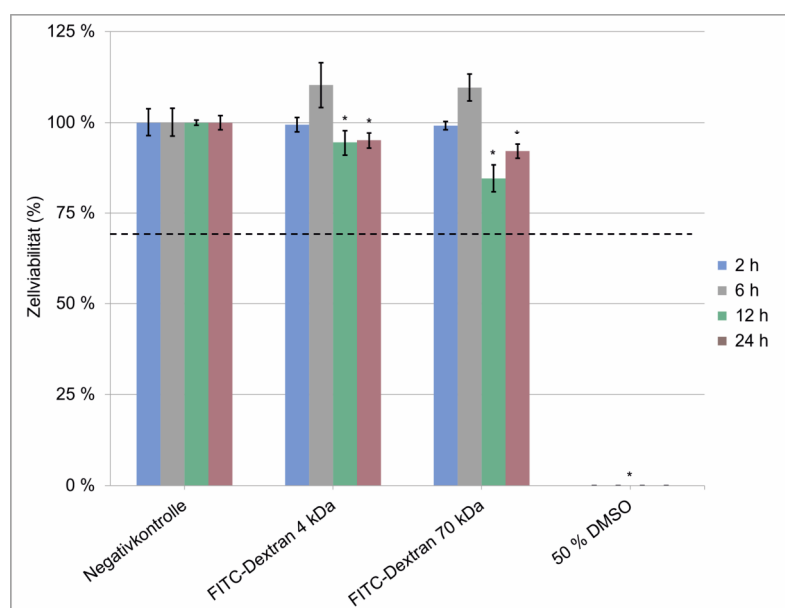


Abbildung 48: Einfluss von FITC-Dextran 4 bzw. 70 kDa (250 µg/mL, Inkubation für 90 Minuten) auf die Zellviabilität nach einer vorangegangenen Inkubationszeit mit 100 ng/mL TNF-α von zwei, sechs, zwölf bzw. 24 Stunden in jeweils 50 % Humanserum. Die Absorptionen wurden auf die Negativkontrolle normiert (%). 50 % DMSO fungierte als Positivkontrolle. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar (n = 6). Die waagrechte gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze von 70 % Zellviabilität gemäß DIN EN ISO 10993-5 (C4.6). Die Ergebnisse wurden in einer zweiten unabhängigen Versuchsreihe bestätigt. *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

Keines der in B4.2.2 evaluierten Polyphenole Protocatechusäure, -Sulfat, Ferulasäure, -Sulfat und Taxifolin zeigte in einer Konzentration von 0,5 µM im angewendeten Versuchsaufbau eine relevante Verminderung der Zellviabilität (Abbildung 49). Bei allen Substanzen außer Protocatechusäure war die Abweichung zwar statistisch signifikant, allerdings wurde dies wie auch bereits bei FITC-Dextran als nicht relevant eingestuft. Die niedrigste Zellviabilität von 79 ± 2 % ergab sich bei Taxifolin.

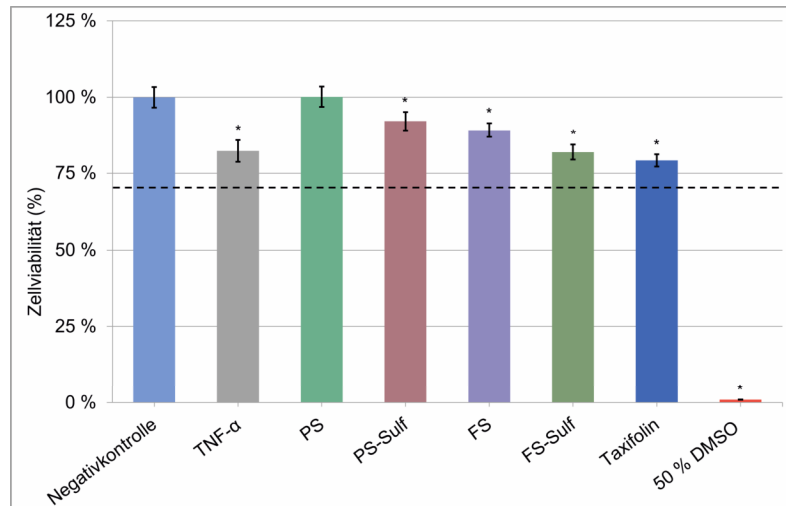


Abbildung 49: Einfluss der zweistündigen Prä-Inkubation verschiedener Polyphenole einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ in 50 % Humanserum mit anschließender zweistündiger Inkubation mit 100 ng/mL TNF- α und 90-minütiger Inkubation mit $250 \mu\text{g/mL}$ 4 kDa FITC-Dextran. Die Absorptionen wurden auf die Negativkontrolle normiert (%). 50 % DMSO fungierte als Positivkontrolle. Die Säulen stellen den Mittelwert inkl. Standardabweichung dar ($n = 6$). Die waagrechte gestrichelte Linie kennzeichnet die Grenze von 70 % Zellviabilität gemäß DIN EN ISO 10993-5 (C4.6). PS = Procatechusäure, FS = Ferulasäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat. *: Ergebnis statistisch signifikant, Negativkontrolle als Referenz ($p < 0,05$, one-way ANOVA mit Dunnett's post-hoc test).

C Experimenteller Teil

1 Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Materialien

1.1 Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle	
Milli-Q® Reinstwasser	Institutseigene Anlage	
Pycnogenol	Biolandes, Le Sen, Frankreich	
M1 (δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton)	Eigensynthese des Instituts	
Isopropanol p.a.	Fakultätseigene Chemikalienausgabe	
Fetales bovines Serum (FBS) GIBCO®, hitzeinaktiviert (Produktnummer 10500-064)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Sigma Aldrich, Taufkirchen	
Trans-Ferulasäure 99 %		
Taxifolin (Analytical standard)		
LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit (Produktnummer MP0035)		
LookOut® Mycoplasma Away		
JumpStart® Taq DNA Polymerase (Produktnummer D9307)		
Agarose Typ I-A		
Borsäure		
Tris-aminomethan (Tris) $\geq 99,9$ %		Carl Roth, Karlsruhe

1.2 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Bezugsquelle
Pipette Eppendorf® Research® plus 0,5 – 10 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf® Research® plus 10 – 100 µL	
Pipette Eppendorf® Research® plus 100 – 1.000 µL	
Mehrkanalpipette Eppendorf® Research® 20 – 200 µL	
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe accu-jet® pro	
Zentrifuge Mikrofuge® 22R	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Megafuge® Kendro 1.0 R	Heraeus, Hanau
Schüttler Heidolph Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA-Werke, Staufen
Analysenwaage Kern ABT 220-4NM	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
UV-Vis-Spektrometer UVmini-1240	Shimadzu, Kyoto, Japan
CO ₂ -Inkubator HeraCell® 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CO ₂ -Inkubator HeraCell® 240i	
Sicherheitswerkbank HeraSafe KS®	
Mikrotestplattenlesegerät Multiskan As- cent®	
Mr. Frosty® Freezing Container	
Vortex 2 Genie	VWR, Darmstadt
Mikroskop Eclipse® TS 100	Nikon, Chiyoda, Japan

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255	Bandelin, Berlin
Gerät für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Cyclone 25	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-Kammer 40-0708	
GeneFlash® Gel Documentation System	Syngene Bio Imaging, Frederick, USA

1.3 Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Schraubröhre 15, 50 mL, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5, 2,0 mL	
Mikro-Schraubröhre 2 mL, steril	
Serologische Pipette 5, 10, 25 mL	
96-well-Mikrotestplatten, flacher Boden	
Zellkulturflasche für adhärente Zelllinien, Kulturfläche 75 cm ²	NanoEnTek, Seoul, Südkorea
Einmal-Zählkammer Typ C-Chip®, Neubauer improved	

2 Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro

2.1 Analyse von Lektinen in Pycnogenol

2.1.1 Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien

2.1.1.1 Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Humanes Erythrozytenkonzentrat (CPD-SAGM L)	Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Wiesentheid
Tris-HCl ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat ≥ 98 %, p.a. (APS)	
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ≥ 99 %, p.a.	
Rotiphorese® Gel 30 % (37,5 Teile Acrylamid, 1 Teil Bisacrylamid)	
Natriumchlorid p.a.	Fakultätseigene Chemikalienausgabe
Manganchlorid-Tetrahydrat p.a.	
Calciumchlorid-Dihydrat 99+ %	
D-Glucose-Monohydrat reinst	
Natriumazid	
Essigsäure 99 %	
Coomassie Brilliantblau G250	
Ethanol p.a.	
Phosphorsäure 85 %	
Salzsäure 36 %	
Bovines Serumalbumin Typ H1 (BSA)	
Pycnogenol Fraktionen 2, 3, 4	Gewinnung durch Größenausschlusschromatographie im Arbeitskreis

Bezeichnung	Bezugsquelle
D-Xylose BioXtra® ≥ 99 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tris ≥ 99,9 %	
Concanavalin A Typ VI (ConA) (Produktnummer L7647)	
Phytohämagglutinin-P (PHA-P) (Produktnummer L8754)	
L-Rhamnose-Monohydrat ≥ 99 %	
L-/D-Arabinose mind. 98 %	
D-Melibiose ≥ 98 %	
D-Mannose ≥ 99 %	
D-Fructose ≥ 99 %	
D-Galactose ≥ 99 %	
N-Acetyl-D-glucosamin ≥ 99 %	
D-Glucosamin-HCl ≥ 99 %	
Glycin für die Synthese	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Pierce® D-Galactose Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce® Silver Stain Kit	
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X), 500 mM Dithiothreitol (DTT)	
PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	

2.1.1.2 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Bezugsquelle
Spannungsgeber Elektrophorese EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München

2.1.1.3 Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Spin Concentrator for Proteins, MWCO 5.000 Da, 4 mL	Agilent, Santa Clara, USA
96-well-Mikrotestplatten, U-förmiger Boden	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Mikroküvette	
Pierce® Zentrifugenröhrchen 10 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Hämagglutinations-Assay

2.1.2.1 Herstellung benötigter Lösungen

Für den Hämagglutinations-Assay wurde als Lösungsmittel ein 50 mM Tris-HCl Puffer mit 150 mM NaCl, pH = 7,4 (TBS) hergestellt und bei 4 °C gelagert. Das humane Erythrozytenkonzentrat (EK) der Blutgruppe AB wurde steril in Portionen à 15 mL aufgeteilt und ebenfalls bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

Die 2 %-, 4 %- und 6 %-Erythrozytensuspensionen wurden vor Versuchsbeginn stets frisch hergestellt. Dazu wurde ein Aliquot des EK entnommen, dreimal mit der fünffachen Menge gekühltem TBS gewaschen und anschließend für sechs Minuten mit 457 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dies war zur Entfernung der Glucose aus der Stabilisatorlösung des EK notwendig, welche die Hämagglutination behindern konnte. Nach den Waschrufen wurde die benötigte, gekühlte Menge TBS in einer 15 mL Schraubröhre vorgelegt, die entsprechende Menge Erythrozyten dazugegeben und gut durchmischt.

Die Konzentrationen der Stammlösungen (SL) der Positivkontrollen Concanavalin A (ConA) und Phytohämagglutinin-P (PHA-P) betragen jeweils 1 mg/mL in TBS. Bei ConA erfolgte noch die Zugabe von Calcium und Mangan (beide als Chloridsalze) als Co-Faktoren in einer Konzentration von je 1 mg/mL. Die SL wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die SL von Pycnogenol und dessen Fraktionen 2 – 4 in einer Konzentration von jeweils 1 mg/mL bzw. bei den Fraktionen zusätzlich noch 10 mg/mL wurden ebenfalls aliquotiert,

bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und nach Durchführung eines Assays verworfen. Fraktion 1 stand für die Versuche nicht zur Verfügung.

2.1.2.2 Versuchsdurchführung

In einer 96-well-Mikrotestplatte mit U-förmigen Boden wurden $50\text{ }\mu\text{L}$ TBS in jeder Vertiefung vorlegt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von $50\text{ }\mu\text{L}$ der Stammlösungen von Positivkontrollen, Pycnogenol oder dessen Fraktionen 2 – 4 in das erste Well der Reihe. Als Negativkontrolle fungierte $50\text{ }\mu\text{L}$ TBS. Nach Erstellen einer Verdünnungsreihe mittels Multikanalpipette wurden mit ebendieser jeweils $50\text{ }\mu\text{L}$ der Erythrozyten-Suspension zugegeben. Alle Assays wurden mindestens im Triplikat in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die visuelle Auswertung erfolgte nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur (Abbildung 50).

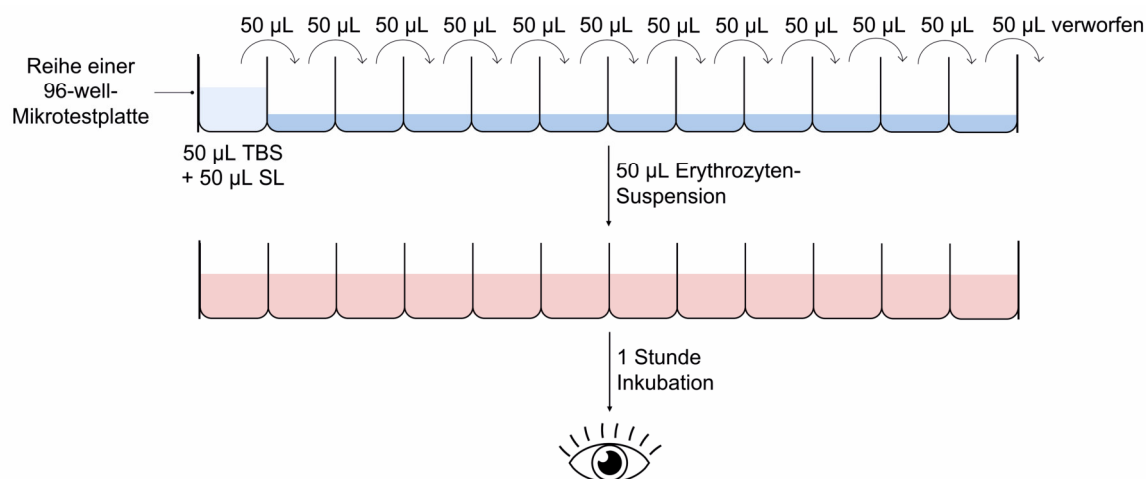


Abbildung 50: Schematische Darstellung der Durchführung des Hämagglutinations-Assays. TBS = 50 mM Tris-HCl Puffer pH = 7,4, SL = Stammlösung der Positivkontrolle, von Pycnogenol oder dessen Fraktionen 2 – 4.

2.1.3 Inhibition der Hämagglutination durch ausgewählte Saccharide

2.1.3.1 Herstellung benötigter Lösungen

Die Herstellung von TBS, 2 %-Erythrozyten-Suspension und Stammlösungen der Substanzen erfolgten wie in C2.1.2.1 beschrieben. Da für die Fraktionen 2 – 4 kein reproduzierbares Hämagglutinations-Verhalten in C2.1.2.2 zu erreichen war, wurde auf die weitere Untersuchung derer verzichtet. Als potentielle Inhibitoren der Hämagglutination wurden D-Glucose, L-Rhamnose, D-Arabinose, L-Arabinose, D-Melibiose, D-Mannose, D-Fructose, D-Galactose, N-Acetyl-D-glucosamin, D-Glucosamin-HCl und D-Xylose untersucht. Die Konzentration der Lösungen betrug jeweils 2 mol/L bzw. 100 mg/mL bei D-Galactose und 200 mg/mL bei D-Glucosamin-HCl. Als Lösungsmittel diente immer TBS, welcher gegebenenfalls auch zur Verdünnung der Stammlösungen verwendet wurde. Aliquots der Saccharidlösungen wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.3.2 Identifikation möglicher Inhibitoren

Im ersten Schritt der Charakterisierung möglicher Inhibitoren wurden in einem Hämagglutinations-Assay diejenigen Saccharide identifiziert, die die hervorgerufene Hämagglutination teilweise oder vollständig aufhoben. Dazu wurde der Assay in Analogie zu C2.1.2.2 durchgeführt; jedoch wurden nach der Erstellung der Verdünnungsreihen von Pycnogenol und dessen Fraktionen zunächst je 50 μL der entsprechenden Zuckerlösung in jedes Well einer Reihe pipettiert und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde in diesem Fall in einer separaten Reihe anstelle des Zuckers 50 μL TBS zugegeben. In Anschluss erfolgte dann die Zugabe von jeweils 50 μL der 2 %-Erythrozyten-Suspension mit nachfolgender Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zwischen den in C2.1.2.1 beschriebenen Erythrozyten-Konzentrationen ergab sich kein Unterschied im Ergebnis, sodass nachfolgend eine 2 %ige Erythrozyten-Suspension verwendet wurde. Bei einer Pycnogenol-Konzentration von 0,04 mg/mL konnte eine vollständige Inhibition der Hämagglutination durch D-Glucosamin-HCl und D-Galactose beobachtet werden; daher wurde diese Konzentration gewählt, um die minimal notwendige Saccharidkonzentration für eine vollständige Aufhebung der Hämagglutination zu bestimmen. Alle Assays wurden mindestens im Triplikat in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte visuell.

2.1.3.3 Bestimmung der minimalen Inhibitorkonzentration zur vollständigen Aufhebung der Hämagglutination

Nur D-Glucosamin-HCl und D-Galactose zeigten in C2.1.3.2 eine Hemmung der durch Pycnogenol verursachten Agglutination, weswegen diese beiden Substanzen weiter charakterisiert wurden. Für die Bestimmung der minimal notwendigen Zuckerkonzentration, die bei einer Pycnogenol-Konzentration von 0,04 mg/mL eine vollständige Hemmung der Hämagglutination hervorruft, wurden je 25 μL der Zuckerlösungen mit 25 μL einer Lösung der oben genannten Pycnogenol-Konzentration auf einer 96-well-Mikrotestplatte gemischt. Der überprüfte Konzentrationsbereich betrug 100 – 200 mg/mL für D-Galactose und 5 – 40 mg/mL für D-Glucosamin-HCl. Nach anschließender Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C wurde in jedes Well 50 μL einer 2 %-Erythrozyten-Suspension gegeben und die Proben nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur visuell ausgewertet.

2.1.4 Isolierung eines Lektins aus Pycnogenol mittels Affinitätschromatographie

2.1.4.1 Herstellung benötigter Lösungen

Zum Konditionieren und Waschen der Säule wurde der in C2.1.2.1 beschriebene TBS verwendet. Der abschließende Waschschriff und die Lagerung des D-Galactose-Agarose-Gels erfolgten mit TBS, welcher mit 0,02 % Natriumazid konserviert war. Eluiert wurde mit einer Lösung von 0,3 M D-Galactose in TBS, welche vor Versuchsbeginn immer frisch hergestellt wurde. Die Lagerungstemperatur der restlichen Lösungen und des Gels betrug 4 °C. Für die aufzutragende Probelösung wurden 5 g Pycnogenol in 20 mL TBS suspendiert, eine Viertelstunde auf einem Magnetrührer gemischt und bei 3345 g, 4 °C für 30 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut unter den gleichen Bedingungen der Zentrifugation zugeführt und schließlich der Affinitätschromatographie unterzogen.

2.1.4.2 Durchführung der Affinitätschromatographie und Fraktionierung

Um das D-Galactose-Agarose-Gels zu konditionieren, wurde dieses zunächst mit dem zehnfachen Volumen des Säulenbetts an TBS behandelt. Nachdem die in C2.1.4.1 geschilderte Probelösung aufgetragen wurde, wurde die Säule zur Entfernung restlicher Bestandteile von Pycnogenol mit dem vierzigfachen Volumen des Säulenbetts an TBS gewaschen. Zur Elution des nun an D-Galactose gebundenen Lektins wurde das zehnfache Volumen des Säulenbetts an 0,3 M D-Galactose in TBS auftragen, wobei letztlich jeweils Fraktionen à 1 mL aufgefangen wurden (Abbildung 51). Nach der Gewinnung der Fraktionen erfolgte das Waschen der Säule mit dem Fünffachen des Säulenvolumens an TBS. Für den letzten Waschschrift wurde 0,02 % Natriumazid in TBS verwendet, um eine mikrobielle Kontamination während der Säulenlagerung zu verhindern.

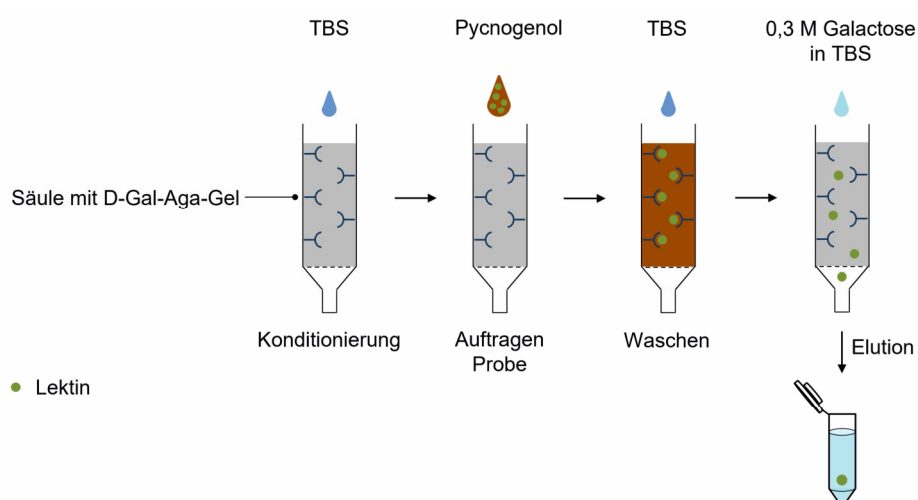


Abbildung 51: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer Affinitätschromatographie zur Aufreinigung eines Galactose-spezifischen Lektins. Nach der Konditionierung mit TBS wurde die Pycnogenol-Probelösung aufgetragen und im Anschluss an einen Waschschrift mit 0,3 M Galactose eluiert, wobei Fraktionen à 1 mL aufgefangen wurden. D-Gal-Aga-Gel = D-Galactose-Agarose-Gel.

Die Konzentration der D-Galactose wurde höher gewählt als herstellereits empfohlen, um eine möglichst vollständige Elution des Lektins sicherzustellen. Die erhaltenen Fraktionen wurden bis zur weiteren Analytik bei -20 °C gelagert.

2.1.4.3 Identifizierung Lektin-enthaltender Fraktionen mittels Hämagglutinations-Assay

Für die Identifizierung derjenigen Fraktionen der Affinitätschromatographie (C2.1.4.2), die vermutlich ein Lektin enthielten, wurden alle Fraktionen einem Hämagglutinations-Assay analog C2.1.2.2 unterzogen.

2.1.4.4 Bradford-Assay zur Bestimmung des Proteingehalts der Fraktionen

Im Gegensatz zu anderen gängigen Methoden zur Proteinbestimmung wird der Bradford-Assay durch die in den Fraktionen anwesende D-Galactose nicht gestört. Dieser beruht auf

einer Bindung basischer Aminosäuren an den rotbraunen Coomassie-Farbstoff im sauren pH-Bereich, wodurch sich eine Farbänderung hin zu blau ergibt, welche in einem Wellenlängen-Bereich von 575 nm bis 615 nm erfasst werden kann.

Für die Färbelösung wurden 50 mg Coomassie G250 in 25 mL Ethanol p.a. unter Rühren gelöst und daraufhin 50 mL Phosphorsäure 85 % ebenfalls unter Rühren hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde in ca. 400 mL Milli-Q®-Reinstwasser überführt, ad 500 mL aufgefüllt und bei 4 °C gelagert. Für die Kalibriergerade wurden sieben BSA-Standards mit 0,3 M Galactose in TBS als Lösungsmittel im Konzentrationsbereich von 2,5 µg/mL bis 50 µg/mL aus einer BSA-Stammlösung mit 2 mg/mL hergestellt. Dies geschah vor jedem Assay, zudem wurden die Lösungen bis zur Durchführung auf Eis gelagert.

Für die Versuchsdurchführung wurden je 1.000 µL BSA-Standards, ausgewählte Fraktionen, Pycnogenol 1 mg/mL in TBS und PHA-P 25 µg/mL (Positivkontrolle) in einem Reagiergefäß vorgelegt und mit 1.000 µL der Färbelösung versetzt. Während der zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 184 Umdrehungen pro Minute im ThermoMixer® gemischt. Für die Bestimmung der Absorption bei den Wellenlängen 450 nm und 600 nm unter Verwendung des Mikrottestplattenlesegeräts wurden je 250 µL der Proben auf eine 96-well-Mikrottestplatte überführt und sogleich vermessen. Die Bestimmung erfolgte immer im Triplikat.

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel® Version 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Zur Verbesserung der Genauigkeit wurde für die Erstellung der Kalibriergerade und die Auswertung zusätzlich zur Absorption bei 600 nm auch der Quotient der Absorptionen bei 600 nm und 450 nm gebildet [402].

2.1.4.5 Aufreinigung und Konzentrierung der Fraktionen und einer Pycnogenol-Lösung

Für die Ultrafiltration zur Proben-Aufkonzentrierung und zur Entfernung von Bestandteilen, die die weitere Charakterisierung des Lektins gestört hätten, wurden zunächst drei ausgewählte Fraktionen vereint. Als Kontrolle diente eine Pycnogenol-Lösung der Konzentration 1 mg/mL in TBS, TBS alleine und als Positivkontrolle eine Lösung mit 20 µg/mL BSA. Danach wurde die erhaltene Lösung mit dem Volumen von 3 mL in die Filtrationseinheiten (Spin Concentrator for Proteins, MWCO 5.000 Da, 4 mL) überführt und für 30 Minuten bei 3345 g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene konzentrierte Überstand wurde mit 3 mL TBS ergänzt und erneut zentrifugiert; dieser Schritt wurde im Anschluss wiederholt. Abschließend fand eine erneute Proteinquantifizierung mittels des Bradford Assays statt, die Durchführung war dabei identisch zu C2.1.4.4.

2.1.5 SDS-PAGE zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen

2.1.5.1 Herstellung benötigter Lösungen

Die 10 %ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) als Radikalstarter der Polymerisation des Gels wurde aliquotiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und nach einmaligem Auftauen verworfen. Die Lagerung einer 10 %-Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) zur Denaturierung von Proteinen erfolgte bei Raumtemperatur. ConA in Lösungen verschiedener Konzentrationen wurde als Referenzprotein verwendet. Als Probelösungen wurden neben ausgewählten Fraktionen aus der Affinitätschromatographie noch Pycnogenol-Lösungen bzw.-suspensionen mit einer Konzentration von 1 mg/mL, 100 mg/mL und 1 g/mL verwendet. Alle Pycnogenol-Proben wurden zur Entfernung unlöslicher Bestandteile zunächst bei 18.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 Minuten zentrifugiert und nur der Überstand für die SDS-PAGE verwendet, um ein Verstopfen der Gel-Poren zu vermeiden. Der pH-Wert des zehnfach konzentrierten Laufpuffers betrug für eine adäquate Ionenstärke $8,3 \pm 0,2$ und wurde dementsprechend nicht angepasst. Er wurde vor Gebrauch 1:10 mit Milli-Q[®]-Reinstwasser verdünnt und gemäß Herstelleranweisung in die Kammern des Elektrophorese-Tanks gefüllt. Der Laufpuffer sowie TBS 1,5 M pH = 8,8 und TBS 0,5 M pH = 6,8 wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die konkrete Zusammensetzung der genannten Lösungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung Laufpuffer, 1,5 M TBS pH = 8,8 und 0,5 M TBS pH = 6,8. 10X = zehnfach konzentriert.

Lösung	Tris	Salzsäure	Glycin	SDS
Laufpuffer (10X)	250 mM	-	1,92 M	1 %
1,5 M TBS pH = 8,8	1,5 M	36 %	-	-
0,5 M TBS pH = 6,8	0,5 M	36 %	-	-

2.1.5.2 Durchführung der SDS-PAGE

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des vermuteten Lektins wurde zunächst eine denaturierende und reduzierende bzw. nicht-reduzierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE). Die Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels war wie in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel mit 10 % bzw. 5 % Rotiphorese®-Gel. Die angegebenen Mengen waren ausreichend für ein SDS-PAGE-Gel.

Reagenz	Trenngel mit 10 %-Rotiphorese®-Gel (Volumen in µL)	Sammelgel mit 5 %-Rotiphorese®-Gel (Volumen in µL)
Milli-Q® Reinstwasser	2.008	2.867
Rotiphorese®-Gel	1.667	834
1,5 M TBS pH = 8,8	1.250	1.250
10 % SDS	50	50
TEMED	2,5	5
10 % APS	25	50

Das Trenngel wurde zügig nach Mischen der genannten Komponenten in einem Volumen von 3 mL zwischen die Glasplatten der Apparatur zum Gießen des Gels eingebracht und sofort mit 1,5 mL Milli-Q-Reinstwasser überschichtet, um später eine scharfe Trennung zwischen den beiden Gelen zu erreichen. Nach einer Aushärtezeit von 30 Minuten wurde das Wasser abgegossen, das unmittelbar zuvor hergestellte Sammelgel aufgebracht und dieses mit Kamm für weitere 60 Minuten auspolymerisiert. Eine Variation bestand aus der Verwendung eines Gels, welches nur aus einem Sammelgel bestand. Zudem wurde sowohl ein präparativer Kamm für ein Taschenvolumen von 650 µL als auch ein herkömmlicher Kamm mit zehn Taschen eines Volumens von 44 µL verwendet (Abbildung 52).

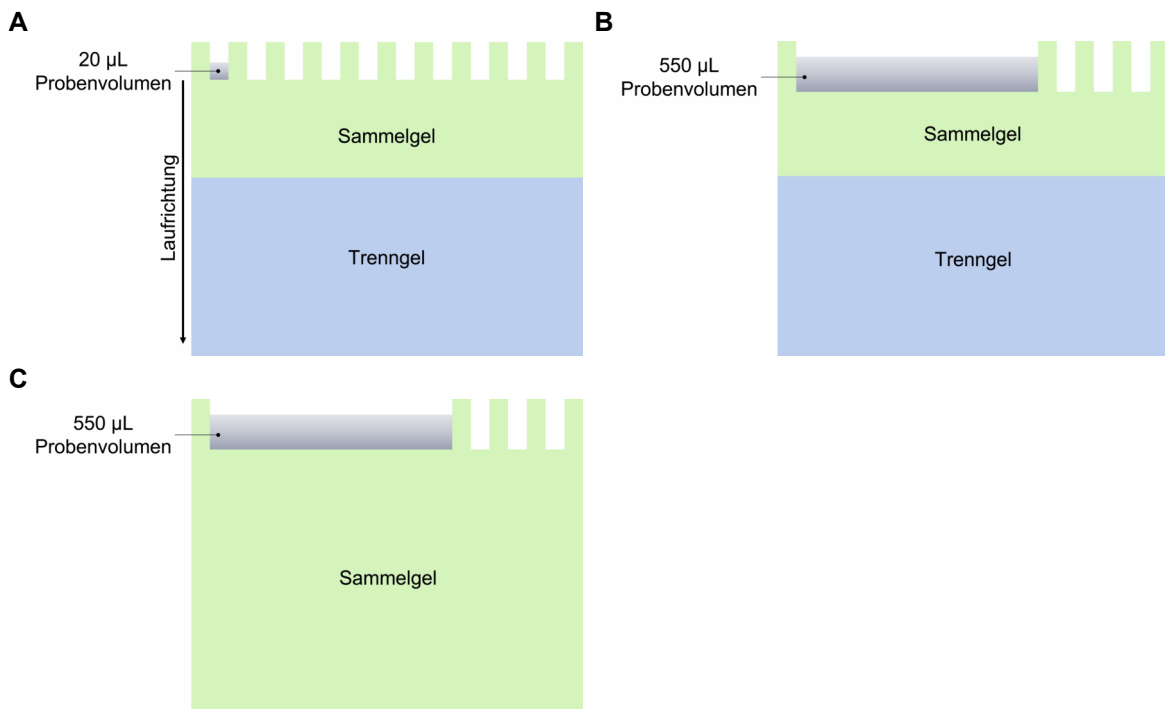


Abbildung 52: Variationen der verwendeten SDS-PAGE-Gele zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen. A: herkömmliches Gel, B: Gel mit präparativer Tasche, C: Gel ausschließlich mit Sammelgel und mit präparativer Tasche.

Nachdem der Kamm entfernt wurde, wurden die entstandenen Probestaschen zur Entfernung nicht-polymerisierter Acrylamid-Monomere mit 2 mL Laufpuffer gewaschen. Für die nicht-reduzierende SDS-PAGE wurde die Probelösung mit dem gebrauchsfertigen Probenpuffer versetzt und ohne vorheriges Erhitzen auf das Gel aufgetragen. Für die reduzierende SDS-PAGE wurde der Probelösung zusätzlich noch DTT als Reduktionsmittel in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben und für vier Minuten bei 95 °C erhitzt. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 20 µL bzw. beim präparativen Kamm 550 µL.

Zur Visualisierung der Auftrennung der Proteine und zur Bestimmung des Molekulargewichts derer wurden 10 µL eines vorgefärbten Markers pro Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 390 mA für etwa eineinhalb Stunden, nämlich bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreichte. Die abschließende Proteinfärbung des SDS-PAGE-Gels wurde gemäß der Handlungsanweisung des Herstellers des gebrauchsfertigen Kits (Pierce® Silver Stain Kit) durchgeführt.

2.2 Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Polyphenole auf die Atmungskette in vitro

2.2.1 Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Lösung von nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA, 100X)	Biochrom, Berlin
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa®)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Midori-Green Advance	Nippon Genetics, Tokio, Japan
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
0,25 % Trypsin + 0,02 % EDTA (T/E)	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), High-Glucose (4.500 mg/L)	
Lösung mit Penicillin (10.000 U/mL) und Streptomycin (10 mg/mL) (Pen-Strep)	
Resveratrol > 98 %	TCI, Tokio, Japan
Adenosintriphosphat-Lösung (ATP) 5 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zinkchlorid p.a. (ZnCl ₂)	Fakultätseigene Chemikalienausgabe

Bezeichnung	Bezugsquelle
CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Fitchburg, USA
Luminometer Centro LB 960	Berthold, Bad Wildbad
96-well-Mikrotestplatten, flacher Boden, weiß, für die Lumineszenz	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.2.2 Kultivierung humaner kolorektaler Adenokarzinomzellen (CaCo-II)

Alle Tätigkeiten wurden, soweit nachfolgend nicht anders angegeben, unter aseptischen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt.

2.2.2.1 Herstellung und Wechsel des Nährmediums

Für die Herstellung des Nährmediums (Medium) wurden fetales bovines Serum (FBS), Pen-Strep und NEA aufgetaut und wie das DMEM auf Raumtemperatur gebracht. Nacheinander wurden 5 mL Pen-Strep, 5 mL NEA und 50 mL FBS zu 440 mL DMEM in dessen Originalgefäß gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Die Endkonzentrationen betragen 10 % FBS, 1 % Pen-Strep und 1 % NEA. Das fertige Medium wurde in 50 mL Schraubröhren bei 4 °C für höchstens vier Wochen gelagert. Zudem wurde ein Aliquot maximal zweimal auf 37 °C erwärmt und dann verworfen.

Der Nährmediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Dazu wurde ein Aliquot Medium zunächst für eine Stunde im CO₂-Inkubator auf 37 °C erwärmt. Nach dem Dekantieren des alten Mediums wurde sogleich frisches, erwärmtes Medium ergänzt. Das Volumen betrug dabei 12 mL pro Kulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm².

2.2.2.2 Kultivierung und Passagieren der CaCo-II-Zellen

Die Zelllinie CaCo-II stammte aus Epithelzellen eines humanen kolorektalen Adenokarzinoms. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im CO₂-Inkubator in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm². Belegte der Zellrasen etwa 80 – 90 % des Flaschenbodens (Konfluenz), so erfolgte das Passagieren der Zellen, um eine Wachstumshemmung zu vermeiden. Dazu wurden zunächst alle benötigten Lösungen auf 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde entfernt und der Zellrasen mit 10 mL PBS (Phosphatpuffer ohne Ca²⁺ oder Mg²⁺) gewaschen, um eventuell noch vorhandene FBS-Reste zu entfernen. Die darin enthaltenen Calcium- oder Magnesium-Ionen stören die Aktivität des nachfolgenden T/E, das das Ablösen der am Flaschenboden anhaftenden Zellen bewirkt. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach Zugabe von 2 mL T/E während der Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für fünf Minuten. Durch vorsichtiges Klopfen auf den Flaschenboden wurden unter mikroskopischer Kontrolle restliche noch adhärente Zellen gelöst. Die Inaktivierung von T/E erfolgte durch die Zugabe von 8 mL Medium zur Kulturflasche. Nach mehrmaligem Mischen

durch Auf- und Abpipettieren der so erhaltenen Zellsuspension wurde diese in eine Schraubröhre überführt und bei 300 g für vier Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und das daraus resultierende Zellpellet in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Das Aussäen der Zellen in einer neuen Kulturflasche erfolgte in einem Verhältnis von 1:4 oder 1:6 oder in Mikrottestplatten in der erforderlichen Zellzahl für folgende Versuche.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Das Zählen von Zellen erfolgte während des Passagierens nach der Resuspension des Zellpellets. Dazu wurden 10 μL der erhaltenen Zellsuspension in die Zählkammer des C-Chips überführt, mikroskopisch die Zahl der Zellen in allen vier Quadranten mäanderförmig gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Tiefe der Zählkammer betrug 0,1 mm bei einer Breite und Höhe von je 1 mm. Dadurch ergab sich ein Volumen von 0,1 mm^3 bzw. 0,1 μL für die Zählkammer; multiplizierte man die erhaltene Zellzahl mit 10.000, so erhielt man die Zellzahl pro mL (Abbildung 53).

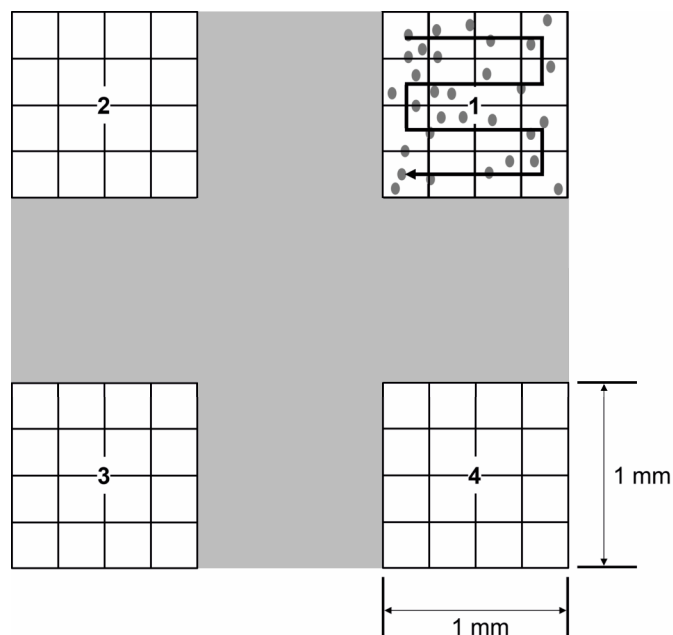


Abbildung 53: Zählkammer (C-Chip) für die Zählung von Zellen. Im 1. Quadranten ist das mäanderförmige Vorgehen zu sehen. Der Mittelwert aller Quadranten multipliziert mit 10.000 liefert die Zellzahl pro mL.

Im Anschluss an die Bestimmung erfolgte je nach Versuchsaufbau eine Verdünnung der Zellsuspension mit Medium auf die gewünschte Anzahl von Zellen.

2.2.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von CaCo-II-Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff. Für das Einfrieren der Zellen wurde zunächst ein Kryomedium aus gleichen Teilen Medium und 20 % DMSO in FBS hergestellt. DMSO penetriert während des Einfrierens die Zellmembran und verringert im Inneren der Zelle die Bildung großer Eiskristalle, die die

Integrität der Zellmembran und Zellorganellen stören würden. Da DMSO als organisches Lösungsmittel bei Raumtemperatur cytotoxisch ist, wurde das Kryomedium vor Verwendung bei 4 °C gekühlt. Zum Einfrieren wurde die Zellzahl der Suspension zunächst auf 800.000 bis 1.000.000 Zellen pro mL eingestellt. Anschließend wurde diese Zellsuspension mit gleichen Teilen des gekühlten Kryomediums gemischt und 2 mL dieser Mischung in eine Mikro-Schraubröhre überführt. Zur Gewährleistung einer konstanten Kühlrate von -1 °C pro Minute wurden die Aliquots in das Gefrierbehältnis Mr. Frosty® überführt und mindestens vier Stunden lang bei -80 °C gelagert. Zum Schluss erfolgte die Überführung in den flüssigen Stickstoff.

2.2.2.5 Überprüfung der Kontamination durch *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma* spp. und *Ureaplasma* spp. mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine Kontamination der kultivierten Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde regelmäßig eine Überprüfung mittels PCR (LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit) durchgeführt. Dazu wurden 100 µL des Medium-Überstandes einer Kultur mit 90 % Konfluenz für 5 Minuten im ThermoMixer® bei 95 °C erhitzt. Nach der Zentrifugation bei 18.000 g für 30 Sekunden bei einer Temperatur von 4 °C wurde der Überstand für die Testung gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Zudem wurde bei jeder Überprüfung eine Negativkontrolle in Form von Milli-Q® Reinstwasser und eine im Kit enthaltene Positivkontrolle analysiert. Für den DNA-Polymerase-Reaktionspuffer wurden pro Reaktion 0,5 µL der DNA-Polymerase mit 22,5 µL des im Kit enthaltenen Rehydrations Buffer versetzt, vorsichtig durch Schwenken gemischt und anschließend laut Anweisung des Herstellers mit den Proben bzw. Kontrollen in PCR-Reagiergefäßen gemischt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Pipettierschema zur Vorbereitung der Proben und Kontrollen für die PCR.

Reagenz	Probe	Negativkontrolle	Positivkontrolle
DNA-Polymerase-Reaktionspuffer	23 µL	23 µL	25 µL
Medium-Überstand	2 µL	-	-
Milli-Q® Reinstwasser	-	2 µL	-

In Anschluss an eine fünfminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die PCR gemäß eines vom Hersteller vorgeschlagenen Programmablaufs durchgeführt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Programmablauf der PCR.

Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer Zyklus (s)
1	94	120
40	94	30
	55	30
	72	40

Zur Detektion der amplifizierten DNA wurde nach Abkühlung der Proben auf 4 – 8 °C eine Gel-Elektrophorese vorgenommen. Für das Agarose-Gel wurden 0,6 g Agarose in 50 mL TBE (0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure, pH = 8 und 0,002 M EDTA-Dinatrium) suspendiert und unter Rühren erhitzt, bis die Agarose gelöst war und keine Partikel mehr sichtbar waren. Nach dem Erreichen einer Temperatur von etwa 60 °C wurden 7 µL Midori-Green für die DNA-Färbung hinzugegeben und die Lösung zum Aushärten des Gels in die vorgesehene Apparatur gegossen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit TBE bis zur vollständigen Bedeckung des Gels befüllt. Im Anschluss wurden je 8 µL Probelösung aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 Volt so lange durchgeführt, bis die Lauffront etwa 2,5 cm vom Ende des Gels entfernt war. Die Auswertung des Gels erfolgte mittels GeneFlash® unter UV-Belichtung bei 280 nm.

2.2.3 Lumineszenz-Assay

2.2.3.1 Herstellung häufig benötigter Lösungen

Die Stammlösungen von Pycnogenol und den Substanzen Ferulasäure, M1, Taxifolin und Resveratrol als Positivkontrolle [239] wurden in einer Konzentration von 10 mg/mL in DMSO hergestellt und bei -80 °C gelagert. Am Versuchstag wurden die Stammlösungen aufgetaut und mit Medium auf eine Konzentration von 50 µg/mL bzw. 46 µg/mL für Resveratrol gebracht. Als Qualitätskontrolle fungierte Zinkchlorid mit einer Konzentration von 200 µg/mL, welches in der eingesetzten Endkonzentration von 100 µg/mL als cytotoxisch gilt [403]. Diese Lösung wurde ebenfalls erst am Tag des Assays durch Verdünnen einer DMSO-Stammlösung mit 20 mg/mL mit Medium hergestellt. ATP-Lösungen für einen finalen Kalibrierbereich von 0,5 – 4,5 µM wurden durch Verdünnung einer 5 mM Lösung mit Ampuwa® erhalten und bei -80 °C gelagert. Alle genannten Schritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen.

2.2.3.2 Kultivierung und Inkubation der CaCo-II-Zellen

Die Zellen wurden für eine maximale Signalintensität während der späteren Lumineszenz-Bestimmung in weißen 96-well-Mikrotestplatten mit einem Arbeitsvolumen von 50 µL kultiviert. Dazu wurden initial pro Well 10.000 Zellen ausgesät. Die äußeren Wells wurden dabei

nicht belegt, um Randeffekte zu vermeiden. In diese und weitere Wells ohne Zellen wurde für eine einheitliche Temperaturverteilung jeweils 100 μL reines Medium gefüllt. Nach 24 Stunden Wartezeit begann die sechsstündige Inkubation im CO_2 -Inkubator mit Pycnogenol, Ferulasäure, M1, Taxifolin, Resveratrol und Zinkchlorid. Dazu wurden von jeder Lösung aus C2.2.3.1 50 μL pro Well vorsichtig zu den Zellen pipettiert und durch sanftes Schwenken gleichmäßig verteilt. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Pycnogenol, M1, Ferulasäure und Taxifolin, 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Resveratrol und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für Zinkchlorid mit einer finalen DMSO-Konzentration von 0,5 %. Somit dienten 50 μL 0,5 % DMSO als Negativkontrolle, was als nicht cytotoxisch gilt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Zellen mit 50 μL reinem Medium zum Vergleich inkubiert (Abbildung 54). In die Wells ohne Zellen für die späteren ATP-Kalibrierstandards wurden je 90 μL Medium pipettiert. Die Inkubationsversuche erfolgten jeweils sechsfach an drei unterschiedlichen Tagen.

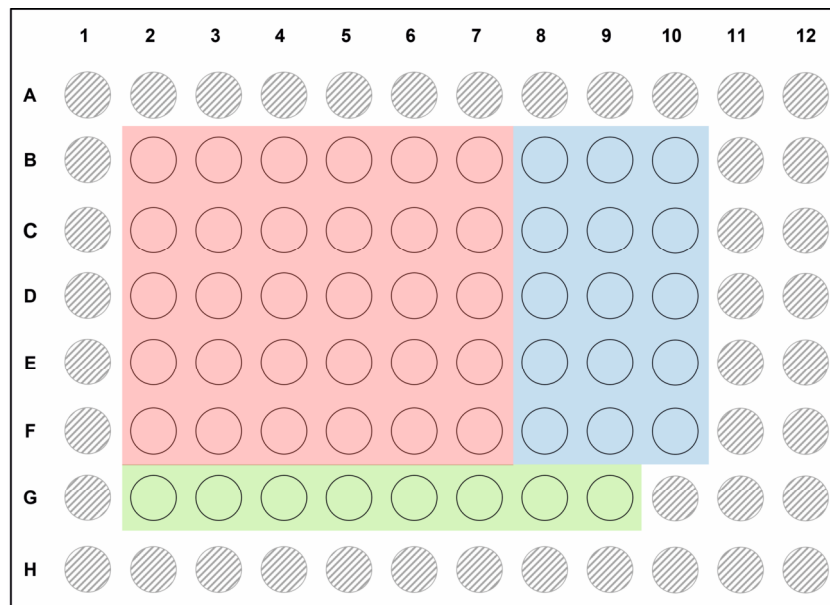


Abbildung 54: Schematischer Belegungsplan der 96-well-Mikrotestplatte für die Kultivierung und Inkubation der CaCo-II-Zellen ($n = 6$). Rot = Ferulasäure, M1, Taxifolin und Resveratrol, blau = Medium, 0,5 % DMSO und ZnCl_2 , grün = Kalibriergerade, schraffierte Wells wurden nicht genutzt.

2.2.3.3 ATP-Quantifizierung

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit von sechs Stunden wurde zunächst die Mikrotestplatte für 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden 10 μL der entsprechenden ATP-Standardlösung (C2.2.3.1) in das vorgesehene Well mit bereits 90 μL Medium pipettiert und auf einem Schüttler mit maximaler Umdrehung für zwei Minuten gemischt. Die Reaktionslösung mit Luciferase, Luciferin, Zellysepuffer und ATPase-Inhibitor wurde gemäß Protokoll hergestellt und in einem Volumen von je 100 μL in jedes Well gegeben. Dadurch ergab sich das laut Hersteller empfohlene Verhältnis zwischen Reaktionslösung und Zellüberstand von 1:1. Die Zellyse, ATP-Freisetzung und Lumineszenz-Reaktion erfolgte für einen Dauer von zwei Minuten durch Schwenken der Platte im

Luminometer; nach einer zehnmütigen Stabilisierung des Signals wurde letztlich die Lumineszenz für einen Zeitraum von einer Sekunde pro Well erfasst.

Die anschließende Auswertung wurde mit Microsoft Excel® Version 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und Prism Version 4 (GraphPad®, San Diego, USA) durchgeführt.

3 Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol

3.1 Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien

3.1.1 Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Methanol, BAKER ANALYZED® für die LC-MS, J.T. Baker	VWR, Darmstadt
Wasser, HiPerSolv CHROMANORM® für die LC-MS, VWR Chemicals	
L(+)-Ascorbinsäure, 99,0 – 100,5 %	
Ammoniumformiat für LC-MS ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ameisensäure 99 %	
1,2,3- ¹³ C ₃ -Ferulasäure 98 %	
Phenyl- ¹³ C ₆ -Vanillin 99 %	
Kaffeensäure ≥ 98,0 %	

3.1.2 Geräte, Instrumente und Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
Sciex® X500R QTOF	Sciex, Darmstadt
SCIEX OS® Analytics	
LibraryView®	
SWATH® Variable window calculator V1.1.	
Agilent® Infinity 1290 II mit G7120A High Speed Pump, G7167B Multisampler, G7116B Column Compartment	Agilent, Santa Clara, USA
Stickstoff-Abdampfapparatur	Eigenbau der Institutswerkstatt

3.1.3 Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Braunglas-Vials, mit 300 µL Glaseinsatz, Chromacol 03-FISV(A)	VWR, Darmstadt
Vialcaps (screw, blue, PTFE/red silicone septum)	Agilent, Santa Clara, USA
Trennsäule Poroshell® 120 PFP, 4,6 mm x 100 mm, Partikelgröße 2,7 µM	
Trennsäule Zorbax Eclipse Plus® C18 RRHD, 2,1 mm x 50 mm, Partikelgröße 1,8 µM	
S-Monovette® Gel 7,5 mL Z-Gel	Sarstedt, Nümbrecht

3.2 Auswahl der geeigneten Probenvorbereitung für Humanserum

3.2.1 Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)

Für den 5 mM Ammoniumformiat-Puffer mit 0,065 % (V/V) Ameisensäure als wässrige Fließmittelkomponente (FM A) wurde zunächst eine 10 M Stammlösung (SL) Ammoniumformiat in Wasser hergestellt. Diese wurde bei 4 °C maximal 4 Wochen gelagert. Für FM A wurden 500 µL der SL sowie 650 µL Ameisensäure 99 % zu 1 L Wasser gegeben. Um die organische Phase FM B mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Methanol herzustellen, wurden 1.000 µL Ameisensäure 99 % zu 1 L Methanol pipettiert. Für die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Vorversuche wurden die beiden Trennsäulen Poroshell® 120 PFP und Zorbax Eclipse Plus® C18 in Anlehnung an Mülek et al. [259] und Feliciano et al. [282] genutzt.

3.2.2 Herstellung benötigter Lösungen

Für den dreifach ¹³C-markierten internen Standard Ferulasäure wurde initial eine methanolische Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurde ein Aliquot mit Methanol auf eine Konzentration von 1 µg/mL verdünnt, welches ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen gelagert wurde. Nach dem Auftauen wurden etwaige Restmengen beider Lösungen verworfen. Für den sogenannten Spike-Mix der polyphenolischen Substanzen Ferulasäure, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin wurden zunächst methanolische Einzellösungen (Konzentration 1 mg/mL) hergestellt. Diese wurden jeweils mit Methanol auf eine Konzentration von 10 µg/mL gebracht, bevor je 100 µL ebendieser Lösungen zusammen pipettiert und mit 600 µL Methanol ergänzt wurden. Somit betrug die Endkonzentration der Analyten im Mix 1 µg/mL. Zur

Erhöhung der Stabilität oxidationsempfindlicher Analyten wurde für die Probenvorbereitung des humanen Serums Ascorbinsäure als Antioxidans hinzugegeben. Dazu wurde eine wässrige Stammlösung mit einer Konzentration von 27,5 mg/mL immer frisch angesetzt. 10%ige Ameisensäure in Wasser wurde verwendet, um die Bindung von Polyphenolen an Matrixproteine zu minimieren; diese wurde jeweils am Tag der Probenvorbereitung durch Verdünnung von 99 %-Ameisensäure hergestellt. Details zu den eingesetzten Konzentrationen bzw. Volumina sind in den einzelnen Kapiteln beschrieben.

3.2.3 Ersatzmatrix

Die Proben der Klinischen Studie standen für die Vorversuche zur Probenvorbereitung und die Optimierung der Quellenparameter in C3.3.1 nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde als Ersatz humanes Serum einer Einzelspenderin mit der Blutgruppe A, Rhesusfaktor positiv verwendet. Die Ersatzmatrix wurde im Rahmen eines freiwilligen Selbstversuches analog B2.3 gewonnen. Nach der Blutentnahme mit einer S-Monovette® Gel wurde diese mehrmals vorsichtig geschwenkt und zum Ablauf der Koagulation 30 Minuten aufrecht stehen gelassen. Zur Ausbildung der Polyacrylat-Gelschicht zwischen Blutzellen und Serum wurde das Blutentnahmeröhrchen zentrifugiert (2416 g, 15 Minuten, 4 °C), das Serum anschließend dekantiert und aliquotiert. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung der Serumproben bei einer Temperatur von -80 °C.

3.2.4 Standardvorgehen bei der Proteinfällung zur Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung des Humanserums erfolgte in Anlehnung an Mulek et al. [339] und Day et al. [266] in Form einer Proteinfällung mit Methanol. 250 µL Serum der in C3.2.3 genannten Einzelspenderin wurden mit 25 µL des Spike-Mixes aus C3.2.2 versetzt und mittels Vortex kurz gemischt. Für eine Vergleichsprobe ohne die Analyten Ferulasäure, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin wurde anstelle des Spike-Mixes das gleiche Volumen Methanol zugegeben. Danach wurden je 10 µL von Lösungen des internen Standards ¹³C-Ferulasäure und Ascorbinsäure hinzugefügt und ebenfalls kurz gevortext. Im Anschluss an die Proteinpräzipitation mit Methanol erfolgte das Mischen der Proben auf dem Vortex für einen Zeitraum von zehn Sekunden. Nach einer 20-minütigen Ultraschallbad-Behandlung wurden die Proben zentrifugiert (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C), 75 % des Überstandes abgenommen und in Olivenkölbchen überführt. Das sich anschließende Abdampfen unter einem konstanten N₂-Fluss erfolgte bei Raumtemperatur. Der erhaltene Probenrückstand wurde mit 120 µL eines 1:1-Gemisches aus Methanol und Wasser mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure und 0,1 % (m/m) Ascorbinsäure gelöst (Rekonstitutionsmittel). Die Proben wurden sodann zehn Sekunden gevortext, in Reagiergefäße gegeben und zentrifugiert (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde mittels UHPLC-qTOF-MS analysiert (Abbildung 55).

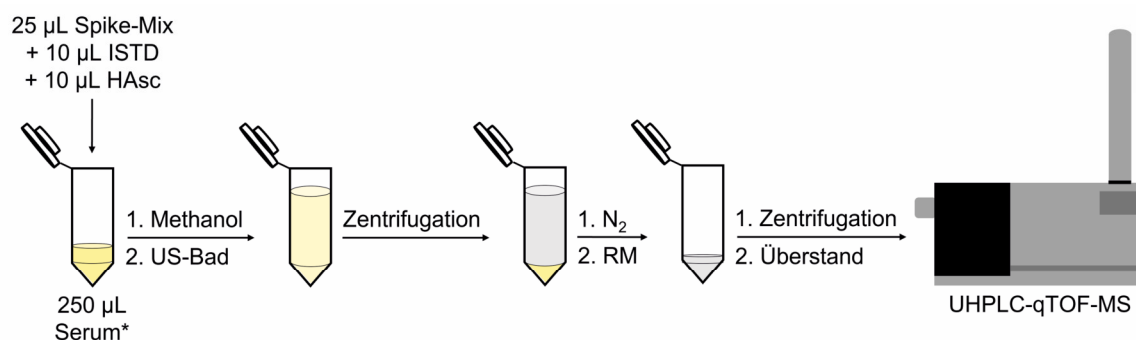


Abbildung 55: Schematische Darstellung des allgemeinen Ablaufs der Probenvorbereitung mittels methanolischer Proteinfällung. *: ggf. Zugabe von Ameisensäure, ISTD = interner Standard, HAsc = Ascorbinsäure, US-Bad = Ultraschallbad, RM = Rekonstitutionsmittel.

Verwendet wurde dabei die C18-Trennsäule (C3.2.1, Tabelle 11, Säulentemperatur 40 °C) und ein Injektionsvolumen von 5 µL. Die Post time betrug zwei Minuten.

Tabelle 11: Fließmittelgradient für die Auswahl der geeigneten Probenvorbereitung von humanem Serum unter Verwendung der C18-Trennsäule. B (%) = Anteil der organischen Phase B bei der Zusammensetzung der mobilen Phase.

Zeit (Minuten)	B (%)	Fluss C18-Trennsäule (mL/min)
0	10	0,25
0,5	10	0,25
6,5	95	0,25
12	95	0,25
12,1	10	0,25
13	10	0,25

Die MS-Methode bestand aus einem TOF MS Scan im ESI-Negativ-Modus (Temperatur 500 °C, IonSpray voltage 3.000 V, Gas 1 60 psi, Gas 2 50 psi, Curtain gas 30 psi, Declustering potential 65 V und Accumulation time 0,2 s).

3.2.5 Überprüfung des Einflusses von Ameisensäure

Die Probenvorbereitung wurde gemäß C3.2.4 durchgeführt. Zusätzlich wurde jedoch vor Zugabe von Methanol zur Proteinpräzipitation 10%ige Ameisensäure in demjenigen Volumen hinzugefügt, das einer Endkonzentration (V/V) von 0,1 %, 0,5 %, 1,0 % und 2 % im Serum entsprach. Alle weiteren Schritte blieben gegenüber C3.2.4 unverändert.

3.2.6 Überprüfung des Einflusses des Extraktionsmittel-Volumens

Des Weiteren wurde der Einfluss des Methanolvolumens als Extraktionsmittel untersucht. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in C3.2.4 beschrieben unter der Verwendung von 750 µL, 1.000 µL und 1.250 µL Methanol. Dies entsprach den typischen Verhältnissen von Matrix zu Extraktionsmittel von 1:3, 1:4 und 1:5 [404].

3.3 Optimierung der Quellenparameter für die Massenspektrometrie und Ermittlung der SWATH[®] windows

3.3.1 Probenvorbereitung

250 µL Serum der Einzelspenderin aus C3.2.3 wurde mit 12,5 µL 10%iger Ameisensäure und 10 µL Ascorbinsäure-Lösung mit einer Konzentration von 27,5 mg/mL versetzt und zum Mischen kurz gevortext. Nach der Zugabe von 10 µL des internen Standards (C3.2.2) und erneutem Vortexen wurden 1.250 µL Methanol zur Proteinfällung hinzugefügt, wobei die Probe ebenfalls kurz gemischt wurde. Danach erfolgte eine 20-minütige Behandlung im Ultraschallbad und eine Zentrifugation (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C). 1.000 µL des Überstandes wurden in ein Olivenkölbchen überführt und unter einem konstantem Stickstoff-Fluss bei Raumtemperatur abgedampft. Der Probenrückstand wurde zunächst bei -20 °C gelagert, am Versuchstag auf Raumtemperatur gebracht und weiter aufbereitet. Dazu wurden zunächst für den Spike-Mix der polyphenolischen Substanzen Ferulasäure, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin die jeweiligen Stammlösungen (C3.2.2) mit Methanol auf 100 µg/mL verdünnt. Je 200 µL dieser Lösungen wurden zusammen pipettiert und mit 200 µL Methanol ergänzt, sodass sich eine Substanzkonzentration von je 20 µg/mL in einer Lösung ergab. Dieser Mix wurde erneut mit Methanol auf eine Konzentration von 2 µg/mL verdünnt. Ein Aliquot dieser Mischung wurde dann 1:1 mit Wasser plus 0,2 % (V/V) Ameisensäure und 0,2 % (m/m) Ascorbinsäure verdünnt. Letztlich wurden 120 µL dieses Mixes zum oben genannten Rückstand gegeben und für zehn Sekunden mittels Vortex gemischt, bevor die Probe zentrifugiert (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C) wurde. Für die Optimierung der Quellenparameter wurde der Überstand unter Verwendung der PFP-Trennsäule (C3.2.1, Tabelle 12) mit einem Injektionsvolumen von 2,5 µL und einer Post time von zwei Minuten bei einer Säulentemperatur von 40 °C analysiert.

Tabelle 12: Fließmittelgradient für die Optimierung der Quellenparameter unter Verwendung der PFP-Trennsäule. B (%) = Anteil der organischen Phase bei der Zusammensetzung der mobilen Phase.

Zeit (Minuten)	B (%)	Fluss PFP-Trennsäule (mL/min)
0	10	0,4
0,5	10	0,4
6,5	95	0,4
12	95	0,4
12,1	10	0,4
13	10	0,4

3.3.2 Durchführung der Quellenparameter-Optimierung

Um eine optimale Empfindlichkeit zum Nachweis der unbekannt Analyten zu erzielen, wurden näherungsweise die Quellenparameter für die bekannten Substanzen Ferulasäure, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin in Anwesenheit von Matrixbestandteilen optimiert. Verwendet wurde hierzu die in C3.3.1 genannte Probe. Die zu optimierenden Parameter im TOF ESI-Negativ-Modus waren Temperatur, IonSpray voltage, Gas 1, Gas 2, Curtain gas und Declustering potential (DP). Die dazugehörigen Standardeinstellungen und applizierten Varianten sind in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13: Standardeinstellung und Varianten der Quellenparameter.

Parameter	Einheit	Standardeinstellung	Varianten
Temperatur	°C	450	300, 350, 400, 500
IonSpray voltage	V	4.500	2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000
Gas 1	psi	40	50, 60
Gas 2	psi	50	30, 40, 60
Curtain gas	psi	35	25, 30
Declustering potential	V	50	65, 80

Für die Optimierung der Quellenparameter wurde jeweils nur ein Parameter abgewandelt, wohingegen die anderen Parameter in ihrer Standardeinstellung beibehalten wurden. Die Accumulation time betrug immer 0,2 s, der DP spread war 0 psi. Der Massenbereich ging von 100 – 1000 Da. Die optimierten Parameter wurden für die finale MS-Methode kombiniert und auch für den ESI-Positiv-Modus angewendet.

3.3.3 Ermittlung der SWATH® windows

Die sogenannte „Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion Spectra-Methode“ (SWATH®) ermöglicht grundsätzlich die Fragmentierung aller im MS-Modus detektierten Ionen. Dabei erfolgt die Fragmentierung schrittweise anhand der SWATH® windows über den gesamten Massenbereich, welcher hier 100 – 1000 Da betrug. Für die Bestimmung der Breite der SWATH® windows für Vorversuche und Studienproben wurde Serum gemäß C3.3.1 aufgearbeitet, nach dem Abdampfen unter einem N₂-Strom aber mit 120 µL eines 1:1-Gemisches aus Methanol und Wasser mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure und 0,1 % (m/m) Ascorbinsäure versetzt. Alle weiteren Schritte sowie die Flüssigkeitschromatographie blieben im Vergleich zu C3.3.1 unverändert. Bei der MS-Analyse wurden sowohl im ESI-Negativ-Modus als auch im ESI-Positiv-Modus die optimierten Quellenparameter aus C3.3.2 verwendet. Die Ermittlung der SWATH® windows erfolgte gemäß einer Herstellerempfehlung mit acht Windows durch einen Rechner (SWATH® Variable window calculator V1.1.) unter Verwendung der Daten der vorangegangenen MS-Analyse.

3.4 Analyse von Humanserum-Proben der Klinischen Studie

3.4.1 Probenvorbereitung

Die Serumproben der Studienteilnehmer*innen wurden vorab bereits in Aliquots à 250 µL aufgeteilt und bei -80 °C gelagert (B2.3). Alle verwendeten Lösungen sind im Detail in C3.2.2 beschrieben. Zu Beginn wurde die Probe für 20 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz auf dem Vortex gemischt. Nach der Zugabe von 12,5 µL 10%iger Ameisensäure und 10 µL einer Ascorbinsäure-Lösung (Konzentration 27,5 mg/mL) wurde die Probe erneut mittels Vortex gemischt, bevor 10 µL einer Lösung des dreifach ¹³C-markierten internen Standards Ferulasäure (Konzentration 1 µg/mL) hinzu pipettiert wurden. Im Anschluss an einen erneuten Mischprozess erfolgte die Proteinpräzipitation mit 1.250 µL Methanol. Die Probe wurde zehn Sekunden gevortext, bevor sie für 20 Minuten mit Ultraschall in einem Wasserbad behandelt wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C). Vom erhaltenen Überstand wurden 1.000 µL in ein Olivenkölbchen überführt und unter einem N₂-Strom bei Raumtemperatur abgedampft. Der Probenrückstand wurde in 120 µL einer 1:1-Mischung aus Wasser und Methanol mit je 0,1 % Ameisensäure (V/V) und Ascorbinsäure (m/m) auf dem Vortex gemischt und ebenfalls zentrifugiert (18.000 g, 15 Minuten, 4 °C). 90 µL des resultierenden Überstandes wurden abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Für die weitere Messung wurde die so vorbereitete Probe aufgetaut, kurz gevortext und in ein Braunglas-Vial überführt.

3.4.2 UHPLC-SWATH®-Methode

Als Trennsäule mit korrespondierendem Fließmittelgradienten (Tabelle 12) wurde die PFP-Säule aus C3.2.1 verwendet, injiziert wurden jeweils 2,5 µL. Für die SWATH®-Methode bei der Polaritäten betrug die Temperatur 500 °C, IonSpray voltage 2500 V, Gas 1 60 psi, Gas 2 60 psi, Curtain Gas 35 psi und Declustering Potential 65 V. Für TOF MS betrug der Massenbereich 100 – 1000 Da, die Accumulation time war 0,2 s. In den TOF MS/MS Scans ging der Massenbereich von 50 bis 1000 Da, die Accumulation time belief sich auf 0,05 s. Die Collision energy (CE) mit einem CE spread von 15 V betrug 35 V. Die Bestimmung der acht SWATH® windows für ESI-Negativ- und ESI-Positiv-Modus erfolgte wie in C3.3.3 beschrieben (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ermittelte SWATH® windows des MS-Massenbereichs für ESI-Negativ- und ESI-Positiv-Modus. Die Überlappungen von 1 Da beruhen auf Herstellerempfehlungen.

ESI-Negativ (Da)	ESI-Positiv (Da)
99,5 – 144,2	99,5 – 204,9
143,2 – 169,3	203,9 – 254,8
168,3 – 190,9	253,8 – 295,3
189,9 – 217,9	294,3 – 323,2
216,9 – 262	322,2 – 351,1
261 – 333,6	350,1 – 404,2
332,6 – 476,2	403,2 – 526,6
475,2 – 999,6	525,6 – 999,6

Die Analyse der Studienproben erfolgte als Einfachbestimmung. Nach jeder achten Injektion wurde das Massenspektrometer für eine hohe Massengenauigkeit automatisch im TOF MS bzw. TOF MS/MS kalibriert. Dabei wurden die Ionen für die Kalibration im MS-Modus so gewählt, dass diese sich möglichst über den gesamten Massenbereich erstreckten; dies traf auch auf das Ion zu, dessen Fragmente für die MS/MS-Kalibrierung genutzt wurden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Kalibrationsionen im MS-Modus für ESI-Negativ und ESI-Positiv. * = Fragmente des Ions wurden für die MS/MS-Kalibrierung genutzt.

ESI-Negativ (Da)	ESI-Positiv (Da)
112,9856	132,9049
154,9738	266,1598
204,9706	315,1623
248,9604	354,2122
384,9352	442,2647
520,9100	609,2807*
656,8848	829,5393
792,8596*	922,0098
928,8344	-

3.4.3 Regelmäßige Überprüfung der X500R-Systemperformance

Für die wiederkehrende Kontrolle der Systemperformance wurde sowohl eine Lösung diverser polyphenolischer Substanzen als auch sogenannte Quality control-Proben (QC) verwendet. Für die polyphenolische Kontrolllösung wurden zunächst die Einzellösungen der Substanzen Ferulasäure, $^{13}\text{C}_3$ -Ferulasäure, Kaffeesäure, M1, Taxifolin und $^{13}\text{C}_6$ -Vanillin mit einer Konzentration von je 1 mg/mL mit Methanol auf eine Konzentration von 1 µg/mL gebracht. Anschließend wurden je 150 µL von jeder Lösung gemischt und mit 100 µL einer Ascorbinsäure-Lösung (Konzentration 11 mg/mL) und 450 µL Methanol ergänzt. Daraus resultierte eine Endkonzentration von 100 ng/mL für jeden Analyten. Aliquots der Lösung wurden bei -20 °C in Braunglasvials gelagert und jeweils am Ende einer Messreihe verworfen. Die Herstellung der QC-Proben, die zudem der Systemkonditionierung dienten, erfolgte in Anlehnung an Broadhurst et al. [405]. Hierfür wurden 150 µL Serum jeder Probe jedes Studienteilnehmenden gemischt und in Aliquots à 250 µL aufgeteilt, in flüssigem N_2 eingefroren und bis zur Probenvorbereitung analog C3.4.1 bei -80 °C gelagert. Je 1 µL der Kontrolllösung wurde im ESI-Negativ-Modus vor Beginn und nach Ende einer Messreihe zur Überwachung der Systemperformance mit der Methodik aus C3.4.2 analysiert. Von der QC-Probe wurde in beiden Polaritäten ebenfalls 1 µL injiziert, allerdings erfolgte dies in dreifacher Ausführung vor und nach der Analyse der Studienproben [405].

3.4.4 Auswertung

Die Auswertung der erhaltenen Daten beider Polaritäten aus C3.4.2 orientierte sich an Zhu et al. [328]. Aufgrund der zu erwartenden Heterogenität bezüglich der Anzahl und des Ausmaßes der detektierbaren unbekannt Substanzen (A1.4) wurden die Proben der Studienteilnehmenden zunächst separat analysiert; Details zu den vier Proben sind in B2.3 beschrieben. In der verwendeten Software Sciex OS[®] Analytics wurde der Untargeted workflow angewendet. Als relevante Parameter wurden hierbei Retentionszeit, experimentelles Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z), Summenformel und Wertungsscore ermittelt. Erfasst wurde auch die jeweilige Peakfläche, welche allerdings nur halbquantitativ zu bewerten war. Da die Probe D1-S1, gewonnen vor dem Beginn der Pycnogenol-Einnahme, als Referenzdiente, wurden in dieser Probe detektierte Analyten im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt. Anschließend erfolgte die manuelle Peakinspektion bezüglich korrekter Peakintegration und Retentionszeit in den Proben D1-S2, D1-S3 und D4-S4. Nach der Auswertung aller Studienproben wurden als interessante Marker diejenigen Analyten definiert, die bei mindestens zwei Studienteilnehmenden zu finden waren. Alle detektierten Analyten wurden bezüglich der m/z mit den Substanzdatenbanken METLIN, hmdb (Human Metabolome Database), Phenol-Explorer und PhytoHub, sowie mit einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten Datenbank abgeglichen. Zudem wurde eine Liste mit teils nach der Pycnogenol-Einnahme bereits in Serum detektierten unkonjugierten, einfach-sulfatierten und einfach-glucuronidierten Bestandteile bzw. Metabolite erstellt [70, 89, 259, 282, 293] und diese anhand der berechneten m/z mit den Analyten verglichen. Die Liste beinhaltete die Polyphenole Catechin, Dihydrokaffeesäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, M1 (inklusive der ringoffenen Form), δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M2), p-Cumarsäure, Protocatechualdehyd, Protocatechusäure, Scopoletin, Sinapinaldehyd, Syringaaldehyd, Syringasäure, Taxifolin, Vanillin und Vanillinsäure.

4 Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum

4.1 Verwendete Reagenzien, Geräte, Instrumente und Materialien

4.1.1 Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Salzsäure 0,5 mol/L	Fakultätseigene Chemikalienausgabe
0,25 % Trypsin + 0,02 % EDTA (T/E)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gelatine Typ B (Produktnummer G9391)	
Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) $\geq 97,5$ %	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>Salmonella minnesota</i> (Produktnummer L2137)	
Wasserstoffperoxid 3 % (H ₂ O ₂)	
Protocatechusäure (analytical standard)	
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran), 4 und 70 kDa	
Gepooltes Humanserum (Produktnummer H4522)	
Amphotericin-B-Lösung 250 µg/mL	
Gentamicin-Lösung 50 mg/mL	
Rekombinanter, humaner Tumornekrosefaktor- α (TNF- α , exprimiert in HEK293 Zellen)	
	Sigma Aldrich, Taufkirchen (Produktnummer H8916)
Ferulasäure-4-sulfat (Dinatriumsalz)	Biozol, Eching
Protocatechusäure-3-sulfat (Natriumsalz)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Humanes Heparansulfat ELISA Kit (Produktnummer MBS267373)	MyBioSource, San Diego, USA

Bezeichnung	Bezugsquelle
Endopan 3 Kit (Produktnummer P04-0010K)	PAN-Biotech, Aidenbach
Fetales Bovines Serum (FBS) GIBCO®, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce® RIPA Buffer	
Pierce® BCA Protein Assay Kit	
Endothelzellen aus humanen Nabel- schnurvenen (HUVEC)	Eigene Herstellung
Trypsin-Neutralisierer (10 % FBS in Phos- phatpuffer)	
0,025 % Trypsin + 0,002 % EDTA (T/E)	

4.1.2 Geräte, Instrumente und Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Millicell® ERS-2 Voltohmmeter	Merck, Darmstadt
Nunc 96-well-Mikrotestplatten, flacher Bo- den, schwarz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile Spritzenvorsatzfilter (Cellulose- acetat-Membran; 0,2 µm Porengröße)	VWR, Darmstadt
ThinCert® Zellkultureinsätze für 12-well- bzw. 24-well-Mikrotestplatten (transpa- rente PET-Membran; 0,4 µm Porengröße)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
12-well- bzw. 24-well-Mikrotestplatten	
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

4.2 Kultivierung der Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC)

Alle Tätigkeiten mit HUVEC wurden, soweit nachfolgend nicht anders angegeben, unter aseptischen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung gemäß C2.2.2 durchgeführt.

4.2.1 Herstellung des Nährmediums

Für die Fertigstellung des Nährmediums Endopan 3 wurde das basale Medium gemäß Herstellerangaben mit den separat gelieferten Zusätzen ergänzt. Supplementiert wurde das basale Medium mit Gentamicin (Endkonzentration 30 µg/mL), Amphotericin B (Endkonzentration 15 ng/mL), fetalem bovinem Serum (Endkonzentration 3 %), Heparin, Hydrocortison, Ascorbinsäure, Insulin-like Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor und Epidermal Growth Factor. Die exakte Zusammensetzung von basalem und supplementiertem Medium unterliegt dem Herstellergeheimnis. Die Laufzeit betrug zwölf Wochen.

4.2.2 Gelatine-Beschichtung der Zellkulturgefäße

Alle verwendeten Zellkulturgefäße wurden vor dem Aussäen der Zellen mit dampfsterilisierter 0,1 %-Gelatine-Lösung in Phosphatpuffer (PBS) beschichtet. Die Dampfsterilisation erfolgte bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2,1 bar für 15 Minuten. Für die Beschichtung wurden pro cm² Kulturfläche 100 µL der auf 37 °C erwärmten Lösung verwendet und das Kulturgefäß anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Beschichtungslösung dekantiert und das Gefäß vor dem Einbringen der Zellen mit etwa 200 µL Medium pro cm² für 30 Minuten im CO₂-Inkubator belassen. Die Laufzeit der Gelatine-Lösung betrug bei einer Lagertemperatur von 4 °C vier Wochen.

4.2.3 Kultivierung und Passagieren der HUVEC

HUVEC werden als Primärzellen aus dem Endothel humaner Nabelschnurvenen isoliert und anschließend gepoolt. Für alle Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passagen drei bis sechs verwendet. Um dies sicherzustellen, war regelmäßig das Auftauen bereits kryokonservierter Zellen notwendig. Dazu wurde das Einfriergefäß mit einem Aliquot (1 mL) der Zellsuspension in auf 37 °C erwärmten PBS unter Schwenken aufgetaut und nach vorsichtigem Mischen mit einer Pipette zu 13 mL warmen Medium gegeben. Das Einfriergefäß wurde mit 1 mL Medium nachgespült und anschließend die Zellzahl der 15 mL-Zellsuspension bestimmt. Details zum Ablauf der Zellzählung sind in C2.2.2.3 beschrieben. Letztlich wurde ein entsprechendes Volumen dieser Suspension in eine bereits mit warmem Medium versetzten Kulturflasche überführt, sodass sich eine Zellzahl von etwa 3.500 Zellen pro cm² ergab. Ein Mediumwechsel nach dem Auftauen erfolgte nach 24 Stunden, anschließend alle zwei bis drei Tage.

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Belegung (Konfluenz) der Wachstumsfläche von etwa 80 %. Frisches Medium und PBS wurden auf 37 °C erwärmt, T/E und Trypsin-Neutralisierer hingegen auf Raumtemperatur. Das alte Medium wurde durch Dekantieren entfernt und die adhärennten Zellen dreimal vorsichtig mit je 8 mL PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden bei Raumtemperatur 3 ml T/E zur Kulturflasche gegeben; nach

einer Wartezeit von zwei Minuten wurde das T/E durch die Zugabe von 9 ml Trypsin-Neutralisierer inaktiviert und die letzten noch am Flaschenboden anhaftenden Zellen durch vorsichtiges Klopfen auf den Flaschenboden entfernt. Nach mehrmaligem Spülen der Kulturfläche mit der erhaltenen Zellsuspension wurde diese in einer Schraubröhre bei 180 g für sieben Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Zugabe von 12 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit einer absoluten Zellzahl von 187.500 bis 375.000 pro neuer Kulturflasche oder in der benötigten Zellzahl für nachfolgende Versuche in Mikrottestplatten ausgesät.

4.3 Bestimmung des transendothelialen Widerstandes (TEER) zur Überprüfung der Integrität des HUVEC-Monolayers

Die Kultivierung der HUVEC für die Bioaktivitätsuntersuchungen erfolgte größtenteils in Zellkultureinsätzen mit PET-Membranen, wodurch die Barrierefunktion von Endothelzellen im Monolayer (Zellmonoschicht) *in vitro* überprüft werden konnte. *In vivo* entspricht das apikale Kompartiment dem Gefäßlumen, während die basolaterale Seite der Gefäßwand zugewandt ist. Der transendotheliale Widerstand (TEER) wurde unter der Verwendung einer Doppel- bzw. „Chopstick“-Elektrode mit einem Volttohmmeter bestimmt. Der dadurch ermittelte Widerstand zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment wird auf die Membranoberfläche normiert und korreliert daher mit der Integrität des ausgebildeten Zellmonolayers (Abbildung 56).

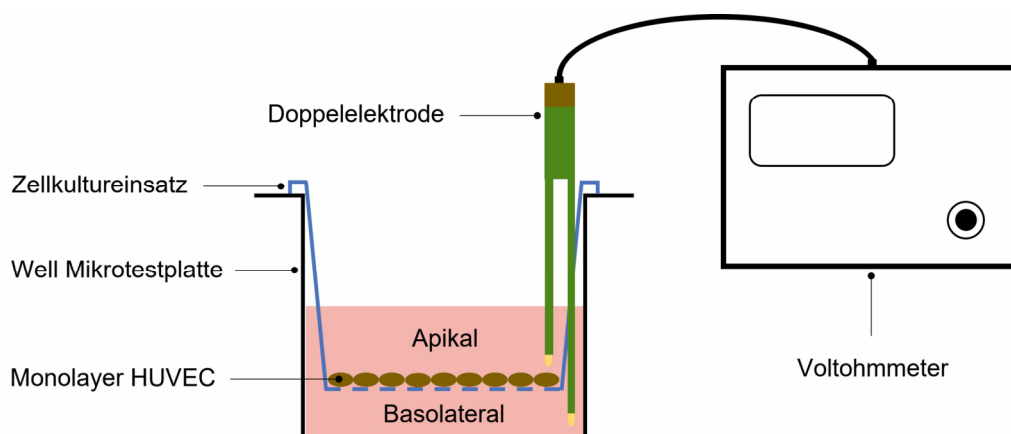


Abbildung 56: Schematische Darstellung der TEER-Bestimmung während der Kultivierung von HUVEC in Monolayern in Zellkultureinsätzen (blau) auf einer PET-Membran, wodurch sich apikales und basolaterales Kompartiment mit Medium (rot) ergeben.

Die TEER-Messung erfolgte routinemäßig alle zwei Tage bis zur Versuchsdurchführung unmittelbar vor dem Mediumwechsel mittels Vakuum-Absaugpumpe.

4.4 Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Endothelintegrität

4.4.1 Herstellung häufig benötigter Lösungen

Die Herstellung der Stammlösung des humanen Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) erfolgte in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS. Aliquots dieser Lösung wurden für maximal drei Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, unmittelbar vor Gebrauch einmalig aufgetaut und entsprechend dem Bedarf mit Medium verdünnt. Die Lipopolysaccharid-Stammlösung (LPS) hatte eine Konzentration von 1 mg/mL in Medium und wurde unter denselben vorher genannten Bedingungen gelagert und verwendet. Humanes, bereits herstellerseits gepooltes Humanserum wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aliquotiert aufbewahrt und nach Bedarf aufgetaut. Um das Risiko bakterieller oder fungaler Kontaminationen zu vermindern, wurde dem Humanserum vor der Verwendung Gentamicin und Amphotericin B in einer Endkonzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 15 ng/mL zugefügt. Die dreiprozentige Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2) wurde gemäß der benötigten Konzentration vor Versuchsbeginn mit Medium verdünnt. Für die Stammlösungen der Polyphenole Ferulasäure, Ferulasäure-4-sulfat, Protocatechusäure und Protocatechusäure-3-sulfat wurden mit DMSO Lösungen in einer Konzentration von je 65 mM hergestellt, bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aliquotiert gelagert und etwaige Reste nach dem Auftauen verworfen. Die Verdünnung der Stammlösungen auf die erforderliche Konzentration erfolgte mit Medium, sodass die verbleibende DMSO-Konzentration von unter 0,001 % unbedenklich war.

4.4.2 Vorversuche zur Zellzahl und Kulturzeit

Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen wurden in einer Zahl von 45.000 in 24-well-Mikrotestplatten ausgesät, das Arbeitsvolumen betrug pro Well jeweils 1.000 μL . Nach 48 Stunden wurde mit dem Versuch begonnen. Dafür wurden zunächst Humanserum-Medium-Lösungen mit einer Endkonzentration von 10 %- und 50 %-Humanserum hergestellt; als Vergleich diente das herkömmliche Medium mit 3 % fetalem Rinderserum. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und je 900 μL der genannten Lösungen hinzu pipettiert. Sogleich wurden je 100 μL der entsprechenden Stimulanzien-Lösung ergänzt. Verwendet wurden hierbei TNF- α (Endkonzentration 10 bzw. 100 ng/mL) und LPS (Endkonzentration 100 bzw. 1.000 ng/mL); 100 μL Medium wurde als Kontrolle eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von zwei, acht oder 24 Stunden wurde der Zellüberstand vorsichtig mittels Pipette gemischt, abpipettiert und bis zur weiteren Analyse mittels ELISA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle genannten Bedingungen wurden im Duplikat im CO_2 -Inkubator durchgeführt.

4.4.3 Vorversuche zur Humanserum-Konzentration und zur Auswahl der inflammatorischen Stimuli

Pro Well wurden 300.000 HUVEC in 12-well-Zellkultureinsätzen ausgesät; der erste Mediumwechsel zur Vermeidung des Wachstums der Zellen in mehreren Schichten (Multilayer) erfolgte nach sechs bis 16 Stunden [397], danach alle zwei Tage nach der TEER-Messung. Dabei betrug das apikale Arbeitsvolumen 500 μL , basolateral wurden 1.500 μL appliziert. Für die Ausbildung eines suffizienten Monolayers mit einem intakten Endothel inklusive Glycocalyx wurden die Zellen insgesamt 16 Tage kultiviert. Der letzte Mediumwechsel fand zwölf bis 24 Stunden vor Beginn der inflammatorischen Stimulation statt, unmittelbar davor eine TEER-Messung. Im Anschluss an die Abnahme des Mediums wurde zum apikalen Kompartiment 400 μL eine Humanserum-Medium-Lösung mit einer Endkonzentration von 10 % oder 50 % hinzu pipettiert. Auch basolateral erfolgte in Anlehnung an Miyazaki et al. [393] die Zugabe der Stimulanzen TNF- α , LPS oder H₂O₂ in 1.500 μL einer 10%igen oder 50%igen Humanserum-Medium-Lösung. Bei allen nachfolgenden Versuchen wurde darauf verzichtet. Letztlich wurde die inflammatorische Stimulation der HUVEC durch die apikale Applikation von 100 μL einer Lösung der genannten Stimulanzen eingeleitet. Untersucht wurde die Wirkung von 100 ng/mL TNF- α und 1.000 ng/mL LPS für jeweils 24 Stunden und von 50 μM H₂O₂ für einen Zeitraum von acht und 24 Stunden. Zur späteren ELISA-Analyse wurden die apikalen und basolateralen Lösungen abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Um abschließend eine TEER-Messung der stimulierten Zellen durchzuführen, wurde frisches Medium zu den HUVEC gegeben. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, bei denen anstelle der Stimulanzen Medium angewendet wurde. Die Stimulationsversuche erfolgten in zweifacher Ausführung bei einer Temperatur von 37 °C.

4.4.4 Vorversuch zur Verkürzung der Dauer der inflammatorischen Stimulation

Zur Untersuchung des Einflusses einer verkürzten inflammatorischen Stimulation mit TNF- α oder H₂O₂ auf die Endothelintegrität wurden anfänglich 300.000 HUVEC pro Well in einer 24-well-Mikrotestplatte für insgesamt 21 Tage kultiviert (n = 2). Alle zwei Tage erfolgte der Mediumwechsel mit einem Volumen von 1.000 μL , wobei der letzte Mediumwechsel zwölf bis 24 Stunden vor Beginn des Versuchs erfolgte. Je 700 μL einer Lösung mit 50 μM H₂O₂ oder 100 ng/mL TNF- α in 50 %-Humanserum-Medium wurden nach der Abnahme des Mediums zu den Zellen pipettiert und diese für zwei Stunden im Falle von H₂O₂ und für sechs Stunden (bzw. 24 Stunden als Kontrolle) im Falle von TNF- α bei 37 °C inkubiert. Unstimulierte Zellen fungierten als Kontrolle, bei diesen wurde nur 50 %-Humanserum in Medium hinzugefügt. Nach dem Ende der Stimulationszeit wurde der Überstand der Zellen abgenommen und bis zur späteren Analyse mittels ELISA bei -20 °C aufbewahrt. Zum Abschluss erfolgte die Lyse der Zellen mit nachfolgender Bestimmung der Proteinkonzentration (C4.4.7).

4.4.5 Finale Versuchsdurchführung unter optimierten Bedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte analog C4.4.4, ebenso betrug das Arbeitsvolumen 700 μL . Im Anschluss an die Mediumabnahme wurden je 600 μL einer Humanserum-Medium-Mischung zu den HUVEC gegeben. Danach wurden je 50 μL einer Mediumlösung mit Ferulasäure, Ferulasäure-4-sulfat, Protocatechusäure oder Protocatechusäure-3-sulfat appliziert. Hierdurch ergab sich letztlich eine Serumkonzentration von 50 % in Medium und eine Konzentration der jeweiligen polyphenolischen Substanz von je 0,1 und 0,5 μM . Als Kontrolle dienten 50 μL Medium. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe von 50 μL einer TNF- α -Lösung in Medium (Endkonzentration 100 ng/mL) bzw. Medium als Kontrolle für einen Zeitraum von 24 Stunden (Abbildung 57).

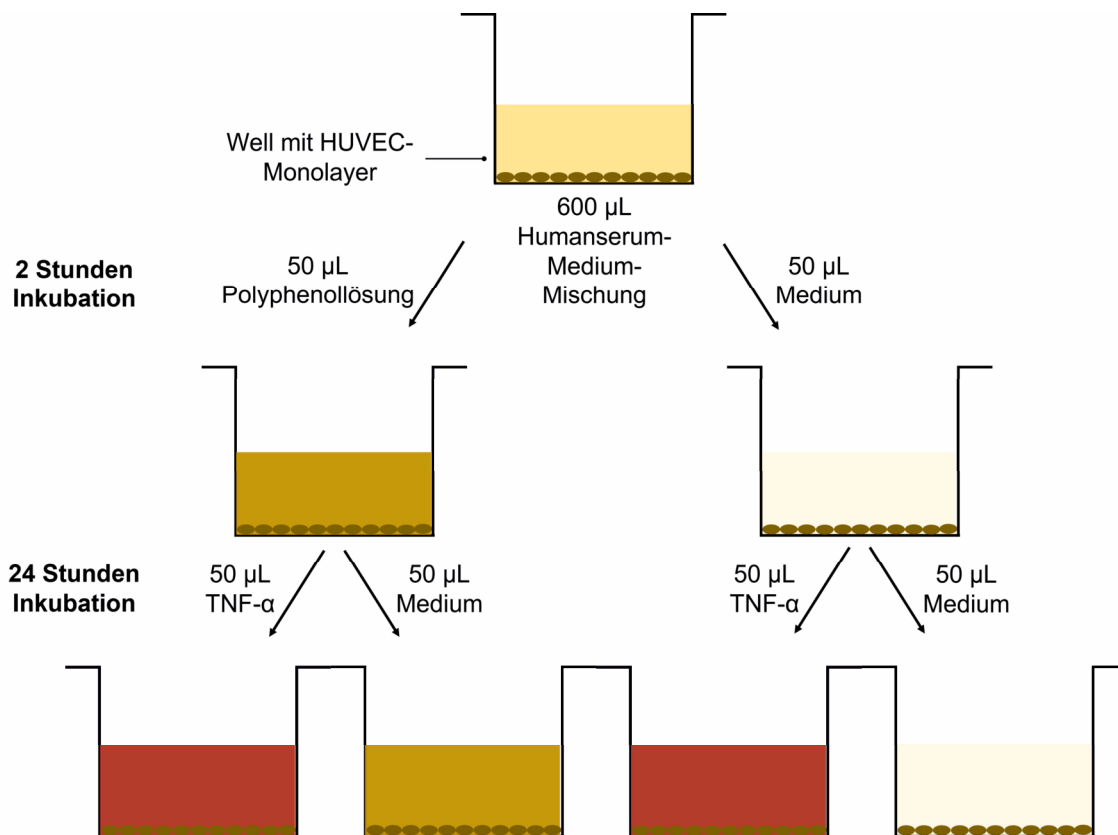


Abbildung 57: Schematische Darstellung des Ablaufs der zweistündigen Inkubation mit ausgewählten Polyphenolen vor der inflammatorischen Stimulation mit 100 ng/mL TNF- α für 24 Stunden inklusive der beschriebenen Kontrollen.

Alle weiteren Schritte wurden wie in C4.4.4 geschildert durchgeführt.

4.4.6 Bestimmung des humanen Heparansulfats mittels ELISA

Heparansulfat stellt einen essentiellen Bestandteil der Glycocalyx dar, weswegen es als Marker einer Endothelschädigung in HUVEC gewählt wurde. Nach dem Auftauen der Proben aus C4.4.2, C4.4.3, C4.4.4 und C4.4.5 wurden diese mittels Vortex kurz gemischt, im Anschluss zentrifugiert (18.000 g, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) und der Überstand für den ELISA verwendet. Die Bestimmung erfolgte ein- oder zweifach gemäß Herstellerprotokoll, wobei jedoch

für eine bessere Empfindlichkeit die Inkubation mit dem Farbreagenz in Abhängigkeit von der Farbentwicklung des höchsten Kalibrierpunktes verlängert wurde.

Die Auswertung (B4.1.2) erfolgte mittels des Online-Tools GainData[®] (Arigo Biolaboratories, Taiwan), Microsoft 365 Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und Prism Version 4 (GraphPad[®], San Diego, USA).

4.4.7 Bestimmung des Proteingehalts der Zelllysate mittels Bicinchoninsäure-Assay

Für die Lyse der Zellen unter unsterilen Bedingungen nach der Durchführung der inflammatorischen Stimulation (C4.4.4, C4.4.5) wurden diese zunächst zweimal mit je 1.000 µL kaltem PBS gewaschen. Danach wurden je 200 µL kalter Lyse-Puffer (Pierce[®] RIPA Buffer) hinzugegeben und die HUVEC bei 4 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm für eine Dauer von 20 Minuten lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden der Mikrottestplatte gelöst und das erhaltene Lysat zentrifugiert (18.000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein gekühltes Reagiergefäß pipettiert, kurz durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und bis zur Proteinquantifizierung bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zelllysate im Triplikate mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) erfolgte unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Kits (Pierce[®] BCA Protein Assay Kit) gemäß dem Protokoll für Mikrottestplatten. Alle Proben und Albumin-Standardlösungen zur Erstellung der Kalibriergerade wurden bis zum Beginn des Assays auf Eis gelagert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm mit dem Mikrottestplattenlesegerät (Multiskan Ascent) erfasst. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft 365 Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

4.5 Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Störung der Barrierefunktion des Endothels

4.5.1 Herstellung häufig benötigter Lösungen

Die FITC-Dextran-Stammlösungen (Molekulares Gewicht von 4 bzw. 70 kDa) zur Überprüfung der Barrierefunktion des Endothels von HUVEC wurden in einer Konzentration von 50 mg/mL in PBS hergestellt, sterilfiltriert und lichtgeschützt in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Taxifolin-Stammlösung mit einer Konzentration von 65 mM in DMSO wurde ebenfalls in Aliquots bei -20 °C gelagert und nach einmaligem Auftauen verworfen. Auch hier galt die Unbedenklichkeit des DMSO nach Verdünnung analog C4.4.1, alle weiteren verwendeten Lösungen sind dort gleichermaßen beschrieben.

4.5.2 Apikale Konzentration von FITC-Dextran im FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assay

Die Kultivierung der HUVEC wurde mit der Ausnahme der Kultivierungsdauer wie in C4.4.3 beschrieben durchgeführt. Da zunächst angenommen wurde, dass für die Ausbildung eines intakten Monolayers als Barriere im Gegensatz zur Ausbildung der Glycocalyx eine kürzere Kultivierung notwendig ist, wurden die Zellen insgesamt elf Tage bis zum Versuchsbeginn angezchtet. Hier wurden anfänglich apikal 500 μL und basolateral 1.500 μL 50 % Humanserum in Medium zu den Zellen gegeben. 24 Stunden später erfolgte die apikale Zugabe von TNF- α in Medium mit einer Endkonzentration von 100 ng/mL für eine Dauer von zwei Stunden. Dieser Zeitraum der inflammatorischen Stimulation basierte auf der Annahme, dass für eine Disruption des Monolayers eine vergleichsweise kurze Inkubation nötig war. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle, zu diesen wurde kein TNF- α gegeben, sondern ausschließlich Medium. Anschließend wurde die Humanserum-Medium-Mischung beider Kompartimente abpipettiert und apikal 350 μL bzw. basolateral 1.200 μL frisches Medium hinzugefügt. Die 4 kDa FITC-Dextran-Stammlösung wurde mit Medium auf diejenigen entsprechenden Konzentrationen mit Medium verdünnt, die nach der Zugabe zum apikalen Kompartiment von je 50 μL eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 250 $\mu\text{g/mL}$ ergaben (Abbildung 58).

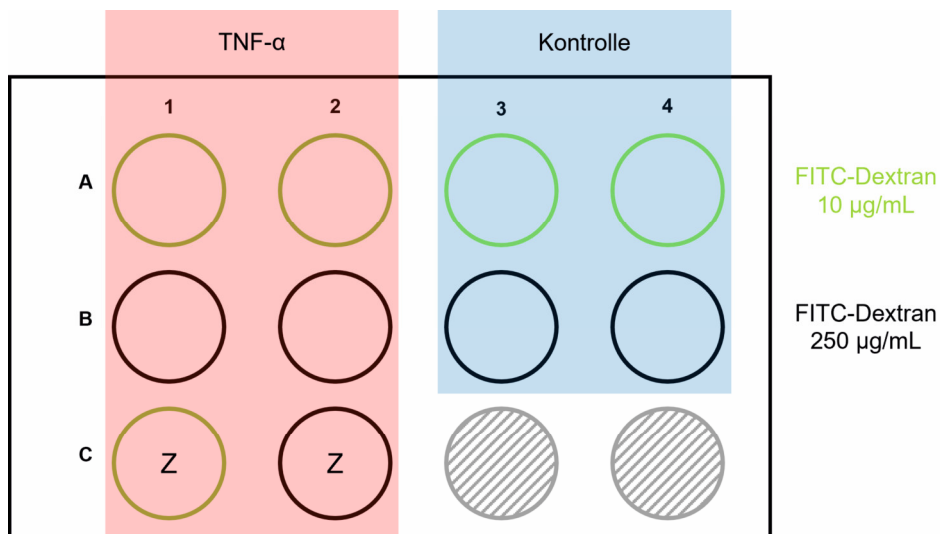


Abbildung 58: Schematischer Belegungsplan der 12-well-Mikrotestplatte für den Vorversuch zur Bestimmung der notwendigen apikalen FITC-Dextran-Konzentration. Z = ohne Zellen als Vergleich, schraffierte Wells wurden nicht genutzt.

Sodann wurden nach 0, 30, 60 und 90 Minuten basolateral jeweils eine Probe von 100 μL für die spätere Fluoreszenzmessung entnommen und auf eine schwarze 96-well-Mikrotestplatte überführt; das entnommene Volumen wurde sofort durch eine äquivalenten Menge Medium ersetzt. Für eine homogene Verteilung des FITC-Dextran wurde die Mikrotestplatte nach der Zugabe der FITC-Dextran-Lösung manuell und zwischen der Probennahme auf einem Schüttler bei etwa 100 rpm geschwenkt. Der Permeabilitäts-Versuch fand als Zweifachbestimmung bei Raumtemperatur und ausgeschalteter Raumbeleuchtung statt.

Außerdem wurde der Raum zusätzlich durch die Verwendung von Jalousien abgedunkelt. Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte am Tecan Infinite® M Plex u. a. bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm (Tabelle 16).

Tabelle 16: Einstellungsparameter am Tecan Infinite® M Plex für die Fluoreszenzbestimmung.

Parameter	Einstellung
Excitation	485 nm (bandwidth 9 nm)
Emission	535 nm (bandwidth 20 nm)
Mode	Fluorescence top reading
Gain	100
Number of flashes	25
Integration time	20 μ s
Lag time	0 μ s
Settle time	0 ms
Z-position	20.000 μ m

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft 365 Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

4.5.3 Finale Versuchsdurchführung unter optimierten Bedingungen

Die HUVEC wurden wie in C4.4.3 und C4.5.2 geschildert kultiviert, ebenso wurde der TEER bestimmt. Aus logistischen Gründen wurden jedoch die Zellen 37 Stunden mit der 50%igen Humanserum-Medium-Mischung kultiviert. Nach diesem Zeitraum erfolgte die TEER-Messung und danach die apikale Zugabe von je 20 μ L einer Mediumlösung von Ferulasäure, Ferulasäure-4-sulfat, Protocatechusäure, Protocatechusäure-3-sulfat oder Taxifolin. Dadurch ergab sich eine Endkonzentration der entsprechenden Substanz von 0,5 μ M, der die Zellen exponiert war. Als Kontrolle bzw. bei späterer alleiniger TNF- α -Inkubation ohne polyphenolische Prä-Inkubation wurde entsprechend Medium zu pipettiert. Die genannte Prä-Inkubation dauerte zwei Stunden, in der Folge wurde apikal TNF- α in Medium in einer Endkonzentration von 100 ng/mL bzw. Medium als Kontrolle für ebenfalls zwei Stunden hinzugefügt. Im Anschluss an eine erneute TEER-Messung wurde der Versuch mit einer apikalen FITC-Dextran-Konzentration (4 kDa) von 250 μ g/mL gemäß C4.5.2 durchgeführt (Abbildung 59). Alle Bedingungen wurden mindestens im Triplikat untersucht.

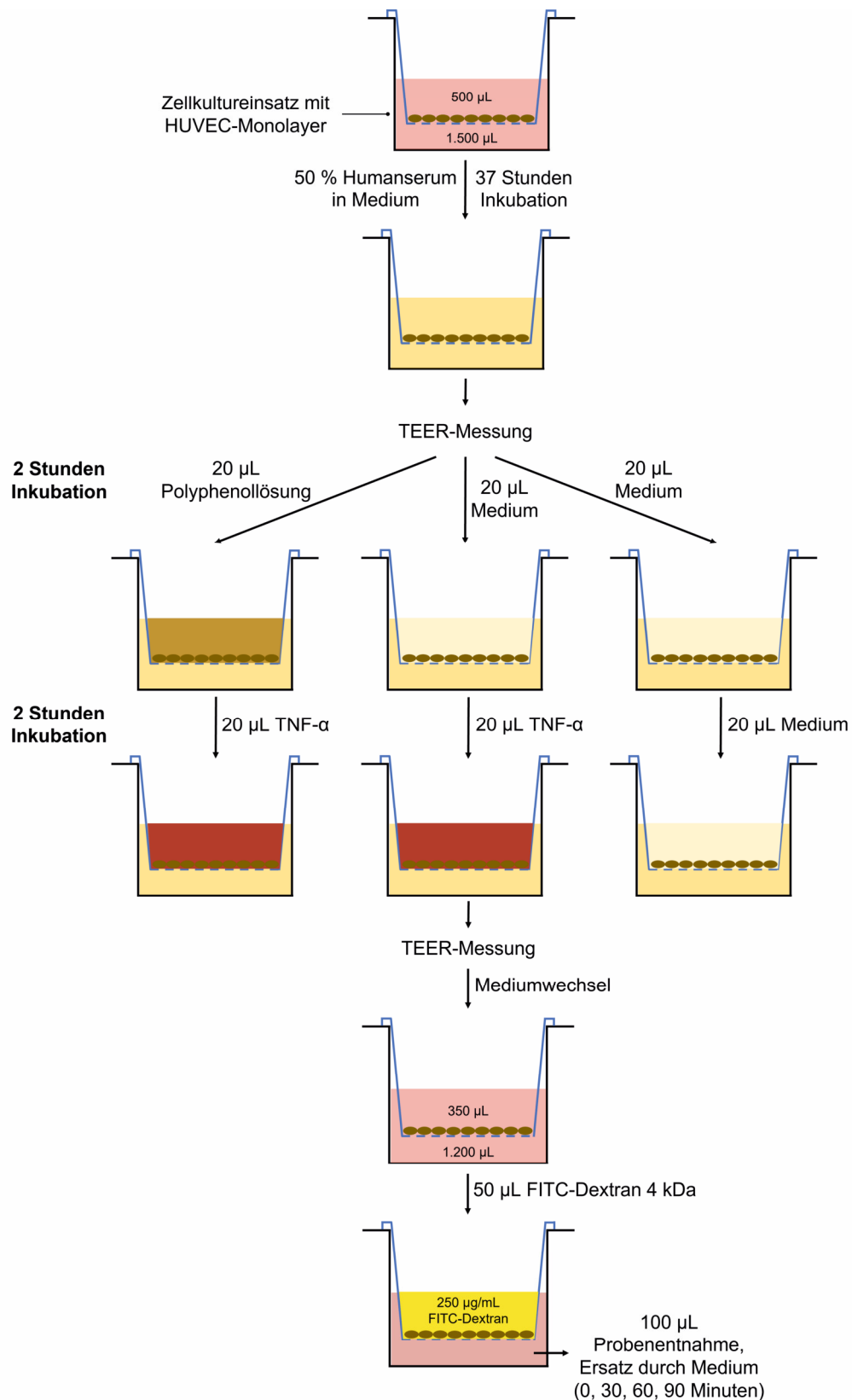


Abbildung 59: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Überprüfung des Einflusses einer zweistündigen Prä-Inkubation mit ausgewählten Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten auf die durch TNF- α induzierte Disruption eines HUVEC-Monolayers.

4.5.4 Optimierung der Kultivierungsdauer, der inflammatorische Stimulation und der Permeabilitätsmessung

Aufgrund heterogener Ergebnisse in C4.5.3 wurde eine Optimierung bezüglich verschiedener Parameter versucht. Dazu wurden 90.000 HUVEC pro Well in Zellkultureinsätzen für 24-well-Mikrotestplatten ausgesät und das Medium erstmals nach sechs bis 16 Stunden gewechselt. Die Erfassung des TEER erfolgte alle zwei Tage vor dem routinemäßigen Mediumwechsel, die Arbeitsvolumina betragen hierbei 200 μL apikal und 600 μL basolateral. Die Zellen wuchsen insgesamt 21 Tage, bevor 50 %-Humanserum in Medium für 20 Stunden appliziert wurde. Im Anschluss an die TEER-Messung wurden in das apikale Kompartiment zur Initiierung der inflammatorischen Stimulation 20 μL einer Lösung mit TNF- α in 50%igem Humanserum hinzugegeben. Dadurch resultierte eine Endkonzentration von TNF- α von 100 ng/mL. Unstimulierte Zellen fungierten als Kontrolle; zu diesen wurde ein äquivalentes Volumen 50 %-Humanserum apikal pipettiert. DMSO in einer apikalen Konzentration von 50 % diente als Noxe, welche mit großer Wahrscheinlichkeit eine Monolayer-Disruption hervorrufen sollte. Überprüft wurde eine Stimulationsdauer von zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden. Danach wurde eine TEER-Messung durchgeführt, der apikale Zellüberstand abgenommen und durch 150 μL 50% Humanserum in Medium ersetzt. Für die Permeabilitätsuntersuchung wurden zwei FITC-Dextran-Lösungen mit einem molekularen Gewicht von 4 und 70 kDa durch Verdünnung der entsprechenden Stammlösung mit 50 % Humanserum hergestellt. Nach der apikalen Ergänzung von 50 μL ergab sich dadurch eine FITC-Dextran-Konzentration von 250 $\mu\text{g/mL}$. Alle weiteren Schritte inklusive der Fluoreszenzmessung wurden wie in C4.5.2 beschrieben vorgenommen, allerdings wurde 50 %-Humanserum zum Ersetzen der basolateral gewonnenen Proben verwendet. Alle genannten Versuchsvariationen wurden in dreifacher Ausführung bestimmt.

4.6 Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

In Zellkulturmodellen ist es von großer Bedeutung, dass die gewählten Versuchsbedingungen bezüglich einer möglichen cytotoxischen Wirkung charakterisiert werden. Sterben nämlich zu viele Zellen im Laufe des Versuches, so kann dies die Ergebnisse dessen verfälschen. Laut DIN EN ISO 10993-5 liegt eine cytotoxische Wirkung *in vitro* vor, wenn die Zellviabilität im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrolle um mehr als 30 % reduziert ist [372]. Der durchgeführte Methylthiazolyphenyltetrazoliumbromid-Assay (MTT) beruht auf einer enzymatischen Reduktion des gelben MTT durch metabolisch aktive bzw. vitale Zellen, wodurch der lilablaue Formazan-Farbstoff (Abbildung 60) entsteht. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Reaktion ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert war. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass auch extramitochondriale Enzyme in Endo- oder Lysosomen an der Reduktion beteiligt sind [406].



Abbildung 60: Reduktion von MTT zu MTT-Formazan durch metabolisch aktive Zellen während des Zellviabilitäts-Assays.

Die Überprüfung der Zellviabilität erfolgte im Wesentlichen nach Kumar et al. [407]. Zur Durchführung des Assays wurden 20.000 Zellen pro Well in einer 96-well-Mikrotestplatte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Abnahme des Mediums und die Zugabe der zu untersuchenden Substanz im korrespondierenden Lösungsmittel mit einem Volumen von 100 μL ; als cytotoxische Kontrolle (Positivkontrolle) fungierte 50 % DMSO in Medium, als Negativkontrolle reines Medium. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10 μL der MTT-Lösung in jedes Well pipettiert und für etwa 24 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im CO_2 -Inkubator belassen. Der von vitalen Zellen in dieser Zeit gebildete lilablaue Farbstoff vom Formazan-Typ wurde durch die unsterile Zugabe von 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in 0,01 M Salzsäure mit anschließender vierstündiger Inkubation bei einer Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ solubilisiert. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Lagerung der sterilfiltrierten Lösung Methylthiazolylphenyltetrazoliumbromid (MTT) mit einer Konzentration von 5 mg/mL in PBS erfolgte in Aliquots bei -20 $^{\circ}\text{C}$. Die Berechnung der Zellviabilität erfolgte nach Formel (3).

$$\text{CV (\%)} = \frac{A_{600 \text{ nm}} (\text{N})}{A_{600 \text{ nm}} (\text{K})} * 100 \% \quad (3)$$

CV = Zellviabilität, $A_{600 \text{ nm}}$ = Absorption bei 600 nm, N = Untersuchte Noxe, K = Kontrolle.

Da alle Proben in sechsfacher Ausführung in zwei Versuchsreihen bestimmt wurden, wurde entsprechend der Mittelwert der Absorptionen bei 600 nm zur Berechnung der Zellviabilität verwendet. Als Negativkontrolle fungierte immer das korrespondierende Lösungsmittel der Noxe ohne diese selbst, z. B. Medium oder 50 %-Humanserum-Medium. 50 % DMSO in Medium wurde als (cytotoxische) Positivkontrolle untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft 365 Excel[®] (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und Prism Version 4 (Graph-Pad[®], San Diego, USA).

D Tabellarischer Anhang

1 Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro

1.1 Detektion und Charakterisierung von Lektinen in Pycnogenol

1.1.1 Bradford-Assay vor Ultrafiltration

Kalibriergerade (n = 3)

Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm} /A _{450 nm}	Probe (n = 3)	MW (µg/mL)	Rel. SD (%)
Blank	1,394	Fraktion 2	14,7	0,7
0,001	0,094	Fraktion 4	14,3	0,2
0,0025	0,101	Fraktion 10	12,4	0,4
0,005	0,214	Fraktion 15	12,6	0,3
0,01	0,497	Fraktion 20	13,1	1,0
0,015	0,845	Fraktion 25	13,3	1,0
0,02	1,286	Fraktion 30	14,4	2,3
0,025	1,675	Fraktion 40	14,7	1,3
0,05	3,435	Fraktion 50	14,4	1,4
y = 70,159x - 0,1087		Fraktion 60	14,4	1,0
R ² = 0,9955		Fraktion 70	14,9	0,4
		Fraktion 80	15,2	0,6
		Fraktion 90	14,7	1,0

1.1.2 Bradford-Assay nach Ultrafiltration

Kalibriergerade (n = 3)

Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm} /A _{450 nm}	Probe (n = 3)	MW (mg/mL)	Rel. SD (%)
Blank	1,420	Fraktion 38	0,10	0,3
0,001	0,095	Pycnogenol	0,10	1,9
0,0025	0,240	TBS	0	-
0,005	0,392	BSA	++	-
0,01	0,769			
0,015	1,171			
0,02	1,575			
0,025	1,899			
0,05	3,205			
y = 64,356x + 0,1345				
R ² = 0,9879				

++ = außerhalb Kalibrierbereich.

1.2 Untersuchung des Einflusses von Pycnogenol und ausgewählter Polyphenolen auf die Atmungskette in vitro

RLU = Relative light unit, Maß für die Licht-Intensität durch Lumineszenz. Bezug gemessene Intensität zu geräteinterner Referenz.

Daten korrespondierend zu Abbildung 18

Kalibriergerade (n = 3)

Konzentration (µM)	RLU
Blank	966
0,5	1768428
0,75	2630149
1	3222121
1,5	4919619
2	6266576
2,5	7347669
3	8886288
y = 2810303,93x + 489275,84	
R ² = 1,0	

RLU	Negativ-kontrolle	Pycnogenol	M1	Res-veratrol	Ferulasäure	Taxifolin	Zinkchlorid
1	3340069	3580772	3766481	4027544	3763738	3614727	2150800
2	3278839	3591959	3536012	3956303	3929053	3523771	2337968
3	3273925	3350164	3158551	3814619	3569103	3405007	2106230
4	3173383	3249279	3220378	3511518	3422594	3406048	1924598
5	3235869	3074643	3364056	3618549	3300705	3442948	1961635
6	3260417	3601585	3143758	3709987	3303499	3314051	2096246
ATP-Konzentration (µM)	Negativ-kontrolle	Pycnogenol	M1	Res-veratrol	Ferulasäure	Taxifolin	Zinkchlorid
1	1,01	1,10	1,17	1,26	1,16	1,11	0,59
2	0,99	1,10	1,08	1,23	1,22	1,08	0,66
3	0,99	1,02	0,95	1,18	1,10	1,04	0,58
4	0,95	1,02	0,98	1,08	1,04	1,04	0,51
5	0,98	0,92	1,02	1,11	1,00	1,05	0,52
6	0,99	1,11	0,94	1,15	1,00	1,00	0,57
MW	0,99	1,04	1,02	1,17	1,09	1,054	0,57
Rel. SD (%)	2	7	8	6	8		9

Daten korrespondierend zu Abbildung 19 (Inkubation mit Indometacin)

Kalibriergerade (n = 3)

Konzentration (µM)	RLU
Blank	1018
1	3211819
1,5	4144589
2	6141807
2,5	7387087
3	8797365
3,5	9989339
4	11037470
y = 2805211,89x + 299256,76	
R ² = 0,99	

1 Charakterisierung der Wirkung von Pycnogenol und ausgewählter Bestandteile in vitro

RLU	Negativkontrolle		Pycnogenol		M1		Ferulasäure		Taxifolin	
	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.
1	4412936	4344798	4509530	4355858	4395451	4632345	4136247	4321980	4259366	4506203
2	4426586	4438700	4380708	4517910	4190873	4488324	4194302	4211444	4131523	4350551
3	4280712	4518063	4373255	4401584	4266896	4468756	4165275	4285702	4213438	4499397
ATP-Konzentration (µM)	Negativkontrolle		Pycnogenol		M1		Ferulasäure		Taxifolin	
	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.	Kon.	Mit Ind.
1	1,47	1,44	1,50	1,45	1,46	1,54	1,37	1,43	1,41	1,50
2	1,47	1,48	1,45	1,50	1,39	1,49	1,39	1,39	1,37	1,44
3	1,42	1,50	1,45	1,46	1,41	1,49	1,38	1,42	1,39	1,50
MW	1,45	1,47	1,47	1,47	1,42	1,51	1,38	1,48	1,39	1,48
Rel. SD (%)	2	2	2	2	3	2	1	2	2	2

Kon = Kontrolle, Ind = Indometacin.

2 Nachweis bislang unbekannter Substanzen in Humanserum nach der Einnahme von Pycnogenol

LC-MS-Rohdaten der gefundenen Marker, Tabelle korrespondierend zu B3.3

Catechin-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	3,9	369,0280	369,0283	0,7	0,61	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	91
	D1-S3							
	D4-S4							
2	D1-S2	3,9	369,0280	369,0283	0,8	0,55	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	81
	D1-S3	3,9	369,0280	369,0274	-1,7	0,13	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	79
	D4-S4							
3	D1-S2	3,9	369,0280	369,0274	-1,7		C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	79
	D1-S3							
	D4-S4							
4	D1-S2	3,9	369,0280	369,0283	0,9	0,26		
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0275	-1,5	0,08	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	70
5	D1-S2	3,9	369,0280	369,0284	1,0	0,37	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	91
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0279	-0,2	0,10	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	89
6	D1-S2	3,9	369,0280	369,0286	1,5	0,24	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	87
	D1-S3							
	D4-S4							
7	D1-S2	3,9	369,0280	369,0290	2,6	0,28	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	84
	D1-S3							
	D4-S4							
8	D1-S2	3,9	369,0280	369,0280	0	0,39	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	82
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0275	-1,4	0,07	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	52
10	D1-S2	3,9	369,0280	369,0285	1,3	0,17	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	94
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0283	0,6	0,10	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	94
11	D1-S2	3,9	369,0280	369,0285	1,3	0,16	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	99
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0276	-1,3	0,07	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	67
14	D1-S2	3,9	369,0280	369,0279	-0,4	0,15	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	65
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0284	1,0	0,09	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	91
15	D1-S2	3,9	369,0280	369,0280	-0,1	0,16	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	76
	D1-S3							
	D4-S4	3,9	369,0280	369,0288	2,2	0,05	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	95

Dihydroxymethoxybenzol-Sulfat								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
2	D1-S2							
	D1-S3	3,8	218,9963	218,9971	3,7	0,94	C ₇ H ₈ O ₆ S	88
	D4-S4							
12	D1-S2							
	D1-S3	3,9	218,9963	218,9971	3,3	1,30	C ₇ H ₈ O ₆ S	88
	D4-S4							

Ferulasäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
2	D1-S1	4,1	273,0069	273,0073	1,4	0,08	Nf	
	D1-S2	4,1	273,0069	273,0058	-3,9	0,41	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	57
	D1-S3							
	D4-S4							
11	D1-S1	4,2	273,0069	273,0076	2,5	0,04	Nf	
	D1-S2	4,2	273,0069	273,0064	-1,7	0,13	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							
12	D1-S1	4,2	273,0069	273,0079	3,6	0,04	Nf	
	D1-S2	4,2	273,0069	273,0068	-0,5	0,44	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							

Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
1	D1-S2							
	D1-S3	3,5	305,0331	305,0325	-1,9	0,05	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	76
	D4-S4	3,5	305,0331	305,0336	1,6	0,52	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	85
12	D1-S2							
	D1-S3	3,5	305,0331	305,0337	2,0	0,34	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	95
	D4-S4							
15	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	3,5	305,0331	305,0337	1,8	0,46	C ₁₁ H ₁₄ O ₈ S	91

Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
5	D1-S2							
	D1-S3	4,9	273,0433	273,0435	0,7	0,11	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S	92
	D4-S4	4,9	273,0433	273,0435	0,2	0,19	C ₁₁ H ₁₄ O ₆ S	77

Kaffeensäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	4,1	258,9913	258,9915	1,0	0,65	C ₉ H ₈ O ₇ S	89
	D1-S3							
	D4-S4							
8	D1-S2	4,1	258,9913	258,9919	2,4	0,36	C ₉ H ₈ O ₇ S	92
	D1-S3							
	D4-S4							
10	D1-S2	4,1	258,9913	258,9918	2,0	0,34	C ₉ H ₈ O ₇ S	94
	D1-S3							
	D4-S4	4,1	258,9913	258,9915	0,9	0,16	C ₉ H ₈ O ₇ S	81
12	D1-S2	4,1	258,9913	258,9926	5,1	0,40	C ₉ H ₈ O ₇ S	96
	D1-S3							
	D4-S4							
14	D1-S2	4,1	258,9913	258,9917	1,7	0,33	C ₉ H ₈ O ₇ S	84
	D1-S3							
	D4-S4							

Protocatechusäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	3,5	232,9756	232,9762	2,6	0,41	C ₇ H ₆ O ₇ S	91
	D1-S3							
	D4-S4							
2	D1-S2	3,5	232,9756	232,9762	2,6	0,33	C ₇ H ₆ O ₇ S	94
	D1-S3							
	D4-S4							
4	D1-S2	3,5	232,9756	232,9764	3,3	0,24	C ₇ H ₆ O ₇ S	92
	D1-S3							
	D4-S4							
5	D1-S2	3,5	232,9756	232,9763	3,3	0,37	C ₇ H ₆ O ₇ S	85
	D1-S3							
	D4-S4	3,5	232,9756	232,9762	2,8	0,17	C ₇ H ₆ O ₇ S	97
7	D1-S2	3,5	232,9756	232,9761	2,1	0,31	C ₇ H ₆ O ₇ S	96
	D1-S3							
	D4-S4							
8	D1-S2	3,5	232,9756	232,9762	2,4	0,27	C ₇ H ₆ O ₇ S	92
	D1-S3							
	D4-S4							
12	D1-S2	3,5	232,9756	232,9759	1,1	0,32	C ₇ H ₆ O ₇ S	78
	D1-S3							
	D4-S4							
14	D1-S2	3,5	232,9756	232,9759	1,4	0,33	C ₇ H ₆ O ₇ S	84
	D1-S3							
	D4-S4	3,5	232,9756	232,9756	0	0,08	C ₇ H ₆ O ₇ S	65
15	D1-S2	3,5	232,9756	232,9757	0,5	0,21	C ₇ H ₆ O ₇ S	66
	D1-S3							
	D4-S4							

Taxifolin-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	4,8	383,0073	383,0072	-0,2	0,33	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	82
	D1-S3							
	D4-S4							
2	D1-S2	4,8	383,0073	383,0074	0,3	0,40	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	81
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0066	-1,8	0,10	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	78
4	D1-S2	4,8	383,0073	383,0075	0,6	0,2	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0070	-0,8	0,06	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	85
5	D1-S2	4,8	383,0073	383,0076	0,8	0,24	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	87
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0069	-1,0	0,07	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	83
6	D1-S2	4,8	383,0073	383,0069	-1,2	0,27	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	70
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0070	-0,8	0,05	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	56
7	D1-S2	4,8	383,0073	383,0075	0,6	0,22	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	77
	D1-S3							
	D4-S4							
8	D1-S2	4,8	383,0073	383,0069	-1,0	0,27	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	69
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0078	-1,3	0,01	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	99
10	D1-S2	4,8	383,0073	383,0083	2,7	0,17	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	87
	D1-S3	4,8	383,0073	383,0076	0,70	0,03	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	69
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0073	0,1	0,10	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	91
11	D1-S2	4,8	383,0073	383,0076	0,8	0,14	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	77
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0071	-0,4	0,07	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	88
12	D1-S2	4,8	383,0073	383,0076	0,9	0,39	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	90
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0081	2,2	0,02	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	95
13	D1-S2	4,8	383,0073	383,0076	0,9	0,39	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	90
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0081	2,7	0,02	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	95
14	D1-S2	4,8	383,0073	383,0073	0,1	0,23	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	91
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0068	-1,4	0,10	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	76
15	D1-S2	4,8	383,0073	383,0080	2,0	0,24	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	91
	D1-S3							
	D4-S4	4,8	383,0073	383,0094	5,5	0,03	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	88

Trihydroxybenzol-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
3	D1-S2	3,7	204,9807	204,9806	-0,3	2,71	Nf	
	D1-S3	3,7	204,9807	204,9807	0,2	2,55	Nf	
	D4-S4	3,7	204,9807	204,9810	1,3	8,42	C ₆ H ₆ O ₆ S	89
8	D1-S2							
	D1-S3	3,7	204,9807	204,9809	1,2	5,02	C ₆ H ₆ O ₆ S	87
	D4-S4							
14	D1-S2							
	D1-S3	3,7	204,9807	204,9810	1,3	3,02	C ₆ H ₆ O ₆ S	90
	D4-S4	3,7	204,9807	204,9807	0,1	1,20	Nf	

Vanillinsäure-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	4,6	246,9913	246,9916	1,5	0,21	C ₈ H ₈ O ₇ S	83
	D1-S3							
	D4-S4	4,6	246,9913	246,9915	1,1	0,14	C ₈ H ₈ O ₇ S	88

Vanillin-Sulfat								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
9	D1-S2	3,8	230,9963	230,9970	2,7	0,28	C ₈ H ₈ O ₆ S	98
	D1-S3	3,8	230,9963	230,9967	1,6	0,19	Nf	
	D4-S4	3,8	230,9963	230,9972	3,7	0,82	C ₈ H ₈ O ₆ S	79
12	D1-S2	3,8	230,9963	230,9966	1,1	0,27	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							

UN1								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
9	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	2,9	161,9877	161,9865	-6,9	0,37	Nf	
14	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	2,9	161,9875	161,9866	-5,1	3,8	Nf	

UN2								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
4	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	4,1	175,9605	175,9598	-4,0	0,05	Nf	
15	D1-S2							
	D1-S3	4,0	175,9604	175,9596	-4,6	0,74	Nf	
	D4-S4							

UN3								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
3	D1-S2	2,0	177,0925	177,0917	-4,3	0,03	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							
6	D1-S2	1,9	177,0929	177,0920	-5,2	0,03	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							

UN4								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
4	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	1,8	182,9897	182,9885	-6,6	0,30	Nf	
15	D1-S2							
	D1-S3	1,8	182,9897	182,9886	-6,0	0,22	Nf	
	D4-S4							

UN5								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
5	D1-S2							
	D1-S3	4,7	196,0083	196,0074	-4,8	0,31	Nf	
	D4-S4	4,7	196,0083	196,0076	-4,0	0,04	Nf	
10	D1-S2	4,7	196,0078	196,0073	-2,5	0,10	Nf	
	D1-S3	4,7	196,0078	196,0071	-3,5	0,19	Nf	
	D4-S4	4,7	196,0078	196,0084	2,8	0,04	Nf	

UN6								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
8	D1-S2	3,7	205,9854	205,9841	-6,0	0,03	Nf	
	D1-S3	3,7	205,9854	205,9842	-5,4	0,32	Nf	
	D4-S4	3,7	205,9854	205,9834	-9,5	0,03	Nf	
14	D1-S2							
	D1-S3	3,7	205,9851	205,9843	-4,2	0,22	Nf	
	D4-S4	3,7	205,9851	205,9843	-4,1	0,08	Nf	

UN7								
Pro-band*in	Zeit-punkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summen-formel	Score (%)
11	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	4,3	221,0790	221,0792	0,9	0,31	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	69
15	D1-S2							
	D1-S3	4,2	221,0790	221,0793	1,4	1,55	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	87
	D4-S4							

UN8								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
2	D1-S2	3,7	233,0120	233,0124	1,7	0,19	C ₇ H ₈ O ₄ S	90
	D1-S3	3,7	233,0120	233,0114	-2,3	0,14	C ₇ H ₈ O ₄ S	61
	D4-S4	3,7	233,0120	233,0123	1,4	0,13	C ₇ H ₈ O ₄ S	93
3	D1-S2	3,7	233,0120	233,0123	1,4	0,49	C ₇ H ₈ O ₄ S	71
	D1-S3							
	D4-S4	3,7	233,0120	233,0124	1,8	0,51	C ₇ H ₈ O ₄ S	78
5	D1-S2	3,7	223,0120	233,0121	0,6	0,27	C ₇ H ₈ O ₄ S	58
	D1-S3	3,7	223,0120	233,0124	2,0	0,25	C ₇ H ₈ O ₄ S	95
	D4-S4	3,7	223,0120	233,0119	-0,4	0,26	C ₇ H ₈ O ₄ S	71
12	D1-S2	3,7	223,0120	233,0117	-1,2	0,09	C ₇ H ₈ O ₄ S	64
	D1-S3	3,7	223,0120	233,0124	1,9	0,26	Nf	
	D4-S4	3,7	223,0120	233,0123	1,4	0,05	C ₇ H ₈ O ₄ S	94
14	D1-S2	3,7	223,0120	233,0120	0,2	0,08	C ₇ H ₈ O ₄ S	85
	D1-S3	3,7	223,0120	233,0126	2,6	0,16	C ₇ H ₈ O ₄ S	98
	D4-S4	3,7	223,0120	233,0126	2,6	0,09	C ₇ H ₈ O ₄ S	99

UN9								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	4,6	246,0084	246,0074	-4,0	0,61	Nf	
	D1-S3	4,6	246,0084	246,0077	-2,9	0,05	Nf	
	D4-S4							
2	D1-S2	4,6	246,0082	246,0073	-3,6	0,22	Nf	
	D1-S3	4,6	246,0082	246,0071	-4,3	0,13	Nf	
	D4-S4							
3	D1-S2	4,6	246,0081	246,0079	-1,0	0,22	Nf	
	D1-S3	4,6	246,0081	246,0073	-3,5	0,04	Nf	
	D4-S4							
5	D1-S2	4,6	246,0086	246,0079	-3,0	0,52	Nf	
	D1-S3	4,5	246,0086	246,0074	-4,7	0,20	Nf	
	D4-S4							
7	D1-S2	4,5	246,0085	246,0078	-3,0	0,28	Nf	
	D1-S3	4,5	246,0085	246,0090	2,1	0,02	Nf	
	D4-S4							
8	D1-S2	4,5	246,0086	246,0077	-3,9	0,89	Nf	
	D1-S3	4,5	246,0086	246,0078	-3,5	0,50	Nf	
	D4-S4							

UN10								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
4	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	1,9	255,2324	255,2321	-1,3	0,21	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	77
6	D1-S2	2,0	255,2324	255,2324	0	0,02	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	86
	D1-S3							
	D4-S4							
11	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	1,9	255,2324	255,2323	-0,5	0,08	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	82

UN11								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
5	D1-S2	3,0	269,1031	269,1027	-1,6	0,13	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							
10	D1-S2	3,1	269,1045	269,1032	-4,8	0,12	Nf	
	D1-S3	3,1	269,1045	269,1021	-9,1	0,03	Nf	
	D4-S4	3,1	269,1045	269,1033	-4,6	0,07	Nf	
12	D1-S2	3,1	269,1035	269,1026	-3,2	0,14	Nf	
	D1-S3	3,1	269,1035	269,1029	-2,1	0,06	Nf	
	D4-S4	3,1	269,1035	269,1017	-6,6	0,04	Nf	
15	D1-S2	3,1	269,1042	269,1031	-4,1	0,12	Nf	
	D1-S3							
	D4-S4							

UN12								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
2	D1-S2	2,3	309,0345	309,0340	-1,4	0,03	Nf	
	D1-S3	2,3	309,0345	309,0334	-3,4	0,22	Nf	
	D4-S4							
7	D1-S2	2,3	309,0348	309,0342	-1,9	0,03	Nf	
	D1-S3	2,3	309,0348	309,0335	-4,2	0,19	Nf	
	D4-S4							
	D4-S4							

UN13								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
2	D1-S2							
	D1-S3	2,8	317,9905	317,9900	-1,4	0,60	Nf	
	D4-S4							
7	D1-S2							
	D1-S3	2,8	317,9908	317,9900	-2,6	0,77	Nf	
	D4-S4							

UN14								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
2	D1-S2							
	D1-S3	2,8	368,9875	368,9867	-2,4	0,24	Nf	
	D4-S4							
7	D1-S2							
	D1-S3	2,8	368,9880	369,9869	-3,0	0,32	Nf	
	D4-S4							

UP1								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	2,0	211,1306	211,1308	0,9		Nf	
	D1-S3	2,0	211,1306	211,1304	-0,7		Nf	
	D4-S4	2,0	211,1306	211,1306	0,1		Nf	
12	D1-S1	2,0	211,1304	211,1310	2,8		Nf	
	D1-S2							
	D1-S3	2,0	211,1304	211,1306	0,7		Nf	
	D4-S4	2,0	211,1304	211,1304	-0,4		Nf	

UP2								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
2	D1-S2							
	D1-S3	2,1	227,1761	227,1756	-2,3		Nf	
	D4-S4							
7	D1-S2							
	D1-S3	2,1	227,1761	227,1755	-2,5		Nf	
	D4-S4							

UP3								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
4	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	1,4	254,9963	254,9946	-6,8		C ₁₀ H ₆ O ₆ S	69
10	D1-S2							
	D1-S3	1,5	254,9963	254,9946	-6,9		C ₁₀ H ₆ O ₆ S	68
	D4-S4							

UP4								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
1	D1-S2	3,0	293,1000	293,0998	-0,8		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1000	0,1		C ₁₉ H ₁₆ OS	87
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0997	-1,1		C ₁₉ H ₁₆ OS	87
2	D1-S2	3,0	293,1000	293,0996	-1,3		C ₁₉ H ₁₆ OS	94
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0999	-0,5		C ₁₉ H ₁₆ OS	82
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0998	-0,7		Nf	
3	D1-S2	3,0	293,1000	293,0998	-0,9		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1002	0,8		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0998	-0,9		Nf	
4	D1-S2	3,0	293,1000	293,1000	-0,3		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1000	-0,3		C ₁₉ H ₁₆ OS	74
	D4-S4	3,0	293,1000	293,1002	0,5		Nf	
5	D1-S2	3,0	293,1000	293,0998	-0,6		C ₁₉ H ₁₆ OS	88
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1000	0		C ₁₉ H ₁₆ OS	87
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0999	-0,4		C ₁₉ H ₁₆ OS	90
6	D1-S2	3,0	293,1000	293,1000	-0,1		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1000	0		C ₁₉ H ₁₆ OS	85
	D4-S4	3,0	293,1000	293,1001	0,4		C ₁₉ H ₁₆ OS	83
7	D1-S2	3,0	293,1000	293,0999	-0,5		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0996	-1,5		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0999	-0,3		Nf	
8	D1-S2	3,0	293,1000	293,0998	-0,7		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0998	-0,7		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0996	-1,5		C ₁₉ H ₁₆ OS	97
9	D1-S2	3,0	293,1000	293,0999	-0,4		Nf	87
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0999	-0,5		C ₁₉ H ₁₆ OS	78
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0999	-0,3		C ₁₉ H ₁₆ OS	
10	D1-S2	3,0	293,1000	293,0997	-1,0		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0999	-0,2		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0997	-1,0		Nf	
12	D1-S2	3,0	293,1000	293,0997	-1,0		C ₁₉ H ₁₆ OS	94
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0998	-0,6		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0997	-1,1		Nf	
13	D1-S2	3,0	293,1000	293,0998	-0,8		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0998	-0,6		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0998	-0,6		C ₁₉ H ₁₆ OS	74
14	D1-S2	3,0	293,1000	293,1001	0,5		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,0999	-0,4		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,0998	-0,7		C ₁₉ H ₁₆ OS	86
15	D1-S2	3,0	293,1000	293,1000	-0,2		Nf	
	D1-S3	3,0	293,1000	293,1002	0,7		Nf	
	D4-S4	3,0	293,1000	293,1000	0,1		Nf	

UP5								
Pro-band*in	Zeitpunkt	T _{ret} (min)	Precursor	m/z	Error (ppm)	A _{Analyt} /A _{ISTD}	Summenformel	Score (%)
3	D1-S2	6,4	620,4376	620,4374	-0,5		Nf	
	D1-S3							
	D4-S4	6,4	620,4376	620,4372	-0,9		Nf	
12	D1-S2							
	D1-S3							
	D4-S4	6,4	620,4372	620,4374	0,2		Nf	

3 Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum

3.1 Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Endothelintegrität

3.1.1 Vorversuche

3.1.1.1 Vorversuch Zellzahl und Kulturzeit

Alle Daten korrespondierend zu C4.4.2

Heparansulfat-ELISA

Kalibrierpunkte		Variablen Kalibriergleichung				
Konzentration (pg/mL)	A _{450 nm}	a	b	c	d	R ²
Blank	0,068	0,095	1,12	772,06	2944,33	1,0
15,63	0,095					
31,25	0,126					
62,5	0,184					
125	0,27					
250	0,441					
500	0,859					
1.000	1,773					

Probe	Konzentration (pg/mL)	Probe	Konzentration (pg/mL)	Probe	Konzentration (pg/mL)
TNF-α 100 ng/mL		LPS 1.000 ng/mL		Negativkontrolle	
8 h		8 h		8 h	
10 % Human-serum	Nd	10 % Human-serum	Nd	10 % Human-serum	Nd
50 % Human-serum	Nd	50 % Human-serum	Nd	50 % Human-serum	Nd
24 h		24 h		24 h	
10 % Human-serum	Nd	10 % Human-serum	Nd	10 % Human-serum	Nd
50 % Human-serum	Nd	50 % Human-serum	Nd	50 % Human-serum	Nd

Nd = nicht detektiert.

3.1.1.2 Vorversuch Humanserum-Konzentration und Auswahl inflammatorischer Stimuli

Daten korrespondierend zu Abbildung 37

Heparansulfat-ELISA

Kalibrierpunkte		Variablen Kalibriergleichung				
Konzentration (pg/mL)	A _{450 nm}	a	b	c	d	R ²
Blank	0,057	0,078	1,23	449,73	2436,89	0,999
15,63	0,073					
31,25	0,089					
62,5	0,131					
125	0,186					
250	0,336					
500	0,617					
1.000	1,398					

100 ng/mL TNF-α 24 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	Nd		24,1		0,092	25,3	29,8	1,27	
2	Nd		26,8		0,186	47,6	12,6	1,97	
								MW	1,62
								Rel. SD (%)	31
1.000 ng/mL LPS 24 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	Nd		39,3		Nd		37,5		
2	-				-				
50 µM H ₂ O ₂ 8 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	0,086	16,2	38,2	0,21	0,079	3,5	38,2	0,14	
2	-				-				
50 µM H ₂ O ₂ 24 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	Nd		50,2		0,094	28,2	36,8	0,38	
2	Nd		47,6		0,165	19,7	44,3	0,59	
								MW	0,49
								Rel. SD (%)	31
Unstimuliert 8 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	Nd		38,2		0,185	51,7	38,2	1,18	
2	-				-				
Unstimuliert 24 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysats (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	
	10 % Humanserum				50 % Humanserum				
1	Nd		49,8		0,161	12,9	38,9	0,26	
2	Nd		36,2		0,165	20,7	38,0	0,57	
								MW	0,41
								Rel. SD (%)	53

1, 2 = Anzahl Versuche, Nd = nicht detektiert, HeS = Heparansulfat.

BCA-Assay

Kalibriergerade TNF-α (n = 3)		Kalibriergerade LPS (n = 3)		Kalibriergerade H ₂ O ₂ , Unstimuliert (n = 3)	
Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm}	Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm}	Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm}
Blank	0,109	Blank	0,106	Blank	0,104
0,02	0,010	0,02	0,013	0,02	-
0,025	0,011	0,025	0,016	0,025	0,011
0,125	0,064	0,125	0,069	0,125	0,062
0,5	0,224	0,5	0,230	0,5	0,219
0,75	0,332	0,75	0,327	0,75	0,310
1	0,423	1	0,421	1	0,398
1,5	0,636	1,5	0,624	1,5	0,609
2	0,835	2	0,844	2	0,772
y = 0,4167x + 0,0085		y = 0,4144x + 0,0011		y = 0,3859x + 0,0149	
R ² = 0,9995		R ² = 0,9994		R ² = 0,9983	

Proteingehalt der Zelllysate

Probe	Humanserum-Konzentration	MW (mg/mL)		Rel. SD (%)
		1	2	
TNF- α	10 %	1	0,120	2,2
		2	0,134	2,3
	50 %	1	0,149	1,0
		2	0,063	1,7
LPS	10 %	1	0,196	0,5
	50 %	1	0,188	0,8
H ₂ O ₂ 8 h*	10 %	1	0,191	19
	50 %	1	0,191	19
H ₂ O ₂ 24 h	10 %	1	0,251	1,0
		2	0,238	0,3
	50 %	1	0,184	0,5
		2	0,221	1,9
Unstimuliert 8 h*	10 %	1	0,191	19
	50 %	1	0,191	19
Unstimuliert 24 h	10 %	1	0,249	1,4
		2	0,181	2,7
	50 %	1	0,195	0,6
		2	0,190	3,3

1, 2 = Anzahl Versuche, *Proben standen nicht zur Verfügung, daher Verwendung Mittelwert aller Proben.

TEER-Werte ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)

TNF- α	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	44	55	36	33	42	47
2	72	53	32	36	43	33
LPS	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	15	38	40	35	34	47
2	32	34	33	38	39	48
H ₂ O ₂	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	17	23	38	44	41	43
2	21	31	37	38	45	36
Unstimuliert	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	41	37	47	46	39	44
2	47	30	35	40	45	44
H ₂ O ₂ 8 h	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	28	40	49	46	33	31
2	38	23	39	38	48	36
Unstimuliert 8 h	Tag 1		Vor Stimulation		Nach Stimulation	
	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS	10 % HS	50 % HS
1	41	38	35	38	43	42
2	30	32	58	48	26	35

1, 2 = Anzahl Versuche, HS = Humanserum.

3.1.1.3 Vorversuch Verkürzung Dauer der inflammatorischen Stimulation

Daten korrespondierend zu Abbildung 38

Heparansulfat-ELISA

Kalibrierpunkte		Variablen Kalibriergleichung				
Konzentration (pg/mL)	A _{450 nm}	a	b	c	d	R ²
Blank	0,076	0,099	1,18	220462	696,47	0,999
15,63	0,082					
31,25	0,156					
62,5	0,135					
125	0,202					
250	0,343					
500	0,635					
1.000	1,319					

6 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein
1	0,107	26,9	78,5	0,24	0,107	11,4	64,8	0,12
2	0,113	25,5	85,0	0,21	0,115	25,5	74,1	0,24
			MW	0,23			MW	0,18
			Rel. SD (%)	9			Rel. SD (%)	47
24 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein
1	0,105	14,4	64,0	0,16	0,116	17,3	66,4	0,18
2	0,115	28,2	60,3	0,33	0,125	6,6	70,9	0,07
			MW	0,25			MW	0,13
			Rel. SD (%)	49			Rel. SD (%)	62
2 h	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Proteingehalt Zelllysate (µg)	HeS (pg) pro µg Protein
1	0,106	13,0	60,4	0,15	0,101	18,7	65,8	0,20
2	0,117	25,5	65,0	0,28	0,120	14,4	66,1	0,15
			MW	0,22			MW	0,18
			Rel. SD (%)	43			Rel. SD (%)	20

1, 2 = Anzahl Versuche,
HeS = Heparansulfat.

BCA-Assay

Kalibriergerade (n = 3)		Proteinkonzentration der Zelllysate				
Konzentration (mg/mL)	MW A _{600 nm}	Probe	Humanserum-Konzentration	MW (mg/mL)	Rel. SD (%)	
Blank	0,110	TNF-α	6 h	1	0,392	1,1
0,025	0,012			2	0,425	0,3
0,125	0,064		24 h	1	0,320	1,0
0,25	0,122			2	0,301	1,1
0,5	0,235	H ₂ O ₂	2 h	1	0,302	0,8
0,75	0,342			2	0,325	1,2
1	0,426	Unstimuliert	2 h	1	0,329	38,
1,5	0,621			2	0,331	4,5
2	0,867		6 h	1	0,324	0,8
				2	0,371	1,5
			24 h	1	0,332	0,7
				2	0,354	1,5

y = 0,421x + 0,0125
R² = 0,998
1, 2 = Anzahl Versuche.

3.1.2 Versuchsdurchführung

Daten korrespondierend zu Abbildung 39

Heparansulfat-ELISA (Kalibriergerade siehe D3.1.1.3)

	TNF- α			Unstimuliert				
	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Protein-gehalt Zelllysate (μ g)	HeS (pg) pro μ g Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Protein-gehalt Zelllysate (μ g)	HeS (pg) pro μ g Protein
1	0,101	32,0	74,2	0,30	0,109	38,3	70,5	0,38
2	0,102	4,9	72,1	0,05	0,115	14,4	75,6	0,13
			MW	0,18			MW	0,26
			Rel. SD (%)	100			Rel. SD (%)	68
	0,1 μ M			0,5 μ M				
	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Protein-gehalt Zelllysate (μ g)	HeS (pg) pro μ g Protein	A _{450 nm}	Konzentration (pg/mL)	Protein-gehalt Zelllysate (μ g)	HeS (pg) pro μ g Protein
FS	0,125	22,9	66,9	0,24	0,108	29,5	56,0	0,37
FS-Sulf	0,102	8,3	54,1	0,11	0,121	40,8	56,3	0,51
PS	0,127	33,3	64,4	0,36	0,103	6,6	68,5	0,07
PS-Sulf	0,118	15,9	55,8	0,20	0,107	38,3	55,5	0,48

1, 2 = Anzahl Versuche, FS = Ferulasäure, PS = Protocatechusäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat, HeS = Heparansulfat.

BCA-Assay (Kalibriergerade siehe D3.1.1.3)

Proteinkonzentration der Zelllysate

Probe	Konz. (mg/mL)	Rel. SD (%)	Probe	MW (mg/mL)	Rel. SD (%)
Ferulasäure 0,1 μ M	0,335	1,9	TNF- α	1	0,371
Ferulasäure 0,5 μ M	0,280	0,4		2	0,361
Ferulasäure-Sulfat 0,1 μ M	0,270	1,1	Unstimuliert	1	0,353
Ferulasäure-Sulfat 0,5 μ M	0,281	0,5		2	0,378
Protocatechusäure 0,1 μ M	0,322	3,1	1, 2 = Anzahl Versuche, jeweils n = 3.		
Protocatechusäure 0,5 μ M	0,342	2,3			
Protocatechusäure-Sulfat 0,1 μ M	0,279	0,6			
Protocatechusäure-Sulfat 0,5 μ M	0,278	0,8			

3.1.3 Zellviabilität mittels MTT-Assay

Tabelle korrespondierend zu Abbildung 40

2 h (%)	0 % Human-serum	10 % Human-serum	50 % Human-serum	8 h (%)	0 % Human-serum	10 % Human-serum	50 % Human-serum
1	94,3	128,2	146,1	1	88,2	99,5	131,5
2	94,1	129,9	148,9	2	102,1	104,1	132,1
3	93,0	125,0	147,7	3	102,2	99,9	130,8
4	100,4	112,1	144,5	4	103,9	109,8	137,9
5	116,2	117,3	145,1	5	102,6	112,5	137,6
6	101,9	102,0	146,1	6	100,9	110,0	137,4
MW	100,0	119,1	146,4	MW	100,0	106,0	134,6
Rel. SD	8,8	10,8	1,7	Rel. SD	5,8	5,6	3,4
24 h (%)	0 % Human-serum	10 % Human-serum	50 % Human-serum				
1	105,8	115,4	142,8				
2	98,8	117,6	141,8				
3	99,0	117,5	139,7				
4	97,7	110,7	126,7				
5	99,7	111,9	130,5				
6	98,9	112,4	131,3				
MW	100,0	114,2	135,5				
Rel. SD	2,9	3,0	6,8				

Tabelle korrespondierend zu Abbildung 41

TNF- α 8 h (%)	Negativ-Kontrolle	10 ng/mL	100 ng/mL	Negativ-Kontrolle	10 ng/mL	100 ng/mL
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	99,8	93,1	96,1	99,7	88,6	89,4
2	100,3	91,6	93,0	101,1	88,3	89,8
3	98,7	95,3	96,9	101,2	90,9	88,2
4	101,5	98,3	93,1	97,9	88,5	91,4
5	103,6	93,0	96,0	103,5	88,4	91,0
6	96,1	93,2	96,0	96,6	89,5	88,7
MW	100,0	94,1	95,2	100,0	89,0	89,7
Rel. SD	2,5	2,4	1,7	2,5	1,0	1,3
TNF- α 24 h (%)	Negativ-Kontrolle	10 ng/mL	100 ng/mL	Negativ-Kontrolle	10 ng/mL	100 ng/mL
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	96,8	95,4	93,9	103,1	88,5	89,5
2	96,2	87,9	96,0	99,7	81,9	82,7
3	96,5	89,3	89,3	96,0	86,1	83,8
4	99,2	91,3	89,4	101,5	82,8	90,3
5	99,4	87,6	83,4	101,7	85,1	88,4
6	111,9	90,3	88,5	98,0	86,5	81,7
MW	100,0	90,3	90,1	100,0	85,1	86,1
Rel. SD	6,0	2,9	4,4	2,7	2,4	3,8
LPS 8 h (%)	Negativ-Kontrolle	100 ng/mL	1.000 ng/mL	Negativ-Kontrolle	100 ng/mL	1.000 ng/mL
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	104,2	97,0	101,3	97,7	93,0	95,0
2	97,5	97,2	98,0	101,2	92,1	96,6
3	96,6	88,9	97,4	100,9	89,0	95,1
4	101,7	90,6	94,4	98,0	87,7	95,1
5	99,7	91,3	93,3	101,1	93,1	94,3
6	100,3	95,6	96,8	101,1	96,5	95,6
MW	100,0	93,4	96,9	100,0	91,9	95,3
Rel. SD	2,8	3,6	2,8	1,7	3,1	0,8
LPS 24 h (%)	Negativ-Kontrolle	100 ng/mL	1.000 ng/mL	Negativ-Kontrolle	100 ng/mL	1.000 ng/mL
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	98,6	97,7	107,2	99,7	94,5	101,5
2	97,5	96,2	98,9	101,0	101,9	99,9
3	101,0	100,4	100,1	98,5	99,1	102,2
4	100,2	102,0	98,5	102,5	101,8	101,5
5	102,7	101,7	96,5	97,5	98,0	105,2
6	100,0	100,7	102,3	100,8	103,5	101,8
MW	100,0	99,8	100,6	100,0	99,8	102,0
Rel. SD	1,8	2,3	3,7	1,8	3,3	1,8

TNF- α 8 h (%)	Negativ-Kontrolle			Negativ-Kontrolle		
	10 ng/mL	100 ng/mL		10 ng/mL	100 ng/mL	
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
H ₂ O ₂ 8 h (%)	Negativ-Kontrolle	5 μ M	50 μ M	Negativ-Kontrolle	5 μ M	50 μ M
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	95,8	102,4	96,5	95,2	91,4	95,0
2	99,5	103,6	102,4	110,5	95,5	95,7
3	100,6	105,1	99,9	104,5	96,5	96,3
4	102,6	103,0	104,2	95,0	94,5	95,5
5	103,5	103,4	109,6	97,8	93,6	94,2
6	97,9	101,3	101,1	97,0	94,2	94,9
MW	100,0	103,1	102,3	100,0	94,3	95,3
Rel. SD	2,9	1,3	4,4	6,2	1,8	0,7
H ₂ O ₂ 24 h (%)	Negativ-Kontrolle			Negativ-Kontrolle		
	5 μ M	50 μ M		5 μ M	50 μ M	
	10 % Humanserum			50 % Humanserum		
1	99,8	112,2	109,2	94,9	98,9	95,7
2	102,5	110,9	109,5	98,2	95,2	97,1
3	96,6	110,4	108,9	101,3	99,1	97,2
4	98,2	114,3	107,7	102,4	101,9	97,2
5	100,0	109,2	106,	100,4	89,3	96,3
6	103,1	113,0	108,4	102,7	99,3	95,6
MW	100,0	111,7	108,4	100,0	97,3	96,5
Rel. SD	2,5	1,9	1,0	3,0	4,4	0,7
50 % DMSO (%)*	8 h	24 h				
1	-0,7	-0,7				
2	-0,7	-0,4				
3	-0,9	-0,7				
4	-0,7	-0,6				
5	-0,9	-0,8				
6	-0,8	-0,6				
MW	-0,8	-0,6				
Rel. SD	0,1	0,1				

*Daten wurden für Abb. auf 0 % aufgerundet

3.2 Untersuchung des Einflusses ausgewählter Polyphenole und deren Sulfatkonjugate auf die Störung der Barrierefunktion des Endothels

RFU = Relative fluorescence unit, Maß für die Fluoreszenz-Intensität. Bezug gemessene Fluoreszenz zu geräteinterner Referenzmessung.

3.2.1 Vorversuch zur apikalen FITC-Dextran-Konzentration

Kalibriergerade als Kontrolle
(n = 3)

Konzentration (μ g/mL)	RFU
Blank	6,3
0,25	56,7
0,5	432
5	1211
10	2356
25	5754
50	11205
100	20333
125	25059
250	44277
$y = -0,1951x^2 + 225,68x$	
$R^2 = 0,9998$	

Daten korrespondierend zu Abbildung 42

RFU TNF- α 100 ng/mL	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	10 μ g/mL			250 μ g/mL		
1	2,7	1141	988	861	499	489
2	2,7	300	273	695	220	224
RFU Negativkontrolle	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	10 μ g/mL			250 μ g/mL		
1	2,7	5,7	7,7	51	110	137
2	3,7	6,7	7,7	56	102	136
RFU Maximum	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	10 μ g/mL			250 μ g/mL		
1	5,7	9,7	12,7	535	612	574
2	-	-	-	-	-	-

1, 2 = Anzahl Versuche.

RFU normalisiert auf Maximum (%)

TNF- α 100 ng/mL (%)	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	10 μ g/mL			250 μ g/mL		
1	47	11800	7797	161	82	85
2	47	3100	2153	130	36	39
MW	47	7450	4975	145	59	62
SD	0	6152	3991	22	32	33
Negativkontrolle (%)	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	10 μ g/mL			250 μ g/mL		
1	47	59	61	9	18	24
2	65	69	61	10	17	24
MW	56	64	61	10	17	24
SD	12	7	0	1	1	0

1, 2 = Anzahl Versuche.

3.2.2 Versuchsdurchführung

Daten korrespondierend zu Abbildung 43

RFU TNF- α 100 ng/mL	30 min	60 min	90 min	RFU Negativkontrolle	30 min	60 min	90 min
1	4621	8618	12282	1	4266	7693	11366
2	4293	8202	10976	2	3727	7170	9843
3	4400	8455	11145	3	4148	8332	11424
4	4014	7507	9796	4	4100	7363	9995
5	3614	6434	9815	5	3975	6656	9280
6	3719	7234	9270	6	1692	5966	7744
RFU FS	30 min	60 min	90 min	RFU FS-Sulf	30 min	60 min	90 min
1	4071	7463	9610	1	3721	7384	10368
2	3884	7320	9414	2	3835	5640	8375
3	3940	7305	8784	3	3923	8114	8720
4	3905	6606	9004	4	4106	6708	10185
5	2287	5576	7351	5	2409	6440	4008
RFU PS	30 min	60 min	90 min	RFU PS-Sulf	30 min	60 min	90 min
1	4300	8144	11386	1	3630	-143	10543
2	4228	7737	11010	2	4032	18367	10287
3	3979	7282	9967	3	3494	5867	6829
4	5060	9304	13034	4	5919	10177	15126
5	4480	7896	11575	5	4426	8267	10836
RFU Taxi	30 min	60 min	90 min	RFU Maximum	30 min	60 min	90 min
1	3639	6534	7047	1	0	12883	16382
2	4401	3444	10021	2	6611	13203	18346
3	2091	4185	5344				
4	4091	1872	9654				
5	4134	9125	11451				

FS = Ferulasäure, PS = Protocatechusäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat, Taxi = Taxifolin.

3 Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum

RFU normalisiert auf TNF- α (%)

TNF- α 100 ng/mL (%)	30 min	60 min	90 min	Negativkon- trolle (%)	30 min	60 min	90 min
1	112	111	116	1	104	99	108
2	104	106	104	2	91	93	93
3	107	109	106	3	101	108	108
4	98	97	93	4	100	95	95
5	88	83	93	5	97	86	88
6	90	93	88	6	41	77	73
MW	100	100	100	MW	89	93	94
SD	10	11	11	SD	24	11	13
FS (%)	30 min	60 min	90 min	FS-Sulf (%)	30 min	60 min	90 min
1	99	96	91	1	91	95	98
2	94	95	89	2	93	73	79
3	96	94	83	3	95	105	83
4	95	85	85	4	100	87	97
5	56	72	70	5	59	83	38
MW	88	89	84	MW	88	89	79
SD	18	10	8	SD	17	12	24
PS (%)	30 min	60 min	90 min	PS-Sulf (%)	30 min	60 min	90 min
1	105	105	108	1	88	237	100
2	103	100	104	2	98	76	98
3	97	94	94	3	85	138	65
4	123	120	124	4	144	107	143
5	109	102	110	5	108	131	103
MW	107	104	108	MW	105	138	102
SD	10	10	11	SD	24	70	28
Taxi (%)	30 min	60 min	90 min	Maximum (%)	30 min	60 min	90 min
1	89	84	67	1	0	166	155
2	107	44	95	2	161	171	174
3	51	54	51	MW	80	168	165
4	100	24	92	SD	114	3	13
5	101	118	109				
MW	89	65	83				
SD	23	37	23				

FS = Ferulasäure, PS = Protocatechusäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat,
Taxi = Taxifolin.

TEER korrespondierend zu Abbildung 44

TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Tag 1							Tag 3						
	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi
1	33	26	31	21	35	34	29	28	21	31	23	23	36	25
2	25	35	34	35	34	29	26	29	36	32	32	25	31	18
3	37	32	38	31	38	19	20	23	31	28	33	30	31	19
4	29	33	35	33	26	36	27	31	34	21	36	22	27	23
5	27	36	37	35	35	28	19	24	31	39	31	20	30	31
6	28	32						31	30					
MW	29,8	32,3	35,0	31,0	33,6	29,2	24,2	27,7	30,5	30,2	31,0	24,0	31,0	23,2
Rel. SD (%)	15	11	8	19	13	23	18	12	17	22	16	16	10	22
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Tag 5							Tag 7						
	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi
1	30	37	30	35	28	28	33	40	48	46	25	27	20	45
2	30	31	33	38	21	30	35	45	46	34	34	35	22	18
3	29	35	30	31	29	38	30	40	42	34	40	42	42	25
4	34	48	37	34	31	29	26	39	48	29	34	47	39	26
5	31	28	37	36	26	36	33	28	39	40	39	40	30	28
6	33	29						31	37					
MW	31,2	34,7	33,4	34,8	27,0	32,2	31,4	37,2	43,3	36,6	34,4	38,2	30,6	28,4
Rel. SD (%)	6	21	11	7	14	14	11	17	11	18	17	20	32	35
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Tag 9							Vor Stimulation						
	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi
1	45	38	28	45	35	44	33	54	55	61	44	58	58	57
2	35	41	37	49	34	31	36	51	49	56	55	50	59	46
3	42	28	41	41	37	44	33	50	56	54	55	50	54	56
4	36	49	44	41	34	35	40	62	64	56	56	47	49	49
5	43	46	45	36	42	49	36	56	57	58	53	53	61	44
6	43	52						50	50					
MW	40,7	42,3	39,0	42,4	36,4	40,6	35,6	53,8	55,2	57,0	52,6	51,6	56,2	50,4
Rel. SD (%)	10	21	18	12	9	18	8	9	10	5	9	8	8	12
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Nach Stimulation							K = Negativkontrolle, T = Stimulation mit TNF- α , FS = Ferulasäure, PS = Protocatechusäure, Sulf = korrespondierendes Sulfatkonjugat, Taxi = Taxifolin.						
	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi	T	K	FS	FS-Sulf	PS	PS-Sulf	Taxi
1	34	34	44	37	31	37	43							
2	41	44	51	43	32	43	37							
3	41	37	35	44	59	45	32							
4	44	43	36	33	32	37	40							
5	35	36	46	49	36	46	32							
6	42	45												
MW	39,5	39,8	42,4	41,2	38,0	41,6	36,8							
Rel. SD (%)	10	12	16	15	31	10	13							

MTT-Assay korrespondierend zu Abbildung 49

Prä-Inkubation Polyphenole 0,5 μM 2 h, 100 ng/mL TNF- α 2 h, 4 kDa FITC- Dextran 90 min (%)	Negativ- Kontrolle	TNF- α	Protocatechu- säure (PS)	PS-Sulf	Ferulasäure (FS)	FS-Sulf	Taxifolin	50 % DMSO
1	101,1	87,2	95,8	97,9	89,8	87,2	79,9	0,6
2	97,9	77,7	103,0	88,9	92,8	81,7	77,1	0,5
3	104,5	77,7	99,1	90,7	85,0	79,9	77,6	0,5
4	100,8	83,6	102,1	91,9	88,9	81,4	77,5	0,6
5	93,8	84,8	104,8	89,7	90,1	80,7	80,1	0,6
6	101,9	82,5	96,4	93,8	88,7	80,4	82,8	0,6
MW	100,0	82,3	100,2	92,2	89,2	81,9	79,2	0,6
Rel. SD	3,4	3,5	3,3	3,0	2,3	2,4	2,0	0,0

3.2.3 Weiterführender Versuch

RFU Daten korrespondierend zu Abbildung 42

TNF- α	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	5983	7882	10078	4591	4760	5387	6910	8745	10848	4590	5012	5610
2	6516	8881	10801	4327	4871	6265	7286	9212	11917	4320	4885	5485
3	6443	8405	15221	4327	4812	5318	6913	8883	11230	4853	5239	5737
TNF- α	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	6514	*	*	4809	*	*	7109	8825	11330	4448	4392	4636
2	6603	*	*	4326	*	*	7234	8829	10688	4433	4657	5214
3	6505	*	*	4556	*	*	7166	8810	12675	4665	5188	5417
Negativkontrolle	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	6316	8210	10252	4325	4823	5248	6620	8024	10435	4686	4918	5588
2	6829	8533	10462	4586	4749	5142	6600	8204	10464	4397	4778	5099
3	6727	8310	10458	4357	4822	5152	6509	8506	10265	5016	4848	5344
Negativkontrolle	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	3812	*	*	3781	*	*	7830	10017	12915	4599	4487	4996
2	3650	*	*	3778	*	*	6802	8206	10494	4118	3946	4373
3	3808	*	*	3950	*	*	6452	8626	10835	4571	4397	4578
50 % DMSO	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	6150	7995	48589	4397	4930	12556	6693	9313	11757	4961	4946	5235
2	6297	9032	11793	4261	4855	12591	6854	8968	10637	5209	5071	5373
3	5988	8919	11200	4490	5050	5145	7423	9078	11553	4900	5008	5326
50 % DMSO	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	6654	*	*	4828	*	*	6226	7272	9378	5178	5055	5367
2	6483	*	*	4467	*	*	6093	6926	9127	4891	4881	5424
3	6948	*	*	4718	*	*	6708	7863	9534	4708	4999	5457
Zero	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	5995	*	*	4691	*	*	9969	13995	18645	4677	4835	5440
2	6513	*	*	4894	*	*	9070	12744	16756	5258	6662	7126
3	7330	*	*	4675	*	*	6973	9089	11780	4504	5228	5505
Zero	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	6884	*	*	4444	*	*	7776	9513	12273	5097	5100	5640
2	6556	*	*	4604	*	*	6646	7762	9845	4557	4676	4694
3	8445	*	*	4341	*	*	7081	8512	11170	4862	5638	6078

N = 3, *Proben standen nicht zur Verfügung.

D Tabellarischer Anhang

RFU normalisiert auf Negativkontrolle (%)

TNF-α	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	90	94	97	104	99	104	105	106	104	98	103	105
2	98	106	104	98	102	121	111	112	115	92	101	103
3	97	101	146	98	100	103	105	108	108	103	108	107
MW	9	100	116	100	100	109	107	109	109	98	104	108
SD	4	6	27	3	1	10	3	3	5	6	4	2
TNF-α	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	111	*	*	109	*	*	101	99	99	100	103	100
2	113	*	*	98	*	*	103	99	94	100	109	112
3	111	*	*	103	*	*	102	98	111	105	121	117
MW	112			103			102	99	101	102	111	109
SD	1			5			1	0	9	3	9	9
Negativkontrolle	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	95	98	99	98	101	101	101	97	100	100	101	105
2	103	102	101	104	99	99	100	100	101	94	99	95
3	102	100	101	99	101	99	99	103	99	107	100	100
MW	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
SD	4	2	1	3	1	1	1	3	1	7	1	5
Negativkontrolle	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	107	*	*	101	*	*	111	112	113	104	105	107
2	97	*	*	95	*	*	97	92	92	93	92	94
3	96	*	*	104	*	*	92	96	95	103	103	98
MW	100			100			100	100	100	100	100	100
SD	6			5			10	11	11	6	7	7
50 % DMSO	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	93	96	468	99	103	242	102	113	113	106	102	98
2	95	108	113	96	101	243	104	109	102	111	105	101
3	90	107	108	102	105	99	113	110	111	104	103	100
MW	93	104	230	99	103	195	106	111	109	107	103	99
SD	2	7	206	3	2	83	6	2	6	3	1	1
50 % DMSO	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	114	*	*	109	*	*	89	81	82	117	118	115
2	111	*	*	101	*	*	87	77	80	100	114	117
3	119	*	*	107	*	*	95	88	84	106	117	117
MW	114			106			90	82	82	111	116	116
SD	4			4			5	5	2	5	2	1
Zero	2 h						6 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	91	93	93	117	118	123	152	170	179	100	100	102
2	98	102	97	122	122	130	138	155	161	112	137	133
3	11	117	121	116	115	119	106	110	113	96	108	103
MW	100	104	103	118	118	124	132	145	151	102	115	113
SD	10	12	15	3	3	5	23	31		8	20	18
Zero	12 h						24 h					
	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min	30 min	60 min	90 min
	4 kDa			70 kDa			4 kDa			70 kDa		
1	118	*	*	101	*	*	111	106	108	115	119	121
2	112	*	*	104	*	*	95	87	86	103	109	101
3	144	*	*	98	*	*	101	95	98	110	132	131
MW	125			101			102	96	97	109	120	118
SD	17			3			8	10	11	6	11	15

N = 3, *Proben standen nicht zur Verfügung.

3 Bioaktivität von Polyphenolen und deren Sulfatkonjugaten in vitro in Anwesenheit von Humanserum

TEER korrespondierend zu Abbildung 46 (100 ng/mL TNF- α)

2 h (Ω^*cm^2)	Tag 1			Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 9			Tag 11		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	18	21	23	25	23	26	24	22	27	28	25	25	28	26	25	24	25	28
2	24	24	24	25	25	26	28	27	26	28	27	27	28	27	28	26	25	26
3	23	25	24	26	26	27	26	26	27	26	27	26	25	26	30	24	27	25
4	22	21	26	25	25	28	25	25	28	27	28	25	29	26	29	22	27	23
5	21	21	25	25	25	28	29	25	26	30	27	25	25	25	27	25	25	27
6	24	24	26	23	23	25	28	27	28	26	27	28	28	26	28	26	23	25
MW	22	23	25	25	25	27	27	25	27	28	27	26	27	26	28	25	25	26
Rel. SD (%)	10	8	5	4	5	5	7	7	3	6	4	5	6	2	6	6	6	7
2 h (Ω^*cm^2)	Tag 13			Tag 15			Tag 17			Tag 19			Vor Stim.			Nach Stim.		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	27	25	27	30	29	26	27	25	29	22	22	21	36	38	44	13	8	381
2	26	25	25	27	28	28	27	29	26	21	22	22	39	43	42	14	7	244
3	27	26	27	27	27	27	25	24	29	20	24	23	40	39	37	18	9	324
4	26	27	25	28	29	28	26	25	27	23	23	24	38	39	38	12	8	347
5	25	27	27	27	28	28	28	23	29	23	22	25	40	41	39	16	7	339
6	26	25	26	28	28	27	27	26	26	20	23	22	40	40	40	16	9	313
MW	26	26	26	28	28	27	27	25	28	22	23	23	39	40	40	15	8	325
Rel. SD (%)	3	4	4	4	3	3	4	8	5	6	4	6	4	4	7	15	11	14
6 h (Ω^*cm^2)	Tag 1			Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 9			Tag 11		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	20	19	30	21	19	23	26	20	26	23	24	25	26	28	28	25	28	25
2	27	21	22	22	21	24	24	24	24	25	24	25	25	26	27	28	26	27
3	26	24	25	21	20	24	25	25	24	24	25	27	28	25	27	27	26	28
4	21	20	24	22	21	25	24	23	28	24	22	25	25	27	27	24	25	27
5	27	26	27	25	24	24	25	26	25	23	25	24	25	29	26	26	25	27
6	27	25	26	21	22	25	25	26	24	23	24	23	27	28	25	26	26	25
MW	25	23	26	22	21	24	25	24	25	24	24	25	26	27	27	26	26	27
Rel. SD (%)	13	13	11	7	8	3	3	10	6	3	5	5	5	5	4	5	4	5
6 h (Ω^*cm^2)	Tag 13			Tag 15			Tag 17			Tag 19			Vor Stim.			Nach Stim.		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	28	27	28	31	30	29	23	21	22	26	25	27	34	33	39	18	1	90
2	26	30	28	29	30	28	21	25	25	27	27	24	36	36	36	19	9	92
3	27	28	29	28	29	29	24	27	22	28	26	26	36	36	37	20	12	89
4	29	28	29	30	30	29	21	24	22	25	26	24	36	37	37	19	3	90
5	28	27	29	29	29	27	24	23	22	28	27	25	35	36	36	21	7	103
6	27	28	28	28	28	29	23	23	23	28	27	23	38	38	4	22	12	92
MW	28	28	29	29	29	29	23	24	23	27	26	25	36	36	32	20	7	93
Rel. SD (%)	4	4	2	4	3	3	6	9	5	5	3	6	4	5	43	7	63	6
12 h (Ω^*cm^2)	Tag 1			Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 9			Tag 11		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	19	21	25	20	23	25	25	25	25	24	26	27	30	28	27	22	24	25
2	19	21	22	25	22	23	23	24	25	28	26	27	27	30	27	24	24	26
3	20	23	23	23	25	22	26	26	25	27	27	25	27	28	28	24	25	23
4	19	19	24	24	25	26	25	26	25	29	31	25	27	30	28	23	22	25
5	21	19	21	22	24	22	25	27	25	29	27	25	26	26	28	25	27	25
6	24	23	22	24	26	24	23	26	26	26	25	26	29	29	28	26	24	25
MW	20	21	23	23	24	24	25	26	25	27	27	26	28	29	28	24	24	25
Rel. SD (%)	10	9	6	8	6	7	5	4	2	7	8	4	5	5	2	6	7	4

12 h (Ω^*cm^2)	Tag 13			Tag 15			Tag 17			Tag 19			Vor Stim.			Nach Stim.		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	27	28	27	28	26	27	27	21	24	26	26	23	36	39	42	19	0	74
2	27	27	26	26	28	26	24	23	26	25	23	23	38	41	40	19	0	75
3	26	28	28	27	28	26	25	25	26	25	23	24	41	40	40	22	0	74
4	26	26	26	25	27	28	26	25	28	24	21	24	40	36	42	17	0	81
5	26	26	26	28	26	28	24	25	29	23	24	23	41	39	39	20	1	78
6	28	28	27	25	27	28	25	23	25	26	24	14	41	39	97	23	6	74
MW	27	27	27	27	27	27	25	24	26	25	24	22	40	39	50	20	1	76
Rel. SD (%)	3	4	3	5	3	4	5	7	7	5	7	18	5	4	46	11	206	4
24 h (Ω^*cm^2)	Tag 1			Tag 3			Tag 5			Tag 7			Tag 9			Tag 11		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	21	22	23	24	26	25	23	25	23	23	26	23	27	28	26	22	26	26
2	24	23	23	27	26	26	23	24	25	23	23	24	27	24	26	24	24	24
3	22	23	24	24	26	27	23	22	25	25	22	25	25	27	27	22	23	24
4	19	23	23	26	24	24	23	27	25	23	26	23	28	28	28	25	24	23
5	25	26	27	27	26	25	23	25	28	25	26	22	25	24	25	25	22	25
6	24	25	23	26	25	27	24	24	24	26	26	26	24	26	25	24	26	25
MW	23	24	24	26	26	26	23	25	25	24	25	24	26	26	26	24	24	25
Rel. SD (%)	10	6	7	5	3	5	2	7	7	5	7	6	6	7	4	6	7	4
24 h (Ω^*cm^2)	Tag 13			Tag 15			Tag 17			Tag 19			Vor Stim.			Nach Stim.		
	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D	K	T	D
1	29	28	28	22	22	25	24	22	24	24	21	20	39	42	38	18	0	74
2	27	28	29	22	24	25	27	25	25	24	21	21	40	36	39	18	6	73
3	27	29	28	25	24	24	23	21	24	22	22	21	38	40	41	17	0	75
4	28	27	27	25	23	23	21	20	23	22	23	20	43	42	39	17	0	77
5	27	28	28	23	24	23	24	24	25	26	23	24	40	38	40	19	2	74
6	28	26	29	23	23	25	23	23	24	23	24	22	35	43	38	19	3	72
MW	28	28	28	23	23	24	24	23	24	24	22	21	39	40	39	18	2	74
Rel. SD (%)	3	4	3	6	3	4	8	8	3	6	5	7	7	7	3	5	131	2

K = Negativkontrolle, T = Stimulation mit TNF- α , D = 50 % DMSO, Stim = Stimulation.

MTT-Assay korrespondierend zu Abbildung 48

100 ng/mL TNF- α 2 h (%)	Negativ- Kontrolle	FITC-Dextran 4 kDa	FITC-Dextran 70 kDa	50 % DMSO*
1	95,0	97,1	98,1	-1,3
2	97,6	99,2	101,1	-1,3
3	105,1	98,5	99,5	-1,3
4	103,8	102,6	99,6	-1,4
5	98,6	100,9	98,7	-1,4
6	99,9	98,5	98,2	-1,5
MW	100,0	99,4	99,2	-1,4
Rel. SD	3,8	2,0	1,1	0,1
100 ng/mL TNF- α 6 h (%)	Negativ- Kontrolle	FITC-Dextran 4 kDa	FITC-Dextran 70 kDa	50 % DMSO*
1	94,6	116,0	114,6	-1,2
2	103,3	112,3	108,2	-1,4
3	96,9	111,4	112,4	-1,4
4	98,8	101,1	106,4	-1,3
5	104,9	116,2	111,1	-1,4
6	101,4	104,8	105,1	-1,4
MW	100,0	110,3	109,6	-1,3
Rel. SD	3,9	6,1	3,7	0,1
100 ng/mL TNF- α 12 h (%)	Negativ- Kontrolle	FITC-Dextran 4 kDa	FITC-Dextran 70 kDa	50 % DMSO*
1	99,3	96,9	88,3	-1,0
2	101,0	93,5	84,5	-1,0
3	99,3	91,0	86,3	-1,1
4	100,	91,5	84,3	-1,0
5	100,5	92,9	85,8	-1,1
6	99,8	100,0	77,5	-1,1
MW	100,0	94,3	84,5	-1,0
Rel. SD	0,7	3,5	3,7	0,0
100 ng/mL TNF- α 24 h (%)	Negativ- Kontrolle	FITC-Dextran 4 kDa	FITC-Dextran 70 kDa	50 % DMSO*
1	97,8	98,1	89,2	-1,1
2	103,2	92,0	91,3	-1,1
3	98,5	94,4	92,3	-1,1
4	99,3	93,3	92,3	-1,0
5	100,7	96,4	91,4	-1,2
6	100,6	95,5	95,1	-0,9
MW	100,0	95,0	91,9	-1,1
Rel. SD	1,9	2,2	1,9	0,1

*Daten wurden für Abb. auf 0 % aufgerundet

E Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Der aus der in Frankreich kultivierten Meeres-Kiefer (*Pinus pinaster*) gewonnene und standardisierte Rindenextrakt Pycnogenol enthält neben Procyanidinen auch weitere polyphenolische sekundäre Naturstoffe und ist zudem weltweit als USP-gelistetes Nahrungsergänzungsmittel kommerziell erhältlich. Der Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln ist ebenso wie die Einnahme von Pycnogenol mit einer Vielzahl von positiven Effekten bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen assoziiert. Dazu zählen beispielsweise antioxidative oder antiinflammatorische Wirkungen, welche sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet werden konnten. Bislang gelang es nach der Einnahme des Extraktes nicht alle in Humanserum oder -plasma detektierten Substanzen zu identifizieren; zudem ist nicht geklärt, von welchen Stoffen konkret eine Bioaktivität ausgeht oder ob diese durch synergistische Effekte zustande kommt. Aus diesen Gründen sollten in der vorliegenden Arbeit im Rahmen einer klinischen Studie bislang nicht beschriebene Analyten in Humanserum mittels UHPLC-qTOF-MS charakterisiert werden. Hierbei wurde ein ungerichteter, metabolomischer Ansatz gewählt. Die Studienproben der Proband*innen wurden dabei also ohne etwaige Restriktionen analysiert, beispielsweise hinsichtlich möglicher Molekülstrukturen oder der Retentionszeiten der detektierten Analyten. Näher betrachtet werden sollten Analyten, die in einer individuellen Serumprobe nach Beginn der viertägigen Pycnogenol-Einnahme neu auftraten.

In Anschluss an eine Probenvorbereitung mittels methanolischer Proteinpräzipitation im sauren Milieu konnten in dem Humanserum der Proband*innen im ESI-Positiv-Modus fünf und im ESI-Negativ-Modus 23 interessante Analyten nachgewiesen werden, die auf die Einnahme von Pycnogenol zurückzuführen waren. Elf dieser Substanzen konnte eine Struktur zugeordnet werden, wobei alle ausschließlich als Sulfatkonjugate vorlagen. Zu diesen zählten neben Zimtsäure-Derivaten wie Ferulasäure-Sulfat zudem Flavonoide, z. B. Taxifolin-Sulfat, aber auch Phenylvaleriansäure-Abkömmlinge, beispielsweise Hydroxydihydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat, sowie Vertreter aus der Gruppe der Benzoessäuren und weitere Aromaten wie z. B. Pyrogallol-Sulfat oder Protocatechusäure-Sulfat.

Nach unserem besten Wissen war der Aspekt der ausschließlichen Sulfatierung neuartig. Wie aufgrund des interindividuell variablen Metabolismus zu erwarten, insbesondere durch das enterale Mikrobiom, war die Verteilung dieser sogenannten Marker innerhalb der 15 Studienteilnehmenden sehr heterogen. Nicht jeder Marker wurde bei jeder Person erfasst; die Spannweite reichte dabei von einem Teilnehmenden im Falle des mikrobiellen Metaboliten Hydroxyphenylvaleriansäure-Sulfat bis hin zu 14 Proband*innen bei einer nicht-identifizierbaren, jedoch wahrscheinlich endogenen Substanz im ESI-Positiv-Modus. Am häufigsten wurden die elf zuordenbaren Analyten vier Stunden nach der Einnahme von Pycnogenol über einen Zeitraum von vier Tagen bestimmt.

Im Anschluss sollte die Bioaktivität dieser Substanzen in einem endothelialen Zellkulturmodell untersucht werden. Das Endothel wurde als Zielstruktur gewählt, da eine endotheliale Dysfunktion in der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten mit ausgeprägter Mortalität und Morbidität eine bedeutende Rolle spielt. Zudem wurde bereits eine positive Wirkung auf die Endothelfunktion nach der Einnahme von Pycnogenol beschrieben, wobei bis dato der Mechanismus auf molekularer Ebene unklar war.

Die Charakterisierung der Sulfatkonjugate bezüglich ihrer Bioaktivität *ex vivo* mit humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) gestaltete sich herausfordernd. Initial sollte untersucht werden, inwiefern diese Substanzen einer durch einen Entzündungsstimulus hervorgerufenen Schädigung der endothelialen Glycocalyx entgegenwirken oder diese vermeiden können. Allerdings ließen sich mit den verschiedenen inflammatorischen Stimuli Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Wasserstoffperoxid bezüglich Konzentration und Inkubationsdauer keine reproduzierbaren Kulturbedingungen für eine valide ELISA-Quantifizierung des endothelialen Markers Heparansulfat etablieren. Im Anschluss erfolgte unter dem Einfluss einer TNF- α -Stimulation ein orientierendes Screening mit den Monosubstanzen Ferulasäure und Protocatechusäure bzw. mit deren Sulfatkonjugaten in Konzentrationen von 0,1 und 0,5 μ M. Dabei zeigten die Konjugate beider Analyten bei der niedrigeren Konzentration tendenziell eine glyocalyx-protective Wirkung, welche bei der höheren Konzentration jedoch nicht mehr beobachtet werden konnte. Die endotheliale Permeabilität wurde mittels eines FITC-Dextran-Permeabilitäts-Assays untersucht. Hiermit sollte ebenfalls ein möglicher endothel-protectiver Einfluss der sulfatierten Substanzen unter entzündlichen Bedingungen (TNF- α -Stimulation) beleuchtet werden. Jedoch konnte weder bei Ferulasäure oder Protocatechusäure noch bei deren Sulfatkonjugate oder Taxifolin in diesem Modell ein Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion erfasst werden.

Ursprünglich war abschließend geplant in einem *ex vivo*-Modell die Humanserum-Proben mit dem darin enthaltenen Gemisch aus möglicherweise bioaktiven Metaboliten direkt im Zellkulturmodell auf ihre Wirkung zu testen. Dies hat den Vorteil, dass simultan synergistische Effekte und Einflüsse der Matrix untersucht werden können und ausschließlich *in vivo* erreichbare Konzentrationen eingesetzt werden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Studienproben und der oben geschilderten heterogenen Ergebnisse wurde auf eine weitere Analyse im Rahmen eines *ex vivo*-Modells verzichtet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach der Einnahme von Pycnogenol resorbierte Bestandteile und Metabolite in Humanserum ausschließlich als Sulfatkonjugate vorlagen. Zudem wurde bezüglich der Evaluation der endothelialen Bioaktivität durch Polyphenole eine Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen. Damit konnte ein Beitrag zur pharmakokinetischen und -dynamischen Charakterisierung von Pycnogenol geleistet werden.

2 Summary

Pycnogenol is a standardized bark extract from the French maritime pine *Pinus pinaster*, which is monographed in the USP as a dietary supplement. The main components are pro-cyanidins as well as other polyphenolic secondary metabolites. The consumption of polyphenol-rich food or extracts is associated with miscellaneous beneficial effects in different pathophysiological processes. This accounts for the intake of Pycnogenol as well, which exhibits antioxidant and antiinflammatory effects both *in vitro* and *in vivo*. So far, not all analytes detected in human serum or plasma could be identified after ingestion of the bark extract; additionally, the exact bioactive compounds are unknown as well as probable synergistic effects. Therefore, the aim of the present thesis was the UHPLC-qTOF-MS-identification of previously unidentified analytes in human serum of fifteen volunteers in a clinical study. Study samples were analyzed using an untargeted, metabolomic approach without any predefined restrictions regarding possible chemical structures or the retention times of the detected analytes. Analytes which were tracked in individual serum samples after the start of a four-day course of Pycnogenol-intake were to be further characterized.

Human serum of the subjects was analyzed by UHPLC-qTOF-MS after protein precipitation with methanol acidified with formic acid. In total, five analytes in ESI positive mode and 23 in negative mode were detected, which were related to the intake of Pycnogenol. Eleven of these substances were assigned a molecular structure, all of them were exclusively sulfate conjugates. These included cinnamic acid derivatives such as ferulic acid sulfate as well as flavonoids, e.g., taxifolin sulfate, but also phenylvaleric acid metabolites, for example hydroxydihydroxyphenylvaleric acid sulfate, and additionally benzoic acids and other aromatic compounds such as pyrogallol sulfate or protocatechuic acid sulfate.

To the best of our knowledge, the exclusive presence of sulfate conjugates has never been reported before. The distribution and presence of the features differed greatly within the study participants. This fact was to be expected based on marked interindividual variable metabolism, especially by gut microbiota. Not every analyte was detected in every subject; hydroxyphenylvaleric acid sulfate was identified in only one person, whereas an unknown marker appeared in 14 subjects in ESI positive mode, which was presumably an endogenous compound. Most of the eleven analytes mentioned above were detected four hours after the last ingestion of a 4-day-course.

Subsequently, a comprehensive characterization of these compounds with respect to their effects on the endothelium in a cell culture model was planned. Endothelial dysfunction plays a significant role in the pathogenesis of a variety of diseases with marked mortality and morbidity. For this reason, the endothelium was chosen as a target for these assays. Several beneficial effects on endothelial function *in vitro* and *in vivo* had already been

reported after Pycnogenol-ingestion, although the precise mechanism at the molecular level was not known.

The ex vivo bioactivity characterization of the sulfate conjugates in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was challenging. Initially, it was planned to investigate a probable protection from endothelial glycocalyx damage induced by different inflammatory stimuli. Heparan sulfate, an integral part of the endothelial glycocalyx, was chosen to be the target for ELISA-quantification. However, the establishment of reproducible cell culture conditions was not possible, neither with the application of lipopolysaccharide (LPS) nor tumor necrosis factor α (TNF- α) or hydrogen peroxide. A screening performed with both sulfated and unconjugated ferulic acid and protocatechuic acid at a concentration of 0.1 and 0.5 μ M did not show any promising result regarding protection of the endothelium under TNF- α initiated inflammation. At the lower concentration, both sulfate conjugates appeared to exhibit a slight glycocalyx-protective effect, whereas this was not observed at higher concentration. Subsequently, endothelial permeability was assessed under inflammatory conditions (stimulation with TNF- α) by FITC-dextran-transport. Neither ferulic acid nor protocatechuic acid or their sulfate conjugates nor taxifolin protected the endothelial barrier function in this model.

Originally, it was planned to evaluate human serum samples containing all possibly bioactive compounds in an ex vivo model; in this set up, human serum is applied directly to cell culture in order to examine effects. Firstly, synergistic actions of different analytes and the effect of matrix on bioactivity can be measured. Secondly, only physiologic relevant concentrations are used. However, due to the limited availability of the study samples and the previously mentioned heterogeneous results, this approach was not further pursued.

As a summary, the present work revealed that absorbed components and metabolites after the ingestion of Pycnogenol were exclusively present as sulfate conjugates in human serum. In addition, a base for further bioactivity studies of polyphenols with respect to endothelial function was established. Therefore, this work contributed to the pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of Pycnogenol.

F Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CD4+	Cluster of differentiation 4
CE	Collision energy
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
ConA	Concanavalin A
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX-1/2	Cyclooxygenase-1/2
CPD-SAGM L	Citrat-Phosphat-Dextrose-Saline-Adenin-Glucose-Mannitol-Lösung
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozyten-Konzentrat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC-Dextran	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
FMD	Flussvermittelte Vasodilatation
GCP	Good clinical practice
GP120	Glycoprotein 120
GRAS	Generally recognized as safe
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMDBA	Human metabolome database
HPLC-UV-Vis	High performance liquid chromatography-UV-Vis
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells

ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICH	International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use
INOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
LDL	Low density lipoprotein
LDS	Lithium dodecylsulfate
LPS	Lipopolysaccharid
M1	δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
MS	Mass spectrometry
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MWCO	Molecular weight cut-off
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PET	Polyethylenterephthalat
PFP	Pentafluorophenyl
PHA-P	Phytohämagglutinin-P
QC	Quality control
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay.
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis
SGLT	Sodium dependent glucose co-transporter
SL	Stammlösung
SULT	Sulfotransferase
SVCAM-1	Soluble vascular cell adhesion molecule 1

SWATH	Sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra
T/E	Trypsin/EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEER	Transendothelialer Widerstand
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TOF	Time of flight
TOF MS	Time of flight-mass spectrometry
TOF MS/MS	Time of flight-mass spectrometry/mass spectrometry
Tris(-HCl)	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan(-HCl)
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UHPLC-qTOF	Ultra high performance liquid chromatography-quadrupol time of flight
USP	United States Pharmacopeia
UV-Vis	Ultraviolet-visible
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin

G Literaturverzeichnis

1. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr, 2004. 79(5).
2. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr, 2005. 81(1).
3. Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Madry, R., et al., *Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study*. Nutrition, 2014. 30(11-12).
4. Hänsel, R., Sticher, O., *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9. Auflage 2009, Heidelberg.
5. Williamson, G., Kay, C. D., Crozier, A., *The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: a review from a historical perspective*. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2018. 17(5).
6. Goszcz, K., Duthie, G. G., Stewart, D., et al., *Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response?* Br J Pharmacol, 2017. 174(11).
7. Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., et al., *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radic Biol Med, 2002. 33(2).
8. Peterson, J., Dwyer, J., *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity*. Nutr Res, 1998. 18(12).
9. Zamora-Ros, R., Rothwell, J. A., Scalbert, A., et al., *Dietary intakes and food sources of phenolic acids in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Br J Nutr, 2013. 110(8).
10. Robbins, R. J., *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*. J Agric Food Chem, 2003. 51(10).
11. Pei, R., Liu, X., Bolling, B., *Flavonoids and gut health*. Curr Opin Biotechnol, 2020. 61.
12. Scalbert, A., Williamson, G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J Nutr, 2000. 130(8).
13. Das, A., Baidya, R., Chakraborty, T., et al., *Pharmacological basis and new insights of taxifolin: a comprehensive review*. Biomed Pharmacother, 2021. 142.
14. American Botanical Council, *Scientific and clinical monograph for Pycnogenol*. 2010.
15. United States Pharmacopeia (USP), *Dietary Supplements 39*. 2016.
16. Rohdewald, P., *A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2002. 40(4).
17. Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F., *Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark, Pycnogenol*. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6).
18. Pirasteh, M., *Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer* Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster.
19. Rüge, H.-J., *Identifizierung und Quantifizierung phenolischer Inhaltsstoffe sowie pharmakologisch-biochemische Untersuchungen eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer Pinus pinaster Ait.* Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster.
20. Ross, J. A., Kasum, C. M., *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. Annu Rev Nutr, 2002. 22.
21. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev, 1998. 56(11).
22. Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., et al., *Natural polyphenols: an overview*. Int J Food Prop, 2017. 20(8).
23. Câmara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., et al., *Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study*. Foods, 2020. 10(1).
24. Kaulmann, A., Bohn, T., *Bioactivity of polyphenols: preventive and adjuvant strategies toward reducing inflammatory bowel diseases - promises, perspectives, and pitfalls*. Oxid Med Cell Longev, 2016. 2016.
25. Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., et al., *Bioactivity of dietary polyphenols: the role of metabolites*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020. 60(4).
26. Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., et al., *The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols*. Nutrients, 2018. 10(11).
27. Maimoona, A., Naeem, I., Saddiqe, Z., et al., *A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract*. J Ethnopharmacol, 2011. 133(2).
28. Malekahmadi, M., Moghaddam, O. M., Firouzi, S., et al., *Effects of pycnogenol on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Pharmacol Res, 2019. 150.

29. Farid, R., *Pycnogenol in the treatment of inflammatory diseases: osteoarthritis, asthma and heart disease*, in Botanical medicine in clinical practice. 2008.
30. Rašković, A., Bukumirović, N., Paut Kusturica, M., et al., *Hepatoprotective and antioxidant potential of Pycnogenol in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats*. *Phytother Res*, 2019. 33(3).
31. Nattagh-Eshtivani, E., Gheflati, A., Barghchi, H., et al., *The role of Pycnogenol in the control of inflammation and oxidative stress in chronic diseases: Molecular aspects*. *Phytother Res*, 2022. 36(6).
32. Belcaro, G., Cesarone, M. R., Errichi, S., et al., *Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol. The SVOS (San Valentino osteo-arthrosis study). Evaluation of signs, symptoms, physical performance and vascular aspects*. *Phytother Res*, 2008. 22(4).
33. Belcaro, G., Cesarone, M. R., Errichi, S., et al., *Variations in C-reactive protein, plasma free radicals and fibrinogen values in patients with osteoarthritis treated with Pycnogenol*. *Redox Rep*, 2008. 13(6).
34. Cisar, P., Jany, R., Waczulikova, I., et al., *Effect of pine bark extract (Pycnogenol) on symptoms of knee osteoarthritis*. *Phytother Res*, 2008. 22(8).
35. Jessberger, S., Hogger, P., Genest, F., et al., *Cellular pharmacodynamic effects of Pycnogenol in patients with severe osteoarthritis: a randomized controlled pilot study*. *BMC Complement Altern Med*, 2017. 17.
36. Kohama, T., Negami, M., *Effect of low-dose French maritime pine bark extract on climacteric syndrome in 170 perimenopausal women - a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *J Reprod Med*, 2013. 58(1-2).
37. Wilson, D., Evans, M., Guthrie, N., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study to evaluate the potential of Pycnogenol for improving allergic rhinitis symptoms*. *Phytother Res*, 2010. 24(8).
38. Belcaro, G., Luzzi, R., Hu, S., et al., *Improvement in signs and symptoms in psoriasis patients with Pycnogenol supplementation*. *Panminerva Med*, 2014. 56(1).
39. Belcaro, G., Cornelli, U., Luzzi, R., et al., *Pycnogenol supplementation improves health risk factors in subjects with metabolic syndrome*. *Phytother Res*, 2013. 27(10).
40. Zibadi, S., Rohdewald, P. J., Park, D., et al., *Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation*. *Nutr Res*, 2008. 28(5).
41. Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., et al., *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk*. *Eur Heart J*, 2020. 41(1).
42. Enseleit, F., Sudano, I., Periat, D., et al., *Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study*. *Eur Heart J*, 2012. 33(13).
43. Nishioka, K., Hidaka, T., Nakamura, S., et al., *Pycnogenol, French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans*. *Hypertens Res*, 2007. 30(9).
44. Schoonees, A., Visser, J., Musekiwa, A., et al., *Pycnogenol (extract of French maritime pine bark) for the treatment of chronic disorders*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012(4).
45. Del Rio, D., Costa, L., Lean, M., et al., *Polyphenols and health: what compounds are involved?* *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010. 20(1).
46. Sies, H., *Polyphenols and health: update and perspectives*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. 501(1).
47. Nignpense, B. E., Francis, N., Blanchard, C., et al., *Bioaccessibility and bioactivity of cereal polyphenols: a review*. *Foods*, 2021. 10(7).
48. Bohn, T., Mcdougall, G. J., Alegria, A., 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).
49. Dridi, W., Bordenave, N., *Pine bark phenolic extracts, current uses and potential food applications: a review*. *Curr Pharm Des*, 2020. 26(16).
50. Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J., *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. 2011, Philadelphia.
51. Shahidi, F., Peng, H., *Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds*. *J Food Bioact*, 2018. 4.
52. Oracz, J., Nebesny, E., Zyzelewicz, D., et al., *Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: a comprehensive review*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020. 60(12).
53. Dekant, W., *Biotransformation von Fremdstoffen*, in *Das Toxikologiebuch*. 2017.

54. Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., et al., *Polyphenols and human health: the role of bioavailability*. *Nutrients*, 2021. 13(1).
55. Vivarelli, S., Costa, C., Teodoro, M., et al., *Polyphenols: a route from bioavailability to bioactivity addressing potential health benefits to tackle human chronic diseases*. *Arch Toxicol*.
56. Velderrain-Rodriguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., et al., *Phenolic compounds: their journey after intake*. *Food Funct*, 2014. 5(2).
57. González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., Sáyago-Ayerdi, S. G., *Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility*. *Curr Opin Food Sci*, 2017. 13.
58. Soares, S., Vitorino, R., Osorio, H., et al., *Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols*. *J Agric Food Chem*, 2011. 59(10).
59. Cassidy, A., Minihane, A. M., *The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids*. *Am J Clin Nutr*, 2017. 105(1).
60. Pforte, H., Hempel, J., Jacobasch, G., *Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats*. *Nahrung*, 1999. 43(3).
61. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., *The interaction of anthocyanins with bilitranslocase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 296(3).
62. Van De Waterbeemd, H., *The fundamental variables of the biopharmaceutics classification system (BCS): a commentary*. *Eur J Pharm Sci*, 1998. 7(1).
63. Teng, H., Chen, L., *Polyphenols and bioavailability: an update*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019. 59(13).
64. Cosme, P., Rodriguez, A. B., Espino, J., et al., *Plant phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications*. *Antioxidants*, 2020. 9(12).
65. Ader, P., Grenacher, B., Langguth, P., et al., *Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer*. *Exp Physiol*, 1996. 81(6).
66. Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. *Nat Prod Rep*, 2009. 26(8).
67. Scott, M. B., Styring, A. K., Mccullagh, J. S. O., *Polyphenols: bioavailability, microbiome interactions and cellular effects on health in humans and animals*. *Pathogens*, 2022. 11(7).
68. Parkinson, A., Ogilvie, B., *Chapter 6: biotransformation of xenobiotics*, in Casarett & Doull's *Essentials of Toxicology*. 2. Auflage 2010, New York.
69. Chen, Z. J., Zheng, S. R., Li, L. P., et al., *Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review*. *Curr Drug Metab*, 2014. 15(1).
70. Grimm, T., Skrabala, R., Chovanova, Z., et al., *Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (Pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers*. *BMC Clin Pharmacol*, 2006. 6.
71. Roberts, M. S., Magnusson, B. M., Burczynski, F. J., et al., *Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications*. *Clin Pharmacokinet*, 2002. 41(10).
72. Chen, H. D., Sang, S. M., *Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota*. *J Funct Foods*, 2014. 7.
73. Rathaur, P., Johar, K., *Metabolism and pharmacokinetics of phytochemicals in the human body*. *Curr Drug Metab*, 2019. 20(14).
74. Beekmann, K., Actis-Goretta, L., Van Bladeren, P. J., et al., *A state-of-the-art overview of the effect of metabolic conjugation on the biological activity of flavonoids*. *Food Funct*, 2012. 3(10).
75. Van Duynhoven, J., Van Der Hooft, J. J. J., Van Dorsten, F. A., et al., *Rapid and sustained systemic circulation of conjugated gut microbial catabolites after single-dose black tea extract consumption*. *J Proteome Res*, 2014. 13(5).
76. Dudas, B., Toth, D., Perahia, D., et al., *Insights into the substrate binding mechanism of SULT1A1 through molecular dynamics with excited normal modes simulations*. *Sci Rep*, 2021. 11(1).
77. Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., et al., *Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites*. *Food Funct*, 2010. 1(3).
78. Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., et al., *Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption*. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(20).

79. Chen, D., Wang, C. Y., Lambert, J. D., et al., *Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies*. *Biochem Pharmacol*, 2005. 69(10).
80. Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M. N., *Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds*. *Mol Aspects Med*, 2010. 31(6).
81. Oesterle, I., Braun, D., Berry, D., et al., *Polyphenol exposure, metabolism and analysis: a global exposomics perspective*. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2021. 12.
82. Sousa, T., Paterson, R., Moore, V., et al., *The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs*. *Int J Pharm*, 2008. 363(1-2).
83. Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Queipo-Ortuno, M. I., et al., *High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial*. *Food Funct*, 2014. 5(8).
84. Calani, L., Dall'asta, M., Derlindati, E., et al., *Colonic metabolism of polyphenols from coffee, green tea and hazelnut skins*. *J Clin Gastroenterol*, 2012. 46(9).
85. Santos, A. C., Costa, G., Veiga, F., et al., *Advance in methods studying the pharmacokinetics of polyphenols*. *Curr Drug Metab*, 2014. 15(1).
86. Shahidi, F., Yeo, J., *Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review*. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(6).
87. Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Aura, A. M., et al., *Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites*. *J Agric Food Chem*, 2009. 57(3).
88. Ottaviani, J. I., Borges, G., Momma, T. Y., et al., *The metabolome of 2-C-14 (-)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives*. *Sci Rep*, 2016. 6.
89. Van Der Hooft, J. J. J., De Vos, R. C. H., Mihaleva, V., et al., *Structural elucidation and quantification of phenolic conjugates present in human urine after tea intake*. *Anal Chem*, 2012. 84(16).
90. Qin, J., Li, R., Raes, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature*, 2010. 464(7285).
91. Thursby, E., Juge, N., *Introduction to the human gut microbiota*. *Biochem J*, 2017. 474(11).
92. Kawabata, K., Yoshioka, Y., Terao, J., *Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols*. *Molecules*, 2019. 24(2).
93. Bevins, C. L., Salzman, N. H., *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. 9(5).
94. Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K., et al., *Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration*. *Dig Dis Sci*, 2020. 65(3).
95. Donaldson, G. P., Lee, S. M., Mazmanian, S. K., *Gut biogeography of the bacterial microbiota*. *Nat Rev Microbiol*, 2016. 14(1).
96. Haller, D., Hörmannspurger, G., *Die intestinale Mikrobiota als externes „Organ“ in Darmgesundheit und Mikrobiota: Ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit*. 2015, Wiesbaden.
97. Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., et al., *Gut reactions: breaking down xenobiotic-microbiome interactions*. *Pharmacol Rev*, 2019. 71(2).
98. Fan, Y., Pedersen, O., *Gut microbiota in human metabolic health and disease*. *Nat Rev Microbiol*, 2021. 19(1).
99. Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., et al., *Role of the gut microbiota in nutrition and health*. *BMJ*, 2018. 361.
100. Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., et al., *How colonization by microbiota in early life shapes the immune system*. *Science*, 2016. 352(6285).
101. Van Den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R., et al., *Shaping the gut microbiota by breastfeeding: the gateway to allergy prevention?* *Front Pediatr*, 2019. 7.
102. Kelly, C. P., Lamont, T. J., Bakken, J. S., *Clostridioides difficile infection in adults: treatment and prevention*, in UpToDate. Dezember 2022, Waltham, MA.
103. Lamont, T. J., Bakken, J. S., Kelly, C. P., *Clostridioides difficile infection in adults: epidemiology, microbiology and pathophysiology*, in UpToDate. Dezember 2022, Waltham, MA.
104. Chang, J. Y., Antonopoulos, D. A., Kalra, A., et al., *Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea*. *J Infect Dis*, 2008. 197(3).

105. Johnson, S., Lavergne, V., Skinner, A. M., et al., *Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of Clostridioides difficile infection in adults*. Clin Infect Dis, 2021. 73(5).
106. Lampe, J. W., Chang, J. L., *Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition*. Semin Cancer Biol, 2007. 17(5).
107. Rodriguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., et al., *Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: toward prebiotics and further*. Front Nutr, 2021. 8.
108. Williamson, G., Clifford, M. N., *Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?* Br J Nutr, 2010. 104.
109. Alves-Santos, A. M., Sugizaki, C. S. A., Lima, G. C., et al., *Prebiotic effect of dietary polyphenols: a systematic review*. J Funct Foods, 2020. 74.
110. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., et al., *Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health*. J Nutr Biochem, 2013. 24(8).
111. Correa, T. a. F., Rogero, M. M., Hassimotto, N. M. A., et al., *The two-way polyphenols-microbiota interactions and their effects on obesity and related metabolic diseases*. Front Nutr, 2019. 6.
112. Tabasco, R., Sanchez-Patan, F., Monagas, M., et al., *Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism*. Food Microbiol, 2011. 28(7).
113. Tzounis, X., Rodriguez-Mateos, A., Vulevic, J., et al., *Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study*. Am J Clin Nutr, 2011. 93(1).
114. Fooks, L. J., Gibson, G. R., *Probiotics as modulators of the gut flora*. Br J Nutr, 2002. 88 Suppl 1.
115. Masumoto, S., Terao, A., Yamamoto, Y., et al., *Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes*. Sci Rep, 2016. 6.
116. Roopchand, D. E., Carmody, R. N., Kuhn, P., et al., *Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium Akkermansia muciniphila and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome*. Diabetes, 2015. 64(8).
117. Wang, X. F., Qi, Y., Zheng, H., *Dietary polyphenol, gut microbiota and health benefits*. Antioxidants, 2022. 11(6).
118. Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M., et al., *Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds - a review*. Food Chem, 2015. 173.
119. Ulfing, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 2019, Stuttgart.
120. Boujard, D., Anselme, B., Cullin, C., et al., *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. 2014, Berlin.
121. Pries, A. R., Secomb, T. W., Gaehtgens, P., *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. 440(5).
122. Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. 2017, Weinheim.
123. Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G., et al., *Stryer Biochemie*. 8. Auflage 2018, Heidelberg.
124. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. 97.
125. Vink, H., Duling, B. R., *Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries*. Circ Res, 1996. 79(3).
126. Moore, K. H., Murphy, H. A., George, E. M., *The glycocalyx: a central regulator of vascular function*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2021. 320(4).
127. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflugers Arch, 2007. 454(3).
128. Curry, F. E., *Layer upon layer: the functional consequences of disrupting the glycocalyx-endothelial barrier in vivo and in vitro*. Cardiovasc Res, 2017. 113(6).
129. Campbell, H. K., Maiers, J. L., Demali, K. A., *Interplay between tight junctions & adherens junctions*. Exp Cell Res, 2017. 358(1).
130. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. 196(3).
131. Villalba, N., Baby, S., Yuan, S. Y., *The endothelial glycocalyx as a double-edged sword in microvascular homeostasis and pathogenesis*. Front Cell Dev Biol, 2021. 9.
132. Wagner, D. D., Frenette, P. S., *The vessel wall and its interactions*. Blood, 2008. 111(11).
133. Sandoo, A., Van Zanten, J. J., Metsios, G. S., et al., *The endothelium and its role in regulating vascular tone*. Open Cardiovasc Med J, 2010. 4.

134. Shihoya, W., Nishizawa, T., Okuta, A., et al., *Activation mechanism of endothelin ET_B receptor by endothelin-1*. *Nature*, 2016. 537(7620).
135. Rapoport, R. M., *Nitric oxide inhibition of endothelin-1 release in the vasculature: in vivo relevance of in vitro findings*. *Hypertension*, 2014. 64(5).
136. Levin, E. R., *Endothelins*. *N Engl J Med*, 1995. 333(6).
137. Sieve, I., Munster-Kuhnel, A. K., Hilfiker-Kleiner, D., *Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases*. *Vascul Pharmacol*, 2018. 100.
138. Duong, C. N., Vestweber, D., *Mechanisms ensuring endothelial junction integrity beyond VE-Cadherin*. *Front Physiol*, 2020. 11.
139. Yang, Y., Schmidt, E. P., *The endothelial glycocalyx: an important regulator of the pulmonary vascular barrier*. *Tissue Barriers*, 2013. 1(1).
140. Tarbell, J. M., Cancel, L. M., *The glycocalyx and its significance in human medicine*. *J Intern Med*, 2016. 280(1).
141. Yang, X., Meegan, J. E., Jannaway, M., et al., *A disintegrin and metalloproteinase 15-mediated glycocalyx shedding contributes to vascular leakage during inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2018. 114(13).
142. Ince, C., Mayeux, P. R., Nguyen, T., et al., *The endothelium in sepsis*. *Shock*, 2016. 45(3).
143. Sullivan, R. C., Rockstrom, M. D., Schmidt, E. P., et al., *Endothelial glycocalyx degradation during sepsis: causes and consequences*. *Matrix Biol Plus*, 2021. 12.
144. Jaffe, E. A., *Cell biology of endothelial cells*. *Hum Pathol*, 1987. 18(3).
145. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(9).
146. Gotts, J. E., Matthay, M. A., *Sepsis: pathophysiology and clinical management*. *BMJ*, 2016. 353.
147. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., et al., *The pathogenesis of sepsis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6.
148. Bone, R. C., *Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)*. *Ann Intern Med*, 1996. 125(8).
149. Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., et al., *The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)*. *JAMA*, 2016. 315(8).
150. Iba, T., Levy, J. H., *Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis*. *J Thromb Haemost*, 2019. 17(2).
151. Uchimido, R., Schmidt, E. P., Shapiro, N. I., *The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis*. *Crit Care*, 2019. 23.
152. Bermejo-Martin, J. F., Martin-Fernandez, M., Lopez-Mestanza, C., et al., *Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease)*. *J Clin Med*, 2018. 7(11).
153. Rittirsch, D., Flierl, M. A., Ward, P. A., *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(10).
154. Nevriere, R., *Pathophysiology of sepsis*, in UpToDate. Dezember 2022, Waltham, MA.
155. Steyers, C. M., 3rd, Miller, F. J., Jr., *Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases*. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(7).
156. Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., et al., *Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction*. *Biomedicines*, 2021. 9(7).
157. Liochev, S. I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. *Free Radic Biol Med*, 2013. 60.
158. Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., et al., *Oxidative stress in atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2017. 19(11).
159. Madamanchi, N. R., Vendrov, A., Runge, M. S., *Oxidative stress and vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1).
160. Yang, Y. M., Huang, A., Kaley, G., et al., *eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 297(5).
161. Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., et al., *eNOS uncoupling in cardiovascular diseases - the role of oxidative stress and inflammation*. *Curr Pharm Des*, 2014. 20(22).
162. Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris Nikolaos Papageorgiou, C., et al., *The role of nitric oxide on endothelial function*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012. 10(1).
163. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., et al., *Nitric oxide and endothelial dysfunction*. *Crit Care Clin*, 2020. 36(2).

164. Forstermann, U., Sessa, W. C., *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. 33(7).
165. Forstermann, U., Munzel, T., *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease - from marvel to menace*. Circulation, 2006. 113(13).
166. Zhao, X.-Q., *Pathogenesis of atherosclerosis*, in UpToDate. Dezember 2022, Waltham, MA.
167. Falk, E., *Pathogenesis of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(8 Suppl).
168. Forstermann, U., Xia, N., Li, H., *Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis*. Circ Res, 2017. 120(4).
169. Nieuwdorp, M., Mooij, H. L., Kroon, J., et al., *Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. 55(4).
170. Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., et al., *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel*. Eur Heart J, 2017. 38(32).
171. Senoner, T., Dichtl, W., *Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?* Nutrients, 2019. 11(9).
172. Tabas, I., *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. J Clin Invest, 2002. 110(7).
173. Vergallo, R., Crea, F., *Atherosclerotic plaque healing*. N Engl J Med, 2020. 383(9).
174. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. 362(6423).
175. Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., et al., *2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes*. Eur Heart J, 2020. 41(3).
176. Elsässer, H.-P., *Allgemeine Histologie*. 2021, Heidelberg.
177. Milici, A. J., Furie, M. B., Carley, W. W., *The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro*. Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1985. 82(18).
178. Claesson-Welsh, L., Dejana, E., McDonald, D. M., *Permeability of the endothelial barrier: Identifying and reconciling controversies*. Trends Mol Med, 2021. 27(4).
179. Mehta, D., Malik, A. B., *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiol Rev, 2006. 86(1).
180. Daneman, R., Prat, A., *The blood-brain barrier*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. 7(1).
181. Aird, W. C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. 100(2).
182. Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., et al., *Physiologie*. 4. Auflage 2021, Stuttgart.
183. Verkman, A. S., *Aquaporin water channels and endothelial cell function*. J Anat, 2002. 200(6).
184. Azzi, S., Hebda, J. K., Gavard, J., *Vascular permeability and drug delivery in cancers*. Front Oncol, 2013. 3.
185. Minshall, R. D., Malik, A. B., *Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability*. Handb Exp Pharmacol, 2006. 176.
186. Menard, S., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M., *Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens*. Mucosal Immunol, 2010. 3(3).
187. Wettschureck, N., Strilic, B., Offermanns, S., *Passing the vascular barrier: endothelial signaling processes controlling extravasation*. Physiol Rev, 2019. 99(3).
188. Nagy, J. A., Benjamin, L., Zeng, H., et al., *Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis*. Angiogenesis, 2008. 11(2).
189. Feng, D., Nagy, J. A., Dvorak, H. F., et al., *Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals*. Microsc Res Tech, 2002. 57(5).
190. Dvorak, A. M., Feng, D., *The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle*. J Histochem Cytochem, 2001. 49(4).
191. Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., et al., *Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors - a review*. Cardiovasc Res, 2018. 114(1).
192. Turner, J. R., Buschmann, M. M., Romero-Calvo, I., et al., *The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability*. Semin Cell Dev Biol, 2014. 36.

193. Hofmann, S., Grasberger, H., Jung, P., et al., *The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression*. Eur J Med Res, 2002. 7(4).
194. Turksen, K., *Permeability Barrier: methods and protocols*. 2021, Ottawa.
195. Oami, T., Coopersmith, C. M., *Measurement of intestinal permeability during sepsis*. Methods Mol Biol, 2021. 2321.
196. Grimm, T., *Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten Kiefernextraktes*. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005.
197. Minko, T., *Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. 56(4).
198. Sharon, N., Lis, H., *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. Glycobiology, 2004. 14(11).
199. Robert Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin 32/2017*. 2017.
200. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S. B., *A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics*. Acta Histochem, 2011. 113(3).
201. Mason, C. P., Tarr, A. W., *Human lectins and their roles in viral infections*. Molecules, 2015. 20(2).
202. Pöhlmann, S., Schmitt, C., *Orthomyxoviren: Influenza*, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 9. Auflage 2020, Heidelberg.
203. Allen, P. Z., Connelly, M. C., Apicella, M. A., *Interaction of lectins with Neisseria gonorrhoeae*. Can J Microbiol, 1980. 26(4).
204. Bies, C., Lehr, C. M., Woodley, J. F., *Lectin-mediated drug targeting: history and applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. 56(4).
205. De Juan, L. L., Recio, V. G., Lopez, P. J., et al., *Pharmaceutical applications of lectins*. J Drug Deliv Sci Technol, 2017. 42.
206. Van Damme, E. J. M., *35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine*. Glycoconj J, 2022. 39(1).
207. *Fachinformation Kadcyła®*. Stand Sept. 2022. Roche Pharma AG.
208. *Fachinformation Enhertu®*. Stand Aug. 2022. Daiichi Sankyo Europe GmbH.
209. Fu, L. L., Zhou, C. C., Yao, S., et al., *Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents*. Int J Biochem Cell Biol, 2011. 43(10).
210. Thies, A., Dautel, P., Meyer, A., et al., *Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model*. Br J Cancer, 2008. 98(1).
211. Tazaki, K., Yoshida, K., *The bark lectin of Robinia pseudoacacia - purification and partial characterization*. Plant Cell Physiol, 1992. 33(2).
212. Frederich, M., Marcowycz, A., Cieckiewicz, E., et al., *In vitro anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest*. Planta Med, 2009. 75(15).
213. Santos, A., Napoleao, T., Bezerra, R., *Strategies to obtain lectins from distinct sources*, in Adv Exp Med Biol. Vol. 63. 2013.
214. Kornfeld, R., Kornfeld, S., *The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes*. J Biol Chem, 1970. 245(10).
215. Selby, C., *Interference in immunoassay*. Ann Clin Biochem, 1999. 36 (Pt 6).
216. Rogers, D. J., Loveless, R. W., *Hemagglutinins of the phaeophyceae and non-specific aggregation phenomena by polyphenols*. Bot Mar, 1985. 28(4).
217. Jakobek, L., *Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins*. Food Chem, 2015. 175.
218. Kroll, N. G., Rawel, H. M., Rohn, S., *Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds*. Food Sci Technol Res, 2003. 9(3).
219. Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., Lynn, P. Y., *Nature of polyphenol-protein interactions*. J Agric Food Chem, 1996. 44(1).
220. Schefer, S., Oest, M., Rohn, S., *Interactions between phenolic acids, proteins, and carbohydrates - influence on dough and bread properties*. Foods, 2021. 10(11).
221. Perot, M., Lupi, R., Guyot, S., et al., *Polyphenol interactions mitigate the immunogenicity and allergenicity of gliadins*. J Agric Food Chem, 2017. 65(31).
222. Wu, W. J., Li, R. C., Li, X. L., et al., *Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry*. Viruses, 2016. 8(1).
223. Wang, T. H., Lee, M. H., Su, N. W., *Screening of lectins by an enzyme-linked adsorbent assay*. Food Chem, 2009. 113(4).

224. Akbar, M., Essa, M. M., Daradkeh, G., et al., *Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress*. Brain Res, 2016. 1637.
225. Friedman, J. R., Nunnari, J., *Mitochondrial form and function*. Nature, 2014. 505(7483).
226. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., Norberg, E., *The role of mitochondria in metabolism and cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. 482(3).
227. Taniyama, Y., Griendling, K. K., *Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms*. Hypertension, 2003. 42(6).
228. Dias, V., Junn, E., Mouradian, M. M., *The role of oxidative stress in Parkinson's disease*. J Parkinsons Dis, 2013. 3(4).
229. Incalza, M. A., D'oria, R., Natalicchio, A., et al., *Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases*. Vascul Pharmacol, 2018. 100.
230. Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., et al., *Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications*. Cell Death Dis, 2018. 9(2).
231. Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., et al., *Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases*. Front Physiol, 2018. 9.
232. Zhao, B. L., *The health effects of tea polyphenols and their antioxidant mechanism*. J Clin Biochem Nutr, 2006. 38(2).
233. Ruskovska, T., Maksimova, V., Milenkovic, D., *Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - an overview and perspective*. Br J Nutr, 2020. 123(3).
234. Bucciantini, M., Leri, M., Nardiello, P., et al., *Olive polyphenols: antioxidant and anti-inflammatory properties*. Antioxidants 2021. 10(7).
235. Singh, A., Faccenda, D., Campanella, M., *Pharmacological advances in mitochondrial therapy*. EBioMedicine, 2021. 65.
236. Pallas, M., Casadesus, G., Smith, M. A., et al., *Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection*. Curr Neurovasc Res, 2009. 6(1).
237. Serra, D., Rufino, A. T., Mendes, A. F., et al., *Resveratrol modulates cytokine-induced JAK/STAT activation more efficiently than 5-aminosalicylic acid: an in vitro approach*. PLoS One, 2014. 9(10).
238. Robb, E. L., Page, M. M., Wiens, B. E., et al., *Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: specific and progressive induction of MnSOD*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 367(2).
239. Carrasco-Pozo, C., Mizgier, M. L., Speisky, H., et al., *Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells*. Chem Biol Interact, 2012. 195(3).
240. Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Speisky, H., *Protection by apple peel polyphenols against indometacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells*. J Pharm Pharmacol, 2010. 62(7).
241. *Fachinformation Indometacin AL 50*. Stand März 2021. Aliud Pharma GmbH.
242. Dorta, D. J., Pigoso, A. A., Mingatto, F. E., et al., *The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes*. Chem Biol Interact, 2005. 152(2-3).
243. Sumantran, V. N., *Cellular chemosensitivity assays: an overview*. Methods Mol Biol, 2011. 731.
244. Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y., *Cell proliferation and cytotoxicity assays*. Current Pharm Biotechnol, 2016. 17(14).
245. Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A., *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?* Am J Clin Nutr, 2005. 81(1 Suppl).
246. Williams, R. J., Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C., *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* Free Radic Biol Med, 2004. 36(7).
247. Gebicki, J. M., Nauser, T., *Fast antioxidant reaction of polyphenols and their metabolites*. Antioxidants, 2021. 10(8).
248. Nauser, T., Gebicki, J. M., *Addition of carbon-centered radicals to aromatic antioxidants: mechanistic aspects*. Phys Chem Chem Phys, 2020. 22(42).
249. Kawai, Y., *Beta-Glucuronidase activity and mitochondrial dysfunction: the sites where flavonoid glucuronides act as anti-inflammatory agents*. J Clin Biochem Nutr, 2014. 54(3).

250. Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., et al., *Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid*. J Nutr Biochem, 2010. 21(5).
251. Skemiene, K., Liobikas, J., Borutaite, V., *Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury*. FEBS J, 2015. 282(5).
252. Moini, H., Arroyo, A., Vaya, J., et al., *Bioflavonoid effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state*. Redox Rep, 1999. 4(1-2).
253. Tsujimoto, Y., *Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes*. Cell Death Differ, 1997. 4(6).
254. Owen, M. R., Doran, E., Halestrap, A. P., *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain*. Biochem J, 2000. 348.
255. Miller, R. A., Chu, Q., Xie, J., et al., *Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP*. Nature, 2013. 494(7436).
256. Ralph, S. J., Low, P., Dong, L., et al., *Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2006. 1(3).
257. *Fachinformation Sirturo®*. Stand Nov. 2021. Janssen-Cilag International NV.
258. Tsuji, A., Akao, T., Masuya, T., et al., *IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism*. J Biol Chem, 2020. 295(21).
259. Múlek, M., Högger, P., *Highly sensitive analysis of polyphenols and their metabolites in human blood cells using dispersive SPE extraction and LC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 2015. 407(7).
260. Espin, J. C., Gonzalez-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F. A., *The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols*. Biochem Pharmacol, 2017. 139.
261. Múlek, M., Seefried, L., Genest, F., et al., *Distribution of constituents and metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol) into serum, blood cells and synovial fluid of patients with severe osteoarthritis: a randomized controlled trial*. Nutrients, 2017. 9(5).
262. Li, M., Hagerman, A. E., *Interactions between plasma proteins and naturally occurring polyphenols*. Curr Drug Metab, 2013. 14(4).
263. Serafini, M., Testa, M. F., Villano, D., et al., *Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk*. Free Radic Biol Med, 2009. 46(6).
264. Perez-Gregorio, M. R., Simal-Gandara, J., *A critical review of the characterization of polyphenol-protein interactions and of their potential use for improving food quality*. Curr Pharm Des, 2017. 23(19).
265. Perron, N. R., Brumaghim, J. L., *A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding*. Cell Biochem Biophys, 2009. 53(2).
266. Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., et al., *Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin*. Free Radic Res, 2001. 35(6).
267. Huang, Y., Sun, H. Y., Qin, X. L., et al., *A UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of free and total forms of a phenolic acid and two flavonoids in rat plasma and its application to comparative pharmacokinetic studies of Polygonum capitatum extract in rats*. Molecules, 2017. 22(3).
268. Mullen, W., Edwards, C. A., Crozier, A., *Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions*. Br J Nutr, 2006. 96(1).
269. Bartolome, B., Estrella, I., Hernandez, M. T., *Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA)*. J Food Sci, 2000. 65(4).
270. Xiao, J. B., Kai, G. Y., *A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity and structure-affinity relationship*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. 52(1-3).
271. Minkus, S., Bieber, S., Moser, S., et al., *Optimization of electrospray ionization parameters in an RPLC-HILIC-MS/MS coupling by design of experiment*. AFIN-TS Forum, 2020.
272. Gillet, L. C., Navarro, P., Tate, S., et al., *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis*. Mol Cell Proteom, 2012. 11(6).
273. Ivanisevic, J., Want, E. J., *From samples to insights into metabolism: uncovering biologically relevant information in LC-HRMS metabolomics data*. Metabolites, 2019. 9(12).

274. Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J. M., et al., *Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics*. *Metabolomics*, 2013. 9(1).
275. Bonner, R., Hopfgartner, G., *SWATH data independent acquisition mass spectrometry for metabolomics*. *Trends Analyt Chem*, 2019. 120.
276. Hopfgartner, G., Tonoli, D., Varesio, E., *High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices*. *Anal Bioanal Chem*, 2012. 402(8).
277. Anjo, S. I., Santa, C., Manadas, B., *SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications*. *Proteomics*, 2017. 17(3-4).
278. *Improved data quality using variable Q1 window widths in SWATH acquisition*. *RUO-MKT-02-2879-B*. 2017.
279. Roura, E., Andres-Lacueva, C., Jauregui, O., et al., *Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans*. *J Agric Food Chem*, 2005. 53(16).
280. Donovan, J. L., Bell, J. R., Kasim-Karakas, S., et al., *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *J Nutr*, 1999. 129(9).
281. Mullen, W., Borges, G., Lean, M. E. J., et al., *Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a polyphenol-rich juice drink*. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(4).
282. Feliciano, R. P., Boeres, A., Massacessi, L., et al., *Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols*. *Arch Biochem Biophys*, 2016. 599.
283. Hidalgo-Liberona, N., Gonzalez-Dominguez, R., Vegas, E., et al., *Increased intestinal permeability in older subjects impacts the beneficial effects of dietary polyphenols by modulating their bioavailability*. *J Agric Food Chem*, 2020. 68(44).
284. Correia, M. S. P., Jain, A., Alotaibi, W., et al., *Comparative dietary sulfated metabolome analysis reveals unknown metabolic interactions of the gut microbiome and the human host*. *Free Radic Biol Med*, 2020. 160.
285. Fumeaux, R., Menozzi-Smarrito, C., Stalmach, A., et al., *First synthesis, characterization, and evidence for the presence of hydroxycinnamic acid sulfate and glucuronide conjugates in human biological fluids as a result of coffee consumption*. *Org Biomol Chem*, 2010. 8(22).
286. Gomez-Juaristi, M., Martinez-Lopez, S., Sarria, B., et al., *Bioavailability of hydroxycinnamates in an instant green/roasted coffee blend in humans. Identification of novel colonic metabolites*. *Food Funct*, 2018. 9(1).
287. Anesi, A., Mena, P., Bub, A., et al., *Quantification of urinary phenyl-gamma-valerolactones and related valeric acids in human urine on consumption of apples*. *Metabolites*, 2019. 9(11).
288. Borges, G., Ottaviani, J. I., Van Der Hoof, J. J. J., et al., *Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: a review of recent findings*. *Mol Asp Med*, 2018. 61.
289. Mena, P., Bresciani, L., Brindani, N., et al., *Phenyl-gamma-valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: synthesis, analysis, bioavailability and bioactivity*. *Nat Prod Rep*, 2019. 36(5).
290. Gomez-Juaristi, M., Sarria, B., Martinez-Lopez, S., et al., *Flavanol bioavailability in two cocoa products with different phenolic content. A comparative study in humans*. *Nutrients*, 2019. 11(7).
291. Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S., et al., *Metabolomic fingerprint in patients at high risk of cardiovascular disease by cocoa intervention*. *Mol Nutr Food Res*, 2013. 57(6).
292. De Ferrars, R. M., Czank, C., Zhang, Q., et al., *The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans*. *Br J Pharmacol*, 2014. 171(13).
293. Pimpao, R. C., Ventura, M. R., Ferreira, R. B., et al., *Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit puree*. *Br J Nutr*, 2015. 113(3).
294. Untergehrer, M., Kiermaier, J., Reintjes, S., et al., *Identification of phase-II metabolites from human serum samples after oral intake of a willow bark extract*. *Phytomedicine*, 2019. 57.
295. Roowi, S., Stalmach, A., Mullen, W., et al., *Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans*. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(2).
296. Suarez, M., Romero, M. P., Macia, A., et al., *Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 2009. 877(32).

297. Angelino, D., Carregosa, D., Domenech-Coca, C., et al., *5-(Hydroxyphenyl)-gamma-valerolactone-sulfate, a key microbial metabolite of flavan-3-ols, is able to reach the brain: evidence from different in silico, in vitro and in vivo experimental models*. *Nutrients*, 2019. 11(11).
298. Henning, S. M., Wang, P. W., Abgaryan, N., et al., *Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer*. *Mol Nutr Food Res*, 2013. 57(3).
299. Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C., et al., *Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans*. *J Nutr Biochem*, 2006. 17(1).
300. Nardini, M., Forte, M., Vrhovsek, U., et al., *White wine phenolics are absorbed and extensively metabolized in humans*. *J Agric Food Chem*, 2009. 57(7).
301. Pimpao, R. C., Dew, T., Figueira, M. E., et al., *Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers*. *Mol Nutr Food Res*, 2014. 58(7).
302. Wong, C. C., Meinel, W., Glatt, H. R., et al., *In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans*. *J Nutr Biochem*, 2010. 21(11).
303. Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., *Phase II drug metabolizing enzymes* *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc, Czech Repub*, 2010. 154(2).
304. Virgili, F., Pagana, G., Bourne, L., et al., *Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (Pinus maritima) bark extract*. *Free Radic Biol Med*, 2000. 28(8).
305. Aragones, G., Danesi, F., Del Rio, D., et al., *The importance of studying cell metabolism when testing the bioactivity of phenolic compounds*. *Trends Food Sci Technol*, 2017. 69.
306. Ding, Y., Peng, M., Zhang, T., et al., *Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with beta-glucuronidase and sulfatase: a review of bio-analytical methods*. *Biomed Chromatogr*, 2013. 27(10).
307. Quifer-Rada, P., Martinez-Huelamo, M., Lamuela-Raventos, R. M., *Is enzymatic hydrolysis a reliable analytical strategy to quantify glucuronidated and sulfated polyphenol metabolites in human fluids?* *Food Funct*, 2017. 8(7).
308. Raetz, M., Bonner, R., Hopfgartner, G., *SWATH-MS for metabolomics and lipidomics: critical aspects of qualitative and quantitative analysis*. *Metabolomics*, 2020. 16(6).
309. Guy, P. A., Renouf, M., Barron, D., et al., *Quantitative analysis of plasma caffeic and ferulic acid equivalents by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr B*, 2009. 877(31).
310. Huang, C., Chen, Y., Zhou, T., et al., *Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases*. *Xenobiotica*, 2009. 39(4).
311. Mullen, W., Borges, G., Donovan, J. L., et al., *Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2009. 89(6).
312. Ottaviani, J. I., Momma, T. Y., Kuhnle, G. K., et al., *Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards*. *Free Radic Biol Med*, 2012. 52(8).
313. Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., et al., *Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Chromatogr A*, 2009. 1216(43).
314. Lee, M. J., Wang, Z. Y., Li, H., et al., *Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1995. 4(4).
315. Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., et al., *Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat*. *Free Radic Biol Med*, 2003. 34(7).
316. O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., et al., *Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism*. *Biochem Pharmacol*, 2003. 65(3).
317. Gong, Z. G., Hu, J., Wu, X., et al., *The recent developments in sample preparation for mass spectrometry-based metabolomics*. *Crit Rev Anal Chem*, 2017. 47(4).
318. Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., et al., *Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: when less is more*. *Anal Chem*, 2013. 85(1).

319. Tomas-Barberan, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marin, A., et al., *A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans*. J Agric Food Chem, 2007. 55(10).
320. Rowland, A., Miners, J. O., Mackenzie, P. I., *The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. 45(6).
321. Bowen, C. L., Volpatti, J., Cades, J., et al., *Evaluation of glucuronide metabolite stability in dried blood spots*. Bioanalysis, 2012. 4(23).
322. Regan, S. L., Maggs, J. L., Hammond, T. G., et al., *Acyl glucuronides: the good, the bad and the ugly*. Biopharm Drug Dispos 2010. 31(7).
323. Yang, X. X., Hu, Z. P., Boelsterli, U. A., et al., *Drug acyl glucuronides: reactivity and analytical implication*. Curr Pharm Anal, 2006. 2(3).
324. Yuan, L., Xu, X. S., Ji, Q. C., *Challenges and recommendations in developing LC-MS/MS bioanalytical assays of labile glucuronides and parent compounds in the presence of glucuronide metabolites*. Bioanalysis, 2020. 12(9).
325. Wang, L. F., Zhang, D. L., Swaminathan, A., et al., *Glucuronidation as a major metabolic clearance pathway of C-14-labeled muraglitazar in humans: metabolic profiles in subjects with or without bile collection*. Drug Metab Dispos, 2006. 34(3).
326. Patel, S. R., *Bioanalytical challenges and strategies for accurately measuring acyl glucuronide metabolites in biological fluids*. Biomed Chromatogr, 2020. 34(1).
327. Smith, D. A., Hammond, T., Baillie, T. A., *Safety assessment of acyl glucuronides - a simplified paradigm*. Drug Metab Dispos, 2018. 46(6).
328. Zhu, Z. J., Schultz, A. W., Wang, J. H., et al., *Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database*. Nat Protoc, 2013. 8(3).
329. Kind, T., Fiehn, O., *Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm*. BMC Bioinform, 2006. 7.
330. Mihaleva, V. V., Vorst, O., Maliepaard, C., et al., *Accurate mass error correction in liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry based metabolomics*. Metabolomics, 2008. 4(2).
331. Halwachs-Baumann, G., *Labormedizin*. 2011, Wien.
332. Beck, S., *Fragmentation behavior of EDTA complexes under different activation conditions*. J Mass Spectrom, 2021. 56(7).
333. Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., et al., *Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2008. 627(1).
334. Wu, B. J., Basu, S., Meng, S. N., et al., *Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: insights into the structural basis*. Curr Drug Metab, 2011. 12(9).
335. Meng, S. N., Wu, B. J., Singh, R., et al., *SULT1A3-mediated regiospecific 7-O-sulfation of flavonoids in Caco-2 cells can be explained by the relevant molecular docking studies*. Mol Pharm, 2012. 9(4).
336. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., et al., *Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism*. Toxicol Sci, 2006. 90(1).
337. Cortes-Martin, A., Selma, M. V., Espin, J. C., et al., *The human metabolism of nuts proanthocyanidins does not reveal urinary metabolites consistent with distinctive gut microbiota metabolotypes*. Mol Nutr Food Res, 2019. 63(2).
338. Mulek, M., *Distribution and metabolism of constituents and metabolites of a standardized maritime pine bark extract (Pycnogenol) in human serum, blood cells and synovial fluid of patients with severe osteoarthritis*. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, 2015.
339. Mulek, M., Fekete, A., Wiest, J., et al., *Profiling a gut microbiota-generated catechin metabolite's fate in human blood cells using a metabolomic approach*. J Pharm Biomed Anal, 2015. 114.
340. Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., et al., *Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence*. Annu Rev Food Sci Technol, 2017. 8.
341. Goodrich, K. M., Neilson, A. P., *Simultaneous UPLC-MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats*. J Chromatogr B, 2014. 958.
342. Passon, M., Buhlmeier, J., Zimmermann, B. F., et al., *Polyphenol phase-II metabolites are detectable in human plasma after ingestion of C-13 labeled spinach - a pilot intervention trial in young healthy adults*. Mol Nutr Food Res, 2018. 62(10).

343. Williamson, G., Clifford, M. N., *Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?* Br J Nutr, 2010. 104.
344. Cueva, C., Gil-Sanchez, I., Ayuda-Duran, B., et al., *An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health.* Molecules, 2017. 22(1).
345. Ku, S. K., Kim, T. H., Bae, J. S., *Anticoagulant activities of persicarin and isorhamnetin.* Vascul Pharmacol, 2013. 58(4).
346. Di Gesso, J. L., Kerr, J. S., Zhang, Q. Z., et al., *Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor-secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes.* Mol Nutr Food Res, 2015. 59(6).
347. Warner, E. F., Zhang, Q. Z., Raheem, K. S., et al., *Common phenolic metabolites of flavonoids, but not their unmetabolized precursors, reduce the secretion of vascular cellular adhesion molecules by human endothelial cells.* J Nutr, 2016. 146(3).
348. O' Leary, K. A., De Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., et al., *Effect of flavonoids and Vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription.* Mutat Res, 2004. 551(1-2).
349. Van Rymenant, E., Van Camp, J., Pauwels, B., et al., *Ferulic acid-4-O-sulfate rather than ferulic acid relaxes arteries and lowers blood pressure in mice.* J Nutr Biochem, 2017. 44.
350. Fang, S. H., Hou, Y. C., Chang, W. C., et al., *Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock.* Life Sci, 2003. 74(6).
351. Amin, H. P., Czank, C., Raheem, S., et al., *Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells.* Mol Nutr Food Res, 2015. 59(6).
352. Figueira, I., Garcia, G., Pimpao, R. C., et al., *Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection.* Sci Rep, 2017. 7.
353. Teles, Y. C. F., Souza, M. S. R., De Souza, M. D. V., *Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities.* Molecules, 2018. 23(2).
354. Ottaviani, J. I., Kwik-Urbe, C., Keen, C. L., et al., *Intake of dietary procyanidins does not contribute to the pool of circulating flavanols in humans.* Am J Clin Nutr, 2012. 95(4).
355. Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., et al., *Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models.* Br J Nutr, 2010. 103(7).
356. Ou, K., Sarnoski, P., Schneider, K. R., et al., *Microbial catabolism of procyanidins by human gut microbiota.* Mol Nutr Food Res, 2014. 58(11).
357. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings* Adv Drug Deliv Rev, 2001. 46(1-3).
358. Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., et al., *HMDB: a knowledgebase for the human metabolome.* Nucleic Acids Res, 2009. 37.
359. Grimm, T., Chovanova, Z., Muchova, J., et al., *Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol).* J Inflamm 2006. 3.
360. Lomholt, S., Mellekjaer, A., Iversen, M. B., et al., *Resveratrol displays anti-inflammatory properties in an ex vivo model of immune mediated inflammatory arthritis.* BMC Rheumatol, 2018. 2.
361. Pirkmajer, S., Chibalin, A. V., *Serum starvation: caveat emptor.* Am J Physiol Cell Physiol, 2011. 301(2).
362. Schmitz, S., *Der Experimentator - Zellkultur.* 3. Auflage 2011, Heidelberg.
363. Ma, C., Wang, X. F., *In vitro assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process.* Cold Spring Harb Protoc, 2008. 2008.
364. Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells.* Nat Protoc, 2007. 2(3).
365. Mockl, L., Hirn, S., Torrano, A. A., et al., *The glycocalyx regulates the uptake of nanoparticles by human endothelial cells in vitro.* Nanomed J, 2017. 12(3).
366. Jimenez, N., Krouwer, V. J. D., Post, J. A., *A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro.* Cytotechnology, 2013. 65(1).
367. Diebel, M. E., Martin, J. V., Liberati, D. M., et al., *The temporal response and mechanism of action of tranexamic acid in endothelial glycocalyx degradation.* J Trauma Acute Care Surg, 2018. 84(1).

368. Eisenreich, A., Bogdanov, V. Y., Zakrzewicz, A., et al., *Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells*. *Circ Res*, 2009. 104(5).
369. Kim, D. S., Kwon, H. M., Choi, J. S., et al., *Resveratrol blunts tumor necrosis factor-alpha-induced monocyte adhesion and transmigration*. *Nutr Res Pract*, 2007. 1(4).
370. Murphy, K., Weaver, C., *Janeway Immunologie*. 9. Auflage 2018, Berlin.
371. Koga, T., Meydani, M., *Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells*. *Am J Clin Nutr*, 2001. 73(5).
372. *DIN ISO 10993-5:2009-10: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfung auf in-vitro-Zytotoxizität*.
373. Russell, F. D., Hamilton, K. D., *Nutrient deprivation increases vulnerability of endothelial cells to proinflammatory insults*. *Free Radic Biol Med*, 2014. 67.
374. Ma, X., *TNF-alpha and IL-12: a balancing act in macrophage functioning*. *Microbes Infect*, 2001. 3(2).
375. Chappell, D., Jacob, M., Paul, O., et al., *The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell - an impressive structure ex vivo but not in culture*. *Circ Res*, 2009. 104(11).
376. Reine, T. M., Kusche-Gullberg, M., Feta, A., et al., *Heparan sulfate expression is affected by inflammatory stimuli in primary human endothelial cells*. *Glycoconj J*, 2012. 29(1).
377. Ihrcke, N. S., Wrenshall, L. E., Lindman, B. J., et al., *Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions*. *Immunol Today*, 1993. 14(10).
378. Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., et al., *Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans*, in *Essentials of Glycobiology*. 2015, Cold Spring Harbor (NY).
379. Potter, D. R., Damiano, E. R., *The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro*. *Circ Res*, 2008. 102(7).
380. Medina-Leyte, D. J., Dominguez-Perez, M., Mercado, I., et al., *Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: a review*. *Appli Sci*, 2020. 10(3).
381. Delgadillo, L. F., Lomakina, E. B., Kuebel, J., et al., *Changes in endothelial glycocalyx layer protective ability after inflammatory stimulus*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021. 320(2).
382. Wang, G., Kostidis, S., Tiemeier, G. L., et al., *Shear stress regulation of endothelial glycocalyx structure is determined by glucobiosynthesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. 40(2).
383. Chia, P. Y., Teo, A., Yeo, T. W., *Overview of the assessment of endothelial function in humans*. *Front Med*, 2020. 7.
384. Watson, C. A., Camerabenson, L., Palmercrocker, R., et al., *Variability among human umbilical vein endothelial cultures*. *Science*, 1995. 268(5209).
385. Singh, A., Ramnath, R. D., Foster, R. R., et al., *Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx*. *PLoS One*, 2013. 8(2).
386. Adjuto-Saccone, M., Soubeyran, P., Garcia, J., et al., *TNF-alpha induces endothelial-mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma*. *Cell Death Dis*, 2021. 12(7).
387. Piera-Velazquez, S., Jimenez, S. A., *Endothelial to mesenchymal transition: role in physiology and in the pathogenesis of human diseases*. *Physiol Rev*, 2019. 99(2).
388. Maleszewska, M., Moonen, J., Huijkman, N., et al., *IL-1 beta and TGF beta 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF kappa B-dependent manner*. *Immunobiology*, 2013. 218(4).
389. Huang, X. B., Pan, L. G., Pu, H., et al., *Loss of caveolin-1 promotes endothelial-mesenchymal transition during sepsis: a membrane proteomic study*. *Int J Mol Med*, 2013. 32(3).
390. Martins-Green, M., Petreaca, M., Yao, M., *An assay system for in vitro detection of permeability in human endothelium*. *Methods Enzymol*, 2008. 443.
391. Watts, M. E., Arnold, S., Chaplin, D. J., *Changes in coagulation and permeability properties of human endothelial cells in vitro induced by TNF-alpha or 5,6 MeXAA*. *Br J Cancer*, 1996. 74.
392. Arakawa, T., Kita, Y., Timasheff, S. N., *Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide*. *Biophys Chem*, 2007. 131(1-3).
393. Miyazaki, K., Hashimoto, K., Sato, M., et al., *Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF-alpha in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy*. *Pediatr Res*, 2017. 81(6).

394. Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*. J Lab Autom, 2015. 20(2).
395. Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., et al., *Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies*. Fluids Barriers CNS, 2013. 10(1).
396. Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J., *Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study*. J Physiol, 1990. 429.
397. Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., Artursson, P., *Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers*. Nat Protoc, 2007. 2(9).
398. Colas-Algora, N., Garcia-Weber, D., Cacho-Navas, C., et al., *Compensatory increase of VE-cadherin expression through ETS1 regulates endothelial barrier function in response to TNF-alpha*. Cell Mol Life Sci, 2020. 77(11).
399. Frost, T. S., Jiang, L., Lynch, R. M., et al., *Permeability of epithelial/endothelial barriers in Transwells and microfluidic bilayer devices*. Micromachines, 2019. 10(8).
400. Kluger, M. S., Clark, P. R., Tellides, G., et al., *Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. 33(3).
401. Bischoff, I., Hornburger, M. C., Mayer, B. A., et al., *Pitfalls in assessing microvascular endothelial barrier function: impedance-based devices versus the classic macromolecular tracer assay*. Sci Rep, 2016. 6.
402. Noble, J. E., Bailey, M. J. A., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 2009. 463.
403. Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J. L., *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. Nat Protoc, 2008. 3(7).
404. Polson, C., Sarkar, P., Incedon, B., et al., *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B, 2003. 785(2).
405. Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., et al., *Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies*. Metabolomics, 2018. 14(6).
406. Liu, Y. B., Peterson, D. A., Kimura, H., et al., *Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction*. J Neurochem, 1997. 69(2).
407. Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P. D., *Analysis of cell viability by the MTT assay*. Cold Spring Harb Protoc, 2018. 2018(6).