

**Verteilungsvorgänge und Metabolismus
ausgewählter Verbindungen eines
standardisierten Kiefernrintenextraktes in
menschlichem Blut**



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Max Kurlbaum
aus Würzburg

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

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

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalpublikation:

Kurlbaum M, Högger P.

Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP).

J Pharm Biomed Anal. 2011 Jan 5;54(1):127-32. Epub 2010 Aug 6.

Posterbeitrag:

Kurlbaum M, Uhlenhut K, Högger P.

Polyphenole im Kiefernextrakt- sekundäre Pflanzenstoffe komplexer

Zusammensetzung und vielfältiger Wirkung.

ChemSystem 2007, Würzburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich natürlich bei Frau Prof. Dr. Petra Högger für das interessante Thema bedanken. Ihre vielfältigen Anregungen und Tipps bei verschiedensten Fragestellungen ermöglichten die Entstehung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt für das mir entgegengebrachte Vertrauen bezüglich der verantwortungsvollen Aufgabe in der Lehre im Fach Biochemie und klinische Chemie.

Herr Prof. Dr. Christoph Sottriffer stand mir engagiert mit Rat und Tat bei verschiedenen Fragen rund um die theoretischen Hintergründe und die praktische Durchführung der Berechnung molekularer Wechselwirkungen beiseite, hierfür ein herzliches Dankeschön. An dieser Stelle gilt mein Dank auch den Mitarbeitern seines Arbeitskreises, insbesondere David Zilian, für die praktischen Tipps zum Umgang mit der Software.

Bei Frau Dr. Klinker und Herrn Dr. Opitz vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg bedanke ich mich sehr für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die praktischen Tipps bei verschiedenen experimentellen Durchführungen.

Natürlich standen mir auch die Mitarbeiter der Institutswerkstatt, Herr Völker, Herr Vollmuth und Herr Walter stets bei vielen technischen Fragen zur Seite und konnten durch mehrere selbstgebaute Apparaturen zur Umsetzung dieser Arbeit beitragen. Desweiteren gilt mein Dank der Firma Horphag Research für die Bereitstellung des Kiefernrintenextraktes.

Herrn Dr. Michael Menzel danke ich besonders für die Durchführung der gaschromatographischen Messungen, die stets erhellenden Gespräche während der Teepausen, sowie die hilfreichen Tipps bei verschiedensten nicht nur lebensmittelrechtlichen Fragestellungen.

Die Betreuung des Praktikums klinische Chemie war ein wichtiger Teil meiner Arbeit. Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, sowie die Geduld und guten Nerven, die gelegentlich für die Praktikumsaufsicht nötig waren, möchte ich mich deshalb bei meinen Kolleginnen und Kollegen Steffi Bank, Diana Kesetovicova, Max Tischer, Klaus Uhlenhut und Frederic Vollmers bedanken.

Meinen Kollegen Mirjam Gnadt, Beatrice Trammer, Roswitha Scheblein, Daniel Baumann, Frederic Vollmers und Klaus Uhlenhut danke ich für die tolle Zeit und die gute Stimmung, die wir im Arbeitskreis hatten.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern sowie bei meiner liebsten Anka für ihre Unterstützung bedanken.

Ne discere cessa
(Marcus Porcius Cato)

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1	Pharmakokinetik der Phenolcarbonsäuren und Flavonoide.....	21
1.1	Bildung in der Pflanze.....	21
1.2	Transformation vor dem Übergang in den Darm.....	24
1.3	Interaktionen mit der Darmflora und Resorption.....	26
1.4	Transport im Blut.....	28
1.5	Verteilungsräume im Körper.....	29
1.6	Ausscheidung.....	30
1.7	Ein standardisierter Extrakt der Meereskiefer (<i>pinus pinaster</i>) als Untersuchungsgegenstand.....	31

B. Allgemeiner Teil

2	Identifizierung verschiedener Fettsäuren im Kiefernrintenextrakt mittels Gaschromatographie.....	35
2.1	Untersuchung des Extraktes auf Fettsäuren.....	35
2.2	Ergebnisse.....	35
2.3	Diskussion.....	36
3	Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines standardisierten Kiefernrintenextraktes.....	37
3.1	Plasmaproteine und ihre Bindungsstellen.....	37
3.2	Auswirkungen der Plasmaproteinbindung auf die Pharmakokinetik der Xenobiotika.....	38
3.3	Methoden zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung.....	39
3.4	Auswahl der Methode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung.....	41
3.4.1	Bestimmung der Plasmaproteinbindung mit immobilisiertem humanem Albumin.....	43
3.4.2	Theoretischer Hintergrund der HPAC.....	44
3.4.3	Methodenevaluierung der high performance affinity chromatography.....	45

3.4.4	Bindung verschiedener Extraktbestandteile der Meereskiefer an immobilisiertes humanes Albumin.....	48
3.5	Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration.....	53
3.5.1	Prinzip der Bestimmung.....	53
3.5.2	Durchführung der Ultrafiltration.....	54
3.5.3	Ergebnisse.....	56
3.6	Vergleich zwischen HPAC und Ultrafiltration	60
4	Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen.....	64
4.1	Problemstellung.....	64
4.2	Prinzip der Bestimmung.....	65
4.3	Verteilung der Substanzen zwischen mononukleären Zellen und humanem Plasma.....	68
4.3.1	Ergebnisse.....	68
4.3.2	Diskussion.....	70
4.4	Verteilung der Substanzen zwischen Erythrozyten und humanem Plasma.....	72
4.4.1	Ergebnisse.....	72
4.4.2	Diskussion.....	75
4.5	Verteilung der Substanzen zwischen Erythrozyten und humanem Plasma unter Verapamilzugabe.....	78
4.5.1	Prinzip der Bestimmung.....	78
4.5.2	Ergebnisse.....	79
4.5.3	Diskussion.....	81
4.6	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen Erythrozyten und humanem Plasma durch Phenylalanin und Tryptophan.....	83
4.6.1	Prinzip der Bestimmung.....	83
4.6.2	Ergebnisse.....	84
4.6.3	Diskussion.....	86
4.7	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phloretin.....	88
4.7.1	Prinzip der Bestimmung.....	88

4.7.2	Ergebnisse.....	89
4.8	Computergestützter Vergleich physikalischer Eigenschaften der Glucose und des Metaboliten M1.....	90
4.8.1	Molekülstruktur und Überlagerungsberechnungen.....	90
4.8.2	Diskussion.....	95
4.9	Abschließende Betrachtungen.....	97
5	Untersuchungen zu metabolischen Veränderungen verschiedener Kiefernrindeextraktbestandteile und des Metaboliten M1 durch Erythrozyten und mononukleäre Zellen.....	104
5.1	Metabolische Aktivität der Erythrozyten und mononukleären Zellen.....	104
5.2	Prinzip der Bestimmung.....	106
5.3	Ergebnisse.....	107
5.3.1	Screening auf Metabolite.....	107
5.3.2	Identifizierung möglicher Glutathion-Addukte.....	109
5.4	Diskussion.....	112
5.4.1	Metabolitenspektrum in mononukleären Zellen.....	112
5.4.2	Metabolitenspektrum in Erythrozyten.....	112
5.4.3	Mechanismus der Adduktbildung zwischen Xenobiotika und Glutathion in Erythrozyten.....	113
5.4.4	Pharmakokinetische und pharmakodynamische Konsequenzen einer Glutathion-Adduktbildung.....	117
6	Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ-(3,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran.....	120
6.1	Problemstellung.....	120
6.2	Antioxidatives System der Erythrozyten.....	122
6.3	Kenntnisstand.....	123
6.4	Auswahl der Methode.....	123
6.5	Ergebnisse.....	126
6.6	Diskussion.....	129

C.	Experimenteller Teil	
7	Identifizierung verschiedener Fettsäuren im Kiefernrintenextrakt mittels Gaschromatographie.....	139
7.1	Geräte.....	139
7.2	Reagenzien.....	140
7.3	Durchführung.....	140
8	Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes und zweier Metabolite.....	141
8.1	Bestimmung der Proteinbindung mittels high performance affinity chromatography.....	141
8.1.1	Verwendete Geräte und Reagenzien.....	141
8.1.2	Geräte.....	141
8.1.3	Lösungsmittel für Standards, Bestandteile des Kiefernrintenextraktes sowie die Metabolite M1 und M2.....	143
8.1.4	Standards.....	143
8.1.5	Untersuchte Substanzen.....	143
8.1.6	Bestimmung der Bindung der Referenzsubstanzen zu Albumin.....	144
8.1.7	Systemeignung.....	144
8.2	Bestimmung der Proteinbindung mittels Ultrafiltration.....	146
8.2.1	Verwendete Geräte und Reagenzien.....	146
8.2.2	Substanzen bzw. Chemikalien.....	147
8.2.3	Geräte.....	147
8.2.4	HPLC-System.....	148
8.2.5	Ultrafiltrationseinheiten.....	148
8.2.6	Präparation der Filtrationseinheiten.....	149
8.2.7	Durchführung der Ultrafiltration.....	149
8.2.8	Aufarbeitung der Proben.....	150
8.2.9	HPLC-Bedingungen.....	150
8.2.10	Messung der unspezifischen Bindung und deren Korrektur.....	151
8.2.11	Bestimmung der Wiederfindung der untersuchten Substanzen..	152
8.2.12	Auswertung der HPLC-Ergebnisse.....	152
8.2.13	Validierung der HPLC-Methode.....	153
8.2.13.1	Selektivität.....	153

8.2.13.2	Linearität.....	154
8.2.13.3	Präzision und Richtigkeit.....	155
9	Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile des Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen.....	157
9.1	HPLC-System.....	157
9.2	Lösungen und Reagenzien.....	157
9.3	Geräte.....	158
9.4	Aufreinigung der Erythrozyten.....	158
9.5	Isolierung der mononukleären Zellen.....	158
9.6	Durchführung der Verteilungsversuche.....	159
9.6.1	Aufarbeitung der Erythrozyten.....	159
9.6.2	Aufarbeitung der mononukleären Zellen.....	159
9.7	Bestimmung der Verteilung verschiedener Bestandteile des Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten unter Verapamilzugabe.....	160
9.8	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phenylalanin und Tryptophan.....	160
9.9	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phloretin.....	162
9.10	Auswertung der Verteilungsversuche.....	162
9.11	Bestimmung des hämolysierten Anteils.....	164
9.12	Bestimmung der Vitalität der mononukleären Zellen.....	165
9.13	Berechnungen zum Vergleich zwischen Glucose und dem Metaboliten M1...	165
10	Untersuchungen zu metabolischen Veränderungen von Bestandteilen des Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 in Erythrozyten bzw. mononukleären Zellen.....	167
10.1	Geräte und Reagenzien.....	167
10.1.1	HPLC-MS/MS System.....	167
10.1.2	Reagenzien.....	168
10.2	Inkubation der Erythrozyten und mononukleären Zellen mit Bestandteilen des Kiefernridenextraktes.....	168
10.2.1	Durchführung mit mononukleären Zellen.....	168
10.2.2	Durchführung mit Erythrozyten.....	169

10.3	Screening der Zellinkubationen auf Metabolite.....	169
10.4	Darstellung eines Addukts zwischen Glutathion und dem δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton.....	170
10.5	Massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifizierung eines Glutathion- δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton-Addukts.....	170
11	Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ-(3,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran mittels eines AAPH-Assays.....	172
11.1	Reagenzien.....	172
11.2	Geräte und Materialien.....	173
11.3	Vorbereitung der Erythrozyten.....	173
11.4	Herstellung der Untersuchungslösungen und Messung der Proben.....	173
11.5	Durchführung der Versuche mit Vorinkubation und Austausch des Probenpuffers.....	174
11.6	Durchführung der Versuche mit Vorinkubation ohne Austausch des Probenpuffers.....	174
11.7	Durchführung der Versuche unter Zugabe von Verapamil oder Indometacin..	175
11.8	Auswertung der Versuche.....	175

D. Tabellarischer Anhang

12	Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes und zweier Metabolite.....	179
12.1	Affinitätschromatographische Methode.....	179
12.1.1	Retentionszeiten der Kalibriersubstanzen.....	179
12.1.2	Berechnete k' -Werte.....	179
12.1.3	Berechnete P-Werte.....	180
12.1.4	Retentionszeiten der untersuchten Substanzen.....	180
12.1.5	Berechnete k' -Werte der untersuchten Substanzen.....	181
12.1.6	Graphisch ermittelte Bindungswerte der Substanzen.....	181
12.2	Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration.....	182
12.2.1	Unspezifische Bindung der Substanzen.....	182
12.2.2	Plasmaproteinbindung bestimmt mittels Ultrafiltration.....	182

13	Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile des Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen.....	183
13.1	Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und mononukleären Zellen.....	183
13.1.1	Versuch 1.....	183
13.1.2	Versuch 2.....	184
13.2	Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten.....	185
13.2.1	Versuch 1.....	185
13.2.2	Versuch 2.....	187
13.2.3	Vergleich zwischen (+)-Catechin und dem Metaboliten M1.....	188
13.3	Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten unter Verapamilzugabe.....	189
13.3.1	Versuch 1.....	189
13.3.2	Versuch 2.....	191
13.4	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Tryptophan.....	193
13.5	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phenylalanin.....	194
13.6	Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phloretin.....	195
14	Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ-(3,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran.....	196
14.1	Vergleich zwischen Ascorbinsäure und M1.....	196
14.2	Konzentrationsreihe des Metaboliten M1.....	196
14.3	Vergleich des Metaboliten M1 mit Verapamil und Indometacin.....	197
14.4	Vergleich verschiedener Inkubationen des Metaboliten M1 mit Pufferwechsel.....	198
E.	Abkürzungsverzeichnis.....	199
F.	Zusammenfassung.....	203
G.	Literaturverzeichnis.....	209

EINLEITUNG

Einleitung

1 Pharmakokinetik der Phenolcarbonsäuren und Flavonoide

1.1 Bildung in der Pflanze

Im Pflanzenreich wird eine große Anzahl verschiedener phenolischer Verbindungen mit einer ausgedehnten Strukturvariabilität und einem weiten Spektrum chemischer Eigenschaften gebildet. Eine einheitliche Klassifizierung ist aufgrund der großen Strukturbandbreite komplex. Die Bildungswege dieser Substanzgruppen sind meist hingegen klar definiert. Es existieren im Wesentlichen drei Synthesewege. Über den Shikimatweg kann aus Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat über verschiedene Zwischenstufen Chorismat gebildet werden (s. Abb. 1).

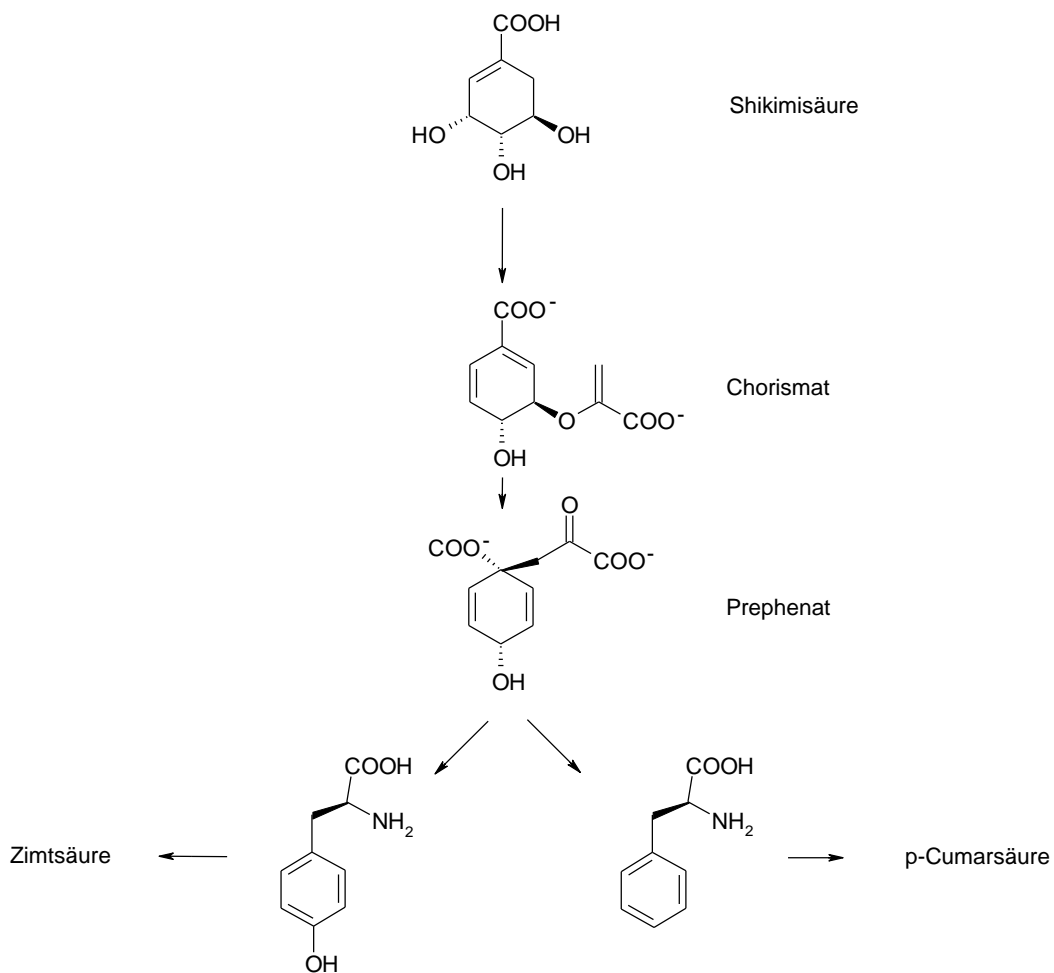


Abb. 1: Schematische Darstellung des Shikimisäureweges als Syntheseweg zur Darstellung von Phenolcarbonsäuren im Pflanzenreich (modifiziert nach [1]).

A. Einleitung

Aus dieser Verbindung entstehen über Prephenat schließlich L-Tyrosin und L-Phenylalanin. Diese Aminosäuren sind die Vorläufer für p-Cumarsäure und Zimtsäure, die wiederum als Ausgangsverbindungen für andere Phenolcarbonsäuren dienen [1].

Als weitere Variante existiert der Acetat-Malonat-Weg. Hier werden Acetyl-Coenzym A und Malonyl-Coenzym A Einheiten gekoppelt, so dass sich Polyketoverbindungen bilden. Aus diesen können in Folgereaktionen Aromaten entstehen. Als Beispiel sei die Bildung von Phloroglucin aus einer Polyketidkette genannt [2]. Eine weniger bedeutende Rolle spielt der Acetat-Mevalonat-Weg. Die aromatische Struktur entsteht hier durch die Bildung von Terpenen aus Isoprenoiden. Diese Terpene können nun dehydriert werden und so schlussendlich Phenole bilden. Über diesen Syntheseweg findet beispielsweise die Bildung von Thymol oder Xanthorrhizol statt [3].

Die oben bereits erwähnten Phenolcarbonsäuren lassen sich weiter in Hydroxyzimtsäuren, wie beispielsweise Kaffeesäure, Ferulasäure oder auch Cumarsäure und Hydroxybenzoesäuren, denen Gallussäure und Vanillinsäure zugeordnet werden können, aufteilen. Sie kommen in der Natur in geringen Mengen als freie Säuren vor, sind sonst meist verknüpft mit Alkoholen, anderen Phenolcarbonsäuren oder verschiedenen Zuckern [4]. Aus einer Untergruppe der Phenolcarbonsäuren, den Phenylpropanen, können verschiedene Dimere gebildet werden, die als Lignane bezeichnet werden. Als Grundstrukturen dienen oft Coniferylalkohol und Syringaalkohol. Die Verknüpfung der einzelnen Monomere findet meist am β -Kohlenstoffatom des Propyl-Restes statt, doch gibt es hier Varianten, die zu einer Zyklisierung der aliphatischen Kohlenwasserstoffatome führen. Hieraus resultieren, je nach Aufbau der Monomere, Tetraline, Tetrahydrofurane, Tetrahydrofuranole oder Lactone [5].

Als weitere Gruppe sind die Flavonoide zu nennen. Sie bestehen aus jeweils zwei Benzolringen und einem von einem Oxanring abgeleiteten Heterozyklus. Die große Variabilität dieser Substanzgruppe kommt hauptsächlich durch verschiedene Substituenten und deren Isomere zustande. Die Bildung dieser Stoffgruppe erfolgt über die Kondensation von zwei verschiedenen Verbindungen. Eine Ausgangsverbindung ist Malonyl-Coenzym A, das aus Acetyl-Coenzym A durch Kondensation mit CO_2 unter ATP-Verbrauch und unter Katalyse der Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet wird [6]. Die zweite Ausgangsverbindung, Cumaroyl-CoA, hingegen stammt aus dem Shikimisäureweg. Das aus der Verknüpfung dieser beiden Moleküle entstehende Chalcon stellt nun die Stammverbindung der verschiedenen Flavonoidklassen dar, deren Trivialnamen am Substitutionsmuster des Oxanrings orientiert sind (s. Abb. 2).

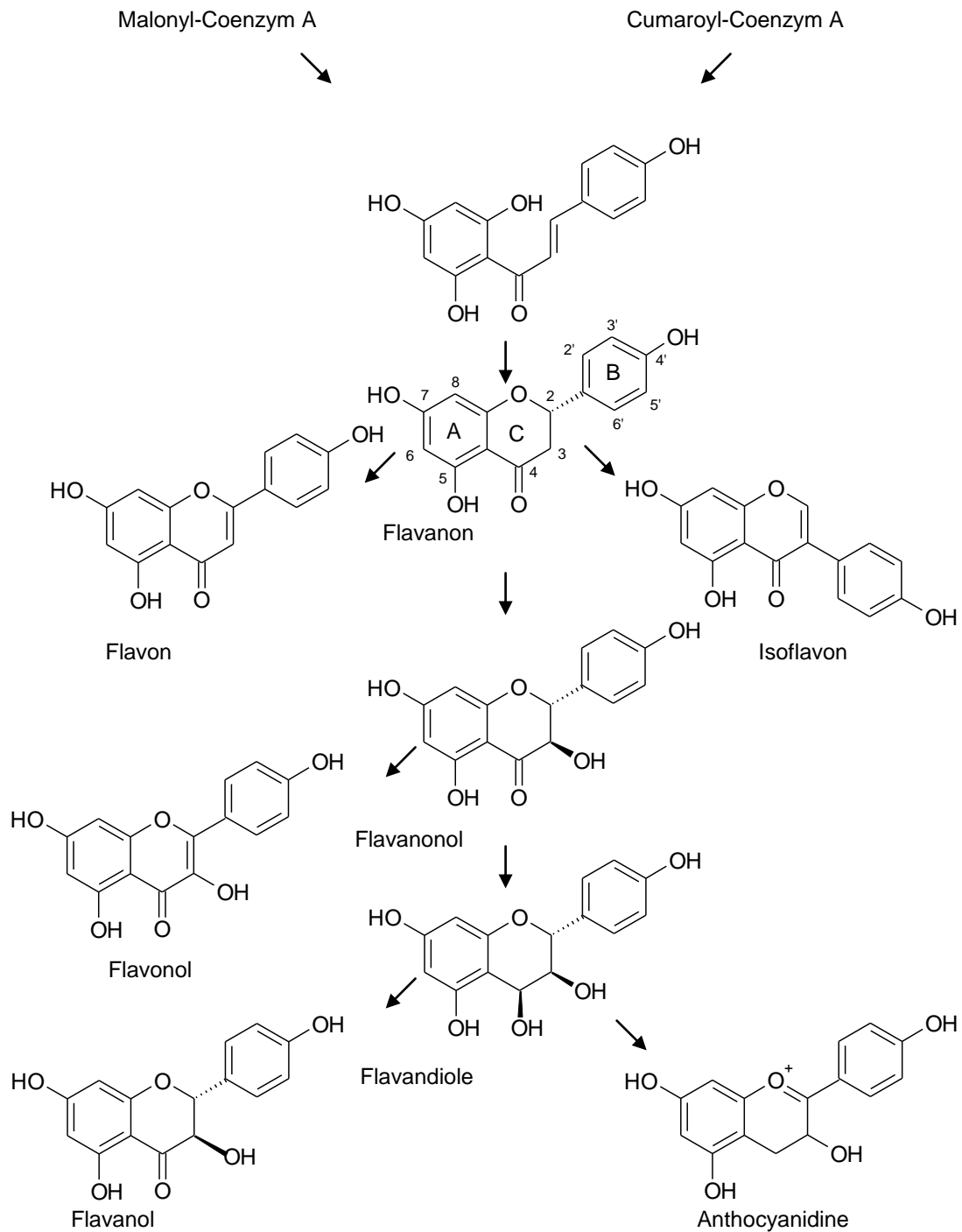


Abb. 2: Schematische Darstellung der Bildung verschiedener Untergruppen der Flavonoide (Abbildung modifiziert nach [1, 7, 8]).

Flavonoide liegen oft als Zuckerkonjugate in der Pflanze vor. Hierbei handelt es sich um Glucoside, Galactoside, Glucuronide, Rhamnoside, Xyloside und Arabinoside [9]. Die

Verknüpfung mit dem Flavonoid-Rest erfolgt entweder an einer Hydroxygruppe des Flavonoids, wobei eine glycosidische Bindung entsteht, oder es bildet sich eine glycosylische Verbindung („C-Glycosid“), wenn der Bindungspartner ein C-Atom darstellt.

Polymere Strukturen, denen beispielsweise das positiv geladene Flavonoid Pelargonidin zu Grunde liegt, werden als Anthocyanidine bezeichnet. Ausgehend von diesen Anthocyanidinen existieren noch zwei weitere Substanzklassen. Zum einen die Anthocyane, bei denen es sich um die Anthocyanidine handelt, die glycosidisch mit verschiedenen Zuckern, meist Glucose und Galactose, verknüpft sind [10]. Zum anderen existieren polymere Strukturen, die beim Erhitzen Anthocyanidine liefern und als Proanthocyanidine bezeichnet werden. Liegen ihnen als Monomere Grundstrukturen Catechin oder Epicatechin zu Grunde so werden sie auch als Procyanidine bezeichnet. In dem in dieser Arbeit verwendeten Kiefernextrakt der Meereskiefer *pinus pinaster* sind als Inhaltsstoffe die Flavan-3-ole (+)-Catechin und Taxifolin sowie die Phenolcarbonsäuren Ferulasäure, Kaffeesäure, Vanillinsäure, Gallussäure, Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoesäure und p-Cumarsäure identifiziert worden [11]. Als Zuckerkonjugate wurden p-Hydroxybenzoesäure- β -D-Glucosid, 1-(p-Cumaroyl)- β -D-Glucose, 1-Feruloyl- β -D-Glucose und das Flavonolglucosid Taxifolin-3'-O- β -D-Glucosid gefunden [11]. Als weitere Strukturen sind Polymere des (+)-Catechins und Epicatechins als Procyanidine vorhanden [11].

1.2 Transformation vor dem Übergang in den Darm

Die nativ vorliegenden Zuckerkonjugate der Phenolcarbonsäuren und Polyphenole kommen nach oraler Aufnahme mit Speichel in Kontakt. Dieser enthält in geringem Maße β -Glucosidasen, die zur Hydrolyse eines Teils der Konjugate führen können. Da meist nur ein kurzer Kontakt stattfindet resultiert somit nur eine begrenzte Öffnung der glykosidischen Bindungen. Kahle et al. [12] zeigten im Rahmen einer Untersuchung zur Pharmakokinetik von verschiedenen in Äpfeln enthaltenen Polyphenolen, dass nach Inkubation mit Speichel eine deutliche Lyse der Verbindungen feststellbar war. Die Autoren führten diese allerdings weniger auf frei vorliegende lytische Enzyme als auf mikrobielle Zersetzung zurück. Zu beachten ist, dass die Inkubationszeit mit fünf Minuten sehr lang gewählt wurde, so dass fraglich ist ob *in vivo* ähnliche Umsetzungsraten

erreicht werden können. Des Weiteren kann natürlich bereits in diesem Bereich ein Teil der Phenole durch Adsorption an die Schleimhaut bzw. an die Proteine ihrer Oberfläche verloren gehen [13, 14].

Nach dem Übergang in den Magen können abhängig von der Struktur verschiedene hydrolytische Vorgänge stattfinden. Monomere Phenolcarbonsäuren und Flavonoide scheinen unter diesen Bedingungen stabil zu sein [15]. Die Verbindungsklasse der Proanthocyanidine unterliegt hingegen der sauren Hydrolyse und es entstehen Degradationsprodukte bis hin zu den Monomeren Grundstrukturen Catechin und Epicatechin [16]. Glycosidische Bindungen können durch den sauren pH-Wert nicht gespalten werden, so dass diese Konjugate unverändert in den Darm gelangen [17] (s. Abb. 3).

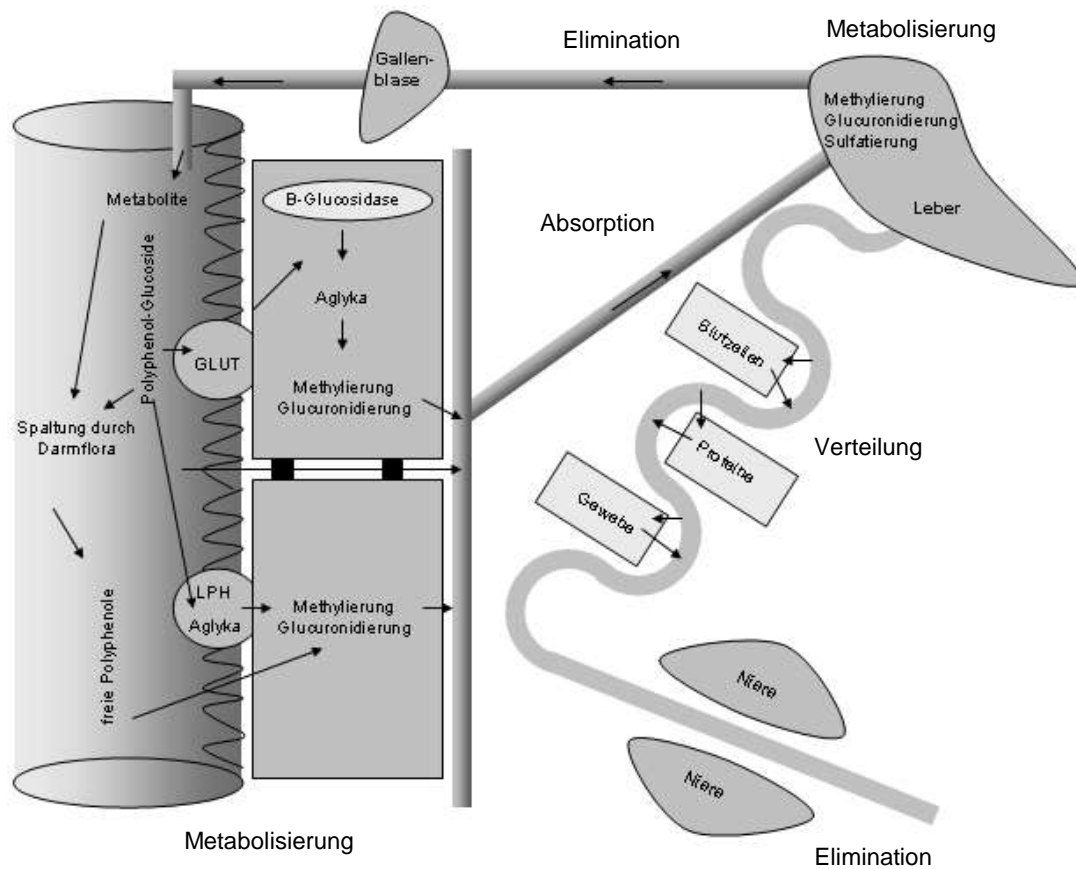


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Absorption, Verteilung und Metabolisierung von Polyphenolen und Phenolcarbonsäuren. [LPH = Lactase-Phlorizin-Hydrolase, GLUT = Glucose-Transporter]

1.3 Interaktionen mit der Darmflora und Resorption

Nach Passage des Magens finden weitere Degradationen im Dünndarm statt und dort kann nun auch die Hydrolyse von Flavonoid-Glucosiden durch eine β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) auftreten. Andere Zuckerkonjugate wie Rhamnoside können nicht durch körpereigene Enzyme gespalten werden. Der Abbau dieser Verbindungen erfolgt durch Mikroorganismen der Darmflora und findet hauptsächlich im Kolon und nur zu einem geringen Teil im Dünndarm statt [18]. Der Metabolismus der Phenolcarbonsäuren verläuft ähnlich. Auch sie liegen, wie oben gezeigt, meist verknüpft mit Zuckern oder anderen organischen Säuren vor, die eines Abbaus durch Mikroorganismen des Darms bedürfen. Eine große Rolle spielen hierbei *Bacteroides distasonis*, das eine β -Rhamnosidase aufweist, *Bacteroides uniformes* und *Bacteroides ovatus* hingegen verfügen über Glucosidasen [19].

Es wäre anzunehmen, dass eine Dekonjugation der Zucker bzw. organischer Säuren für eine Absorption der Verbindungen aus dem Darm obligat ist, denn mit steigender Hydrophilie und zunehmendem Molekulargewicht der Substanzen wird die Aufnahme, zumindest auf dem Weg der passiven Diffusion, erschwert. Morand et al. [20] veröffentlichten eine Arbeit, deren Ergebnisse mit diesen Überlegungen im Widerspruch liegen. Sie zeigten bei Ratten nach Verfütterung verschiedener Quercetin-Konjugate für ein Quercetin-Glucosid einen höheren Plasmaspiegel als für das Aglykon. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist nur schwer zu geben zumal dieses Phänomen bei vergleichbaren Flavonoiden nicht beobachtet werden konnte [21, 22]. Ein Erklärungsmodell stellt die aktive Aufnahme dieses Glucosides über den GLUT-2 Transporter dar [23].

Durch die Darmflora werden nicht nur Bindungen zwischen einem Flavonoid bzw. einer Phenolcarbonsäure und einem Zucker gespalten, sondern es kann intramolekular zu Ringöffnungen und metabolischen Veränderungen der Verbindung kommen. Exemplarisch soll dies an einigen im Kiefernextrakt enthaltenen Verbindungen verdeutlicht werden. (+)-Catechin und Taxifolin ähneln sich trotz der unterschiedlichen Struktur im Abbauweg und es entstehen größtenteils vergleichbare Spaltungsprodukte. Es kann an drei Positionen des C-Ringes zu Spaltungen kommen. Aus dem B-Ring hervorgehen kann die 2,3-Dihydroxypropionsäure. Diese kann über 2,3-Dihydroxyessigsäure zu 2,3-Dihydroxybenzoesäure abgebaut werden.

Schlussendlich führt dieser Abbau zu 1,2-Dihydroxybenzol (Brenzcatechin) und Phenol [24]. Aus dem A-Ring kann hingegen 1,3,5-Trihydroxybenzol (Phloroglucin) entstehen. Der Abbauweg von der Propionsäure bis zum Phenol scheint für die Kaffeesäure und Ferulasäure ebenfalls Geltung zu haben wobei aus letzterer jeweils die methylierten Phenole entstehen können.

Für verschiedene Flavan-3-ole wurden weitere Abbauprodukte beschrieben [25]. Durch die Darmflora können nach Öffnung des C-Ringes, abhängig vom Substitutionsmuster am B-Ring, verschiedene Lactone entstehen (s. Abb. 4).

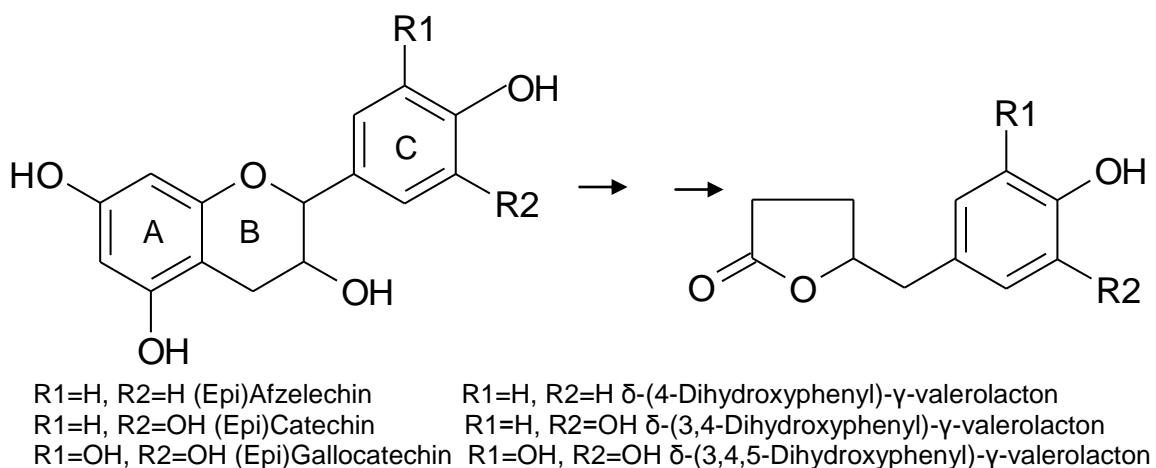


Abb. 4: Abbau von Flavan-3-olen durch die Darmflora zu verschiedenen Lactonen (Abbildung modifiziert nach [24]).

Das δ-(3,4-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolacton konnte bereits in verschiedenen Humanstudien nach Einnahme catechinhaltiger Nahrung nachgewiesen werden und ist somit auch Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit [26, 27].

Wie bereits erwähnt stellt die Zuckerabspaltung der Flavonoid- und Phenolcarbonsäureglycoside wohl den entscheidenden Schritt dar, um eine Resorption der Flavonoide, dann als Aglyka, zu ermöglichen. Enzyme, die an diesem Prozess beteiligt sein könnten, sind die Glucocerebrosidase (EC 3.2.1.62) [28], die oben bereits erwähnte L-Glucosidase (EC 3.2.1.21) [29] und die Pyridoxin-Glucosid-Hydrolase [30]. Diesen Enzymen ist gemein, dass sie in den Darmwandzellen situiert sind, was einen vorgeschalteten intrazellulär gerichteten Transport der intakten Glycoside voraussetzen würde.

Eine weitere Möglichkeit der Dekonjugation der Glycoside, die keine transmembranäre Passage der hydrophilen Ausgangsverbindungen voraussetzt, stellt die Beteiligung der am Bürstensaum vorhandenen Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) (EC 3.2.1.23 und 62) dar. Day et al. [31] konnten zeigen, dass Quercetin-4P-Glucosid, Quercetin-3-Glucosid, Genistein-7-Glucosid und das Daidzein-7-Glucosid Substrate dieses Enzyms darstellen und somit eine Absorption der Aglyka in die Zellen des Endothels ermöglicht wird. Andere Gruppen erzielten ähnliche Resultate, die diese Vermutung weiter stützen [32-34]. Grundsätzlich soll Erwähnung finden, dass auch Alternativen zu Versuchen an Ratten bzw. Mäusen möglich sind, die unter Zuhilfenahme von Ileostoma- oder Colostomapatienten Versuchskonzepte beinhalten, die insbesondere durch Berücksichtigung der humanen Darmflora, ein realistisches Bild von metabolischen Veränderungen im Darm liefern können [35], denn die Vergleichbarkeit bzw. Übertragbarkeit der Physiologie der Verdauung zwischen Mensch und Ratte bzw. Maus ist nur begrenzt gegeben.

1.4 Transport im Blut

Nach der Passage der Darmmukosa und Dekonjugation der Zuckerreste erfolgen bereits im Darmepithel erste Metabolisierungsreaktionen. So ist das Auftreten verschiedener Konjugationen des Phase II Metabolismus in Enterozyten beschrieben [18]. Es handelt sich hierbei um Methylierungen, Glucuronidierungen und Sulfatierungen. Für diese Vorgänge scheint eine gewisse Substratspezifität zu bestehen. Crespy et al. [36] zeigten, dass zwar für Quercetin aber nicht für Rutin Konjugationsreaktionen in der Epithelzellschicht des Darms erfolgen. Deshalb ist es nicht möglich anhand einzelner Versuchsergebnisse die beschriebenen Abläufe pauschal auf andere Verbindungen zu übertragen. Auch ist das Ausmaß bzw. das Verhältnis der einzelnen Metabolisierungen wohl abhängig von der Struktur der Verbindung. So wurden mit (+)-Catechin Untersuchungen durchgeführt, die die Bildung von 3-O-Methyl-Catechin und eines Catechin-Glucuronids im präparierten Rattendarm zeigen konnten [37]. Die Glucuronidierung fand hauptsächlich an Position 5 bzw. 7 des A-Ringes statt [38]. Hinzu kamen Methylierungen, so dass 3' bzw. 4' methylierte Catechine oder Catechinglucuronide resultieren. Diese Art von Metabolisierungen bereits im

Darmepithel treten wahrscheinlich auch für Phenolcarbonsäuren bzw. deren Zucker-Konjugate auf [39].

Reaktionen des Phase II Metabolismus sind also sowohl für Flavonoide als auch für Phenolcarbonsäuren bereits prähepatisch vorzufinden. Diese führen dazu, dass bereits vor Erreichen der Leber über die Pfortader Glucuronide, Sulfate und methylierte Verbindungen entstehen. Zu welchem Ausmaß diese Verstoffwechslung stattfindet, d.h. wie groß der metabolisierte Substanzanteil im Vergleich zu frei vorliegender, unkonjugierter Verbindung ist, ist abhängig von der Struktur bzw. dem Substitutionsmuster der Verbindung. Nach Erreichen der Leber können dort weitere Verknüpfungen vorkommen, die zu komplexeren Produkten, wie Methylierungen kombiniert mit Glucuronidierungen oder Sulfatierungen, führen [39].

1.5 Verteilungsräume im Körper

Oben genannte Reaktionen beeinflussen entscheidend die Polarität der Substanzen und können so zur Verteilung zwischen verschiedenen Kompartimenten beitragen. Im Blut kann der Transport entweder frei im Plasmawasser, an Proteine gebunden, an bzw. in Blutzellen gebunden oder auch in LDL (low density lipoproteins), HDL (high density lipoproteins), Chylomikronen oder VLDL (very low density lipoproteins) erfolgen [40]. Durch Konjugation, insbesondere mit Glucuronsäure, erhöht sich die Hydrophilie, so dass ehemals proteingebundene Substanzen nun auch frei vorliegen können. Ein Beispiel hierfür liefern Janisch et al., die für verschiedene Quercetinmetabolite mittels Fluoreszenzquenching Proteinbindungen bestimmten, die, wie zu erwarten, von Sulfaten bis zu Glucuroniden, stetig abnahmen [41].

Eine Kompartimentierung ist natürlich nicht nur zwischen verschiedenen Blutbestandteilen sondern auch zwischen verschiedenen Geweben möglich. Es kann also zur Anreicherung in bestimmten Zelltypen kommen. So konnte in einem Versuch bei Ratten eine Akkumulation eines 5,7-Dimethoxyflavons in der Leber nachgewiesen werden [42]. Besonders deutlich trat hier der Unterschied zwischen dem methylierten und dem unmethylierten Flavonoid, das bei diesen Versuchen keine besondere Gewebeaffinität besaß, hervor. Versuche mit radioaktiv markiertem Epigallocatechingallat zeigten bei Mäusen eine starke Aufnahme vor allem in die Leber, die Lunge, in das Pankreas und in die Haut [43]. In einer Humanstudie wurde von

Patienten, die vor einer Prostataektomie standen, entweder grüner bzw. schwarzer Tee oder Wasser als Vergleich eingenommen. Nach der Prostataentfernung konnten bei den Tee trinkenden Probanden verschiedene Polyphenole (Epicatechingallat, Epicatechin, Epigallocatechingallat, Epigallocatechin) im Prostatagewebe nachgewiesen werden [44]. Neben einer spezifischen Verteilung in einzelne Gewebe kann es aber auch zu einer temporären Anreicherung im Plasma kommen. Dieses Phänomen tritt insbesondere nach der wiederholten Einnahme von Flavonoiden bzw. Polyphenolen auf [45, 46].

1.6 Ausscheidung

Für die Elimination der Polyphenole oder Phenolcarbonsäuren lassen sich kaum allgemein gültige Aussagen über gruppen- oder substituentenspezifische biliäre bzw. renale Ausscheidungswege treffen [14]. Wegen der ausgeprägten Metabolisierung (s. oben) sind sowohl im Urin als auch im Fäces Glucuronide und Sulfate die vorherrschende Eliminierungsform. So wurden bei Ratten, nach der Verabreichung von Genistin, in beiden Spezimen hauptsächlich Glucuronide und kaum freie, unkonjugierte Ausgangsverbindungen gefunden [47]. In dieser Studie war kein Eliminationsweg eindeutig bevorzugt. Ein anderes Bild ergab sich in einer Humanstudie, bei der auch die Genistin-Exkretion gemessen wurde. Hier fand die Ausscheidung hauptsächlich über den Fäces statt [48]. Der hier beschriebene Ausscheidungsweg wird an anderer Stelle bestätigt [49]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass selbst für einzelne Substanzen differierende Ergebnisse erzielt werden. In diesem Fall mag der Grund in unterschiedlichen Metabolisierungen von Mensch und Mäusen bzw. Ratten zu finden sein [14].

Dennoch werden Versuche unternommen valide Marker für die Aufnahme von Polyphenolen beim Menschen zu finden, über die Rückschlüsse auf den resorbierten Anteil aus der aufgenommenen Nahrung getroffen werden könnten. Dies gestaltet sich nicht nur wegen der begrenzten Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf die humane Physiologie als schwierig. Individuelle Unterschiede sind nämlich nicht nur im Ausscheidungsweg, sondern auch im zeitlichen Verlauf zu finden. Der mikrobielle Abbau im Darm ist von der jeweiligen Flora abhängig, außerdem können durch die parallel aufgenommene Nahrung Matrixeffekte erwartet werden. So zeigte sich beim renal ausgeschiedenen Metabolitenspektrum im Zuge einer Humanstudie nach

Kakaoeinnahme bei den Probanden ein Unterschied in der Zusammensetzung der Verbindungen im Urin, wenn zusätzlich zu Polyphenolen Milch konsumiert wurde [50]. Eine Beeinflussung kann ebenso durch den enterohepatischen Kreislauf, den einige Verbindungen durchlaufen, erwartet werden. Hierdurch ändert sich in erheblichem Maße die Pharmakokinetik der Substanz. Nach der Aufnahme und Metabolisierung kommt es zur Ausscheidung über die Gallenblase und darauf folgend zur Entfernung des addierten Konjugats, meist eines Glucuronids. Danach kann die Substanz wieder resorbiert und erneut metabolisiert werden. Hier sei beispielhaft wieder Genistin genannt, dessen Auftreten im Plasma ca. sieben Stunden nach Einnahme am besten durch einen enterohepatischen Kreislauf zu erklären ist [51].

1.7 Ein standardisierter Extrakt der Meereskiefer (*pinus pinaster*) als Untersuchungsgegenstand

Die im vorherigen Abschnitt dargestellten Ausführungen verdeutlichen die Komplexität der Pharmakokinetik der Polyphenole bzw. Phenolcarbonsäuren. Diese Vorgänge können zweifelsohne Einfluss auf potentielle pharmakodynamische Effekte der Substanzen nehmen. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit das Wissen um pharmakokinetische Kenngrößen für verschiedene Bestandteile eines standardisierten (USP) Extrakt der französischen Meereskiefer (*pinus pinaster*) erweitert werden [52].

Der Extrakt findet als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung, da verschiedene pathophysiologische Vorgänge durch die Einnahme günstig beeinflusst werden sollen [53]. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Rinde enthält der Extrakt eine Vielzahl an Verbindungen. Bei den Bereichen, die botanisch der Rinde zuzuordnen sind, handelt es sich um die Teile, die außerhalb des Kambiums, also der Wachstumszone, gelegen sind. Somit ist der Rinde der Bast als lebendes Gewebe und die Borke als abgestorbenes Material zugehörig. Allgemein sind in der Rinde der Meereskiefer *pinus pinaster* vor allem Lignin und Polyphenole vorhanden [54]. Diese Verbindungen bilden mit einem Anteil von 44 % vor den Polysacchariden mit 39 % den Hauptteil der Substanzen in der Rinde. Des Weiteren werden noch geringe Mengen an freien Zuckern gefunden [11]. Die Extraktionsbedingungen beeinflussen die Zusammensetzung eines Extraktes, deshalb sind bei dem untersuchten Extrakt die Komponenten in anderen Mengenverhältnissen vorhanden. Den Hauptanteil stellen mit ca. 65 % Procyanidine des

(+)-Catechins und des Epicatechins dar. Des Weiteren sind bekannt verschiedene Phenolcarbonsäuren wie Vanillinsäure, p-Cumarsäure, Ferulasäure, Gallussäure, Kaffeesäure, p-Hydroxybenzoesäure, und Protocatechusäure. Diese Verbindungen liegen in der Rinde entweder frei oder als Glycoside vor. Neben diesen Substanzen wurden desweiteren das Falavanol (+)-Catechin und das Flavanonol Taxifolin gefunden [11].

Es wurden eine Reihe *in vivo* bzw. *ex vivo* Untersuchungen durchgeführt um pharmakodynamische Effekte zu zeigen. Hierbei standen besonders antioxidative [55, 56] und antiinflammatorische Aspekte im Mittelpunkt. So konnten Grimm et al. in einem *ex vivo* Ansatz eine deutliche Hemmung der NF- κ B Aktivierung und eine Inhibition der Matrixmembranproteinasen in humanem Plasma (MMP-9) zeigen [57, 58]. Ebenfalls an einem *ex vivo* Ansatz konnten Schäfer et al. [59] antiinflammatorische Wirkungen durch signifikante Verminderung der COX-1 bzw. COX-2 Aktivierung durch Plasma von Probanden, die 300 mg eines Kiefernrintenextraktes eingenommen hatten, nachweisen. Desweiteren wurden in einer Humanstudie pharmakokinetische Untersuchungen von Grimm et al. [26] durchgeführt, bei der Plasmaproben von Probanden nach Einnahme eines Kiefernrintenextraktes entnommen und auf verschiedene Metabolite hin untersucht wurden. In dieser Studie ergab sich ein komplexes Bild aus bekannten und unbekannt Metaboliten, deren Plasmaspiegel jeweils stark differierten und relevante interindividuelle Schwankungen zeigten. Auch konnten in dieser Studie, wie in vielen vergleichbaren Untersuchungen, nur relativ geringe Plasmaspiegel im Bereich von 1-100 ng/ml der verschiedenen Substanzen, abhängig von Dosis und Einnahmedauer, festgestellt werden.

Diese geringen Konzentrationen sind in *in vitro* Zellkulturversuchen, beispielsweise bei Untersuchungen zur Beeinflussung entzündlicher Prozesse, meist unwirksam obwohl *in vivo* bzw. *ex vivo* Effekte nachweisbar sind [60]. Diese Diskrepanz könnte durch komplexe Verteilungsprozesse im Verlauf des Metabolismus von Polyphenolen und Phenolcarbonsäuren begründet sein. Deshalb sollen im Rahmen dieser Arbeit die Verteilung von monomeren Bestandteilen bzw. Polyphenolen eines Kiefernrintenextraktes zwischen Plasma und Blutzellen untersucht werden. Außerdem soll die Affinität dieser Substanzen zu Plasmaproteinen bestimmt werden um das pharmakokinetische Profil weiter zu vervollständigen.

ALLGEMEINER TEIL

2 Identifizierung verschiedener Fettsäuren im Kiefernextrakt mittels Gaschromatographie

2.1 Untersuchung des Extraktes auf Fettsäuren

Wie in der Einleitung gezeigt ist ein Großteil der Inhaltsstoffe des Kiefernextraktes bereits bekannt. Dennoch liegt bis jetzt eine komplette Aufklärung der Zusammensetzung nicht vor. Deshalb wurden, um das Wissen über die Komponenten des Extraktes zu erweitern, gaschromatographische Untersuchungen durchgeführt. Die Suche nach lipophilen Bestandteilen sollte hierbei im Mittelpunkt stehen. Deshalb erfolgte eine Extraktion des Kiefernextraktes mit Diethylether. Nach der Methylierung der bei dieser Prozedur erhaltenen Verbindungen wurde nach Auftrennung der Substanzen und deren Fragmentierung ein Abgleich der hierbei erhaltenen Massenspektren mit Spektren einer Substanzbibliothek (s. experimenteller Teil 7) vorgenommen.

2.2 Ergebnisse

Die erhaltenen Spektren zeigten eine große Anzahl Peaks, die größtenteils einer Identifizierung nicht zugänglich waren, da in der Datenbank keine deckungsgleichen Spektren gefunden werden konnten. Einige Peaks konnten jedoch zugeordnet werden. So zeigten sich Hinweise auf das Vorhandensein von Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure und Myristinsäure. Eine Quantifizierung der Substanzen fand nicht statt. Es fiel jedoch auf, dass die Ölsäuren wesentlich kleinere Peakflächen aufwiesen, als andere Flächen der erhaltenen Chromatogramme.

2.3 Diskussion

Die erhaltenen Ergebnisse lieferten eine gute Übereinstimmung mit vergleichbaren Untersuchungen. Andere Kiefernarten zeigen eine ähnliche Fettsäurekomposition, wie sie für *pinus pinaster* gefunden wurde [61]. Aber auch Pflanzen anderer Ordnungen wie *Cinnamomum cassia* zeigen einen gewissen Gehalt an Fettsäuren [62, 63]. Möglicherweise entstammen diese Säuren bei *pinus pinaster* aus Suberin, einem in der Rinde enthaltenen Polymer, das aus aliphatischen Carbonsäuren, die mit aromatischen Komponenten wie Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd verknüpft sind, besteht [64]. Diese Verbindung dient der Pflanze als Verdunstungsschutz, der einen übermäßigen Wasserverlust über die große Oberfläche der Rinde verhindern soll. Desweiteren vermag diese für Tiere unverdauliche Substanzschicht einen gewissen Schutz vor Fraßfeinden und Parasiten zu gewähren [65]. Durch die Aufarbeitung des Pflanzenrohmaterials könnten Zersetzungen des Suberins stattfinden, die zu einer Freisetzung freier Fettsäuren führen würden.

3 Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines standardisierten Kiefernextraktes

3.1 Plasmaproteine und ihre Bindungsstellen

Im menschlichen Plasma ist eine Vielzahl von Proteinen vorhanden, die eine wichtige Rolle beim Transport von Xenobiotika und körpereigenen Substanzen wie Bilirubin oder Fettsäuren spielen. Hervorzuheben sind hier vor allem Albumin (ca. 4 g/100 ml) und das α_1 -Glykoprotein (ca. 300 mg/100 ml). Saure Substanzen zeigen eine höhere Affinität zu Albumin, während neutrale oder basische Substanzen mit einem pK_s größerer als acht bevorzugt an das α_1 -Glykoprotein binden [66, 67]. Beispiele hierfür sind Metoprolol, Propranolol [68] und einige Steroide [69].

Das humane Serumalbumin (HSA) besitzt mehrere Bindungsstellen, die sich in ihren bevorzugten Bindungspartnern unterscheiden [70]. Über die Anzahl dieser Bindungsstellen wird nach wie vor diskutiert. Eine mögliche Einteilung definiert fünf Stellen, die nach ihren Affinitäten zu verschiedenen Modellsubstanzen unterschieden werden [71]. Vereinfachend werden oft zwei Hauptbindungsstellen (Bindungsseite I/II) genannt, die, wegen jeweils typischen Bindungspartnern, auch als Warfarin- bzw. Benzodiazepin-Bindungsstelle bezeichnet werden.

Als wirksame Bindungskräfte werden van der Waals-, Wasserstoffbrücken-, ionische-, und hydrophobe Wechselwirkungen beschrieben. Eine Voraussage, ob und gegebenenfalls wo eine Substanz an Albumin bindet, lässt sich schwer treffen. Charakteristische Molekülstrukturen können Hinweise auf bevorzugte Affinitäten geben. So binden sperrige Heterozyklen mit einer negativen Ladung vor allem an der Bindungsstelle I, während aromatische Carbonsäuren Bindungsstelle II zu bevorzugen scheinen [72].

Die beschriebenen Bindungen sind, wie an der Art der Wechselwirkung zu erkennen ist, reversibel. Es besteht aber auch die Möglichkeit einer irreversiblen Verknüpfung. So bindet Glucose unter Bildung eines Aldimins, Acyl-Glucuronide von verschiedenen Carbonsäuren [73] oder auch Thiole wie Captopril gehen, unter Bildung eines Disulfids,

ebenfalls eine kovalente Bindung ein [74, 75]. Die gebildeten Addukte können als Antigene erkannt werden und allergische Reaktionen auslösen [76].

3.2 Auswirkungen der Plasmaproteinbindung auf die Pharmakokinetik der Xenobiotika

Nach Aufnahme in den Organismus können Xenobiotika zwischen verschiedenen Kompartimenten verteilt werden. Es kann eine Aufnahme in die zellulären Bestandteile des Blutes stattfinden, die Substanz kann frei in der wässrigen Plasmaphase vorliegen oder aber auch in das Körpergewebe diffundieren bzw. in die interstitielle Flüssigkeit übergehen. Welche Art der Verteilung entsteht, hängt hauptsächlich von den chemischen Eigenschaften der Substanz ab, wobei auch spezifische Wechselwirkungen, wie Effluxtransporter oder Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen zu berücksichtigen sind. Die Verteilung wird auch durch die Affinität zu Plasmaproteinen bestimmt. Zeigen Substanzen eine starke Proteinbindung so stehen sie zur Diffusion aus den Gefäßen nicht unmittelbar zur Verfügung. Somit kann die Proteinbindung verschiedene pharmakokinetische Parameter beeinflussen.

Aus einer starken Proteinbindung folgt ein geringer frei im Plasma vorliegender Anteil. Gibaldi et al. [77] konnten zeigen, dass das Verteilungsvolumen, das als Proportionalitätsfaktor aus Dosis und Plasmakonzentration definiert ist, linear mit dem freien Anteil einer Substanz im Plasma zusammenhängt. Dies bedeutet, dass bei einem geringen frei vorliegenden Anteil das Verteilungsvolumen limitiert ist. Je geringer die frei im Plasma vorliegende Substanzmenge, desto geringer fällt das Verteilungsvolumen aus. Ein Beispiel hierfür bietet Glibenclamid, das bei einer Proteinbindung von 99 % nur ein Verteilungsvolumen von ca. 0,3 L/kg aufweist [78]. Dieser Zusammenhang ist allerdings nicht allgemein gültig, denn Itraconazol zeigt bei einer Plasmaproteinbindung von 99 % ein Verteilungsvolumen von bis zu 10 L/kg [78].

Auch die Exkretion einer Substanz kann einer Beeinflussung durch die Plasmaproteinbindung unterliegen, denn der Elimination aus dem Körper steht nur der freie Anteil zur Verfügung. Daher folgt aus einer starken Proteinbindung, dass meist nur ein kleines Plasmavolumen pro Zeiteinheit von der Substanz befreit wird, bezeichnet als Clearance. Dies kann zu einer verlängerten Halbwertszeit führen. Dieser Effekt muss nicht auftreten, denn nach Entfernung des freien Anteils über Leber oder Niere kann sich

wieder das ursprüngliche Gleichgewicht herstellen, indem vorher gebundene Substanz freigesetzt und so wieder der Elimination zur Verfügung steht.

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen waren Gegenstand einer von Grimm et al. [26] durchgeführten Studie zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter verschiedener Bestandteile eines Kiefernextraktes und deren Metabolite nach Einnahme einer Einmaldosis von 200 mg bzw. nach fünftägiger Einnahme dieser Dosis. Es wurde ein komplexes pharmakokinetisches Profil erhalten. So ergaben sich bei Kaffeesäure biphasische Plasmaspiegelkurven und Nachweisbarkeit von (+)-Catechin, Ferulasäure und Taxifolin auch über zwölf Stunden nach Einnahme in Konzentrationen von über 15 ng/ml. Möglicherweise wurden diese Plasmaspiegelverläufe auch durch die Proteinbindung beeinflusst.

Auch um mögliche Verdrängungseffekte zwischen den Substanzen des Pflanzenextraktes und körpereigenen Substanzen oder zugeführten Arzneistoffen beurteilen zu können, sind Daten über die Plasmaproteinbindung hilfreich. Auch wenn die Proteinbindung bzw. deren Änderungen und damit auch die Änderung des freien Anteils an Substanz wohl keinen merklichen Einfluss auf mögliche pharmakodynamische Effekte hat, denn Leslie et al. [79] zeigten, dass nur in Ausnahmen praxisrelevante Effekte zu erwarten sind, stellt die Bestimmung der Proteinbindung, wegen oben beschriebener Beeinflussung pharmakokinetischer Prozesse, einen nötigen Untersuchungsgegenstand dar.

3.3 Methoden zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung

Um die Plasmaproteinbindung einer Substanz zu bestimmen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Häufig angewendet werden Varianten der Ultrafiltration, der kontinuierlichen Ultrafiltration, der Gleichgewichtsdialyse, der Gelfiltration, Ultrazentrifugation und kapillarelektrophoretische Methoden [80]. Es existiert eine große Anzahl von Arbeiten, die sich mit der Aussagekraft der jeweiligen Methode, auch im Vergleich zu anderen Bestimmungsmethoden, beschäftigen [81-84].

Bei der Ultrazentrifugation, Ultrafiltration und dialytischen Methoden werden proteinhaltige Lösungen mit Analyt versetzt und nach Equilibrierung die freien bzw. gebundenen Anteile gemessen. So kann bei verschiedenen Varianten der Ultrafiltration

nach Ausfällung der Proteine mit Ammoniumsulfat oder Trichloressigsäure der freie Anteil im Überstand bestimmt werden. Allerdings wird beim Ausfällen ein erheblicher Anteil eigentlich freier Substanz mitgerissen, so dass die Proteinbindung oft zu hoch kalkuliert wird.

Andere Fehlerquellen zeigen sich vor allem bei dialytischen Methoden. An die eingesetzten Membranen findet häufig, aufgrund der großen Oberfläche und des Membranmaterials, eine starke unspezifische Bindung der Substanzen statt [85]. Vorbehandlung der Membranen mit verschiedenen Tensiden bzw. Salzlösungen zur Verminderung der unspezifischen Adsorption sind oft nicht erfolgreich. Außerdem ist ein erheblicher apparativer und zeitlicher Aufwand zu betreiben; auch sind nicht alle Substanzen, wegen ungenügender Stabilität, einer aufwendigen Flüssigextraktion aus biologischen Spezimen zugänglich.

Der Vorteil der Dialyse- bzw. Zentrifugationsmethoden besteht in der Möglichkeit Plasma zu verwenden und so nicht nur die Bindung zu Albumin, sondern auch zu anderen Plasmabestandteilen, wie dem α_1 -Glykoprotein oder Lipoproteinen zu berücksichtigen. Hierbei ist allerdings oft nicht eindeutig zu klären, welche Plasmabestandteile für die Bindung verantwortlich sind. Hinweise auf die bindenden Proteine gibt bei Filtrationsmethoden der MWCO (molecular weight cut-off) der verwendeten Filtrationseinheiten. So stehen Filter mit Porengrößen zwischen 10 kDa und 100 kDa zur Verfügung, um zwischen verschiedenen Plasmaproteinen zu unterscheiden.

Methoden der kontinuierlichen Ultrafiltration bieten den Vorteil innerhalb kurzer Zeit ein breites Spektrum verschiedener Konzentrationsverhältnisse zwischen Protein und bindender Substanz untersuchen zu können [86].

Kinetische Parameter, wie Retentionszeiten bzw. Verteilungskoeffizienten, hingegen werden bei chromatographischen und kapillarelektrophoretischen Ansätzen betrachtet, um auf die Affinität der zu untersuchenden Substanz zum eingesetzten Protein schließen zu können [86].

Außerdem existieren *in silico* Modelle zur Beschreibung und Vorhersage der Bindung [87]. Unter dem Oberbegriff des QSAR (Quantitative structure-activity relationship) werden anhand funktioneller Gruppen, Polaritäten und dreidimensionaler Molekülform, Wechselwirkungen mit Bindungstaschen berechnet. Doch bleibt die Vorhersage des Ausmaßes und des Ortes der Bindung schwierig. So können sich schon Stereoisomere einer Substanz stark in ihrer Bindung unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass

sich die zwei Isomeren (S)-(+) und (R)-(-) des Ibuprofens nicht nur in der Bindungsstärke, sondern auch im Bindungsort unterscheiden [88].

Eine klare Überlegenheit einer Methode, bezogen auf die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse, ist dabei kaum festzustellen. Vor- und Nachteile werden meist in Bezug auf Kosten bzw. Aufwand und Handhabung des Versuchsaufbaus diskutiert. Auffällig ist die Bandbreite an verschiedenen Ergebnissen dieser Bestimmungen. So untersuchten Zlotos et al. die Proteinbindung verschiedener Gyrasehemmer mittels kontinuierlicher Ultrafiltration und verglichen die so erhaltenen Werte mit Messungen, die mit diskontinuierlicher Ultrafiltration durchgeführt wurden [89]. Für einige Arzneistoffe zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Messmethoden für andere ergaben sich aber Abweichungen um bis zu 20 %.

Als Referenzmethode, um verschiedene Messmethoden vergleichen zu können, werden meist Methoden der Ultrafiltration, unter Verwendung von Humanplasma, herangezogen.

3.4 Auswahl der Methode zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung

Ziel der Untersuchung war es die Plasmaproteinbindung der im Kiefernrintenextrakt enthaltenen Verbindungen Kaffeesäure, Ferulasäure, Taxifolin, Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure, (+)-Catechin, Gallussäure, Procyanidin B₁ und der Metabolite δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M1) und δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M2) zu bestimmen [11, 90].

Über die Verteilung der oben genannten Verbindungen in menschlichem Plasma liegen nur begrenzte Daten vor. Vereinzelt wurden bereits Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Plasmaproteinbindung sekundärer Pflanzenstoffe, insbesondere der Polyphenole, beschäftigen [91-93]. Soares et al. untersuchten mehrere Polyphenole mittels Fluoreszenzquenching [93]. Es wurde bovines Serumalbumin verwendet und Veränderungen des Fluoreszenzverhaltens bei ansteigenden Substanz-Konzentrationen gemessen und mögliche Bindungstaschen beschrieben. Kusuda et al. zeigten mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese, dass (+)-Catechin und Procyanidin-B₃ Komplexe mit BSA bilden, ohne aber quantitative Aussagen zu treffen [94]. Diniz et al. [91] untersuchten die Bindung von zehn Flavonoiden mit unterschiedlichem Substitutionsmuster in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit zu humanem Serumalbumin

und verglichen die Affinitäten mit Messungen, für die α_1 -Glykoprotein boviner Herkunft Verwendung fand. Diese Ergebnisse wurden mit Affinitäten verglichen, die aus Messungen mittels Ultrafiltration erhalten wurden. Traten Differenzen im gebundenen Anteil auf, so wurde von einer Bindung an andere Plasmabestandteile wie Lipoproteine ausgegangen.

Ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeiten ist oft nur beschränkt möglich, da starke Abweichungen in pH-Werten der Puffer, oder auch in der Zusammensetzung der verwendeten Puffer bzw. deren Osmolarität, bestehen. Die chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften einiger Verbindungen limitieren die Auswahl der möglichen Bestimmungsmethode. So zeigten die Verbindungen Taxifolin und (+)-Catechin in eigenen Vorversuchen eine ausgeprägte unspezifische Bindung an Filtermembranen, welche die Verwendung von Methoden der Zentrifugation und Dialyse einschränkte. Da γ -Lactone im Sauren zur Ringöffnung neigen, stellt die Extraktion aus wässrigen Lösungen ebenfalls eine analytische Herausforderung dar.

Einige Vorteile bietet hier die Verwendung von humanem oder bovinem Serumalbumin, das kovalent an Silanolgruppen einer Kieselgel-Säule gebunden wird [95]. Das dieser Methode zugrunde liegende Prinzip ist die high-performance-affinity-chromatography (HPAC). Die Retentionszeiten der Substanzen werden dabei wie bei der HPLC direkt nach der Elution durch Anschluss eines geeigneten Detektors verfolgt. Zusätzlich können Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen untersucht werden. So gelingt es durch Parallelinjektion mehrerer Verbindungen Verdrängungseffekte aufzuzeigen. Ebenso ist mittels HPAC die Aufklärung der spezifischen Bindungsstelle einer Substanz möglich. So kann bei einer Parallelinjektion verschiedener Konzentrationen einer zu untersuchenden Substanz und eines Stoffes, dessen Bindungsstelle an humanes Albumin bekannt ist, durch Änderungen der Retentionszeit auf eine mögliche Affinität zur interessierenden Bindungsstelle geschlossen werden [96]. Aufwendige Extraktionen und Aufarbeitungen entfallen, so dass auch im Sauren oder Basischen instabile Substanzen einer Messung zugänglich sind. Außerdem ermöglichen kurze Retentionszeiten, meist unter zehn Minuten, und das Entfallen jeglicher Aufarbeitung eine große Anzahl an Bestimmungen in kurzer Zeit durchzuführen. Valko et al. konnten nach der Messung von 68 Arzneistoffen mit verschiedenen chemischen Eigenschaften eine gute Übereinstimmung zwischen selbst gemessenen Bindungswerten und Ergebnissen, die durch andere Verfahren, hier Ultrafiltration, erhalten wurden, zeigen [97]. Buchholz et al. hingegen äußerten sich

kritisch dieser Methode gegenüber. Insbesondere die Übertragbarkeit auf physiologische Bedingungen sahen sie nur begrenzt gegeben [98]. Noctor et al. fanden jedoch bei der Untersuchung von verschiedenen Cumarinen und Benzodiazepinen gute Übereinstimmungen zwischen Messungen per Gleichgewichtsdialyse und Daten einer HPAC-Methode [99].

3.4.1 Bestimmung der Plasmaproteinbindung mit immobilisiertem humanem Albumin

Bei der HPAC (high performance affinity chromatography) handelt es sich um eine modifizierte Anwendung der Affinitätschromatographie. Dort werden Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörpern genutzt, um spezielle Substanzen aus einem komplexen Gemisch zu isolieren. Bei der HPAC werden Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem humanem Serumalbumin und dem Analyten untersucht. Je größer die Affinität, desto schwieriger ist die Substanz von Albumin desorbierbar und dementsprechend erhöht sich die Retention.

Um die Anzahl der möglichen Wechselwirkungsstellen zu erhöhen, können mit humanem Albumin belegte Partikel dicht gepackt in Metallsäulen eingebracht werden. Diese sind mit üblichen HPLC-Systemen kompatibel und ermöglichen so ein einfaches Einbringen der zu untersuchenden Substanzen auf die Säule.

Für die Immobilisierung der Proteine wurden verschiedene Methoden entwickelt. So kann humanes Serumalbumin unter Bildung einer Schiffischen Base über einige Zwischenschritte an mit 1,1'-Carbonyl-diimidazol aktiviertes Kieselgel gebunden werden [100]. Hierbei werden vicinale Diole unter Zugabe von Periodsäure in Aldehyde gespalten und an diese mit Hilfe von Natriumborhydrid freie Aminofunktionen der Proteine kovalent gebunden [101]. Eine andere Möglichkeit besteht darin Glutardialdehyd oder N,N'-Disuccinimidylcarbonat als Vernetzer zu verwenden [102].

Kim et al. [103] verglichen das Bindungsverhalten von Carbamazepin an Säulen, an die Albumin über Schiffische Basen oder durch N,N'-Disuccinimidylcarbonat gebunden wurde. Es zeigte sich, dass ähnliche Affinitätskonstanten erhalten wurden, aber Unterschiede in den Retentionszeiten auftraten. So fanden Andersson et al., dass Benzodiazepine eine längere Retentionszeit an Säulen, an die Albumin über N,N'-Disuccinimidylcarbonat gebunden wurde, zeigten, als an Säulen, an die Albumin mit Glutardialdehyd oder über Schiffische Basen gebunden wurde [102].

3.4.2 Theoretischer Hintergrund der high performance affinity chromatography

Bei affinitätschromatographischen Versuchen werden Verteilungsgleichgewichte zwischen einer stationären und einer mobilen Phase untersucht.

Unter der Annahme der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase kann der Kapazitätsfaktor folgendermaßen ausgedrückt werden (1):

$$\text{Gleichung (1)} \quad k' = \frac{F_g}{F_f}$$

Wobei F_g den gebundenen Anteil des Analyten und F_f den freien, ungebundenen Anteil des Analyten darstellt.

Unter der Annahme, dass freier und gebundener Anteil zusammen eins ergeben gilt folgender Zusammenhang (2):

$$\text{Gleichung (2)} \quad 1 - F_g = F_f$$

Eingesetzt in Gleichung 1 erhält man Gleichung 3:

$$\text{Gleichung (3)} \quad F_g + F_g \cdot k' = k'$$

Aus dieser Gleichung geht über Umformung Gleichung 4 hervor. Diese ermöglicht über den Kapazitätsfaktor (k') die Berechnung des gebundenen Anteils (F_g):

$$\text{Gleichung (4)} \quad F_g = \frac{k'}{k'+1}$$

Gleichung 5 zeigt nun den Zusammenhang zwischen den chromatographisch bestimmbaren Parametern Totzeit (T_0) und Retentionszeit (T_r) einer Substanz und dem Kapazitätsfaktor (k'):

$$\text{Gleichung (5)} \quad k' = \frac{T_r - T_0}{T_0}$$

Somit kann der gebundene Anteil einer Substanz über die Retentionszeit bestimmt werden.

3.4.3 Methodenevaluierung der high performance affinity chromatography

Die Messungen wurden an einem HPLC-System durchgeführt wobei die Signaldetektion uv-spektroskopisch erfolgte. Die Auswahl der Methode orientierte sich an Cheng et al. [104]. Das Fließmittel setzte sich aus Isopropanol und einem 20 mM Phosphatpuffer zusammen. Die Substanzen wurden einzeln jeweils fünfmal injiziert und die erhaltenen Retentionszeiten für die Berechnung der Bindung an humanes Serumalbumin verwendet (s. experimenteller Teil 8.1).

Für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung unter Verwendung einer HSA-Säule stehen grundsätzlich zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Der prozentuale Bindungsanteil ist entweder direkt über den Kapazitätsfaktor k' [105], oder Mithilfe einer Kalibriergeraden, bei der bekannte Bindungswerte von Referenzsubstanzen gegen berechnete Affinitäten aufgetragen werden [104, 106], zugänglich.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurde das zweite Verfahren gewählt, denn bei dieser Vorgehensweise war es durch die Einbeziehung externer Daten in Form von Bindungswerten, die anhand anderer Messmethoden ermittelt wurden, möglich, die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse zu erhöhen und gleichzeitig eine Systemeignung für die Untersuchungen durchzuführen. Diese ergab sich durch den Vergleich zwischen den selbst erhaltenen Messwerten und den Literaturbindungswerten. Sechs Substanzen (s. Tab. 1) mit bekannten Bindungswerten wurden mittels HPAC vermessen und der berechnete Bindungsanteil gegen Literaturbindungswerte [107] aufgetragen (s. Abb. 5). Zu erkennen ist, dass die erhaltenen Bindungswerte der Referenzsubstanzen gut vergleichbar waren.

Tab. 1: Prozentuale Bindungswerte der Referenzsubstanzen an Albumin. Die erste Spalte zeigt Literaturbindungswerte [107]. Im Vergleich dazu Ergebnisse aus eigenen Messungen. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N=5]

Substanz	% - Bindung		SD [\pm]
	Literaturwert	gemessen	
Paracetamol	20	-15,7	0,5
Salicylsäure	97	85,9	0,1
Triamteren	57	53,0	0,2
Atenolol	3	-5,1	0,1
Salicylamid	50	27,3	0,6
Allopurinol	0,5	-31,3	0,2

Die so erhaltene Gerade (s. Abb. 5) zeigte eine gute Korrelation ($R^2 = 0,93$) zwischen gemessenen und Literaturbindungswerten.

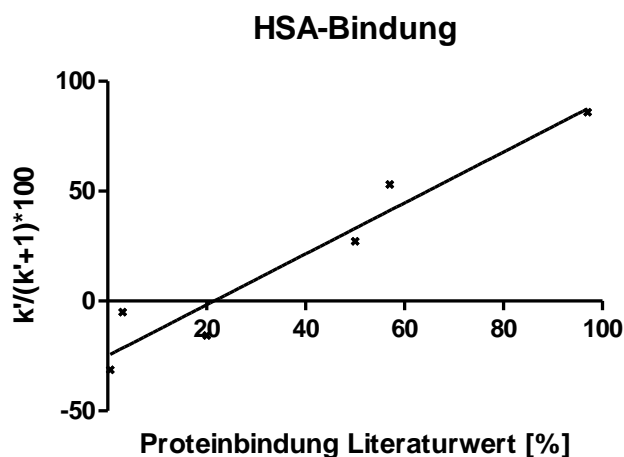


Abb. 5: Literaturwerte [107] der Proteinbindung der verwendeten Referenzsubstanzen aufgetragen gegen gemessene Bindungswerte der Referenzsubstanzen. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N=5]

Auf der Suche nach geeigneten Referenzsubstanzen zeigte sich, dass in Bereichen besonders hoher bzw. niedriger Retention die differenzierenden Eigenschaften des Systems begrenzt waren. Die beste Übereinstimmung zwischen Bindungswerten erhalten aus eigenen Messungen und Literaturwerten [107] ergab sich bei einer Bindungsrate zwischen 20 - 80 %.

Die Aussagekraft des Systems ist am größten, wenn für die Kalibrierung Verbindungen verwendet werden, die eine der zu untersuchenden Substanz ähnliche Molekülstruktur aufweisen. So zeigten Buchholz et al., bei der Untersuchung von β -Blockern, dass eine gute Übereinstimmung mit anderen Bestimmungsmethoden vorlag, wenn zur Kalibrierung ebenfalls β -Blocker verwendet wurden [98]. Dies wurde berücksichtigt indem, wenn möglich, niedermolekulare Verbindungen mit aromatischem Grundgerüst und einer Säurefunktion verwendet wurden (s. Tab. 1).

Das System zeigte eine gute Präzision (s. Standardabweichungen z.B. Tab. 1), wohingegen die Beurteilung der Richtigkeit differierende Ergebnisse lieferte. Wurden aus den Retentionszeiten der Standards Bindungsdaten berechnet und mit Literaturwerten verglichen, ergaben sich, wie in Tabelle 1 zu erkennen ist, teilweise Unterschiede. So ist für Salicylamid eine Bindung von 50 % beschrieben [106]. Die eigenen Messungen hingegen ergaben 27,3 % Proteinbindung. Aber auch, wenn verschiedene Literaturangaben einer Substanz verglichen wurden, ergaben sich starke Schwankungen. Dies ist wahrscheinlich auf die jeweils unterschiedlichen Messmethoden zurückzuführen.

Für die Messung der Verbindungen des Extraktes und der Standards wurde ein Fließmittel, das aus einer Mischung aus Isopropanol und Phosphatpuffer bestand, verwendet. Mit einem Gemisch, das einen geringeren Anteil an organischem Lösungsmittel enthielt, wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, doch die Ergebnisse wiesen bereits für die Referenzsubstanzen eine ungenügende Linearität auf. Es wurden verschiedene Versuche unternommen das Fließmittel physiologischen Bedingungen anzugleichen, d.h. den Isopropanol-Anteil zu verringern und einen pH nahe 7,4 zu erreichen. Doch die Variationen waren durch die Stabilität des Säulenmaterials (pH größerer als 7,0 nicht empfohlen) oder durch nachlassende Qualität der Chromatogramme bei zunehmend wässrigem Fließmittelanteil begrenzt.

Eine Möglichkeit Aussagen über das Bindungsverhalten in rein wässriger Umgebung zu treffen, besteht darin Messungen bei verschiedenen Isopropanolkonzentrationen durchzuführen und diese Ergebnisse auf ein Isopropanol freies Fließmittel zu extrapolieren [102]. Bei eigenen Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass diese Methode für die hier untersuchten Substanzen nicht geeignet war, da kein direkter Zusammenhang zwischen zunehmendem Anteil des organischen Lösungsmittels und abnehmender Retention gefunden werden konnte.

Unter den gewählten Bedingungen war es jedoch möglich die Plasmaproteinbindung der untersuchten Verbindungen verlässlich zu bestimmen.

3.4.4 Bindung verschiedener Extraktbestandteile der Meereskiefer an immobilisiertes humanes Serumalbumin

Aus zuvor gezeigter Kalibriergerade (s. Abb. 5) wurden für die Bestandteile des Pflanzenextraktes und die Metaboliten M1 und M2 die prozentualen Bindungen an humanes Serumalbumin ermittelt. Die Ergebnisse zeigten eine große Bandbreite in den Bindungsraten (s. Abb. 6), aber überwiegend nur eine geringe Streuung der Einzelmessungen. Die Interpretation der gefundenen Bindungswerte, bezogen auf die prozentuale Proteinbindung in Abhängigkeit von der chemischen Struktur, war nur beschränkt möglich.

Zu erkennen war, dass die Hydroxyphenylpropionsäuren Kaffeesäure ($66,3 \% \pm 0,2$), Ferulasäure ($73,5 \% \pm 0,1$) und p-Cumarsäure ($65,4 \% \pm 4,8$) nach Procyanidin B₁ ($81,5 \% \pm 1,09$) die stärkste Bindung zeigten. Die Derivate der Benzoessäure, 3,4-Dihydroxybenzoessäure ($20,7 \% \pm 0,1$), Gallussäure ($31,6 \% \pm 0,6$), p-Hydroxybenzoessäure ($35,3 \% \pm 10,9$) und Vanillinsäure ($56,3 \% \pm 1,2$) lagen in geringeren Bereichen der Proteinbindung. Die beiden Metabolite (M1) δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton ($34,9 \% \pm 1,3$) und (M2) δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton ($26,4 \% \pm 0,03$) zeigten eine deutlich geringere Bindung als die Hydroxyphenylpropionsäuren. Für Taxifolin und (+)-Catechin konnten keine Absolutwerte ermittelt werden, da beide Verbindungen unter den Versuchsbedingungen nicht eluiert werden konnten. Die Entfernung von der Säule war nur mit reinem Isopropanol möglich. Deshalb ist von einer stark ausgeprägten Bindung beider Substanzen an Albumin auszugehen.

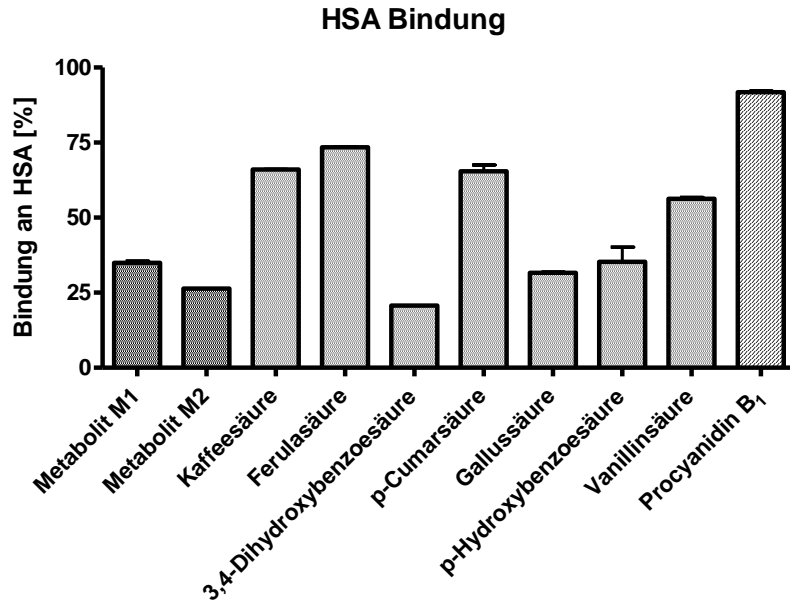


Abb. 6: Prozentuale Bindung der untersuchten Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und der Metabolite M1 und M2 zu humanem Serumalbumin (HSA), bestimmt mittels HPAC. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N=5]

Häufig wird in der Literatur für die Beschreibung der Proteinbindung nicht der prozentuale Bindungsanteil, sondern die Affinitätskonstante (K_a) verwendet [108, 109]. Die Affinitätskonstante ist definiert als:

$$\text{Gleichung (6)} \quad K_a = \frac{[Ps]}{[P] \cdot [S]}$$

P = Proteinkonzentration [M]; S = Bindungspartnerkonzentration [M]; P_s = Protein-Ligandkomplex [M]; K_a = Affinitätskonstante [M⁻¹]

Nach Valko et al. [97] kann unter Verwendung von Gleichung 6 und der Annahme, dass die molare Konzentration des Albumins im Plasma 0,6 mmol/L beträgt, die Affinitätskonstante näherungsweise folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\text{Gleichung (7)} \quad \log K = \log \left[\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right]$$

PPB = Plasmaproteinbindung

Es folgt:

$$\text{Gleichung (8)} \quad \log K_a = \log \left[\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right] + 3.22$$

Daraus errechnen sich für die untersuchten Substanzen die in Tab. 2 dargestellten Affinitätskonstanten.

Tab. 2: Mittlere Affinitätskonstanten der Verbindung berechnet aus Proteinbindungswerten, die aus eigenen Messungen erhalten wurden.

Substanz	Affinitätskonstante k_a [M^{-1}]
Kaffeesäure	3130
Ferulasäure	4549
Metabolit M1	960
Metabolit M2	575
3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)	436
p-Cumarsäure	3130
Gallussäure	770
p-Hydroxybenzoesäure	960
Vanillinsäure	2065
Procyanidin B ₁	16559

Kratochwil et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen experimentell ermittelter Assoziationskonstante und der aus dem prozentualen Bindungsanteil berechneten Assoziationskonstante [110]. Sie konnten zeigen, dass im Bereich bis 95 % Proteinbindung eine gute Vergleichbarkeit der Affinitätskonstanten gegeben war. Lag eine stärkere Bindung vor so waren die diskriminierenden Eigenschaften bei experimenteller Bestimmung höher, als bei berechneten Konstanten.

Für Kaffeesäure wurde eine prozentuale Bindung von 61 - 95 % per Gleichgewichtsdialyse beschrieben [111]. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen (66 % ± 0,2). Allerdings wird in einer weiteren Veröffentlichung [112] eine wesentlich geringere Bindung von 18,9 % angegeben. Der geringere Wert könnte darauf zurückzuführen sein, dass dort bovines Serumalbumin verwendet wurde, denn es konnte gezeigt werden dass sich Bindungswerte, die mit humanem bzw. bovinem Serumalbumin erhalten wurden, deutlich unterscheiden können und somit eine Übertragbarkeit der Ergebnisse nur begrenzt möglich ist [89]. Außerdem wurde bei der oben genannten Untersuchung eine wässrige Pufferlösung verwendet, somit fanden Wechselwirkungen mit anderen Plasmaproteinen keine Berücksichtigung.

Mittels Fluoreszenzquenching konnte von Zhang et al. [113] eine Affinitätskonstante von 28200 M^{-1} für Kaffeesäure gefunden werden, die sich allerdings erheblich von dem selbst ermittelten Wert 3130 M^{-1} unterschied.

Für Ferulasäure wurde mit einer kapillarelektrophoretischen Methode bzw. mittels Fluoreszenzquenching eine wesentlich höhere Bindung von $56000 \text{ M}^{-1} \pm 0,4$ bzw. $22300 \text{ M}^{-1} \pm 0,32$ als bei eigenen Messungen (4549 M^{-1}), erhalten [114, 115]. Eine mögliche Erklärung ist der von eigenen Versuchsbedingungen (pH 7,0) abweichende pH-Wert des dort verwendeten Puffers (pH 8,5). Es ist bekannt, dass bei verschiedenen phenolischen Verbindungen die Affinität zu Albumin mit steigendem pH-Wert zunimmt [116]. Das Ergebnis einer ebenfalls in dieser Arbeit (Y. Zhang et al.) [114] durchgeführten Größenausschlusschromatographie ergab mit einem Messwert von 4000 M^{-1} eine gute Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen. Guo et al. führten Versuche mithilfe von Mikrodialysemembranen an einem Pflanzenextrakt durch und erhielten, bei einer Albuminkonzentration von $0,6 \text{ mmol/L}$ (pH 7,4) eine 36 % ige Bindung [109] und somit einen wesentlich geringeren Anteil, als eigene Messungen, die für Ferulasäure eine Bindung von 73,5 % ergaben. Allerdings wurde hier ein Pflanzenextrakt ohne weitere Auftrennung der Inhaltsstoffe verwendet, so dass wechselseitige Beeinflussungen der Begleitsubstanzen zu vermuten sind.

Von Liu et al. [117] wurde die Bindung von Gallussäure durch Fluoreszenzquenching bestimmt. Hierbei ergab sich eine wesentlich höhere Affinität (11000 M^{-1}) als bei den eigenen Untersuchungen (770 M^{-1}) festgestellt wurde. Die starken Abweichungen der Messergebnisse können in der Verwendung verschiedener Lösungsmittel begründet sein, denn für die Fluoreszenzquenching-Messungen wurde ein wässriger Phosphatpuffer verwendet. Außerdem wird bei dieser Untersuchungsmethode nicht direkt die Bindung, sondern Veränderungen im Fluoreszenzverhalten von Tryptophanresten untersucht. Dies stellt somit ein anderes Messprinzip dar und kann als weitere Ursache für abweichende Ergebnisse gesehen werden.

Ishii et. al [118] konnten mit einer den eigenen Messungen vergleichbaren affinitätschromatographischen Methode für Gallussäure einen Bindungswert von 48 % ermitteln, der mit den selbst ermittelten 31,6 % vergleichbar ist.

Für Taxifolin konnte von Manach et al. ein Bindungsanteil von mehr als 90 % gezeigt werden [119]. Zwar konnte bei den eigenen Messungen mittels HPAC kein Absolutwert für die Proteinbindung des Taxifolins gefunden werden, aber die sehr lange

Retentionszeit ließ auf eine starke Bindung von nahezu 100 % schließen, was wiederum durch die Ergebnisse von Manach et al. gestützt wird.

Es existiert eine Untersuchung, die verschieden modifiziertes BSA in Bezug auf Bindungsfähigkeit zu (+)-Catechin untersucht [120]. Ein Vergleich mit den selbst durchgeführten Untersuchungen ist wenig aussagekräftig, denn auch hier stellt sich, wie oben diskutiert, die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen BSA und HSA. Bei einer Untersuchung nach dem Fluoreszenzquenchingverfahren wurde für (+)-Catechin eine Affinitätskonstante von 14100 M^{-1} gefunden [93]. Dies deckt sich in der Tendenz mit eigenen Untersuchungen. Die am stärksten gebundene Komponente Procyanidin B₁ zeigte eine Affinitätskonstante von 16559 M^{-1} bei einer prozentualen Bindung von 81,5 %. Da (+)-Catechin eine wesentlich längere Retentionszeit aufwies, bzw. nur unter drastischeren Bedingungen eluiert werden konnte, musste also für diese Substanz eine Proteinbindung größer als 81,5 % angenommen werden. Diniz et al. [91] zeigten für (+)-Catechin nach kapillarelektrophoretischer Messung eine Bindung von $42 \% \pm 10$ für HSA und einen, mit den eigenen Ergebnissen gut übereinstimmenden, Bindungsanteil von $90 \% \pm 3$ zu den Gesamtplasmaproteinen.

Ishii et al. [118] untersuchten ebenfalls (+)-Catechin mittels Affinitätschromatographie und erhielten eine 42 % ige Bindung. Für δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton, δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton, Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzoesäure wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen erstmalig Daten zum Proteinbindungsverhalten ermittelt.

3.5 Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration

3.5.1 Prinzip der Bestimmung

Die Plasmaproteinbindung, im Rahmen einer Ultrafiltrationsmethode, wird durch Abtrennung der Proteine über eine porengrößendefinierte Membran aus dem Plasma bestimmt. Hierbei kommen Gefäße mit Filtermembranen zum Einsatz, auf die Plasma aufgetragen werden kann. Eine gewisse Selektion der Proteine ist durch die Auswahl von Filtern mit verschiedenen Porengrößen möglich. Durch Zentrifugation kann eine Abtrennung der Plasmaproteine und damit auch des proteingebundenen Anteils einer Substanz erreicht werden. Im Filtrat liegt nun der freie Anteil vor, der quantifiziert werden kann. Durch direkte Bestimmung der gebundenen Menge oder durch Berechnung aus dem verbleibenden freien Anteil ist es möglich den prozentualen Bindungsanteil zu erhalten.

Bei Untersuchungen dieser Art stellt sich insbesondere bei lipophilen Substanzen das grundsätzliche Problem der Adsorption an Gefäß- und Materialoberflächen. So bestimmten Taylor et al. [121] die unspezifische Bindung bzw. Adsorption verschiedener Kortikoide mittels Ultrafiltration. Wie entscheidend die Berücksichtigung dieses Parameters ist, zeigte sich bei Mometasonfuroat. Denn hier ergab sich eine beinahe vollständige (99 %) Adsorption an Gefäß- und Membranoberflächen. Der so gebundene Anteil kann bei der Berechnung der Proteinbindung zwar berücksichtigt werden, allerdings kann die verminderte freie Menge an Substanz auch das Messergebnis an sich beeinflussen zum Beispiel durch Veränderung des Gleichgewichtes zwischen freiem und gebundenem Anteil, da die prozentuale Proteinbindung auch eine Konzentrationsabhängigkeit aufweisen kann [122]. Um eben diese unspezifische Bindung zu vermindern können potentielle Adhäsionsstellen abgesättigt werden. Dies kann durch vorheriges Spülen der Gefäße und Membranen mit Analytlösung geschehen. Hierbei ist allerdings nicht auszuschließen, dass es während der Analyse auch zu Desorptionen kommt und dadurch zu viel der Substanz frei vorliegt. Alternativ besteht die Möglichkeit eine Vorbelegung mit Tensiden, beispielsweise Polysorbat, oder mit quartären Ammoniumverbindungen wie Benzalkoniumchlorid durchzuführen. So konnten Lee et al. [85] durch die Vorbehandlung der Oberflächen mit Polysorbat 80 die unspezifische Bindung von Propranolol von ca. 85 % auf ca. 65 % senken.

3.5.2 Durchführung der Filtration

Zur Durchführung der Versuche wurden Mikrozentrifugationseinheiten aus Polycarbonat verwendet, deren Filter aus Cellulose eine Porengröße von ca. 10 kDa, entsprechend einem Porendurchmesser von 0,05 μm , aufwiesen (s. Abb. 7). Auf diese Filtrationseinheiten wurde humanes Plasma, das mit den Bestandteilen des Kiefernrintenextraktes und dem Metaboliten M1 versetzt war, aufgegeben und anschließend durch Zentrifugation der Proteinanteil abgetrennt.

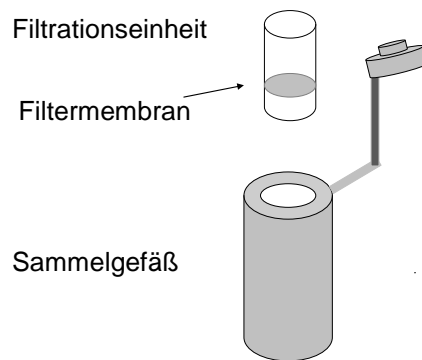


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Filtrationseinheiten, die für die Proteinbindungsversuche verwendet wurden. Der Filtereinsatz kann auf das Sammelgefäß sowohl aufrecht, als auch um 180° gedreht, aufgesetzt werden.

Die Filtrationsmethode orientierte sich an von Taylor et al. [121] durchgeführten Versuchen (s. Abb. 8). Zu jeder so vorbereiteten Filtrationseinheit wurde auf einen zweiten Filter Humanplasma ohne Zusatz der Substanzen aufgegeben und parallel aufgearbeitet. So bestand jeder Versuch aus zwei Filtrationseinheiten. Wurde nach dem Auftragen des Plasmas zentrifugiert so befand sich im Filtrat des Gefäßes, das das mit den Substanzen versetzte Plasma enthielt, der freie Anteil, der gebundene hingegen verblieb im Filter. Nun wurden jeweils die Filtereinsätze einer Filtrationseinheit mit proteingebundenen Substanzen mit einer Filtrationseinheit, die reines Plasma enthielt, getauscht. Hierzu wurden die Filter um 180° gedreht in das jeweils andere Gefäß

eingesetzt und erneut zentrifugiert. So konnte erreicht werden, dass der plasmaproteingebundene Anteil, der sich im Filter befand, nun im Filtrat des zweiten Gefäßes zu finden war. Damit lagen nach Aufarbeitung pro Versuch zwei Filtrationsgefäße vor. Eines enthielt den freien und Eines enthielt den proteingebundenen Anteil.

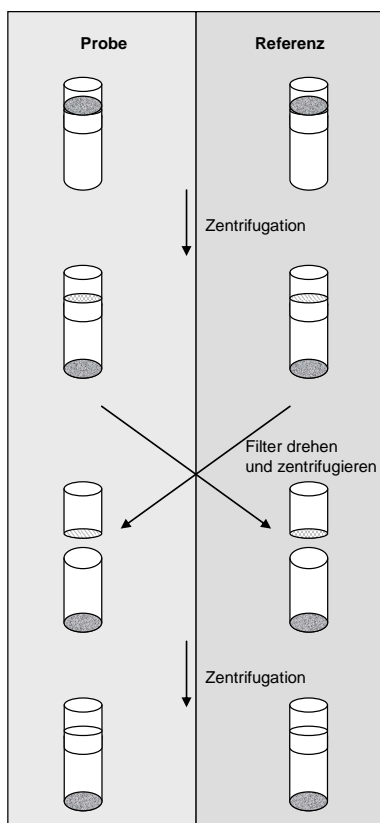


Abb. 8: Schematische Darstellung der für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung verwendeten Ultrazentrifugationsmethode. [Modifiziert nach Taylor et al. [121]]

Diese Methode wurde verwendet, um die Proteinbindung sowohl aus dem gebundenen, als auch aus dem freien Anteil bestimmen zu können, denn da beide Anteile letztendlich frei in Lösung vorliegen sind prinzipiell beide, im Gegensatz zu klassischen Ultrafiltrationsmethoden, einer Quantifizierung zugänglich. Außerdem wird dem freien, gelösten Anteil durch Aufsetzen des zweiten Filters wieder ein gewisser Proteinanteil zugeführt. Dieser vermindert deutlich das Auftreten unspezifischer Bindungen [121] möglicherweise durch Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an der Gefäßoberfläche und das Bereitstellen zusätzlicher Bindungsstellen an gelösten

Proteinen. Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung erfolgte bei den eigenen Untersuchungen aus dem freien, nicht proteingebundenen Anteil.

3.5.3 Ergebnisse

Diese Methode der Proteinbindungsbestimmung wurde bei denjenigen Verbindungen, die im Plasma nachgewiesen wurden [26] und bei Procyanidin B₁, für das es ebenfalls Hinweise auf eine Resorption gibt [123], durchgeführt. Bei ebendiesen mittels Ultrafiltration untersuchten Substanzen bestätigten sich einige Tendenzen, die sich schon bei Proteinbindungsversuchen mit der affinitätschromatographischen Methode angedeutet hatten. So zeigten (s. Abb. 9) die beiden Flavonoide Taxifolin und (+)-Catechin mit 95,4 % ± 1,1 und 95,9 % ± 1,4 die höchste Bindung. Hierauf folgten die beiden Benzoessäurederivate Kaffeesäure mit 79,1 % ± 2,5 und Ferulasäure mit 78,4 % ± 4,0. M1 zeigte hier von allen untersuchten Monomeren mit 58,8 % ± 19,4 die geringste Bindung. Procyanidin B₁ als Dimer lag mit 35,3 % ± 3,7 noch darunter.

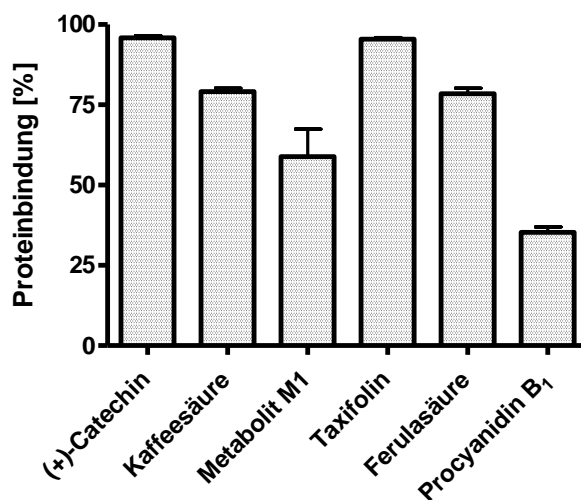


Abb. 9: Proteinbindung der Kiefernextraktbestandteile und des Metaboliten M1 bestimmt mittels Ultrafiltration. [Mittelwert ± Standardabweichung, N=5]

Diese geringe Bindung des Procyanidins war überraschend und ließ sich durch die chemischen Eigenschaften der Verbindung nicht erklären. Denn da schon das Monomer (+)-Catechin eine ausgeprägte Proteinbindung zeigte sollte dies auch bei dem nicht minder lipophilen Dimer zu erwarten gewesen sein. Ein Einfluss der verwendeten

Konzentrationen, die in vivo wohl nicht erreicht werden (ca. 10 μM), auf die Ergebnisse, war eher unwahrscheinlich, zumal die Bindungswerte durch Flächenverhältnisse berechnet (s. Experimenteller Teil 8.2.12) wurden, so dass die Absolutmenge hier eine weniger große Rolle spielte. Außerdem lag Albumin weiterhin im Überschuss vor, so dass nicht mit einer Absättigung der Bindungsstellen gerechnet werden musste.

Weiterhin bestand die Möglichkeit der Verfälschung der Messergebnisse durch Hydrolyse des Catechindimers zu den monomeren Strukturen. Spencer et al. [16] untersuchten die Stabilität mehrerer Procyanidine in Puffern mit verschiedenen pH-Werten. Sie konnten zeigen, dass im sauren Bereich zwischen pH 2 und pH 5 ein Abbau der Dimere um 15 % stattfand. In einem pH-Bereich größer 9 fand dieser Abbau schneller statt. So waren nach zwei Stunden nur noch 30 % des ursprünglich vorhandenen Dimers nicht abgebaut. Bei den untersuchten Dimeren handelte es sich um Procyanidin B₂ und Procyanidin B₅, die sich in der Verknüpfung der Monomere untereinander unterscheiden. Insbesondere Procyanidin B₂ ist mit Procyanidin B₁ vergleichbar, da sich diese beiden Isomere nur in der Konformation der Hydroxygruppe an der 3-Position des Heterozyklus unterscheiden. Bei den eigenen Untersuchungen wurde, da humanes Plasma verwendet wurde, in einem pH-Bereich zwischen 7 und 8 gearbeitet. Hier zeigen Procyanidine die größte Stabilität [124]. In Übereinstimmung mit den von Spencer et al. [16] durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen konnten bei den eigenen Messungen Veränderungen in den Chromatogrammen, wie zusätzliche Signale, nicht festgestellt werden, so dass eine Zersetzung des Dimers als mögliche Ursache für die unerwartet niedrige Bindung unwahrscheinlich ist.

Wie oben beschrieben kann auch die unspezifische Bindung die Ergebnisse verfälschen. Einen Hinweis darauf, ob eine Substanz zu unspezifischer Bindung neigt, könnte der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (P) geben [125]. Er gibt an wie sich ein Stoff zwischen einer Wasser- und einer Octanolphase verteilt. Werte größer als eins deuten auf eine hohe Affinität zur organischen Phase hin. Oft wird auch der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (log P) angegeben. Für Substanzen mit einem hohen log P Wert ist wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften starke Affinität zu apolaren Oberflächen anzunehmen.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden von verschiedenen Autoren ermittelte Verteilungskoeffizienten mit den eigenen experimentell bestimmten unspezifischen Bindungen verglichen. Diese wurden nach Lee et al. [85] ermittelt. Hierzu wurde die Konzentration der Substanzen vor und nach der Passage durch die Filtermembran

B. Allgemeiner Teil

verglichen und aus dem Verhältnis aus dieser Konzentrationsdifferenz zur eingesetzten Konzentration nach Gleichung 9 die unspezifische Bindung errechnet.

$$\text{Gleichung (9) USB [\%]} = \frac{(C_{\text{prä}} - C_{\text{post}})}{C_{\text{prä}}} * 100$$

USB = unspezifische Bindung (Adhäsion); $C_{\text{prä}}$ = Konzentration vor der Filtration; C_{post} = Konzentration nach der Filtration

(+)-Catechin zeigte mit 45,8 % die höchste unspezifische Bindung (s. Tab. 3). Auch Ferulasäure lag mit 45,2 % in einem ähnlich hohen Größenbereich. Kaffesäure und der Metabolit M1 lagen mit 29,7 % und 25,6 % deutlich unter den erstgenannten Substanzen. Die niedrigste Adsorption zeigten Procyanidin B₁ und Taxifolin. Für Ferulasäure wurde der höchste Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient gefunden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der hohen unspezifischen Bindung, die bei den eigenen Messungen erhalten wurde. Auch die von allen Substanzen am geringsten ausgeprägte Tendenz des Procyanidin B₁ zur Adsorption, wurde durch einen sehr niedrigen Verteilungskoeffizienten bestätigt. Für die anderen Substanzen war keine Korrelation feststellbar, so dass von einem allgemein gültigen Zusammenhang zwischen Lipophilie eines der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Moleküle und deren unspezifischer Adsorption an Gefäß- und Membranoberflächen nicht ausgegangen werden kann.

Tab. 3: Unspezifische Bindung der untersuchten Substanzen eines Kiefernextraktes an die Filtermembranen der Filtrationseinheiten sowie die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Substanzen und deren polare Oberflächen (topical polar surface area, TPSA). [Mittelwert ± Standardabweichung, N=3]

Substanz	unspezifische Bindung [%] ± SD	Log P	TPSA
(+)-Catechin	45,8 ± 0,09	0,86 [110]	90,2
Kaffesäure	29,7 ± 0,11	1,30 [112]	77,8
Metabolit M1	25,6 ± 0,06	-0,01 [113]	66,8
Ferulasäure	45,2 ± 0,09	1,58 [112]	66,8
Taxifolin	11,7 ± 0,10	1,30 [110]	128
Procyanidin B ₁	8,5 ± 0,05	0,30 [110]	221

Insbesondere ein linearer Zusammenhang d.h. eine durch zunehmende Lipophilie bedingte Zunahme der unspezifischen Bindung konnte bei den durchgeführten

Versuchen nicht festgestellt werden ($R^2 = 0,14$). Dies mag auch durch die unterschiedlichen Quellen der Log P Werte begründet sein. Die Ermittlung der Werte wurde nicht in allen Arbeiten detailliert beschrieben. Schon geringe Unterschiede in der Durchführung wie beispielsweise verschiedene pH-Werte können zu stark differierenden Ergebnissen führen.

Hingegen lieferte der Vergleich der unspezifischen Bindungen der Substanzen mit ihrer polaren Oberfläche (topical polar surface area, TPSA), nach logarithmischer Umformung, eine mäßige Korrelation ($r = 0,8529$; $p < 0,05$).

Des Weiteren stellte sich bei Betrachtung der Methode die Frage, zu welchem Ausmaß der im Filter der Tubes vorhandene proteingebundene Anteil durch das Drehen der Filter und nachfolgende Zentrifugation wieder aus dem Filter entfernt werden konnte.

Um dies zu beurteilen wurden die freien und gebundenen Anteile summiert und zur eingesetzten Menge ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen Substanzen, außer M1, ein gewisser Anteil im Filter verblieb, der auch durch Zentrifugation nicht von diesem gelöst werden konnte (s. Tab. 4). Möglicherweise reichte die Zentrifugalkraft, trotz Zugabe eines Tensides nicht aus um die Proteine aus den Filtern zu lösen oder die Kapillarkräfte in den Poren der Membranen zu überwinden.

Tab. 4: Wiederfindung der untersuchten Substanzen bei der Proteinbindungsbestimmung mittels Ultrafiltration.

Substanz	Wiederfindung
(+)-Catechin	36 %
Kaffeesäure	72 %
Metabolit M1	105 %
Ferulasäure	93 %
Taxifolin	62 %
Procyanidin B ₁	99 %

Dies bedeutet, dass die Bestimmung der Proteinbindung aus dem gebundenen Anteil wohl zu falsch niedrigen Ergebnissen geführt hätte. Nichtsdestoweniger war die modifizierte Ultrafiltrationsmethode geeignet, gerade im direkten Vergleich verschiedener Substanzen, eine gute Aussage über deren Plasmaproteinbindung zu treffen.

3.6 Vergleich zwischen high performance affinity chromatography und Ultrafiltration

Bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung durch Ultrafiltration sollten ähnliche Bindungswerte zu erwarten sein, wie sie mittels Affinitätschromatographie ermittelt wurden. Auch tendenziell höhere Werte würden nicht überraschen, denn wie schon diskutiert (Abschnitt 3.1) werden durch das Vorhandensein weiterer Proteine im Plasma zusätzliche Bindungspartner zur Verfügung gestellt. Bei Kaffeesäure, Ferulasäure und M1 war dieser Effekt zu erkennen (s. Abb. 10). So betrug bei Kaffeesäure der absolute prozentuale Unterschied beider Methoden 12,8 % bei Ferulasäure 4,9 % und bei M1 23,9 %. (+)-Catechin und Taxifolin konnten keine totalen prozentualen Differenzen zugeordnet werden, da bei der Proteinbindungsbestimmung mittels HPAC keine Elution erreicht werden konnte, was wie unter 3.5.3 beschrieben, auf eine nahezu vollständige Albuminbindung hindeutete. Daher sind im Schaubild Taxifolin und (+)-Catechin mit jeweils 100 % Bindung bei der Bindungsbestimmung mittels Affinitätschromatographie aufgetragen. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit den Bindungswerten, die mittels Ultrafiltration erhalten wurden, denn hier ergaben sich mit jeweils ca. 95 % die höchsten Werte aller untersuchten Substanzen. Procyanidin B₁ zeigte bei den Ultrafiltrationsversuchen eine wesentlich geringere Bindung als durch die affinitätschromatographische Methode ermittelt werden konnte. Der Unterschied war deutlich (46,2 % absolut) und statistisch signifikant ($p < 0,001$). Dieser Unterschied könnte auf Matrixeffekte zurückzuführen sein. Facino et al. [126] und Sakano et al. [127] konnten zeigen, dass Procyanidine stabile Komplexe mit Fe²⁺-Ionen bilden. Auch für Cu²⁺ sind derartige Verbindungen beschrieben worden [126, 128]. Diese Tendenz Komplexe mit Metallionen einzugehen könnte die Proteinbindungsfähigkeit beeinflussen, denn die affinitätschromatographischen Versuche wurden mit metallionenfreiem Puffer durchgeführt wohingegen das Plasma der Ultrafiltrationsversuche mehrwertige Metallionen enthielt.

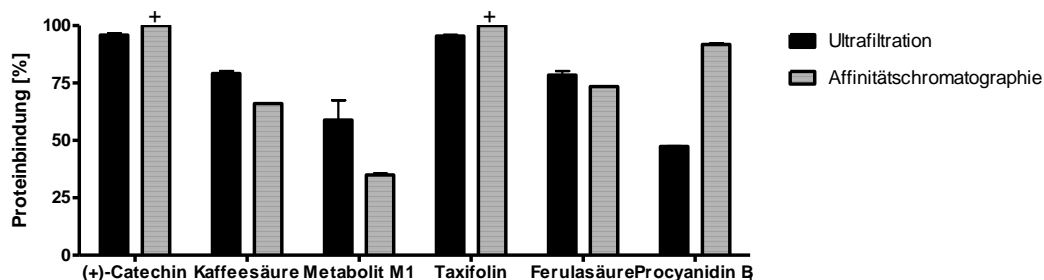


Abb. 10: Prozentuale Plasmaproteinbindung ausgewählter Bestandteile eines Kiefernextraktes und des Metaboliten M1 bestimmt mittels Ultrafiltration und Affinitätschromatographie. Für (+)-Catechin und Taxifolin ist für den HSA-Bindungswert (+) wegen nahezu totaler Retention eine hundertprozentige Bindung angenommen. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N=5]

Es stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Art und Position verschiedener funktioneller Gruppen der Substanzen und dem Ausmaß der Plasmaproteinbindung festzustellen ist. Dangles et al. [129] konnten zeigen, dass bei der Affinität von Quercetin zu humanem Serumalbumin die Affinität stark vom Substitutionsmuster der Hydroxygruppen abhängt. So veränderte zwar eine Sulfatierung der Hydroxygruppe an der 4'-Position (s. Abb. 11) die Bindungsstärke kaum, erfolgte diese Metabolisierung allerdings an der Hydroxygruppe an 3'-Position, so wurde eine signifikante Verringerung der Proteinbindung festgestellt.

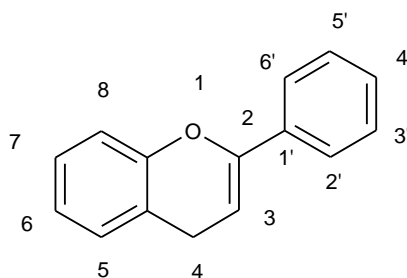


Abb. 11: Struktur des Flavans als Grundgerüst der untersuchten Flavonoide.

Dies deutet darauf hin, dass die Hydroxygruppe an der 3'-Position einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung ausübt. Auch vicinale Diolen an Benzolringen, wie sowohl bei Taxifolin als auch bei (+)-Catechin an 3' und 4' vorhanden, verstärken die Bindung [130]. Als Mechanismus wird die durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden vicinalen Diolen entstehende Elektronendichteververschiebung, die wiederum die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen einem Sauerstoffatom des

Flavonoids und einem Proton des Albumins ermöglicht, postuliert. Gezeigt wurde dieser Effekt von Rawel et al. [116] die die Bindung verschiedener Phenole zu bovinem Serumalbumin untersuchten. Hierbei zeigte 1,2-Dihydroxybenzol eine stärkere Bindung als 1,3-Dihydroxybenzol. Da diese Struktur auch bei Kaffeesäure und Ferulasäure zu finden ist könnte sie auch hier zum Bindungsverhalten der beiden Substanzen beitragen. Doch dies ist sicher nur als Hinweis zu werten, da zwischen Dihydroxyphenolen und Phenolcarbonsäuren strukturelle Unterschiede bestehen. Außerdem wurde bei obigen Untersuchungen kein humanes Albumin verwendet.

Zu klären ist die Frage nach den praktischen Konsequenzen der verschiedenen Plasmaproteinbindungswerte. Da die Substanzen nicht frei vorliegen, könnten die Polyphenole vor Abbau im Plasma geschützt [129] werden, was die Verfügbarkeit in ihrer aktiven Form verlängert. Nicht nur Flavonoide selbst, sondern auch deren Bindungspartner, die Plasmaproteine, könnten von einer starken Bindung profitieren. Es gibt Hinweise [131], dass Polyphenole die Proteine, an die sie gebunden sind, vor oxidativem Angriff zu schützen vermögen. Osakabe et al. führten eine plazebokontrollierte Humanstudie durch, bei der Versuchspersonen über 12 Wochen täglich Kakaopulver einnahmen und beurteilten jeweils vor Studienbeginn und nach 12 Wochen die Anfälligkeit der low density lipoproteins (LDL) gegenüber oxidativer Veränderung, die ursächlich mit arteriosklerotischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird [132]. Diese zeigte sich bei der Interventionsgruppe signifikant niedriger als bei der der Kontrollgruppe. Die Autoren vermuten, neben anderen Mechanismen, auch eine direkte Wechselwirkung bzw. Bindung der Flavonoide an LDL-Partikel als mögliche Ursache für deren geringere Anfälligkeit gegenüber Oxidation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bestimmung der Proteinbindung der Substanzen wegen der teilweise sehr ausgeprägten Adhäsion an verschiedene Oberflächen analytisch schwer zugänglich war. Wegen dieser unspezifischen Bindungen, insbesondere von Taxifolin und (+)-Catechin, war die Durchführung zwei verschiedener Messmethoden notwendig. Durch rechnerische Korrektur war es möglich auch für die Substanzen mit sehr starker Bindung mittels Ultrafiltration Proteinbindungswerte zu ermitteln. Desweiteren zeigte sich, dass beide Messmethoden in ihren Ergebnissen, ausgenommen Procyanidin B₁, eine sehr gute Übereinstimmung aufwiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Plasmaproteinbindungswerte für den Metaboliten M1 und Procyanidin B₁ gemessen. Für (+)-Catechin, Taxifolin, Ferulasäure und Kaffeesäure lagen bereits Untersuchungen zum

Proteinbindungsverhalten vor, dennoch war es durch die Verwendung von zwei verschiedenen Messmethoden möglich besonders robuste Messwerte mit guter Aussagekraft zu erhalten.

4 Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen

4.1 Problemstellung

In den vorherigen Kapiteln wurde die Bindung verschiedener Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 an Plasmaproteine untersucht. Neben eben diesen Proteinen können die verschiedenen Blutzellen als weitere eigenständige Kompartimente betrachtet werden. Den größten Volumenanteil stellen hierbei die Erythrozyten mit einer Anzahl von ca. $5 \cdot 10^9$ Zellen pro Milliliter dar [133].

Die Bedeutung der Erythrozyten beim Transport verschiedener Xenobiotika zeigt sich beispielsweise an der Arzneistoffgruppe der Antimetabolite und dort im Speziellen an den Nucleosidanaloga, die in der Onkologie Verwendung finden. So konnte 6-Mercaptopurin auch noch drei Tage nach Verabreichung bei Kindern, die wegen akuter lymphatischer Leukämie behandelt wurden, in Erythrozyten nachgewiesen werden [134]. Eine intrazelluläre Verweildauer von bis zu 79 Tagen konnte von Lena et al. auch für Methotrexat gezeigt werden [135]. Wegen der langen Lebensdauer von ca. 130 Tagen könnten Erythrozyten also für einige Arzneistoffe ein bedeutendes Reservoir [136] darstellen.

Der Aufnahme von Xenobiotika in Erythrozyten liegen verschiedene Mechanismen zugrunde [137]. So kann der Transport über passive Diffusion oder aktiv erfolgen [138]. Für diesen aktiven Weg stehen auf der Zelloberfläche der Erythrozyten unterschiedliche potentielle Transportwege zur Verfügung. Eine geringere Rolle spielen wohl Ionenkanäle sowie Harnstofftransporter und Chemokin-Transporter [139] als mögliche Wege für Substanzen in das Zellinnere. Eine größere Bedeutung könnten Nucleosid-Transporter als Transportweg für oben beschriebene Nucleosidanaloga haben [136].

Es existieren bereits vereinzelte Untersuchungen zur Aufnahme von Polyphenolen bzw. Phenolcarbonsäuren in Erythrozyten. Dort stand jedoch nicht so sehr die Bedeutung der Zellen als Speicher- und Transportort im Mittelpunkt, sondern es wurden pharmakodynamische Effekte, wie zum Beispiel die Fähigkeit verschiedener

Polyphenole der Plasmamembranperoxidase als Substrat zu dienen, untersucht [140]. Auch auf mögliche Effekte ausgelegt war eine Arbeit von Galati et al. [141], die die prooxidativen Eigenschaften verschiedener Phenole auf Glutathion und Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) untersuchten. Diese Arbeiten liefern durch den Beleg der Beeinflussung intrazellulärer Vorgänge indirekt Hinweise auf eine Aufnahme der untersuchten Polyphenole.

Die Rolle der Erythrozyten als pharmakokinetischer Einflussparameter wurde hingegen für die im Kiefernextrakt enthaltenen Polyphenole und Phenolcarbonsäuren noch nicht untersucht. Dass hier eine Betrachtung als sinnvoll und relevant zu erachten ist, zeigt folgendes Beispiel, denn die Plasmaspiegelverläufe aufgenommener Substanzen können durch dieses Phänomen beeinflusst werden. So wurde für Doxorubicin nach der Verabreichung einer Dosis von 10 mg/kg in Erythrozyten 50 % der aufgenommenen Arzneistoffmenge gefunden. Diese Affinität vermindert die Plasmakonzentration des Doxorubicins und damit auch die kardiologischen Nebenwirkungen [142].

Als weiterer zellulärer Bestandteil des Vollblutes können mononukleäre Zellen als Gegenstand für pharmakokinetische Betrachtungen dienen. Leukozyten sind ebenfalls als Reservoir für Arzneistoffe in der Literatur beschrieben worden. Sie können hierbei nicht nur als Speicherort, sondern auch als Wirkort dienen wie für Rifampin gezeigt wurde [143].

Da Leukozyten bzw. Makrophagen aktiv in Gewebe eindringen können ist eine mögliche Aufnahme von Xenobiotika besonders interessant, da diesen Substanzen dadurch Gewebe zugänglich gemacht werden könnten, die allein durch passive Diffusion nicht zu erreichen wären. Auch eine Beeinflussung von Entzündungsprozessen entweder durch Wechselwirkung mit den Zellen oder Transport an Entzündungsherde wäre denkbar.

Somit kann die Bestimmung der Verteilung der Substanzen zwischen Plasma und Blutzellen zur Vervollständigung des pharmakokinetischen Profils dieser Substanzen beitragen und Ansätze für mögliche Angriffspunkte für die Beeinflussung pharmakodynamischer Prozesse liefern.

4.2 Prinzip der Bestimmung

Um die Menge einer Substanz, die in Erythrozyten oder mononukleären Zellen gebunden vorliegt zu bestimmen, können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Nach

Zugabe der zu untersuchenden Substanzen zu einer Mischung aus Plasma und Zellen kann die wässrige Phase durch Zentrifugation abgetrennt und die zellgebundene Fraktion durch Extraktion und Bestimmung der Absolutmenge aus dem Zellpellet ermittelt werden. Allerdings ist es hierbei nötig die Zellen gründlich zu waschen um für den zellgebundenen Anteil, aufgrund von Adsorptionseffekten, nicht falsch hohe Werte zu erhalten. Jedoch kann sich durch mehrmaliges Waschen und damit das mehrmalige Zugabe substanzfreien Puffers immer wieder ein Gleichgewicht zwischen Zellphase und wässriger Phase einstellen und dadurch Substanz aus dem Zellinneren entfernt und mit der Spüllösung verloren gehen.

Eine weitere analytische Herausforderung stellt die genaue Bestimmung des Zellvolumens dar, dessen Wert im Rahmen eines solchen Messansatzes unabdingbar benötigt wird. Einen Lösungsansatz für dieses Problem stellt die Verwendung einer dünnen Kapillare dar, die mit der Mischung aus Plasma und Zellen befüllt und zentrifugiert wird. Nach Abschneiden der Kapillare an der Grenzfläche zwischen Zellfraktion und Plasma kann durch Differenzwägung das genaue Gewicht der Zellen bestimmt und danach über die Dichte der Zellen das Volumen errechnet werden [133]. Es ist nötig das interzelluläre Wasser möglichst quantitativ zu entfernen, was sich in der praktischen Durchführung als schwierig erweist. Durch eine nicht vollständige Entfernung der Flüssigkeit kann es zu falschen Ergebnissen bei Verteilungsuntersuchungen kommen. Die Werte können zu niedrig berechnet werden, wenn das interzellulär verbliebene Plasma keine Substanz enthält oder aber zu hoch, wenn sie eben gerade dort angereichert ist.

Eine weitere Möglichkeit die Verteilung zu bestimmen besteht in einer indirekten Methode. Hierzu wird eine Zell/Plasma-Mischung mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach Zentrifugation wird der übergegangene Anteil bestimmt, indem die Konzentrationsdifferenz im Plasma vor und nach Inkubation gemessen wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Zellen direkt vor der Konzentrationsbestimmung nicht gewaschen werden müssen und deshalb keine Substanzverluste auftreten. Auch ist hier ein zeitlicher Verlauf einfacher zu verfolgen, da zu verschiedenen Zeitpunkten ohne großen Aufwand Proben entnommen werden können. Yu et al. [144] entwickelten eine Methode zur Bestimmung der Arzneistoffverteilung zwischen Plasma und Blutzellen, die mit einigen Veränderungen angewendet werden konnte (s. Experimenteller Teil 9). Die Autoren verwendeten bei ihren Versuchen heparinisiertes Vollblut während für die eigenen Versuche

Erythrozytenkonzentrate zur Anwendung kamen. Diese sind weitgehend frei von anderen Blutzellen, so dass keine Verfälschung der Messergebnisse durch Bindung der Substanzen an andere Zellen zu erwarten ist. Allerdings mussten diese Konzentrate durch mehrmaliges Waschen von ihrer Nährlösung befreit werden, da diese die Signalgebung bei elektrochemischer Detektion störte. Es wurden zwei volumengleiche Ansätze verwendet. Der eine enthielt reines Plasma, das die Bestandteile des Kiefernrintenextraktes in der gleichen Konzentration enthielt wie der zweite Ansatz dem Erythrozyten zugesetzt wurden (s. Abb. 12). Bei den Versuchen wurde sowohl für die Versuche mit Erythrozyten als auch mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) ein Zellanteil von 40 % verwendet. Als Ergebnis dieser Versuche wurden Flächenverhältnisse erhalten, durch die sich ein Verteilungskoeffizient berechnen ließ (s. Experimenteller Teil 9.10). Dieser drückt das Verhältnis von intrazellulärer Substanzmenge zu Substanzmenge im Plasma aus.

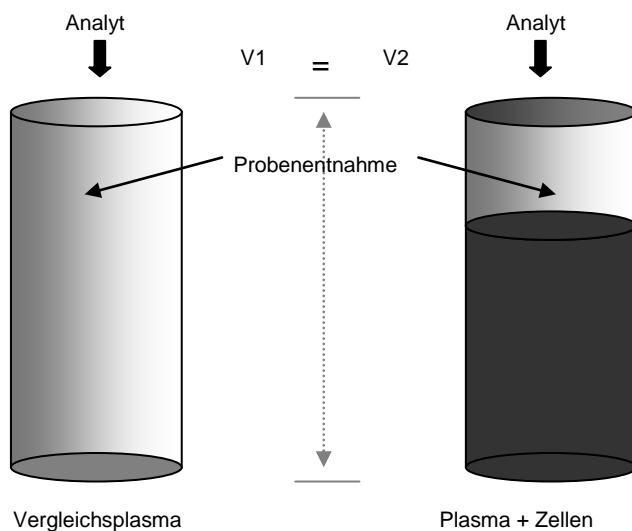


Abb. 12: Schematischer Aufbau des Versuchs zur Ermittlung der Verteilung von Xenobiotika in Blutzellen. Sowohl die Volumina (V_1 = Volumen des Vergleichsplasmas, V_2 = Volumen der Plasma/Zell - Mischung), als auch die Konzentrationen der Substanzen sind in beiden Gefäßen gleich.

Je größer also der berechnete Koeffizient ausfällt desto ausgeprägter ist die Aufnahme einer Substanz in die Zelle. Beiden Ansätzen wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und die Verteilungskoeffizienten mittels HPLC und uv-spektroskopischer bzw. elektrochemischer Detektion bestimmt (s. Experimenteller Teil 9). Zu beachten ist

allerdings, dass, bedingt durch die Bestimmungsmethode, d.h. die Konzentrationsbestimmung im Überstand, eine Unterscheidung zwischen *Absorption*, also einer Aufnahme der Substanzen in die Zelle, und einer *Adsorption*, also einer Anheftung an die Zellwand nicht möglich ist. Wird also im Folgenden von einer Aufnahme bzw. Absorption gesprochen so sind die Ergebnisse stets unter Berücksichtigung dieser Einschränkung zu betrachten.

4.3 Verteilung der Substanzen zwischen mononukleären Zellen und humanem Plasma

4.3.1 Ergebnisse

Zunächst wurden Versuche zur Verteilung von monomeren Verbindungen des Kiefernextraktes, die in der Humanstudie von Grimm et al. im Plasma gefunden wurden, zwischen PBMCs und humanem Plasma durchgeführt [26]. Gegenstand der Untersuchungen war auch der Metabolit M1 (s. Einleitung), der ebenfalls in dieser Studie nachgewiesen werden konnte.

Die Verteilung der Substanzen zwischen mononukleären Zellen und Plasma zeigte für Kaffeesäure, Ferulasäure, (+)-Catechin und den Metaboliten M1 einen vergleichbaren Verlauf (s. Abb. 13). Für Taxifolin hingegen zeigte sich ein stetig abfallender extrazellulärer Anteil. Nach 150 Minuten wurde für diese Verbindung der höchste Verteilungskoeffizient gefunden (12,9).

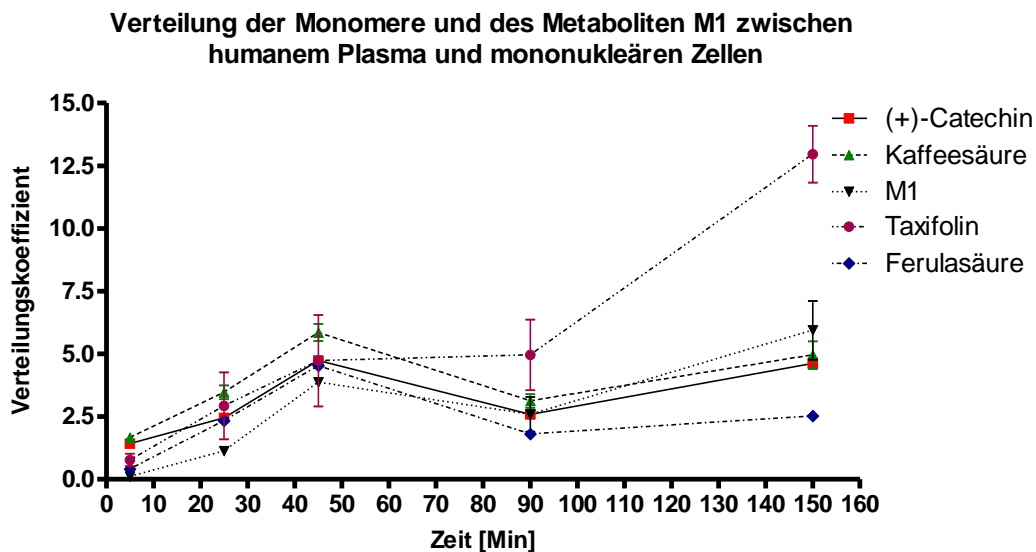


Abb. 13: Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und mononukleären Zellen. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. Die Verteilung wurde nach 5, 25, 45, 90 und 150 Minuten bestimmt. [Mittelwert \pm Standardabweichung]

Bereits zu Beginn der Messung lag bei allen Verbindungen ein gewisser Anteil innerhalb der Zellen vor. Dies spricht entweder für einen schnellen passiven Konzentrationsausgleich oder eine relevante unspezifische Adsorption an die Zelloberfläche. Nach 45 Minuten war für alle Substanzen ein lokales Maximum der Aufnahme zu erkennen. Zwischen 45 und 90 Minuten waren nur geringe Veränderungen feststellbar, wobei die Aufnahme des Taxifolins zu diesem Zeitpunkt bereits am stärksten ausgeprägt war. Zum letzten Messzeitpunkt nach 150 Minuten war für alle Verbindungen der extrazelluläre Anteil geringer, als der intrazellulär verbliebene. Im zweiten Versuch, der mit Zellen eines anderen Spenders durchgeführt wurde, zeigten die Verbindungen ein anderes Verhalten (s. Abb. 14).

Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und mononukleären Zellen

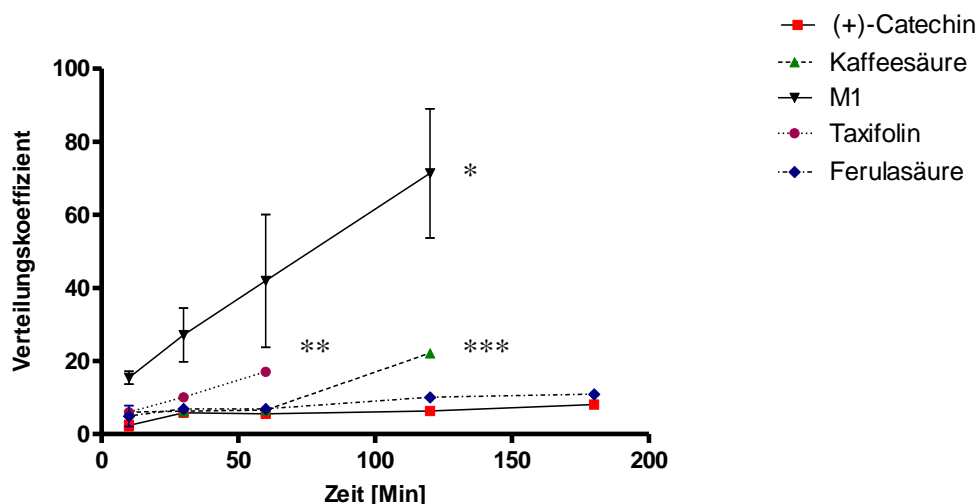


Abb. 14: Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und mononukleären Zellen. Die Verteilung wurde nach 10, 30, 60, 120 und 180 Minuten bestimmt. Für den Metaboliten M1 *, Taxifolin ** und Kaffeesäure *** konnte nach den Entnahmezeitpunkten 60 Minuten bzw. 120 Minuten keine freie Substanz im Überstand gefunden werden. Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. [Mittelwert \pm Standardabweichung]

Bereits zum ersten Messzeitpunkt zeigte der Metabolit M1 die höchste Aufnahme in die Zellen. Der Verteilungskoeffizient stieg bis zum Messzeitpunkt nach 120 Minuten beinahe linear an. Nach 180 Minuten war im Überstand kein freier Metabolit nachweisbar. (+)-Catechin und Ferulasäure verblieben während des gesamten Versuches auf beinahe gleich bleibendem Niveau wobei ein Verteilungskoeffizient von 11 nicht überschritten wurde. Schon nach 120 Minuten war Taxifolin nicht mehr im Plasma nachweisbar und auch Kaffeesäure war zum letzten Messzeitpunkt nicht mehr detektierbar.

4.3.2 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Ergebnisse stark mit der individuellen Leukozytenpräparation schwankten. Während im ersten Versuch für Taxifolin zu den letzten Entnahmezeitpunkten die höchsten Koeffizienten erhalten wurden, zeigte im zweiten Versuch der Metabolit M1 die stärkste Tendenz zur Aufnahme.

Dies mag neben der Herkunft von jeweils verschiedenen Spendern auch in der heterogenen Zusammensetzung der aus der Aufarbeitung (s. Experimenteller Teil 9.5) gewonnenen Zellfraktion begründet sein, die hauptsächlich aus Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten bestand. Bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass bei einigen Durchführungen Effekte auftraten, die Einfluss auf die Aussagekraft der Verteilungsversuche nehmen konnten. So bildeten sich Agglomerate, als Hinweis auf eine Zellaktivierung, die eine Weiterverwendung der Zellen für die Verteilungsversuche nicht erlaubten. Diese Versuche mussten abgebrochen werden und fanden, da keine aussagekräftigen Messwerte erhalten werden konnten, keinen Eingang in die Auswertung. Somit sind auch die ausgewerteten und dargestellten Experimente nur als erster Versuch einer Annäherung an das Problem der Bestimmung der möglichen Aufnahme der Verbindungen in PBMCs zu verstehen. Dennoch deuten die experimentell gefundenen Hinweise in die gleiche Richtung wie andere Arbeiten, die sich bereits mit dieser Thematik beschäftigten.

So ist eine Aufnahme von (+)-Catechin in PBMCs in verschiedenen Arbeiten beschrieben. Beispielsweise wurden in einer Veröffentlichung in humanen Monozyten *in vitro* immunmodulatorische Effekte nachgewiesen [145]. Eine durch hohe Glucosezufuhr initiierte Inflammation konnte durch Expressionshemmung von TNF- α , IL-1 β und COX-2 gemindert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der Einfluss verschiedener Flavonoide auf die intrazelluläre Sauerstoff-Radikalbildung untersucht. Hier konnte unter anderem auch für (+)-Catechin eine freisetzungshemmende Eigenschaft festgestellt werden. Über das Ausmaß der Aufnahme wurden allerdings keine Aussagen getroffen. Die gleiche Arbeitsgruppe führte Versuche zur Wirkung verschiedener Phenolcarbonsäuren auf oben beschriebene Parameter durch [146]. Für Kaffeesäure und Ferulasäure wiesen sie eine Hemmung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies nach. Auch bei diesen Untersuchungen standen quantitative Aussagen über die Aufnahme der Substanzen nicht im Mittelpunkt, dennoch geben die Ergebnisse Hinweise auf das intrazelluläre Vorliegen der Substanzen. Allerdings diente bei den Versuchen Zellkulturmedium als Extrazellulärmatrix und nicht wie in den eigenen Versuchen humanes Plasma. Dieser Umstand kann die Verteilungsvorgänge erheblich beeinflussen. Denn gerade die Plasmaproteine tragen wegen der teilweise ausgeprägten Bindung der Substanzen (s. Abschnitt 3.6) möglicherweise dazu bei, dass ein höherer extrazellulärer Anteil vorliegt, als bei Verwendung eines wässrigen Mediums, auch wenn diesem 10 % FBS zugesetzt wurde.

Die stark differierenden Ergebnisse beider Versuche führen zu einer begrenzten Interpretierbarkeit und Aussagekraft der Resultate. Aber es lässt sich festhalten, dass für den Metaboliten M1 und Taxifolin eine Tendenz zur Aufnahme vorlag, die aber durch weitere Versuche bestätigt werden müsste. Die separate Untersuchung, der in diesem Ansatz verwendeten Zellarten, sowie eine Direktbestimmung der aufgenommenen Substanzmenge durch Zellyse könnten die durchgeführten Versuche ergänzen.

Dieser Ansatz wurde aufgrund der heterogenen Ergebnisse und der offenbar großen Variabilität des Zellmaterials nicht weiter verfolgt. Zudem traten, wie oben beschrieben, in ca. 50 % der ursprünglich angesetzten Versuche Agglomerate auf, so dass die dargestellten Ergebnisse einer gewissen Verzerrung durch die Selektion bestimmter Versuche unterlagen und es somit einer weiteren Optimierung des Versuchsaufbaus bedarf, um die Validität der Aussagen noch erhöhen zu können.

4.4 Verteilung der Substanzen zwischen Erythrozyten und humanem Plasma

4.4.1 Ergebnisse

Analog zu den Untersuchungen mit PBMCs wurden Verteilungsversuche mit Erythrozyten durchgeführt. Um auch sich erst nach längerer Zeit einstellende Gleichgewichte zu erfassen wurde zunächst ein Ansatz mit einer Versuchsdauer von 350 Minuten durchgeführt (s. Abb. 15).

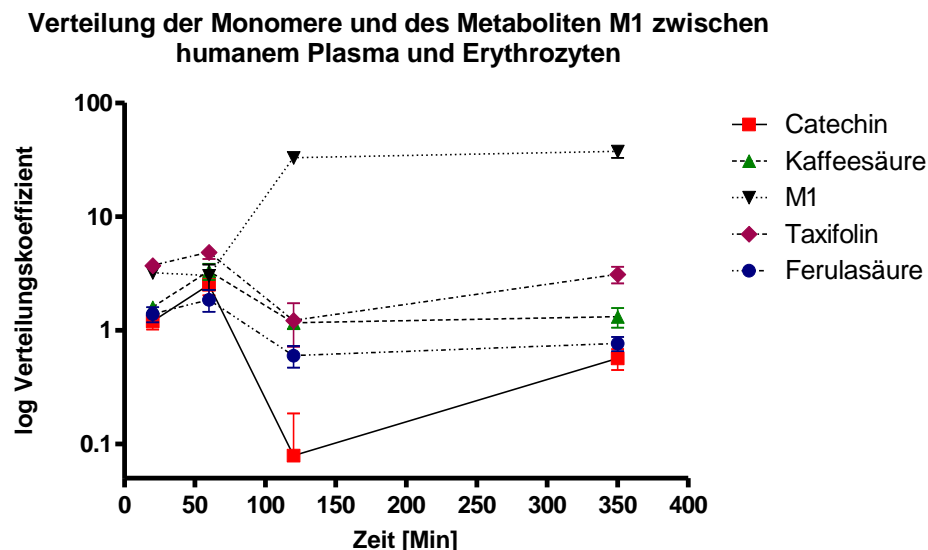


Abb. 15: Darstellung des ersten Versuchs zur Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen Plasma und Erythrozyten. Es wurden jeweils Fünffachmessungen durchgeführt. Nach 20, 60, 120 und 350 Minuten wurde die Verteilung bestimmt. [Mittelwert \pm Standardabweichung]

Zwischen dem vorletzten Messzeitpunkt bei 120 Minuten und der letzten Probennahme ergaben sich für alle Verbindungen kaum Veränderungen, so dass bei den Folgeversuchen die Inkubationszeit von 280 Minuten beibehalten wurde.

Schon zum ersten Messzeitpunkt nach 20 Minuten zeigte sich für alle Substanzen ein Verteilungskoeffizient der, da größer als eins, auf eine schnelle Aufnahme in die Zellen oder eine starke Adsorption an die Zellmembran hindeutete. Bis zum zweiten Messpunkt nach 60 Minuten stieg der Koeffizient leicht an, um danach wieder abzusinken. Diese Tendenz zeigte sich bei allen Substanzen außer bei M1. Bei diesem stieg der Verteilungskoeffizient auf 37 nach 350 Minuten an, was auf eine beinahe vollständige Aufnahme hindeutete.

Zum letzten Messzeitpunkt nach 350 Minuten ergaben sich für Taxifolin (3,1), Kaffeesäure (1,3), (+)-Catechin (0,6) und Ferulasäure (0,8) Verteilungskoeffizienten, die kleiner ausfielen als nach 60 Minuten (4,8; 3,3; 2,5; 1,9). Dies könnte entweder auf eine passive Diffusion oder auf einen aktiven Transport aus dem Zellinneren zurückzuführen sein. Es ließ sich feststellen, dass in diesem Versuch (+)-Catechin, Kaffeesäure und Ferulasäure nur eine geringe Tendenz zum Übergang in Erythrozyten zeigten, während Taxifolin eine mäßige und der Metabolit M1 eine ausgeprägte Aufnahme aufwies.

Die Ergebnisse des zweiten Versuchs sind nachfolgend dargestellt (s. Abb. 16).

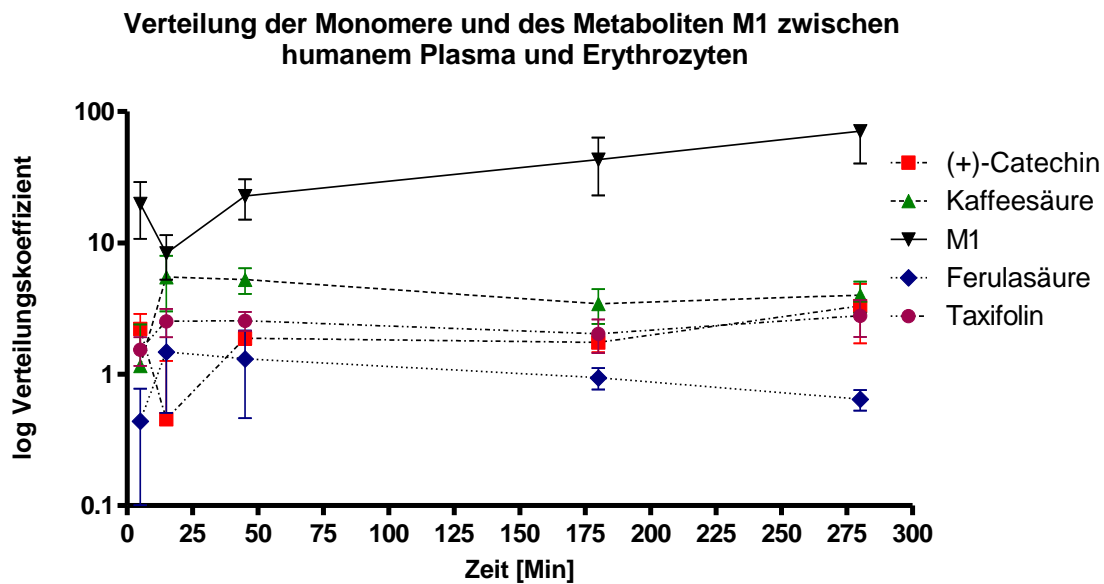


Abb. 16: Darstellung des zweiten Versuchs zur Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen Plasma und Erythrozyten. Es wurden jeweils Fünffachmessungen durchgeführt. Nach 5, 15, 45, 180 und 280 Minuten wurde die Verteilung bestimmt. [Mittelwert \pm Standardabweichung]

Hier wurden innerhalb der ersten Stunde nach 5, 15 und 45 Minuten Proben entnommen, um den frühen Verlauf der Verteilung näher betrachten zu können.

Bei diesem Versuch zeigte sich für Kaffeesäure (5,5), Ferulasäure (1,5) und Taxifolin (2,5) ein Maximum nach 15 Minuten und danach über den verbleibenden Messzeitraum eine stabile Verteilung auf gleich bleibendem Niveau. Die Konzentration von (+)-Catechin in den Zellen hingegen erreichte nach 15 Minuten ein Minimum (0,5), stieg nach 45 Minuten wieder an (1,9) und blieb bis zum Ende der Messung nahezu konstant. Für M1 war der höchste Verteilungskoeffizient aller untersuchter Monomere feststellbar. Er erreichte nach 280 Minuten mit einem Wert von 71 sein Maximum.

Ergänzend wurden aufgrund der Hinweise auf eine ausgeprägte Aufnahme des Metaboliten M1 in Erythrozyten drei weitere unabhängige Versuche mit drei unterschiedlichen Erythrozytenchargen durchgeführt, in deren Rahmen der Metabolit M1 kombiniert mit (+)-Catechin wiederholt vermessen wurde. (s. Abb. 17). (+)-Catechin diente in diesen Ansätzen als Vergleichssubstanz, da diese Verbindung in den vorherigen Versuchen eine wesentlich geringere Aufnahme zeigte als der Metabolit M1.

Verteilung des Metaboliten M1 und des (+)-Catechins zwischen humanem Plasma und Erythrozyten

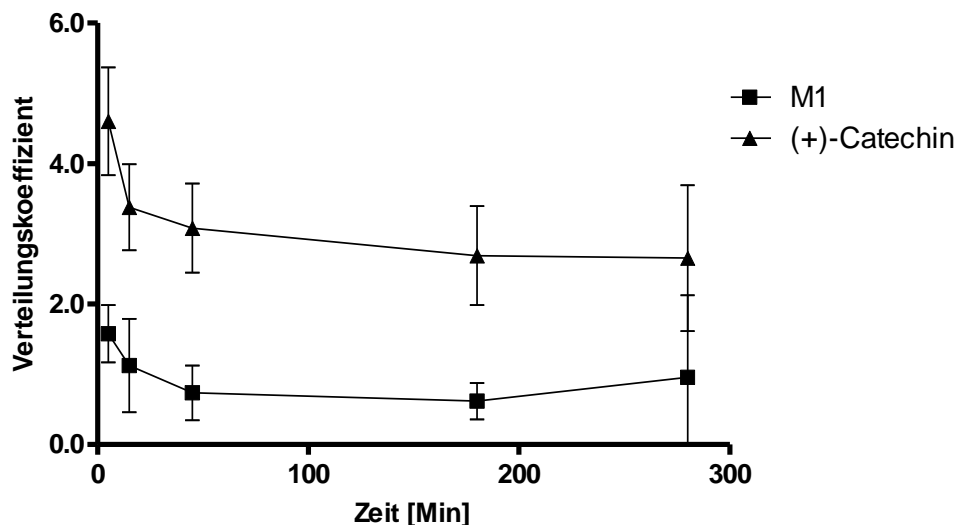


Abb. 17: Darstellung der Verteilung von (+)-Catechin in Kombination mit dem Metaboliten M1 zwischen Plasma und Erythrozyten. Es wurden drei unabhängige Versuche mit verschiedenen Zellchargen durchgeführt. Nach 5, 15, 45, 180 und 280 Minuten wurde die Verteilung bestimmt. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3]

Überraschenderweise ergab sich für (+)-Catechin hier durchweg eine ausgeprägtere Aufnahme als für den Metaboliten M1. Dieser zeigte außerdem, im Gegensatz zu vorherigen Versuchen, über den Messzeitraum abfallende Verteilungskoeffizienten. Den höchsten Verteilungskoeffizient fand man für beide Substanzen zu Beginn der Messung. Auffällig war, dass die dort gemessenen Maxima, mit $4,6 \pm 0,7$ für (+)-Catechin bzw. $1,6 \pm 0,4$ für M1 wesentlich geringer ausfielen als bei den vorherigen Messungen. Nach dem dritten Messzeitpunkt blieben die Koeffizienten für beide Verbindungen nahezu konstant.

4.4.2 Diskussion

Vergleicht man die verschiedenen Versuche so fallen zunächst die sich in den einzelnen Durchführungen stark unterscheidenden Verteilungskoeffizienten auf. So lagen für den Metaboliten M1 die Koeffizienten in einer Durchführung nicht über zwei (s. Abb. 17), während sich bei einem anderen Versuch Koeffizienten bis zu 71 ergaben (s. Abb. 15).

Auch der Vergleich der Substanzen untereinander in einem Versuch ergab widersprüchliche Ergebnisse. Hier sei die Kaffeesäure herausgegriffen: Im zweiten Versuch stieg der Koeffizient nicht über eins, während im ersten Versuch Werte über fünf erreicht wurden. Dieses heterogene Bild lässt sich möglicherweise durch die Verwendung von Erythrozyten verschiedener Spender erklären, da sowohl die Zellform und Anzahl, als auch die funktionelle Ausstattung mit Transportern bzw. transmembranären Kanälen großen interindividuellen Unterschieden unterliegt [147].

Ein eindeutiger Trend der Verteilungen war beim Vergleich der einzelnen Versuche, insbesondere wenn die Absolutwerte betrachtet wurden, nicht festzustellen. Vergleicht man hingegen die Substanzen in Relation zu den jeweils anderen Verbindungen, so ließen sich doch Regelmäßigkeiten erkennen. Ferulasäure, Kaffeesäure und Taxifolin zeigten jeweils über die gesamten Messzeiträume betrachtet ähnliche Kurvenverläufe. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zwischen Kaffee- und Ferulasäure ist ein solches Ergebnis nicht überraschend. Die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs der Substanzen lässt einen gemeinsamen Transportmechanismus möglich erscheinen. Insbesondere das Auftreten von Maxima der Verteilungskoeffizienten gefolgt von einem Absinken der intrazellulären Menge lässt die Beteiligung von Efflux-Mechanismen vermuten.

Arturson et al. [148] untersuchten die Aufnahme verschiedener Substanzen in Caco-2 Zellen und die Abhängigkeit dieses Transports von verschiedenen physikalischen Eigenschaften der Verbindungen. Ausgiebig wurde dort der Zusammenhang zwischen dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten einer Substanz und der Permeabilität der Zellmembran für diese Verbindung betrachtet. Besonders effektiv zeigte sich die Aufnahme bei Verteilungskoeffizienten, die sich bei ca. zwei befanden. Bei geringeren Werten verhinderte die Hydrophilie ein Eindringen in die Zellwand während bei Werten, die zwei weit überstiegen ebenfalls eine Abnahme der Permeationsfähigkeit beschrieben wurde. Dieser Effekt ist wohl durch den partiell hydrophilen Charakter der Zellmembran zu erklären, der es stark hydrophoben Verbindungen nicht ermöglicht die Membran zu passieren. Die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Monomere des Kiefernextraktes bzw. des Metaboliten M1 wurden zeitabhängig mit den experimentell ermittelten Verteilungskoeffizienten verglichen. Es wäre zu erwarten, dass bei zunehmenden log P-Werten (s. Tab. 3) eine verstärkte Tendenz zur Aufnahme in die Zelle zu beobachten wäre. Eine solche Tendenz war allerdings für die untersuchten Verbindungen, auch zeitabhängig, nicht zu erkennen.

Im Gegenteil zeigte sich die Tendenz, dass mit steigendem log P-Wert eine geringere Aufnahme in Erythrozyten stattfand. Zu beachten ist, dass in den jeweiligen Quellen nicht immer angegeben war für welchen pH-Wert die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt wurden. Da das Verhältnis zwischen Säure und Base einer Verbindung erheblichen Einfluss auf die Verteilung zwischen zwei Phasen nehmen kann, ist die Aussagekraft dieser log P-Werte also nur begrenzt. Des Weiteren beschreiben Arturson et al. [148], dass eine bessere Korrelation zwischen Penetrationsvermögen und log P-Wert gegeben ist, wenn als weitere physikalische Größe der Verteilungskoeffizient zwischen Wasser und Cyclohexan berücksichtigt wird. Eine Korrelation zwischen der topological polar surface area (TPSA) und der Tendenz zur Aufnahme in die Zellen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (s. Abb. 18). Es wäre zu erwarten gewesen, dass mit zunehmender polarer Oberfläche eine Abnahme der Tendenz zum Übergang in die Zellen festzustellen wäre.

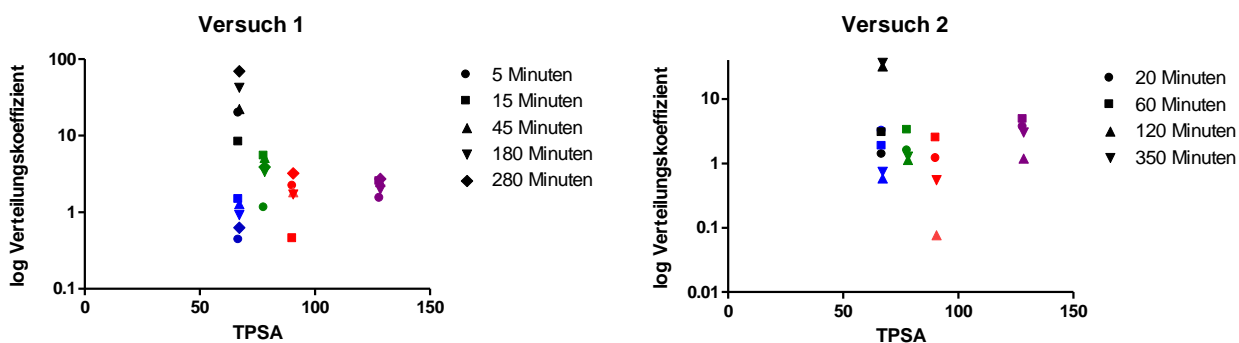


Abb. 18: Zusammenhang zwischen *topological polar surface area* (TPSA) der untersuchten Substanzen und den experimentell erhaltenen Verteilungskoeffizienten aus den Versuchen 1 und 2. [M1=schwarz, Kaffeesäure=grün, Ferulasäure=blau, Catechin=rot, Taxifolin=violett]

Die erhaltenen Ergebnisse können darauf hindeuten, dass eine passive Diffusion nicht den entscheidenden Transportweg darstellte. Insbesondere für den Metaboliten M1 zeigte sich die deutlichste Diskrepanz zwischen einem geringen log P-Wert, der auf einen hydrophilen Charakter der Substanz hinweist, und der experimentell ermittelten starken Aufnahme in Erythrozyten.

4.5 Verteilung der Substanzen zwischen Erythrozyten und humanem Plasma unter Verapamilzugabe

4.5.1 Prinzip der Bestimmung

Um zu untersuchen ob die Verteilung der Substanzen durch aktive Transportmechanismen beeinflusst werden könnte, wurde die im vorherigen Abschnitt beschriebene Versuchsdurchführung erweitert. In der Zellmembran der Erythrozyten liegen Effluxtransporter der ABC-Gruppe (ATP binding cassette) vor [149]. Hierbei handelt es sich um ABCB1 oder auch Para-Glykoprotein-Transporter [150]. Diese können unter ATP- und Glucoseverbrauch aktiv Xenobiotika aus dem Zellinneren transportieren. Verschiedene Isoenzyme dieser Gruppe sind vor allem in der Leber, der Niere und im Dünndarm verbreitet. Sie zeichnen sich durch eine geringe Substratspezifität aus, so dass sie in der Lage sind strukturunabhängig eine große Bandbreite verschiedenster Moleküle zu transportieren.

Die Arzneistoffgruppe der Calciumkanalblocker, wie Verapamil und Diltiazem, werden als Inhibitoren eben dieser Para-Glykoproteine beschrieben [151]. Werden nun Zell-Inkubationen unter Zugabe von Verapamil mit Inkubationen, bei denen kein Zusatz dieser Substanz erfolgt, verglichen, so können Rückschlüsse auf die Art der Wechselwirkung zwischen Xenobiotikum und Zelle gemacht werden. Verapamil selbst dient als Substrat des Para-Glykoproteins, so dass durch diese Substanz eine kompetitive Hemmung des Effluxes anderer Substanzen hervorgerufen werden kann. Derartige Versuche zur Hemmung des Transportes sind bereits in der Literatur beschrieben. Hierbei dienten neben verschiedenen Geweben auch Erythrozyten als Untersuchungsobjekt [152-155]. Die Durchführung der eigenen Versuche erfolgte nach dem unter Abschnitt 4.2 beschriebenen Schema. Es wurden parallel zwei Versuche durchgeführt, wobei jede Probe dreimal vermessen wurde. Einem Ansatz wurde vor der Zugabe der Monomere und des Metaboliten M1 Verapamil zugesetzt. Hierauf wurden die Zellen inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Da ein konzentrationsabhängiger hämolytischer Effekt für Verapamil bekannt ist [156], wurde in Vorversuchen die höchstmögliche Konzentration Verapamil ermittelt, die bei den Zellen keine Hämolyse hervorrief.

4.5.2 Ergebnisse

Nach obiger Versuchsvorschrift wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Zwischen der Inkubation mit (s. Abb. 19 B) und ohne (s. Abb. 19 A) Verapamilzugabe sind folgende Unterschiede festzustellen.

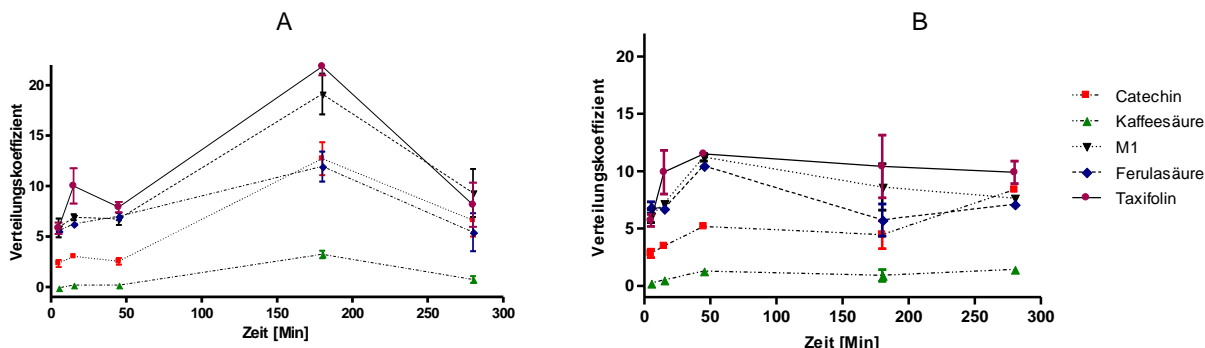


Abb. 19: Verteilung der Monomere und des Metaboliten M1 zwischen Erythrozyten und humanem Plasma mit (B) und ohne (A) Zugabe von Verapamil (50 µM). Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. [Mittelwert ± Standardabweichung]

Für (+)-Catechin ergab sich zu den ersten Messzeitpunkten nach fünf und 15 Minuten kein Unterschied zwischen beiden Versuchsansätzen. Nach 45 Minuten lag der Verteilungskoeffizient im Versuchsansatz mit Verapamil (Ansatz B) mit 5,2 wesentlich höher als im Vergleichsversuch (Ansatz A) mit 2,6. Nach 180 Minuten war der in Ansatz A im Plasma gemessene Anteil des Catechins wesentlich geringer, als im Vergleichsversuch. Zum letzten Entnahmezeitpunkt wiederum lag mit 8,4 im Versuch mit PGP-Inhibitor ein höherer Koeffizient vor als im Vergleichsversuch (6,6).

Zu Beginn der Messung zeigte Kaffeesäure nach den ersten beiden Entnahmezeitpunkten keinen Unterschied der Koeffizienten. Auch hier war nach 45 Minuten in Ansatz B ein höherer Koeffizient (1,3) als im Vergleich (0,2) feststellbar. Den absolut höchsten Koeffizienten dieser Verbindung fand man nach 180 Minuten in Ansatz A (3,2) der somit deutlich über dem Versuch unter Verapamilzugabe anzusiedeln war (0,9). Am Ende der Messzeit fand in Ansatz B eine ausgeprägtere Aufnahme in die Zellen (1,4) als in Ansatz A statt (0,7).

Das Verteilungsverhalten des Metaboliten M1 war durch deutliche Unterschiede zu den Messpunkten nach 45 und 180 Minuten geprägt, während zu den verbleibenden

B. Allgemeiner Teil

Messzeitpunkten keine Unterschiede auftraten. Nach 45 Minuten ergab sich für die Probe mit Verapamilzugabe ein Koeffizient von 11,2 während im Vergleich nur 6,7 erreicht werden konnte. Nach 180 Minuten hingegen wurde in Ansatz A ein höherer Koeffizient festgestellt (19,1) als in Ansatz B (8,6).

Qualitativ vergleichbar verhielten sich Taxifolin und Ferulasäure. Zu den Zeitpunkten 5, 15 und 280 Minuten ergaben sich jeweils keine Unterschiede zwischen den Versuchen. Nach 45 Minuten war jeweils im Versuchsansatz mit Verapamil ein erhöhter Koeffizient feststellbar (Ferulasäure 10,5 ; Taxifolin 11,5) als im Vergleich (Ferulasäure 7,0 ; Taxifolin 7,9). Nach 180 Minuten ergab sich ein umgekehrtes Bild für beide Verbindungen, denn der intrazelluläre Anteil war in Ansatz A höher (Ferulasäure 11,9 ; Taxifolin 21,9) als in Ansatz B (Ferulasäure 5,7 ; Taxifolin 10,4). Zum letzten Entnahmezeitpunkt war der Koeffizient der Ferulasäure in Ansatz B höher (7,1), als in Ansatz A (5,4), während sich für Taxifolin in beiden Ansätzen kein Unterschied ergab. Im zweiten Verteilungsversuch (s. Abb. 20) ergaben sich folgende Ergebnisse.

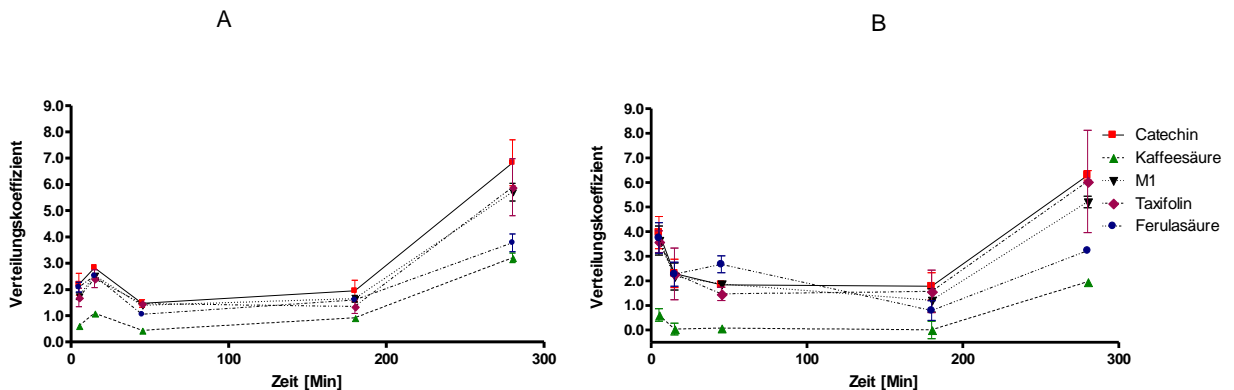


Abb. 20: Verteilung der Monomere zwischen Erythrozyten und humanem Plasma mit (B) und ohne (A) Zugabe von Verapamil (50 μ M). Es wurden jeweils Dreifachmessungen durchgeführt. [Mittelwert \pm Standardabweichung]

(+)-Catechin zeigte hier bei beiden Ansätzen keine Unterschiede außer zum ersten Entnahmezeitpunkt nach fünf Minuten. Hier lag der Koeffizient unter Verapamilzugabe mit 3,9 höher als im Vergleichsansatz in dem nur 2,2 erreicht wurde.

Anders als beim ersten Versuch stieg die Aufnahme der Kaffeensäure sowohl bei der Verapamilinkubation als auch bei der Kontrolle auf Koeffizienten über zwei. Bei dieser Versuchsdurchführung war allerdings der Verteilungskoeffizient zu allen Zeitpunkten in Ansatz A höher als in Ansatz B.

Für Taxifolin konnte nur nach fünf Minuten ein Unterschied zwischen beiden Inkubationen gefunden werden. Auch hier lag der gefundene Wert im Versuch mit Verapamilzugabe höher (3,6) als beim Vergleich (1,7).

Ein anderes Bild ergab sich für Ferulasäure. Hier war in Versuch B nach fünf (3,7) und 45 Minuten (2,7) eine ausgeprägtere Verteilung in die Erythrozyten als im Vergleichsansatz feststellbar (2,1 bzw. 1,1). Nach 180 Minuten war für Ansatz A (1,6) eine stärkere Aufnahme festzustellen als bei Ansatz B (0,8).

Vergleicht man Versuch eins und zwei, so lässt sich feststellen, dass im ersten Versuch, insbesondere bei Ansatz A, für alle Substanzen durchweg eine höhere Aufnahme auftrat. Im zweiten Versuch ergab sich, im Gegensatz zum ersten Ansatz, für alle Verbindungen zum letzten Entnahmezeitpunkt nach 280 Minuten ein Maximum der Aufnahme.

4.5.3 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Verteilungsversuche überraschen, denn es ergaben sich zwar Unterschiede zwischen Inkubationen mit Verapamilzugabe und den Vergleichsansätzen, doch waren diese nicht in einen klaren zeitlichen Zusammenhang, im Sinne einer zu- oder abnehmenden Akkumulation, zu bringen.

Das Para-Glykoprotein-System (PGP) zeichnet sich durch eine geringe Substratspezifität aus, was sich in einer großen Bandbreite transportierter Substanzen äußert. Somit wäre zu erwarten gewesen, dass in dem Versuchsansatz mit Verapamilzugabe ein größerer Anteil der Substanzen intrazellulär verbleibt, was sich in einem erhöhten Verteilungskoeffizienten äußern würde. Eine mögliche Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse wäre eine von einer Transporterhemmung unabhängige intrazelluläre Akkumulation der Substanzen. Durch Adsorption an zytosolische Proteine, insbesondere der Flavonoide Taxifolin und (+)-Catechin, könnte ein extrazellulär gerichteter Transport vermindert sein. Nicht erklärbar ist hierbei, dass auch für die Zimtsäurederivate Ferulasäure und Kaffesäure und den Metaboliten M1 eine Anreicherung festgestellt wurde, denn für diese Substanzen ist eine geringere Affinität zu Proteinen gegeben (s. Abschnitt 3.6).

Ein weiterer Erklärungsansatz beinhaltet, dass in beiden Versuchen die enthaltenen Polyphenole Taxifolin und (+)-Catechin zu einer Hemmung des Para-Glykoprotein-

Systems geführt haben könnten, da für die Versuche jeweils Substanzmischungen verwendet wurden. Diese Hemmung könnte den Effekt des kompetitiven Hemmstoffs Verapamil überdeckt haben. Hinweise für diese Annahme sind in der Literatur bekannt [157, 158]. So zeigten Murakami et al. [158], die für verschiedene Polyphenole in einem Konzentrationsbereich von 0,1 – 300 μM strukturabhängige Affinitäten zu verschiedenen ATP-abhängigen Enzymen ermittelten, eine ausgeprägte Hemmung. Diese trat partiell schon bei Konzentrationen auf, die auch für die Flavonoide in den eigenen Versuchen gewählt wurden (6 μM), so dass ein ähnlicher Effekt denkbar wäre. Als Mechanismus wird eine kompetitive Hemmung der ATP-Umsetzung vermutet. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei einer Wechselwirkung zwischen PGP und (+)-Catechin bzw. Taxifolin denkbar. In obiger Arbeit werden mindestens drei aromatische Hydroxygruppen als nötige ergänzende Strukturmerkmale am Flavangerüst beschrieben. Diese sind sowohl bei (+)-Catechin als auch bei Taxifolin vorhanden. Arbeiten, die eine PGP-Hemmung durch (+)-Catechin zum Gegenstand haben, liefern dennoch widersprüchliche Ergebnisse. Zum einen wird beschrieben, dass keine Beeinflussung durch (+)-Catechin festzustellen ist [159], zum anderen konnte bei Zellkulturversuchen ein inhibitorischer Effekt des (+)-Catechins auf das Para-Glykoprotein gezeigt werden [160]. Sollte es durch eine oder mehrere der untersuchten Substanzen zu einer unspezifischen Inhibition des PGP-Systems kommen, so wären die erhaltenen Ergebnisse erklärbar. Wenn sowohl im Ansatz mit Verapamil als auch in der Vergleichsprobe eine Effluxhemmung auftritt, so ist der Effekt von Verapamil maskiert, so dass widersprüchliche, nicht eindeutige Ergebnisse, erklärbar sind.

Betrachtet man die Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.1 so lässt sich diese Annahme möglicherweise stützen. Die Verteilungskoeffizienten des (+)-Catechins und des Metaboliten M1 waren dort wesentlich kleiner als bei den Versuchsansätzen, bei denen weitere Substanzen zugesetzt waren. Insbesondere für den Metaboliten M1 war dieser Effekt deutlich. Bei den zwei Versuchen, bei denen alle anderen Komponenten zugesetzt wurden, lag der Verteilungskoeffizient jeweils über zehn. Befand sich jedoch nur (+)-Catechin als weitere Komponente in der Inkubationslösung überstieg der Koeffizient nicht den Wert von zwei. Dies bedeutet, dass im zweiten Fall weniger Substanz aufgenommen wurde bzw. in der Zelle verblieb. Daraus lassen sich zwei Schlüsse ziehen. Zum einen, dass (+)-Catechin möglicherweise keine Hemmung des Transporters zeigte, denn die intrazelluläre Konzentration der Substanzen M1 und (+)-Catechin zeigte sich als wesentlich geringer als bei der Kombination mit den anderen

Verbindungen. Zum anderen wäre davon auszugehen, dass eine PGP-Hemmung entweder von Taxifolin, Kaffeesäure, Ferulasäure oder einer Kombination verschiedener Substanzen ausging.

Durch die hier erhaltenen Ergebnisse lässt sich also nicht belegen, dass eine der untersuchten Substanzen ein Substrat des PGP-Systems darstellt, da die mögliche Inhibition des Enzyms durch die eingesetzte Substanzmischung einen Aspekt in den Versuchsaufbau einbringt, der die Interpretation erschwert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anhand der erhaltenen Ergebnisse keine eindeutige Aussage bezüglich der ursprünglichen Fragestellung gegeben werden kann, zumal die Resultate auch dadurch zu erklären wären, dass es sich bei den beobachteten Vorgängen nicht um Absorptions- sondern um Adsorptionsprozesse an der Zelloberfläche handelte und somit keine Transportvorgänge stattfinden konnten. Durch die Verwendung einer Substanzmischung sollten die *in vivo* gefundenen [26] Verhältnisse abgebildet werden, jedoch wäre es im Rahmen dieser speziellen Fragestellung sinnvoll den Versuchsaufbau dahingehend zu verändern, dass jede Verbindung einer separaten Betrachtung unterzogen wird. Durch dieses Vorgehen könnte zum einen ein möglicher PGP-Inhibitor identifiziert und zum anderen Substrate eindeutig als solche aufgeklärt werden.

4.6 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen Erythrozyten und humanem Plasma durch Phenylalanin und Tryptophan

4.6.1 Prinzip der Bestimmung

In humanen Erythrozyten existieren verschiedene Transportsysteme für Aminosäuren [161]. Verzweigte Aminosäuren wie Isoleucin und Valin sind Substrate des „System L“ Proteins. Auch Aromaten wie Phenylalanin oder Tyrosin können so transportiert werden. Als eine Unterform ist ein „System y⁺ L“ beschrieben. Bei diesem Transportweg scheint eine gewisse Selektivität für Leucin vorzuliegen. Die Aminosäuren Arginin und Lysin hingegen gelangen hauptsächlich durch das „System y⁺“ in das Zellinnere. Es handelt sich hierbei um eine erleichterte Diffusion. Aromatische und neutrale Aminosäuren werden in oben beschriebenen Systemen nur in Gegenwart von Natrium transportiert [162]. Ein natriumunabhängiger Kanal ist das „System T“. Dieses ermöglicht, ebenfalls durch erleichterte Diffusion, Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin den Einstrom in die

Zellen. Eine aktive Aufnahme ist hingegen für Alanin, Serin und Cystein beschrieben. Dieser Mechanismus wird als „ASC System“ bezeichnet und ist zwingend natriumabhängig [163]. Als weitere aktive Transporter seien „System Gly“ und „System N“ genannt, die selektiv Glycin und Glutaminsäure den Eintritt in das Zellinnere ermöglichen. Nur für diese beiden Systeme lässt sich eine eindeutige Substratspezifität und -selektivität belegen [164]. Für die anderen Transportsysteme lässt sich eine solche Aussage nicht treffen. So zeigt beispielsweise Tryptophan zwar eine starke Präferenz für das „System T“, kann aber bei Hemmung des selben auch durch das „System $\gamma^+ L$ “ in das Zellinnere gelangen [165]. Ebenso kann Lysin nicht nur über das „System γ^+ “ sondern auch über das „System $\gamma^+ L$ “ transportiert werden.

Zhou et al. beschrieben, dass Trijodthyronin (T_3) über das „System L“ in Erythrozyten gelangen kann [166]. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zwischen T_3 und dem bis dahin bekannten Substrat Tyrosin schien diese Erklärung eingängig. Somit scheint eine gewisse Substrattoleranz für dieses System vorzuliegen. Deshalb ist es sinnvoll zu untersuchen, ob dieser Transporter durch passive Diffusion auch dem Metaboliten M1 den Eintritt in die Zelle ermöglichen könnte. Der Metabolit M1 liegt als Phenolstruktur vor, die bei Öffnung des Lactonrings, verbunden durch einen Alkylrest, durch eine Säurefunktion ergänzt wird. Die Feststellung, dass T_3 als Substrat des „System T“ dient deutet auf eine Substratspezifität hin, die eine gewisse Variation in der Molekülstruktur erlauben könnte. Die Beeinflussung des Verteilungsverhaltens des Metaboliten M1 wurde deshalb in Gegenwart der „System T“ Substrate Tryptophan und Phenylalanin untersucht. Diese Aminosäuren sollten wie bei Zhou et al. beschrieben als kompetitive Inhibitoren des Transporters dienen.

4.6.2 Ergebnisse

Es wurden drei unabhängige Versuche mit unterschiedlichen Erythrozytenchargen zur Beeinflussung der Aufnahme des Metaboliten M1 durch Tryptophan durchgeführt (s. Abb. 21). Beim ersten Messzeitpunkt nach einer Minute zeigte sich eine leicht, wenn auch nicht signifikant erhöhte Aufnahme des Metaboliten M1 im Vergleich zu dem Ansatz, dem Tryptophan zugesetzt wurde.

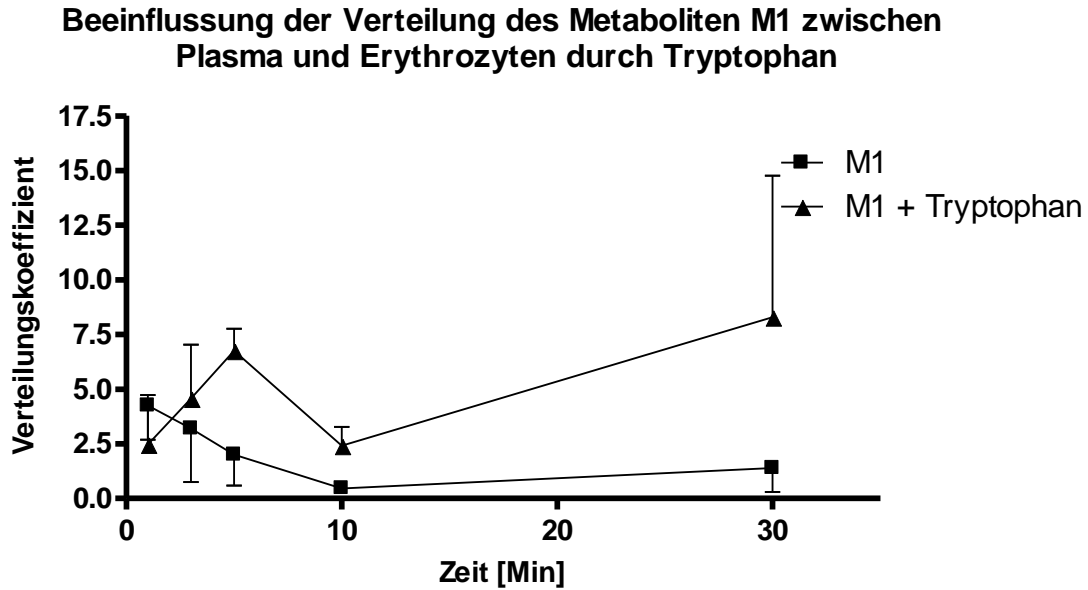


Abb. 21: Verteilung des Metaboliten M1 (4 μM) zwischen Plasma und Erythrozyten unter Einfluss von Tryptophan (1 mM). [Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3]

Nach drei Minuten bzw. fünf Minuten stieg für diese Proben die Aufnahme in die Zelle während für den unbehandelten Ansatz ein verminderter Koeffizient bzw. ein Efflux festgestellt werden konnte. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten zehn und 20 Minuten waren deutlich während nach 30 Minuten, bedingt durch die starke Streuung, kein eindeutiger Unterschied vorlag. Überraschend war, dass zu einem Messzeitpunkt die Konzentration des Metaboliten M1 im Plasma, bei demjenigen Ansatz dem Tryptophan zugesetzt wurde, geringer war als bei der Vergleichsprobe ohne Zusatz des Influxhemmers. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergab sich allerdings, wenn der gesamte Messzeitraum betrachtet wurde, kein Unterschied der Koeffizienten der beiden Ansätze. In Abb. 22 ist bei analogem Versuchsaufbau die Beeinflussung des Influxes des Metaboliten M1 durch Phenylalanin gezeigt.

Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen Plasma und Erythrozyten durch Phenylalanin

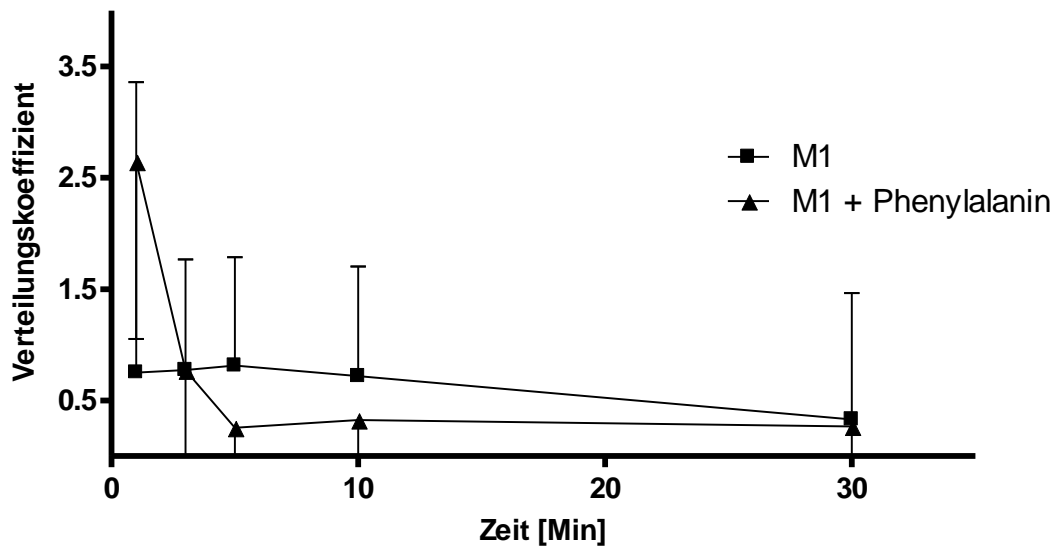


Abb. 22: Verteilung des Metaboliten M1 ($4 \mu\text{M}$) zwischen Plasma und Erythrozyten unter Einfluss von Phenylalanin (1 mM). [Mittelwert \pm Standardabweichung, $N = 5$]

Auch bei diesem Ansatz lag zum ersten Messzeitpunkt der Mittelwert des Verteilungskoeffizienten des Versuchsansatzes, dem der Influxhemmer zugesetzt wurde, höher als derjenige der Vergleichsuntersuchung. Zu beachten ist auch hier, dass, wenn die Standardabweichungen berücksichtigt werden, zwischen beiden Ansätzen kein Unterschied der Verteilungskoeffizienten erkennbar war. Ab der Probennahme nach fünf Minuten lagen diejenigen Mittelwerte der Proben, denen kein Influxinhibitor zugesetzt wurde, über den Versuchsansätzen mit Phenylalanin.

4.6.3 Diskussion

Wie in Abschnitt 4.6.1 erläutert, ist bekannt, dass Xenobiotika als Substrate für Aminosäuretransporter dienen können. Die Verbreitung der bereits beschriebenen verschiedenen Transporter ist nicht auf Erythrozyten beschränkt, so dass zur vergleichenden Betrachtung der Transporttätigkeit auch Untersuchungen an anderen Geweben herangezogen werden können. Tsuji et al. [167] liefern in diesem Zusammenhang eine ausführliche Zusammenfassung. Sie beschreiben Gabapentin,

α -Methyldopa, L-Dopa, Baclofen, und D-Cycloserin als Substrate verschiedener Aminosäuretransporter, unter anderem auch von in Erythrozyten vorkommenden Isoformen im Darmepithel. Bei einer Untersuchung, bei der das „System L“ als möglicher Transportweg in Astrozyten getestet werden sollte, wurden wie bei den eigenen Versuchen verschiedene Aminosäuren bei jeweils gleichem Versuchsaufbau verwendet [168]. Hintergrund hierbei war die oben bereits erwähnte Selektivität bzw. Spezifität der Transporter, so dass durch zwei verschiedene kompetitive Inhibitoren die Wahrscheinlichkeit auf eine mögliche Transportbeeinflussung erhöht werden sollte. Dort konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe verschiedener Aminosäuren die Aufnahme von Gabapentin in die Zellen vermindert wurde, was die Autoren als die Folge einer kompetitiven Aufnahmehemmung deuteten. Als weitere Variante wird beschrieben [163], dass durch Arbeiten mit natriumfreiem Puffer ebenfalls der Influx eines Substrates gehemmt werden könnte. Dies ist der Fall bei neutralen Verbindungen, denen hauptsächlich das „System L“ als Transporter dient. Die Aussagekraft dieses Ansatzes ist allerdings beschränkt, da durch den Ersatz des Natriums durch andere Ionen nur ein kleiner Anteil des Flusses unterbunden werden kann. Beispielsweise kann durch die Verwendung von Kalium statt Natrium nur eine 41 %ige Abnahme des Influxes des natürlichen Substrates L-Cystein beobachtet werden [163]. Dieser geringe Einfluss ist wahrscheinlich auf das Ausweichen auf einen anderen Transporter zu erklären.

Wäre der Metabolit M1 Substrat einer der in Erythrozyten vorkommenden Aminosäuretransporter, so wäre zu erwarten gewesen, dass sich bei Zugabe eines kompetitiven Inhibitors die Aufnahme in die Zellen vermindert. Dies ist aber weder bei der Inkubation mit Tryptophan noch mit Phenylalanin festzustellen. Ganz im Gegenteil zeigte sich bei den Verteilungsversuchen mit Tryptophan als Influxhemmer sogar eine vermehrte Aufnahme in dessen Gegenwart. Ein Symport des Metaboliten M1 mit Tryptophan ist wenig wahrscheinlich zumal dort nur der parallele Einstrom von einwertigen Kationen bzw. einem Proton und dem Substrat, also der Aminosäure, beschrieben ist. Deshalb ist die schlüssigste Erklärung dieser Ergebnisse, dass zwischen beiden Versuchsansätzen kein Unterschied besteht und die Abweichungen der Mittelwerte zufällig zustande kamen. Die Versuchsansätze mit Phenylalanin zeigen zwar, wenn nur die Mittelwerte betrachtet werden, ein Ergebnis, das mit einer Hemmung des Influxes in Einklang zu bringen wäre, doch ist auch dieses unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nicht haltbar.

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Aufnahme des Metaboliten M1 nicht bzw. nicht entscheidend durch die in der Erythrozytenmembran vorliegende Aminosäuretransportsysteme L y^+ , T bzw. y^+ beeinflusst wird bzw. M1 wohl nicht als Substrat dieser Transporter dient.

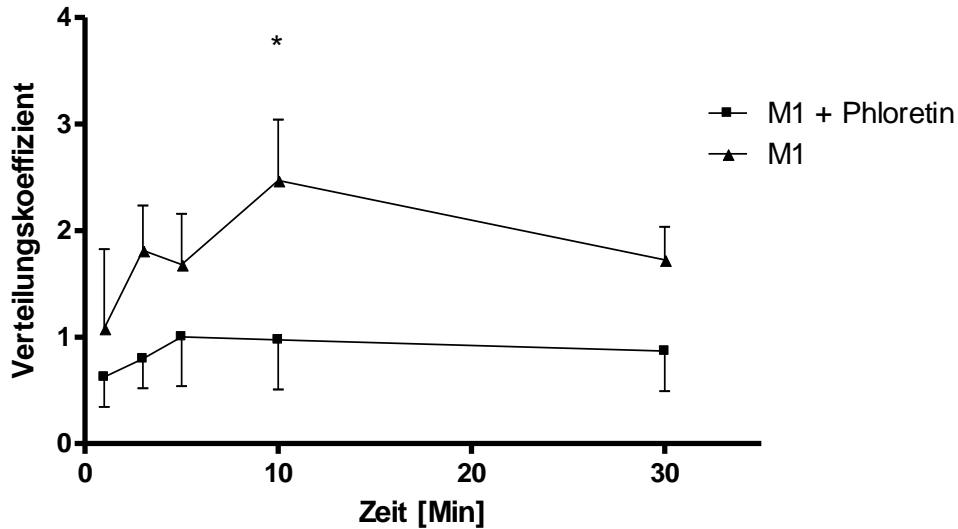
4.7 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen Plasma und Erythrozyten durch Phloretin

4.7.1 Prinzip der Bestimmung

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels deuten darauf hin, dass der Metabolit M1 kein Substrat eines Aminosäure-Transportsystems darstellt. Eine weitere Variante intrazellulär gerichteten Transports bildet der unter anderem in Erythrozyten lokalisierte Glucose-Transporter (GLUT-1) [169]. Hierbei handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das den Glucosefluss sowohl intra- als auch extrazellulär kontrolliert und ca. 10-20 % der Gesamtmasse an Membranproteinen in Erythrozyten ausmacht [170]. Mechanistisch handelt es sich hierbei um eine erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Als Substrat dienen Zucker, vor allem D-Glucose und D-Galactose, in der Struktur des Pyranose-Rings [171], aber auch Moleküle, die keine Zuckerstruktur aufweisen, wie Harnsäure [172] können transportiert werden. Um eine Wechselwirkung des Metaboliten M1 mit diesem Transporter untersuchen zu können wurde Phloretin als Inhibitor dieses Proteins verwendet. Krupka [173] konnte zeigen, dass Phloretin als kompetitiver Influxhemmer fungiert. Möglich ist aber auch eine Effluxhemmung zu erzeugen. Diese entsteht durch partielle Bindung von Phloretin an die Außenseite des Transporters. Wichtig war es deshalb bei der Durchführung der Versuche eine ausreichende Vorinkubationszeit einzuhalten. Es wurden dann, wie bei vorherigen Versuchen, parallel zwei Ansätze Erythrozyten/Plasma-Mischung vorbereitet. Einem Ansatz wurde Phloretin zugegeben und nach einer hinreichenden Vorinkubation der Metabolit M1. Krupka konnte beispielsweise schon nach einer Minute Inkubationszeit einen deutlichen Einfluss des Inhibitors auf das Influxverhalten von Glucose feststellen [173]. Aus diesem Grund wurde eine Gesamtversuchsdauer von 30 Minuten als sinnvoll erachtet und zu Beginn innerhalb von kurzen Zeitabständen Proben entnommen

4.7.2 Ergebnisse

Es erfolgten fünf unabhängige Versuche mit jeweils verschiedenen Erythrozytenchargen. Bereits nach der ersten Probenentnahme ist ein verminderter Übergang des Metaboliten M1 in Erythrozyten im Vergleich zu den Ansätzen ohne Phloretinzugabe zu erkennen (s. Abb. 23).



* $p < 0,05$ (one-way ANOVA, Bonferroni)

Abb. 23: Verteilung des Metaboliten M1 (4 μM) zwischen Plasma und Erythrozyten unter Einfluss von Phloretin (0,6 mM). Die Unterschiede der Verteilungskoeffizienten sind zum Zeitpunkt 10 Minuten signifikant ($p < 0,05$) (one-way ANOVA, Bonferroni). [Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 5]

Im Verlauf steigerte sich die Aufnahme bei den Vergleichsproben bis zum Höchstwert nach zehn Minuten ($2,8 \pm 1,5$) um dann bis zur Entnahme der letzten Probe nach 30 Minuten wieder abzusinken. Betrachtet man den Verlauf der Proben denen Phloretin zugesetzt wurde so war zu erkennen, dass kaum eine zeitabhängige Veränderung des Verteilungskoeffizienten sichtbar war. Dies bedeutet also, dass über den gesamten Messzeitraum der in Erythrozyten übergegangene Anteil unter Phloretinzugabe nahezu gleich blieb. Vergleicht man die einzelnen Koeffizienten zu allen Entnahmezeitpunkten untereinander so ist unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, außer nach zehn Minuten, kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte feststellbar. Dennoch gab dieser eine signifikante Unterschied der Koeffizienten Anlass weitere Untersuchungen anzustellen, zumal da zu allen anderen Messzeitpunkten die Mittelwerte der

Koeffizienten für den Versuch ohne Phloretin durchweg höher lagen als die des Vergleichsansatzes.

4.8 Computergestützter Vergleich physikalischer Eigenschaften der Glucose und des Metaboliten M1

Um die in Abschnitt 4.7 erhaltenen Ergebnisse zu erweitern wurden mittels des Computerprogramms SYBYL-X[®] ergänzende Untersuchungen durchgeführt. Ziel der Berechnungen war es, das natürliche Substrat des GLUT-1-Transporters Glucose mit dem Metaboliten M1 zu vergleichen um somit eine Aussage darüber treffen zu können ob eine hinreichende Ähnlichkeit beider Substanzen besteht, die eine Beförderung der untersuchten Verbindung auch durch den GLUT-1 Transporter als möglich erscheinen lässt. Zunächst wurden hierfür die Strukturen von α -D-Glucose sowie Ascorbinsäure [174] und α -D-Galactose [175], die ebenfalls als Substrate des GLUT-1 Transporters bekannt sind, aufgebaut. Auf gleiche Weise wurde mit dem Metaboliten M1 und Kaffeesäure verfahren. Kaffeesäure wurde als weitere Substanz ausgewählt, da sie in den selbst durchgeführten Versuchen keine ausgeprägte Tendenz zum Übergang in Erythrozyten zeigte und auch in der Literatur nicht als Substrat des GLUT-1 Transporters bekannt ist. Somit stand diese Verbindung als „Nicht-Substrat“ zur Verfügung. Die Zucker Glucose und Galactose können in Lösung entweder offen oder als Pyranose bzw. Furanose vorliegen. Da als Substrat für den GLUT-1 Transporter eine Pyranoseform bevorzugt ist [176], wurden beide Zucker in zyklischer Form für die Berechnungen verwendet.

4.8.1 Molekülstruktur und Überlagerungsberechnungen

Zunächst wurde eine dreidimensionale Molekülstruktur der Verbindungen mithilfe von SYBYL-X[®] konstruiert (s. Experimenteller Teil 9.13), wobei für den Metaboliten M1 beide Stereoisomere getrennt betrachtet wurden. Diese Ausgangsverbindungen wurden einer Kraftfeldminimierung unterzogen und die energieminierten Strukturen dienten als Ausgangsverbindungen für die weiteren Untersuchungen. Grundsätzlich stellte sich das Problem der geeigneten Beschreibung der zugrunde liegenden Fragestellung. Ein

eindeutiges Ergebnis, im Sinne eines Absolutwertes, das eine exakte Aussage darüber zulässt, ob eine Verbindung Substrat eines Transporters darstellt, war im Rahmen dieser Untersuchungen nicht zu erwarten. Um eindeutige Aussagen zu treffen wäre es nötig Berechnungen, die die Struktur des Transporters unter Berücksichtigung des Lösungsmittels beinhalten, durchzuführen. Die Komplexität des Systems wird dadurch noch erhöht, dass auch Verformungen des Kanals durch das transportierte Molekül denkbar wären.

Ausgehend von dem bekannten Substrat Glucose wurden deshalb Vergleichsberechnungen mit verschiedenen Substanzen durchgeführt. Hierfür wurde ein Werkzeug verwendet, das die zu untersuchenden Moleküle bestmöglich übereinander legte. Berücksichtigung bei den Berechnungen fanden die Form, elektrostatische Eigenschaften und, soweit vorhanden, Wasserstoffbrücken [177]. Die Beurteilung erfolgte indem eine „similarity objective function“ gebildet wurde. Hierbei wurden paarweise Ähnlichkeiten und der Raum um die überlagerten Moleküle, in einem gegebenen Maximalvolumen, maximiert. Die effektivsten Überlagerungen wurden isoliert und erneut einer Berechnung mit unterschiedlicher Konformation unterzogen. Voraussetzung dieser Berechnungen war die Bestimmung flexibler Bindungen und die Drehbarkeit dieser Bindungen, wobei verschiedene Konformere als Ausgangspunkt verwendet wurden.

Als Ergebnis wurde eine Liste verschiedener Überlagerungen erhalten, die qualitativ nach der Güte der Überlagerung sortiert war. Grundlage dieser Einstufung war die morphologische Ähnlichkeit der überlagerten Moleküle. Diese wurde wie folgend schematisch beschrieben berechnet: Zunächst wurden in einem dreidimensionalen Raum Punkte definiert. Von diesen ausgehend wurden die kleinstmöglichen Distanzen zur Oberfläche, zum nächstgelegenen Wasserstoffbrückendonator bzw. positiv geladenen Atom und zum nächstgelegenen Wasserstoffbrückenakzeptor bzw. negativ geladenen Atom berechnet. Die Ähnlichkeit zwischen den Molekülen ergab sich als die aufsummierten Differenzen zwischen den Beobachtungspunkten und den Molekülen. Die Optimierung dieser Überlagerungen wurde realisiert, indem die Moleküle in rotierbare Fragmente geteilt wurden von denen jedes einzeln verglichen wurde. Die zehn Fragmentüberlagerungen mit der größten Ähnlichkeit wurden beibehalten und dienten als Basis für die Überlagerung des nächsten Fragments. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt bis alle Fragmente überlagert wurden.

B. Allgemeiner Teil

Die Ergebnisse der Überlagerung von Glucose mit Ascorbinsäure bzw. Galactose sind in Abb. 24 dargestellt. Wie zu erwarten zeigte sich die größte Übereinstimmung bei der Überlagerung von Glucose und Galactose. Zwei Hydroxygruppen waren zur Deckung zu bringen, es fand eine Überlagerung der Heterozyklen statt und die Alkylgruppen außerhalb des Ringes zeigten ebenfalls eine gute Überlappung. Außerdem befanden sich beide Moleküle in einer Ebene, hier diejenige in der sich der Heterocyclus befand, im Gegensatz zur Überlagerung zwischen Glucose und Ascorbinsäure. Hier musste eine Drehung der Ebene vollzogen werden, um die größtmögliche Überlagerung zu erzeugen. Die Carbonylfunktion der Ascorbinsäure ließ sich auch in diesem Fall mit keinem anderen Element der Glucose in Deckung bringen.

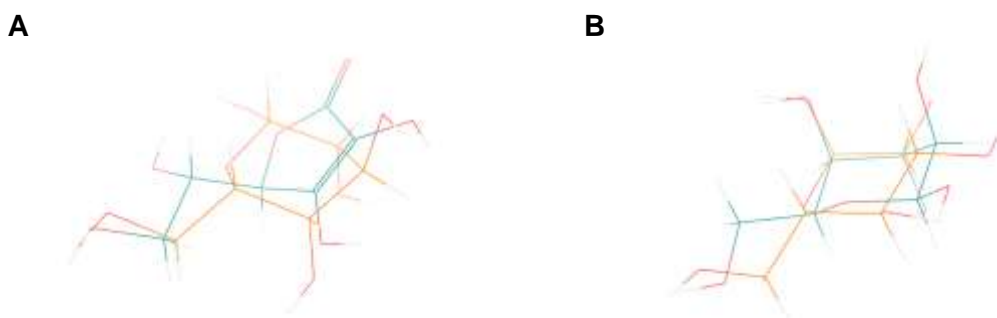


Abb. 24: Dargestellt sind Ergebnisse der Überlagerungen von α -D-Glucose mit Ascorbinsäure (A) und α -D-Galactose (B). Glucose ist jeweils orange und die überlagerten Moleküle grün dargestellt. Die Berechnung erfolgte mittels SYBYL-X[®] (Tripos, Version 1.0 Aug. 2009).

Die gleichen Berechnungen wurden beim Vergleich von Glucose mit Kaffeesäure und dem Metaboliten M1 durchgeführt (s. Abb. 25). Hier zeigte sich überraschenderweise, dass bei der Überlagerung der Kaffeesäure mit Glucose der Propionsäurerest der Kaffeesäure nicht mit der Alkylgruppe der Glucose überlagert wurde. Vielmehr schien ein energetischer Vorteil darin zu bestehen eine der Phenolgruppen mit der Alkoholgruppe des Alkylrestes der Glucose zu überlagern. Der starre Propionsäurerest zeigte hier raumfordernd in die entgegengesetzte Richtung, was eine weniger effektive Überlagerung bedeutete, insbesondere da die polare Säurefunktion weit außerhalb des Ringes zu finden war.

Der Vergleich des Metaboliten M1 mit Glucose ergab eine Überlagerung der zwei Hydroxyfunktionen am Benzolring mit zwei Alkoholgruppen des Pyranoserings. Die

Alkoholgruppe des Alkylrestes der Glucose lag bei dieser Überlagerung Nahe bei der Lactonstruktur des Metaboliten M1. Das Lacton fand zwar kein direktes Analogon in der Glucose, konnte aber durch Drehung der flexiblen Alkylbrücke, an die ebenfalls polare Hydroxyfunktion herangeführt werden, so dass im Gegensatz zur starren Propionsäurefunktion der Kaffeesäure, beide Moleküle bündiger abschlossen.

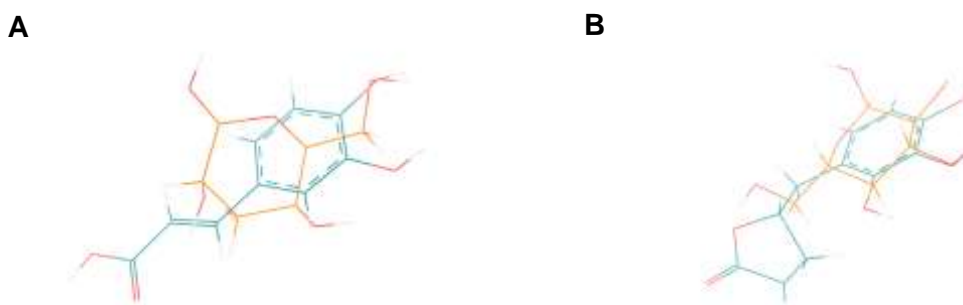


Abb. 25: Dargestellt sind Ergebnisse der Überlagerungen von α -D-Glucose mit Kaffeesäure (A) und dem Metaboliten M1 (S-Isomer) (B). Glucose ist jeweils orange und die überlagerten Moleküle grün dargestellt. Die Berechnung erfolgte mittels SYBYL-X[®] (Tripos, Version 1.0 Aug. 2009).

Um neben dem optischen Vergleich weitere Parameter heranziehen zu können wurden ergänzend zusätzliche Kenngrößen berechnet. Es handelte sich um die Gesamtenergie der Moleküle und sowohl Volumen als auch Oberfläche der Verbindungen. Hierbei wurden jeweils die Werte vor und nach der Überlagerung verglichen (s. Tab. 5).

Tab. 5: Aufstellung der berechneten Kennzahlen der untersuchten Verbindungen. Gegenübergestellt sind die Ergebnisse der Moleküle nach Überlagerung (nachher) und der Ausgangsverbindungen (vorher).

	Volumen [\AA^3]		Oberfläche [\AA^2]		Energie [kcal/mol]	
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher
Glucose	142,9	142,5	157,9	159,2	3,062	11,722
Galactose	142,6	142,7	158,1	159,7	3,344	3,352
Glucose	142,9	142,6	157,9	159,7	3,062	14,725
Ascorbinsäure	125,8	126,7	150,4	152,3	19,368	19,369
Glucose	142,9	142,4	157,9	159,8	3,062	10,701
M1 (R)	165,7	166,9	193,3	194,8	10,701	10,703
Glucose	142,9	142,4	157,9	159,8	3,062	11,436
M1 (S)	164,1	166,9	188,8	194,8	32,742	32,841
Glucose	142,9	142,4	157,9	159,8	3,062	12,376
Kaffeesäure	135,0	134,6	168,4	168,4	9,643	9,643

B. Allgemeiner Teil

Zunächst ist zu erkennen, dass die Ausgangsverbindung Glucose ebenfalls veränderliche Werte zeigte. Dies ist dadurch zu erklären, dass nicht nur das Molekül, das verglichen werden soll, sondern auch das Ausgangsmolekül, die Schablone, nicht starr vorlag, sondern ebenfalls bezüglich der Bindungen und Konformationen flexibel gehandhabt wurde. Damit resultierte aus der Berechnung eine Annäherung bei der die Bindungen beider Moleküle als drehbar behandelt wurden.

Werden die Energien der Moleküle betrachtet, so zeigt sich, dass nach dem Abgleich höhere Energien resultierten. Da für die Ausgangsverbindungen Kraftfeldminimierungen durchgeführt wurden ist dieser Umstand gut zu erklären, da sich durch Drehung der Bindungen die Moleküle nicht mehr in einem (lokalen) Energieminimum befanden. Einzig bei Kaffeesäure blieb die Energie unverändert, was für eine relativ starre Struktur spricht, die sich durch die Berechnungen kaum verändern ließ. Dies spiegelt sich auch in den Werten für Volumen und Oberfläche wieder. Diese blieben ebenfalls nahezu unverändert. Durch die Doppelbindung am aliphatischen Rest der Phenolstruktur ist diese geringe Flexibilität gut nachvollziehbar. Betrachtet man die zugehörige Abbildung (s. Abb. 25 A), so ist insbesondere der Propionsäurerest nicht mit der Struktur der Glucose zur Deckung zu bringen, selbst wenn das Glucosemolekül in eine energetisch ungünstige Konformation gebracht wird, was anhand der stark zunehmenden Energie nach der Überlagerung zu erkennen ist.

Betrachtet man hingegen Ascorbinsäure als Vergleich so zeigt sich zunächst, dass der Energiebetrag, der nötig war um Glucose in eine größtmögliche konformere Ähnlichkeit zu versetzen, höher war als bei Kaffeesäure. Das Volumen der Kaffeesäure ist demjenigen von Glucose wesentlich ähnlicher als das der Ascorbinsäure. In der Oberfläche zeigt sich jedoch, dass für Kaffeesäure ein höherer Wert erhalten wurde als für Ascorbinsäure. Vergleicht man hingegen die zugehörigen Abbildungen (s. Abb. 24 A, Abb. 25 A), so waren Glucose und Ascorbinsäure besser zur Deckung zu bringen, als Kaffeesäure und Glucose.

Bezieht man in diese Überlegungen nun den Metaboliten M1, bzw. beide möglichen Stereoisomere, mit ein so lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Volumen und Oberfläche sind wesentlich größer als bei den übrigen Verbindungen. Beide Isomere änderten nach der Überlagerung nur wenig die Energie. Allerdings ist zu erkennen, dass die Energie für das S-Isomer wesentlich höher war als für das R-Isomer, so dass dieses möglicherweise bevorzugt vorliegt. Ein Vergleich mit *in vivo* Ergebnissen bezüglich der Konformation ist nicht möglich. Es wurde zwar die bevorzugte Ausscheidung eines

Stereoisomere beschrieben, jedoch wurde es wegen der Wechselwirkung mit linear polarisiertem Licht als „-“-Isomer bezeichnet [25, 178]. Da dies jedoch keine Aussage darüber zulässt, ob es sich nach CIP-Nomenklatur um das R oder S Isomer handelt, bleibt ungeklärt, ob die computergenerierten Daten bezüglich der energetischen Bevorzugung des R-Isomers der Realität entsprechen.

Letztendlich lässt sich anhand der Daten keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob der Metabolit M1 als Substrat für den GLUT-1 Transporter zur Verfügung steht. Das wesentlich größere Volumen und die größere Oberfläche sprechen eher gegen diese These während die Betrachtung der graphischen Darstellung der Überlagerung auf eine gewisse Vergleichbarkeit hindeutet (s. Abb. 25 B).

4.8.2 Diskussion

Die Verteilungsversuche zur Aufnahme des Metaboliten M1 in Erythrozyten zeigten, dass diese Prozesse möglicherweise einer Beeinflussung durch den GLUT-1 Inhibitor Phloretin unterliegen. Die Mittelwerte der Verteilungskoeffizienten lagen für denjenigen Versuchsansatz höher, bei dem kein Influxhemmer zugesetzt wurde. Die Probenahme nach zehn Minuten lieferte einen signifikanten Unterschied beider Versuche im Sinne einer Influxhemmung des Metaboliten M1 in Erythrozyten. Zu den anderen Zeitpunkten der Probenentnahme war zwischen beiden Versuchsansätzen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Dies kann den Schluss zulassen, dass die Aufnahme des Metaboliten M1 zumindest zu einem gewissen Teil, d.h. neben einer passiven Diffusion, durch diesen Glucose-Transporter vermittelt sein könnte, denn es ist bekannt, dass dem Glucose-Transporter GLUT-1 auch andere Substanzen als die Zucker Glucose und Galactose und die Verbindungen Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure als Substrat dienen können. So zeigten Lagerquist et al. [179], dass, wenn auch in geringem Umfang Tyrosin über diesen Transporter in den Intrazellulärraum von Erythrozyten gelangen kann.

Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass möglichst physiologische Bedingungen erreicht wurden. Ein das Gleichgewicht der intra- und extrazellulär vorliegenden Konzentration beeinflussender Faktor ist die Wahl der eingesetzten Menge der Substanzen. Der Metabolit lag mit 4 μM in höherer als der in der Humanstudie im Plasma gefundenen Konzentration von ca. 16 nM vor. Diese Konzentration wurde gewählt

um auch noch geringe im Plasmaüberstand verbleibende Mengen quantifizieren zu können. Ein Umstand, der die Ergebnisse der Verteilungsversuche in nicht vorhersehbarer Weise beeinflussen kann, ist die Zusammensetzung der wässrigen extrazellulären Phase. Bei Arbeiten, bei denen Phloretin als kompetitiven Hemmstoff eines Substrat influxes verwendet wurde, fand in den meisten Fällen Phosphatpuffer als Lösungs- bzw. Inkubationsmittel Verwendung [180-182]. Im Gegensatz zu dem in den eigenen Versuchen verwendetem humanem Plasma fehlen dort Plasmaproteine und die Zusammenstellung der Salze bzw. freien Ionen differiert. So könnte ein gewisser Anteil des Phloretins proteingebunden vorliegen oder mit Ionen Komplezierungen eingehen, was die transporthemmenden Eigenschaften dieser Verbindung verändern könnte. Von einem entscheidenden Einfluss ist aber nicht auszugehen, da, wie oben erwähnt, eine ausreichend hohe Konzentration des Inhibitors gewählt wurde um einen möglichen Ausfall eines Anteils der Verbindung auszugleichen. Ein weiterer im Vergleich zu anderen Arbeiten verändert gewählter Parameter war der Anteil an Erythrozyten im Versuchsansatz. Dieser wird meist niedrig gewählt, im Bereich von 10 – 20 %. Bei den eigenen Versuchen wurde von diesem Verhältnis abgewichen und ein Anteil von 40 % gewählt. Der Grund war der Angleich an physiologische Verhältnisse. Die Aussagekraft der Ergebnisse wird hierdurch bedeutend erhöht, denn mit steigendem Zellanteil verändert sich die Absolutmenge des zweiten verteilungsbestimmenden Kompartiments, des Plasmas, und damit auch der Anteil an potentiellen Bindungspartnern der untersuchten Substanz.

Eine vermehrte Akkumulation des Metaboliten M1 könnte durch diesen Transportweg gefördert werden. Ein Efflux durch den Transporter GLUT-1 ist möglich [183], aber insbesondere nach einer möglicherweise intrazellulär stattfindenden metabolischen Modifikation wenig wahrscheinlich, zumindest wenn Konjugationsreaktionen stattfinden sollten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dieser Transportweg einen Ansatzpunkt bietet um die in einigen Verteilungsversuchen festgestellten Hinweise auf eine starke Aufnahme zu erklären, denn der Metabolit M1 zeigt eine ausgeprägte Hydrophilie (s. Abschnitt 3.6), die eine passive Diffusion als Haupttransportart über die Zellmembran hinweg erschwert. Die Berechnungen zu Überlagerung des Metaboliten M1 lassen zwar keine eindeutige Aussage zu, ob ein Transport über den GLUT-1 Transporter stattfinden kann, sie zeigen jedoch, dass *in silico* Strukturen gebildet werden können, die eine gute Überlagerung und damit eine Substratähnlichkeit veranschaulichen.

4.9 Abschließende Betrachtungen

In diesem Kapitel wurden Verteilungsvorgänge zwischen Plasma und Blutzellen untersucht. Betrachtet man die Zusammenhänge differenzierter so sind als weitere eigenständige Kompartimente Plasmaproteine, das Plasmawasser und das Gewebe in die Überlegungen einzubeziehen. Die Zusammenhänge sind in Abb. 26 dargestellt.

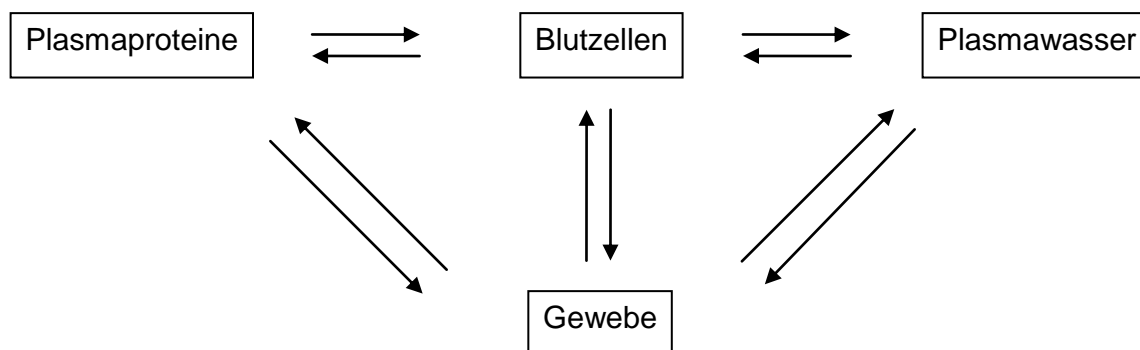


Abb. 26: Schematische Darstellung der Kompartimente, die die Verteilung der untersuchten Substanzen im Blut beeinflussen. [Modifiziert nach Higley et al. [133]]

Um zu beurteilen welchen Stellenwert Erythrozyten bzw. PBMCs als Kompartiment für die Pharmakokinetik einer Substanz einnehmen, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Zunächst ist zu klären welche Voraussetzungen gegeben sein müssen, damit Substanzen in das Zellinnere penetrieren können. Als extrazelluläre Kompartimente stehen der Substanz Plasmaproteine und das Plasmawasser zur Verfügung. Wenn eine Verbindung eine sehr geringe Proteinbindung aufweist, so ist, unter der Voraussetzung der Permeabilität der Zellmembran für diese Verbindung, ein schneller Konzentrationsausgleich möglich. Bei ausgeprägter Plasmaproteinbindung stellt sich die Frage zu welchem Kompartiment in diesem Fall eine stärkere Affinität vorliegt.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurden von Driessen et al. verschiedene Verteilungsversuche mit den Arzneistoffen Phenytoin, Valproinsäure und Hydrocortison durchgeführt [132, 184-188]. Sie untersuchten die Veränderungen der Konzentrationsverhältnisse der Arzneistoffe von Plasmaproteinen zu Plasmawasser und Erythrozyten zu Plasmawasser nach Zugabe zunehmender Menge der Substanzen. Das

Verhältnis der Konzentrationen von Plasmaproteinen zu Plasmawasser nahm mit steigender zugesetzter Menge ab. Dies deutete darauf hin, dass zuerst die Bindungsstellen der Plasmaproteine abgesättigt wurden und die darüber hinaus gehende Substanzmenge frei im Plasmawasser vorlag. Das Verhältnis der Substanzkonzentration von Erythrozyten zu Plasmawasser hingegen blieb bei Phenytoin und Hydrocortison nahezu konstant und stieg bei Valproinsäure an. Dies ließ für Phenytoin und Hydrocortison denn Schluss zu, dass zuerst eine Proteinbindung stattfand, die einen konstant bleibenden Wert erreichte und nur der Überschuss der Substanz zur Verteilung in die Erythrozyten zu Verfügung stand. Der dosisabhängig zunehmende Verteilungskoeffizient, der für Valproinsäure gefunden wurde, ist allerdings durch Proteinbindungseffekte nicht erklärbar. Als Ergebnis dieser Arbeiten lässt sich festhalten, dass für die dort untersuchten Verbindungen vorrangig eine Proteinbindung stattfand und der verbleibende freie Anteil für die Verteilung in Blutzellen zur Verfügung stand.

Die beschriebenen Verteilungsgleichgewichte könnten Einfluss auf andere pharmakokinetische Parameter nehmen. So ist denkbar, dass sich die Clearance, insbesondere bei Substanzen, die eine starke Affinität zu Blutzellen aufweisen, verändern könnte. Für die renale bzw. biliäre Ausscheidung steht der freie oder ungebundene Anteil einer Substanz zur Verfügung. Nach der Elimination einer Fraktion dieses Anteils stellt sich wieder das Ausgangsgleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Anteil ein, indem aus der Proteinbindung bzw. aus den Blutzellen Substanz freigesetzt wird. Wegen der kurzen Kontaktzeit des Blutes mit Nieren bzw. Lebergewebe, ca. 10 Sekunden [189], könnten Blutzellen als Reservoir dienen, wenn die Freisetzung aus Erythrozyten und mononukleären Zellen nicht innerhalb der Kontaktzeit mit dem Eliminationsorgan erfolgt. Ansonsten wäre das Kompartiment der Blutzellen wie das des Plasmawassers zu werten. Das heißt bei schnellem Konzentrationsausgleich zwischen Zellen und Plasmawasser könnte auch Substanz direkt aus dem Zellinneren eliminiert werden. Dies sind theoretische Überlegungen, deren praktische Konsequenz noch untersucht werden muss.

So ist auch die Relevanz einer starken Proteinbindung für die Clearance umstritten [190], so dass der Einfluss der Blutzellverteilung einer Substanz auf die Elimination sich möglicherweise als gering herausstellen könnte. Bezieht man in diese Überlegungen den pharmakokinetischen Parameter des Verteilungsvolumens mit ein, so erhöht sich die Komplexität des Systems und es ergeben sich heterogene Konsequenzen einer

starken Blutzellaffinität. Es zeigte sich beispielsweise im Tiermodell für eine Substanz, dass, trotz ausgeprägter Aufnahme in Erythrozyten, eine Überwindung der Blut/Hirn-Schranke möglich war [191]. Für Ciclosporin wurden im Tiermodell hingegen abweichende Ergebnisse erhalten. Diese Substanz zeigte ebenfalls eine ausgeprägte Affinität zu Erythrozyten, die allerdings die Überwindung der Blut/Hirn-Schranke stark verminderte [192]. Eine klare Korrelation zwischen Substanzaufnahme in die Blutzellen und einer Hemmung der Aufnahme in Gewebe ist somit nicht gegeben. Gleiches gilt für eine postulierte verminderte Ausscheidung einer solchen Substanz. Dies bedeutet, dass die in den eigenen Untersuchungen erhaltene Hinweise auf eine starke Affinität von verschiedenen Bestandteilen des Kiefernextraktes zu Blutzellen zwar als ein Hinweis auf eine möglicherweise verlängerte Verweildauer der Substanzen im Körper zu betrachten ist, aber keinesfalls als eine eindeutige Schlussfolgerung aus der Verteilung gezogen werden kann.

Eine andere Konsequenz, die sich durch die hohe Affinität einiger Monomere zu Blutzellen ergibt, ist die Möglichkeit, dass der Anteil, der nach Konzentrationsbestimmungen aus Plasma erhalten wird, nicht die wahre im Blut vorliegende Konzentration widerspiegelt [193]. Somit könnte für einige Verbindungen ein wesentlich größerer Anteil der durch Nahrung aufgenommenen Polyphenole bzw. Phenolcarbonsäuren in den Blutkreislauf gelangen als durch Messungen allein der Plasmaspiegel erhalten wird. Dieser Umstand ist bekannt für Arzneistoffe wie Phenytoin, Propofol [194] oder Methotrexat [195]. Auch Resveratrol zeigt eine hohe Affinität zu Blutzellen [196]. Untersuchungen von Biasutto et al., die nach der Durchführung der eigenen Versuche veröffentlicht wurden, bei denen sowohl die Wiederfindung aus Plasma als auch aus dem Vollblut gemessen wurde, ergaben bei Bestimmung von Quercetin aus dem Vollblut eine Wiederfindung von $87 \pm 9 \%$, die verglichen zu den $50 \pm 4 \%$, die im Plasma gemessen wurden, eine deutliche Differenz zeigte [197]. In der gleichen Arbeit wurde mit demselben Versuchsaufbau die Wiederfindung von Resveratrol gemessen, wobei sich bei Bestimmungen aus dem Vollblut ebenfalls Ergebnisse ergaben, die der ursprünglich zugesetzten Menge wesentlich näher kamen, als eine Messung bei der nur die Konzentration im Plasma bestimmt wurde. In dieser Arbeit wurden Absolutkonzentrationen aus Vollblut bzw. Plasma bestimmt und mit Konzentrationen verglichen, die bei gleicher eingesetzter Menge aus Puffer bestimmt wurden. Die Substanzen wurden hierbei mit einer den eigenen Untersuchungen vergleichbaren Konzentration von $5 \mu\text{M}$ eingesetzt. Es wurde keine Extraktion sondern

eine Proteinfällung zur Probengewinnung verwendet und zur Stabilisierung Ascorbinsäure zugesetzt. Der Konzentrationsverlauf wurde über einen Zeitraum von 45 Minuten betrachtet, wobei die Einzelergebnisse, mit dem Verweis auf sich nicht ändernde Konzentrationen, nicht einzeln aufgeführt wurden. Als Nachteil dieser Methode muss angeführt werden, dass auch bei diesem Versuchsaufbau nicht zwischen Adsorption und Absorption unterschieden werden kann. Um den intrazellulären Anteil von Quercetin in den Untersuchungen von Biasutto et al. anzugeben, um ihn mit eigenen Ergebnissen vergleichen zu können, ist es nicht möglich die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil der Substanz die im Vollblut gefunden wurde und dem Anteil der im Plasma ermittelt wurde zu bilden, da die Wiederfindung aus den Zellen nicht bekannt ist. Somit ist ein Vergleich absoluter Zahlen nicht möglich, insbesondere auch da in dieser Arbeit prozentuale Anteile erhalten wurden, während die eigenen Untersuchungen relative Werte in Form von Verteilungskoeffizienten lieferten. Dennoch kann festgehalten werden, dass für das Flavonoid Quercetin Daten existieren, die auf eine ausgeprägte Affinität dieser Verbindung zu Blutzellen hinweisen [197].

Bezieht man in diese Überlegungen die Humanstudie von Grimm et al. ein, in deren Rahmen pharmakokinetische Parameter eben der Substanzen untersucht wurden, die auch Gegenstand der Verteilungsversuche waren, so könnten sich auch in diesem Fall neue Aspekte ergeben. Unter anderem wurden in der Studie die „steady state“ Konzentrationen verschiedener Monomere nach fünftägiger Einnahme von 200 mg eines Kiefernrintenextraktes aus Plasmaproben bestimmt. Es ergaben sich Konzentrationen zwischen 2 und 60 ng/ml. Ausgehend von den Ergebnissen der eigenen Verteilungsversuche, die für alle dort untersuchten Verbindungen eine gewisse Affinität zu Blutzellen ergaben, besteht die Möglichkeit, dass die tatsächlich im Blut vorhandene Menge der Substanzen höher lag. Diese erhöhten Blutspiegel könnten auch pharmakodynamische Effekte beeinflussen. Eine konkrete Abschätzung dieser möglicherweise im Blut tatsächlich vorliegenden Menge an Substanz, insbesondere des Metaboliten M1, aus den Daten der pharmakokinetischen Studie ist jedoch nicht möglich. Wie in den Versuchen gezeigt, war eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit der Verteilung vorhanden. Somit steht kein fixer Koeffizient als Richtwert zur Verfügung. Jedoch lässt sich anhand der Versuche, unter Berücksichtigung der verschiedenen Ergebnisse festhalten, dass, wenn eine Aufnahme festgestellt wurde, diese mindestens 50 % der Gesamtmenge der Substanz darstellte.

Um für Verteilungsvorgänge zur Verfügung zu stehen, muss die in die Blutzellen aufgenommene Substanz wieder freigegeben werden. Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass dies, zumindest innerhalb des Versuchszeitraums, nicht bei allen Versuchen der Fall war. Voraussetzung wäre, dass nach Erreichen eines Maximums des Verteilungskoeffizienten dieser wieder absinkt. Ein solcher Effekt ist bei einigen Versuchen zwar erkennbar, aber dennoch reicht dieser Umstand nicht aus um von einer eindeutigen Freisetzung zu sprechen. Ein Nachteil des gewählten Versuchsaufbaus besteht darin, dass es sich um ein statisches System handelt. Befinden sich die Erythrozyten im Blutkreislauf, so kann sich freie oder auch proteingebundene Substanz verteilen und es resultiert eine Konzentrationsabnahme in unmittelbarer Umgebung der Zelle. Das hierdurch entstehende Konzentrationsgefälle begünstigt laut Fickschem Gesetz den Austritt von Substanz aus dem Zellinneren, vorausgesetzt es sind Diffusionsprozesse am Transport beteiligt. Um diese Prozesse zu simulieren wäre es als Erweiterung des Versuchsmodells nötig die statischen Bedingungen des Systems durch einen Flüssigkeitsaustausch zu ersetzen. Dies wäre möglich durch eine Trennung der Zellfraktion vom Plasma durch eine semipermeable Membran. Die Plasmaphase könnte durch ein Pumpsystem in Fluss versetzt werden und so ein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch gewährleistet werden. Allerdings entspräche ein solcher Aufbau ebenfalls nicht den Gegebenheiten *in vivo*, da sich dort die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom bewegen und damit nicht permanent ein kompletter Austausch der Umgebungsflüssigkeit stattfindet. Alternativ wäre es möglich in einem *ex vivo* Ansatz Probanden nach Einnahme der zu untersuchenden Substanzen Blutproben zu entnehmen und sowohl im Plasma als auch in den Blutzellen Konzentrationsbestimmungen durchzuführen. Von Vorteil wäre, dass unter diesen Umständen alle möglichen Verteilungsräume Berücksichtigung fänden und eben auch die Strömungsverhältnisse korrekt einbezogen würden. Andererseits ist es unter den selbigen Voraussetzungen schwierig zeitliche Zusammenhänge in der Pharmakokinetik zu betrachten. Durch die verschiedenen metabolischen Vorgänge, die einer Absorption aus dem Darm vorangehen (s. Einleitung), kommt es zu Verzögerungen bzw. Verschiebungen der Aufnahme der Substanzen, so dass ein zeitlicher Verlauf der Verteilungsvorgänge, ohne den Zeitpunkt des Erstkontaktes der Substanzen mit dem Blutstrom zu kennen, kaum zu bestimmen ist.

Ein anderer Aspekt, der eine Erweiterungsmöglichkeit des Verteilungsmodells darstellt, besteht in der Möglichkeit direkt Freisetzungsraten der Substanzen zu messen. Hierzu könnte die Verbindung einer Blutprobe zugesetzt, und nach hinreichender Äquilibrierungszeit, das Plasma entfernt werden. Nach Zugabe von Frischplasma ließe sich dann die freigesetzte Substanzmenge im Überstand, ausgehend von einem „Nullwert“, bestimmen [198]. Bei diesem Ansatz handelt es sich um eine Variante des oben angesprochenen dynamischen Modells. Somit sind die dort genannten Vor- und Nachteile auch für diesen Ansatz gültig.

Ein Umstand, dem bei der Beurteilung der Versuche Rechnung getragen werden muss, stellt die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichend bekannte Stabilität der untersuchten Substanzen dar. Für das Flavonoid (+)-Catechin existieren Arbeiten, die eine pH abhängige Degradation beschreiben [124, 199-201]. Als Matrix diente dort Phosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten [124]. Die Stabilität sank mit abnehmendem pH-Wert. Als weiterer Einfluss wurde die Lagertemperatur untersucht, hierbei fand Plasma als Matrix Anwendung. Bei einer Temperatur von 25 °C war bereits nach 12 Stunden weniger als 30 % der Ausgangskonzentration nachweisbar [200].

Für den Metaboliten M1 sind bisher kaum Daten bekannt. Die Ringöffnung des Lactons und Oxidation der Brenzcatechinstruktur stellen die entscheidenden Faktoren der Stabilität dieser Verbindung dar. Bei den durchgeführten Verteilungsversuchen wurde versucht dieser möglicherweise auftretenden Instabilität Rechnung zu tragen, indem die Chromatogramme der zeitabhängigen Verteilung auf zusätzlich auftretende Peaks untersucht wurden. Außerdem wurden zur Berechnung der Koeffizienten parallel Proben inkubiert, die als Vergleich dienten. (s. Experimenteller Teil 9.10). Es fanden also keine absoluten Konzentrationsbestimmungen statt, sondern es wurden Flächenverhältnisse gebildet, wobei auch ein partieller Abbau einer Substanz durch diese Art der Berechnung Berücksichtigung gefunden hätte.

Wie in der Einleitung beschrieben liegen die untersuchten Verbindungen zu einem gewissen Anteil als Metabolisierungsprodukte (Glucuronide, Sulfate) vor, so dass es in einem erweiterten Modell sinnvoll wäre diese Verbindungen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. Dennoch haben die selbst durchgeführten Untersuchungen eine gewisse Aussagekraft. Zwar finden bereits im Darm erste Metabolisierungsreaktionen statt, doch können die Wechselwirkungen der Substanzen zwischen Plasma und Blutzellen schon in der Pfortader stattfinden, d.h. Verteilungsvorgänge finden bereits statt bevor die

Substanzen die Leber, das ausschlaggebende Organ des Phase II Metabolismus, erreichen.

Sollten die Substanzen insbesondere in Erythrozyten verbleiben, dann könnte sich auch ein „targeting“ für die beschriebenen Verbindungen ergeben. Nach ca. 120 Tagen im Blutkreislauf werden Erythrozyten von Monozyten phagozytiert. Daher könnte so ein Transport der Verbindungen direkt zu an verschiedenen Entzündungsprozessen beteiligten Zellen führen [202].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für verschiedene im Rindenextrakt der Meereskiefer *pinus pinaster* enthaltene Monomere und den Metaboliten M1 Verteilungsversuche durchgeführt wurden, die eine gewisse Affinität dieser Substanzen, insbesondere des Metaboliten M1 und des Taxifolins, zu Erythrozyten bzw. mononukleären Zellen, ergaben. Auffällig waren die starken Unterschiede, die für verschiedene Zellchargen gefunden wurden. Des Weiteren ergaben Untersuchungen zu möglichen Transportmechanismen der festgestellten Aufnahme des Metaboliten M1, dass eine Beteiligung des GLUT-1 Transporters an diesen Vorgängen vorliegen könnte.

5 Untersuchungen zu metabolischen Veränderungen verschiedener Kiefernringenextraktbestandteile und des Metaboliten M1 durch Erythrozyten und mononukleäre Zellen

5.1 Metabolische Aktivität der Erythrozyten und mononukleären Zellen

Wie zuvor (Kap. 4) gezeigt, werden einige der Kiefernringenextraktbestandteile bzw. Metabolite in Erythrozyten und möglicherweise auch PBMCs aufgenommen oder adsorbiert. Es stellt sich die Frage, ob und in welcher Art und Weise diese Substanzen in den Zellen metabolische Veränderung erfahren könnten.

Erythrozyten verfügen über eine Enzymausstattung, die sie zum Metabolismus verschiedenster Xenobiotika und endogener Verbindungen befähigt. So wird Acetylsalicylsäure durch intrazelluläre Esterasen gespalten und die freie Salicylsäure wieder in das Plasma abgegeben [203]. Auch Oxireduktasen sind vorhanden, die Steroidhormone wie Estradiol und Testosteron [204] oxidieren und Progesteron reduzieren können [205]. Noradrenalin kann durch die im Zytosol vorliegende Katechol-O-Methyltransferase (COMT) metabolisiert werden [206]. Eine mäßige N-Acetyltransferase-Aktivität ist ebenfalls beschrieben worden [207]. Diese wurde experimentell von Mandelbaum-Shavit et al. [208] an Paraaminobenzoesäure gezeigt.

Erythrozyten enthalten 200 – 400 µg Glutathion pro Milliliter Vollblut [209]. Dieses dient zum einen als Reduktionsäquivalent zur Detoxifizierung von Oxidantien und zum anderen als Kopplungspartner um die Ausscheidung lipophiler Xenobiotika zu beschleunigen. Marcus et al. identifizierten 1978 ein von in anderen Geweben vorkommendes Isoenzym der GSH-Transferase [210], das sich sowohl in der Aminosäurezusammensetzung als auch in der Substratspezifität von der in der Leber vorkommenden Isoform unterscheidet. Dies bedeutet, dass eine direkte Vergleichbarkeit von Transferaseaktivitäten in verschiedenen Geweben nicht immer gegeben ist. Dieser Umstand muss bei der Betrachtung von GSH-Transferase-Addukten berücksichtigt werden, denn meist dienen Leberhomogenate als *in vitro* Modelle für Metabolisierungsreaktionen.

Als weiteres Beispiel für eine intrazelluläre Konjugationsreaktion sei der Arzneistoff Pentoxifyllin genannt, der in Erythrozyten aufgenommen und dort hydroxyliert [211] wird. Das Nucleosid-Analogon Didanosin geht ebenfalls vom Plasma in den Intrazellulärraum von Erythrozyten über und wird dort zu Hypoxanthin metabolisiert [212].

Auch mononukleäre Zellen zeigen eine Enzymausstattung, die ein erhebliches Potential für Reaktionen bzw. Metabolisierungen bietet. Im Rahmen der Immunabwehr werden verschiedene reaktive Sauerstoffspezies, unter Katalyse der NADPH-Oxidase [213], gebildet, die wiederum mit Fremdstoffen reagieren und so zu Oxidationsprodukten führen können.

Ein Enzym, das insbesondere nach Aktivierung neutrophiler Granulozyten eine Rolle spielt, ist die Myeloperoxidase [214]. Sie bildet aus Chloridionen unter Wasserstoffperoxidverbrauch Hypochlorit, welches die in seiner Umgebung befindlichen Substanzen oxidieren kann.

Ebenfalls aus einer Oxidationsreaktion in PBMCs hervorgehen kann Peroxynitrit. Es entsteht aus Stickstoffmonoxid und einem Hydroperoxid-Anion. Peroxynitrit zeigt insbesondere Thiolen gegenüber eine oxidierende Aktivität.

Diesen oxidativen Veränderungen können in den mononukleären Zellen auch Arzneistoffe unterliegen. So wird Isoniazid nach Aufnahme, möglicherweise durch Myeloperoxidase, in Isonicotinsäure umgewandelt [215]. Carbamazepin ist ebenfalls Substrat dieses Enzyms. Nach Oxidation kommt es zu einer kovalenten Bindung des Arzneistoffes an aktivierte Zellen. Diese Reaktionen können extrazellulär an der Zellmembran oder aber in hohem Maße intrazellulär stattfinden.

Die aufgeführten Beispiele zeigen deutlich, dass in Erythrozyten und mononukleären Zellen metabolische Veränderungen sowohl körpereigener als auch körperfremder Substanzen stattfinden können. Somit sollten nun mögliche Metabolisierungsreaktionen bzw. entstehende Metabolite von Bestandteilen des Kiefernextraktes bzw. des Metaboliten M1 in Erythrozyten bzw. PBMCs untersucht werden.

5.2 Prinzip der Bestimmung

Obige Ausführungen zeigen, dass eine Vielzahl metabolischer Reaktionen in Blutzellen möglich ist, die eine große Anzahl verschiedener Metabolite hervorbringen können. Dies bedeutet, dass eine geeignete analytische Methode eine große Bandbreite unbekannter und auch unerwarteter Metabolite, erfassen sollte.

Für die Gewinnung dieser metabolisierten Substanzen gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. In einer klinischen Studie können die interessierenden Ausgangsverbindungen Probanden verabreicht und nach verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen werden. Diese können dann, zur Trennung der verschiedenen Zellarten, weiter aufgearbeitet werden. Nach der Zellyse wären mögliche Metabolite analytisch zugänglich.

Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass diese Methode durch die physiologische Umgebung reale Bedingungen widerspiegelt. Jedoch stellt es sich bei dem komplexen pharmakokinetischen Verhalten der Polyphenole als schwierig dar, geeignete Zeitpunkte für eine Probennahme auszuwählen. Es wäre daher möglich, dass die Plasmaspiegel gebildeter Metabolite wegen einer Eliminierung so gering wären, dass die Substanzen einer Detektion nicht mehr zugänglich wären. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass der Zeitraum zwischen Aufnahme in die Zelle und Metabolismus unbekannt ist. Eine genaue Zuordnung entstehender Metabolite zu Ausgangsverbindungen wäre nur dann möglich wenn die Substanzen einzeln verabreicht würden.

Einen anderen Ansatz stellt die Isolierung und Trennung der Zellen dar, die dann *in vitro* bzw. *ex vivo* mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert werden müssten. Nach der Lyse bestünde die Möglichkeit durch Vergleich zwischen Zellen, denen eine Substanz zugesetzt wurde und Zellen, die ohne Substanzzugabe inkubiert wurden, Metabolite zu identifizieren. Außerdem wäre es vorteilhaft, dass in diesem Testsystem die Konzentration der Verbindungen und Zellen variiert werden könnte, so dass auch bei sehr geringem Substratumsatz ein ausreichendes Quantum der Metabolite gebildet würde, das der Detektion und Identifizierung zugänglich wäre.

Für die eigenen Versuche wurde letztere Vorgehensweise gewählt. Die Erythrozyten wurden als Konzentrat von der Transfusionsmedizin der Uniklinik Würzburg erhalten. Die mononukleären Zellen konnten aus Filtern isoliert werden (*Leukoreduction system chambers*), die bei der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten anfielen. Ein

Restanteil an Erythrozyten machte eine Aufreinigung dieser Filter mittels Dichtegradientenzentrifugation nötig (s. Experimenteller Teil 9.5).

Verschiedene Bestandteile des Kiefernrintenextraktes wurden jeweils einzeln sowohl mit Erythrozyten als auch mit mononukleären Zellen inkubiert. Um eine ausreichende Reaktionszeit und möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten wurde eine Reaktionstemperatur von 37 °C für einen Inkubationszeitraum von einer Stunde gewählt. Da als Produkte einer Metabolisierung sowohl polare Substanzen wie beispielsweise Glucuronide und Sulfate in Frage kamen als auch unpolare Verbindungen aus Methylierungen hervorgehen konnten, musste eine Lyse bzw. Extraktionsmethode angewendet werden, die in der Lage war Verbindungen mit weit differierendem Lösungsverhalten zu erfassen. Eine zweistufige Methode in der, nach Zelllyse, entweder mit Methanol, Acetonitril, Ethylacetat bzw. Butanol extrahiert wurde, gefolgt von einer wässrigen Extraktion, hatte keinen Erfolg. Es kam zu Ausfällungen und Verklumpungen der Zellen, die sich weder durch Zentrifugation noch durch Behandlung im Ultraschallbad vermindern ließen.

Bessere Ergebnisse ließen sich durch eine Mischung aus Methanol und Wasser unter Zugabe von Chloroform erzielen. So konnte in mehreren Schritten, eine wässrige und eine organische Phase, voneinander getrennt durch die verbliebenen Zellfragmente, gewonnen werden (s. Experimenteller Teil 10), was die Extraktion intrazellulärer Substanzen ermöglichte.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Screening auf Metabolite

Die durch Extraktion erhaltenen Proben wurden im Scan (+/-)-Modus untersucht (s. Experimenteller Teil 10). Die hierbei nach Inkubation neu auftretenden Peaks wurden auf Massenladungsverhältnisse hin untersucht, welche auf Metabolisierungsprodukte hinweisen könnten. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

B. Allgemeiner Teil

Tab. 6: Mögliche Metabolisierungsprodukte verschiedener Bestandteile des Kiefernrintenextraktes bzw. des Metaboliten M1, erhalten aus massenspektrometrischen Untersuchungen von Erythrozyten- bzw. PBMC-Inkubationen.

Substanz	Erythrozyten	PBMCs
(+)-Catechin		[M-H] ⁻ 594 Glutathion – Addukt [M-H] ⁻ 303 Methylierung
Kaffeensäure	[M+H] ⁺ 486 Glutathion – Addukt [M-H] ⁻ 207 doppelte Methylierung	[M-H] ⁻ 259 Sulfatierung [M-H] ⁻ 207 doppelte Methylierung
Metabolit M1	[M+H] ⁺ 514 Glutathion – Addukt	[M-H] ⁻ 249 Acetylierung
Taxifolin		[M-H] ⁻ 383 Sulfatierung [M-H] ⁻ 608 Glutathion – Addukt
Procyanidin B ₁		
Procyanidin B ₂		[M-H] ⁻ 605 doppelte Methylierung
Ferulasäure		

Für (+)-Catechin wurden im Leukozyten-Lysat Massenladungsverhältnisse gefunden, die mit m/z 594 bzw. m/z 303 auf eine Methylierung bzw. auf ein Glutathion-Addukt hindeuteten. Hingegen konnte im Erythrozyten-Lysat keine zusätzliche Verbindung gefunden werden.

Bei Kaffeensäure gab es Hinweise auf eine Sulfatierung oder doppelte Methylierung bzw. die Bildung eines Glutathion-Addukts. Auch bei M1 konnte eine Konjugation mit Glutathion in Erythrozyten vermutet werden, während im Leukozyten-Lysat möglicherweise ein Acetylierungsprodukt entstand. Neben einem Sulfatierungsprodukt wurde für Taxifolin ein Massenladungsverhältnis, das auf eine Verbindung zwischen Taxifolin und Glutathion hindeutete, im Leukozyten-Lysat gefunden. Bei Procyanidin B₁ und Ferulasäure gab es weder in Erythrozyten noch in Leukozyten Hinweise auf Metabolite. Procyanidin B₂ hingegen wurde in Leukozyten möglicherweise methyliert.

5.3.2 Identifizierung möglicher Glutathion–Addukte

Die oben angegebenen Massenladungsverhältnisse (s. Tab. 6) konnten nur als Hinweise für die Struktur möglicher Metabolite angesehen werden. Das Auftreten dieser Verbindungen allein im Zusammenhang mit inkubierten Proben war jedoch Hinweis genug um eine weitere Strukturaufklärung durchzuführen. Hierzu war es erforderlich Referenzen herzustellen, um die Vermutung der Metabolitenbildung zu untermauern. Da sich in den Inkubationsversuchen für (+)-Catechin, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin Hinweise auf eine Adduktbildung mit Glutathion ergaben, wurde versucht, durch Umsetzung der Monomere mit Glutathion und Glutathion-S-Transferase, Vergleichsverbindungen herzustellen (s. Experimenteller Teil 10.4). Bei (+)-Catechin, Kaffeesäure, und Taxifolin gelang dies nicht. Eine Erklärung könnte eine unspezifische Hemmung des Enzyms liefern, wie sie für einige Polyphenole und Zimtsäurederivate beschrieben wurde. Zhang et al. zeigten, dass bei Zugabe verschiedener Polyphenole in einem Konzentrationsbereich von 20 μM – 200 μM bei den meisten dort untersuchten Verbindungen eine Enzymhemmung zu beobachten war [216]. (+)-Catechin zeigte sich bei diesen Versuchen zwar nur als schwacher Hemmstoff ($\text{IC}_{50} = 984 \mu\text{M}$), doch konnte trotzdem bei eigenen Versuchen, auch bei Variation der Catechinkonzentrationen, keine Verbindung, deren Fragmentmuster mit demjenigen aus dem Zelllysate übereinstimmte, hergestellt werden.

Für M1 hingegen verlief die Inkubation erfolgreich. Wurde Glutathion im Überschuss zugegeben so konnte die Bildung eines Addukts beobachtet werden (s. Abb. 27).

B. Allgemeiner Teil

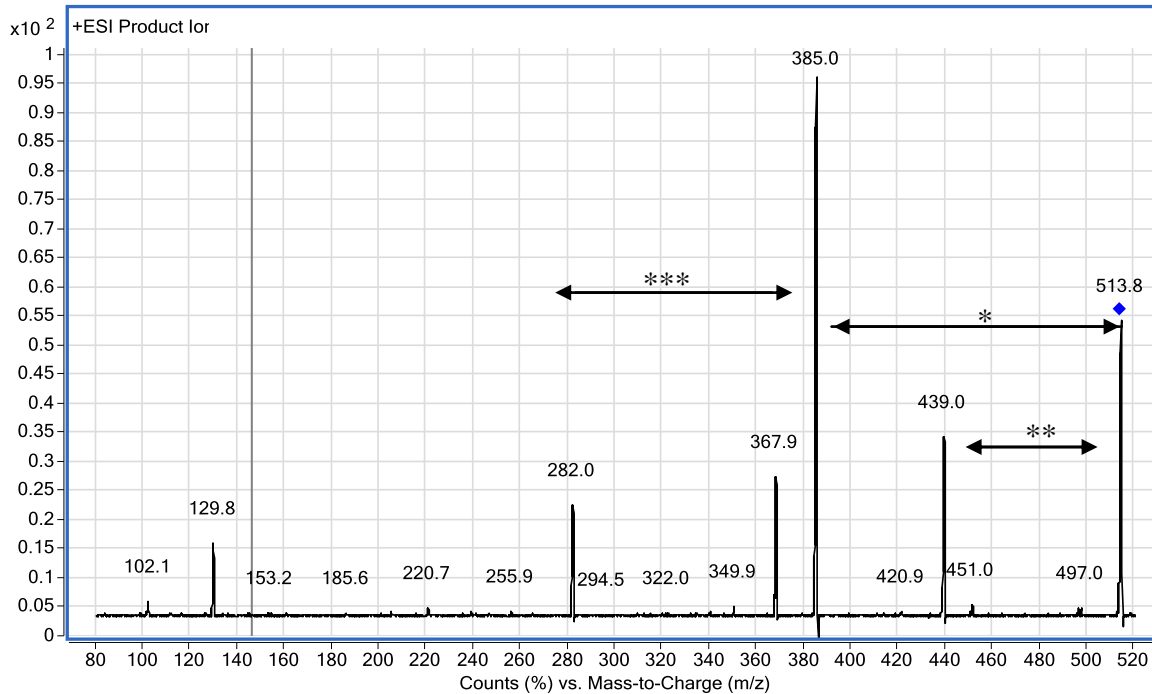


Abb. 27: MS/MS-Spektrum eines möglichen M1-Glutathion-Addukts $[M+H]^+$ $m/z = 514$, das durch Inkubation des Metaboliten M1 mit Glutathion und Glutathion-S-Transferase erhalten wurde. * Fragmentbildung $[MH^+-129]$ charakteristisch für Pyrroglutaminsäure. ** Fragmentbildung $[MH^+-76]$ charakteristisch für Glycin. *** Fragmentbildung $[MH^+-103]$ charakteristisch für Cystein.

Hierauf deutet neben dem Massenladungsverhältnis auch die Bildung verschiedener Fragmente hin, die als charakteristisch für Glutathionverbindungen angesehen werden [217]. So beschrieben Baillie et al. [218] bei Fragmentierungen von Glutathion-Addukten im positiven Modus die Bildung von Fragmenten mit dem Massenladungsverhältnis m/z 129 und 79. Diese Fragmente entsprechen der Abspaltung von Glycin und möglicherweise Pyrroglutaminsäure, die nach Dehydratation des Peptidrestes, das nach Auftrennung der Bindung zwischen der Glutaminsäure und Cystein des Glutathions entsteht, gebildet werden können (s. Abb. 28).

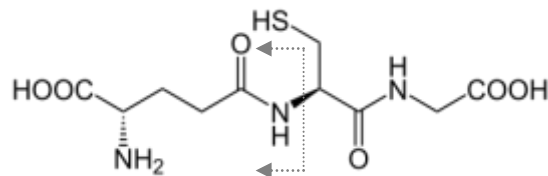


Abb. 28: Glutathion mit der möglichen Spaltungsstelle bei Fragmentierung. Aus dem Glutaminsäurerest kann nach Wasserabspaltung Pyrroglutaminsäure entstehen.

Außerdem wurde ein Fragment mit dem Massenladungsverhältnis m/z 103 gefunden, das auf eine Abspaltung von Cystein hindeutet [219]. Das Auftreten oben beschriebener Fragmente ist aber weder notwendig noch hinreichend für den Beweis eines derartigen Metaboliten, denn die Fragmentbildung ist abhängig von verschiedenen analytischen Parametern unter anderem von Geräte- bzw. Detektionseinstellungen und von der Fließmittelzusammensetzung. Für eine eindeutige Strukturaufklärung wären NMR-spektroskopische Untersuchungen geeignet, doch die gefundenen Verbindungen konnten nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Da die Metabolite in einer komplexen Matrix bestehend aus Zellfragmenten und Puffer vorlagen, war eine Isolierung in ausreichender Menge nicht praktikabel. Dennoch kommt noch ein weiterer Hinweis hinzu, der den Verdacht auf Bildung eines Adduktes erhärtet. So finden sich bei den MS/MS-Spektren beider Verbindungen, also derjenigen aus dem Zelllysate und aus der Inkubation von M1 mit Glutathion, sich gleichende Massenladungsverhältnisse. Auch wenn die Intensitäten der einzelnen Massenladungsverhältnisse betrachtet werden, ist eine gute Vergleichbarkeit der relativen Intensitäten gegeben (s. Abb. 29).

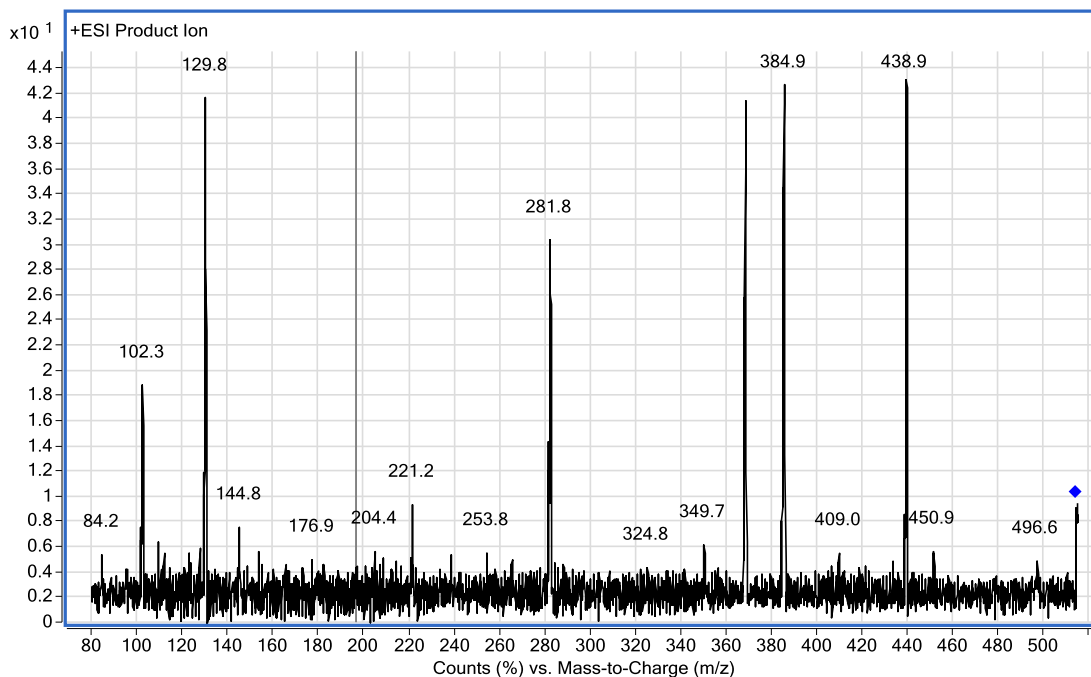


Abb. 29: MS/MS-Spektrum der Verbindung, die im Erythrozytenlysate nach Inkubation mit M1 nachgewiesen werden konnte $[M+H]^+$ 514.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination verschiedener Hinweise, die oben ausgeführt wurden, nachdrücklich darauf hindeuten, dass es sich bei der im Erythrozytenlysat gefundenen Verbindung um einen Metaboliten handelte, der durch die Verbindung zwischen M1 und Glutathion entstanden ist.

5.4 Diskussion

5.4.1 Metabolitenspektrum in mononukleären Zellen

Die Hinweise auf das Metabolisierungsspektrum, das sich aus dem Lysat der mononukleären Zellen ergab, werden teilweise durch andere Arbeiten gestützt. So wurde in Lymphozyten [220], die bei der gewählten Aufarbeitungsmethode in der in den eigenen Versuchen eingesetzten Zellfraktion vorhanden waren, eine COMT nachgewiesen, was die Bildung von Methylierungsprodukten von (+)-Catechin, Kaffeesäure und Procyanidin B₂, wie in Tab. 6 aufgeführt, plausibel erscheinen lässt.

Anders verhält es sich bei den Massenladungsverhältnissen, die bei den Inkubationen von Taxifolin und Kaffeesäure, die auf eine Sulfatierung hinwiesen, auftraten, denn eine sulfatübertragende Aktivität von Leukozyten ist bislang nicht beschrieben, so dass es sich bei den gefundenen Verbindungen wahrscheinlich nicht um Sulfatierungsprodukte handelte.

5.4.2 Metabolitenspektrum in Erythrozyten

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten Hinweise für verschiedene metabolische Veränderungen von Bestandteilen eines Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 in Erythrozyten gefunden werden. Am deutlichsten war dies für ein M1-Glutathion-Addukt, dessen Bildung als höchst wahrscheinlich angesehen werden kann. Eine Methylierung, auf die das bei Untersuchungen der Kaffeesäure gefundene Massenladungsverhältnis hinwies, ist ebenfalls durchaus möglich, denn in Erythrozyten wurde die Katechol-O-Methyltransferase nachgewiesen, die *in vivo* Dopamin und Adrenalin methyliert [221]. Doch sowohl Methylierungsprodukte der Kaffeesäure als auch

Glutathionaddukte konnten nicht eindeutig bewiesen werden, denn es standen keine geeigneten Standards als Vergleichssubstanzen zur Verfügung.

5.4.3 Mechanismus der Adduktbildung zwischen Xenobiotika und Glutathion in Erythrozyten

Das Ergebnis der eigenen Untersuchung, das die Bildung eines Addukts zwischen Glutathion und M1 postuliert, deckt sich mit verschiedenen anderen Arbeiten, in denen die Fähigkeit von Erythrozyten zur intrazellulären Glutathion-Adduktbildung gezeigt wurde [222, 223]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen gab es bisher keine Erkenntnisse über in Erythrozyten gebildete Metabolite. Es liegen aber Arbeiten vor, die eine enzymkatalysierte Bildung von GSH-Addukten, allerdings in anderen Zelltypen, dokumentieren. So wurden Kaffeesäure, Chlorogensäure und Dihydrokaffeesäure mit einem Hepatozytenhomogenat inkubiert [224]. Bei allen Verbindungen fand eine Konjugatbildung statt. Das Ausmaß der Bildung war jedoch für jede Verbindung unterschiedlich. So wurden von Chlorogensäure 20 %, von Kaffeesäure 50 % und von Dihydrokaffeesäure 60 % der eingesetzten Menge umgesetzt. Der Nachweis der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch durch die den Massenladungsverhältnissen der GSH-Konjugate entsprechenden Signale. Diese Arbeit ist nicht direkt auf die eigenen Untersuchungen übertragbar, doch sie zeigt, dass eine durch eine Isoform (s. Einleitung) der GSH-Transferase katalysierte *ex vivo* Bildung eines Kaffesäureaddukts prinzipiell möglich ist.

Leider konnte der Hinweis auf die Bildung eines Catechin-GSH-Addukts in mononukleären Zellen nicht bestätigt werden obwohl Untersuchungen zu Konjugationen zwischen (+)-Catechin und Glutathion eine Verknüpfung beschreiben. Moridani et al. [225] inkubierten Hepatozytenhomogenat mit (+)-Catechin und konnten dort die Bildung verschiedener Addukte feststellen. Es entstanden Verbindungen mit bis zu drei GSH-Molekülen pro Molekül (+)-Catechin. Die Position der Verknüpfung war variabel. Sie fand am B-Ring entweder an der 2', 5' oder 6' Position statt.

Diese große Variabilität mag erklären warum bei den selbst durchgeführten Inkubationen von (+)-Catechin mit GSH keine Verbindung mit einem zur aus dem Zelllysate isolierten Verbindung passenden Fragmentmuster hergestellt werden konnte. Möglicherweise fand die Konjugation jeweils an verschiedenen Positionen statt was trotz passendem

Massenladungsverhältnis von m/z 594 zu unterschiedlichen Fragmentierungsmustern im MS/MS-Spektrum geführt haben könnte.

Die Konjugation könnte aber nicht nur über eine GSH-Transferase stattfinden. In oben genannter Arbeit [225] wurde noch ein anderer Syntheseweg aufgezeigt. Die Autoren gingen von einer Aufnahme des (+)-Catechins in die Hepatozyten aus. Dort sollte eine Oxidation zum ortho-Chinon erfolgen. Dieses reaktive Molekül hätte die Möglichkeit direkt mit Glutathion zu reagieren und so eine kovalente Verbindung zwischen Glutathion und (+)-Catechin zu bilden. Neben Cytochrom P450 Isoformen sind in Leukozyten ebenfalls das für die Reaktion benötigte Nicotinamadenindinucleotid (NADPH) sowie Glutathion, wenn auch in geringer Konzentration (ca. 24 nmol/10⁷ Zellen) [226], intrazellulär vorhanden. Somit könnte der oben beschriebene Mechanismus einer Adduktbildung zwischen (+)-Catechin und Glutathion auch in Leukozyten einen möglichen Syntheseweg darstellen. Neben den in der Arbeit von Moridani et al. beschriebenen Angriffspositionen der Thiolgruppe, werden in einer anderen Arbeit weitere Stellen für eine Konjugation diskutiert. Dort dient die dem (+)-Catechin strukturähnliche Verbindung Quercetin als Untersuchungsobjekt (s. Abb. 30).

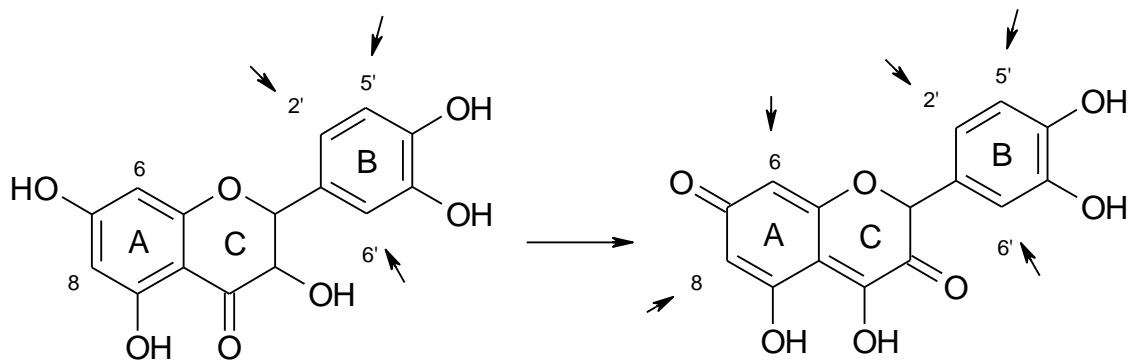


Abb. 30: Quercetin bzw. ein Oxidationsprodukt mit möglichen Angriffspunkten [227] der Thiolgruppe des Glutathions.

Die beiden Verbindungen unterscheiden sich nur am C-Ring in den funktionellen Gruppen. Bei Quercetin ist an der Position 4 eine zusätzliche Hydroxygruppe vorhanden. Dies erleichtert möglicherweise die Bildung einer Struktur, bei der in Position 7 und 3 Carbonylfunktionen vorliegen und die aromatische Struktur des Ringes A aufgehoben ist. Für diese Zwischenstufe ist auch ein Angriff des Thiols an Position 6

und 8 beschrieben. Ob ein solches Zwischenprodukt auch bei (+)-Catechin gebildet wird ist allerdings nicht bekannt.

Nun stellt sich die Frage an welcher Position die Adduktbildung zwischen M1 und Glutathion stattfinden könnte. Betrachtet man die Verbindung so zeigt sich auch hier eine Brenzcatechinstruktur. Dies schließt eine Oxidation, entweder unter Einfluss von oxidierenden Enzymen oder auch eine Autoxidation, nicht aus. Das entstehende Benzochinonderivat stellt nun wieder ein Elektrophil dar, das an Position 4 möglicherweise einen bevorzugten Angriffspunkt für die nucleophile Thiolgruppe des Glutathions bildet (s. Abb. 31).

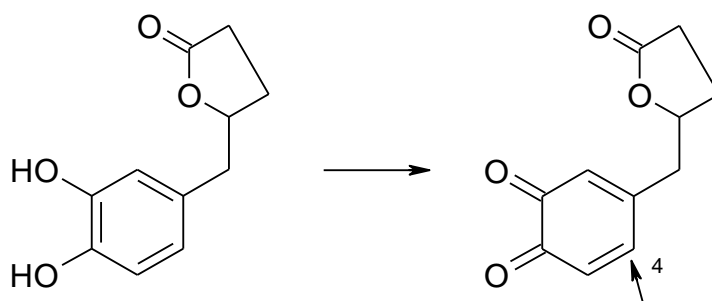


Abb. 31: Der Metabolit δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M1) und dessen möglicherweise durch Oxidation entstehendes Benzochinonderivat. Der Pfeil zeigt eine potentiell bevorzugte Bindungsstelle des Glutathions.

Diese Reaktion könnte aber wie oben angedeutet auch ohne enzymatische Einwirkung stattfinden. Ob dieses Produkt in nennenswertem Umfang bei den durchgeführten Untersuchungen gebildet wurde ist fraglich. Bei der Inkubation des Glutathions mit M1 und GSH-Transferase entstand ein Produkt mit einem Massenladungsverhältnis von 514. Dieses stimmt nicht mit obiger Struktur überein. Doch auch das Auftreten zusätzlicher Peaks mit passendem Massenladungsverhältnis wurde nicht beobachtet. Auszuschließen ist natürlich nicht, dass nach Adduktbildung eine Rückreaktion der Chinonstruktur zum Brenzcatechin stattfindet.

Der Mechanismus der enzymkatalysierten Bindung zwischen Glutathion und einem Substrat wurde von Armstrong et al. beschrieben [228]. Es kommt zu einer Aktivierung der Thiolgruppe und, wenn es die Struktur des Substrates zulässt, zu einer Erleichterung der Trennung der Abgangsgruppe vom Ausgangsmolekül. Eine genaue Bestimmung der Position der Konjugatbindung lässt sich auf diese Weise nicht feststellen. Baillie et al.

B. Allgemeiner Teil

[218] beschreiben eine Möglichkeit diese Position genauer zuzuordnen. Verwendet man als Substrat Glutathion, das an verschiedenen Stellen synthetisch verändert wurde, z.B. durch Methylierungen, und führt dann jeweils voneinander unabhängige Inkubationsversuche durch, so ist es bei Vergleich der Fragmentierungsmuster anhand der Massendifferenzen möglich, eine Zuordnung zu treffen. Außerdem werden charakteristische Bruchstellen zwischen Glutathion und der konjugierten Verbindung beschrieben. Aufgrund der begrenzten Datenlage schränken die Autoren diese Möglichkeit allerdings ein. Als Werkzeug für ein „screening“ wird dort außerdem beschrieben mittels Massenspektrometrie über den Neutralionenverlust von 129, entsprechend Pyrroglutaminsäure (s. oben), nach unbekanntem GSH-Addukten zu suchen. Diese Methode wurde bei den eigenen Untersuchungen ebenfalls angewendet und war dort erfolgreich (s. Abb. 32).

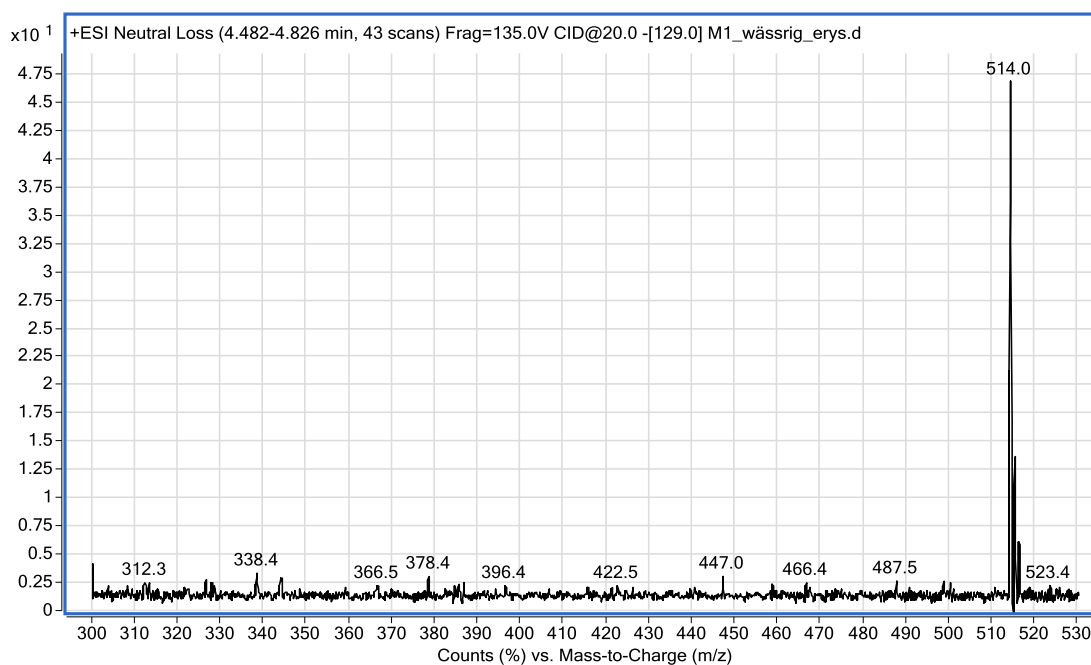


Abb. 32: Massenspektrum, das das Mutterion eines Neutralionenverlustscans ($\Delta m/z$ 129) mit dem Massenladungsverhältnis $[M+H]^+$ 514 abbildet.

Als Ausgangsmolekül, das ein Fragment der Masse 129 abspaltete, ist im Spektrum ein Mutterion mit dem Massenladungsverhältnis m/z 514 zu sehen, welches dem M1-Glutathionaddukt entspricht.

5.4.4 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Konsequenzen einer Glutathion-Adduktbildung

Nun stellt sich die Frage welche Konsequenzen sich aus metabolischen Konjugationsreaktionen ergeben. Allgemein hat die Verknüpfung von Xenobiotika mit Glutathion eine Erhöhung der Hydrophilie zur Folge, welche die Ausscheidung aus dem Organismus erleichtert. Deshalb ist diese Reaktion dem Phase II Metabolismus zuzuordnen. Doch ist es auch denkbar, dass als Folge der Reaktion keine rasche Elimination aus dem Körper bzw. Desaktivierung resultiert, sondern ganz im Gegenteil eine Anreicherung in bestimmten Geweben zustande kommt. Durch die Konjugation mit mehreren Glutathioneinheiten können Makromoleküle gebildet werden, die nicht mehr in der Lage sind die Zelle bzw. das Gewebe zu verlassen [229].

Außerdem wäre es möglich, dass neue pharmakodynamische Eigenschaften entstehen, die die unkonjugierte Substanz nicht oder in anderer Weise innehatte. Als Beispiel sei im Folgenden die Toxifizierung von Dichlormethan aufgeführt. So konnte für diese Verbindung gezeigt werden [230], dass auf die GSH-Bindung eine Hydrolyse folgt, die zu einer Freisetzung von Formaldehyd führt, das wiederum eine Reaktion mit Proteinen und DNS eingehen kann.

Allgemein verläuft die Elimination von Glutathion-Konjugaten über verschiedene Zwischenstufen. Das Konjugat wird entweder über die Gallenwege oder über die Niere ausgeschieden. In der Niere kommt es vor der Elimination zu Umformungen [231]. Der gamma-glutamyl-Rest wird durch eine gamma-glutamyl-Transpeptidase und das Glycin durch eine Dipeptidase entfernt. Der übrig bleibende Rest wird acetyliert, so dass eine Mercaptursäure entsteht. Diese kann dann ausgeschieden werden. Es ist aber auch möglich, dass nach der Abspaltung des Dipeptides der verbleibende Rest, sofern eine Hydrochinonstruktur enthalten ist, über den Bürstensaum der renalen Epithelzellen aufgenommen wird und dort intrazellulär Schäden verursacht. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine Reoxidation zum Semichinon und der Reaktion mit Sauerstoff in Gegenwart von Fe^{3+} -Ionen, wobei letztendlich nach der Haber-Weiss Reaktion Hydroxylradikale gebildet werden, die DNS-Stränge schädigen. Ausführlich beschrieben ist dieser Vorgang für 2-Bromo-bis(glutathion-S-yl)Hydrochinon [232]. Unterstützt wird diese These durch die Aktivierung von DNS-Reparaturgenen bei Inkubation von Epithelzellen der Niere mit obiger Verbindung [233]. Dieser DNS schädigende

Mechanismus könnte auch der bei Experimenten mit Hamstern beobachteten Nephrotoxizität von 17β -Estradiol zu Grunde liegen [234]. Eine Hydrochinonstruktur entsteht hier durch die aromatische Hydroxylierung an Position 2 bzw. 4 des Benzolrings.

Bei Ratten wurden toxische Effekte von Glutathion-Addukten auch im Gehirn, nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, beschrieben [235]. Diese Effekte verminderten sich bei gleichzeitiger Gabe von Glutathion, was die Autoren zu der Vermutung veranlasste, dass eine Konkurrenz um einen aktiven Transporter stattfindet [236]. Ausführlich sind diese Zusammenhänge von der Arbeitsgruppe T. J. Monk untersucht worden. Sie verdeutlichen zum einen, dass für Xenobiotika durch eine GSH-Verknüpfung eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke möglich ist, die der Ausgangssubstanz nicht möglich war und zum anderen liegt hiermit ein weiteres Beispiel für eine durch Metabolisierung entstehende Toxifizierung vor.

P-Phenetidin ist eine weitere Verbindung, die einer Toxifizierung unterliegen kann. Sie bildet mit Glutathion eine Verbindung, die eine wesentlich höhere Tendenz hat an DNS zu binden und dort pathophysiologische Veränderungen hervorzurufen als die Ausgangsverbindung [237].

Neben der Ausscheidung und der Toxifizierung kann aber auch eine Aktivierung der Substanz mit für den Körper positiven pharmakodynamischen Effekten erfolgen. Die Verbindung liegt also vor der Umsetzung mit Glutathion als *prodrug* vor. Ein Beispiel hierfür ist 6-(2-Acetylvinylthio)Purin, eine Vorstufe von Mercaptopurin [238]. Diese Vorstufe wird an der stark elektrophilen Schutzgruppe durch Glutathion angegriffen. Unter Abspaltung eines Glutathionbutenons bildet sich die wirksame Verbindung Mercaptopurin. Ähnlich verhält es sich auch mit Azathioprin, das ebenfalls als Vorstufe des 6-Mercaptopurins fungiert. Hierbei kommt es im Laufe des Abbaus allerdings zur Abspaltung eines Glutathion-Imidazols [239].

Die intrazelluläre Bildung von Glutathionkonjugaten wirft natürlich auch die Frage nach deren Verbleib auf. Es ist möglich, dass ein aktiv extrazellulär gerichteter Efflux stattfindet. In der Erythrozytenmembran sind MRP1-Transporter (*multidrug resistance protein*) lokalisiert, zu deren Substraten auch Glutathion-Addukte gezählt werden können [240]. Der Transport verläuft aktiv unter Energieverbrauch, da die MRP1-Transporter zur Gruppe der ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) gehören. Dieser Transportweg zeigt keine hohe Substratspezifität denn es werden auch

unkonjugierte bzw. glucuronidierte Substanzen transportiert. Als Beispiele seien Mono- und Bisglucuronylbilirubin und Vincristin genannt [241].

Neben den in Tab. 6 aufgeführten Verbindungen erstreckte sich die Suche nach möglichen Metaboliten auch auf Fettsäurekonjugate. Hintergrund dieser Versuche war eine Arbeit von Miller-Larsson et al. [242], in der eine im Vergleich zu Fluticason-Propionat und Beclomethason-Dipropionat verlängerte Verweildauer von Budesonid in Lungengewebe beschrieben wurde. Dies stand im Widerspruch zur Lipophilie der Substanzen, denn Budesonid zeigte im Vergleich der Verbindungen die geringste Lipophilie. Die Autoren konnten diesen Effekt auf reversible Bildung von Estern zwischen Budesonid und Fettsäuren zurückführen. Ob Ähnliches nicht nur in Lungengewebe sondern auch in Leukozyten bzw. Erythrozyten und nicht nur mit Kortikoiden sondern auch mit Polyphenolen bzw. Zimtsäurederivaten möglich ist, sollte ebenfalls untersucht werden. Als mögliche Bindungspartner wurden hier Ölsäure, Linolensäure, Palmitinsäure und Arachidonsäure angenommen. Die Suche nach solchen Verknüpfungsprodukten war jedoch nicht erfolgreich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen eine Reihe von Hinweisen auf potentiell in Erythrozyten bzw. mononukleären Zellen gebildete Metabolite von im Kiefernextrakt enthaltenen Substanzen bzw. des Metaboliten M1 gefunden werden konnten. Vergleichbare Arbeiten, die sich insbesondere auf die in dieser Arbeit untersuchten Flavonoide und Zimtsäurederivate beziehen, existieren bis jetzt nicht. Zudem konnten erstmalig sehr nachdrückliche Hinweise auf ein aus dem Metabolit δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton in Erythrozyten gebildetes Glutathion-Konjugat gezeigt werden.

In welchem Ausmaß diese Verbindung gebildet wird, ob sie aus den Zellen wieder freigesetzt wird und welche Konsequenzen sich für die Pharmakokinetik des δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactons ergeben, sind Fragestellungen, die in weiteren Untersuchungen geklärt werden müssen.

6 Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran

6.1 Problemstellung

In den vorhergehenden Kapiteln wurden pharmakokinetische Untersuchungen zur Verteilung verschiedener Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes bzw. eines Metaboliten zwischen Plasma und Blutzellen beschrieben. Hierbei ergaben sich insbesondere für das δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (Metabolit M1) Ergebnisse, die weitergehende Untersuchungen als sinnvoll erscheinen ließen. Gerade die teilweise beobachtete ausgeprägte Aufnahme in Erythrozyten gab Anlass neben der Pharmakokinetik auch der Pharmakodynamik vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken. Um nun eine Interaktion bzw. eine Beeinflussung der Eigenschaften der Erythrozyten betrachten zu können, sollte zunächst ein möglichst unspezifisches Untersuchungssystem gewählt werden. Sollten sich dort Hinweise auf pharmakodynamische Prozesse ergeben so wäre es im Weiteren möglich die mechanistische Grundlage dieser Effekte aufzuklären.

Einen ebensolchen Ansatzpunkt stellen Veränderungen der Anfälligkeit eines Systems, hier von Erythrozyten, gegen prooxidative Faktoren dar, denn sowohl Schädigung als auch der Schutz vor derselben kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die potentielle Beeinflussungspunkte darstellen. Als gemeinsames Grundprinzip von Assays, die sich mit dieser Problematik beschäftigen, lässt sich feststellen, dass auf verschiedene Art und Weise Radikale gebildet werden, deren veränderte Umsetzung bzw. oxidierende Wirkung analytisch verfolgt wird. Dies geschieht meist, wie beim DPPH-Assay (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) photometrisch. Dort weist die radikalstabilisierende Form ein anderes Absorptionsspektrum als die Ausgangsverbindung auf [243]. Nach einem ähnlichen Prinzip verläuft die Messung der antioxidativen Aktivität mittels ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6 sulfonsäure)). Aus ABTS wird unter Zugabe von Kaliumpersulfat ein stabiles Radikal, das ein charakteristisches Absorptionsspektrum aufweist, gebildet. Verliert dieses Molekül durch Aufnahme eines Elektrons die

radikalische Eigenschaft so ändert sich das Absorptionsspektrum. Diese Änderung kann photometrisch verfolgt werden.

Des Weiteren existieren verschiedene Varianten von Assays, denen die Redoxeigenschaften des Eisens zu Grunde liegen. Der FRAP-Assay nutzt die Eigenschaft von zweiwertigem Eisen mit Tripyridylpyrazin einen blauen Komplex zu bilden. Der Komplex mit oxidiertem Eisen hingegen ist farblos, so dass reduzierende Eigenschaften photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 593 nm erfassbar sind [244]. Beim FTC-Assay hingegen zeigt sich der Komplex des oxidierten Eisens mit Thiocyanat farbig. Bei 500 nm hat diese Verbindung ihr Absorptionsmaximum [245]. Ähnlich verhält es sich beim FOX-Assay. Dort bildet das oxidierte Eisen mit Xylenol-Orange den farbgebenden Komplex [246].

Diese Methoden sind allesamt unspezifisch d.h. sie zeigen allgemein reduzierende Vorgänge an ohne definierte Reaktionswege zu berücksichtigen. Sie sind deshalb geeignet um die „totale Reduktionskapazität“ [247] besonders von komplexen Matrices zu bestimmen. Ein Verfahren, das ebenfalls für derartige Bestimmungen geeignet ist, ist die zyklische Voltammetrie. Hierbei werden Elektroden in wässrige Systeme eingebracht und der Anodenstrom bei variierter Spannung gemessen. Aus den sich hierbei ergebenden Zusammenhängen können Aussagen über die Reduktionsfähigkeit komplexer Systeme gemacht werden. Hierbei sind nicht nur qualitative sondern auch quantitative Aussagen möglich. So zeigten Zielinska et al. [248] einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration eines eingesetzten Antioxidans und der sich an der Anode ergebenden totalen Ladung.

Weiterhin existieren auch Testsysteme, die den *in vivo* gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. Radikalen gegenüber eine gewisse Spezifität besitzen.

Zur Gruppe der *in vivo* gebildeten ROS werden gezählt:

- Superoxid-Radikal ($O_2^{\bullet -}$)
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
- Hydroxyl-Radikal (HO^{\bullet})
- Hypochlorige Säure (HOCL)
- Singulett Sauerstoff (1O_2)
- Stickstoff Monoxid (NO^{\bullet})
- Peroxynitrit ($ONOO^-$)
- Peroxyl-Radikal ($R-OO^{\bullet}$)

Besonders hervorzuheben sind Versuchsbedingungen, die der physiologischen Umgebung möglichst nahe kommen. Dies gilt beispielsweise für den TBA-Assay. Hintergrund dieses Prinzips ist eine Farbreaktion zwischen Malonaldehyd und Thiobarbitursäure (TBA) bei der ein gefärbtes Produkt entsteht. Dieses System kommt den Bedingungen *in vivo* nahe, da Malonaldehyd ein Abbauprodukt aus der radikalischen Fettsäureoxidation darstellt. Ungesättigten Fettsäuren werden durch Radikale einzelne Elektronen entzogen. Wegen der konjugierten, ungesättigten Doppelbindungen wird diese radikalische Zwischenform der Fettsäure stabilisiert solange bis die Reaktion mit einem Molekül Sauerstoff erfolgt. Das hierbei entstehende Hydroperoxid bildet die Basis für sekundäre Oxidations- und Abbauprodukte wie Aceton, Acrolein, Formaldehyd und eben auch Malonaldehyd. Dies bedeutet, dass durch die gewählten Versuchsbedingungen das Sekundärprodukt eines oxidativen Angriffs detektiert wird. Dies ermöglicht die Aussagekraft eines Assays erheblich zu steigern, denn einerseits wird gezeigt, dass die zugesetzte radikalerzeugende Substanz relevante Reaktionen an zellulären Bestandteilen hervorzurufen vermag und andererseits, dass der untersuchte Radikalfänger mit *in vivo* entstehenden Oxidationsprodukten reagieren bzw. diese detoxifizieren kann.

6.2 Antioxidatives System der Erythrozyten

Erythrozyten verfügen über ein komplexes System zur Verhinderung von Zellschäden durch oxidierende Substanzen [249]. Im Zytosol der Zellen ist die Cu/Zn-Isoform der Superoxiddismutase vorhanden [250]. Sie katalysiert die Umwandlung des Superoxid-Moleküls in Triplett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Dieses ist weit weniger reaktiv als die Ausgangsverbindung. Ein weiteres Enzym, das den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies bewirken kann ist die Katalase [251]. Ihr dient Wasserstoffperoxid als Substrat. Dieses wird entweder zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt oder dient als Elektronenakzeptor bei der Umsetzung mit Phenolen und Aldehyden.

Den quantitativ größten Anteil stellt allerdings die Glutathion-Peroxidase dar. Sie reduziert Hydroperoxide zu Alkoholen. Die Reduktionsäquivalente werden hierbei von Glutathion bereitgestellt, das bei der zugehörigen Reaktion oxidiert wird und ein Dimer bildet. Es existieren fünf Isoformen (GPX 1-5) des Enzyms wobei GPX-1 die in Erythrozyten vorherrschende Spezies darstellt [249].

In einer Studie [252] mit ca. 1800 Teilnehmern wurde untersucht inwiefern die Zusammensetzung und Konzentration oben beschriebener Enzyme von Alter und Geschlecht abhängig ist. Geschlechtsspezifische Unterschiede ergaben sich nur bei der Glutathion-Peroxidase, die bei Frauen im Durchschnitt in höherer Aktivität zu finden ist. Die Aktivitäten aller Enzyme nahmen geschlechtsunabhängig mit zunehmendem Alter hingegen ab. Gewicht, Blutdruck und Menopause zeigten keinen Einfluss auf die Verteilung.

6.3 Kenntnisstand

Bereits Gegenstand von *in vitro* Untersuchungen, die die Aufklärung möglicher antioxidativer Eigenschaften zum Ziel hatten, war der Metabolit M1. Es handelte sich hierbei um verschiedene Assays denen wässrige Pufferlösungen zu Grunde lagen [253]. Mittels eines FRAP-Assays wurden verschiedene Bestandteile eines Kiefernextraktes auf ihren Einfluss auf das Testsystem hin untersucht. Für M1 zeigte sich eine im Vergleich zu den anderen Komponenten (Ascorbinsäure, (+)-Catechin, 9-Epi-Catechin, Gallussäure, Kaffeesäure, M2) stark radikalstabilisierende Wirkung. Einzig Protocatechusäure erwies sich als potentere Verbindung. Die gleichen Substanzen wurden ergänzend einem DPPH-Assay unterzogen. Hier zeigte sich M1 nur stärker wirksam als (+)-Catechin und M2. Die anderen Komponenten hingegen waren unter diesen Bedingungen effektivere Antioxidantien als M1. Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit den antioxidativen Eigenschaften des Metaboliten M1. Dort wurde ein TEAC-Assay durchgeführt. Es erfolgte ein Vergleich mit Ascorbinsäure, wobei sich der Metabolit M1 als effektiveres Antioxidans erwies [27].

6.4 Auswahl der Methode

Die in den oben erläuterten Versuchen erhaltenen Erkenntnisse zu den antioxidativen Fähigkeiten des Metaboliten M1 sollten insbesondere wegen der Ergebnisse die bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen zur Verteilung und Aufnahme dieser Verbindung in Erythrozyten gemacht wurden, noch erweitert werden.

B. Allgemeiner Teil

Ein besonderes Ziel sollte es sein physiologischen Bedingungen durch geeigneten Versuchsaufbau möglichst nahe zu kommen und insbesondere Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und dem Metaboliten M1 gezielt zu betrachten.

Von Niki et al. [254] wurde ein Assay entwickelt, der diesen Vorgaben Rechnung trägt. Als Untersuchungsmaterial dienten Erythrozyten, denen die radikalbildende Substanz 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) (AAPH) zugesetzt wurde. Diese bildet ein Radikal, das wiederum mit Sauerstoff reagiert und es entstehen in der Folge Peroxyl-Radikale (s. Abb. 33).

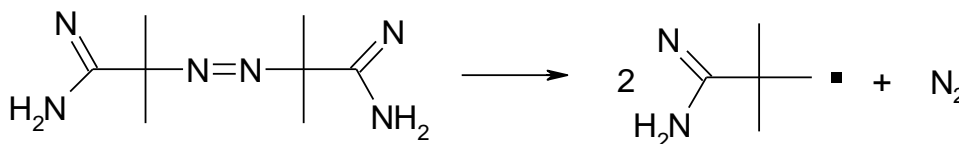


Abb. 33: Thermische Zersetzung von 2,2'-Azobis (2-amidinopropan) (AAPH) unter Bildung eines Radikals, das mit Sauerstoff zu einem Peroxylradikal weiterreagiert.

Von Vorteil ist die gleichmäßige Bildungsrate dieser Radikale, wenn die Temperatur konstant gehalten wird [255]. Der Versuchsaufbau dieser Untersuchungen wurde von Takebayashi et al. [256] modifiziert und für Messungen der antioxidativen Aktivität verschiedener Verbindungen, unter anderem (+)-Catechin und Hesperidin verwendet.

Als Untersuchungsmatrix dienten Erythrozyten, die in Konzentrationen zwischen 0,7 und 1 % eingesetzt wurden. Als Lösungsmittel wurde Phosphatpuffer verwendet. Diesem wurden nacheinander die zu untersuchende Substanz und der Radikalbildner zugesetzt. Durch Inkubation bei 37 °C und die Verwendung von Gefäßen mit hinreichend großem Volumen, um eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff zu gewährleisten, wurde die Radikalreaktion in Gang gesetzt. Nach definierten Zeitpunkten wurden Aliquots der Suspension entnommen und nach Zentrifugation der Überstand photometrisch auf eine einsetzende Hämolyse hin untersucht (s. Experimenteller Teil 11). Durch die im zeitlichen Verlauf ständig zunehmende Radikalbildung setzte eine Schädigung der Zelloberflächen ein, die zu Porenbildung in der Zellwand [255] und schließlich zur Freisetzung von Zytosol bzw. Hämoglobin führte.

Dieses freiwerdende Hämoglobin wurde nun durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 524 nm quantifiziert. Die exakte Wahl der Wellenlänge war nötig, da das freigesetzte Hämoglobin teilweise zu Methämoglobin oxidiert werden konnte, was eine Veränderung des Absorptionsspektrums und damit Fehler in der Quantifizierung

verursacht hätte. Die Absorptionsintensität bei 524 nm hingegen ist unabhängig davon ob Oxyhämoglobin oder Methämoglobin als Freisetzungprodukt vorliegt [257].

Die über den gesamten Messzeitraum erhaltenen Absorptionen wurden mit einer totalhämolytierten Probe verglichen. Wurden nun die berechneten Hämolyseanteile gegen den Zeitverlauf aufgetragen so ergaben sich sigmoide Kurven. Aus diesen ließ sich der Zeitpunkt der 50 prozentigen Hämolyse berechnen (s. Abb. 34). Diese Werte konnten verwendet werden, um verschiedene Substanzen bzw. Messbedingungen miteinander zu vergleichen.

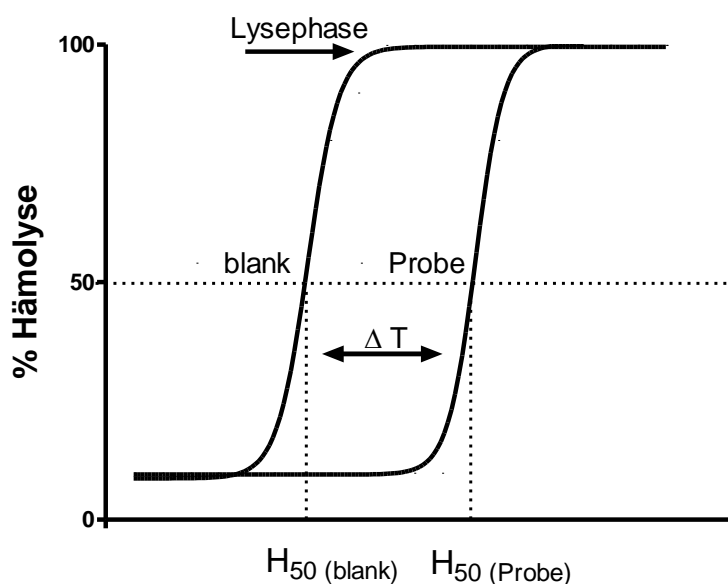


Abb. 34: Schematische Darstellung der Hämolyseverläufe einer Probe mit Antioxidanzzusatz und einer Vergleichsprobe im Rahmen des AAPH-Assays (Modifiziert nach Takebayashi et al. [258]).

Dies geschah indem der Zeitpunkt der fünfzigprozentigen Hämolyse (H_{50}) der Vergleichsprobe mit dem H_{50} einer Probe verglichen wurde, der eine der zu untersuchenden Substanzen zugesetzt wurde. Der Zeitraum, um den sich die Hämolyse veränderte (ΔT), wurde berechnet und daraus Rückschlüsse auf die antioxidativen Fähigkeiten der untersuchten Verbindung gezogen.

Diese Methode wurde, mit einigen Veränderungen (s. Ergebnisse) für die eigenen Untersuchungen angewendet.

6.5 Ergebnisse

Um eine sinnvoll messbare Konzentration des Metaboliten M1 zu ermitteln wurden zunächst Versuche mit einer Konzentration von 1 mM durchgeführt. In der aufgeführten Abbildung ist zu erkennen (s. Abb. 35), dass im Messzeitraum keine nennenswerte Hämolyse der mit M1 inkubierten Probe auftrat.

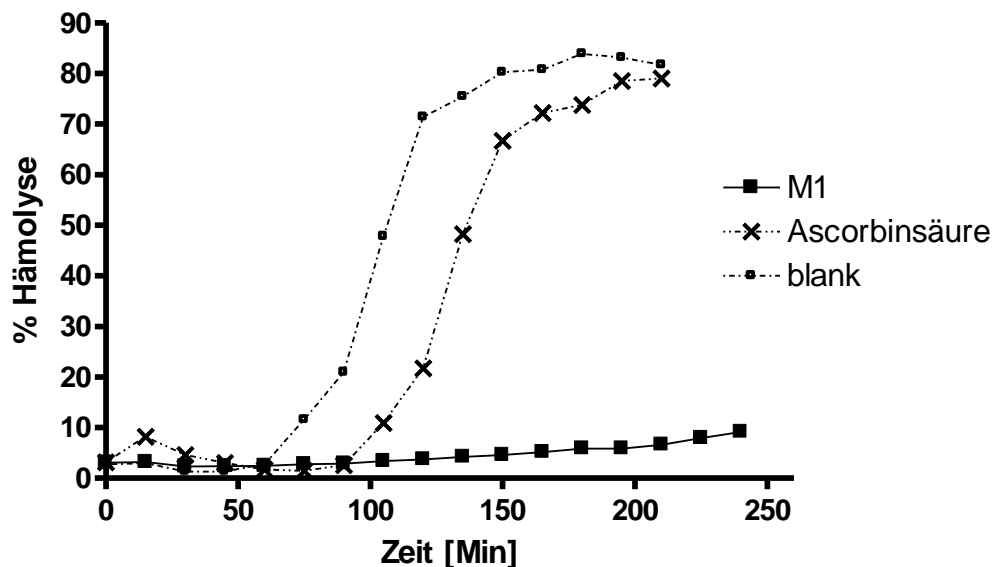


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der Erythrozytenhämolyse einer unbehandelten (blank) und einer mit Ascorbinsäure (50 μ M) bzw. M1 (1 mM) versetzten Zellprobe. Es ergaben sich daraus: H_{50} Ascorbinsäure = 130 Min, H_{50} Blank = 101 Min. [H_{50} = Zeitpunkt 50 % iger Hämolyse]

Als Vergleich wurde im selben Ansatz die reduzierend wirkende Ascorbinsäure vermessen. Für diese ergab sich eine Verzögerung der Hämolyse von 29 Minuten. Takebayashi erhielt unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine Zeitspanne von 15 Minuten. Allerdings betrug der Zellanteil in der Suspension 0,7 % statt den in den eigenen Versuchen gewählten 1 %.

Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die Konzentration des δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactons geringer gewählt werden konnte. Takebayashi et al. beschrieben in ihrer Arbeit einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration des eingesetzten Antioxidans und der Hämolyseverzögerung. Dies konnte in eigenen Versuchen für den Metaboliten M1 bestätigt werden (s. Abb. 36).

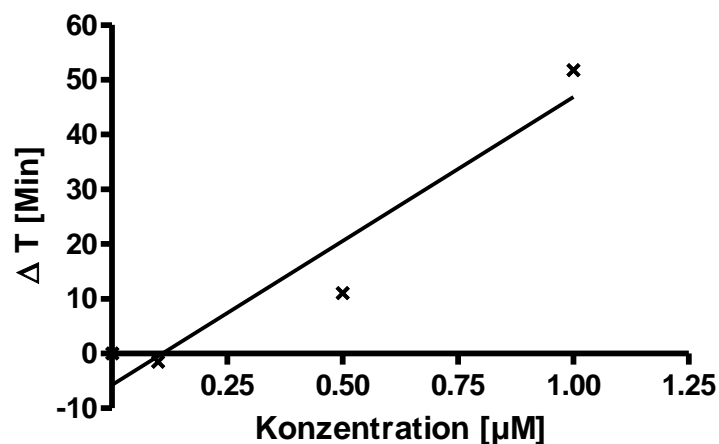


Abb. 36: Zusammenhang zwischen Konzentration des Metaboliten M1 im AAPH-Assay und der resultierenden Verschiebung der oxidativen Hämolyse von Erythrozyten ($R^2 = 0,92$).

Für die weiteren Versuche wurde eine Konzentration von 1 µM gewählt. Diese war ausreichend niedrig, um einen messbaren Unterschied zwischen verschiedenen Proben darzustellen.

Im Folgenden wurden die Inkubationsbedingungen variiert um deren Einfluss auf die Stabilität der Zellen zu untersuchen. Bei einem Ansatz wurde die Vorinkubationszeit, d. h. die Zeit zwischen Zugabe des Antioxidans und des Radikalbildners, von zehn Minuten auf 60 Minuten verlängert. Eine weitere Unterscheidung war nun möglich indem nach verlängerter Inkubation der Überstand entfernt wurde. Durch diese Maßnahme sollte der frei in Lösung befindliche Anteil des Metaboliten M1 entfernt werden und so untersucht werden, ob ein gegebenenfalls in die Zellen aufgenommener Anteil oder gebildetes Addukt, ebenfalls Einfluss auf die Stabilität der Erythrozyten hatte. Es zeigte sich, dass der stärkste antioxidative Effekt bzw. die größte positive Änderung der Zeit bis zum Eintritt der Hämolyse bei den Proben auftrat (ΔT 23,1 Min. \pm 9,6), die ohne eine einstündige Vorinkubation untersucht wurden (s. Abb. 37). Der Metabolit M1 wurde hier zehn Minuten vor Versuchsbeginn zugesetzt.

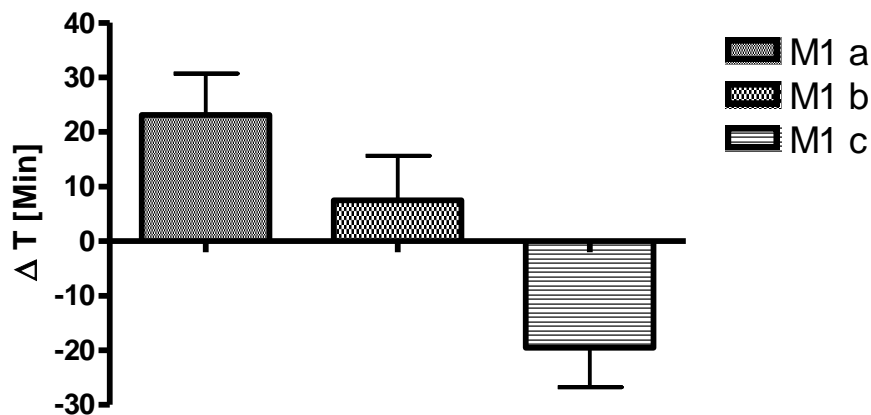


Abb. 37: Veränderung des Einsetzens der oxidativen Hämolyse einer Erythrozytensuspension. Die Lösung wurde entweder nicht mit dem Metaboliten M1 vorinkubiert (a), vorinkubiert ohne Austausch des Puffers (b) oder mit Austausch des Puffers (c). Als Vergleich diente ein Ansatz dem kein Antioxidans zugesetzt wurde. [Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 3]

Nach Vorinkubation ergab sich ein geringerer Wert (ΔT 7,47 Min. \pm 10,8). Eine Änderung in den negativen Bereich hingegen ergab sich bei den Proben, die vorinkubiert wurden aber vor Beginn der Messungen der Puffer ausgetauscht wurde. Hier erhöhte sich sogar die Anfälligkeit gegenüber oxidativen Schäden im Vergleich zur unbehandelten Vergleichsprobe. Dies wird durch das negative Vorzeichen verdeutlicht (ΔT -19,5 Min. \pm 9,6). Dies bedeutet, dass bei dieser Probe schon ca. 20 Minuten bevor bei der unbehandelten Vergleichsprobe die Hämolyse einsetzte, eine Zerstörung der Zellwände stattfand.

Abschließend sollte der Einfluss von Indometacin und Verapamil auf die oxidativen Vorgänge untersucht werden (s. Abb. 38). Hintergrund dieses Ansatzes war, dass beide Verbindungen als Hemmstoffe des PGP-Systems bekannt sind (s. Abschnitt 4.5.1) und somit durch eine Hemmung dieser Effluxpumpe eine Aussage über die mögliche Aufnahme des Metaboliten M1 in Erythrozyten bzw. potentielle Transportmechanismen gemacht werden sollte.

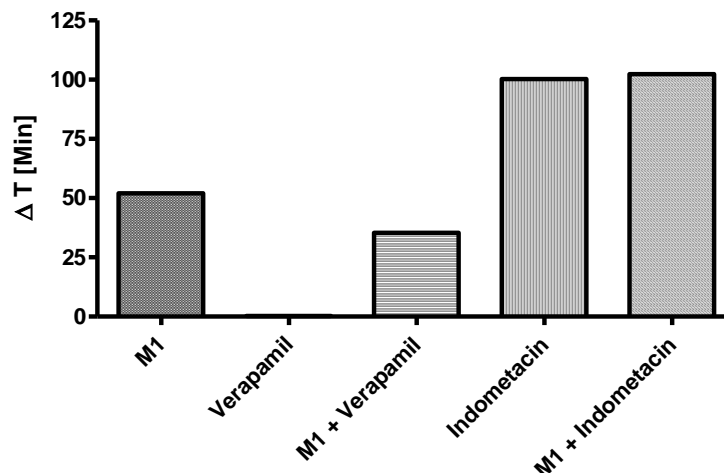


Abb. 38: Einzelversuch zum Einfluss von Verapamil (10 μM) und Indometacin (10 μM) auf die antioxidativen Eigenschaften des Metaboliten M1 (1 μM).

Hierbei zeigte sich, dass Verapamil ohne Zusatz von M1 den geringsten Effekt hervorrief (ΔT 0,3 Min). In Gegenwart von M1 hingegen erhöhte sich die Zeitspanne (ΔT 35 Min) bis zur Hämolyse. Einen größeren Effekt zeigte der Metabolit M1 ohne die Zugabe weiterer Substanzen (ΔT 52 Min). Die stärkste Verschiebung des Einsatzes der Hämolyse ergab sich allerdings bei den Versuchen, bei denen Indometacin Verwendung fand. Die Inkubation, bei der kein Metabolit M1 zugesetzt wurde, erreichte eine Verschiebung von 100 Minuten. Ergänzte man den Ansatz um den Metaboliten M1 so erhöhte sich diese Zeitdifferenz lediglich auf 102 Minuten.

6.6 Diskussion

Die in den durchgeführten Versuchen erhaltenen Ergebnisse des AAPH-Assays zeigten für den Metaboliten M1 eine starke antioxidative Wirkung. Eine erhebliche Konzentrationsabhängigkeit war ebenfalls zu erkennen (s. Abb. 36). Auffällig war, dass schon bei geringen Konzentrationen (0,5 μM) ein deutlicher Effekt sichtbar war. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denjenigen, die von Schäfer erhalten wurden [253], so lassen sich folgende Schlüsse ziehen. Zunächst ist ein direkter Vergleich unmöglich, denn aus den dort verwendeten Assays ging eine andere Kenngröße als bei den eigenen Untersuchungen hervor. Es handelte sich um einen Zahlenwert, der die Konzentration eines Antioxidans definiert, die einen äquivalenten reduzierenden Effekt

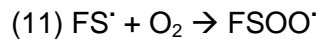
wie eine 1 mM Fe(II)-Lösung aufweist. Aus diesem Grund ist es sinnvoll die dort gefundenen Werte des Metaboliten M1 in Relation zu anderen in diesem Zusammenhang untersuchten Verbindungen zu betrachten. Im FRAP-Assay zeigte M1 von acht Monomeren nach der Protocatechusäure den zweitstärksten reduzierenden Effekt. Das Valerolacton zeigte sich insbesondere potenter als die Ascorbinsäure, was den eigenen Ergebnissen entspricht. In einem in dortiger Arbeit ebenfalls durchgeführten DPPH-Assay zeigten sich für die gleichen Substanzen abweichende Ergebnisse. Dort waren Gallussäure, (-)-Epicatechin, Kaffeesäure und Protocatechusäure stärker reduzierend wirksam während sich die Ascorbinsäure nicht signifikant von dem Metaboliten M1 unterschied. Es ist klar zu erkennen, dass abhängig von Untersuchungsmethode bzw. erhaltenen Kenngrößen, differierende Ergebnisse erhalten werden, die einen sinnvollen Vergleich erschweren.

Takebayashi et al. [256], die bei ihren Versuchen wesentlich höhere Konzentrationen (50 μ M) der Testsubstanzen verwendeten um antioxidative Effekte zu erzielen, erhielten trotzdem für die dort untersuchten Substanzen geringere Veränderungen als bei den eigenen Versuchen für den Metaboliten M1 gefunden wurden. Zwar ist eine direkte Vergleichbarkeit mit den Daten, die Takebayashi et al. erhielten nicht möglich, da dort nicht humane Erythrozyten Verwendung fanden, dennoch können sie die starke antioxidative Tendenz des Metaboliten M1 veranschaulichen. Dies wird deutlich, wenn andere dort untersuchte Verbindungen betrachtet werden. So zeigten Trolox und Harnsäure eine Verschiebung von 28 Minuten, Glutathion konnte 11 Minuten vor oxidativen Schäden schützen und Ascorbinsäure 15 Minuten. Einen größeren Effekt zeigten (+)-Catechin mit 89 Minuten, der Arzneistoff Edaravon mit 96 Minuten und Hesperedin mit 125 Minuten. Die eigenen Versuche ergaben Verschiebungen von 23 Minuten durch die Zugabe des Metaboliten M1. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass bei Takebayashi et al. die untersuchten Substanzen in einer fünfzigfach höheren Konzentration vorlagen als bei den eigenen Versuchen.

Der ausgeprägte Effekt des Metaboliten M1 kann durch die Brenzcatechinstruktur erklärt werden. Das Standardredoxpotential des ortho-Hydrochinons beträgt 1,25 V [259] während für Ascorbinsäure ein Potential von 0,33 V [260] beschrieben ist. Dies bedeutet, dass das Reduktionsvermögen bzw. die Fähigkeit zur Elektronenaufnahme der Dihydroxyphenolstruktur wesentlich höher ist als das der Ascorbinsäure.

Der Mechanismus, der der Zellschädigung zugrunde liegt, wurde bereits kurz angedeutet (s. Abschnitt 6.4). Das dort beschriebene aus AAPH gebildete Peroxyl-

Radikal (ROO^\cdot) reagiert mit Fettsäuren (FSH) der Zellwand und bildet weitere Radikale, die unter Sauerstoffeinfluss zu einer Kettenreaktion mit einer sich potenzierenden Anzahl von Radikal-Molekülen führen können [261] (s. Gleichungen 10-12).



Sato et al. [262] konnten zeigen, dass die Hämolyse auf verschiedene, sich ergänzende membranschädigende Mechanismen zurückzuführen ist. Zum einen erfolgt eine Oxidation von Lipiden, insbesondere von ungesättigten Fettsäuren, in der äußeren Membranschicht. Zum anderen werden Anionentransporter, so genannte Band-3-Transporter, geschädigt. Dies geschieht vor allem durch Oxidation von Thiolgruppen, die in der Folge untereinander Disulfide bilden. Gerade diese veränderten Proteine verursachen Risse, bzw. Löcher in der Membran durch die es dann zum Austritt von Zytosol kommt.

Die eigenen Untersuchungen belegen eine deutliche Verzögerung der Entstehung dieser Läsionen. Nun stellt sich die Frage nach der Aussagekraft bzw. der praktischen Relevanz dieser Ergebnisse. Der Zusammenhang zwischen reaktiven Spezies und pathophysiologischen Vorgängen ist bereits ausgiebig untersucht worden. In gewissem Umfang entstehen diese Moleküle bei der Immunabwehr durch Makrophagen und im Rahmen der Atmungskette [263]. Insbesondere das Superoxid-Radikal steht hierbei im Vordergrund. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* ca. 1-2 % des in Mitochondrien aufgenommenen Sauerstoffs zu einer radikalischen Spezies umgewandelt werden [264]. Es existieren eine Reihe von körpereigenen Systemen, die in der Lage sind diese Verbindungen zu entstören. Die unter 6.2 beschriebenen Enzyme sind nicht nur in Erythrozyten lokalisiert, sondern in unterschiedlichen Konzentrationen ubiquitär. Dies bedeutet, dass unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies gehalten werden kann.

Dieses Gleichgewicht kann möglicherweise zu Gunsten der Bildung von ROS verschoben werden. Eine Ursache ist in inflammatorischen Prozessen zu suchen, bei denen es, wie oben beschrieben, im Rahmen der Immunabwehr zur verstärkten Bildung von radikalischen Verbindungen kommen kann. Da viele Erkrankungen mit chronisch

entzündlichen Prozessen assoziiert sind, ist so eine Zunahme an radikalischen Sauerstoffspezies erklärbar. Ob allerdings eine zugrunde liegende Erkrankung die Menge an ROS erhöht oder ob eine erhöhte Konzentration an ROS imstande ist eine Erkrankung zu verursachen bzw. deren Verlauf entscheidend zu beeinflussen ist umstritten. So wird beispielsweise bei atherosklerotischen Vorgängen die Freisetzung von ROS durch Angiotensin II, TNF- α , IL-1 [265], Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- β 1 [265] und einen hohen Plasmaglucoosespiegel [266] induziert. Der Grund für deren vermehrte Freisetzung ist hingegen noch nicht eindeutig geklärt [267]. Es wird ein Zusammenhang mit einer Veränderung von Endotheloberflächen und dadurch gesteigerte Adhäsionsfähigkeit verschiedener Immunzellen vermutet.

Reaktive Sauerstoffspezies können zu oxidativen Veränderungen verschiedener Proteine und Fette führen, die wiederum imstande sind die Oberflächenstruktur der Gefäßinnenwände negativ zu beeinflussen. Außerdem können diese Sauerstoffspezies auch direkten Einfluss auf Transskriptionsfaktoren nehmen [268]. So wird der Faktor AP-1, der bei Wachstumsvorgängen, Inflammation und Apoptose eine Rolle spielt, insbesondere durch Wasserstoffperoxid aktiviert [269]. Gleiches gilt für die Regulation von NF- κ B. Hier dient ebenfalls Wasserstoffperoxid als aktivierender Faktor. Andere ROS wie Superoxide oder Hydroperoxide zeigen hingegen keine Aktivierung [270].

Oben gezeigte Beispiele verdeutlichen zwar einen theoretischen Zusammenhang zwischen vermehrt anfallenden ROS und einer veränderten Ausprägung bzw. Entstehung verschiedener Erkrankungen. Um aber relevante Zusammenhänge *in vivo* beurteilen zu können ist es nötig Ergebnisse klinischer Studien zu betrachten. Die Teilnehmerzahl ist oft gering, so dass nur eine begrenzte Aussagekraft vorhanden ist. Es existieren aber Metaanalysen, die sich mit dem Einfluss einer Reihe von Polyphenolen, denen *in vitro* antioxidative Effekte zugeschrieben werden, auf den Verlauf verschiedener Krankheiten, die möglicherweise durch ROS beeinflusst werden, beschäftigen.

Hollman et al. [271] zeigten bei einer Analyse von sechs Studien mit insgesamt über 100.000 Teilnehmern, dass ein Zusammenhang besteht zwischen regelmäßiger Aufnahme von Polyphenolen, hier enthalten in grünem und schwarzem Tee, und einem vermindertem relativem Risiko (0,80; 95 % CI: 0,65-0,98) einen Schlaganfall zu erleiden. Dass für diese Effekte antioxidative Eigenschaften des Tees verantwortlich sein könnten, untermauerte eine Arbeit von Rietveld et al. [272]. Dort wurden klinische Studien verglichen, in deren Rahmen Plasmaproben von Probanden untersucht wurden, die

verschiedene Mengen grünen bzw. schwarzen Tees eingenommen hatten. Diese Untersuchungen wurden mithilfe verschiedener Assays (TRAP, EAC, FRAP) durchgeführt. Die Autoren zogen aus den Ergebnissen den Schluss, dass es zu einer relevanten Aufnahme der Polyphenole und dadurch zu einer Zunahme der antioxidativen Kapazität des Plasmas kam.

Es existieren allerdings auch intensive Untersuchungen, die zu einem heterogeneren Ergebnis führen. So wurden pathophysiologische Veränderungen im Glucosestoffwechsel untersucht. Hamer et al. [273] konnten bei einer Metaanalyse zum Einfluss von Gemüse- bzw. Obstaufnahme auf die Entstehung eines Diabetes Typ 2, keinen relevanten Zusammenhang finden.

Zu beachten ist, dass bei derartigen Studien eine Vielzahl von "confoundern" auftreten können. So werden oft nicht definierte Einzelstoffe sondern Gemische in Form von Extrakten oder ganzen Früchten bzw. Gemüsesorten untersucht. Dies bedeutet, dass weder eine gleich bleibende Zusammensetzung der Inhaltsstoffe noch eine gleich bleibende Menge bzw. „Dosis“ gewährleistet ist. Dies macht es schwierig eine mögliche Wirkung auf bestimmte Verbindungen zurückzuführen. Außerdem ist der Anteil der Polyphenole, die aus dem Darm resorbiert werden gering, so dass selten Plasmaspiegel über 1 µM erreicht werden können [274].

Bei der Interpretation der selbst durchgeführten Versuche ist zu beachten, dass ein gewisser Anteil des Valerolactons metabolisiert wird und als Glucuronid, Sulfat bzw. methyliert vorliegt [26]. Die strukturelle Veränderung der Methylierung, wirkt sich negativ auf die antioxidativen Eigenschaften aus, da die Hydrochinonstruktur verloren geht. Wohingegen eine Glucuronidierung und Sulfatierung, zumindest bei (+)-Catechin, keine relevante Veränderung der antioxidativen Eigenschaften zeigte [275]. Ob antioxidativ wirkende Plasmaspiegel des Metaboliten M1 erreicht werden können ist deshalb fraglich, denn Grimm et al. [26] fanden bei Probanden nach Einnahme eines Kiefernextraktes eine Maximalkonzentration von 17 nM pro Liter.

Weiterhin ist zu bedenken, dass nach dem möglichen Abfangen der radikalischen Spezies der Metabolit M1 als Chinon vorliegen könnte (s. Abb. 31). Die Struktur kann nun wiederum eine Reaktivität zeigen. So ist eine Rückreaktion des Chinons unter Bildung eines Semichinons möglich. Bei dieser Reaktion könnte das nötige Elektron von Sauerstoff aufgenommen werden und es entstünde ein Superoxid-Radikal. Dieses könnte nun, wie oben beschrieben, enzymkatalysiert Wasserstoffperoxid bilden. Ein weiterer Reaktionsweg wäre eine Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} , das dann wiederum zur

Entstehung eines Hydroxylradikals führen könnte [276]. Wegen der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur liegt aber auch eine stark elektrophile Verbindung vor. Durch einen nukleophilen Angriff, beispielsweise an Cysteinyll-Reste von Proteinen, könnten kovalente Verbindungen mit Funktionsveränderungen des Proteins oder die Entstehung von antigenen Eigenschaften hervorgehen.

Des Weiteren wurden Versuche mit den PGP-Inhibitoren Indometacin bzw. Verapamil durchgeführt. Sie könnten, falls sich der Metabolit M1 als Substrat dieses Transporters erwiese, Einfluss auf die extrazelluläre bzw. intrazelluläre Konzentration des M1 nehmen. Zu erwarten wäre, dass sich bei Hemmung des Transporters eine intrazelluläre Akkumulation des Metaboliten ergeben würde, die die extrazelluläre Konzentration vermindert und somit auch die im Überstand gemessene antioxidative Aktivität vermindern würde. In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen zeigte sich bei Zugabe eines Inhibitors keine deutlich verminderte Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass die in Kapitel 4 beobachtete Aufnahme bzw. Adsorption des Metaboliten M1 an oder in Erythrozyten nicht durch das PGP-System beeinflusst wird. Bei Indometacin ergab sich eine massive Zunahme des antioxidativen Effekts im Vergleich sowohl zu einer unbehandelten Vergleichsprobe als auch zu einer Inkubation mit dem Metaboliten M1. Strukturell kann dieser Effekt durch den in Indometacin enthaltenen Indolring erklärt werden, denn dieser wird leicht zu einem 2-Oxoindol oxidiert [277] und stellt somit ein potentes Reduktionsmittel dar. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass Indometacin und Verapamil in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden als der Metabolit M1 und somit der Einfluss des Metaboliten auf die antioxidative Wirkung des Ansatzes geringer ausfiel.

Einen weiteren Hinweis dafür, dass ein möglicherweise intrazellulär vorliegender Anteil des Metaboliten M1 keinen relevanten Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften des Systems hatte, zeigte sich bei den Versuchen zum Einfluss der Extrazellulärmatrix (s. Abb. 37). Hier war deutlich erkennbar, dass nach Ersatz des Puffers eine deutlich erhöhte Anfälligkeit der Zellen gegenüber oxidativer Hämolyse vorlag, sogar im Vergleich zu den Proben ohne Antioxidanzusatz. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass das wirksame Antioxidans, in diesem Fall der Metabolit M1,

größtenteils frei in Lösung vorlag und somit entfernt wurde. Zum anderen enthalten Erythrozyten zelleigene Antioxidantien, wie Ascorbinsäure [278] und Glutathion die möglicherweise extrazellulär freigesetzt wurden und deshalb nach Entfernung des Puffers nicht mehr zu Verfügung standen [279]. Ein gegebenenfalls intrazellulär vorhandener Anteil des Metaboliten M1 nahm in diesen Versuchen keinen positiven Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften des Systems.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, wie im vorherigen Kapitel (s. Abschnitt 4.5.3), kein Beleg für die Beteiligung des PGP-Systems an möglichen Verteilungsprozessen des Metaboliten M1 zwischen Erythrozyten und Extrazellulärmatrix gefunden werden konnte. Ebenso fand sich kein Hinweis auf eine Beeinflussung der antioxidativen Kapazität des Systems durch einen intrazellulär vorhandenen Anteil des Metaboliten M1 bzw. durch potentiell dort gebildete Konjugate. Dennoch konnte in den durchgeführten Versuchen für den Metaboliten M1, bei dem gewählten Versuchsaufbau, eine starke antioxidative bzw. radikalstabilisierende Eigenschaft festgestellt werden. Die praktische Relevanz dieser Ergebnisse bleibt hingegen unklar, denn es stellt sich das grundsätzliche Problem der Übertragbarkeit von *in vitro* bzw. *ex vivo* Modellen auf den Organismus. Vor dem Erreichen eines möglichen Wirkorts stehen Aufnahme, Metabolismus und Transport der Substanzen, die zu einer Wirkungsminderung bzw. Veränderung führen können. Außerdem ist nach wie vor ein eindeutiger Nutzen einer zusätzlichen Aufnahme antioxidativer Substanzen nicht bewiesen. In diesem Zusammenhang sei das Verfahren der EFSA (European Food Safety Authority) genannt, in dessen Rahmen Hersteller, die Produkte mit „health claims“ d.h. gesundheitsbezogenen Aussagen bewerben wollen, laut Artikel 13 der Verordnung über Nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben, einen durch valide Daten belegten Antrag stellen müssen um eine derartige Erlaubnis zu erhalten. Eine am 25. Februar 2010 veröffentlichte „expert opinion“ beschäftigt sich mit den Aussagen „schützt Zellen vor frühzeitiger Alterung“ und „Schutz von DNS, Proteinen und Lipiden vor oxidativen Schäden“ [280], die verschiedene Hersteller u.a. für grünen und schwarzen Tee und Zubereitungen aus verschiedenen Pflanzenextrakten in Anspruch nehmen wollten. Das Gremium kommt zu dem Schluss, dass es anhand der vorgelegten Daten zum jetzigen Zeitpunkt keine ausreichend bewiesenen Zusammenhänge zwischen Verzehr bestimmter Nahrungsbestandteile, die mit einer antioxidativen Wirkung in Verbindung gebracht werden, und einem allgemein günstigen physiologischen Effekt wie dem Schutz der Zelle vor frühzeitiger Alterung gibt.

EXPERIMENTELLER TEIL

7 Identifizierung verschiedener Fettsäuren im Kiefernextrakt mittels Gaschromatographie

7.1 Geräte

Kapillargaschromatographie	Agilent 6890 Series GC System (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (1:20), 220 °C
Autosampler	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule	J&W DB-WAX (30 m x 0.25 mm,df=0.25 µm)
Trärgas	2 ml/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	50 °C, 3 min isotherm 4 °C/min, 220 °C, 10 Minuten isotherm
Massenspektrometrie	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Ionenquelle	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV Temperatur 150 °C Quellendruck 10 ⁻⁵ mbar Kathodenstrom 1.5 mA
Photomultiplier	1300 V
Massenbereich	38 – 450 u
Glasviolen N14/23	Witek Labortechnik (Wertheim, Deutschland)

Die Datenauswertung erfolgte mit der PC-Software Xcalibur der Firma Fisons Instruments, der Mass Spectral Database des National Institute of Standards and Technology (NIST MS Search 1.7) und der am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg erstellten Datenbank.

7.2 Reagenzien

Millipore®-Wasser, Diethylether (Fisher Scientific), Tert-butyl-methylether (Fisher scientific), Trimethylsulfoniumhydroxid (Fisher Scientific)

7.3 Durchführung

Es wurden 250 mg des Kiefernrintenextraktes in ca. 250 ml Millipore® -Wasser gelöst. Jeweils ca. 10 ml dieser Lösung wurden in ein Reagenzglas gegeben und mit 2 ml Diethylether überschichtet. Danach wurde 20 Minuten am Mischrads (25 Umdrehungen/min) extrahiert, die Etherphasen abgenommen und jeweils in einer Glasviole vereinigt. Die wässrigen Extrakte wurden noch einmal mit jeweils 2 ml Diethylether überschichtet. Nach Extraktion am Mischrads wurden die Etherphasen der ersten und zweiten Extraktion vereinigt. Der Ether wurde unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur abgedampft und der Rückstand in 1 ml Tert-butyl-methylether aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 300 µl Trimethylsulfoniumhydroxid als Methylierungsreagenz gegeben und von dieser Mischung ca. 1 µl für die Gaschromatographie verwendet.

Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte über den Vergleich der Fragmentierungsmuster mit bekannten Spektren der Substanzbibliothek.

8 Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes und zweier Metabolite

8.1 Bestimmung der Proteinbindung mittels high performance affinity chromatography

8.1.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Reagenzien von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen. Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde durch eine Aufarbeitungsanlage (Milli Q–reagent grade water system) der Firma Millipore (Schwalbach, Deutschland) aus demineralisiertem Wasser hergestellt. Dieses Wasser wird als Millipore®-Wasser bezeichnet.

8.1.2 Geräte

Es wurde ein HPLC-System der Firma Waters mit folgendem Aufbau verwendet:

Pumpe:	Model 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf (Waters, Milford USA)
Degaser:	Modell 1525, In-line Vakuum-Degaser (Waters)
Probengeber:	717 plus Autosampler (Waters)
Stationäre Phase:	Chiral-HSA column 50*3,0 mm (Chromtech, München)
Detektor:	uv dualband Model 2487, Messwellenlänge 280 nm

C. Experimenteller Teil

Datenverarbeitung: Software „Breeze[®]“ Version 3.30 (Waters)
Microsoft Excel 2002

Fluß: 0,5 ml / min

Säulentemperatur: 37 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

Verwendetes Fließmittel:

A: Isopropanol HPLC grade (Merck, Darmstadt)

B: Phosphatpuffer (20 mM) pH 7,0

Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat	0,0075 M
Dinatriumhydrogenphosphat	0,0122 M
Phosphorsäure zum Einstellen auf pH 7,0	
Millipore [®] -Wasser	ad 1000,0 ml

Mobile Phase: 0,05 : 0,95 isokratischer Fluss

A : B

Die Lagerung der Säule erfolgte im Kühlschrank bei 8 °C um mikrobieller Zersetzung des Füllmaterials vorzubeugen. Aus diesem Grunde wurde die Säule vor dauerhafter Lagerung mit reinem Isopropanol gespült bzw. befüllt. Um Kontamination durch den Puffer zu vermeiden wurde dieser täglich frisch vor Versuchsbeginn hergestellt.

8.1.3 Lösungsmittel für Standards, Bestandteile des Kiefernextraktes und die Metabolite M1 bzw. M2

Zum Lösen der Substanzen wurde der oben genannte Phosphatpuffer verwendet.

8.1.4 Standards

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurden Referenzsubstanzen (s. Tab. 7) mit den angegebenen Konzentrationen vermessen und die aus den Retentionszeiten berechneten Affinitäten gegen Proteinbindungswerte aus der Literatur aufgetragen [107].

Tab. 7: Dargestellt sind die für die Kalibriergerade verwendeten Referenzsubstanzen und deren eingesetzte Mengen.

Substanz	Konzentration
Allopurinol	0,03 mg / ml
Atenolol	0,03 mg / ml
Paracetamol	0,1 mg / ml
Triamteren	0,03 mg / ml
Salicylamid	0,03 mg / ml
Salicylsäure	0,03 mg / ml

8.1.5 Untersuchte Substanzen

(+)-Catechin, Taxifolin, Ferulasäure, Kaffeesäure, δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M1) (Synthese durch Große Düweler), δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M2) (Synthese durch Große Düweler), 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure), p-Cumarsäure, Gallussäure, p-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Procyanidin B₁ wurden untersucht.

Die Konzentration der eingesetzten Substanzen betrug jeweils 0,03 mg/ml.

8.1.6 Bestimmung der Bindung der Referenzsubstanzen zu Albumin

Analog zu vergleichbaren Untersuchungen [98, 104, 106] wurde mithilfe der Standards eine Kalibriergerade aufgestellt und aus dieser die Proteinbindung der Verbindungen berechnet. Hierzu wurde aus den Retentionszeiten der Substanzen nach Gleichung 13:

$$\text{Gleichung (13)} \quad k' = \frac{T_r - T_o}{T_o}$$

k' = Retentionsfaktor, T_r = Nettoretentionszeit, T_o = Totzeit

der Retentionsfaktor k' berechnet und aus diesem dann gemäß Gleichung 14

$$\text{Gleichung (14)} \quad P = \left(\frac{k'}{k'+1} \right)$$

P = proteingebundener Anteil

der proteingebundene Anteil P.

Dieser Wert wurde verwendet, um anhand der Gleichung der Regressionsgeraden der Kalibriersubstanzen Proteinbindungswerte graphisch zu ermitteln.

8.1.7 Systemeignung

Auf die Bewertung chromatographischer Daten wie Signal-Rausch-Verhältnis und Symmetriefaktor wurde verzichtet, da bei den durchgeführten Untersuchungen keine Quantifizierung stattfand. Zur Qualitätsbeurteilung der Messungen wurde die Standardabweichung der aus den Retentionszeiten errechneten Proteinbindungswerte herangezogen (s. Tab. 8, Tab. 9).

Tab. 8: Prozentuale Bindungsanteile der untersuchten Bestandteile des Kiefernridenextraktes und der Metabolite M1/M2 zu humanem Albumin. [Mittelwerte, ± Standardabweichung, N=5]

Substanzen	Mittelwert	SD [+/-]
Ferulasäure	73,5	0,12
Kaffeesäure	66,0	0,23
Metabolit M1	34,9	1,28
Metabolit M2	26,4	0,03
3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)	20,7	0,09
p-Cumarsäure	65,4	4,84
Gallussäure	31,6	0,56
p-Hydroxybenzoesäure	35,3	10,9
Vanillinsäure	56,3	1,16
Procyanidin B ₁	91,8	0,94

Tab. 9: Prozentuale Bindungsanteile der Referenzsubstanzen, berechnet aus den Retentionszeiten. [Mittelwerte, ± Standardabweichung, N = 5]

Substanz	Mittelwert	SD [+/-]
Paracetamol	-15,7	0,5
Salicylsäure	85,9	0,1
Triamteren	53,0	0,2
Atenolol	-5,1	0,1
Salicylamid	27,3	0,6
Allopurinol	-31,3	0,2

Exemplarisch ist das Chromatogramm einer Bestimmung der 3,4-Dihydroxybenzoesäure (s. Abb. 39) gezeigt.

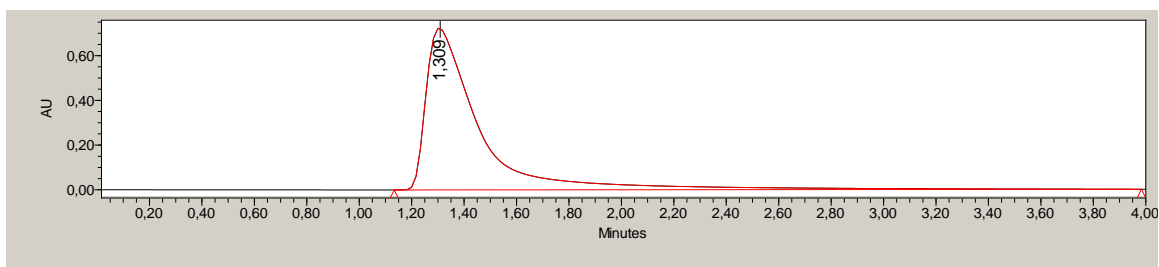


Abb. 39: Chromatogramm der 3,4-Dihydroxybenzoesäure [0,03 mg/ml] bestimmt mittels HPAC.

8.2 Bestimmung der Proteinbindung mittels Ultrafiltration

8.2.1 Verwendete Geräte und Reagenzien

Fließmittel

A: Acetonitril HPLC-Gradient grade Qualität (Fisher Scientific, Schwerte)

B: Wässrige Phase:

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

Mobile Phase: 12 : 88 isokratischer Fluss
A : B

Interner Standard

p-Cumarsäure 6,0 µmol / L

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

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

Es wurden jeweils 10,0 ml der Lösungen A, B und C gemischt und mit Millipore®-Wasser auf etwa 90 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt und mit Millipore®-Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt.

8.2.2 Substanzen bzw. Chemikalien

Methanol HPLC Grade Qualität (Fisher Scientific)

Polyoxyethylen(2)-sorbitan-monooleat, Polysorbat 80 (Tween 80[®])

Salzsäure 0,5 M

Blutprodukte

Humanplasma (Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Würzburg)

8.2.3 Geräte

Mischrad: Außendurchmesser 340 mm, 24 Halterungen für Normschliffe NS 14/23, Umdrehungszahl 10 Upm (Konstruktion der institutseigenen Werkstatt)

Mikroliterpipette 1-10 µL: Eppendorf Research[®] variable, 1-10 µL (Eppendorf)

Mikroliterpipette 10-100 µL: Eppendorf Research[®] variable, 10-100 µL (Eppendorf)

Mikroliterpipette 100-1000 µL: Eppendorf Research[®] variable, 100-1000 µL (Eppendorf)

Präzisionswaage: Mettler P1200, 0,1-1200 g, 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)

Vortex: Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)

8.2.4 HPLC-System

Es wurde das unter 8.2.1 beschriebene HPLC-System mit folgenden Modifikationen verwendet:

Stationäre Phase:	Zorbax [®] SB C-8 (Agilent Technologies, Palo Alto)
Detektor:	Elektrochemischer Detektor CLC 100, oxidativer Modus, Arbeitsspannung +50 mV (Chromsystems, München)
Fluß:	1,0 ml / min
Injektionsvolumen:	20 µl

8.2.5 Ultrafiltrationseinheiten

Für die Versuche wurden Filtrationseinheiten mit einem Größenausschluss von 10,000 Da und einer abnehmbaren Filtereinheit (Microcon centrifugal filter devices Ultracel YM-10, 10,000 MWCO, Millipore[®] Bedford USA) verwendet.

Für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung wurde Humanplasma mit einer Mischung aus Bestandteilen (Lösungsmittel HEPES-Puffer) des Kiefernridenextraktes und dem Metaboliten M1 (s. Tab. 10) versetzt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und nachfolgend zentrifugiert (Beckman Coulter SM, Microfuge[®] 22R Zentrifuge).

Tab. 10: Eingesetzte Konzentrationen der untersuchten Substanzen des Kiefernextraktes und des Metaboliten M1 für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration.

Substanz	Konz.[$\mu\text{mol/L}$]
(+)-Catechin	6,0
Kaffeensäure	1,3
Metabolit M1	6,0
Ferulasäure	80,0
Taxifolin	6,0
Procyanidin B ₁	7,0

8.2.6 Präparation der Filtereinheiten

Die Filtereinheiten wurden nach einer modifizierten Methode von Kyoung-Jin et al. [85] vorbehandelt, um die unspezifische Bindung an Membranen der Filter zu verringern. Hierzu wurden 25 μl einer Polysorbat 80 Lösung (5 % m/m) auf die Filtereinheiten gegeben und nach Aufsetzen der Filter auf die zugehörigen Sammelgefäße 10 min bei 25 °C in der Beckman-Zentrifuge inkubiert. Bei 3000 g wurde für 10 min abzentrifugiert und nach Zugabe von 200 μl HEPES-Puffer auf den Filter erneut 10 min bei 25 °C und 3000 g zentrifugiert. Die Behälter mit dem Filtrat wurden durch neue Sammelgefäße ersetzt. Die so vorbehandelten Filtrationseinheiten wurden für die nachfolgenden Versuche verwendet.

8.2.7 Durchführung der Ultrafiltration

Humanplasma wurde mit den Substanzen (Konzentrationen s. Tab. 10) versetzt und von dieser Mischung jeweils 150,0 μl auf eine Filtrationseinheit aufgegeben. Parallel hierzu wurde auf einen weiteren Filter 150,0 μl Humanplasma ohne Zugabe der Verbindungen aufgetragen und wie obige Einheit aufgearbeitet. Daher bestand also jeder Versuch aus zwei Filtrationseinheiten. Nun wurde bei 25 °C und 14,000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der gebundene Anteil befand sich im Filter und der freie Anteil lag

im Filtrat vor. Im zweiten Gefäß hingegen fand nur eine Trennung der Proteine vom Plasmawasser statt. Die Filter wurden gedreht und in das jeweils andere Gefäß eingesetzt. Nun wurde bei 25 °C und 3000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Auf diese Weise war es möglich den Inhalt der Filter in die Filtrationsgefäße zu überführen [121]. Der plasmaproteingebundene Anteil, der sich zuvor im Filter befand, lag deshalb im Filtrat des zweiten Gefäßes vor. So resultierten pro Versuch zwei Filtrationsgefäße, in denen jeweils der freie und der proteingebundene Anteil in gelöster Form vorlagen.

8.2.8 Aufarbeitung der Proben

Nach Beendigung der Zentrifugation wurden jeweils 100,0 µl Plasma entnommen mit 130,0 µl Methanol, 40,0 µl 0,5 M Salzsäure und 10 µl IS versetzt. Es erfolgte Zentrifugation bei 14,000 g und 4 °C für 30 Minuten. Die wässrige Phase wurde abgenommen und für die HPLC-Analytik verwendet. Zu jedem Filtrationsversuch wurde ein Referenzversuch durchgeführt, bei dem Plasma mit der gleichen Konzentration der Monomere versetzt wurde, wie bei den Bindungsversuchen. Diese wurden auch aufgearbeitet und dienten zur Bestimmung der Gesamtmenge der Monomere im Plasma. Es erfolgten jeweils Fünfachbestimmungen.

8.2.9 HPLC-Bedingungen

Das Fließmittel setzte sich aus 88 % Phase B und 12 % Phase A zusammen (s. experimenteller Teil 8.2.1). Die Detektion erfolgte sowohl mit einem uv-vis-Detektor, als auch mit einem elektrochemischen Detektor (ECD). (+)-Catechin, Kaffeesäure, M1 und Taxifolin waren elektrochemisch zu detektieren, Ferulasäure und p-Cumarsäure waren der uv-Detektion zugänglich (s. Abb. 40, Abb. 41).

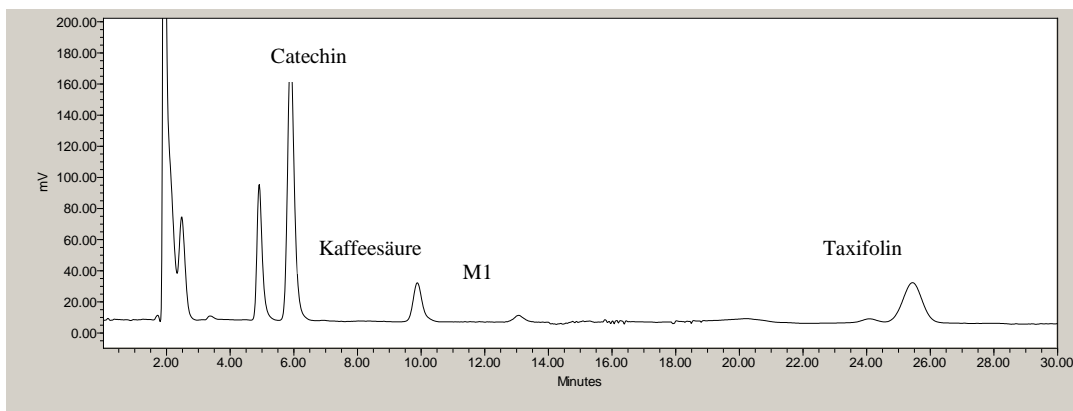


Abb. 40: Musterchromatogramm des aufgearbeiteten humanen Plasmas, das mit den Kiefernrintenextraktbestandteilen und dem Metaboliten M1 versetzt wurde. Die Detektion erfolgte elektrochemisch. Es ergaben sich Retentionszeiten von ca. 6 min für (+)-Catechin, ca. 9 min für Kaffeesäure, ca. 12 min für M1 und ca. 26 min für Taxifolin.

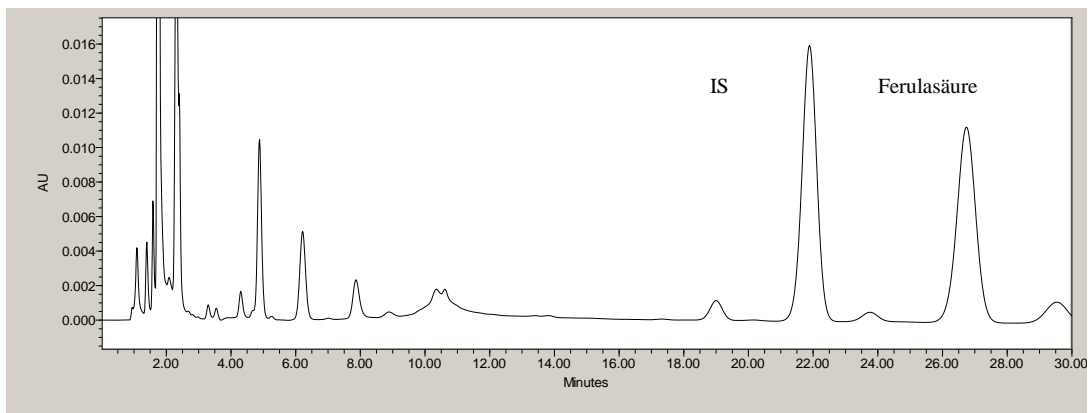


Abb. 41: Musterchromatogramm des aufgearbeiteten humanen Plasmas, das mit den Kiefernrintenextraktbestandteilen und dem Metaboliten M1 versetzt wurde. Die Detektion erfolgte uv-spektroskopisch. Es ergaben sich Retentionszeiten von ca. 19 min für p-Cumarsäure (IS) und ca. 23 min für Ferulasäure.

8.2.10 Messung der unspezifischen Bindung und deren Korrektur

Trotz Vorbehandlung der Filtermembranen mit Polysorbat 80 zeigte sich bei den Messungen für einige Substanzen eine massive unspezifische Bindung. Um diese zu quantifizieren wurden die Verbindungen in der gleichen Konzentration, die auch bei der Bestimmung der Proteinbindung verwendet wurde, in HEPES-Puffer gelöst. Von dieser Lösung wurden 100 μ l auf ein vorbehandeltes Filtrationsgefäß gegeben und 30 Minuten

bei 14,000 g zentrifugiert. Vom Filtrat wurden 20 µl mittels HPLC analysiert. Außerdem wurden aus der gleichen Lösung ohne Zentrifugation entsprechende Mengen direkt injiziert. Aus dem Verhältnis der Flächen nach Filtration zu infiltrierter Lösung konnte die unspezifische Bindung ermittelt werden (s. Allgemeiner Teil, Gleichung 9). Da die Proteinbindung aus dem freien Filtrat bestimmt wurde, musste der erhaltene Wert um die unspezifische Bindung korrigiert werden.

8.2.11 Bestimmung der Wiederfindung der untersuchten Substanzen

Nach der Durchführung der Ultrafiltration lagen für jede Substanz sowohl der freie, als auch der gebundene Anteil in Lösung vor. Diese Anteile wurden jeweils addiert und zur eingesetzten Menge ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise wurde die Wiederfindung berechnet.

$$\text{Gleichung 15} \quad \text{Wiederfindung\%} = \left(\frac{\text{freier Anteil} + \text{gebundener Anteil}}{\text{eingesetzte Menge}} \right) * 100$$

8.2.12 Auswertung der HPLC-Ergebnisse

Nach der Integration der Peaks mit Hilfe der Software „Breeze[®] Version 3.30“ wurden die Verhältnisse zwischen den Peakflächen der zu untersuchenden Substanzen und des internen Standards (IS) gebildet. Aus diesen konnte unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung mit Gleichung 16 A der freie Anteil (f) bestimmt werden.

Mit dessen Hilfe war es dann möglich, unter Verwendung von Gleichung 16 B die Proteinbindung zu erhalten.

$$\text{Gleichung 16 A} \quad f = \frac{F_f}{[(1 - \text{USB}) * F_E]}$$

**f = freier Anteil, F_E = Flächenverhältnis aus Substanz vor Filtration und IS,
F_f = Flächenverhältnis aus Substanz nach Filtration und IS**

$$\text{Gleichung 16 B} \quad \text{PB} = 100 * (1 - f)$$

8.2.13 Validierung der HPLC-Analytik

8.2.13.1 Selektivität

Um zu zeigen, dass die einzelnen Substanzen nebeneinander und ohne gegenseitige Beeinflussung bzw. Beeinflussung durch Matrixbestandteile, Abbauprodukte oder Metabolite aufgetrennt und dargestellt werden können, wurde die Selektivität bestimmt.

Um eben diese darzustellen wurde reines Humanplasma ohne Zusatz der Kiefernextraktbestandteile und des Metaboliten M1 aufgearbeitet und die so erhaltenen Chromatogramme mit aufgearbeiteten Plasmaproben, die die Verbindungen enthielten, verglichen. Hierbei wurden die Substanzen nicht einzeln, sondern als Mischung injiziert um, wie oben beschrieben, auch gegenseitige Beeinflussungen erkennen zu können. Die Selektivität ist definiert als die Fähigkeit einer Methode verschiedene Substanzen nebeneinander ohne Störung durch Matrixbestandteile oder andere Substanzen nachweisen zu können. Beim Vergleich der Chromatogramme konnte bei elektrochemischer Detektion keine Beeinflussung der zu bestimmenden Substanzen im Bereich zwischen 6 - 25 Minuten festgestellt werden (s. Abb.).

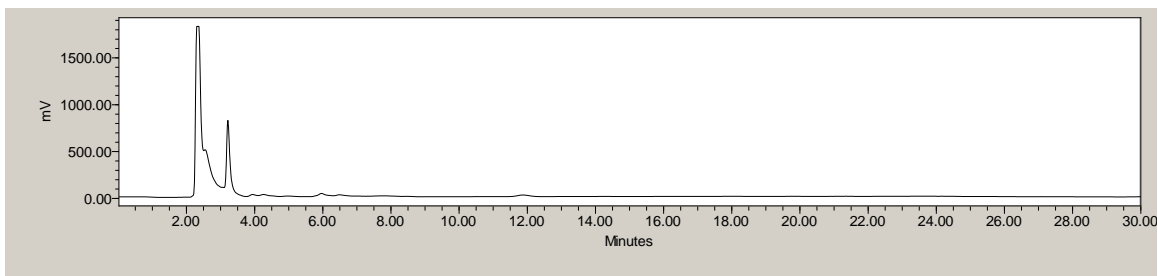


Abb. 42: Musterchromatogramm des aufgearbeiteten humanen Plasmas ohne Zugabe der Verbindungen. Die Detektion erfolgte elektrochemisch. Es ergaben sich keine Überlagerungen zwischen den Substanzen und Matrixbestandteilen (vgl. Abb. 40)

Auch bei uv-spektrometrischer Detektion konnte keine Beeinflussung der Substanzen untereinander im Bereich von 22 - 26 Minuten bzw. durch Matrixbestandteile festgestellt werden (s. Abb. 43).

C. Experimenteller Teil

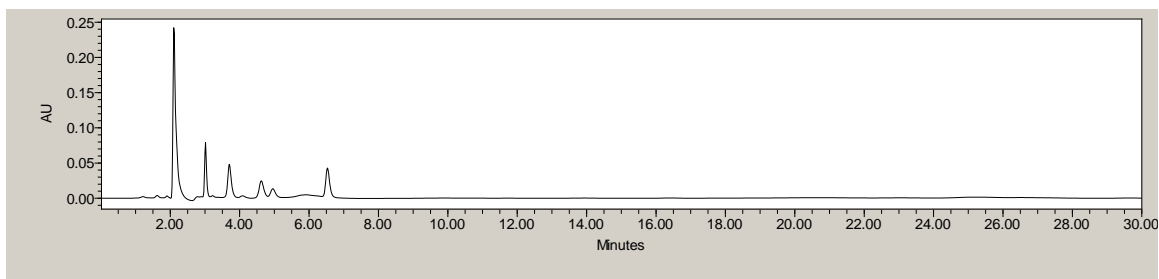


Abb. 43: Musterchromatogramm des aufgearbeiteten humanen Plasmas ohne Zugabe der Verbindungen. Die Detektion erfolgte uv-spektroskopisch. Es ergaben sich keine Überlagerungen zwischen den Substanzen und Matrixbestandteilen (vgl. 41)

8.2.13.2 Linearität

Die Linearität wurde durch Kalibrierreihen für die einzelnen Substanzen überprüft. Für jede Substanz wurden für fünf Konzentrationen im angegebenen Messbereich (s. Tab. 11) Bestimmungen ($N = 5$) vorgenommen. Für alle Kalibrierreihen wurden durch lineare Regression Geradengleichungen mittels GraphPad PrismTM Version 3.30 erstellt. Hierzu wurde aus den Signalen der Substanzen und des internen Standards ein Quotient gebildet und dieser gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen. Durch lineare Regression wurde für jede Substanz eine Gerade folgender Gleichung ermittelt (s. Tab. 11): y (Konzentration [$\mu\text{M/L}$]) = m (Steigung) * x (Flächenquotient) + t (y -Abschnitt)

Tab. 11: Parameter der Kalibrierfunktionen der Verbindungen nach Extraktion aus humanem Plasma. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf Messungen angegeben.

Substanz	Konzentration ($\mu\text{M/L}$)	Steigung (m)	y -Abschnitt (t)	Bestimmtheitsmaß (R^2)
(+)-Catechin	5,5-33,3	$0,1891 \pm 0,006933$	$-0,7832 \pm 0,1498$	0,9563
Kaffeensäure	0,22-1,33	$0,9264 \pm 0,03023$	$-0,1180 \pm 0,02611$	0,9651
M1	1,11-6,66	$0,4861 \pm 0,01902$	$-0,6154 \pm 0,08224$	0,9505
Taxifolin	1,11-6,66	$0,3358 \pm 0,01348$	$-0,3165 \pm 0,05828$	0,9481
Ferulasäure	22,2-133,3	$0,02275 \pm 0,00074$	$-0,03222 \pm 0,06432$	0,9649
Procyanidin B ₁	0,13-7,8	$0,1692 \pm 0,006872$	$0,1692 \pm 0,006873$	0,9634

Um die Linearität zu testen wurde mithilfe von GraphPad Prism TM die Korrelation mittels eines zweiseitigen Pearson Tests untersucht (s. Tab. 12).

Tab. 12: Gezeigt sind die Ergebnisse des Korrelationstests nach Pearson. Der P-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Korrelation an.

Substanz	Korrelationskoeffizient	P-Wert (zweiseitig)	95 % Konfidenzintervall
(+)-Catechin	0,9971	0,0002	0,9543 - 0,9998
Kaffeesäure	0,9998	< 0,0001	0,9973 - 1,000
M1	0,9766	0,0043	0,6811 - 0,9985
Taxifolin	0,9973	0,0002	0,9582 - 0,9998
Ferulasäure	0,9922	0,0008	0,8827 - 0,9995
Procyanidin B ₁	0,9836	0,0025	0,7661 - 0,9990

Die Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,997 und die P-Werte < 0,0043 zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Substanzen und den Peakflächenverhältnissen aus den Substanzen zum internen Standard angenommen werden kann.

8.2.13.3 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der Methode wurden die Substanzen in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen in humanem Plasma gelöst und wie unter Abschnitt 8.2.8 beschrieben aufgearbeitet (N = 5). Aus den Peakflächenverhältnissen wurden mithilfe der Kalibriergeraden die Ist-Konzentrationen bestimmt und daraus mit Gleichung 17 die Richtigkeit berechnet.

$$\text{Gleichung 17: Richtigkeit (\%)} = \frac{\text{errechnete Konzentration}}{\text{eingesetzte Konzentration}} \cdot 100$$

Zur inter-day Präzision (s. Tab. 14) wurde die Aufarbeitung an fünf verschiedenen Tagen durchgeführt. Um die intra-day Präzision zu berechnen wurden die drei Konzentrationen an einem Tag aufgearbeitet (s. Tab. 13).

C. Experimenteller Teil

Tab. 13: Daten zur Intra-day Richtigkeit und Präzision der verwendeten Methode.

Substanz	Menge [μM]	errechnete Menge [μM]	Richtigkeit [%]	Relative Standardabweichung [%]
(+)-Catechin	33,3	$30,3 \pm 3,10$	91,1	10,24
	26,6	$26,8 \pm 3,18$	100,6	11,84
	20,0	$21,3 \pm 0,34$	106,7	1,57
Kaffeensäure	1,3	$1,44 \pm 0,07$	107,9	4,79
	1,1	$1,19 \pm 0,09$	112,9	7,78
	0,8	$0,80 \pm 0,04$	100,6	5,23
M1	6,6	$6,06 \pm 0,45$	91,1	7,49
	5,3	$5,36 \pm 0,58$	92,8	10,92
	3,9	$4,33 \pm 0,07$	87,2	1,69
Taxifolin	6,6	$6,08 \pm 0,59$	91,3	9,67
	5,3	$4,95 \pm 0,44$	92,8	8,81
	3,9	$3,48 \pm 0,29$	87,2	8,47
Ferulasäure	133,0	$136,6 \pm 7,66$	102,4	5,61
	106,6	$108,8 \pm 1,88$	102,1	1,72
	80,0	$79,10 \pm 0,21$	98,9	0,26

Tab. 14: Daten zur Inter-day Richtigkeit und Präzision der verwendeten Methode.

Substanz	Menge [μM]	errechnete Menge [μM]	Richtigkeit [%]	Relative Standardabweichung [%]
(+)-Catechin	33,3	$33,2 \pm 4,65$	99,8	14,01
	26,6	$28,2 \pm 2,38$	105,9	9,28
	20,0	$20,6 \pm 1,72$	102,9	8,37
Kaffeensäure	1,3	$1,39 \pm 0,09$	104,9	6,46
	1,1	$1,15 \pm 0,07$	108,8	6,22
	0,8	$0,86 \pm 0,05$	108,1	5,79
M1	6,6	$6,50 \pm 0,77$	97,7	11,81
	5,3	$5,32 \pm 0,54$	99,8	10,11
	3,9	$4,15 \pm 0,30$	103,9	7,13
Taxifolin	6,6	$6,48 \pm 0,57$	97,2	8,73
	5,3	$5,08 \pm 0,44$	95,4	8,63
	3,9	$3,68 \pm 0,34$	92,2	9,31
Ferulasäure	133,0	$126,55 \pm 6,40$	94,94	5,01
	106,6	$100,21 \pm 6,91$	93,97	6,89
	80,0	$76,60 \pm 3,84$	95,99	5,02

Die Präzision, beurteilt anhand der relativen Standardabweichung, und die Richtigkeit, angegeben als Abweichung zwischen eingesetzter und berechneter Menge, zeigten in keinem Fall eine Abweichung, die größerer als 15 % war [281]. Für Procyanidin B₁ wurde, wegen der nur begrenzt zur Verfügung stehenden Substanzmenge, die Validierung auf die Messung der Linearität beschränkt.

9 Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile des Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen

9.1 HPLC-System

Es wurde das unter 8.1.2 beschriebene HPLC-System verwendet. Die HPLC Bedingungen entsprachen dem unter 8.2.1 beschriebenen Aufbau.

9.2 Lösungen und Reagenzien

Außer den unter 8 angegebenen fanden noch folgende Lösungen und Reagenzien Verwendung:

Erythrozytenkonzentrat (Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Würzburg)

Mononukleäre Zellen, gewonnen aus Filtereinheiten „*Leukoreduction system chambers*“ (Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Würzburg)

Phosphatpuffer (pH 7,4):

KCl	0,20 g
NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaHPO ₄ * 7 H ₂ O	1,44 g
Glucose	1,00 g

0,5 M HCl zum Einstellen auf pH 7,4

Millipore® Wasser ad 1000,0 ml

Das Erythrozytenkonzentrat, die Filtereinheiten und der Phosphatpuffer wurden bis zum Gebrauch unter Kühlung (8 °C) gelagert.

Bicoll-Trennlösung (Polysucrose 400, Amidotrizoesäure, Dichte 1,077 g/ml, isoton) Biochrom

9.3 Geräte

Sicherheitswerkbank (BDK Luft Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl –Gellingen)

Kendro Megafuge 1.0R, Rotor 7570 (Thermo scientific, Dreieich)

Wasserbad GLF 1080

Photometer, Multiscan Ascent (Thermo Electron Computers, Dreieich)

Messwellenlänge: 450 nm

Laminar Air Flow (Fisher, Scientific)

9.4 Aufreinigung der Erythrozyten

Die Erythrozytenkonzentrate waren mit einem komplexen Puffer versetzt, der zur Vermeidung von Störsignalen bei elektrochemischer Detektion entfernt wurde. Hierzu wurden ca. 5 ml des Konzentrats mit dem dreifachen Volumen des vorher bei 8 °C gelagerten PBS-Puffers versetzt und bei 952 g für 5 Minuten (10 °C) zentrifugiert der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit PBS-Puffer versetzt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und das so erhaltene Konzentrat verwendet.

9.5 Isolierung der mononukleären Zellen

Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte aus Filtereinheiten, die bei der Blutspende als Nebenprodukt anfielen. Der Inhalt eines solchen Filters wurde in ein 50 ml Tube überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durchmischt. In zwei anderen 50 ml Tubes wurden jeweils ca. 20 ml Bicol – Lösung vorgelegt und dann vorsichtig mit ca. 30 ml der Zellmischung überschichtet. Die Tubes wurden bei 20 °C für 45 Minuten ohne Bremse bei 604 g zentrifugiert. Hierbei erfolgte eine Anreicherung verschiedener Zellarten in unterschiedlichen Schichten der Lösung. Erythrozyten, Granulozyten und Zellfragmente sanken nach unten. Die mononukleären Zellen, hauptsächlich bestehend

aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten befanden sich zwischen wässriger und Bicolphase. Diese Phase wurde mit einer sterilen Messpipette entnommen, in ein 50 ml Tube überführt und mit 45 ml PBS-Puffer gewaschen. Hierzu wurde bei 353 g für 10 Minuten bei 20 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und durch frischen Puffer ersetzt. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt und das erhaltene Zellpellet für die weiteren Versuche verwendet.

9.6 Durchführung der Verteilungsversuche

9.6.1 Aufarbeitung der Erythrozyten

Zunächst wurde die benötigte Zellmenge bestimmt, um einen Hämatokrit von 0,4 zu erreichen. Dies erfolgte durch Wägung wobei für die Dichte der Zellen ein mittlerer Wert von 1,114 g/ml angenommen wurde [282]. Um den gewünschten Zellanteil zu erhalten wurden demnach 1,67 g Erythrozytenkonzentrat in ein 15 ml Tube eingewogen und 2,0 ml Plasma zugegeben, das die Monomere (+)-Catechin, Kaffeesäure, M1 δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton, Taxifolin und Ferulasäure enthielt. (Konzentrationen s. Tab. 10, Experimenteller Teil). Außerdem wurden 3,5 ml Referenzplasma, das die Substanzen in der gleichen Konzentration enthielt wie die Erythrozyten-Plasma Mischung, hergestellt.

Die so erhaltenen Ansätze wurden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Zu den entsprechenden Entnahmezeitpunkten wurden die Gefäße aus dem Wasserbad entfernt. Es wurden 250 μ l Vollblut bzw. Plasma entnommen und bei 952 g und 10 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden 100,0 μ l des Überstandes entnommen in ein 1,5 ml Eppendorf[®]-Tube überführt und 10,0 μ l (IS) p-Cumarsäure (6 μ M), 130 μ l Methanol (HPLC-Grade) und 40 μ l 0,5 M Salzsäure zugesetzt. Nach Zentrifugation bei 14,000 g für 15 Minuten bei 4 °C wurden 20,0 μ l entnommen und in die HPLC injiziert. Es wurden für jeden Zeitpunkt wiederholte Messungen durchgeführt.

9.6.2 Aufarbeitung der mononukleären Zellen

Für die Verteilungsversuche mit PBMCs wurde ebenfalls ein Zellanteil von 40 % verwendet. Um diesen Anteil zu erreichen wurde die erforderliche Zellmenge

abgewogen. Wegen der heterogenen Zusammensetzung der PBMCs war eine für die Berechnung der Masse nötige Dichte nicht eindeutig festzulegen. Es wurde für die Versuche eine Dichte von 1,070 g/ml verwendet, die im Rahmen des Versuchsaufbaus als Durchschnittswert eine hinreichende Genauigkeit bot [283]. Nach der Isolation wurden 1,61 g in ein 15 ml Tube eingewogen und 2,0 ml Plasma zugegeben. Die weitere Durchführung bzw. Aufarbeitung erfolgte analog Abschnitt 9.6.1).

9.7 Bestimmung der Verteilung verschiedener Bestandteile des Kiefernridenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten unter Verapamilzugabe

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in Abschnitt 9.6.1 beschrieben. Abweichend von dortigem Vorgehen wurden 15 Minuten vor Versuchsbeginn bei einem Set der Versuche, bestehend aus einer Zell/Plasmamischung und einem Vergleichsversuch, 400,0 µl Plasma durch eine Verapamil-Stammlösung ersetzt. Diese wurde hergestellt, indem 10 mg Verapamil-Hydrochlorid in 50,0 ml PBS-Puffer, unter Zugabe von 40 µl DMSO zur Lösungsvermittlung, gelöst wurden. Diese Lösung wurde einem Versuch, d.h. einem Ansatz mit Erythrozyten und einem Vergleichsansatz zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 50 µM ergab (Endkonzentration DMSO < 0,01 %). Ein Vergleichsversuch ohne die Zugabe von Verapamil wurde wie unter 9.6.1 beschrieben hergestellt. Allerdings wurden hier bei beiden Ansätzen, d.h. dem Versuch mit Erythrozyten und dem Vergleichsansatz nur aus Plasma bestehend, jeweils 400,0 µl Plasma durch PBS-Puffer ersetzt, um gleiche Bedingungen wie bei dem Ansatz unter Verapamilzugabe zu schaffen. Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 9.6.1 beschrieben.

9.8 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phenylalanin und Tryptophan

Auch hier erfolgte die Durchführung der Versuche wie in Abschnitt 9.6.1 beschrieben. Abweichend von dortiger Durchführung wurden 15 Minuten vor Versuchsbeginn bei

einem Set der Versuche, bestehend aus einer Zell/Plasmamischung und einem Vergleichsversuch, 385 μ l Plasma durch eine Phenylalanin-Stammlösung ersetzt. Diese wurde hergestellt, indem 15 mg Phenylalanin in 10,0 ml PBS-Puffer, unter Zugabe von 10 μ l DMSO zur Lösungsvermittlung, gelöst wurden. Diese Lösung wurde einem Versuch, d.h. einem Ansatz mit Erythrozyten und einem Vergleichsansatz zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 1 mM ergab (Endkonzentration DMSO = 0,01 %). Zur Beurteilung des Einflusses der Substanz auf die Verteilung wurde ein Vergleichsversuch ohne die Zugabe von Phenylalanin, ebenfalls nach Abschnitt 9.6.1 durchgeführt. Allerdings wurden hier bei beiden Ansätzen, d.h. dem Versuch mit Erythrozyten und dem Vergleichsansatz nur aus Plasma bestehend, jeweils 385 μ l Plasma durch PBS-Puffer ersetzt, um gleiche Bedingungen wie bei dem Ansatz unter Phenylalaninzugabe zu schaffen. Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 9.6.1 beschrieben.

Die Durchführung der Verteilungsversuche unter Tryptophaneinfluss erfolgte wie im vorherigen Absatz beschrieben. Die Stammlösung wurde hergestellt, indem 20 mg Tryptophan in 10,0 ml PBS-Puffer gelöst wurden. Wegen der begrenzten Löslichkeit des Tryptophans in Wasser wurden auch bei diesem Ansatz 10 μ l DMSO zugegeben. Das nötige Volumen dieser Stammlösung pro Versuch betrug 355 μ l (Endkonzentration DMSO = 0,01 %).

9.9 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phloretin

Bei diesen Versuchsansätzen wurden 15 Minuten Vorinkubationszeit mit dem potentiellen Hemmstoff gewählt. Der Versuchsaufbau orientierte sich wiederum an den Durchführungen der vorhergehenden Hemmungsversuche. Die Phloretin-Stammlösung wurde durch das Lösen von 20 mg Phloretin in 10,0 ml Puffer hergestellt. Von dieser Lösung wurden 455 µl pro Ansatz, was einer Endkonzentration von 600 µM entspricht, zugesetzt. Es wurden dem PBS-Puffer auch hier 10 µl DMSO zugesetzt, das in den Ansätzen in einer Endkonzentration von 0,01 % vorlag. Die Aufarbeitung und Messung der Proben wurde nach Abschnitt 9.6.1 durchgeführt. Die Herstellung eines Vergleichsversuchs erfolgte wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben.

9.10 Auswertung der Verteilungsversuche

Die Auswertung der Versuche erfolgte in Anlehnung an Yu et al. [144] indem der Verteilungskoeffizient (K) bestimmt wurde. Dieser ist bei den durchgeführten Versuchen definiert als das Verhältnis der Konzentrationen des Analyten (s. Gleichung 18) zwischen Erythrozyten (C_e) und Plasma (C_p).

$$\text{Gleichung 18} \quad K = \frac{C_e}{C_p}$$

K = Verteilungskoeffizient, C_e = Konzentration in Erythrozyten, C_p = Konzentration im Plasma

ausgedrückt als Verhältnis der Massen (s. Gleichung 19) zwischen der Menge Analyt in den Erythrozyten (Q_e) und im Plasma (Q_p) ergibt sich:

$$\text{Gleichung 19} \quad K_q = \frac{Q_e}{Q_p}$$

**K_q = Verteilungskoeffizient (auf die Masse bezogen), Q_e = Menge in Erythrozyten,
 Q_p = Menge im Plasma**

Da die Menge des Analyten definiert ist als Produkt aus der Konzentration C_e bzw. C_p und dem Volumen V_e bzw. V_p lässt sich Gleichung 19 umformen zu:

$$\text{Gleichung 20} \quad K_q = \frac{C_e \cdot V_e}{C_p \cdot V_p}$$

V_e = Volumen der Erythrozyten, V_p = Volumen des Plasmas

Unter der Voraussetzung, dass der Hämatokrit (H) als Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtblutvolumen definiert ist ergibt sich Gleichung 21 aus Gleichung 20:

$$\text{Gleichung 21} \quad K_q = \frac{C_e \cdot H \cdot V_t}{C_p \cdot (1-H) \cdot V_t} = K \cdot \frac{H}{(1-H)}$$

Gleichung 21 lässt sich auch ausdrücken als:

$$\text{Gleichung 22} \quad K_q = \frac{Q_e}{Q_p} = \frac{Q_{\text{ges}} - Q_p}{Q_p} = \frac{C_{rp} \cdot V_t}{C_p \cdot V_{pl}} - 1 = \frac{C_{rp}}{(1-H) \cdot C_p} - 1$$

**Q_{ges} = Gesamtmenge im Blut, C_{rp} = Konzentration im Referenzplasma,
 V_t = Gesamtvolumen, H = Hämatokrit**

Da die Konzentration proportional zum Detektorsignal ist kann Gleichung 22 auch geschrieben werden als:

$$\text{Gleichung 23 } K_q = \frac{S_{\text{ref}}}{(1-H) \cdot S_{\text{pl}}} - 1$$

**S_{ref} = Signal des Referenzplasmas, S_{pl} = Signal im Plasma des Vollblutes,
 H = Hämatokrit**

werden Gleichung 21 und Gleichung 23 kombiniert erhält man

$$\text{Gleichung 24 } K = \frac{1}{H} \cdot \left(\frac{S_{\text{ref}}}{S_{\text{pl}}} - 1 \right) + 1$$

Unter Anwendung von Gleichung 24 konnte der Verteilungskoeffizient der Monomere für die verschiedenen Zeitpunkte berechnet werden. Hierzu wurden die Quotienten aus den Flächenverhältnissen der Substanzen und des internen Standards verwendet.

9.11 Bestimmung des hämolysierten Anteils

Da sich die Versuche über einen längeren Zeitraum erstreckten, wurde zur Abschätzung der Vitalität der Erythrozyten der hämolysierte Anteil durch photometrische Messung des Hämoglobingehalts im Plasma bestimmt [284]. Hierbei diente reines Plasma zur Festlegung Nullwertes und durch Tiefkühlung (-80 °C) hämolysierte Erythrozyten zur Festlegung von vollständiger Hämolyse.

Zu allen Zeitpunkten an denen Proben zur Bestimmung der Verteilung entnommen wurden, wurden ebenfalls 50,0 µl Plasma zur Bestimmung des Hämolyseanteils entnommen. Die Bestimmung erfolgte nach Aufgeben des Plasmas auf eine 96 - well Platte photometrisch mit dem Multiscan Ascent Photometer von Thermo Electron Computers. Die Berechnung der Hämolyse erfolgte nach Gleichung 25. Bei den durchgeführten Versuchen lag die gemessene Hämolyse zu keinem Zeitpunkt über 3 %.

$$\text{Gleichung 25 } H = \left(\frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Referenz}}} \right) \cdot 100$$

A_{Probe} = Absorption der gezogenen Probe, A_{Referenz} = Absorption einer totalhämolysierten Vergleichsprobe, H = hämolysierter Anteil [%]

9.12 Bestimmung der Vitalität der mononukleären Zellen

Während der Inkubationsversuche wurden zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit einer Trypanblau-Lösung (0.18 % (g/ml) in 0.9 % NaCl-Lösung) verdünnt (1:1000). Von dieser Lösung wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl bestimmt. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass ca. 60 Zellen pro Quadrant vorlagen. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte nach Gleichung 26.

$$\text{Gleichung 26} \quad \text{Gesamtzahl der Zellen/ Milliliter} = M * V * 10^7$$

M = Mittelwert der gezählten Zellen aus vier großen Quadranten, V = Volumen, in dem die Zellsuspension vor der Zählung verdünnt wurde

Lebende Zellen nahmen den Farbstoff nicht auf, so dass diese als helle kreisförmige Gebilde zu erkennen waren. In tote Zellen mit poröser Zellwand drang Trypanblau hingegen ein, was an einer Blaufärbung des Zytoplasmas zu erkennen war.

Der Anteil der toten Zellen berechnet sich nach Gleichung 27.

$$\text{Gleichung 27:} \quad \% \text{ tote Zellen} = \frac{\text{gefärbte Zellen}}{(\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})}$$

Der Anteil der nicht vitalen Zellen lag bei beiden Versuchen unter acht Prozent.

9.13 Berechnungen zum Vergleich zwischen Glucose und dem Metaboliten M1

Für die Berechnungen wurde das Programm SYBYL-X[®] (Version 1.0, August 2009) verwendet. Zunächst wurde nach dem Aufbau der Moleküle eine Energiefeldminimierung durchgeführt (Powell-Methode). Die Ladungen und die resultierende Energie wurden mittels MMFF94, unter Berücksichtigung verschiedener Teilenergien (bond stretching-, angle bending-, torsional-, van der Waals-energy) berechnet. Die so energieminierten Moleküle wurden gespeichert und dienten als Grundlage für die Überlagerungsberechnungen. Sie wurden mit dem Tool „Surflex Sim,

mutual alignment“ durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen wurden, nach absteigender Ähnlichkeit (s. Allgemeiner Teil 4.8) ausgegeben. Unter den höchstbewerteten Ergebnissen wurde, nach optischer Auswertung der dargestellten Moleküle, die vielversprechendste Struktur ausgewählt. Die Moleküle wurden in verschiedene Ebenen aufgetrennt und separat gespeichert.

Die Energie dieser Moleküle wurde wie oben beschrieben berechnet. Außerdem wurden die Oberfläche und das Volumen, sowohl der Ausgangssubstanzen als auch der nach den Berechnungen erhaltenen Verbindungen berechnet. Dieses wurde unter zu Hilfenahme der MOLCAP-Methode (fast connoly) durchgeführt.

10 Untersuchungen zu metabolischen Veränderungen von Bestandteilen des Kiefernextraktes und des Metaboliten M1 in Erythrozyten bzw. mononukleären Zellen

10.1 Geräte und Reagenzien

10.1.1 HPLC-MS/MS System

Gerät	Agilent LC-MS 6460 Triplequad
Pumpe	Agilent, 1200 Series Binary pump SL
Detektor	Agilent, 1200 Series Diodenarray-Detektor 61315 C/D
Stationäre Phase	SunFire® C-18, 2,5 µM, 4,6 + 30 mm (Waters)
Injektionsvolumen	1-5 µl
Fluss	0,5 ml/min
Fließmittel	0,1 % Ameisensäure / Acetonitril : Methanol (50:50)

Parameter der massenspektrometrischen Detektion

gas temperature (N ₂)	300 °C
gas flow	11 L/min
nebulizer	45 psi (N ₂)
capillary voltage	3500 V
scan range m/z	100–1000
step size	0,2 Da
dwel time	0,4 ms
ion mode	ESI +/-

Software	Agilent MassHunter Workstation Aquisition Data Aquisition for Triple Quad B 02.01
Vakuum-Konzentrator	concentrator 5301 Eppendorf [®] (Eppendorf)

10.1.2 Reagenzien

PBS-Puffer (pH 7,4) wurde wie unter 9.2 beschrieben hergestellt.

Glutathion und Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18) und alle anderen Chemikalien und Lösungen wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen erhalten. Erythrozyten und mononukleäre Zellen stammten aus der Transfusionsmedizin der Universität Würzburg. Die Aufreinigung der Zellen wurde wie Abschnitt 9.6 beschrieben durchgeführt.

10.2 Inkubation der Erythrozyten und mononukleären Zellen mit Bestandteilen des Kiefernrintenextraktes und dem Metaboliten M1

10.2.1 Durchführung mit mononukleären Zellen

Die nach Durchführung der Isolation nach Abschnitt 9.6 erhaltene Zellschicht (ca. 5 ml) wurde in ein 50 ml Tube überführt und dreimal mit dem fünffachen Volumen PBS gewaschen. Für diese Versuche wurden 2 Zapfen parallel aufgearbeitet und das erhaltene Zellvolumen in acht gleiche Teile getrennt. (+)-Catechin (10 mM), Kaffeesäure (15 mM), Taxifolin (10 mM), Ferulasäure (15 mM), Metabolit M1 (15 mM), Procyanidin B₁ (5 mM), Procyanidin B₂ (5 mM), jeweils gelöst in PBS (pH 7,4) und ein Zellaliquot ohne Substanzzusatz wurden jeweils eine Stunde bei 37 °C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert (Gesamtvolumen pro Ansatz ca. 1 ml). Parallel erfolgte eine Inkubation der Substanzen mit gleichen Konzentrationen in PBS-Puffer (pH 7,4) ohne Zellzugabe.

10.2.2 Durchführung mit Erythrozyten

Die Erythrozytenkonzentrate wurden, wie unter Abschnitt 9.4 beschrieben, aufgearbeitet. Die Zugabe der Substanzen sowie die Inkubationsprozedur entsprach dem Vorgehen für mononukleäre Zellen, wobei hier ein Zellanteil von ca. 40 % pro Reaktionsgefäß gewählt wurde.

Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an Sana et al. [285]. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße nach der Inkubation zwei Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Bei allen weiteren Extraktionsschritten verblieben die Zellen auf Eis. Um eine Lyse hervorzurufen wurden die Zellen mit 150 µl kaltem Millipore®-Wasser versetzt und danach mithilfe von Trockeneis auf -25 °C temperiert. Hierauf erfolgte die Zugabe von 600 µl Methanol (auf ca. -20 °C abgekühlt). Nach dem Vortexen der Proben wurden 450 µl Chloroform zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Währenddessen erfolgte alle 5 Minuten eine Durchmischung des Lysats durch Vortexen. Wieder wurden 150 µl kaltes Millipore®-Wasser zugegeben. Die Proben wurden nun mindestens für 8 Stunden bei -20 °C eingefroren. Der nächste Schritt bestand in einer Trennung der Phasen. Der Inhalt der Reaktionsgefäße bestand aus einer Chloroformschicht, bedeckt von einer wässrigen Schicht, getrennt durch die Interphase, die aus Zellfragmenten bestand. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt. Das Lösungsmittel wurde durch Zentrifugation im Vakuum-Konzentrator (ca. 6 Stunden, 30 °C) entfernt. Der Rückstand wurde in 50 µl Fließmittel aufgenommen. Die Chloroformphase wurde ebenfalls von der Zellschicht getrennt und in Glasoliven überführt. Unter Stickstoffbegasung wurde nun das Lösungsmittel entfernt. Der hierbei verbliebene Rückstand wurde ebenfalls in 50 µl Fließmittel aufgenommen. Sowohl von dem in Fließmittel aufgenommenen organischen als auch von dem wässrigen Rückstand des Extraktes wurden jeweils 5 µl injiziert.

10.3 Screening der Zellinkubationen auf Metabolite

Von Erythrozyten und PBMCs lagen jeweils ein wässriger und ein organischer Extrakt vor. Diese wurden sowohl im positiven als auch im negativen Modus vermessen. Desweiteren lagen parallel in Puffer aufgearbeitete Proben vor, die auch wie oben

beschrieben, in den verschiedenen Messmodi untersucht wurden. Um eine große Bandbreite möglicher Metabolite erfassen zu können, wurde eine Gradientenmethode entwickelt, die über einen Zeitraum von 50 Minuten von einem stark polaren in ein unpolares Fließmittel überging (s. Tab. 15).

Tab. 15: Gradientenparameter des HPLC-Systems.

**Komponente A = 0,1 % Ameisensäure; Komponente B =
Methanol : Acetonitril (50:50)**

Zeitpunkt nach Probeninjektion [Min]	Fluss (ml/min)	Komponente A [%]	Komponente B [%]
0	0,5	95	5
40	0,5	10	90
50	0,5	0	100
60	1,0	0	100

10.4 Darstellung eines Addukts zwischen Glutathion und δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton

Um einen Vergleich für die aus Erythrozyten isolierte Verbindung zur Verfügung zu haben, wurde ein Addukt zwischen dem Metaboliten M1 und Glutathion durch enzymatische Kopplung hergestellt. Hierzu wurden Glutathion (10 μ M), M1 (12 μ M) und 1 Unit Glutathion-S-Transferase in 1ml Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und 30 Minuten bei 25 °C in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß inkubiert.

Die so erhaltene Verbindung wurde als Vergleich zu den Inkubationslösungen verwendet.

10.5 Massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifizierung eines Glutathion - δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton- Addukts

Um die Verbindungen, die durch Enzyminkubation gewonnen wurden, mit der vermutlichen Glutathion-Verbindung aus dem Erythrozytenlysat vergleichen zu können, wurde von beiden Substanzen ein MS/MS-Spektrum aufgezeichnet. Es wurden die

Geräteeinstellungen wie oben beschrieben verwendet. Abweichend erfolgte eine Verkleinerung der scan range auf den Massenladungsverhältnissbereich 80 – 520. Die Kollisionsspannung betrug 15 bzw. 20 eV. Als Selektionsmassenverhältnis für das Mutterion wurde 514 m/z festgelegt.

11 Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran mittels eines AAPH-Assays

11.1 Reagenzien

AAPH (2,2'-azobis(2-aminopropan)) wurde von Sigma-Aldrich erworben. Die Herkunft aller weiteren verwendeten Chemikalien entspricht derjenigen aus den vorherigen Kapiteln.

Lösungen

Spül- bzw. Inkubationspuffer

Für 1000,0 ml Puffer wurden vorgelegt:

NaCl	150 mM
Na ₂ HPO ₄ Monohydrat	8,1 mM
NaH ₂ PO ₄	1,9 mM
Glucose Monohydrat	0,05 % (m/V)

Die Substanzen wurden in ca. 900 ml Millipore®-Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,5 M Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt. Nach Auffüllen auf 1000,0 ml mit Millipore®-Wasser wurde der Puffer bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei ca. 8 °C gelagert.

AAPH-Lösung

2,2'-Azobis(2-aminopropan) wurde in Inkubationspuffer zu einer Konzentration von 400 mM gelöst. Die Lösung musste bis zum Gebrauch in einem verschlossenen Gefäß auf Eis gelagert werden.

11.2 Verwendete Geräte und Materialien

Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden, wie bei den vorherigen Versuchen, von der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg erhalten. Es wurden keine Zellen, die bereits länger als zwei Wochen über das angegebene Verfallsdatum hinaus gelagert wurden, verwendet.

Versuchsgeräte

UV-Spektrometer uv-mini 1240 (Shimadzu, Duisburg)

Halbmikroküvetten (Plastik) (Sarstedt AG & Co. Laborbedarf, Nümbrecht)

11.3 Vorbereitung der Erythrozyten

Es wurden ca. 3 ml des Erythrozytenkonzentrats mit 10 ml des Puffers in einem 15 ml Tube gemischt. Diese Suspension wurde bei 10 °C für 10 Minuten bei 604 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden wieder 10 ml Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde der Puffer soweit wie möglich entfernt und die verbliebenen Zellen für die Versuche genutzt. Hierzu wurde eine 10 % ige (V/V) Suspension in PBS-Puffer hergestellt.

11.4 Herstellung der Untersuchungslösungen und Messung der Proben

Die zu untersuchenden Substanzen wurden mit der 1,25 fachen Endkonzentration in 12,0 ml PBS in einem 50 ml Tube gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1,5 ml der zehnpromzentigen Zellsuspension gegeben (Endkonzentration 1 %). Unter leichtem Schütteln (60 Rotationen/min) wurde dieser Ansatz 10 Minuten bei 37 C im Wasserbad inkubiert.

Hierauf wurden 1,5 ml AAPH-Lösung zugegeben. Der Zeitpunkt der Zugabe entsprach dem Nullwert d.h. direkt nach Zumischung wurde das erste Aliquot entnommen. Hierzu wurden 800 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses für 2 Minuten bei 4 °C bei 10,000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Halbmikroküvette überführt und die Absorption bei 524 nm gemessen.

Während der Inkubationsphasen im Wasserbad wurden die 50 ml Tubes mittels Schraubdeckel fest verschlossen. Mussten Proben entnommen werden, so wurden zunächst alle Gefäße gleichzeitig geöffnet und dann parallel nach Probennahme wieder geschlossen, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, die für die Bildung der Peroxylradikale nötig war.

11.5 Durchführung der Versuche mit Vorinkubation und Austausch des Probenpuffers

Bei einigen Versuchen wurde eine Vorinkubation der Substanzen mit den Erythrozyten durchgeführt. Hierzu wurde die Substanz zunächst mit dem 2,5 fachen der Endkonzentration in 24,0 ml Probenpuffer in einem 50 ml Tube gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 3,0 ml der zehnpromzentigen Zellsuspension. Diese Mischung wurde nun 60 Minuten unter Schütteln (60 Rotationen/min) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 604 g und 10 °C wurde der wässrige Überstand abgenommen. Diese vorbehandelten Zellen wurden nun verwendet um wieder eine zehnpromzentige Zellsuspension in PBS-Puffer herzustellen. Diese wurde dann wie unter Abschnitt 11.4) für die Versuche eingesetzt.

11.6 Durchführung der Versuche mit Vorinkubation ohne Austausch des Probenpuffers

Bei dieser Variante des Versuchsaufbaus wurde die zu untersuchende Substanz mit der 1,25 fachen Endkonzentration in 12,0 ml Probenpuffer in einem 50 ml Tube gelöst. Nach der Zugabe der zehnpromzentigen Zellsuspension erfolgte über einen Zeitraum von 60 Minuten eine Inkubation der Probe bei 37 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln (60

Rotationen/min). Die Messung der oxidativen Schädigung begann nach Zugabe von 1,5 ml der AAPH-Lösung.

11.7 Durchführung der Versuche unter Zugabe von Verapamil oder Indometacin

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie unter 11.4 beschrieben. Allerdings wurde zehn Minuten vor der Zugabe des Metaboliten M1 entweder Verapamil oder Indometacin, gelöst in Probenpuffer, in einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt.

11.8 Auswertung der Versuche

Zur Auswertung der Versuche wurde der hämolysierte Zellanteil mithilfe einer komplett hämolysierten Vergleichsprobe berechnet (s. Gleichung 28). Die Vergleichsprobe wurde hergestellt indem 10 µl des gewaschenen Erythrozytenkonzentrats mit 990 µl Millipore®-Wasser gemischt wurden. Die Probe wurde eingefroren und nach dem Auftauen vermessen.

$$\text{Gleichung 28: prozentuale Hämolyse [\%]} = \frac{\text{Absorption des Zellüberstands}}{\text{Absorption der Totalhämolyse}} * 100$$

Die Berechnung der prozentualen Hämolyse erfolgte mit Microsoft Excel® 2003 und die sich aus diesen Werten ergebenden Graphiken wurden mit Graph Pad Prism Version 4.0 erstellt. Die Berechnungen der Zeitverschiebungen der Hämolyse erfolgten ebenfalls mittels Graph Pad Prism Version 4.0. Hierzu wurden die erhaltenen Graphen in die logarithmische Form überführt und unter Zuhilfenahme der „IC₅₀“ die Zeitpunkte ermittelt an denen die Hämolyse zu 50 % abgelaufen war. Der Vergleich dieser Werte mit einer unbehandelten Probe lieferte die dargestellten Zeitdifferenzen.

TABELLARISCHER ANHANG

12 Bestimmung der Plasmaproteinbindung verschiedener Bestandteile eines Kiefernrendenextraktes und zweier Metabolite

12.1 Affinitätschromatographische Methode

12.1.1 Retentionszeiten der Kalibriersubstanzen

Paracetamol	Salicylsäure	Triamteren	Atenolol	Salicylamid	Allopurinol	Totzeit	Sotalol
1,139	9,398	2,812	1,258	1,804	1,005	0,771	1,321
1,151	9,423	2,819	1,260	1,806	1,006	0,772	1,322
1,140	9,439	2,818	1,257	1,818	1,006	0,772	1,320
1,139	9,339	2,818	1,256	1,839	1,006	0,771	1,320
1,139	9,322	2,795	1,256	1,804	1,009	0,770	1,320

12.1.2 Berechnete k'-Werte

	Paracetamol	Salicylsäure	Triamteren	Atenolol	Salicylamid	Allopurinol	Totzeit	Sotalol
k' (N = 5)	-0,138	6,114	1,129	-0,048	0,366	-0,239	-/-	0
	-0,129	6,133	1,134	-0,046	0,367	-0,238	-/-	0,001
	-0,137	6,145	1,133	-0,048	0,376	-0,238	-/-	-0,001
	-0,138	6,070	1,133	-0,049	0,392	-0,238	-/-	-0,001
	-0,138	6,075	1,116	-0,049	0,366	-0,236	-/-	-0,001
Mittelwert	-0,136	6,116	1,129	-0,048	0,375	-0,238	-/-	0
SD [+/-]	0,004	0,029	0,008	0,001	0,012	0,001	-/-	0,001

12.1.3 Berechnete P-Werte

	Paracetamol	Salicylsäure	Triamteren	Atenolol	Salicylamid	Allopurinol	Totzeit	Sotalol
k'/(k+1)	-16,0	85,9	53,0	-5,0	26,8	-31,4	-/-	0
	-14,8	86,0	53,1	-4,8	26,9	-31,3	-/-	0,1
	-15,9	86,0	53,1	-5,1	27,3	-31,3	-/-	-0,1
	-16,0	85,9	53,1	-5,2	28,2	-31,3	-/-	-0,1
	-16,0	85,8	52,7	-5,2	26,8	-30,9	-/-	-0,1
Mittelwert	-15,7	85,9	53,0	-5,1	27,3	-31,3	-/-	0
SD [+/-]	0,5	0,1	0,2	0,1	0,6	0,2	-/-	0,1

12.1.4 Retentionszeiten der untersuchten Substanzen

Substanz	Retentionszeit				
Metabolit M1	1,543	1,551	1,550	1,569	1,612
Metabolit M2	1,400	1,401	1,400	1,401	1,400
Kaffeesäure	2,717	2,716	2,728	2,735	2,747
Ferulasäure	3,336	3,326	3,312	3,313	3,324
3,4-Dihydroxybenzoesäure	1,309	1,310	1,309	1,307	1,307
p-Cumarsäure	3,377	2,533	2,543	2,560	2,601
Gallussäure	1,499	1,485	1,488	1,498	1,513
p-Hydroxybenzoesäure	2,152	1,507	1,465	1,461	1,456
Vanillinsäure	2,215	2,300	2,174	2,183	2,193
Procyanidin B ₁	6,605	7,019	7,348	7,023	7,744

12.1.5 Berechnete k'-Werte der Substanzen

Substanz	k'-Wert					Mittelwert	SD [+/-]
Metabolit M1	0,168	0,174	0,173	0,188	0,220	0,185	0,021
Metabolit M2	0,060	0,061	0,060	0,061	0,060	0,060	0
Kaffeensäure	1,057	1,056	1,065	1,070	1,079	1,066	0,010
Ferulasäure	1,525	1,518	1,507	1,508	1,516	1,515	0,008
3,4-Dihydroxybenzoesäure	-0,009	-0,008	-0,009	-0,011	-0,011	-0,010	0,001
p-Cumarsäure	1,556	0,917	0,925	0,938	0,969	1,061	0,278
Gallussäure	0,135	0,124	0,126	0,134	0,145	0,133	0,008
p-Hydroxybenzoesäure	0,629	0,141	0,109	0,106	0,102	0,217	0,231
Vanillinsäure	0,677	0,741	0,646	0,653	0,660	0,675	0,039
Procyanidin B ₁	4,000	4,313	4,562	4,316	4,862	4,411	0,322

12.1.6 Graphisch ermittelte Bindungswerte der Substanzen

Substanz	Proteinbindung					Mittelwert	SD [+/-]
Metabolit M1	33,9	34,3	34,3	35,2	37,1	34,9	1,3
Metabolit M2	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4	26,4	0
Kaffeensäure	65,8	65,8	66,0	66,1	66,3	66,0	0,2
Ferulasäure	73,6	73,5	73,4	73,4	73,5	73,5	0,1
3,4-Dihydroxybenzoesäure	20,7	20,8	20,7	20,6	20,6	20,7	0,1
p-Cumarsäure	74,0	62,8	63,0	63,3	64,0	65,4	4,8
Gallussäure	31,8	31,0	31,2	31,7	32,5	31,6	0,6
p-Hydroxybenzoesäure	54,8	32,2	30	29,8	29,5	35,3	10,9
Vanillinsäure	56,3	58,2	55,4	55,6	55,8	56,3	1,2
Procyanidin B ₁	80,0	81,2	82,0	81,2	82,9	81,5	1,1

12.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration

12.2.1 Unspezifische Bindung der Substanzen

Substanz	unspezifische Bindung			Mittelwert	SD [±]
(+)-Catechin	0,47	0,58	0,32	0,46	0,09
Kaffeesäure	0,32	0,44	0,13	0,30	0,11
Metabolit M1	0,29	0,31	0,17	0,26	0,06
Taxifolin	0,18	0,21	0,04	0,12	0,10
Ferulasäure	0,42	0,59	0,35	0,45	0,09
Procyanidin B ₁	0,04	0,05	0,16	0,08	0,05

12.2.2 Plasmaproteinbindung bestimmt mittels Ultrafiltration

Substanz	Proteinbindung					Mittelwert	SD [±]
(+)-Catechin	97,1	96,9	96,8	93,7	95,0	95,9	1,5
Kaffeesäure	81,1	81,2	80,4	76,6	76,2	79,1	2,5
Metabolit M1	80,7	74,3	49,8	56,9	32,5	58,8	19,4
Taxifolin	94,8	95,1	96,0	97,1	94,1	95,4	1,1
Ferulasäure	81,8	78,3	83,0	73,5	75,5	78,4	4,0
Procyanidin B ₁	32,4	41,4	35,2	35,2	32,4	35,3	3,7

13 Bestimmung der Verteilung verschiedener monomerer Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Blutzellen

13.1 Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und mononukleären Zellen

13.1.1 Versuch 1

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [±]
5	(+)-Catechin	1,39	1,40	1,47	1,42	0,04
	Kaffeensäure	1,64	1,67	1,68	1,66	0,02
	Metabolit M1	0,09	0,05	0,20	0,12	0,08
	Taxifolin	0,88	0,48	0,95	0,77	0,25
	Ferulasäure	0,41	0,39	0,43	0,41	0,02
25	(+)-Catechin	2,38	2,58	2,4	2,45	0,11
	Kaffeensäure	3,24	3,77	3,4	3,47	0,27
	Metabolit M1	1,32	0,96	1,10	1,13	0,18
	Taxifolin	2,39	1,95	4,45	2,93	1,33
	Ferulasäure	2,23	2,25	2,52	2,33	0,16
45	(+)-Catechin	4,82	4,77	4,64	4,74	0,09
	Kaffeensäure	5,69	6,24	5,63	5,85	0,34
	Metabolit M1	3,97	3,69	3,93	3,87	0,15
	Taxifolin	3,87	3,50	6,82	4,73	1,82
	Ferulasäure	4,61	4,43	4,52	4,52	0,09
90	(+)-Catechin	2,46	2,71	2,61	2,59	0,13
	Kaffeensäure	2,94	3,43	3,00	3,13	0,27
	Metabolit M1	1,96	2,48	3,33	2,59	0,69
	Taxifolin	4,19	6,59	4,11	4,96	1,41
	Ferulasäure	1,85	1,81	1,76	1,81	0,05
150	(+)-Catechin	4,80	4,66	4,39	4,62	0,21
	Kaffeensäure	5,39	5,13	4,34	4,96	0,55
	Metabolit M1	5,10	5,45	7,27	5,94	1,17
	Taxifolin	12,06	12,59	14,24	12,96	1,14
	Ferulasäure	2,48	2,48	2,62	2,53	0,08

SD Standardabweichung

13.1.2 Versuch 2

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [+/-]
10	(+)-Catechin	3,91	1,45	1,65	2,34	1,37
	Kaffeensäure	5,58	6,03	6,34	5,98	0,38
	Metabolit M1	13,41	16,74	16,22	15,46	1,79
	Taxifolin	5,84	5,19	6,78	5,94	0,79
	Ferulasäure	1,64	6,63	6,61	4,96	2,88
30	(+)-Catechin	5,36	5,3	6,66	5,77	0,77
	Kaffeensäure	6,06	5,96	6,6	6,21	0,34
	Metabolit M1	26,01	35,02	20,4	27,14	7,38
	Taxifolin	9,5	10,56	10,06	10,04	0,53
	Ferulasäure	6,88	6,88	6,91	6,89	0,02
60	(+)-Catechin	5,35	5,59	6,55	5,83	0,64
	Kaffeensäure	6,49	6,29	6,76	6,51	0,23
	Metabolit M1	47,18	56,85	21,74	41,92	18,14
	Taxifolin	16,88	15,7	17,6	16,72	0,96
	Ferulasäure	6,94	6,93	6,92	6,93	0,01
120	(+)-Catechin	5,35	6,66	6,81	6,27	0,8
	Kaffeensäure	22,59	22,11	21,61	22,1	0,49
	Metabolit M1	91,74	62,66	59,73	71,38	17,69
	Taxifolin	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Ferulasäure	10,04	10,11	9,98	10,04	0,07
180	(+)-Catechin	7,94	7,79	8,49	8,07	0,34
	Kaffeensäure	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Metabolit M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Taxifolin	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Ferulasäure	10,99	10,74	11,04	10,92	0,16

SD Standardabweichung

13.2 Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten

Zur Veranschaulichung wird die Vorgehensweise bei der Berechnung der Verteilungskoeffizienten an nachfolgendem Versuch gezeigt. Zunächst wurden die Flächenverhältnisse zwischen untersuchten Substanzen und internem Standard berechnet.

13.2.1 Versuch 1

Zeit (Min)	Substanz	Flächenverhältnis				
20	Catechin	1,7904	1,7226	1,9381	1,8733	1,8129
	Kaffeesäure	0,4736	0,4458	0,4910	0,4852	0,4793
	Metabolit M1	0,3886	0,3946	0,4070	0,3895	0,4044
	Taxifolin	0,3665	0,4290	0,3703	0,4934	0,3316
	Ferulasäure	0,5588	0,5498	0,6325	0,6251	0,6183
60	Catechin	0,9715	1,1535	1,6153	1,0426	1,6676
	Kaffeesäure	0,2457	0,2875	0,3748	0,2687	0,4132
	Metabolit M1	0,2640	0,4198	0,5845	0,3618	0,6721
	Taxifolin	0,2910	0,2941	0,4147	0,2654	0,3904
	Ferulasäure	0,4349	0,4440	0,6474	0,4392	0,7194
120	Catechin	3,5916	3,0472	3,0236	3,0566	2,9226
	Kaffeesäure	0,5951	0,5369	0,5731	0,5338	0,5080
	Metabolit M1	0,0493	0,0529	0,0776	0,0491	0,0492
	Taxifolin	0,9342	0,8204	0,5152	0,8771	0,8739
	Ferulasäure	0,8036	0,8171	0,8173	0,8089	0,8358
350	Catechin	2,5546	2,3990	2,3801	2,2655	2,3071
	Kaffeesäure	0,5558	0,4683	0,5910	0,4375	0,5973
	Metabolit M1	0,0348	0,0429	0,0783	0,0480	0,0518
	Taxifolin	0,3209	0,4667	0,5033	0,5670	0,4376
	Ferulasäure	0,7572	0,7830	0,7865	0,7027	0,7449
Referenz	Catechin	1,9839	2,2176	2,2472	1,7778	1,6158
	Kaffeesäure	0,5716	0,6659	0,6620	0,5476	0,4814
	Metabolit M1	0,7291	0,7557	0,8236	0,7539	0,6692
	Taxifolin	0,8131	0,8913	0,9642	0,7565	0,6594
	Ferulasäure	0,6430	0,7748	0,7833	0,6535	0,5712

SD Standardabweichung

Unter Verwendung von Gleichung 24 wurden ausgehend von obigen Flächenverhältnissen unter Annahme eines Hämatokrits von 0,4 die Verteilungskoeffizienten, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind, berechnet.

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient					Mittelwert	SD [+/-]
20	(+)-Catechin	1,27	1,72	1,40	0,87	0,73	1,20	0,40
	Kaffeensäure	1,52	2,23	1,87	1,32	1,01	1,59	0,48
	Metabolit M1	3,19	3,29	3,56	3,34	2,64	3,20	0,34
	Taxifolin	4,05	3,69	5,01	2,33	3,47	3,71	0,97
	Ferulasäure	1,38	2,02	1,60	1,11	0,81	1,38	0,46
60	(+)-Catechin	3,61	3,31	1,98	2,76	0,92	2,51	1,08
	Kaffeensäure	4,32	4,29	2,92	3,6	1,41	3,31	1,20
	Metabolit M1	5,4	3,00	2,02	3,71	0,99	3,03	1,68
	Taxifolin	5,49	6,08	4,31	5,63	2,72	4,84	1,35
	Ferulasäure	2,20	2,86	1,53	2,22	0,48	1,86	0,90
120	(+)-Catechin	-0,12	0,32	0,36	-0,05	-0,12	0,08	0,24
	Kaffeensäure	0,90	1,60	1,39	1,06	0,87	1,16	0,32
	Metabolit M1	35,48	34,19	25,04	36,92	32,53	32,83	4,65
	Taxifolin	0,68	1,22	3,18	0,66	0,39	1,22	1,13
	Ferulasäure	0,5	0,87	0,9	0,52	0,21	0,60	0,29
350	(+)-Catechin	0,44	0,81	0,86	0,46	0,25	0,57	0,26
	Kaffeensäure	1,07	2,05	1,30	1,63	0,52	1,31	0,58
	Metabolit M1	50,91	42,51	24,81	37,78	30,81	37,36	10,13
	Taxifolin	4,83	3,27	3,29	1,84	2,27	3,10	1,16
	Ferulasäure	0,62	0,97	0,99	0,82	0,42	0,77	0,24

SD Standardabweichung

13.2.2 Versuch 2

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient					Mittelwert	SD [+/-]
5	(+)-Catechin	4,86	1,82	1,24	1,31	1,86	2,22	1,50
	Kaffeensäure	-1,49	3,56	-1,48	4,41	0,79	1,16	2,76
	Metabolit M1	10,50	33,46	48,77	5,07	1,59	19,88	20,38
	Taxifolin	0,59	2,28	1,98	2,18	0,65	1,53	0,84
	Ferulasäure	-0,54	0,89	0,33	1,43	0,08	0,44	0,75
15	(+)-Catechin	-1,41	-1,32	2,74	0,70	1,56	0,45	1,81
	Kaffeensäure	15,33	2,05	3,66	3,77	2,63	5,49	5,55
	Metabolit M1	4,98	0,12	5,69	16,79	14,20	8,36	6,92
	Taxifolin	4,97	2,06	2,05	1,90	1,66	2,53	1,37
	Ferulasäure	5,23	0,96	1,08	-0,36	0,48	1,48	2,17
45	(+)-Catechin	1,51	2,48	1,64	2,23	1,51	1,87	0,45
	Kaffeensäure	8,07	1,62	6,83	6,15	3,63	5,26	2,60
	Metabolit M1	5,68	4,98	39,66	40,38	23,39	22,82	17,35
	Taxifolin	3,19	1,05	3,18	3,21	2,14	2,55	0,96
	Ferulasäure	4,63	0,59	0,07	0,34	0,90	1,31	1,89
180	(+)-Catechin	1,31	1,68	1,05	2,10	2,60	1,75	0,62
	Kaffeensäure	2,35	2,11	1,12	5,03	6,54	3,43	2,26
	Metabolit M1	37,65	14,36	8,69	120,91	34,37	43,20	45,20
	Taxifolin	1,43	1,25	0,73	2,83	3,90	2,03	1,30
	Ferulasäure	0,73	0,93	0,47	1,04	1,53	0,94	0,39
280	(+)-Catechin	1,54	1,49	1,20	2,72	9,56	3,30	3,55
	Kaffeensäure	1,40	2,23	3,64	5,51	7,23	4,00	2,39
	Metabolit M1	18,81	30,27	36,03	84,29	185,35	70,95	68,66
	Taxifolin	0,83	1,67	2,18	3,51	5,77	2,79	1,93
	Ferulasäure	0,38	0,67	0,47	1,04	0,66	0,64	0,26

13.2.3 Vergleich zwischen (+)-Catechin und Metabolit M1

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [±]
5	(+)-Catechin	4,00	4,33	5,47	4,60	0,77
	Metabolit M1	1,37	1,31	2,05	1,58	0,41
15	(+)-Catechin	2,74	3,42	3,97	3,38	0,62
	Metabolit M1	0,67	0,82	1,89	1,12	0,67
45	(+)-Catechin	2,73	2,70	3,81	3,08	0,63
	Metabolit M1	0,41	0,62	1,17	0,73	0,39
180	(+)-Catechin	1,87	3,10	3,10	2,69	0,71
	Metabolit M1	0,33	0,67	0,84	0,62	0,26
280	(+)-Catechin	1,61	3,69	2,66	2,65	1,04
	Metabolit M1	0,15	0,42	0,64	0,40	0,26

SD Standardabweichung

13.3 Verteilung verschiedener Monomere eines Kiefernrintenextraktes und des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten unter Verapamilzugabe

13.3.1 Versuch 1 (unter Verapamilzugabe)

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [+/-]
5	(+)-Catechin	2,65	2,58	3,27	2,83	0,38
	Kaffeesäure	0,18	0,13	0,37	0,23	0,13
	Metabolit M1	5,83	5,68	6,73	6,08	0,57
	Taxifolin	5,40	5,42	6,32	5,72	0,53
	Ferulasäure	6,70	6,43	7,38	6,84	0,53
15	(+)-Catechin	3,40	3,49	3,51	3,47	0,06
	Kaffeesäure	0,55	0,54	0,41	0,50	0,08
	Metabolit M1	7,08	7,24	7,17	7,16	0,08
	Taxifolin	11,56	10,36	7,82	9,91	1,91
	Ferulasäure	6,71	6,73	6,75	6,73	0,02
45	(+)-Catechin	5,25	4,98	5,31	5,18	0,18
	Kaffeesäure	1,21	1,31	1,35	1,29	0,07
	Metabolit M1	10,88	11,26	11,56	11,23	0,34
	Taxifolin	11,30	11,51	11,74	11,52	0,22
	Ferulasäure	10,33	10,54	10,55	10,47	0,12
180	(+)-Catechin	3,05	5,08	5,24	4,46	1,22
	Kaffeesäure	0,31	1,23	1,16	0,9	0,51
	Metabolit M1	6,28	9,79	9,77	8,61	2,02
	Taxifolin	7,31	12,48	11,44	10,41	2,73
	Ferulasäure	4,12	6,51	6,59	5,74	1,40
280	(+)-Catechin	8,34	8,32	8,49	8,38	0,09
	Kaffeesäure	1,33	1,38	1,57	1,43	0,13
	Metabolit M1	7,64	7,51	7,80	7,65	0,15
	Taxifolin	9,27	9,40	11,03	9,90	0,98
	Ferulasäure	7,08	7,04	7,23	7,11	0,10

Versuch 1 (ohne Verapamilzugabe)

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [+/-]
5	(+)-Catechin	2,00	2,27	2,71	2,33	0,36
	Kaffeensäure	-0,20	-0,14	0,04	-0,10	0,12
	Metabolit M1	5,01	5,69	6,85	5,85	0,93
	Taxifolin	5,19	5,99	6,27	5,82	0,56
	Ferulasäure	5,44	5,57	5,68	5,56	0,12
15	(+)-Catechin	2,80	3,15	3,15	3,03	0,20
	Kaffeensäure	0,10	0,23	0,25	0,19	0,08
	Metabolit M1	6,56	7,07	7,07	6,90	0,29
	Taxifolin	8,01	10,77	11,26	10,01	1,75
	Ferulasäure	6,04	6,34	6,34	6,24	0,17
45	(+)-Catechin	2,20	2,60	2,84	2,55	0,32
	Kaffeensäure	0,07	0,18	0,26	0,17	0,10
	Metabolit M1	6,09	6,86	7,25	6,73	0,59
	Taxifolin	7,48	7,76	8,50	7,91	0,53
	Ferulasäure	6,58	7,10	7,32	7,00	0,38
180	(+)-Catechin	10,82	13,52	13,79	12,71	1,64
	Kaffeensäure	2,80	3,47	3,43	3,23	0,38
	Metabolit M1	16,79	20,17	20,41	19,12	2,02
	Taxifolin	22,78	21,04	21,74	21,85	0,88
	Ferulasäure	10,23	12,81	12,78	11,94	1,48
280	(+)-Catechin	5,07	6,46	8,27	6,60	1,60
	Kaffeensäure	0,38	0,74	1,07	0,73	0,35
	Metabolit M1	6,97	9,27	11,71	9,32	2,37
	Taxifolin	5,72	8,78	9,95	8,15	2,18
	Ferulasäure	6,46	3,26	6,58	5,43	1,88

SD Standardabweichung

13.3.2 Versuch 2 (unter Verapamilzugabe)

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [±]
5	(+)-Catechin	4,71	3,71	3,47	3,96	0,66
	Kaffeensäure	0,90	0,49	0,43	0,61	0,26
	Metabolit M1	4,31	3,41	3,20	3,64	0,59
	Taxifolin	4,10	3,31	3,37	3,59	0,44
	Ferulasäure	4,45	3,44	3,33	3,74	0,62
15	(+)-Catechin	1,64	2,54	2,71	2,30	0,85
	Kaffeensäure	-0,23	0,16	0,20	0,04	0,24
	Metabolit M1	1,55	2,46	2,53	2,18	0,55
	Taxifolin	1,27	2,21	3,36	2,28	1,05
	Ferulasäure	1,70	2,55	2,55	2,27	0,49
45	(+)-Catechin	1,86	1,74	1,91	1,84	0,09
	Kaffeensäure	0,12	0,02	0,07	0,07	0,05
	Metabolit M1	1,94	1,73	1,93	1,87	0,12
	Taxifolin	1,34	1,29	1,78	1,47	0,27
	Ferulasäure	3,06	2,56	2,39	2,67	0,35
180	(+)-Catechin	1,33	2,40	1,59	1,77	0,56
	Kaffeensäure	-0,23	0,41	-0,17	0,00	0,35
	Metabolit M1	0,83	1,73	1,05	1,20	0,47
	Taxifolin	0,78	2,50	1,44	1,57	0,87
	Ferulasäure	0,54	1,26	0,58	0,79	0,40
280	(+)-Catechin	6,24	6,13	6,5	6,29	0,19
	Kaffeensäure	2,01	1,91	1,94	1,96	0,05
	Metabolit M1	5,23	4,97	5,43	5,21	0,23
	Taxifolin	4,44	5,28	8,40	6,04	2,09
	Ferulasäure	3,24	3,16	3,28	3,23	0,06

SD Standardabweichung

Versuch 2 (ohne Verapamilzugabe)

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [+/-]
5	(+)-Catechin	2,19	1,78	2,61	2,20	0,42
	Kaffeensäure	0,81	0,55	0,50	0,62	0,17
	Metabolit M1	1,99	1,61	1,62	1,74	0,22
	Taxifolin	1,62	1,12	2,34	1,69	0,61
	Ferulasäure	2,45	1,94	1,87	2,09	0,32
15	(+)-Catechin	2,73	2,89	2,87	2,83	0,09
	Kaffeensäure	1,01	1,13	1,14	1,10	0,07
	Metabolit M1	2,42	2,58	2,61	2,54	0,10
	Taxifolin	1,74	2,87	2,63	2,41	0,60
	Ferulasäure	2,46	2,58	2,51	2,52	0,06
45	(+)-Catechin	1,62	1,46	1,33	1,47	0,15
	Kaffeensäure	0,48	0,45	0,40	0,44	0,04
	Metabolit M1	1,47	1,37	1,34	1,39	0,07
	Taxifolin	1,35	1,41	1,62	1,46	0,14
	Ferulasäure	1,12	1,06	0,96	1,05	0,08
180	(+)-Catechin	1,48	2,14	2,21	1,94	0,40
	Kaffeensäure	0,71	0,99	1,05	0,92	0,18
	Metabolit M1	1,42	1,68	1,85	1,65	0,22
	Taxifolin	0,86	1,40	1,78	1,35	0,46
	Ferulasäure	1,45	1,72	1,61	1,60	0,14
280	(+)-Catechin	7,21	5,82	7,45	6,83	0,88
	Kaffeensäure	3,35	2,84	3,43	3,21	0,32
	Metabolit M1	6,17	5,05	5,90	5,71	0,58
	Taxifolin	4,96	8,06	4,65	5,89	1,89
	Ferulasäure	3,99	3,12	4,22	3,77	0,58

SD Standardabweichung

13.4 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Tryptophan

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient			Mittelwert	SD [+/-]
1	Metabolit M1	2,45	5,15	5,15	4,25	1,56
	M1 + Tryptophan	1,23	6,85	-0,67	2,47	3,91
3	Metabolit M1	0,38	4,62	4,62	3,2	2,45
	M1 + Tryptophan	1,45	9,45	2,79	4,57	4,28
5	Metabolit M1	1,19	3,65	1,18	2,01	1,42
	M1 + Tryptophan	4,84	7,16	8,28	6,76	1,75
15	Metabolit M1	0,39	0,26	0,74	0,46	0,25
	M1 + Tryptophan	3,12	3,42	0,70	2,41	1,49
30	Metabolit M1	1,18	2,58	0,42	1,39	1,10
	M1 + Tryptophan	0,12	3,69	21,07	8,29	11,21

SD Standardabweichung

13.5 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phenylalanin

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient					Mittelwert	SD [+/-]
1	Metabolit M1	5,77	0,93	0,21	-1,69	-0,63	0,92	2,88
	M1 + Phenylalanin	8,34	5,82	-0,16	3,59	-0,89	3,34	3,92
3	Metabolit M1	2,46	-0,22	0,76	-0,22	0,78	0,71	1,10
	M1 + Phenylalanin	6,12	1,06	-0,32	-0,74	-0,78	1,07	2,92
5	Metabolit M1	1,41	-0,71	2,00	0,72	1,29	0,94	1,03
	M1 + Phenylalanin	2,06	0,42	-0,16	-0,84	0,38	0,37	1,07
10	Metabolit M1	1,41	-0,71	2,00	0,08	1,14	0,79	1,09
	M1 + Phenylalanin	2,06	0,42	-0,16	-0,17	-0,18	0,39	0,96
30	Metabolit M1	1,41	-0,71	2,00	-0,78	0,02	0,39	1,26
	M1 + Phenylalanin	2,06	0,42	-0,16	-0,28	-0,20	0,37	0,98

SD Standardabweichung

13.6 Beeinflussung der Verteilung des Metaboliten M1 zwischen humanem Plasma und Erythrozyten durch Phloretin

Zeit (Min)	Substanz	Verteilungskoeffizient					Mittelwert	SD [+/-]
1	Metabolit M1	0,45	-1,50	1,61	2,52	2,34	1,08	1,66
	M1 + Phloretin	0,20	0,31	1,60	0,92	0,11	0,63	0,63
3	Metabolit M1	1,27	0,86	2,68	1,32	2,96	1,82	0,94
	M1 + Phloretin	-0,12	0,64	1,44	1,29	0,74	0,80	0,62
5	Metabolit M1	0,25	1,25	2,61	1,42	2,86	1,68	1,07
	M1 + Phloretin	-0,53	0,65	2,12	1,02	1,75	1,00	1,03
10	Metabolit M1	1,48	2,18	4,60	1,51	2,59	2,47	1,28
	M1 + Phloretin	-0,16	0,01	1,79	1,05	2,18	0,97	1,04
30	Metabolit M1	1,30	2,70	2,22	1,10	1,30	1,72	0,70
	M1 + Phloretin	-0,10	0,06	1,08	1,69	1,62	0,87	0,85

SD Standardabweichung

14 Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 (δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton) gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran

14.1 Vergleich zwischen Ascorbinsäure und M1 (Angegeben ist der Grad der Hämolyse in Prozent)

Zeit (Min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300
Blank	2,56	2,96	0,96	0,98	2,37	11,21	21,20	47,49	71,58	75,00	80,44	80,63	83,75	82,87	81,62	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M1	3,43	3,47	2,54	2,26	2,41	2,58	2,84	3,55	3,53	4,07	4,57	4,99	5,98	5,93	6,59	7,92	9,45	8,85	9,46	11,04	11,71
Ascorbinsäure	2,59	8,19	4,05	2,89	1,66	0,96	3,15	10,71	21,98	48,89	66,26	72,51	72,63	78,46	79,01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

196

14.2 Konzentrationsreihe des Metaboliten M1 (Angegeben ist der Grad der Hämolyse in Prozent)

Zeit (Min)	20	40	60	80	100	120	140	160	180
Blank	2,09	1,69	19,49	64,70	88,69	91,25	95,16	-/-	-/-
0,01 μ M	1,86	9,40	16,07	70,85	89,50	93,60	94,76	-/-	-/-
0,1 μ M	2,04	3,92	17,23	73,36	89,79	93,63	95,74	-/-	-/-
0,5 μ M	1,44	1,49	8,24	41,17	74,53	88,5	94,12	93,15	-/-
1 μ M	1,76	1,52	1,48	5,24	16,48	43,72	72,47	91,80	93,99

14.3 Vergleich des Metaboliten M1 mit Verapamil und Indometacin (Angegeben ist der Grad der Hämolyse in Prozent)

Zeit (Min)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280
Blank	1,41	1,30	1,11	1,00	1,43	4,06	11,94	27,33	42,29	55,17	68,11	75,68	86,83	-/-	-/-
Verapamil	1,33	1,27	1,02	1,29	4,20	22,05	37,36	49,48	60,96	70,4	78,55	81,53	-/-	-/-	-/-
Indometacin	1,47	1,55	1,00	1,55	2,78	6,81	12,57	19,25	26,83	33,72	41,90	50,66	70,2	86,28	90,41
Verapamil + M1	1,21	1,11	0,89	0,79	2,01	9,13	22,28	35,95	48,87	59,86	70,68	77,12	86,31	-/-	-/-
Indometacin + M1	1,47	1,47	1,11	0,96	1,69	2,31	4,60	9,35	16,80	24,68	34,02	41,93	60,99	77,04	90,51

14.4 Vergleich verschiedener Inkubationen des Metaboliten M1 (Dargestellt ist die Hämolyse in Prozent, drei unabhängige Versuche)

Zeit (Min)	Blank	M1	M1 60	M1 60 (-)
15	1,67	2,08	1,55	1,16
	1,31	1,69	1,33	1,03
	2,19	2,15	2,47	1,56
30	1,75	1,81	1,43	1,22
	1,17	1,68	1,30	2,42
	2,15	2,19	2,36	1,56
45	1,30	1,58	1,02	1,25
	1,29	-/-	1,31	3,31
	2,29	2,09	2,25	1,54
60	1,44	1,59	1,22	1,87
	1,39	1,69	1,55	5,29
	2,04	1,99	4,11	1,58
75	1,39	1,37	1,63	1,41
	6,06	1,88	4,29	15,19
	2,53	2,10	2,21	1,74
90	1,61	1,38	1,74	9,42
	19,95	6,38	5,82	43,34
	2,34	2,87	2,43	1,87
105	3,12	1,38	3,32	29,85
	50,28	18,13	17,73	80,33
	5,09	4,46	2,47	1,85
120	46,67	2,08	11,76	66,54
	83,10	41,36	42,12	101,80
	8,55	2,45	2,76	2,29
135	80,57	5,59	32,46	92,86
	93,00	61,33	66,12	103,93
	8,27	2,94	3,01	1,97
150	99,78	19,64	58,69	98,96
	94,31	82,57	84,02	103,53
	9,06	2,83	2,96	2,54
165	103,30	40,19	72,91	106,68
	101,44	96,87	97,58	95,48
	7,84	4,32	2,84	8,86
180	-/-	52,02	80,58	105,78
	103,45	103,45	103,41	95,56
	8,25	5,23	3,01	12,93
195	-/-	71,09	90,03	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	12,77	4,54	10,17	31,25
210	-/-	80,28	97,84	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
225	-/-	91,47	99,72	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	58,57	39,78	58,05	-/-
240	-/-	102,81	99,69	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	86,32	70,28	86,39	74,51
255	-/-	104,99	-/-	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	99,02	89,48	102,12	91,94
270	-/-	-/-	-/-	-/-
	-/-	-/-	-/-	-/-
	99,49	99,46	99,75	105,59

Abkürzungsverzeichnis:

Å	Ångström (0,1 nm)
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidinopropan)
ABC	ATP binding cassette
ABTS	(2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6 sulfonsäure))
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX-2	Cyclooxygenase 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH-Assay	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – assay
EC	Enzyme Commission number
ECD	Elektrochemischer Detektor
EFSA	European food safety authority
EGF	Epidermal growth factor
EI	Elektronenstoßionisation
FBS	fötales bovines Serum
FOX-Assay	Ferrous oxidation-xylene orange – assay
FRAP-Assay	Ferric reducing ability of plasma - assay
FTC-Assay	Fluorescein thiocarbamoyl – assay
GLUT	Glucose Transporter
GPX	Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
HDL	High density lipoproteins
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPAC	High-performance-affinity-chromatography
HPLC	High-performance-liquid-chromatography
HSA	humanes Serumalbumin
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration

E. Abkürzungsverzeichnis

IL-1 β	Interleukin 1 beta
Kcal	Kilokalorie
kDa	Kilodalton
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDL	low density lipoproteins
log P	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
m/z	Massenladungsverhältnis
MRP	Multidrug resistance protein
MWCO	Molecular weight cut-off
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PGP	Para-Glykoprotein
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
ROS	Reactive oxygen species
T ₃	Trijodthyronin
TBA	Thiobarbitursäure
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRAP-Assay	Telomeric Repeat Amplification – Assay
USP	United States Pharmacopeia
VLDL	very low density lipoproteins

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung

Sekundäre Pflanzenstoffe zeichnen sich wegen ihrer heterogenen Zusammensetzung und großen Strukturvariabilität durch eine komplexe Pharmakokinetik aus. Wissen um die Pharmakokinetik ist wiederum für die Beurteilung von pharmakodynamischen Prozessen unabdingbar. Ziel dieser Arbeit war es durch die Bestimmung wichtiger pharmakokinetischer Parameter zur Erweiterung des Verständnisses um die Verteilung von verschiedenen Bestandteilen und Metaboliten eines standardisierten Extraktes der französischen Meereskieker (*pinus pinaster*) im menschlichen Körper beizutragen.

Es erfolgte zunächst, unter Verwendung zweier verschiedener Methoden, die Bestimmung der Plasmaproteinbindung dieser Substanzen. Hierbei fand eine affinitätschromatographische Methode mit immobilisiertem Albumin Anwendung. Die Flavonoide Taxifolin, (+)-Catechin sowie das Catechindimer Procyanidin B₁ zeigten eine, aufgrund der vorliegenden Polyphenolstruktur der Substanzen gut erklärbare ausgeprägte Bindung, während für Kaffesäure, Ferulasäure und ein δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (Metabolit M1), das *in vivo* als Metabolit aus (+)-Catechin gebildet wird, eine wesentlich geringere Affinität zu Albumin ermittelt werden konnte.

Desweiteren kam eine Filtrationsmethode zur Anwendung, die durch Abtrennung der Proteine aus dem Plasma eine Bestimmung der Bindung ermöglichte. Um die in Vorversuchen gezeigte ausgeprägte unspezifische Bindung der Flavonoide (+)-Catechin und Taxifolin an Membran- und Gefäßoberflächen zu minimieren wurde eine Vorbehandlung der Membranen vorgenommen. Die Resultate beider Methoden zeigten eine gute Übereinstimmung, ausgenommen der bei der Ultrafiltration erhaltenen geringen Proteinbindung des Procyanidin B₁. Auch die Ultrafiltrationsmethode ergab für Taxifolin und (+)-Catechin eine beinahe vollständige Bindung. Für die Phenolcarbonsäuren Ferulasäure und Kaffeesäure sowie den Metaboliten M1 hingegen ergaben sich geringere Affinitäten so dass die Ergebnisse der affinitätschromatographischen Methode bestätigt und durch die Verwendung von zwei verschiedenen unabhängigen Bestimmungsansätzen eine gesteigerte Aussagekraft der Resultate erreicht werden konnte.

Eine weitere Ergänzung der Aufklärung des pharmakokinetischen Profils erfolgte durch die Ermittlung der Verteilung dieser Substanzen zwischen Plasma und verschiedenen Blutzellen. Insbesondere für den Metaboliten M1 zeigte sich bei einigen der Versuche

eine ausgeprägte Affinität zu Erythrozyten und mononukleären Zellen. Ob diesem Phänomen möglicherweise aktive Transportmechanismen zu Grunde lagen sollte durch weiterführende Betrachtungen geklärt werden. Die Untersuchungen ergaben, dass an dieser Verteilung weder ein Aminosäuretransporter noch das para-Glykoprotein beteiligt gewesen waren, jedoch ließen ergänzende Versuche den Schluss zu, dass eine erleichterte Diffusion in das Zellinnere durch den Glucose-Transporter GLUT-1 ermöglicht werden könnte. Diese Vermutung wurde durch vergleichende Energiefeld-, Oberflächen-, und Volumenberechnungen zwischen dem natürlichen Substrat des Transporters Glucose und dem Metaboliten M1 gestützt.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Verteilungsversuche wurde ein möglicher intrazellulärer Metabolismus der Substanzen in Erythrozyten und mononukleären Zellen, insbesondere durch Reaktionen des Phase II Metabolismus, untersucht. Mittels massenspektrometrischer Untersuchungen konnten Hinweise auf die Bildung eines Addukts zwischen Glutathion und dem Metaboliten M1 in Erythrozyten gefunden werden.

Abschließend wurde durch die Bestimmung der protektiven Eigenschaften des Metaboliten M1 gegen oxidative Schädigungen der Erythrozytenmembran auch ein pharmakodynamischer Aspekt dieser Verbindung hinzugefügt. Zwar zeigte sich bereits in einem Konzentrationsbereich von 1 μM eine ausgeprägte antioxidative Aktivität des Metaboliten M1, jedoch konnte kein Hinweis auf Beeinflussung oxidativer Membranschädigungen durch möglicherweise intrazellulär gebildete Konjugate obiger Verbindung gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für verschiedene Bestandteile eines Kiefernrintenextraktes und ein δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton Plasmaproteinbindungen und erstmals die Verteilung dieser Substanzen zwischen Plasma und Blutzellen ermittelt werden. Insbesondere die in einigen Versuchen gezeigte Aufnahme bzw. Adsorption könnte einen Beitrag zur Klärung der Beobachtung liefern, dass eine deutliche Diskrepanz gefunden wurde zwischen *in vivo* gemessenen Plasmakonzentrationen, welche *in vitro* nicht ausreichend sind um deutliche Effekte auszulösen und Ergebnissen aus *ex vivo* Untersuchungen, die eine deutliche Beeinflussung insbesondere antiinflammatorischer Prozesse zeigten.

Summary

Secondary plant compounds are characterized by complex pharmacokinetics due to their heterogeneous composition and distinct variability of formation. Knowledge is indispensable about pharmacokinetics for estimation of pharmacodynamic effects. The objective of this thesis was to contribute to the knowledge of distribution of different constituents of a standardized French maritime pine extract (*pinus pinaster*) in the human body.

At first two different methods were used to determine the plasma protein binding of these substances. An affinity chromatographic method using immobilized albumin was applied. The flavonoids taxifolin, (+)-catechin and the dimer procyanidin B₁ revealed a pronounced binding due to their polyphenolic structures while a considerably lower affinity to albumin was found for caffeic acid, ferulic acid and δ -(3,4-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone (metabolite M1), an in vivo formed metabolite from (+)-catechin.

Additionally a filtration method was used which allowed to quantify the extent of binding by separating the proteins from the plasma. Owing to the relatively lipophilic properties of the flavonoids (+)-catechin and taxifolin membranes were pretreated to reduce the non specific binding to surfaces.

The results of both methods showed good agreement, except for a lower protein binding of procyanidin B₁ observed by the ultrafiltration method. Taxifolin and (+)-catechin displayed almost complete protein binding in the affinity chromatography and the ultrafiltration method.

For the phenolic acids ferulic acid, caffeic acid and the metabolite M1, however, there was lower affinity and these results were consistent with the data obtained by affinity chromatography confirming the validity of the results.

Further investigations regarding the pharmacokinetic profile included determining the distribution of these substances between plasma and blood cells. Particularly a pronounced binding of the metabolite M1 to erythrocytes and mononuclear cells was found. Whether an active transport underlies this phenomenon mechanisms should be clarified by further investigations. The experiments showed that this distribution was neither influenced by amino acid transporters nor that the para glycoprotein was involved. But based on additional testing it was concluded that a facilitated diffusion of M1 was mediated by the glucose transporter GLUT-1. This assumption was supported

by comparative force field, surface and volume calculations between the natural substrate of the transporter glucose and the metabolite M1.

A potential intracellular phase II metabolism of the compounds in erythrocytes and mononuclear cells was examined based on the results of partition experiments. Mass spectrometric investigations revealed an adduct formation between glutathione and the metabolite M1 in human erythrocytes. Finally, by determining the protective properties of the metabolite M1 against oxidative damage of erythrocyte membrane, a pharmacodynamic aspect of this compound was added. Strong antioxidant activity occurred for the metabolite M1 already in a concentration range of 1 μM . However, obviously any intracellularly formed glutathione metabolite did not contribute to this effect. Within the scope of this work the first time plasma protein binding and the distribution between plasma and blood cells were determined for different compounds and a metabolite of a maritime pine extract.

Especially the uptake of the compounds into blood cells might contribute to explain the observation that a significant discrepancy is found between *in vivo* measured and anti-inflammatorily effective plasma concentrations and the fact that these concentrations are not sufficient to trigger significant effects *in vitro*.

Literaturverzeichnis:

- [1] Hänsel S, *Pharmakognosie Phytopharmazie*. Vol. 9. 2010, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 1053-206.
- [2] Bentley R, Bennett JW. *Constructing polyketides: from collie to combinatorial biosynthesis*. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 411-46.
- [3] Paduch R, Kandefler-Szerszen M, Trytek M, et al. *Terpenes: substances useful in human healthcare*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2007; 55 (5): 315-27.
- [4] Parveen I, Winters A, Threadgill MD, et al. *Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (Dactylis glomerata) as substrates for polyphenol oxidase*. Phytochemistry 2008; 69 (16): 2799-806.
- [5] Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, et al. *Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction*. Nutr Rev 2010; 68 (10): 571-603.
- [6] Kannangara CG, Stumpf PK. *Fat metabolism in higher plants. LIV. A procaryotic type acetyl CoA carboxylase in spinach chloroplasts*. Arch Biochem Biophys 1972; 152 (1): 83-91.
- [7] Winkel-Shirley B. *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. Plant Physiol 2001; 126 (2): 485-93.
- [8] Elwers S, *Zusammensetzung und histologische Verteilung der phenolischen Substanzen in Samen von Massen- und Edelkakao-Varietäten (Theobroma cacao L.)*. in *Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg*. 2008, Universität Hamburg: Hamburg. p. 251.
- [9] Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, et al. *Glycosyltransferases: managers of small molecules*. Curr Opin Plant Biol 2005; 8 (3): 254-63.
- [10] Francis FJ. *Food colorants: anthocyanins*. Crit Rev Food Sci Nutr 1989; 28 (4): 273-314.
- [11] Pirasteh G. *Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer*. Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät Westfälische Wilhelms-Universität Münster 1988.
- [12] Kahle K, Kempf M, Schreier P, et al. *Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols*. Eur J Nutr 2010.

- [13] Luck G, Liao H, Murray NJ, et al. *Polyphenols, astringency and proline-rich proteins*. *Phytochemistry* 1994; 37 (2): 357-71.
- [14] Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. *Am J Clin Nutr* 2004; 79 (5): 727-47.
- [15] Spencer JP. *Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract*. *J Nutr* 2003; 133 (10): 3255S-61S.
- [16] Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, et al. *Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272 (1): 236-41.
- [17] Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, et al. *Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway*. *Free Radic Biol Med* 1998; 25 (1): 19-25.
- [18] Scalbert A, Morand C, Manach C, et al. *Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health*. *Biomed Pharmacother* 2002; 56 (6): 276-82.
- [19] Bokkenheuser VD, Shackleton CH and Winter J. *Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans*. *Biochem J* 1987; 248 (3): 953-6.
- [20] Morand C, Manach C, Crespy V, et al. *Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma*. *Free Radic Res* 2000; 33 (5): 667-76.
- [21] Felgines C, Texier O, Morand C, et al. *Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279 (6): G1148-54.
- [22] Crespy V, Aprikian O, Morand C, et al. *Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats*. *J Nutr* 2001; 131 (12): 3227-30.
- [23] Chen CH, Hsu HJ, Huang YJ, et al. *Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters*. *Planta Med* 2007; 73 (4): 348-54.
- [24] Selma MV, Espin JC and Tomas-Barberan FA. *Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health*. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (15): 6485-501.
- [25] Li C, Lee MJ, Sheng S, et al. *Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion*. *Chem Res Toxicol* 2000; 13 (3): 177-84.

- [26] 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: 4.
- [27] Unno T, Tamemoto K, Yayabe F, et al. *Urinary excretion of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone, a ring-fission metabolite of (-)-epicatechin, in rats and its in vitro antioxidant activity*. J Agric Food Chem 2003; 51 (23): 6893-8.
- [28] Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, et al. *Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver*. J Biol Chem 1981; 256 (24): 13004-13.
- [29] Dahlqvist A, Borgstrom B. *Digestion and absorption of disaccharides in man*. Biochem J 1961; 81: 411-8.
- [30] McMahon LG, Nakano H, Levy MD, et al. *Cytosolic pyridoxine-beta-D-glucoside hydrolase from porcine jejunal mucosa. Purification, properties, and comparison with broad specificity beta-glucosidase*. J Biol Chem 1997; 272 (51): 32025-33.
- [31] Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, et al. *Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase*. FEBS Lett 2000; 468 (2-3): 166-70.
- [32] Makino T, Shimizu R, Kanemaru M, et al. *Enzymatically modified isoquercitrin, alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats*. Biol Pharm Bull 2009; 32 (12): 2034-40.
- [33] Henry-Vitrac C, Desmouliere A, Girard D, et al. *Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells*. Eur J Nutr 2006; 45 (7): 376-82.
- [34] Day AJ, Gee JM, DuPont MS, et al. *Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter*. Biochem Pharmacol 2003; 65 (7): 1199-206.
- [35] Hasslauer I, Oehme A, Locher S, et al. *Flavan-3-ol C-glycosides--preparation and model experiments mimicking their human intestinal transit*. Mol Nutr Food Res 2010; 54 (11): 1546-55.
- [36] Crespy V, Morand C, Manach C, et al. *Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen*. Am J Physiol 1999; 277 (1 Pt 1): G120-6.

- [37] Donovan JL, Crespy V, Manach C, et al. *Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats*. J Nutr 2001; 131 (6): 1753-7.
- [38] Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, et al. *Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo*. Antioxid Redox Signal 2001; 3 (6): 1023-39.
- [39] Rechner AR, Spencer JP, Kuhnle G, et al. *Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo*. Free Radic Biol Med 2001; 30 (11): 1213-22.
- [40] Svagera Z, Skottova N, Vana P, et al. *Plasma lipoproteins in transport of silibinin, an antioxidant flavonolignan from Silybum marianum*. Phytother Res 2003; 17 (5): 524-30.
- [41] Janisch KM, Williamson G, Needs P, et al. *Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin*. Free Radic Res 2004; 38 (8): 877-84.
- [42] Walle T, Ta N, Kawamori T, et al. *Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids--methylated versus unmethylated flavones*. Biochem Pharmacol 2007; 73 (9): 1288-96.
- [43] Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, et al. *Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue*. Carcinogenesis 1998; 19 (10): 1771-6.
- [44] Henning SM, Aronson W, Niu Y, et al. *Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption*. J Nutr 2006; 136 (7): 1839-43.
- [45] Ross JA, Kasum CM. *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. Annu Rev Nutr 2002; 22: 19-34.
- [46] Moon JH, Nakata R, Oshima S, et al. *Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000; 279 (2): R461-7.
- [47] Zhou S, Hu Y, Zhang B, et al. *Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats*. J Agric Food Chem 2008; 56 (18): 8354-9.
- [48] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. *Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)*. J Nutr 1998; 128 (10): 1710-5.

-
- [49] Lu LJ, Anderson KE. *Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans*. Am J Clin Nutr 1998; 68 (6 Suppl): 1500S-4S.
- [50] Urpi-Sarda M, Llorach R, Khan N, et al. *Effect of milk on the urinary excretion of microbial phenolic acids after cocoa powder consumption in humans*. J Agric Food Chem 2010; 58 (8): 4706-11.
- [51] Coldham NG, Sauer MJ. *Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health*. Toxicol Appl Pharmacol 2000; 164 (2): 206-15.
- [52] USP, *United States Pharmacopeia*. 2009, Rockville. 1051-3.
- [53] 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): 261-77.
- [54] Fradinho DM, Pascoal Neto C and Pedrosa de Jesus J. *Chemical characterisation of bark and of alkaline bark extracts from maritime pine grown in Portugal*. Industrial Crops and Products 2001; 16 (1): 23-32.
- [55] Ansari MA, Keller JN and Scheff SW. *Protective effect of Pycnogenol in human neuroblastoma SH-SY5Y cells following acrolein-induced cytotoxicity*. Free Radic Biol Med 2008; 45 (11): 1510-9.
- [56] Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, et al. *A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract*. J Ethnopharmacol; 133 (2): 261-77.
- [57] 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 (Lond) 2006; 3: 1.
- [58] Grimm T, Schafer A and Hogger P. *Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol)*. Free Radic Biol Med 2004; 36 (6): 811-22.
- [59] Schafer A, Chovanova Z, Muchova J, et al. *Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol)*. Biomed Pharmacother 2006; 60 (1): 5-9.
- [60] Holt EM, Steffen LM, Moran A, et al. *Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents*. J Am Diet Assoc 2009; 109 (3): 414-21.

- [61] Torbjörn N, Winel B. *Extractives from the bark of common spruce Picea abies L.* *Karst. acta chemica scandinavica* 1972; 26: 2289-96.
- [62] Miller KG, Poole CF and Chichila TP. *Solvent-assisted supercritical fluid extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from the cinnamons of commerce and their separation by series-coupled column gas chromatography.* *Journal of high resolution Chromatography* 1995; 18 (8): 461-71.
- [63] Saranpää P, Nyberg H. *Seasonal variation of neutral lipids in Pinus sylvestris L. sapwood and heartwood.* *trees* 1987; 1 (3): 139-44.
- [64] Kolattukudy. *Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin.* *Annual Review of Plant Physiology* 1981; 32: 539-67.
- [65] Franke R, Schreiber L. *Suberin--a biopolyester forming apoplastic plant interfaces.* *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10 (3): 252-9.
- [66] Kremer JM, Wilting J and Janssen LH. *Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease.* *Pharmacol Rev* 1988; 40 (1): 1-47.
- [67] Bailey DN, Briggs JR. *The binding of selected therapeutic drugs to human serum alpha-1 acid glycoprotein and to human serum albumin in vitro.* *Ther Drug Monit* 2004; 26 (1): 40-3.
- [68] Belpaire FM, Bogaert MG, Mugabo P, et al. *Binding to serum alpha 1-acid glycoprotein and effect of beta-adrenoceptor antagonists in rats with inflammation.* *Br J Pharmacol* 1986; 88 (3): 697-705.
- [69] Ganguly M, Carnighan RH and Westphal U. *Steroid-protein interactions. XIV. Interaction between human alpha 1-acid glycoprotein and progesterone.* *Biochemistry* 1967; 6 (9): 2803-14.
- [70] Sudlow G, Birkett DJ and Wade DN. *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin.* *Mol Pharmacol* 1976; 12 (6): 1052-61.
- [71] Kragh-Hansen U. *Structure and ligand binding properties of human serum albumin.* *Dan Med Bull* 1990; 37 (1): 57-84.
- [72] Kragh-Hansen U, Chuang VT and Otagiri M. *Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin.* *Biol Pharm Bull* 2002; 25 (6): 695-704.
- [73] Benet LZ, Spahn-Langguth H, Iwakawa S, et al. *Predictability of the covalent binding of acidic drugs in man.* *Life Sci* 1993; 53 (8): PL141-6.

-
- [74] Yeung JH, Coleman JW and Park BK. *Drug-protein conjugates--IX. Immunogenicity of captopril-protein conjugates*. *Biochem Pharmacol* 1985; 34 (22): 4005-12.
- [75] Narazaki R, Harada K, Sugii A, et al. *Kinetic analysis of the covalent binding of captopril to human serum albumin*. *J Pharm Sci* 1997; 86 (2): 215-9.
- [76] Kimura T, Ishikawa N and Shinkai K. [*Comparative studies on delayed type hypersensitivity of low-molecular compounds and compound-protein conjugates in rabbits*]. *Arerugi* 1990; 39 (7): 587-94.
- [77] Gibaldi M, McNamara PJ. *Apparent volumes of distribution and drug binding to plasma proteins and tissues*. *Eur J Clin Pharmacol* 1978; 13 (5): 373-80.
- [78] Murphy JE, *Clinical Pharmacokinetics*. 1 ed, ed. CA Ling. 2001, Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists. 521-4.
- [79] Benet LZ, Hoener BA. *Changes in plasma protein binding have little clinical relevance*. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71 (3): 115-21.
- [80] Nilsson M, Harang V, Bergstrom M, et al. *Determination of protein-ligand affinity constants from direct migration time in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* 2004; 25 (12): 1829-36.
- [81] Melten JW, Wittebrood AJ, Willems HJ, et al. *Comparison of equilibrium dialysis, ultrafiltration, and gel permeation chromatography for the determination of free fractions of phenobarbital and phenytoin*. *J Pharm Sci* 1985; 74 (6): 692-4.
- [82] Pacifici GM, Viani A. *Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences*. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23 (6): 449-68.
- [83] Boffito M, Back DJ, Blaschke TF, et al. *Protein binding in antiretroviral therapies*. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19 (9): 825-35.
- [84] Nakai D, Kumamoto K, Sakikawa C, et al. *Evaluation of the protein binding ratio of drugs by a micro-scale ultracentrifugation method*. *J Pharm Sci* 2004; 93 (4): 847-54.
- [85] Lee KJ, Mower R, Hollenbeck T, et al. *Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies*. *Pharm Res* 2003; 20 (7): 1015-21.
- [86] Heinze A, Holzgrabe U. *Determination of the extent of protein binding of antibiotics by means of an automated continuous ultrafiltration method*. *Int J Pharm* 2006; 311 (1-2): 108-12.

- [87] Chuang VT, Otagiri M. *Stereoselective binding of human serum albumin*. Chirality 2006; 18 (3): 159-66.
- [88] Itoh T, Saura Y, Tsuda Y, et al. *Stereoselectivity and enantiomer-enantiomer interactions in the binding of ibuprofen to human serum albumin*. Chirality 1997; 9 (7): 643-9.
- [89] Zlotos G, Oehlmann M, Nickel P, et al. *Determination of protein binding of gyrase inhibitors by means of continuous ultrafiltration*. J Pharm Biomed Anal 1998; 18 (4-5): 847-58.
- [90] Duweler KG, Rohdewald P. *Urinary metabolites of French maritime pine bark extract in humans*. Pharmazie 2000; 55 (5): 364-8.
- [91] Diniz A, Escuder-Gilabert L, Lopes NP, et al. *Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis*. Anal Bioanal Chem 2008.
- [92] Papadopoulou A, Green RJ and Frazier RA. *Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study*. J Agric Food Chem 2005; 53 (1): 158-63.
- [93] Soares S, Mateus N and Freitas V. *Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching*. J Agric Food Chem 2007; 55 (16): 6726-35.
- [94] Kusuda M, Hatano T and Yoshida T. *Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin: evidence from gel electrophoresis*. Biosci Biotechnol Biochem 2006; 70 (1): 152-60.
- [95] Hage DS. *High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 768 (1): 3-30.
- [96] Sengupta A, Hage DS. *Characterization of minor site probes for human serum albumin by high-performance affinity chromatography*. Anal Chem 1999; 71 (17): 3821-7.
- [97] Valko K, Nunhuck S, Bevan C, et al. *Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity*. J Pharm Sci 2003; 92 (11): 2236-48.
- [98] Buchholz L, Cai CH, Andress L, et al. *Evaluation of the human serum albumin column as a discovery screening tool for plasma protein binding*. Eur J Pharm Sci 2002; 15 (2): 209-15.

-
- [99] Noctor TA, Diaz-Perez MJ and Wainer IW. *Use of a human serum albumin-based stationary phase for high-performance liquid chromatography as a tool for the rapid determination of drug-plasma protein binding.* J Pharm Sci 1993; 82 (6): 675-6.
- [100] Harada K, Yuan Q, Nakayama M, et al. *Effects of organic modifiers on the chiral recognition by different types of silica-immobilized bovine serum albumin.* J Chromatogr A 1996; 740 (2): 207-13.
- [101] Tittelbach V, Gilpin RK. *Species dependency of the liquid chromatographic properties of silica-immobilized serum albumins.* Anal Chem 1995; 67 (1): 44-7.
- [102] Andersson S, Thompson RA and Allenmark SG. *Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. IX. Influence of the cross-linking reagent on the retentive and enantioselective properties of chiral sorbents based on bovine serum albumin.* J Chromatogr 1992; 591 (1-2): 65-73.
- [103] Kim HS, Mallik R and Hage DS. *Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin. II. Comparison of the Schiff base and N-hydroxysuccinimide immobilization methods.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 837 (1-2): 138-46.
- [104] Cheng Y, Ho E, Subramanyam B, et al. *Measurements of drug-protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography-mass spectrometry.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 809 (1): 67-73.
- [105] Singh SS, Mehta J. *Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 834 (1-2): 108-16.
- [106] Beaudry F, Coutu M and Brown NK. *Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model.* Biomed Chromatogr 1999; 13 (6): 401-6.
- [107] Gilman, *The pharmacological Basis of Therapeutics.* 11 ed, ed. LL Brunton. 2006, New York: McGraw-Hill. 1714-92.
- [108] Hritz J, Kascakova S, Ulicny J, et al. *Influence of structure of human, rat, and bovine serum albumins on binding properties of photoactive drug hypericin.* Biopolymers 2002; 67 (4-5): 251-4.

- [109] Guo M, Su X, Kong L, et al. *Characterization of interaction property of multicomponents in Chinese Herb with protein by microdialysis combined with HPLC*. Anal Chim Acta 2006; 556 (1): 183-8.
- [110] Kratochwil NA, Huber W, Muller F, et al. *Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach*. Biochem Pharmacol 2002; 64 (9): 1355-74.
- [111] Adzet T, Camarasa J, Escubedo E, et al. *In vitro study of caffeic acid-bovine serum albumin interaction*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1988; 13 (1): 11-4.
- [112] Qian ZM, Qin SJ, Yi L, et al. *Binding study of Flos Lonicerae Japonicae with bovine serum albumin using centrifugal ultrafiltration and liquid chromatography*. Biomed Chromatogr 2008; 22 (2): 202-6.
- [113] Zhang Y, Yue Y, Li J, et al. *Studies on the interaction of caffeic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments*. J Photochem Photobiol B 2008; 90 (3): 141-51.
- [114] Zhang Y, Xu M, Du M, et al. *Comparative studies of the interaction between ferulic acid and bovine serum albumin by ACE and surface plasmon resonance*. Electrophoresis 2007; 28 (11): 1839-45.
- [115] Kang J, Liu Y, Xie MX, et al. *Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid*. Biochim Biophys Acta 2004; 1674 (2): 205-14.
- [116] Rawel HM, Meidtner K and Kroll J. *Binding of selected phenolic compounds to proteins*. J Agric Food Chem 2005; 53 (10): 4228-35.
- [117] Liu Y, Xie MX, Jiang M, et al. *Spectroscopic investigation of the interaction between human serum albumin and three organic acids*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2005; 61 (9): 2245-51.
- [118] Ishii T, Minoda K, Bae MJ, et al. *Binding affinity of tea catechins for HSA: Characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column*. Mol Nutr Food Res 2009.
- [119] Manach C, Morand C, Texier O, et al. *Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin*. J Nutr 1995; 125 (7): 1911-22.
- [120] Arora JP, Singhal VK, Chand M, et al. *Study of interaction between catechin and native and modified bovine serum albumin by physico-chemical methods*. Indian J Biochem Biophys 1989; 26 (1): 14-8.

-
- [121] Taylor S, Harker A. *Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids*. J Pharm Biomed Anal 2006; 41 (1): 299-303.
- [122] Lima JJ. *Experimental evidence for concentration-dependent plasma protein binding effects on the apparent half-lives of restrictively cleared drugs*. J Pharm Sci 1983; 72 (4): 461-2.
- [123] Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, et al. *Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract*. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67 (5): 1140-3.
- [124] Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, et al. *Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa*. J Agric Food Chem 2002; 50 (6): 1700-5.
- [125] Harms H, Zehnder A. *Bioavailability of Sorbed 3-Chlorodibenzofuran*. Appl Environ Microbiol 1995; 61 (1): 27-33.
- [126] Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, et al. *Procyanidines from Vitis vinifera seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability*. Planta Med 1996; 62 (6): 495-502.
- [127] Sakano K, Mizutani M, Murata M, et al. *Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage*. Free Radic Biol Med 2005; 39 (8): 1041-9.
- [128] Sommer. *Über einige analytische Reaktionen der Polyphenole*. Aus dem Institut für analytische Chemie der J.E. Purkyne-Universität 1961: 7-16.
- [129] Dangles O, Dufour C, Manach C, et al. *Binding of flavonoids to plasma proteins*. Methods Enzymol 2001; 335: 319-33.
- [130] Baxter NJ, Lilley TH, Haslam E, et al. *Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation*. Biochemistry 1997; 36 (18): 5566-77.
- [131] Shafiee M, Carbonneau MA, Urban N, et al. *Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds*. Free Radic Res 2003; 37 (5): 573-84.

- [132] van de Vijver LP, Kardinaal AF, van Duyvenvoorde W, et al. *LDL oxidation and extent of coronary atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18 (2): 193-9.
- [133] Highley MS, De Bruijn EA. *Erythrocytes and the transport of drugs and endogenous compounds*. *Pharm Res* 1996; 13 (2): 186-95.
- [134] Rostami-Hodjegan A, Lennard L and Lilleyman JS. *The accumulation of mercaptopurine metabolites in age fractionated red blood cells*. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 40 (3): 217-22.
- [135] Lena N, Imbert AM, Brunet P, et al. *Kinetics of methotrexate and its metabolites in red blood cells*. *Cancer Drug Deliv* 1987; 4 (2): 119-27.
- [136] Griffiths M, Beaumont N, Yao SY, et al. *Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs*. *Nat Med* 1997; 3 (1): 89-93.
- [137] Schrijvers D. *Role of red blood cells in pharmacokinetics of chemotherapeutic agents*. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42 (9): 779-91.
- [138] Zimmerman TP, Prus KL, Mahony WB, et al. *3'-azido-3'-deoxythymidine and acyclovir: antiviral nucleoside analogues with unusual cell membrane permeation properties*. *Adv Exp Med Biol* 1989; 253B: 399-406.
- [139] Daniels G. *Functions of red cell surface proteins*. *Vox Sang* 2007; 93 (4): 331-40.
- [140] Fiorani M, Accorsi A. *Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity*. *Br J Nutr* 2005; 94 (3): 338-45.
- [141] Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, et al. *Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics*. *Toxicology* 2002; 177 (1): 91-104.
- [142] Singal PK, Iliskovic N. *Doxorubicin-induced cardiomyopathy*. *N Engl J Med* 1998; 339 (13): 900-5.
- [143] Mandell GL. *Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics*. *J Clin Invest* 1973; 52 (7): 1673-9.
- [144] Yu S, Li S, Yang H, et al. *A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19 (2): 250-4.

-
- [145] Wu CH, Wu CF, Huang HW, et al. *Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocytic THP-1 cells*. Mol Nutr Food Res 2009; 53 (8): 984-95.
- [146] Wu CH, Yeh CT, Shih PH, et al. *Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1beta activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes*. Mol Nutr Food Res 2010; 54 Suppl 2: S127-40.
- [147] Whitfield JB, Martin NG. *Genetic and environmental influences on the size and number of cells in the blood*. Genet Epidemiol 1985; 2 (2): 133-44.
- [148] Artursson P, Palm K and Luthman K. *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*. Adv Drug Deliv Rev 2001; 46 (1-3): 27-43.
- [149] Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, et al. *Tissue distribution of the multidrug resistance protein*. Am J Pathol 1996; 148 (4): 1237-47.
- [150] Abraham EH, Shrivastav B, Salikhova AY, et al. *Cellular and biophysical evidence for interactions between adenosine triphosphate and P-glycoprotein substrates: functional implications for adenosine triphosphate/drug cotransport in P-glycoprotein overexpressing tumor cells and in P-glycoprotein low-level expressing erythrocytes*. Blood Cells Mol Dis 2001; 27 (1): 181-200.
- [151] Regev R, Katzir H, Yeheskely-Hayon D, et al. *Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by acceleration of passive drug permeation across the plasma membrane*. Febs J 2007; 274 (23): 6204-14.
- [152] Flo K, Hansen M, Orbo A, et al. *Effect of probenecid, verapamil and progesterone on the concentration-dependent and temperature-sensitive human erythrocyte uptake and export of guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP)*. Scand J Clin Lab Invest 1995; 55 (8): 715-21.
- [153] Schultz C, Vaskinn S, Kildalsen H, et al. *Cyclic AMP stimulates the cyclic GMP egression pump in human erythrocytes: effects of probenecid, verapamil, progesterone, theophylline, IBMX, forskolin, and cyclic AMP on cyclic GMP uptake and association to inside-out vesicles*. Biochemistry 1998; 37 (4): 1161-6.
- [154] Bray PG, Howells RE, Ritchie GY, et al. *Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant Plasmodium falciparum. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation*. Biochem Pharmacol 1992; 44 (7): 1317-24.

- [155] Ghosh P, Moitra K, Maki N, et al. *Allosteric modulation of the human P-glycoprotein involves conformational changes mimicking catalytic transition intermediates*. Arch Biochem Biophys 2006; 450 (1): 100-12.
- [156] Watts TJ, Handy RD. *The haemolytic effect of verapamil on erythrocytes exposed to varying osmolarity*. Toxicol In Vitro 2007; 21 (5): 835-9.
- [157] Zhou S, Lim LY and Chowbay B. *Herbal modulation of P-glycoprotein*. Drug Metab Rev 2004; 36 (1): 57-104.
- [158] Murakami S, Muramatsu M and Tomisawa K. *Inhibition of gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by flavonoids: a structure-activity study*. J Enzyme Inhib 1999; 14 (2): 151-66.
- [159] Chieli E, Romiti N, Rodeiro I, et al. *In vitro modulation of ABCB1/P-glycoprotein expression by polyphenols from Mangifera indica*. Chem Biol Interact 2010; 186 (3): 287-94.
- [160] van Zanden JJ, Wortelboer HM, Bijlsma S, et al. *Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2*. Biochem Pharmacol 2005; 69 (4): 699-708.
- [161] Tunnickliff G. *Amino acid transport by human erythrocyte membranes*. Comp Biochem Physiol Comp Physiol 1994; 108 (4): 471-8.
- [162] Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, et al. *The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location*. Genomics 2002; 79 (1): 95-103.
- [163] Young JD, Wolowyk MW, Jones SE, et al. *Sodium-dependent cysteine transport in human red blood cells*. Nature 1979; 279 (5716): 800-2.
- [164] Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, et al. *Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters*. J Biol Chem 2003; 278 (44): 43838-45.
- [165] Lopez-Burillo S, Garcia-Sancho J and Herreros B. *Tryptophan transport through transport system T in the human erythrocyte, the Ehrlich cell and the rat intestine*. Biochim Biophys Acta 1985; 820 (1): 85-94.
- [166] Zhou Y, Samson M, Osty J, et al. *Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system T in erythrocytes*. J Biol Chem 1990; 265 (28): 17000-4.
- [167] Tsuji A, Tamai I. *Carrier-mediated intestinal transport of drugs*. Pharm Res 1996; 13 (7): 963-77.

-
- [168] Su TZ, Lunney E, Campbell G, et al. *Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system l alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells.* J Neurochem 1995; 64 (5): 2125-31.
- [169] Mann GE, Yudilevich DL and Sobrevia L. *Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells.* Physiol Rev 2003; 83 (1): 183-252.
- [170] Gorga FR, Lienhard GE. *Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand binding.* Biochemistry 1982; 21 (8): 1905-8.
- [171] Barnett JE, Holman GD, Chalkley RA, et al. *Evidence for two asymmetric conformational states in the human erythrocyte sugar-transport system.* Biochem J 1975; 145 (3): 417-29.
- [172] Thorens B, Mueckler M. *Glucose transporters in the 21st Century.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 298 (2): E141-5.
- [173] Krupka RM. *Asymmetrical binding of phloretin to the glucose transport system of human erythrocytes.* J Membr Biol 1985; 83 (1-2): 71-80.
- [174] Wang Y, Russo TA, Kwon O, et al. *Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (25): 13816-9.
- [175] Mueckler M. *Facilitative glucose transporters.* Eur J Biochem 1994; 219 (3): 713-25.
- [176] Silverman M. *Structure and function of hexose transporters.* Annu Rev Biochem 1991; 60: 757-94.
- [177] Jain AN. *Morphological similarity: a 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition.* J Comput Aided Mol Des 2000; 14 (2): 199-213.
- [178] Li C, Meng X, Winnik B, et al. *Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry.* Chem Res Toxicol 2001; 14 (6): 702-7.
- [179] Lagerquist Hagglund C, Lundahl P. *Centrifugal and chromatographic analyses of tryptophan and tyrosine uptake by red blood cells and GLUT1 proteoliposomes with permeability estimates and observations on dihydrocytochalasin B.* J Biochem Biophys Methods 2003; 55 (2): 127-40.

- [180] Forsling ML, Widdas WF. *The effect of temperature on the competitive inhibition of glucose transfer in human erythrocytes by phenolphthalein, phloretin and stilboestrol*. J Physiol 1968; 194 (2): 545-54.
- [181] Ku CP, Passow H. *Creatine and creatinine transport in old and young human red blood cells*. Biochim Biophys Acta 1980; 600 (1): 212-27.
- [182] Martin HJ, Kornmann F and Fuhrmann GF. *The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes*. Chem Biol Interact 2003; 146 (3): 225-35.
- [183] Goodyer ID, Hayes DJ and Eisenthal R. *Efflux of 6-deoxy-D-glucose from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes via two saturable carriers*. Mol Biochem Parasitol 1997; 84 (2): 229-39.
- [184] Driessen O, Hoppener R. *Plasma levels of phenobarbital and phenytoin in epileptic outpatients*. Eur Neurol 1977; 15 (3): 135-42.
- [185] Driessen O, Treuren L, Moolenaar AJ, et al. *Distribution of drugs over whole blood: III. The transport function of whole blood for hydrocortisone*. Ther Drug Monit 1989; 11 (4): 401-7.
- [186] Driessen O, Treuren L, Meijer JW, et al. *Distribution of drugs over whole blood: II. The transport function of whole blood for phenytoin*. Ther Drug Monit 1989; 11 (4): 390-400.
- [187] Driessen O, Treuren L and Meijer JW. *Distribution of drugs over whole blood: I. The transport function of whole blood for valproate*. Ther Drug Monit 1989; 11 (4): 384-9.
- [188] Driessen O, Treuren L, Moolenaar A, et al. *In vivo distribution of hydrocortisone over whole blood: a novel method for the extraction of erythrocytes*. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1990; 12 (2): 119-26.
- [189] Goresky CA. *A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes*. Am J Physiol 1963; 204: 626-40.
- [190] Baker M, Parton T. *Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake*. Xenobiotica 2007; 37 (10-11): 1110-34.
- [191] Cornford EM, Landon KP. *Blood-brain barrier transport of CI-912: single-passage equilibration of erythrocyte-borne drug*. Ther Drug Monit 1985; 7 (3): 247-54.

- [192] Lemaire M, Pardridge WM and Chaudhuri G. *Influence of blood components on the tissue uptake indices of cyclosporin in rats.* J Pharmacol Exp Ther 1988; 244 (2): 740-3.
- [193] Riant P, Urien S, Albengres E, et al. *Effects of the binding of imipramine to erythrocytes and plasma proteins on its transport through the rat blood-brain barrier.* J Neurochem 1988; 51 (2): 421-5.
- [194] Hui Y, Raedschelders K, Zhang H, et al. *Quantitative analysis of propofol in whole blood using capillary electrophoresis.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009; 877 (8-9): 703-9.
- [195] Danila MI, Hughes LB, Brown EE, et al. *Measurement of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels: ready for clinical use in rheumatoid arthritis?* Curr Rheumatol Rep 2010; 12 (5): 342-7.
- [196] Blache D, Rustan I, Durand P, et al. *Gas chromatographic analysis of resveratrol in plasma, lipoproteins and cells after in vitro incubations.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 702 (1-2): 103-10.
- [197] Biasutto L, Marotta E, Garbisa S, et al. *Determination of quercetin and resveratrol in whole blood--implications for bioavailability studies.* Molecules 2010; 15 (9): 6570-9.
- [198] Loos WJ, Gelderblom H, Verweij J, et al. *Red blood cells: a neglected compartment in topotecan pharmacokinetic analysis.* Anticancer Drugs 2003; 14 (3): 227-32.
- [199] Chen Z, Zhu QY, Tsang D, et al. *Degradation of green tea catechins in tea drinks.* J Agric Food Chem 2001; 49 (1): 477-82.
- [200] Carando S, Teissedre PL and Cabanis JC. *Comparison of (+)-catechin determination in human plasma by high-performance liquid chromatography with two types of detection: fluorescence and ultraviolet.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 707 (1-2): 195-201.
- [201] Ho Y, Lee YL and Hsu KY. *Determination of (+)-catechin in plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection.* J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 665 (2): 383-9.
- [202] Rossi L, Serafini S, Pierige F, et al. *Erythrocyte-based drug delivery.* Expert Opin Drug Deliv 2005; 2 (2): 311-22.
- [203] Harris PA, Riegelman S. *Acetylsalicylic acid hydrolysis in human blood and plasma. I. Methodology and in vitro studies.* J Pharm Sci 1967; 56 (6): 713-6.

- [204] Portius HJ, Repke K. [*Hydroxysteroid dehydrogenases, delta 5-3-ketosteroid isomerase and delta 4-steroid hydrogenase in erythrocytes.*]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 1960; 239: 299-310.
- [205] Vahdat F, Seguin BE, Whitmore HL, et al. *Role of blood cells in degradation of progesterone in bovine blood.* Am J Vet Res 1984; 45 (2): 240-3.
- [206] Horst WD, Gattanell P, Urbano S, et al. *Catechol-O-methyl transferase in erythrocytes and fat cells.* Life Sci 1969; 8 (10): 473-6.
- [207] Drayer DE, Strong JM, Jones B, et al. *In vitro acetylation of drugs by human blood cells.* Drug Metab Dispos 1974; 2 (6): 499-505.
- [208] Mandelbaum-Shavit F, Blondheim SH. *Acetylation of p-aminobenzoic acid by human blood.* Biochem Pharmacol 1981; 30 (1): 65-9.
- [209] Tietze F. *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues.* Anal Biochem 1969; 27 (3): 502-22.
- [210] Marcus CJ, Habig WH and Jakoby WB. *Glutathione transferase from human erythrocytes. Nonidentity with the enzymes from liver.* Arch Biochem Biophys 1978; 188 (2): 287-93.
- [211] Nicklasson M, Bjorkman S, Roth B, et al. *Stereoselective metabolism of pentoxifylline in vitro and in vivo in humans.* Chirality 2002; 14 (8): 643-52.
- [212] Barry M, Back D, Ormesher S, et al. *Metabolism of didanosine (ddI) by erythrocytes: pharmacokinetic implications.* Br J Clin Pharmacol 1993; 36 (1): 87-8.
- [213] Sandborg RR, Smolen JE. *Early biochemical events in leukocyte activation.* Lab Invest 1988; 59 (3): 300-20.
- [214] Klebanoff SJ. *Myeloperoxidase.* Proc Assoc Am Physicians 1999; 111 (5): 383-9.
- [215] Hofstra AH, Li-Muller SM and Uetrecht JP. *Metabolism of isoniazid by activated leukocytes. Possible role in drug-induced lupus.* Drug Metab Dispos 1992; 20 (2): 205-10.
- [216] Zhang K, Das NP. *Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases.* Biochem Pharmacol 1994; 47 (11): 2063-8.

- [217] Castro-Perez J, Plumb R, Liang L, et al. *A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition*. Rapid Commun Mass Spectrom 2005; 19 (6): 798-804.
- [218] Baillie TA, Davis MR. *Mass spectrometry in the analysis of glutathione conjugates*. Biol Mass Spectrom 1993; 22 (6): 319-25.
- [219] Lindemann T, Hintelmann H. *Identification of selenium-containing glutathione S-conjugates in a yeast extract by two-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma MS and nanoelectrospray MS/MS detection*. Anal Chem 2002; 74 (18): 4602-10.
- [220] Bidart JM, Motte P, Assicot M, et al. *Catechol-O-methyltransferase activity and aminergic binding sites distribution in human peripheral blood lymphocyte subpopulations*. Clin Immunol Immunopathol 1983; 26 (1): 1-9.
- [221] Soares-da-Silva P, Vieira-Coelho MA and Parada A. *Catechol-O-methyltransferase inhibition in erythrocytes and liver by BIA 3-202 (1-[3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl]-2-phenyl-ethanone)*. Pharmacol Toxicol 2003; 92 (6): 272-8.
- [222] Eckert KG. *The metabolism of aminophenols in erythrocytes*. Xenobiotica 1988; 18 (11): 1319-26.
- [223] Eyer P. *Detoxication of N-oxygenated arylamines in erythrocytes. An overview*. Xenobiotica 1988; 18 (11): 1327-33.
- [224] Moridani MY, Scobie H, Jamshidzadeh A, et al. *Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation*. Drug Metab Dispos 2001; 29 (11): 1432-9.
- [225] Moridani MY, Scobie H, Salehi P, et al. *Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450*. Chem Res Toxicol 2001; 14 (7): 841-8.
- [226] Martensson J. *The effect of fasting on leukocyte and plasma glutathione and sulfur amino acid concentrations*. Metabolism 1986; 35 (2): 118-21.
- [227] Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, et al. *Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts*. Arch Biochem Biophys 2000; 378 (2): 224-33.
- [228] Armstrong RN. *Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases*. Chem Res Toxicol 1997; 10 (1): 2-18.

- [229] Nguyen DT, Hernandez-Montes E, Vauzour D, et al. *The intracellular genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone mediates G2-M cell cycle arrest in cancer cells via modulation of the p38 signaling pathway*. Free Radic Biol Med 2006; 41 (8): 1225-39.
- [230] Marsch GA, Botta S, Martin MV, et al. *Formation and mass spectrometric analysis of DNA and nucleoside adducts by S-(1-acetoxymethyl)glutathione and by glutathione S-transferase-mediated activation of dihalomethanes*. Chem Res Toxicol 2004; 17 (1): 45-54.
- [231] van Bladeren PJ. *Glutathione conjugation as a bioactivation reaction*. Chem Biol Interact 2000; 129 (1-2): 61-76.
- [232] Monks TJ, Lau SS, Highet RJ, et al. *Glutathione conjugates of 2-bromohydroquinone are nephrotoxic*. Drug Metab Dispos 1985; 13 (5): 553-9.
- [233] Jeong JK, Stevens JL, Lau SS, et al. *Quinone thioether-mediated DNA damage, growth arrest, and gadd153 expression in renal proximal tubular epithelial cells*. Mol Pharmacol 1996; 50 (3): 592-8.
- [234] Liehr JG, Roy D. *Free radical generation by redox cycling of estrogens*. Free Radic Biol Med 1990; 8 (4): 415-23.
- [235] Miller RT, Lau SS and Monks TJ. *2,5-Bis-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations*. Eur J Pharmacol 1997; 323 (2-3): 173-80.
- [236] Monks TJ, Bai F, Miller RT, et al. *Serotonergic neurotoxicity of methylenedioxyamphetamine and methylenedioxymetamphetamine*. Adv Exp Med Biol 2001; 500: 397-406.
- [237] Andersson B, Larsson R, Rahimtula A, et al. *Prostaglandin synthase and horseradish peroxidase catalyzed DNA-binding of p-phenetidine*. Carcinogenesis 1984; 5 (2): 161-5.
- [238] Eklund BI, Gunnarsdottir S, Elfarra AA, et al. *Human glutathione transferases catalyzing the bioactivation of anticancer thiopurine prodrugs*. Biochem Pharmacol 2007; 73 (11): 1829-41.
- [239] Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, et al. *Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine*. Mol Pharmacol 2006; 70 (2): 747-54.

-
- [240] Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, et al. *ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2*. Chem Biol Interact 1998; 111-112: 153-61.
- [241] Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, et al. *Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport*. J Biol Chem 1996; 271 (16): 9675-82.
- [242] Miller-Larsson A, Jansson P, Runstrom A, et al. *Prolonged airway activity and improved selectivity of budesonide possibly due to esterification*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162 (4 Pt 1): 1455-61.
- [243] Moon JK, Shibamoto T. *Antioxidant assays for plant and food components*. J Agric Food Chem 2009; 57 (5): 1655-66.
- [244] Chizzola R, Michitsch H and Franz C. *Antioxidative properties of Thymus vulgaris leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes*. J Agric Food Chem 2008; 56 (16): 6897-904.
- [245] Llorach R, Espin JC, Tomas-Barberan FA, et al. *Valorization of cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) by-products as a source of antioxidant phenolics*. J Agric Food Chem 2003; 51 (8): 2181-7.
- [246] Pinto Mdel C, Tejada A, Duque AL, et al. *Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation-xylene orange assay*. J Agric Food Chem 2007; 55 (15): 5956-9.
- [247] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, et al. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Anal Chim Acta 2008; 613 (1): 1-19.
- [248] Zielinska D, Szawara-Nowak D and Zielinski H. *Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment*. J Agric Food Chem 2007; 55 (15): 6124-31.
- [249] Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I. *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clin Biochem 1999; 32 (8): 595-603.
- [250] Kimura H, Nakano M. *Highly sensitive and reliable chemiluminescence method for the assay of superoxide dismutase in human erythrocytes*. FEBS Lett 1988; 239 (2): 347-50.
- [251] Perk H, Armagan A, Naziroglu M, et al. *Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men*. J Clin Pharm Ther 2008; 33 (6): 635-40.

- [252] Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, et al. *Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood*. Clin Chem 1991; 37 (11): 1932-7.
- [253] Schäfer A, *Effekte von Bestandteilen und Metaboliten eines Kiefernextraktes von Pinus maritima (Pycnogenol) auf pathophysiologische Aspekte des metabolischen Syndroms*. 2007, Wuerzburg. 55-72.
- [254] Niki E, Komuro E, Takahashi M, et al. *Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers*. J Biol Chem 1988; 263 (36): 19809-14.
- [255] Yamamoto Y, Niki E, Eguchi J, et al. *Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen*. Biochim Biophys Acta 1985; 819 (1): 29-36.
- [256] Takebayashi J, Chen J and Tai A. *A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis*. Methods Mol Biol 2010; 594: 287-96.
- [257] Takebayashi J, Kaji H, Ichiyama K, et al. *Inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis by 2-O-substituted ascorbic acid derivatives*. Free Radic Biol Med 2007; 43 (8): 1156-64.
- [258] Takebayashi J, Chen J and Tai A. *A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis*. Methods Mol Biol; 594: 287-96.
- [259] S Yamabe TM, M Kimura. *Theoretical interpretation of the standard redox potential of benzene-1, 2-diol and its derivatives*. J.Phys.Chem. 1981; 85 (23): 3510-3.
- [260] Nanni E, Stallings, M, Sawyer,DT. *Does superoxide ion oxidize catechol, .alpha.-tocopherol, and ascorbic acid by direct electron transfer?* J.Am.Chem.Soc. 1980; 102 (13): 4481-5.
- [261] Tang YZ, Liu ZQ. *Evaluation of the free-radical-scavenging activity of diclofenac acid on the free-radical-induced haemolysis of human erythrocytes*. J Pharm Pharmacol 2006; 58 (5): 625-31.
- [262] Sato Y, Sato K and Suzuki Y. *Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: comparison of calculated rate constants for hemolysis with experimental rate constants*. Arch Biochem Biophys 1999; 366 (1): 61-9.
- [263] Turrens JF. *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Biosci Rep 1997; 17 (1): 3-8.

- [264] Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.* Biochem J 1973; 134 (3): 707-16.
- [265] Stocker R, Keaney JF, Jr. *Role of oxidative modifications in atherosclerosis.* Physiol Rev 2004; 84 (4): 1381-478.
- [266] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.* Nature 2000; 404 (6779): 787-90.
- [267] Schleicher E, Friess U. *Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis.* Kidney Int Suppl 2007; (106): S17-26.
- [268] Ma Q. *Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications.* Pharmacol Ther 2010; 125 (3): 376-93.
- [269] Kunsch C, Medford RM. *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature.* Circ Res 1999; 85 (8): 753-66.
- [270] Schreck R, Albermann K and Baeuerle PA. *Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review).* Free Radic Res Commun 1992; 17 (4): 221-37.
- [271] Hollman PC, Geelen A and Kromhout D. *Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women.* J Nutr 2010; 140 (3): 600-4.
- [272] Rietveld A, Wiseman S. *Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials.* J Nutr 2003; 133 (10): 3285S-92S.
- [273] Hamer M, Chida Y. *Intake of fruit, vegetables, and antioxidants and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis.* J Hypertens 2007; 25 (12): 2361-9.
- [274] Halliwell B. *Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?* Cardiovasc Res 2007; 73 (2): 341-7.
- [275] Harada M, Kan Y, Naoki H, et al. *Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin.* Biosci Biotechnol Biochem 1999; 63 (6): 973-7.
- [276] Monks TJ, Lau SS. *The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38: 229-55.

- [277] Acheson R, *An introduction to the chemistry of heterocyclic compounds*. 1. ed. 1960, New York: Interscience Publ. 129-31.
- [278] Hughes RE, Maton SC. *The passage of vitamin C across the erythrocyte membrane*. Br J Haematol 1968; 14 (3): 247-53.
- [279] Halliwell B, Gutteridge JM. *The antioxidants of human extracellular fluids*. Arch Biochem Biophys 1990; 280 (1): 1-8.
- [280] (EFSA) EFSA. *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. 2010; 2010/50.11.2010.
- [281] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. *Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays*. Pharm Res 2007; 24 (10): 1962-73.
- [282] Galbraith DA, Watts DC. *Changes in some cytoplasmic enzymes from red cells fractionated into age groups by centrifugation in Ficoll/Triosil gradients. Comparison of normal humans and patients with Duchenne muscular dystrophy*. Biochem J 1980; 191 (1): 63-70.
- [283] Loos H, Blok-Schut B, van Doorn R, et al. *A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradients*. Blood 1976; 48 (5): 731-42.
- [284] D. Salauze DD. *In Vitro Assessment of the Haemolytic Potential of Candidate Drugs*. Comp Haematol Int 1994; 4 (4): 34-6.
- [285] Sana TR, Waddell K and Fischer SM. *A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 871 (2): 314-21.