

Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes und dessen Metabolit auf NO und NO-Synthasen



DISSERTATION

zur Erlangung

des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Klaus Uhlenhut

aus Ansbach

Würzburg 2012

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

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

Meiner Familie

Bereits aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen:

Originalpublikationen:

Uhlenhut, K., Högger, P.

Pitfalls and limitations in using 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) for evaluating the influence of polyphenols on nitric oxide release from endothelial cells

Free Radic Biol Med. 2012 May 5 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.006

Uhlenhut, K., Högger, P.

Facilitated cell uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by a metabolite of maritime pine bark extract (Pycnogenol)

Free Radic Biol Med. 2012 April 23 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.013

Enseleit, F., Sudano, I., Périat, D., Winnik, S., Wolfrum, M., Flammer, A.J., Fröhlich, G.M., Kaiser, P., Hirt, A., Haile, S.R., Krasniqi, N., Matter, C.M., Uhlenhut, K., Högger, P., Neidhart, M., Lüscher, T.F., Ruschitzka, F., Noll, G.

Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study

Eur Heart J. 2012 Jan 11 DOI: 10.1093/eurheartj/ehr482

Basar, S., Uhlenhut, K., Högger, P., Schöne, F., Westendorf, J.

Analgesic and antiinflammatory activity of Morinda citrifolia L. (Noni) fruit

Phytother Res. 2010 Jan; 24(1):38-42. DOI: 10.1002/ptr.2863

Posterbeitrag:

Kurlbaum, M., Uhlenhut, K., Högger, P.

Polyphenole im Kiefernriindenextrakt – sekundäre Pflanzenstoffe komplexer Zusammensetzung und vielfältiger Wirkung

ChemSystM, Chemie Symposium Mainfrankens, Würzburg 2007

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Menschen, die zur Entstehung und auch zu einem erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich allen voran Frau Prof. Dr. Petra Högger danken für die Möglichkeit in ihrem Arbeitskreis dieses interessante Thema zu bearbeiten, für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen, die Möglichkeit an Weiterbildungen teilzunehmen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt ihr zudem für das entgegengebrachte Vertrauen bezüglich der verantwortungsvollen Lehrtätigkeitsaufgabe und Praktikumsleitung im Fach Biochemie und Klinische Chemie.

Ganz besonderer Dank gebührt Dr. Manuel Nietert für die Zusammenarbeit bei der Erstellung des computerbasierten Modells zur Vorhersage der Blut-Hirnschrankengängigkeit. Seine Hilfsbereitschaft und unermüdliche Fähigkeit Probleme zu lösen sind bemerkenswert.

Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister und Matthias Rappold bin ich sehr dankbar für die Synthese des Metaboliten M1.

Dem Team um Dr. Frank Enseleit am Universitätsklinikum Zürich sowie der Gruppe um Prof. Dr. Johannes Westendorf am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf möchte ich für die fruchtbare wissenschaftliche Kooperation danken.

Prof. Dr. Thomas Brand, der inzwischen am Imperial College in London tätig ist, danke ich für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu hospitieren, um mein proteinbiochemisches Methodenwissen zu erweitern.

Der Firma Horphag Research möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken. Allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich eine tolle inspirierende Zeit sowohl im Arbeits- als auch im privaten Kreis verbringen durfte, sei herzlich gedankt: Dr. Daniel Baumann, Dr. Mirjam Gnadt, Dr. Max Kurlbaum, Dr. Beatrice Trammer, Dr. Anagnostis Valotis, Roswitha Skrabala, Roswitha Scheblein, Tanja Wittmann, Martin Haas, Melanie Mülek, Lisa Schaaf und Frederic Vollmers. Besonderer zusätzlicher Dank gilt hierbei Melanie Mülek für ihre Unterstützung bei den LC-MS/MS-Messungen.

Allen Assistentinnen und Assistenten des Biochemie-Praktikums möchte ich danken für die freundschaftlichen und interessanten Diskussionen während des gemeinsamen Aufsichtsdienstes und beim gemeinsamen Essen nach dem Praktikum.

Dem treuen Begleiter Michel de Montaigne danke ich unter anderem für die Hilfe bei der geistigen Festigung des Wunsches irgendwann beim Kohlpflanzen zu sterben – aber derart, dass man sich weder über den Tod noch über den unfertigen Garten grämt.

Meiner Familie und meinen Freunden sei auch herzlich gedankt für ihre soziale Kontrolle, welche stets antreibt, korrigiert und relativiert.

Mein Vater Günter Uhlenhut hat mir besonders geholfen, indem er den Text mit großer Ausdauer Korrektur gelesen hat. Meiner Mutter Maria und meiner Schwester Beate danke ich für ihre bedingungslose Zuneigung, Unterstützung und Geduld.

Und zu guter Letzt sei Dir unsagbar gedankt, liebe Coralie, für Dein großes Herz, das sich meiner erbarmt.

Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better.

Samuel Beckett

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	17
1	Stickstoffmonoxid (NO)	17
2	Polyphenole und Flavonoide	21
3	NO-Stoffwechsel und -Nachweismethoden	24
B	Allgemeiner Teil	29
1	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	29
1.1	NO und Entzündung.....	29
1.2	Flavonoide des Kiefernrintenextraktes, Metabolit M1 und Entzündung.....	31
1.2.1	Fragestellung: Effekte von M1 auf iNOS und NO-Freisetzung.....	33
1.2.2	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	34
1.2.3	Ergebnisse Zytotoxizität von M1.....	34
1.2.4	Diskussion Zytotoxizität von M1.....	37
1.2.5	Ergebnisse der Hemmung der NO-Freisetzung und der iNOS-Induktion aus Makrophagen durch M1.....	38
1.2.6	Diskussion des Einflusses von M1 auf NO und iNOS.....	44
1.2.6.1	Radikalfänger-Eigenschaften von und Hemmung der Nitrit-Freisetzung durch M1.....	44
1.2.6.2	Hemmung der iNOS-Induktion durch M1.....	47
1.3	Ad-/Absorption des Metaboliten M1 an/in murine Makrophagen, humane Endothelzellen und primäre humane Monozyten.....	50
1.3.1	Fragestellung: Zelluläre Ad-/Absorption von M1.....	52
1.3.2	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	53
1.3.3	Ergebnisse.....	54
1.3.3.1	Ad-/Absorption von M1 an/in murine Makrophagen und humane Monozyten....	54
1.3.3.2	Ad-/Adsorption von M1 an/in humane Endothelzellen.....	56
1.3.4	Diskussion.....	57
2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	62
2.1	NO und das Gefäßsystem.....	62
2.2	Flavonoide und Gefäßsystem.....	64
2.2.1	Fragestellung: Effekte von Flavonoiden auf die eNOS in Endothelzellen.....	66
2.2.2	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	67
2.2.3	Ergebnisse.....	67

2.2.3.1	Kurzzeit-Effekte auf die NO-Freisetzung	67
2.2.3.2	Langzeiteffekte auf die NO-Freisetzung und eNOS-Proteinexpression	68
2.2.4	Diskussion	72
2.2.5	Fragestellung: Einfluss des Kiefernrintenextraktes auf methylierte Arginine und Endothelin-1 als Risikofaktoren der Endothelialen Dysfunktion <i>in vivo</i>	77
2.2.5.1	Endogene Inhibitoren von NO-Synthasen	77
2.2.5.2	Endothelin-1	79
2.2.6	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	80
2.2.7	Ergebnisse	81
2.2.7.1	<i>In vitro</i> : Voruntersuchungen	81
2.2.7.2	<i>In vivo</i> : Klinische Studie	83
2.2.8	Diskussion	86
2.2.8.1	<i>In vitro</i> : Voruntersuchungen	86
2.2.8.2	<i>In vivo</i> : Klinische Studie	89
2.3	Neue methodische Aspekte der NO-Quantifizierung	93
2.3.1	Stabilität der untersuchten Substanzen unter Testbedingungen	93
2.3.1.1	Ergebnisse und Diskussion	94
2.3.2	Eignung der neuen HPLC-Methode zur empfindlichen Quantifizierung von durch Endothelzellen produziertem NO	98
2.3.2.1	Ergebnisse und Diskussion	98
2.3.3	Umsatz-Effizienz von DAF-2 mit NO in Assay-Puffer und in Gegenwart von Zellen	101
2.3.3.1	Ergebnisse und Diskussion	101
2.3.4	Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2 unter Test- und Lagerungsbedingungen	104
2.3.4.1	Ergebnisse und Diskussion	105
2.3.5	Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener Detektionssysteme	113
2.3.5.1	Ergebnisse und Diskussion	113
3	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	117
3.1	NO und das Gehirn	117
3.2	Flavonoide und das Gehirn	118
3.2.1	Fragestellung: Mögliche zerebrale Aufnahme von M1 und Effekte auf nNOS-Expression.....	122
3.2.2	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	122
3.2.3	Ergebnisse	123
3.2.3.1	Western-Blotting	123

3.2.3.2	Computer-basierte Vorhersage der Blut-Hirnschrankengängigkeit	124
3.2.4	Diskussion	129
4	Einfluss eines Noni-Extraktes auf die MMP-9 Sekretion aus humanen, primären Monozyten	134
4.1	Die medizinische Anwendung der Noni-Pflanze	134
4.2	Klinische Studien mit Noni-Produkten.....	135
4.3	Arthropathien, MMP-9 und Pflanzenextrakte	136
4.4	Fragestellung: Effekte des Noni-Extraktes auf monozytäre MMP-9 Sekretion	138
4.5	Prinzipien der Bestimmung und Methodik.....	138
4.6	Ergebnisse	139
4.7	Diskussion.....	140
C	Material und Methoden.....	145
1	Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Puffer	145
1.1	Reagenzien	145
1.2	Stammlösungen	146
1.3	Geräte	146
1.4	Puffer	147
2	Untersuchungen der iNOS.....	148
2.1	Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien	148
2.2	Zellkultur.....	148
2.3	Medien	148
2.4	Routinemethoden der Zellkultur.....	149
2.4.1	Einfrieren und Auftauen	149
2.4.2	Passagieren und Kultivieren	150
2.4.3	Zellzählung und Vitalitätstest	150
2.5	Zytotoxizitäts-Testung mit Neutral Rot.....	150
2.6	Nitrit-Messung mit modifizierter Griess-Reaktion	151
2.7	Nitrit-Messung als S-Nitroso-N-Acetylcystein.....	152
2.8	Proteinbestimmung nach Bradford	153
2.9	Western-Blotting.....	154
2.9.1	Zell-Lyse	154
2.9.2	Gelelektrophorese.....	156
2.9.3	Semidry-Blotting	158
3	Bestimmung der Ad-/Absorption des Metaboliten M1 an/in primäre, humane Monozyten und Endothelzellen	160

3.1	Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien	160
3.2	HPLC-Methode zur direkten Bestimmung von M1 in Zellkulturüberständen und - lysaten	161
3.2.1	HPLC-Geräte und Bedingungen	161
3.2.2	Validierungsparameter der M1 HPLC-Methode	161
3.2.2.1	Selektivität/Spezifität	161
3.2.2.2	Linearität/Kalibrierfunktion	162
3.2.2.3	Präzision und Richtigkeit	163
3.2.2.4	Bestimmungsgrenze (LLOQ).....	164
3.2.2.5	Stabilität	164
3.2.3	Versuchsbedingungen und Vorgehensweise	165
3.2.3.1	Monozyten/Makrophagen.....	165
3.2.3.2	EA.hy 926	166
4	Untersuchungen der eNOS	167
4.1	Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien	167
4.2	Zellkultur	168
4.3	Medien	168
4.4	Routinemethoden der Zellkultur	168
4.4.1	Einfrieren und Auftauen	168
4.4.2	Passagieren und Kultivieren	168
4.4.3	Zellzählung und Vitalitätstest	169
4.5	L-Arginin-Abhängigkeit der NO-Produktion der eNOS.....	169
4.6	Stabilitätsuntersuchungen und fluorimetrische Aktivität von (+)-Catechin, (-)- Epicatechin, Resveratrol und M1	169
4.7	Entwicklung einer HPLC-Methode zur störungsfreien Messung der NO- Freisetzung konstitutiver NO-Synthase im Zellkultursystem	170
4.7.1	HPLC-Geräte und Bedingungen	170
4.7.2	Versuchsbedingungen und Vorgehensweise	170
4.7.3	Validierung der DAF-2 HPLC-Methode	171
4.7.3.1	Validierungsplan	171
4.7.3.2	Linearität und Bestimmungsgrenzen (LLOQs) des Systems	172
4.7.3.3	Stabilitätsuntersuchungen von DAF-2 und DAF-2T	176
4.7.3.4	LC-MS/MS Analytik: Qualitative Verifizierung der Hintergrund-Konversion von DAF-2.....	177
4.8	Western-Blotting	177
4.9	Untersuchung von Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener Detektionssysteme.....	178

5	Untersuchungen methylierter Arginin-Derivate in Plasmaproben mittels kompetitivem ELISA-System	178
5.1	Studienpopulation, -design und -protokoll.....	178
5.2	Kompetitives ELISA-Test-System für ADMA und SDMA	179
5.3	Auswertung und nicht-lineare Regression	180
6	Untersuchung von Endothelin-1 (ET-1) in Plasmaproben mittels Sandwich-ELISA.....	181
6.1	Studienpopulation, -design und -protokoll.....	181
6.2	Probenaufarbeitung und Extraktion	181
6.3	Sandwich-ELISA-System für Endothelin-1 (ET-1).....	181
7	Untersuchungen der nNOS.....	182
7.1	Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien	182
7.2	Zellkultur.....	182
7.3	Medien	182
7.4	Routinemethoden der Zellkultur.....	182
7.5	Western-Blotting.....	183
7.6	Computer-basierte Entwicklung eines Modells zur Vorhersage des Blut-Hirnschranken-Übertritts ausgewählter Flavonoide und Metabolite	183
7.6.1	Verwendete Programme	183
7.6.2	Verwendete molekulare Deskriptoren (MOE).....	184
7.6.3	Datensätze	185
7.6.4	Aufbau des Modells	186
8	Untersuchung des Einflusses eines Noni-Extraktes auf die MMP-9 Freisetzung aus primären, humanen Monozyten	187
8.1	Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien	187
8.1.1	Trennlösungen zur modifizierten, isopyknischen Dichtegradienten-Zentrifugation.....	187
8.2	Medien	187
8.3	Isolierung humaner Monozyten	188
8.4	Versuchsbedingungen, Inkubation und Stimulation der Monozyten	189
8.5	Bestimmung der MMP-9 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA System	189
D	Tabellarischer Anhang.....	191
1	Zytotoxizität von M1 in murinen Makrophagen (RAW 264.7).....	191
2	Inhibierung der NO-Freisetzung muriner Makrophagen (RAW 264.7) durch M1	192

2.1	Inhibierung der NO-Freisetzung durch M1 im Vergleich zu Hydrocortison und Fraktion I des Kiefernextraktes.....	192
2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung der NO-Freisetzung aus murinen Makrophagen durch M1	193
2.3	Densitometrische Auswertung der Western-Blots zur Untersuchung des Einflusses von M1 auf die iNOS-Proteinexpression.....	194
3	Sorption M1 an/in humane Monozyten, Endothelzellen und murine Makrophagen.....	194
3.1	Humane primäre Monozyten	194
3.2	Murine Makrophagen (RAW 264.7).....	195
3.3	Humane Endothelzellen (EA.hy 926).....	195
3.4	Verhältnisse der Kontrollversuche mit und ohne Phloretin.....	196
4	Einflüsse von (+)-Catechin, Metabolit M1 und Resveratrol auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen.....	197
4.1	Akute, kurzzeitige Effekte auf die NO-Freisetzung	197
4.2	Langzeit-Effekte auf die NO-Freisetzung.....	198
5	Einfluss von L-Arginin-Aspartat auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen	198
6	ADMA-Freisetzung aus Endothel- und Rhadomyosarkomzellen.....	199
7	ADMA-, SDMA-, und ET-1 Bestimmung in Plasmaproben der klinischen Studie.....	199
8	Stabilität von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, M1, und Resveratrol unter Versuchs-Bedingungen	203
9	Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2	203
10	Erhöhung der DAF-2T Bildung durch Zusatz von Natrium-nitrit/-nitrat beim Einfrieren/Auftauen.....	204
11	Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener analytischer Detektionssysteme.....	204
12	Einfluss eines Noni-Extrakts auf die Freisetzung von MMP-9 aus primären humanen Monozyten	205
E	Zusammenfassung	207
F	Abkürzungsverzeichnis.....	213
G	Literaturverzeichnis	215

A Einleitung

1 Stickstoffmonoxid (NO)

Das NO-Molekül ist *in vivo* an der Regulation einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, die durch seine einzigartigen (bio)-chemischen Eigenschaften beeinflusst und charakterisiert sind. Die bahnbrechende Erkenntnis, dass ein derart einfach aufgebautes zweiatomiges Molekül als selektiver sekundärer Botenstoff in spezifischen Signalkaskaden in der Zelle fungieren kann, wurde 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin belohnt. Angesichts von derzeit ~120.000 Einträgen bei einer PubMed-Recherche zum Suchbegriff „nitric oxide“ wird die anfängliche heftige Kontroverse über die Hypothese NO sei ein *in vivo*-Signalmolekül leicht vergessen gemacht. Stickstoffmonoxid hat ein ungepaartes Elektron und zeigt deshalb radikalische Eigenschaften (Abb. 1.1). Allerdings ist das Molekül im Gegensatz zur allgemeinen Annahme bei radikalischen Struktureigenschaften erstaunlich stabil sowie langlebig, und kann sich mit großer raum-zeitlicher Ausdehnung in biologischer Umgebung bewegen. Um zu verstehen, warum NO sich zum Teil als derart stabil und in seinen Reaktionen als selektiv erweist, kann es sinnvoll sein, sich NO als Intermediat zwischen den beiden in der Erdatmosphäre am häufigsten vorkommenden elementaren Verbindungen Stickstoff und Sauerstoff vorzustellen (Abb. 1.1).

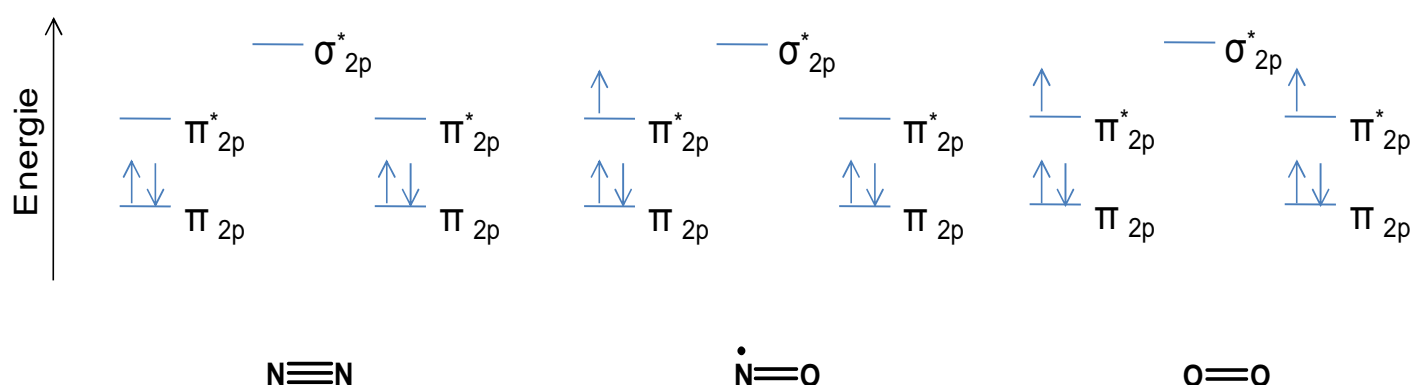


Abb. 1.1: Molekülorbital-Schemata mit drei linear kombinierten antibindenden ($*$) und zwei bindenden 2p-Molekülorbitalen jeweils besetzt mit gepaarten und ungepaarten Elektronen (\uparrow) sowie Lewis-Formeln von elementarem Stickstoff (N_2), Stickstoffmonoxid (NO), und elementarem Sauerstoff (O_2) (nach [1]).

Einerseits ist elementarer Stickstoff ein äußerst inertes und unreaktives Molekül. Andererseits ist Sauerstoff mit zwei ungepaarten Elektronen vor allem thermodynamisch kontrolliert sehr reaktiv und interagiert mit vielen anderen Verbindungen häufig auch unter Bildung radikalischer Kettenreaktionen. Die moderate Reaktivität von NO kann sich dramatisch in Gegenwart von anderen Radikalen wie z.B. dem Superoxid-Anion (O_2^-) ändern, da die sehr schnelle Reaktion von NO mit diesem Sauerstoff-Radikal zu hochreaktiven oxidativen Verbindungen wie z.B. dem Peroxynitrit ($ONOO^-$) führt.

Die beiden vorrangigen Möglichkeiten, wie NO sein ungepaartes Elektron *in vivo* stabilisiert, sind zum einen die Reaktion mit anderen Radikalen, oder zum anderen die koordinative Bindung an Übergangsmetalle wie z.B. in Häm-Eisen-Zentren [2]. Diese Eisen-NO-Bindung ist auch für die Aktivierung des prominentesten NO-Effektorproteins der löslichen Guanylatzyklase essentiell, die letztlich z.B. zur physiologischen Erweiterung von Gefäßen im humanen Blutkreislauf führen kann. Nach der Aktivierung der Guanylatzyklase durch NO diffundiert gebildetes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) dabei in glatten Gefäßmuskelzellen unter anderem zu Proteinkinasen des G-Typs, die durch die Bindung von cGMP aktiviert werden. Durch Übertragung von Phosphatresten durch die Proteinkinasen an weitere Effektorproteine wie z.B. ATP-abhängige Ionenkanäle kommt es dann zu einer Verringerung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration, zur direkten Inaktivierung der Myosinkinase und zur Aktivierung der Myosinphosphatase in glatten Gefäßmuskelzellen, die durch diese Mechanismen erschlaffen und zur Gefäßerweiterung beitragen. Phosphoryliertes Myosin und hohe Calciumionenkonzentrationen sind für die Kontraktion von glatten Muskelzellen notwendig [3]. Pharmakologisch macht man sich das Prinzip der Muskeler schlaffung samt Gefäßerweiterung durch NO und dessen nachfolgenden Botenstoff cGMP zunutze, indem durch Wirkstoffe wie z.B. Sildenafil oder Tadalafil die für den Abbau von cGMP verantwortlichen Enzyme (Phosphodiesterasen) inhibiert werden. Dadurch kommt es zu langfristig erhöhten zellulären Konzentrationen von cGMP, die z.B. in den Corpora cavernosa zu einer Erschlaffung der sinusoidalen glatten Muskelfasern mit einem verstärkten arteriellen Bluteinstrom und folglich einer Erektion führen. Mit therapeutisch eingesetzten organischen Nitraten wie z.B. dem Isosorbiddinitrat kann vor allem durch eine Erweiterung des venösen Gefäßsystems, aber auch einer kurzzeitigen Dilatation der großen Arterienstämme, sowohl die kardiale Vorlast als auch untergeordnet die Nachlast bei einer koronaren sklerotischen Herz(gefäß)erkrankung (KHK) verringert werden [4].

Die mögliche Einflussnahme von NO auf Abläufe in der mitochondrialen Atmungskette mit deren Übergangsmetall-Zentren in den Zellen ist ebenso vor allem durch die starke Affinität von NO zu zwei- oder dreiwertigem Eisen gekennzeichnet. Die aufgrund

der Reaktivität von NO empfindlichsten Zielstrukturen in der Zelle sind also besonders Metallo-Proteine. Bei gleichzeitiger Produktion von Sauerstoffspezies können, wie bereits erwähnt, sehr reaktive Stickstoff-Oxide entstehen, die dann direkt sowie unselektiv mit Proteinen, Lipiden und Nucleinsäurestrukturen reagieren, was bei übermäßiger Entstehung auch als „nitrosativer Stress“ bezeichnet werden kann und mit bestimmten Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson assoziiert zu sein scheint [5].

Neben der Reaktion von NO mit Metallo-Proteinen und Radikalen scheinen bestimmte Aminosäurereste in Proteinen und in diesem Zusammenhang besonders Cysteinyl-Reste mit NO zu interagieren, aber auch Reaktionen mit Tyrosin-Resten über Phenoxyl-Radikale sind möglich. Ob diese posttranslationalen Proteinmodifikation lediglich unbedeutende Beiprodukte des NO-Stoffwechsels sind, oder dabei spezifische signaltransduktorische Funktionen übergeben werden, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen [6].

NO wird im menschlichen Körper durch spezielle Enzyme, sogenannte Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), produziert. Diese Enzym-Komplexe haben eine Masse von bis zu ~160 kDa, wobei deren genauer Zusammenschluß zum Ganzen und mechanistische Funktionsweise bis dato noch nicht vollständig verstanden ist. Eine schematische Übersicht des Aufbaus ist in Abb. 1.2 gezeigt. Die Enzyme wurden bislang in einigen Bakterien, in bestimmten Pilzen und im Tierreich nachgewiesen [7]. Beim Menschen wurden vornehmlich drei NOS beschrieben: die induzierbare (iNOS), die konstitutiv exprimierte endotheliale (eNOS) und neuronale (nNOS) NO-Synthase. Ob Pflanzen durch vergleichbare Enzyme NO zu produzieren im Stande sind, wird derzeit noch kritisch diskutiert [8].

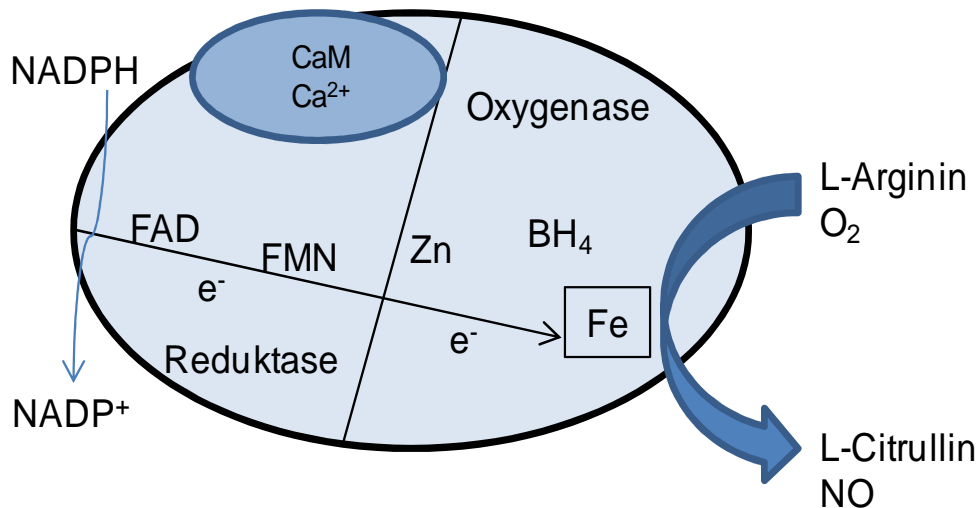


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise von NO-Synthasen. CaM= Calmodulin, BH₄= Tetrahydrobiopterin, FAD= Flavin-Adenin-Dinukleotid, FMN= Flavinmononukleotid, Fe= Eisen, Zn= Zink, NADH= Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat. Weitere Erklärungen im Text.

In der Reduktase-Domäne, die große Ähnlichkeit mit der von Cytochrom-P450 Enzymen aufweist, werden über verschiedene reduzierende Co-Enzyme (NADPH= Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, FAD= Flavin-Adenin-Dinukleotid, FMN= Flavinmononukleotid) Reduktionsäquivalente (e⁻) zur Oxygenase-Domäne mit ihrem Häm-kordinierten Eisen-Zentrum (Fe) transferiert [7]. An einer Verbindungsstruktur zwischen den beiden Domänen lagert sich mit Calcium beladenes Calmodulin (CaM) an, das vermutlich an der optimalen Aufrechterhaltung des Elektronenflusses von der Reduktase- zur Oxygenase-Domäne katalytisch beteiligt ist. An der Domänen-Grenzfläche befindet sich ein gebundenes Zink-Atom (Zn), das bei der Dimerisierung des Enzyms eine Rolle zu spielen scheint. Der wichtige Co-Faktor in der Nähe des Eisenzentrums nämlich BH₄ (Tetrahydrobiopterin) liefert zum einen Reduktionsäquivalente für die Aktivierung von Sauerstoff zur Reaktion mit L-Arginin. Andererseits werden wiederum Elektronen zur Ablösung von NO vom starken Eisen-NO-Komplex benötigt und deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit durch BH₄ bereitgestellt. Insgesamt findet sich ein sehr komplexer redoxchemischer Reaktionsablauf der NO-Synthasen, dessen einzelne Schritte – besonders die genaue NO-Entstehung über Eisen-Sauerstoff-L-Arginin-Intermediate – noch weiterer experimenteller Verifizierung bedürfen. Die Konzentrationsbereiche, die durch die NO-Produktion der Enzyme *in vivo* aber auch in Zellkultursystemen erreicht werden, befinden sich zwischen mikromolaren (iNOS) und nanomolaren bzw. picomolaren (eNOS und nNOS) NO-Konzentrationen [9] (s. Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Charakteristika der NO-Synthasen (NOS) (nach [7, 9]).

	Zelluläres Vorkommen	Masse [kDa]	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der NO-Produktion	NO-Produktion
Neuronale NOS (nNOS)	Gehirn-, Muskelzellen	~160	ja	gering (pM-nM)
Induzierbare NOS (iNOS)	Makrophagen, Hepatozyten	~130	nein	hoch (µM)
Endotheliale NOS (eNOS)	Endothelzellen	~135	ja	gering (pM-nM)

2 Polyphenole und Flavonoide

Die strukturelle Vielfalt der biogen produzierten Verbindungen ist enorm und die Analyse von neuartigen evolutionär in Pflanzen entstandenen Strukturen erweitert den „Chemical Space“ [10] im Sinne eines riesigen Pools von organischen Verbindungen immer wieder aufs Neue. Eine gerichtete Suche nach Molekülen, die (zufällig) eine Wirkung im menschlichen Körper entfalten, gestaltet sich mitunter schwierig. Über umfangreiche Screening-Ansätze und -bibliotheken kann man aussichtsreiche Verbindungskandidaten für die medizinische Forschung erhalten. Eine Schneise durch den sprichwörtlichen Urwald der zahlreichen Strukturen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels lässt sich teilweise mit den bislang aufgeklärten Biosynthese-Wegen in den Pflanzen schlagen. Polyphenole im Allgemeinen entstammen dabei zum einen aus dem Shikimat/Chorismat-Weg zum Aufbau von N-freien Phenylpropankörpern (vor allem Lignine und Zimtsäure-Derivate), und zum anderen aus dem Polyketid-Weg, in welchem Acetyl-CoenzymA-Einheiten zu Polyketonen bzw. weiter zu zyklischen phenolischen Verbindungen aufgebaut werden. Die Shikimisäure und die Orsellinsäure als zentrale Verbindung des jeweiligen Stoffwechselweges sind in Abb. 2.1 gezeigt.

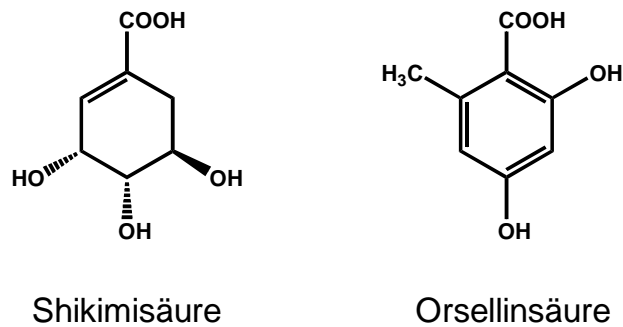


Abb. 2.1: Shikimisäure und Orsellinsäure als Zwischenprodukte im Shikimat/Chorismat- und Polyketid-Stoffwechselweg zum Aufbau von sekundären Pflanzenstoffen.

Man beachte, dass interessanterweise die Strukturelemente aus dem Shikimisäure-Weg häufig Hydroxyl-Gruppen in cis-Stellung tragen, wohingegen die zyklischen Polyketide häufig in meta-Stellung orientierte Hydroxyl-Substituenten zeigen. Flavonoide (lat.: flavus= gelb) können nun in diesem Zusammenhang als gemischte Polyketide (Polyketide + Phenylpropan-Körper) verstanden werden. In Abb. 2.2 sind die Polyketid- und Phenylpropan-Reste aus den unterschiedlichen Stoffwechselwegen am Beispiel der aus Apfelschale isolierbaren Substanz Phloretin gekennzeichnet.

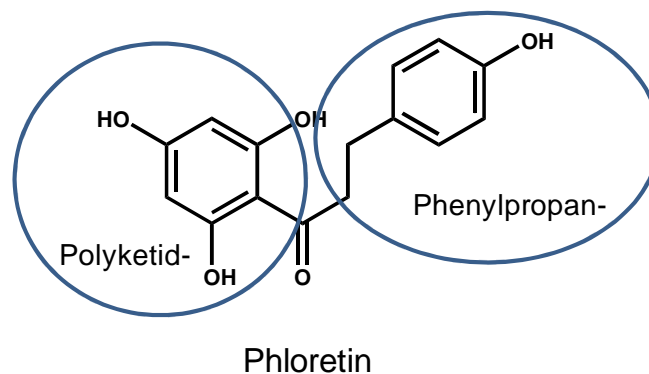


Abb. 2.2: Polyketid- und Phenylpropan-Anteil in Flavonoiden am Beispiel von Phloretin.

Polyphenole und speziell die Gruppe der Flavonoide sind in der Nahrung vor allem in Obst und Gemüse weit verbreitet. Die Aufnahme beträgt im Durchschnitt in Westeuropa etwa ein Gramm pro Tag [11], wobei sehr flavonoidreiche Nahrungs- und Genussmittel wie Rotwein, dunkle Schokolade, Kaffee und grüner oder schwarzer Tee die täglich aufgenommene Menge stark erhöhen können. Vor allem epidemiologische Studien [12-13], aber in jüngster Zeit auch einige prospektive Interventionsstudien, legen einen Zusammenhang zwischen positiven Effekten wie z.B. einer verringerten Inzidenz von Herz-Kreislaufkrankungen [14-

15] einschließlich deren positiver pathogenetischer Beeinflussung und der erhöhten Einnahme von Polyphenolen nahe. Die gefundenen Effekte der Flavonoide sind dabei meist als moderat einzustufen, und die einzelnen Studien sind hinsichtlich ihrer Probanden- oder Patientenanzahl, der damit verbundenen statistischen Vorhersagekraft, des Ausmaßes des Effektes und der gezielten Hypothesentestung im Einzelfall kritisch zu evaluieren [16]. Die Daten sind durchaus heterogen und es gibt teilweise auch Studien, die keine derartigen positiven oder sogar gegenteilige negative Effekte durch die Einnahme von Polyphenolen fanden [17-18]. Da es sich zum Teil um komplexe nicht-standardisierte Stoffgemische in Lebens- bzw. Nahrungsergänzungsmitteln handelt, die in manchen Arbeiten untersucht wurden, sind sowohl positive als auch negative Effekte häufig schwerlich einer bestimmten Verbindung zuzuordnen.

Der in der eigenen Arbeit eingesetzte standardisierte Kiefernrintenextrakt (Handelsname Pycnogenol[®], Horphag Research, UK) ist ein gut untersuchtes und charakterisiertes Polyphenol-Stoffgemisch. Der Extrakt (Maritime pine bark extract) ist im amerikanischen Arzneibuch (United States Pharmacopeia (USP)) entsprechend monographiert [19]. Die Zusammensetzung des Extraktes ist weitestgehend aufgeklärt. So konnte bereits von Pirasteh [20] neben (+)-Catechin und Taxifolin die Phenolcarbonsäuren Protocatechusäure, p-Hydroxybenzoesäure, Kaffeesäure, Gallussäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure und Vanillinsäure identifiziert werden. Die quantitativen Hauptkomponenten sind mit einem Anteil von etwa 65 % Procyanidine, wobei es sich hauptsächlich um Oligomere des (+)-Catechins und des (-)-Epicatechins handelt. Es wurden bis dato 64 publizierte klinische Studien mit dem Kiefernrintenextrakt durchgeführt.

Anfänglich lag der Fokus der Aufklärung und Identifizierung der wirksamen Bestandteile des Extraktes vor allem auf dem Einsatz des Gesamtextraktes oder bekannter enthaltener Ausgangsverbindungen wie (+)-Catechin oder Kaffeesäure in Experimenten wie z.B. klassischen *in vitro* Enzym-Assays [21-22]. Es wurden unterdessen bereits wichtige Beiträge zur Erklärung der Wirkungsweise des Extraktes geleistet: Grimm konnte dabei eine deutliche Hemmung der Enzyme Matrixmetalloproteasen, die an chronisch entzündlichen Prozessen beteiligt sind, durch Extraktbestandteile zeigen [23], und charakterisierte zusätzlich die Pharmakokinetik im Plasma erscheinender Verbindungen nach Einnahme des Kiefernrintenextraktes [24]. Schäfer fand ebenso eine inhibitorische Wirkung des Extraktes auf isolierte Enzyme wie an der Glucoseaufnahme im Darm beteiligten α -Glucosidase [22] sowie eine *ex vivo*-Hemmung der mit Entzündungen und Blutgerinnung assoziierten Cyclooxygenase-1 und -2 nach Einnahme des Extraktes [25]. Kurlbaum untersuchte unter anderem die Plasmaprotein-Bindungseigenschaften der Extraktbestandteile [26] sowie deren

Verteilungsverhalten zwischen humanem Plasma und Erythrozyten [27], wobei sich eine Akkumulation bestimmter Verbindungen des Extraktes und deren Metaboliten in diesen Blutzellen abzeichnete.

In jüngster Zeit mehren sich die Erkenntnisse darüber, dass es wahrscheinlich weniger die polyphenolischen Ausgangsverbindungen, die im Falle der dimeren und höher oligomeren Verbindungen eine schlechte Absorption und Bioverfügbarkeit im Menschen zeigen, als vielmehr durch die Metabolisierung durch Darmbakterien entstandene kleine Moleküle sind, die für die in klinische Studien gezeigten positiven Effekte verantwortlich sind [28]. Diesem Umstand wurde in der eigenen Arbeit mit der Charakterisierung der Effekte des im Plasma erscheinenden Flavonoid-Metaboliten M1 auf die NO-Freisetzung und Expression der NO-Synthasen in einem zellulären Kontext besonderes Augenmerk zu Teil. Inwieweit eine direkte Beeinflussung der Darmbakterien und deren Stoffwechsel durch Polyphenole Einfluss auf die Entstehung verschiedener Krankheiten wie z.B. Tumorerkrankungen haben kann, wird weiterhin ein spannender Gegenstand zukünftiger Forschung sein [29].

3 NO-Stoffwechsel und -Nachweismethoden

Zum einen wird, wie oben beschrieben, NO von speziellen Enzymen produziert. Andererseits kann NO aber auch z.B. reduktiv aus höheren N-oxidischen Verbindungen wie Nitrit oder Nitrat, die beispielsweise auch mit der Nahrung aufgenommen werden, generiert werden [30]. Der Stoffwechsel von NO nach dessen Entstehung im menschlichen Körper ist sehr kompliziert, was unter anderem bedingt ist durch den radikalischen Charakter der Verbindung und sich mit durch voneinander abhängige multiple Gleichgewichte gekennzeichneten schnellen Reaktionskaskaden zeigt. NO hat eine Halbwertszeit von etwa $t_{1/2} = 0,1$ s im humanen Blutkreislauf [31]. Es können kurzlebige reduzierte aber vor allem weiter oxidierte NO-Intermediate sowie stabilere kovalente Addukte z.B. mit funktionellen Gruppen von Aminosäuren entstehen (s. Tab. 3.1). Teilweise kann die Existenz einiger NO-Intermediate wie etwa des Nitrosonium-Ions *in vivo* nur reaktionsmechanistisch postuliert werden, da die Spezies aufgrund mangelnder Stabilität und direkter Nachweistechiken bis dato nicht isoliert werden konnten. Die physiologische Chemie einzelner Verbindungen wie z.B. dem Nitroxyl-Anion, für das *in vitro* bereits gezeigt wurde, dass es von NO-Synthasen trotz einer hohen thermodynamischen Barriere unter bestimmten Umständen produziert werden kann [32], und deren Rolle *in vivo* sind bislang noch wenig verstanden [33]. Das

Nitroxyl-Anion reagiert im Gegensatz zu NO offensichtlich nicht mit Superoxid-Anion zu hochreaktivem Peroxynitrit [34].

Tab. 3.1: Mögliche beteiligte Stickstoffspezies des komplexen NO-Stoffwechsels (Abk.= Abkürzung) [2, 35].

NO und NO-Derivate	Abk.	Nitro- und Nitrosoverbindungen	Abk.
Stickstoffmonoxid	NO	3-Nitro-L-Tyrosin	NO ₂ Tyr
Nitroxyl-Anion	NO ⁻	S-Nitrocystein	SNO ₂ C
Stickstoffdioxid	NO ₂	S-Nitrosocystein	SNOC
Peroxynitrit	ONOO ⁻	S-Nitroso-Hämoglobin	SNOHb
Nitrit	NO ₂ ⁻	S-Nitroglutathion	GSNO ₂
Nitrat	NO ₃ ⁻	S-Nitrosoglutathion	GSNO
Nitronium-Ion	NO ₂ ⁺	Nitrosyl-Hämoglobin	Hb-Fe ^{II} -/Fe ^{III} -NO
Nitrosonium-Ion	NO ⁺		
Distickstofftrioxid	N ₂ O ₃		
Distickstoffmonoxid	N ₂ O		
Distickstofftetroxid	N ₂ O ₄		

Inzwischen wurde eine große Anzahl von Methoden für die NO- und NO-Addukt-Quantifizierung publiziert [36-37]. Diese lassen sich grob einteilen in spektroskopische (Absorption, Fluoreszenz, Chemiluminescence= CL, EPR= Electron Paramagnetic Resonance), elektrochemische Methoden (vor allem Elektroden mit NO-durchlässiger Ummantelung), und massenspektrometrische Methoden (z.B. Nitrit-Quantifizierung nach Umsetzung mit Pentafluorobenzylbromid mittels GC-MS [38]).

Verbreitete Methoden der NO-Analytik mit einer Quantifizierung der Absorptions-Veränderung sind z.B. der Hämoglobin-Assay [39], bei welchem die Bildung von Methämoglobin durch Reaktion von Oxyhämoglobin mit NO UV/VIS-spektroskopisch bestimmt wird: Oxyhämoglobin + NO → Methämoglobin + NO₃⁻. Der wichtige Griess-Assay als photometrisch durchführbare Methode dient zum selektiven Nachweis des NO-Metaboliten Nitrit [40] (s. Abb. 3.1).

A Einleitung

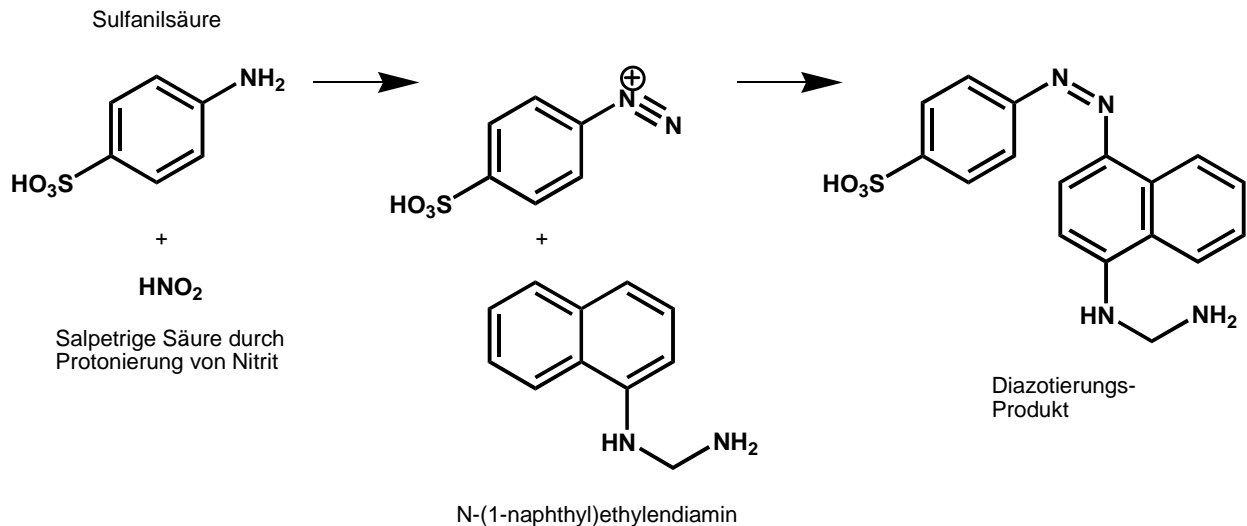


Abb. 3.1: Griess-Reaktion zum spezifischen Nachweis von Nitrit [40]. Sulfanilsäure wird mit Nitrit in saurer Lösung über ein Diazonium-Ion und anschließender Azokupplung mit N-(1-naphthyl)ethylenediamin zum rot-violetten Diazotierungs-Produkt ($\lambda_{\text{max}} \approx 540 \text{ nm}$) umgesetzt.

Sehr empfindliche Fluoreszenzsonden, die speziell für die NO-Analytik entwickelt wurden, stellen die Gruppe der Diaminofluorescein-Derivate wie z.B. 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) dar [41] (s. Abb. 3.2).

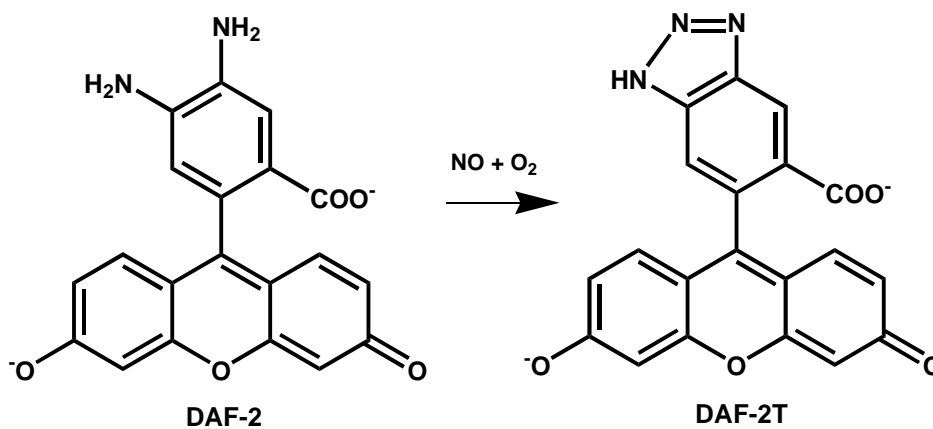


Abb. 3.2: Umsatz von DAF-2 zum Triazol DAF-2T, das eine um den Faktor 200 höhere Quantenausbeute als das Edukt besitzt [41-42], durch nitrosierende Agenzien.

Unter Verwendung des Proteins Cytochrom-c, das in der mitochondrialen Atmungskette vorkommt, wurden ebenso Fluoreszenz-Indikatoren für NO entwickelt, die allerdings weniger empfindlich als die Diaminofluoresceine waren [43]. Auf der Reaktion von NO mit Ozon (O₃) zu einem energetisch angeregten NO₂-Molekül, das mit einer quantifizierbaren Lichtemission in den Grundzustand zurückfällt, basiert die sensitive NO-Messung mittels

Chemilumineszenz (= CL): $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$. NO-Derivate wie z.B. Nitrit müssen für diese Nachweisreaktion zunächst wiederum reduktiv zu NO umgesetzt werden.

Bei der EPR (= Electron Paramagnetic Resonance) wird paramagnetisches NO, das mit seinem ungepaarten Elektron ein magnetisches Moment aufweist, aufgrund seiner Kurzlebigkeit mit sogenannten Spin-Fallen wie z.B. Fe-dithiocarbamaten (s. Abb. 3.3) in einem koordinativen Komplex fixiert und kann dann im Magnetfeld der Messapparatur über einen längeren Zeitraum detektiert werden.

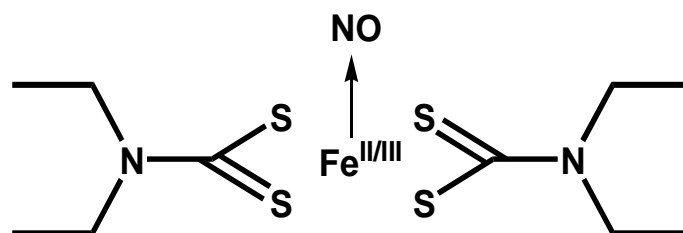


Abb. 3.3: Spin-Falle NO Komplex mit Fe-N,N-Diethyldithiocarbamat (DETC) [44].

Mit Hämoglobin (Hb) als endogene Spin-Falle wurde auch mit der Messung von Hb-NO als Marker für die vaskuläre NO-Produktion experimentiert, wobei die Empfindlichkeit der EPR-Methodik zur selektiven Hb-NO-Detektion im Blut bislang nicht ausreichte [45]. EPR- und CL-Messungen erfordern großen, kostenintensiven apparativen Aufwand. Elektrodensysteme zur elektrochemischen Bestimmung von NO, die mit einer speziellen NO-durchlässigen Membran überzogen werden, können in Bereichen der NO-Analytik Anwendung finden. Die Überzugsmaterialien bestehen dabei z.B. aus Fluoroalkoxysilanen oder Polytetrafluoroethylen [46].

Besonders in Kombination mit reaktiven Polyphenolen haben die angeführten Methoden zusätzliche Tücken. Bei der mit Sicherheit direktesten und für kinetische Messungen geeignetsten elektrochemischen NO-Messung mittels (Mikro-)Elektroden ergaben sich zum einen Probleme durch die Reaktion der Polyphenole mit den Oberflächen der Elektroden bzw. den Ummantelungsmaterialien [47-48] – wobei neuartige Ummantelungsmaterialien diese Probleme verhindern sollen [49] – zum anderen sind Schwierigkeiten ob der reproduzierbaren Platzierung der Elektroden in den Testsystemen mit Zellen und präparierten Geweben sowie die langsame NO-Ansprechbarkeit, aber auch Interferenzen mit Kohlenstoffmonoxid, Dopamin und Nitrit bekannt [36]. Beim Hämoglobin-Bindungs-Assay [39] sind starke Interaktionen der Polyphenole mit den koordinierten Eisen-Zentren z.B. im Methämoglobinmolekül zu erwarten. Zudem kann NO mit phenolischen Strukturen und Fe^{2+} -Ionen bei EPR-Messungen interferierende paramagnetisch aktive Komplexe bilden [50], die Umsatzeffizienz der Spin Fallen mit NO in biologischen Matrices ist

gering, und die Diskriminierung zwischen NO, Nitroxyl-Ionen und Nitrit scheint unter bestimmten Umständen schwierig [44]. Bei CL-Messungen dürfte insbesondere die Anwesenheit von Polyphenolen bei der reduktiven Umsetzung von in Lösung befindlichen Nitrat- und Nitrit-Ionen mit Iodid- oder Vanadium (III)-Ionen zu flüchtigem NO [51], das dann wiederum in einer Reaktion mit Ozon nachgewiesen wird, ein nicht vorherzusehendes gegebenfalls auch katalytisches Interaktionspotential bergen.

Somit stellt die valide NO-Analytik in den durch die NO-Synthesen produzierten geringen NO-Konzentrationsbereichen an sich – aber besonders im Zusammenhang mit reaktiven Polyphenolen und Flavonoiden – eine große Herausforderung dar.

B Allgemeiner Teil

1 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

1.1 NO und Entzündung

Bemerkenswert sind die dichotomen Eigenschaften von NO und des diesen gasförmigen Botenstoff in großen Mengen produzierenden Enzyms iNOS, von welchem die murine Protein-Variante 1992 [52] und das humane Gegenstück 1993 [53] kloniert wurden, was die Funktion bei physiologischen und pathophysiologischen Zuständen wie Infektionen und Entzündungen anbelangt. Diese Janusartigkeit der NO-Produktion durch Induktion der Expression der iNOS, welche wiederum durch inflammatorische Chemokine ausgelöst wird, zeigt sich zum einen darin, dass NO offensichtlich wichtig für erfolgreiche Abwehrmechanismen und Immunität gegen bestimmte pathogene Keime wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* [54] oder *Leishmania major* [55] sein kann. Andererseits kann übermäßig produziertes NO zu strukturellen Gewebeschäden, Nekrosen und DNA-Schädigungen führen, die vor allem ausgelöst werden durch das nach Reaktion von NO mit dem Superoxid-Anion (O_2^-) entstehende hochreaktive Peroxynitrit ($ONOO^-$). Dadurch kommt es progressiv zur Entstehung von chronischen autoimmunologischen Prozessen mit iNOS-Beteiligung wie z.B. chronischen Arthritiden oder Darmentzündungen, prävalent als Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn (Inflammatory bowel diseases) [56].

Eine zentrale Rolle in den durch Peroxynitrit aktivierten Signalkaskaden scheint dem Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase zuzukommen, das an den Reparaturmechanismen der beschädigten DNA beteiligt ist und sich mitverantwortlich für den zellulären Funktionsverlust bei Entzündungszuständen durch starken Abbau und Verbrauch von reduziertem Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) zeigte [57]. Bei der Entstehung fibrotischer Veränderungen durch chronisch-allergisches Asthma hat die iNOS und deren Produkte NO sowie nachfolgend Peroxynitrit unter anderem etwa durch Wirkung auf TIMP-2 (= tissue inhibitor of matrixmetalloprotease-2) einen ausgeprägten Einfluss [58]. Das im Vergleich zu Gesunden erhöhte, in der Atemluft gemessene NO dieser Patienten lässt sich teilweise mit prädiktiven Werten für den Erkrankungsverlauf bei Asthma bronchiale korrelieren [59]. Interessanterweise spielt hauptsächlich von der iNOS produziertes NO ebenso eine bedeutende Rolle bei mukoziliären Prozessen in den Atemwegen [60], und eine

hier wiederum verringerte iNOS-Expression samt NO-Produktion trägt zum Krankheitsbild der primären ziliären Dyskinesie bei [61].

Bei der Initiation und Progression von Tumoren, die durch chronisch-entzündliches Geschehen vorangetrieben werden können, scheint die iNOS eine wichtige Bedeutung zu haben. Detaillierte Ausführungen zum Thema Tumorprogression durch NO und deren mechanistische Grundlagen finden sich in [62]. Dabei geht eine Überexpression von iNOS im Tumorgewebe, wie z.B. beim epithelialen Ovarialkarzinom, häufig mit einer schlechteren Prognose einher [63]. Dies ist auch bekannt für Patientinnen mit Mammakarzinomen, bei welchen eine inverse Korrelation der Überlebensrate mit einer erhöhten iNOS-Konzentration in den Tumorzellen besteht [64]. Allerdings wird die oben bereits angesprochene Ambivalenz evident, wenn man bedenkt, dass es Untersuchungen gibt, die eine entscheidende Rolle bei der lokalen Erkennung und Elimination von Tumorzellen durch die Produktion von NO durch die iNOS von in Tumorgewebe eingewanderten Makrophagen andeuten [65], jedoch wiederum niedrige Konzentrationen von NO auch zu einer anti-apoptotischen Wirkung bei Krebszellen durch Steigerung der Expression von Survivin führen, einem Protein, das die Apoptose hemmen kann [66]. Zusammen mit den in der Einleitung dargestellten grundlegenden Eigenschaften von NO und den NO-Synthasen ergibt sich in physiologischer und pathophysiologischer Hinsicht somit ein noch nicht verstandenes Geflecht aus komplexen Interaktionen bei den oben genannten Krankheitsbildern bedingt durch die einzigartige Natur von NO als Signalmolekül. Komplexität meint hier die Existenz von sehr vielen voneinander abhängigen zellulären Prozessen.

Auch bedingt durch die angesprochene Intransparenz und Dynamik der NO-Systemstruktur – speziell was Konzentrations-, Zeit- und Ortsabhängigkeit der NO-Produktion der iNOS in der jeweiligen Mikroumgebung anbelangt – konnte sich bislang kein iNOS-Inhibitor (weder selektiv noch unselektiv für iNOS) erfolgreich z.B. bei septischen Krankheitsbildern [67-69], Tumorleiden oder bei anderen, chronischen mit iNOS assoziierten Erkrankungen wie Arthritis [70] und Asthma [71] als Behandlungsalternative etablieren, obwohl teilweise durchaus vielversprechende Ansätze vorhanden waren. In Tiermodellen konnte durch neue selektive iNOS-Inhibitoren z.B. eine deutliche Schmerz- und Entzündungshemmung gezeigt werden [72].

1.2 Flavonoide des Kiefernridenextraktes, Metabolit M1 und Entzündung

Bei Erkrankungen, die mit chronisch entzündlichen Geschehen einhergehen, zeigte der Kiefernridenextrakt bzw. das Handelspräparat Pycnogenol® in klinischen Humanstudien einige interessante positive Effekte. In diesem Zusammenhang als randomisierte, doppelblinde und placebo-kontrollierte durchgeführte Studien mit positiven Ergebnissen waren beispielsweise eine Studie mit sechszwanzig an Asthma erkrankten Patienten (n = 26) [73], sowie eine Studie mit einhundert Patienten (n = 100), die an Osteoarthritis litten [74].

Kausale Erklärungsversuche für diese beobachteten Wirkungen wurden auch durch *in vitro* Untersuchungen genährt, die einen hemmenden Effekt von Verbindungen aus dem Kiefernridenextrakt im Speziellen auf die NO Freisetzung der iNOS zeigten, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. So wurde in der Arbeit von Virgili et al. [75] eine 40 %ige Hemmung der Nitrit-Freisetzung aus murinen Makrophagen nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle durch 100 µg/mL Pycnogenol® Gesamtextrakt festgestellt, wohingegen bei Park et al. [76] die gleiche Konzentration von Pycnogenol® eine starke Erhöhung der Nitrit-Konzentration im Medium der gleichen Zelllinie bewirkte. Ob dies auf methodische Unterschiede zurückgeführt werden kann, obwohl in beiden Arbeiten die Griess-Reaktion für die Nitrit-Messungen eingesetzt wurde, bleibt ungewiss.

Pharmakokinetische Untersuchungen von Grimm et al. [24] nach peroraler Applikation des Kiefernridenextraktes beantworteten dann erstmalig die Frage, welche Substanzen aus dem Extraktgemisch in welcher Konzentration überhaupt im Humanplasma *in vivo* bioverfügbar sind und damit Kandidaten für eine spezifische Wirkung *in situ* an bestimmten zellulären Wirkorten sowie an bestimmten Proteinen wie der iNOS in Entzündungs- oder Tumorzellen sein könnten. Dabei wurde neben großen interindividuellen Schwankungen der gemessenen Plasmakonzentrationen einzelner Monomere und eines möglichen Dimers der Extraktkomponenten deutlich, dass eine starke Metabolisierung und Degradierung der Ausgangskomponenten vermutlich vornehmlich durch Bakterien im Kolon stattfand. Daneben waren typische, biotransformatorische Phase-I und Phase-II-Prozesse des menschlichen Körpers in Reaktion auf die Einnahme von Xenobiotika wie z.B. Methylierung, Sulfatierung, oder Glucuronidierung der Extraktkomponenten zu verzeichnen.

Der Metabolit M1 (5-(3,4-Dihydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3*H*)-on) wurde dabei nach Einnahme des Kiefernridenextraktes als einer der Hauptmetaboliten mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Darmbakterien gebildet und erschien im Plasma. In einer 2011 veröffentlichten wichtigen Arbeit von Kutschera et al. [77] wurde belegt, dass bestimmte Bakterienstämme (*Eggerthella lenta* bzw. *Flavonifractor plautii*) in der Lage sind, die in Abb.

1.1 gezeigten Metabolisierungsschritte – vor allem die Spaltung des C- und A-Ringes mit anschließender zyklischer Esterbildung zu γ -Valerolacton-Strukturen – von Catechinen und oligomeren Procyanidinen zu verrichten. In Arbeiten von Appeldoorn et al. [78], Stoupi et al. [79] und Khori et al. [80] sind die weiteren in Abb. 1.1 dargestellten Schritte experimentell z.B. durch Inkubation von Procyanidinen mit humaner Fäzes untersucht und beschrieben.

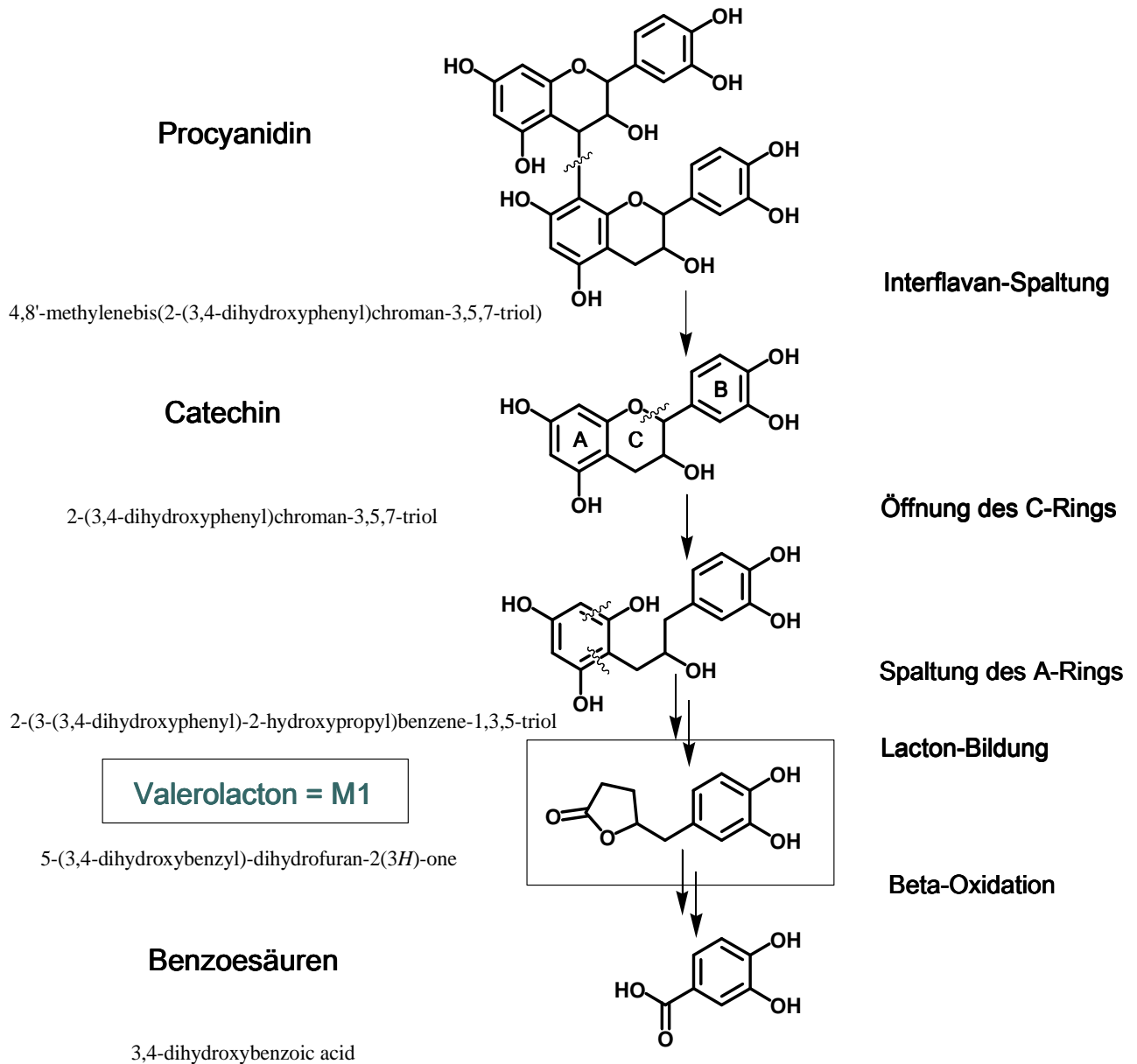


Abb. 1.1: Postulierte Metabolisierung von monomeren und dimeren Flavan-3-ol Strukturen im menschlichen Körper durch Darmbakterien im Kolon [28-31]. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Bereits im Jahr 1971 wurde über eine Metabolisierung von (+)-Catechin im Menschen zur Valerolacton-Struktur berichtet [82], die Bildung der Substanz im menschlichen Körper nach Einnahme des Kiefernrintenextrakts dann 2000 von Düweler et al. belegt [83]. Sowohl bei peroraler Aufnahme von grünem Tee [84-85] als auch von Rotwein ist die Bildung und das Auftauchen dieser Ester-Strukturen im zentralen Kompartiment bekannt [86]. Auch nach Aufnahme von Schokolade bzw. Kakao-Produkten zeigten sich diese gemeinsamen strukturellen Nenner der im Plasma und vor allem im Urin auftauchenden Metaboliten, wenn die enthaltenen Bestandteile wie Procyanidin- und Catechin-Strukturen mikrobiell metabolisiert werden konnten, und wurden somit auch als Biomarker für deren Konsum etabliert [87].

1.2.1 Fragestellung: Effekte von M1 auf iNOS und NO-Freisetzung

Die bisher in der Literatur unbekannt und noch nicht untersuchte Wirkung des Metaboliten M1 auf die NO-Produktion der iNOS sollte Gegenstand der Untersuchungen sein, um damit neue Daten und Erkenntnisse zu gewinnen, ob nach Metabolisierung der Procyanidine und Aufnahme des M1 aus dem Kolon in die Zirkulation dieser einen Einfluss auf die Expression der iNOS und Produktion von NO im Vergleich zur potentiell resorbierbaren Fraktion I (enthält Monomere und Dimere des Kiefernrinten-Extraktgemisches wie in 1.1 Material und Methoden beschrieben) haben kann. Zur besseren Einordnung und Skalierung der möglichen Beeinflussung sollte zusätzlich zur Fraktion I eine geeignete anti-inflammatorische Vergleichssubstanz mit genomischem Wirkmechanismus, in diesem Fall Hydrocortison, eingesetzt werden.

Um eine Wirkung von M1 auf die iNOS über einen Enzym-basierten *in vitro* Assay hinaus in einem physiologischeren, zellulären Kontext zu untersuchen, wurde – da es interessanterweise immer noch Gegenstand reger Diskussion ist, ob humane Monozyten unter Zellkulturbedingungen iNOS bzw. NO zu produzieren in der Lage sind [88-89] – ein Zellkultursystem verwendet, das eine murine Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) beinhaltet, die auf einen inflammatorischen Endotoxin-Stimulus (Lipopolysaccharid= LPS) hin in der Lage ist, mit einer deutlichen iNOS-Induktion und somit auch einer erhöhten NO-Produktion zu reagieren [90]. Wichtig war es nun, die möglichen Effekte von M1 auf unterschiedlichen zellulären Ebenen zu untersuchen, um eine Vorstellung vom Mechanismus der potentiellen Beeinflussung zu erhalten. Realisiert wurde dies zum einen durch die Bestimmung des entstandenen Nitrits als Surrogat-Parameter der NO-Produktion nach Inkubation mit M1, zum anderen auch auf posttranslationaler Proteinebene durch Bestimmung der relativen

iNOS Proteinmenge nach Stimulation der Zellen. Es sollte weiterhin geklärt werden, inwieweit die Toxizität von M1 eine Rolle bei diesen Prozessen spielt.

Es sollte somit untersucht werden, ob sich aus den oben genannten Ansätzen Hinweise ergeben, die auf eine Wirkung von M1 auf pathophysiologisch relevante NO-Kaskaden hindeuten, und der Metabolit deshalb auch eine Hemmung bzw. eine Art abschwächende Pufferwirkung für exzessive NO-Produktionen im menschlichen Körper bei chronisch-entzündlichen Prozessen mit einem geringen Grad an Toxizität entfalten könnte [91].

1.2.2 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

Die Makrophagen wurden für die Versuche in entsprechender Dichte ausgesät, mit unterschiedlichen Konzentrationen von M1 von 100 ng/mL bis 50 µg/mL behandelt, mit LPS 1 µg/mL über 14 h stimuliert und danach zum einen das im Überstand entstandene Nitrit mit Hilfe der Griess-Reaktion quantifiziert, zum anderen nach Zellyse der Proteingehalt der iNOS mittels Western-Blot bestimmt, wie in 2 Material und Methoden im Detail beschrieben. Zur relativen Einordnung der erhaltenen Werte wurde zusätzlich als Vergleich Hydrocortison (HC) und Fraktion I (F I) des Kiefernrintenextraktes eingesetzt, als Kontrolle für eine kompetitive Aminosäuresubstrat-Hemmung der iNOS diene der spezifische iNOS-Inhibitor L-NIL. Die Zytotoxizität von M1 für die Makrophagen sowie die membranäre Integrität der Zellen nach Inkubation mit M1 wurden durch den Neutral-Rot Test erstmalig untersucht.

1.2.3 Ergebnisse Zytotoxizität von M1

Da DMSO in vielen *in vitro* Studien als Lösungsvermittler für schwerlösliche oder in wässrigem Medium instabile Arzneistoffe dient und durchaus starke Effekte auf Zellen haben kann, wurde zunächst in orientierenden Versuchen bestimmt, ob und bei welchen Konzentrationen in dem eingesetzten Modell DMSO zytotoxisch auf die Makrophagen wirkte (Abb. 1.2).

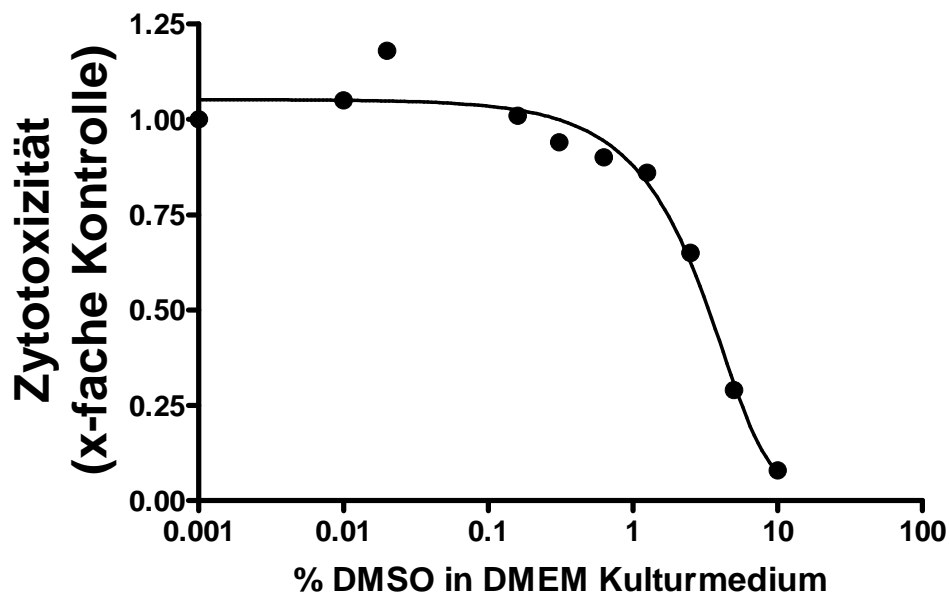


Abb. 1.2: Zytotoxizität von DMSO auf RAW 264.7 Makrophagen. Darstellung eines exemplarischen Versuchs, bei welchem die Makrophagen über 14 h mit DMSO inkubiert und anschließend ein Neutral-Rot Test wie in 2.5 Material und Methoden beschrieben durchgeführt wurde.

Es wurde ersichtlich, dass DMSO in der eingesetzten Konzentration von $\leq 0,03$ % (V/V) mit hoher Wahrscheinlichkeit keine zytotoxischen Effekte auf die Makrophagen über die entsprechende Inkubationszeit aufwies. Der Wert der halbmaximalen Inhibition (IC_{50}) der Aufnahme von Neutral-Rot in die Membransysteme der Zellen lag dabei zwischen 2,5 und 5,0 % (V/V) DMSO im Kulturmedium. Bei einer DMSO-Konzentration von 10,0 % (V/V) im Kulturmedium wurde nur mehr weniger als ein Zehntel Neutral-Rot im Vergleich zur Kontrolle akkumuliert.

Um Artefakte, die auf potentiellen zytotoxischen Eigenschaften von M1 beruhen, bei der Bewertung der Potenz von M1 zur iNOS-Inhibition auszuschließen, wurde die Zytotoxizität von M1 mittels Neutral-Rot Test für die verwendeten Makrophagen untersucht (Abb. 1.3).

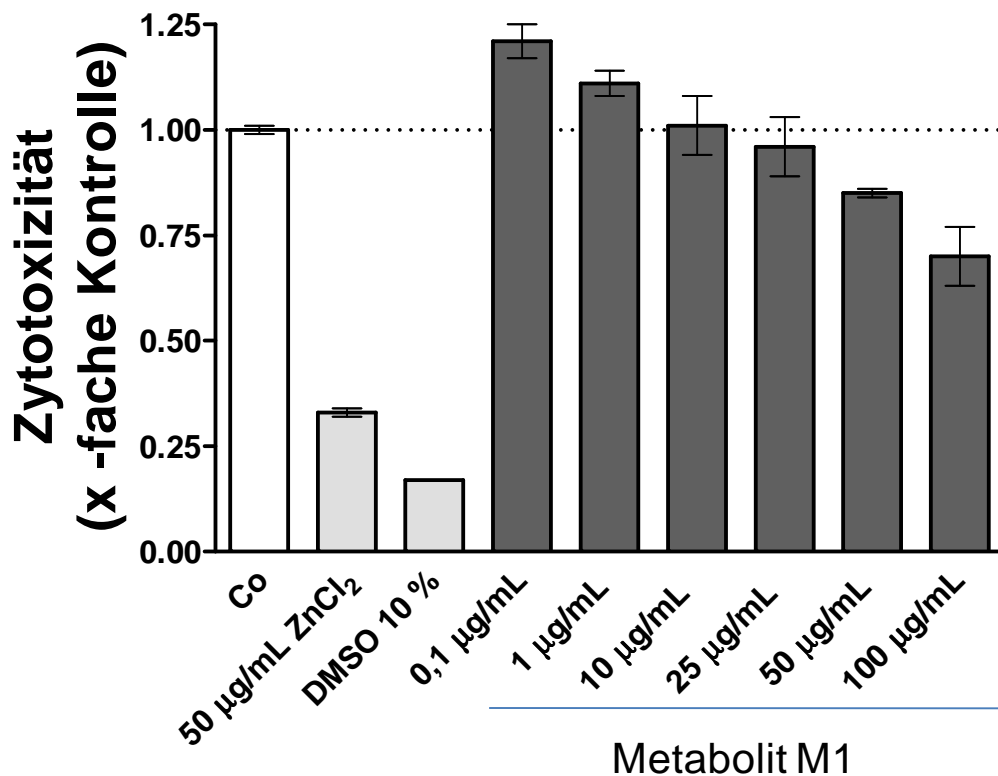


Abb. 1.3: Zytotoxizität von M1 auf murine Makrophagen über 14 h. RAW 264.7 Zellen wurden in einer Anzahl von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen in 96-well Zellkulturplatten ausgebracht und mit M1 in einer Konzentration von 0,1 bis 100 µg/mL versetzt. Nach 14 h wurde der Neutral-Rot Test wie unter 2.5 Material und Methoden beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Als Kontrollen für eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen wurden ZnCl₂ in einer Konzentration von 50 µg/mL und 10 % (V/V) DMSO eingesetzt. Unbehandelte, exakt gleichen Arbeitsabläufen unterzogene Zellen dienten als Referenz (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Die Positiv-Kontrollen DMSO 10 % und ZnCl₂ 50 µg/mL lieferten mit den entsprechenden Faktoren $0,17 \pm 0,005$ bzw. $0,33 \pm 0,01$ bezogen auf die OD-Werte der unbehandelten Kontrolle (Co) und normalisiert auf die Zellzahl $0,3 \cdot 10^6$ pro Ansatz deutliche Hinweise für zytotoxische Effekte dieser Substanzen für murine Makrophagen im untersuchten Modell. Der Metabolit M1 zeigte einerseits in niedrigen Konzentrationen von 100-1000 ng/mL (Faktoren $1,21 \pm 0,04$ bzw. $1,11 \pm 0,03$ in Referenz zur Co) offensichtlich geringfügig proliferations- bzw. stoffwechselstimulierende Auswirkungen, wohingegen ab einer Konzentration von 50 µg/mL M1 entsprechend dem Faktor $0,85 \pm 0,01$ deutlich zytotoxische Effekte in dem Testsystem zu erkennen waren. Im Bereich von 10 - 25 µg/mL Endkonzentration M1 im Medium wurde kein zytotoxischer Einfluss auf die Zellen gefunden (Faktor $1,01 \pm 0,07$ bzw. Faktor $0,96 \pm 0,07$).

1.2.4 Diskussion Zytotoxizität von M1

Es konnte gezeigt werden, dass der Metabolit M1 in den eingesetzten Konzentrationen (100 ng/mL - 50 µg/mL) eine geringe zytotoxische Potenz im Neutral-Rot Test aufwies und somit keine direkten zytotoxischen Effekte die weiteren Untersuchungen in den folgenden unterschiedlichen Testsystemen zur iNOS-Inhibition beeinflussen sollten.

Zusätzlich konnte eine Auswirkung von DMSO als Lösungsmittel der M1-Stammlösung nach Verdünnung in den eingesetzten Konzentrationen auf die eigenen Messergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da erst ab einer DMSO-Konzentration von 1 % (V/V) deutliche zytotoxische Effekte auf die Makrophagen beobachtet wurden. In vergleichbaren Untersuchungen zur Zytotoxizität von DMSO bei einer kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie wurden zytotoxische Auswirkungen mit dem Neutral-Rot Test erst bei einer Konzentration von 20 % DMSO (V/V) gefunden, allerdings bei kürzerer Inkubationszeit und langsamerer Proliferation dieser Zellen im Vergleich zu murinen Makrophagen [92].

Oxidationsempfindliche Phenol-Strukturen wie der Metabolit M1 können in der Lage sein – wie andere Flavonoid-Verbindungen oder Vorläufermoleküle von M1 mit ähnlichen funktionellen Gruppen wie z.B. (+)-Catechin – in Lösung leicht Oxidationsprodukte wie Chinone oder Semichinone, aber vor allem auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu bilden und somit in bestimmten Zellkulturmodellen deutliche zytotoxische Effekte hervorzurufen [93-94]. Ob diese Beobachtungen, die besonders in Zellkulturexperimenten untersucht wurden, auch *in vivo* eine Rolle spielen, und damit die spannende Frage, ob diese pro-oxidativen Eigenschaften von Flavonoiden sogar zum in klinischen Studien beobachteten Nutzen durch Wirkung auf Tumorzellen oder Induktion von metabolisierenden und reaktive Sauerstoffspezies detoxifizierenden Enzymen beitragen können, ist derzeit noch ungeklärt [95-96]. Dass bestimmte Flavonoide in niedrigen Konzentrationsbereichen in der Lage sein können, einen unspezifisch stimulierenden Effekt auf die gesamte RNA-Expression von Zellen auszuüben, zeigten unter anderem Experimente von Pfaffl et al. [97], der dazu beigetragen haben könnte, dass in den eigenen Untersuchungen bei niedrigen M1 Konzentrationen proliferations- bzw. stoffwechselstimulierende Effekte beobachtet wurden. Allerdings könnten, da dies bei anderen Flavonoiden wie z.B. Phloretin bekannt ist [98], die Effekte auch durch konzentrationsabhängige, membranverändernde Eigenschaften wie Veränderung der Dipoleigenschaften von Lipiddoppelschichten oder Beeinflussung von zellulären Transportprozessen durch M1 mit einer dadurch verstärkten Akkumulierung von Neutral-Rot hervorgerufen werden.

Einige Struktureigenschaften bzw. Struktur-Wirkungsbeziehungen, die die Zytotoxizität von Flavonoiden determinieren, sind inzwischen bekannt. Höhere dimere oder polymere Moleküle wie z.B. Procyanidine haben ein wesentlich höheres zytotoxisches Potential als monomere, kleinere Stoffe wie z.B. (+)-Catechin [99]. Ob diese Unterschiede *in vivo* über die möglichen lokalen Effekte im Gastrointestinaltrakt hinaus eine Rolle spielen, bleibt angesichts der geringen Bioverfügbarkeit von dimeren und oligomeren Polyphenolen fraglich [100]. Die Zytotoxizität von Flavonoiden *in vitro* scheint weiterhin mit der Löslichkeit der Ausgangskomponenten in wässrigem Medium indirekt bzw. direkt proportional mit der Lipophilie zu korrelieren, und eine Metabolisierung wie O-Methylierung aber auch Glucuronidierungen kann teilweise zu einer Verstärkung der zytotoxischen Eigenschaften führen [101].

Einschränkend sollte hierbei die große methodische Heterogenität der Testsysteme in unterschiedlichen Zellkultur-Modellen zur Untersuchung von Zytotoxizität und damit schwierige Vergleichbarkeit untereinander erwähnt werden. Bei den vorliegenden Experimenten wurde eine murine Makrophagen-Zelllinie verwendet, so dass nicht direkt auf ähnliche Wirkung von M1 in humanen Zellen primären Ursprungs geschlossen werden kann. Als Testsystem wurde mit dem Neutral-Rot Test lediglich dieser Test verwendet, da beim Einsatz von Enzymen wie bei MTT-, LDH-, oder ATP-Test die Anwesenheit von Flavonoiden zu Störungen und Interferenzen durch unspezifische Hemmeffekte oder starke Redoxreaktivität der Flavonoide führen kann und sich der Neutral-Rot Test für die meisten Arten von zytotoxischen Mechanismen empfindlicher als die anderen oben genannten darstellte [102].

Im Licht dieser Befunde erscheinen die hier beobachteten gering ausgeprägten zytotoxischen Eigenschaften von M1 im gewählten Modell plausibel und sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht unmittelbar für die im Folgenden beschriebenen Wirkungen auf die iNOS verantwortlich sein.

1.2.5 Ergebnisse der Hemmung der NO-Freisetzung und der iNOS-Induktion aus Makrophagen durch M1

Normalisiert auf den Proteingehalt der Zellen bestimmt durch die Methode von Bradford nach der entsprechenden Inkubationszeit, wie unter 2.9.1 Material und Methoden beschrieben, ergab sich durch spezifische Inhibition der iNOS durch L-NIL ein Faktor der Nitrit-Freisetzung von $0,09 \pm 0,02$ (\pm mittlere Abweichung vom Mittelwert) im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Co). Bei Verwendung von Hydrocortison (HC) zur Inhibition der intrazellulären

inflammatorischen Kaskade wurde eine Hemmung auf den Faktor $0,58 \pm 0,06$ gefunden. Der Metabolit M1 hingegen führte zu einem Inhibierungs-Faktor von $0,50 \pm 0,05$, derweil durch den Einsatz der Fraktion I (F I) des Kiefernrintenextraktes der Faktor $0,77 \pm 0,05$ des Kontroll-Wertes (Co) erhalten wurde (Abb. 1.4).

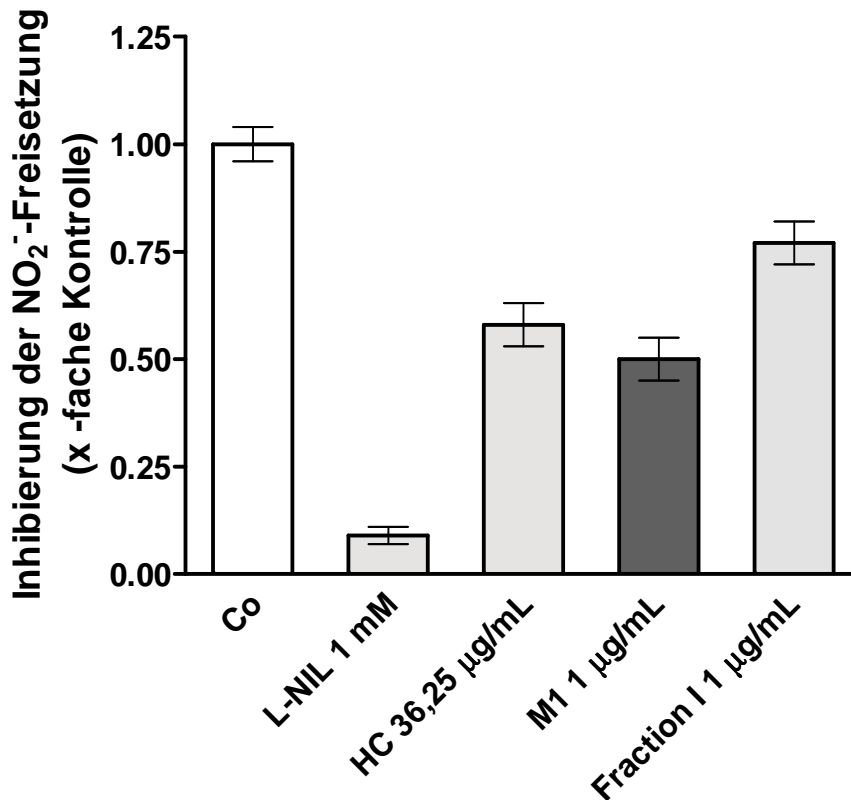


Abb. 1.4: Einfluss von M1 im Vergleich zu Hydrocortison (HC) und Fraktion I (F I) des Kiefernrintenextraktes auf die Nitrit-Produktion muriner Makrophagen nach LPS-Stimulation mit L-NIL als Kontrolle für eine spezifische iNOS-Inhibition. Alle Werte wurden auf den Proteingehalt (Bradford) der Zellen der jeweiligen Proben nach Beendigung der Inkubationszeit (14 h) normalisiert. Exakt gleichen Arbeitsabläufen unterzogene Zellen ohne Inhibitorzusatz dienten als Referenz (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Im nicht durch LPS stimulierten Kontrollansatz lag die absolute Nitrit-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze ($<1 \mu\text{M}$). Bei maximaler Stimulation (Co) wurde eine Nitrit-Konzentration im Überstand von $32,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (produzierte absolute Nitritstoffmenge normalisiert auf den Proteingehalt: $18,37 \mu\text{mol Nitrit pro Gramm Protein}$) gemessen, wohingegen die Inhibition durch L-NIL einen Wert von $2,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ($1,63 \mu\text{mol/g}$) lieferte. Hydrocortison (HC) führte zu einer Verringerung der Konzentration von Nitrit auf $19,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ($10,53 \mu\text{mol/g}$), währenddessen im Ansatz mit dem Metabolit M1 eine Konzentration von $15,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$

B Allgemeiner Teil

(9,21 $\mu\text{mol/g}$) bestimmt wurde. Fraktion I (F I) verringerte die Nitrit-Produktion der Zellen im Vergleich zur Co auf $24,1 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ($14,16 \mu\text{mol/g}$).

Mittels Western-Blotting durchgeführt und ausgewertet wie in 2.9 Material und Methoden beschrieben, wurde zusätzlich die relative Proteinmenge der iNOS in den Ansätzen nach Inkubation mit M1, HC und FI untersucht (Abb. 1.5).

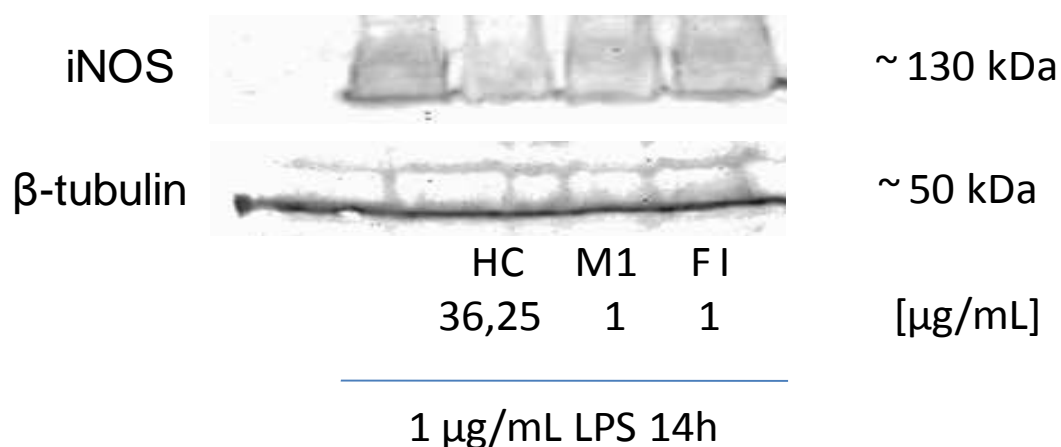


Abb. 1.5: Repräsentativer Western-Blot von Lysaten muriner Makrophagen nach Stimulation mit LPS, zusätzlich inkubiert mit Hydrocortison (HC), M1 und Fraktion I (F I) des Kiefernridenextraktes mit spezifischer Detektion der aufgetrennten iNOS- und β -tubulin-Proteine aus den Zellen durch Immunfärbung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Eine genauere Analyse der Hemmung der Nitrit-Produktion durch M1 in einem umfassenderen Konzentrationsintervall (0,1-50 $\mu\text{g/mL}$) ergab folgende Ergebnisse (Abb. 1.6).

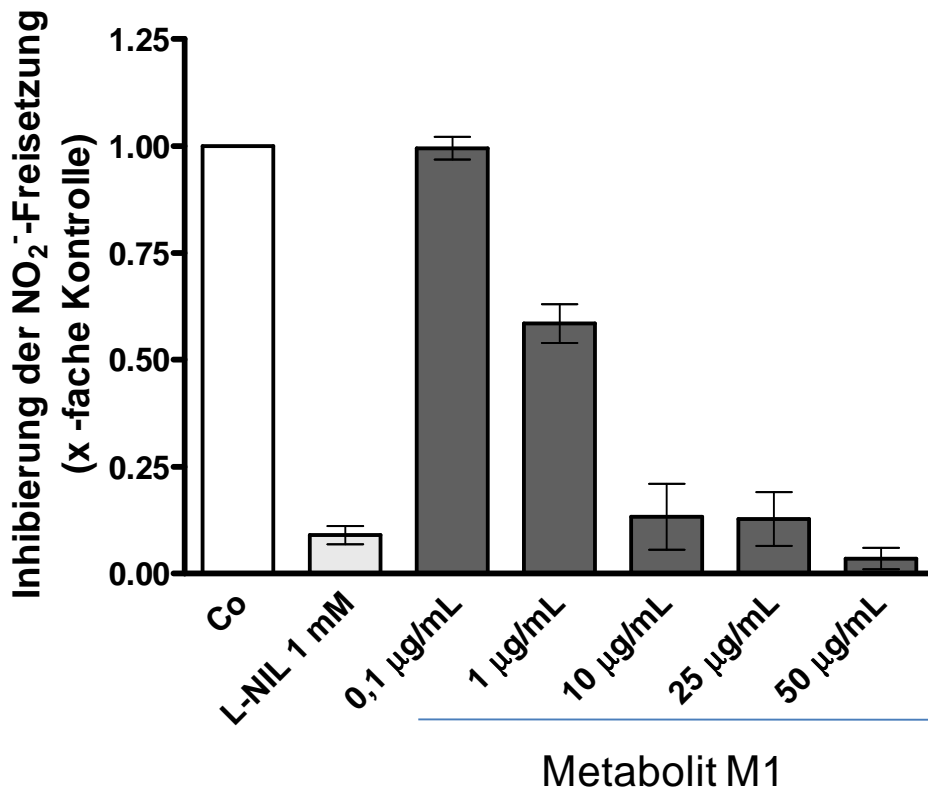


Abb. 1.6: Einfluss des Metaboliten M1 auf Nitrit-Produktion muriner Makrophagen nach LPS-Stimulation. L-NIL diente als Kontrolle für eine spezifische iNOS-Inhibition. Alle Werte wurden auf den Proteingehalt (Bradford) der Zellen der jeweiligen Probe nach Beendigung der Inkubationszeit (14 h) normalisiert. Exakt gleichen Arbeitsabläufen unterzogene Zellen ohne M1- oder Inhibitorzusatz dienten als Referenz (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 4$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Normalisiert auf den Proteingehalt der Zellen bestimmt durch die Methode von Bradford nach der entsprechenden Inkubationszeit wie unter 2.9.1 Material und Methoden beschrieben ergab sich durch spezifische Inhibition der iNOS durch L-NIL ein Faktor von $0,09 \pm 0,01$ (produzierte absolute Nitritstoffmenge normalisiert auf den Proteingehalt: $1,38 \mu\text{mol Nitrit pro Gramm Protein}$) im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (Co). Der Metabolit M1 hingegen führte zu einem Inhibierungs-Faktor von $0,99 \pm 0,02$ ($15,45 \mu\text{mol/g}$) bei 100 ng/mL M1, $0,58 \pm 0,03$ ($9,31 \mu\text{mol/g}$) bei $1 \mu\text{g/mL}$ M1, und $0,13 \pm 0,06$ ($1,73 \mu\text{mol/g}$) bei $10 \mu\text{g/mL}$ M1. Die beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen von M1 ergaben jeweils folgende Faktoren der Inhibition bei $25 \mu\text{g/mL}$ und $50 \mu\text{g/mL}$ bezogen auf die unbehandelte Co: $0,13 \pm 0,05$ ($1,75 \mu\text{mol/g}$) bzw. $0,03 \pm 0,02$ ($0,68 \mu\text{mol/g}$). Die maximale Stimulation mit LPS führte zu einer Nitritstoffmenge von $16,10 \mu\text{mol pro Gramm Protein}$. Der Wert der Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC_{50}) der Nitrit-Bildung lag bei $1,28 \mu\text{g/mL}$ M1 im Medium.

B Allgemeiner Teil

Korrespondierende Daten wurden aus Western-Blot Experimenten der Untersuchungen des Einflusses auf die iNOS-Expression durch M1 über das Konzentrationsintervall 1 µg/mL-50 µg/mL M1 und deren densitometrischer Auswertung ermittelt (Abb. 1.7, Abb. 1.8).

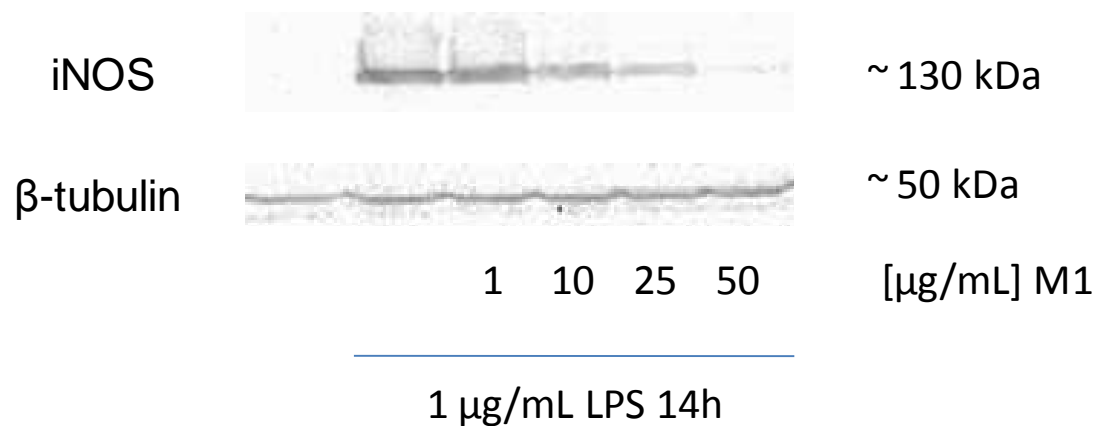


Abb. 1.7: Repräsentativer Western-Blot von Lysaten muriner Makrophagen, inkubiert mit M1 und stimuliert mit LPS, sowie mit spezifischer Detektion der aufgetrennten iNOS- und β-tubulin-Proteine aus den Zellen durch Immunfärbung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

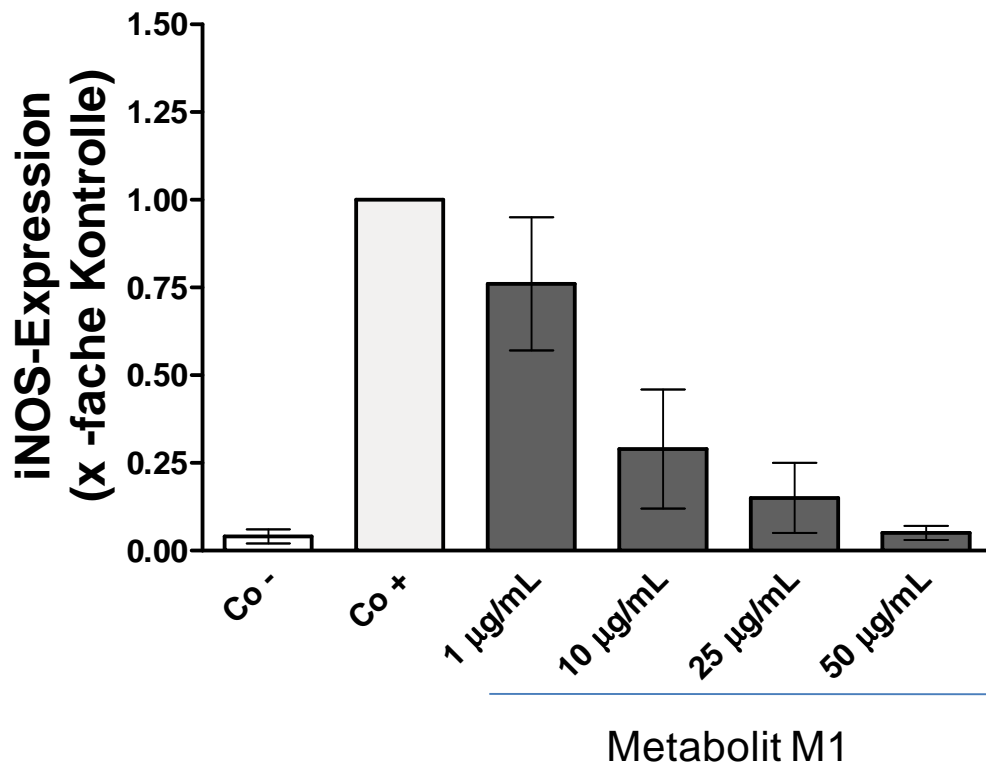


Abb. 1.8: Densitometrische Auswertung durch relativen Bezug der Quotienten aus optischer Bandendichte der angefärbten iNOS-Proteine im Zähler und Bandendichte von β -tubulin-Proteinen zur Normalisierung und Ladungskontrolle im Nenner dreier Western-Blots von Lysaten muriner Makrophagen, die mit LPS und M1 inkubiert und wie unter 2.9 Material und Methoden beschrieben behandelt wurden, auf die unbehandelte Kontrolle (Co) mit maximaler Stimulation. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

Es wurde ein deutlich konzentrationsabhängiger, hemmender Einfluss von M1 auf die Proteinexpression der iNOS nach Stimulation mit LPS gefunden (Abb. 1.8). Nicht mit LPS stimulierte Zellen zeigten hinsichtlich der Nachweisgrenze marginale iNOS-Expression, wohingegen LPS im Medium zu einer deutlichen iNOS-Induktion führte. Bei zusätzlichem Einsatz von 1 $\mu\text{g/mL}$ M1 belief sich der Faktor der Inhibition im Verhältnis zur maximal stimulierten Kontrolle (Co) in diesen Versuchen auf $0,76 \pm 0,19$ und entsprechend bei 10 $\mu\text{g/mL}$ M1 auf $0,29 \pm 0,17$. Die demnach höheren Konzentrationen von M1 mit 25 und 50 $\mu\text{g/mL}$ führten zu Faktoren von $0,15 \pm 0,10$ bzw. $0,05 \pm 0,02$. Der Wert der Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC_{50}) der iNOS-Expression lag bei 3,78 $\mu\text{g/mL}$ M1 im Medium.

1.2.6 Diskussion des Einflusses von M1 auf NO und iNOS

Es konnte gezeigt werden, dass der *in vivo* entstehende Flavonoid-Metabolit M1 einen konzentrationsabhängigen hemmenden Einfluss sowohl auf die Proteinexpression der iNOS als auch auf die NO-Produktion in einem Makrophagen-Zellkulturmodell hat. Im Vergleich der Massenkonzentration mit Fraktion I des Kiefernriindenextraktes (F I), deren monomere Bestandteile nach peroraler Einnahme des Extraktes grösstenteils im Plasma erscheinen, und Hydrocortison (HC) zeigte M1 einen stärkeren Hemmeffekt auf die Nitrit-Entstehung nach einem Entzündungsreiz. Die Bedeutung und Relevanz dieser Ergebnisse sollen im Folgenden genauer diskutiert werden.

1.2.6.1 Radikalfänger-Eigenschaften von und Hemmung der Nitrit-Freisetzung durch M1

Zunächst kann festgestellt werden, dass im Vergleich zu den in eigenen Versuchen erhaltenen Konzentrationen von Nitrit im Medium nach maximaler Stimulation mit LPS in Modellen mit gleicher Zelllinie und vergleichbarem Inkubations-Zeitintervall in mehreren Publikationen sehr ähnliche absolute Nitrit-Konzentrationen im Zellkulturüberstand mit Werten zwischen 30 und 40 μM Nitrit erreicht wurden [103-104]. Ebenso konnte dort eine Hemmung der Nitrit-Entstehung durch den Einsatz von HC beobachtet werden [104].

Zum ersten Mal konnte somit ein direkter Einfluss des Metaboliten M1 auf das iNOS-System gezeigt werden. Für die Struktur 5-(3,4,5-trihydroxy)-dihydrofuran-2(3H)-on, also M1 mit einer zusätzlichen, dritten vicinalen Hydroxylfunktion am Benzenring, die nach der Einnahme von grünem Tee im Darm gebildet wird, wurde durch Einsatz einer Konzentration von 20 μM ($\approx 5 \mu\text{g/mL}$) eine 50 %ige Hemmung der NO-Produktion – somit in vergleichbarer Größenordnung relativ zu den eigenen Untersuchungen (42 %ige Hemmung bei 1 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 5 \mu\text{M}$) M1; 87 %ige Hemmung bei 10 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 48 \mu\text{M}$) M1) – bei der gleichen mit LPS stimulierten Makrophagen-Zelllinie dargestellt [105]. Diese Einordnung unterstützend scheint eine weitere Hydroxyl-Funktion am Benzenring der M1 Struktur aller Wahrscheinlichkeit nach keinen großen Einfluss auf die Eigenschaften des direkten NO-Radikal Scavenging zu haben, was entsprechend für die Vorläufermoleküle (+)-Galocatechin und (+)-Catechin untersucht und bestätigt wurde [106]. Im Gegensatz dazu steht die Reaktion mit dem reaktiveren Superoxid-Anion, wo ein trihydroxylierter Aromat offensichtlich aktiver im Vergleich zum dihydroxylierten Flavonoid B-Ring zu sein scheint. Überraschenderweise zeigte das M1-Vorläufermolekül (+)-Catechin in mehreren Arbeiten mit dem gleichen Zellkulturmodell für nitrosativen Stress auch in hohen Konzentrationen von 100, 224 bzw. 500 μM (29, 65 bzw. 145 $\mu\text{g/mL}$) nur sehr schwache Aktivität in Bezug auf eine NO-

Radikalfängereigenschaft [107-109]. Dies ließe sich, da die Fraktion I auch (+)-Catechin neben anderen monomeren Bestandteilen des Kiefernrintenextraktes enthält, mit den vorliegenden Versuchen zur Deckung bringen, so dass über eine Aktivitätssteigerung durch Metabolisierung spekuliert werden könnte, obwohl die genaue Stöchiometrie und das Ausmaß der *in vivo* Umwandlung zu M1 bislang nicht aufgeklärt sind. Beim Quenching von Singulett-Sauerstoff jedoch schneidet (+)-Catechin offenbar aufgrund seiner Stereochemie besser ab als alle anderen getesteten Flavonoide [110]. Ähnliche Verhältnisse, genauer eine schwache NO- jedoch stärkere O₂⁻-Radikalfängereigenschaften, konnte – allerdings bei Verwendung einer kinetischen Methode mit einer NO-sensitiven Elektrode – auch für Quercetin gefunden werden [48]. Verschiedene Arbeiten zeigten ebenfalls eine deutliche anti-oxidative Eigenschaft von M1 bei Verwendung verschiedener *in vitro*-Testsysteme wie den ORAC- (Oxygen radical absorbance capacity), FRAP- (Ferric reducing antioxidant potential), DPPH- (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-Radikal), NBT-(nitroblue tetrazolium) und AAPH- (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)) -Tests [23, 27], bei welchen M1 bis auf eine Ausnahme [111] stärkere anti-oxidative Eigenschaften als (+)-Catechin zeigte. Wie zu erwarten hängt die anti-oxidative Potenz stark von den Eigenschaften und der Chemie der entstandenen Radikale in der jeweiligen Mikroumgebung sowie von der Flexibilität und Stereochemie der interagierenden Moleküle ab, wobei zelluläre Testsysteme den klassischen oben genannten *in vitro* Tests hinsichtlich der Verteilung, Kinetik sowie Dynamik und damit bezüglich einer humanphysiologisch relevanteren Aussage überlegen sein dürften.

Ein nicht außer Acht zu lassender Grund für die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der klassischen *in vitro* Tests und zellulären Testsystem könnte die teilweise hohe Proteinbindung von Flavonoiden wie z.B. (+)-Catechin darstellen, da M1 im Vergleich zu den meisten anderen Flavonoiden in Fraktion I die deutlich geringste Proteinbindung aufwies und deswegen je nach Testsystem in unterschiedlichem Ausmaß verfügbar wäre [26].

Übereinstimmend mit der Tatsache, dass Flavonoid-Strukturen und ihre korrespondierenden Redoxpaare – insbesondere das Catechol-Strukturmerkmal des B-Ringes, das auch beim Metaboliten M1 konserviert ist – im allgemeinen relativ niedrige Redoxpotentiale mit < 0,2 V gegen SCE (saturated calomel electrode) [112] aufweisen (Brenzkatechin E° = 0,8 V gegen SHE (standard hydrogen electrode) [113]) und somit eine Reaktion mit einem oxidierenden Radikal wahrscheinlicher würde, wurde auch in den vorliegenden Untersuchungen offensichtlich eine kompetitive Hemmung der Reaktion von NO mit Sauerstoff zum Nitrit durch M1 gefunden. Allerdings ist das eigentliche NO-Radikal

im Vergleich zu anderen physiologisch vorkommenden Sauerstoffradikalen wie dem Superoxid- oder Peroxynitrit-Ion wesentlich weniger reaktiv und oxidierend, jedoch damit auch selektiver, was sich in einem berechneten Redoxpotential für NO zum Triplett-Zustand des Nitroxyl-Anions ($^3\text{NO}^-$) von -0,8 V gegen SHE zeigt [114]. Welcher Mechanismus nun der Reaktion von NO mit Flavonoiden zugrunde liegt, über welche reaktiven Zwischenstufen wie z.B. Nitroso-addukte oder auto-oxidative, radikalische Flavonoid-Strukturen diese Reaktion abläuft, sowie die genaue zeitliche und räumliche Auflösung der Reaktion, bleibt bislang spekulativ und aufzuklären. Ein möglicher Weg könnte analog der Reaktion von NO mit Catecholaminen die Entstehung von 6-Nitro-derivaten sein [115], was in der Konsequenz z.B. im Hirnstoffwechsel eine vor nitrosativem Stress schützende Wirkung durch M1 von verschiedenen Neurotransmittern bedeutete, sofern M1 die Blut-Hirnschranke überwindet. Ebenfalls bekannt ist die pathologische Bildung von 3-Nitrotyrosin-Strukturen durch übermäßig freigesetztes NO, die bei vielen, im Speziellen auch neuronalen Erkrankungsformenkreisen eine Rolle spielen [116]. M1 könnte hier in pseudosubstratartige protektive Funktion erfüllen.

Als Limitierung der möglichen aus den vorliegenden Untersuchungen zu ziehenden Schlussfolgerungen muss erwähnt werden, dass sich die NO-Biologie in dem Modell mit murinen Makrophagen von der humaner Makrophagen unterscheidet, so dass Unwägbarkeiten hinsichtlich einer Übertragbarkeit auf die Verhältnisse im Menschen entstehen [117]. Die eingesetzte Konzentration von HC war in diesem Modell mit 36,25 µg/mL im Vergleich zu humanphysiologisch vorkommenden Konzentrationen von bis zu 0,25 µg/mL [118] relativ hoch, was wiederum mit der unterschiedlichen Regulierung bei murinen im Vergleich zu humanen Zellen sowie des starken Ansprechens inflammatorischer Signalwege durch Einsatz von LPS bei dieser Zelllinie zusammenhängen könnte. Desweiteren ist der zelluläre Stoffwechsel von Nitrit bzw. salpetriger Säure bislang keineswegs verstanden [119] und deshalb – um die Messung von Nitrit-Artefakten aus evtl. anderen Stoffwechselwegen auszuschliessen – eine Erhöhung der Nitrit-Konzentrationen im Medium durch entsprechende Kontrollen wie z.B. den Einsatz von spezifischen iNOS-Inhibitoren wie L-NIL verifiziert werden musste. Da der vermutlich im Darm entstehende Metabolit M1 biotransformatorischen Prozessen unterworfen ist und deswegen im Plasma hauptsächlich an Glucose und/oder Sulfat gebunden vorkommt [24], erscheint es fraglich, ob die gemessenen Effekte des unkonjugierten Moleküls von humanphysiologischer Relevanz sind. Jedoch konnte auch schon für andere Flavonoide wie konjugiertes Luteolin gezeigt werden, dass z.B. Glucuronidasen in der Mikroumgebung von entzündlichem Geschehen oder Tumorzellen besonders exprimiert und aktiv sind, und damit das freie Molekül wiederum

gerade an diesem diskreten Wirkort eine Funktion ausüben könnte [120]. Ob dann durch Anreicherung – für die es wie auch unter 1.3 beschrieben erste Hinweise gibt – lokale Konzentrationen, die vergleichbar mit der hier im oberen ng/mL-Bereich gefundenen, für eine Beeinflussung des iNOS-Systems notwendigen, erreicht werden können, bleibt bislang fraglich. Im Plasma wurden bislang lediglich Konzentrationen im unteren ng/mL-Bereich gefunden [24].

Während lokale zum Teil antibiotische Effekte von Flavonoiden auf Bakterien im Darm [121] beschrieben wurden – auch mit Blick auf mögliche Effekte, die die Pathophysiologie von entzündlichen Darmerkrankungen beeinflussen – scheint interessanterweise eine eigene bakterielle NO-Synthase von z.B. Staphylokokken diese Keime vor der Wirkung von Antibiotika durch direkte chemische Modifikation oder Verhinderung eines Fenton-Reaktionsablaufs zu schützen [122]. Die Anwesenheit von NO als Radikal führt dabei unter anderem zum Abbruch der durch die Antibiotika erzeugten radikalischen Kettenreaktionen. Damit entstünde möglicherweise ein weiteres potentielles, zukünftiges Anwendungsgebiet für NO-Radikalfänger wie eben auch M1 als synergistische Komponente antibiotischer Therapie. Teilweise wurden schon sich ergänzende Effekte von Flavonoiden und Antibiotika gezeigt [123].

NO reagiert mit O₂ zum Hauptabbauprodukt Nitrit [124], was wie deutlich gezeigt durch den Metabolit M1 konzentrationsabhängig beeinflusst werden kann. Somit scheint M1 zunächst im zellulären Kontext des Makrophagen-Modells ein NO-Radikalfänger im Einklang mit seiner zuvor in klassischen *in vitro* Tests bestätigten, anti-oxidativen Potenz zu sein. Inwieweit M1 spezifisch Einfluss auf bestimmte Signalkaskaden bei einem (chronischen) Entzündungsreiz nimmt, und ob eine spezielle Pharmakokinetik des Metaboliten dabei eine Rolle spielen kann, sollte weiter untersucht werden.

1.2.6.2 Hemmung der iNOS-Induktion durch M1

Erstmals wurde auch ein konzentrationsabhängiger Einfluss des Metaboliten M1 direkt auf die Proteinexpression der iNOS gezeigt. Die oben in 1.2.6.1 diskutierte verringerte Nitrit-Entstehung im Zellkulturüberstand scheint deshalb zumindest teilweise auf einer Hemmung der iNOS-Proteininduktion zu beruhen.

Das Enzym iNOS kann in einer Vielzahl von Zellen – vor allem aber in Immunzellen und speziell in Makrophagen – exprimiert werden, und wird durch Cytokine und mikrobielle Stimuli induziert, wonach es zur Generierung hoher, lokaler NO-Konzentrationen in der Lage

ist [125]. M1 kann ab einer Konzentration von 1 µg/mL ($\approx 5 \mu\text{M}$) die Induktion des iNOS Enzyms durch LPS hemmen, allerdings beim Vergleich der relativen Faktoren nicht so stark wie die Nitrit-Entstehung ($0,76 \pm 0,19$ iNOS-Induktions- vs. $0,58 \pm 0,03$ Nitrit-Inhibierungsfaktor bei 1 µg/mL M1 relativ zur Kontrolle). Dies kann einerseits an der unterschiedlichen, methodischen Auflösung der Assay-Techniken liegen, da die Streuung der Western-Blot Experimente höher war, und andererseits auf einen synergistischen Effekt hinsichtlich eines Eingreifens in bestimmte Abschnitte der Signalkaskaden zur iNOS-Protein-Induktion in Kombination mit der NO-Radikalfängereigenschaft von M1 hindeuten. Die Tatsache, dass HC hauptsächlich genomisch wirkt und im Gegensatz dazu M1 bei einer Konzentration von 1 µg/mL einen schwachen Einfluss auf die iNOS-Proteinexpression zeigte, sprechen eher dafür, dass M1 dual in die Proteinexpression und als Radikalfänger in die inflammatorische Kaskade einzugreifen vermag.

Vergleichbare Ergebnisse von der Beeinflussung der iNOS-Proteinexpression durch Western-Blot-Experimente für M1 liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor, während Untersuchungen an murinen Makrophagen für das Vorläufermolekül (+)-Catechin in vergleichbarer Konzentration von 10 µM ($\approx 3 \mu\text{g/mL}$) für ein ähnliches Zeitintervall (18 h) kaum eine Inhibierung der iNOS-Induktion mit einem Faktor $> 0,9$ relativ zur Kontrolle fanden [126], was sich auch mit der in 1.2.6.1 erwähnten, absenten Inhibierung der Nitrit-Entstehung durch (+)-Catechin deckt.

Die iNOS wird hauptsächlich auf der Expressionsebene reguliert [127]. An welcher Stelle M1 in die Aktivierung eingreift – möglich durch direkte Interaktion mit 1) LPS durch Bindung von Flavonoiden an Lipid-A Region, 2) Rezeptoren wie z.B. Toll-like receptor 4 (TLR4), 3) downstream-Kinasen wie z.B. mitogen-activated protein kinases (MAPKs), 4) Promotoren und Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF-κB, sowie durch 5) Einflüsse auf mRNA-Stabilisierung und Translation [128] – oder ob eine eher unspezifische Puffer- bzw. abschwächende Wirkung auf das gesamte System ausgeübt wird, ist bislang nicht bekannt.

Interessanterweise wurde in einer Arbeit von Roh et al. aus dem Jahr 2011 [129] gefunden, dass ein im gleichen Zellkulturmodell (RAW 264.7) verwendetes Flavonoid aus der Gruppe der Chalkone, die chemisch mit den Flavanonen nah verwandt und ähnlich den Strukturen nach mikrobieller Öffnung des Flavan-C-Ringes wie in Abb. 1.1 beschrieben sind, durch direkte, spezifische Bindung an den myeloid differentiation factor 2 (MD-2) (ein Co-Rezeptor des TLR4) zur Inhibierung der NF-κB Aktivierung, der darauffolgenden Gen- und somit auch der iNOS-Expression führte. Unterstützt wurde diese These durch umfangreiche *in silico* Modellierungen der Bindung von Flavonoiden an MD-2. Das Glykoprotein, welches sowohl LPS als auch die extrazelluläre Domäne des TLR4 bindet, ist essentiell für die

Erkennung von LPS und damit Aktivierung des TLR4. Die Aktivierung dieses Co-Komplexes führt zur pro-inflammatorischen Zellantwort und kann auch bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie z.B. NASH (nonalcoholic steatohepatitis) eine bedeutende Rolle spielen [130]. Ob dies ein konkreter Angriffspunkt auch für M1 sein kann, muss in künftigen Experimenten geklärt werden.

Obzwar die Untersuchungen der relativen iNOS-Proteinmenge durch Western-Blotting alle upstream-Ereignisse der pro-inflammatorischen Kaskade wie Rezeptor-, transkriptions- und translationsabhängige Interaktionen vor der Bildung des funktionellen Enzyms mit einbezieht, können dabei keine genaueren Darstellungen der jeweiligen Wechselwirkungen auf den unterschiedlichen Ebenen getroffen werden, was die Aussage über einen potentiellen Wirkmechanismus von M1 limitiert. Weiter bleibt das klassische Problem der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Zellkultur-Versuchen auf *in vivo* Verhältnisse auch hier aufrecht erhalten, da die in Zellkulturmodellen eingesetzten Konzentration die *in vivo* in humanem Plasma gemessenen um den Faktor 1000 übertreffen ($4,11 \pm 2,08$ ng/mL M1 im Plasma nach Einnahme des Kiefernrintenextraktes [24]). Obwohl bekannt ist, dass ein grosser Anteil der im Darm entstandenen Metabolite wahrscheinlich in den Kreislauf über das Pfortadersystem aufgenommen wird, da die Flavan-ol-Strukturen mit geschätzten 47 % bzw. 83 % [131] der eingenommenen Menge als Metaboliten im Urin wieder ausgeschieden werden, ist die Pharmakokinetik der freien Moleküle an diskreten Wirkorten noch nicht ausreichend bekannt. Leider wurden bislang bei Messungen der Plasmakonzentration von Flavonoiden durch Behandlung der Proben mit Glucuronidase/Sulfatase-Kombinationen häufig keine parallele, direkte Quantifizierung der Sulfat- und Glucuronid-Konjugate hauptsächlich aus Ermangelung an Referenzsubstanzen ausgeführt, so dass wenig über die Effizienz oder Hemmung dieser Enzyme (Glucuronidase/Sulfatase) bei der Proben-Aufarbeitung durch Flavonoide bekannt ist und deshalb Flavonoid-Plasmaspiegel wesentlich unterschätzt werden könnten [132]. Zusätzlich scheint die gefundene (Plasma)-Proteinbindung einiger Flavonoide, die teilweise irreversibel an Proteine gebunden werden, von der analytischen Aufarbeitung samt Extraktion abzuhängen und deswegen die entsprechende Wiederfindung dadurch verringert sein könnte [133]. Da sich bei einer kinetischen Messung mit einer NO-sensitiven Elektrode die Flavonoide im Gegensatz zum Zellkulturmodell wenig in ihrer Potenz NO-Radikale einzufangen unterschieden [48], bleibt aufzuklären, auf welches genaue Verhältnis der Anteil des Einflusses von M1 relativ zu anderen Flavonoiden aus Fraktion I auf direktes NO-Radikal-Scavenging oder auf eine Interaktion mit Prozessen der iNOS-Protein Induktion zurückzuführen ist.

Da die Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch direkte Bindung der iNOS und lokale Freisetzung von NO aktiviert werden kann und sich darum ca. 50 % der induzierten COX-2 Aktivität auf eine S-Nitrosylierung durch NO zurückführen lassen [134], könnte hier ein weiterer wichtiger Grund für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von M1 liegen, zumal bereits auch *in vitro* eine moderate Hemmwirkung von M1 direkt auf COX-2 dargestellt wurde [25].

Somit konnte gezeigt werden, dass der Metabolit M1 die iNOS-Induktion und -Proteinexpression deutlich konzentrationsabhängig beeinflussen kann. Welcher genaue spezifische oder unspezifische Mechanismus die Wirkung von M1 hervorruft, sollte in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

1.3 Ad-/Absorption des Metaboliten M1 an/in murine Makrophagen, humane Endothelzellen und primäre humane Monozyten

Um sich der Frage räumlich und zeitlich anzunähern, wo und wann der Metabolit M1 in einem physiologischen Kontext seine anti-inflammatorische Wirkung entfaltet, sollte zunächst beantwortet werden, wie M1 sich in Abhängigkeit von der Zeit hinsichtlich der Verteilung zwischen proteinhaltigem Medium und Zellen verhält. Es schließen sich weitere Fragestellungen an wie derart, ob es wahrscheinlich ist, dass M1 in Zellen aufgenommen wird oder sich in bestimmten zellulären Kompartimenten durch Transportmechanismen anreichert.

Die Grundlagen von Sorptions- und Bindungsgleichgewichten von gelösten Molekülen und deren Wechselwirkungen an der Fest/Flüssig-Grenzfläche mit Proteinen, Membranen und Rezeptoren lassen sich zunächst weitestgehend durch sieben intermolekulare Kräfte und Bindungstypen beschreiben. In ansteigender Reihenfolge der Bindungsenergien sind dies hydrophobe-, Dispersions-(van-der-Waalssche Kraft, speziell auch London-Kraft), Wasserstoffbrücken-, Dipol-Dipol- (van-der-Waalssche Kraft, speziell Keesom-Kraft), Ion-Dipol-, Ion-Ion-, und kovalente Wechselwirkungen. Eine Wechselwirkung eines Moleküls mit z.B. Lipiden in Biomembranen unterscheidet sich damit physikochemisch grundsätzlich nicht von der Wechselwirkung mit hydrophoben Proteinen wie etwa eines Transport- oder Kanalproteins und beides wäre somit als Versuch zu werten, die freie Oberflächenenergie hydrophober Festphasen zu reduzieren. Die Reversibilität einer solchen Interaktion von Molekülen ist ein weiteres wichtiges Charakteristikum, so dass bei einer

nicht-van-der-Waalsschen irreversiblen Bindung ohne Desorption von Chemisorption gesprochen wird [135].

Als Transportmotive für die Biomembrangängigkeit von Molekülen können die rein passive Diffusion, ein durch Kanalproteine erleichtert vermittelter passiver Transport, ein aktiver mit dem Verbrauch von Energie gekoppelter Transport, und eine korpuskuläre Absorption in Form von Pinozytose oder Phagozytose verstanden werden.

Die Aufnahme von in wässrigem Medium gelösten Molekülen durch Lipid-Membranen als evolutionär entstandene Diffusionsbarrieren kann anhand der fünf Faustregeln von Lipinski [136] geschätzt werden, die damit hauptsächlich für die Bewertung der Bioverfügbarkeit nach peroraler Aufnahme einer Substanz verwendet werden. Dafür wird ein Molekulargewicht < 500 Da, nicht mehr als fünf Wasserstoff-Donorgruppen, nicht mehr als zehn Wasserstoff-Akzeptorgruppen, und ein Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) ≤ 5 verlangt. Diese Regeln fußen auf der Aufnahme, dass Moleküle hauptsächlich durch passive Diffusions- und Verteilungsmechanismen in von Biomembranen umschlossene Kompartimente aufgenommen werden. M1 widerspricht hierbei keiner dieser Regeln.

Die Erkennung und der Transport von Xenobiotika wie M1 sind in jeder Hinsicht als evolutionäre Prozesse zu verstehen, und neuere Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob die Aufnahme und der Durchtritt von Molekülen durch Biomembranen durch passive Diffusion nicht eher eine Ausnahme anstatt die Regel darstellt [137]. Wenn man bedenkt, dass in vielen untersuchten Biomembranen das Verhältnis Protein/Lipid 1:1 bzw. 3:1 [138] ist (in innerer mitochondrialer Membran 76 % Proteinanteil [139]), kann man sich unschwer vorstellen, dass Proteine je nach Anforderung und evolutionärem Druck im jeweiligen Mikrokompartment stark an der Kontrolle von transmembranären Transportprozessen von Molekülen beteiligt sind. Im Zuge umfangreicher Expressionsstudien wurden bislang Sequenzen im Genom von über 700 verschiedenen Transportern entdeckt, die sich in zwei große Familien, nämlich die solute carrier (SLC) [140] und die ATP-binding cassette carrier (ABC) [141] einteilen lassen.

Die Tatsache, dass viele bislang beschriebene Arzneistoff-Substrate für bestimmte Transporter Analoga von natürlich vorkommenden Verbindungen sind, weist auch deutlich darauf hin, dass große Ähnlichkeiten zwischen den Transportern höherer Organismen und den von z.B. bioaktive sekundäre Metaboliten produzierenden niedrigeren Organismen wie Bakterien oder Pilzen bestehen [141].

Eine Beeinflussung von Membran-Transportern im menschlichen Körper im Speziellen durch Flavonoide wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts prominent durch die

perorale Einnahme von Phlorizin – das zuerst aus der Rinde von Apfelbäumen isoliert wurde – und der daraus resultierenden Glucosurie beschrieben [142], wenn auch damals faktisch ohne Wissen um die molekularen biochemischen Hintergründe. Phlorizin wirkt hierbei – wie heute bekannt ist – an einem mit dem Natrium-Transport gekoppelten Glucosetransporter (sodium-linked glucose transporter = SGLT), der vor allem in Membranen in Dünndarmabschnitten und im renalen Tubulus eine wichtige Rolle bei der Glucose-(Wieder-) Aufnahme spielt [143]. Durch Phlorizin und dessen Aglykon Phloretin lassen sich auch andere Glucosetransporter (GLUT) z.B. der SLC-2 Familie wie GLUT-1 hemmen [144].

Dass Flavonoide aus dem Kiefernridenextrakt, vor allem die monomeren Bestandteile und Abbauprodukte höher kondensierter Procyanidine wie Catechine, Ferulasäure, Kaffeesäure und Taxifolin die systemische Zirkulation – wenn auch in sehr geringen Konzentrationen – erreichen können, wurde deutlich von Grimm gezeigt [24]. Auch die Entstehung von Metaboliten wie M1 mittels Abbau von Catechin-Einheiten durch Darmbakterien und deren Aufnahme in das zentrale Kompartiment wurde bereits dargestellt [24, 79]. Unklarer scheint dabei das Problem, ob die aufgenommenen und *in vivo* gebildeten Flavonoid-Strukturen dabei lediglich ephemere Xenobiotika mit kurzer Halbwertszeit und geringer Bioverfügbarkeit darstellen, deren sich der menschliche Körper durch rasche Metabolisierung und Eliminierung auf schnellstmögliche Weise entledigt, oder ob eine Bindung und Anreicherung in bestimmten Geweben oder Zellen von z.B. wirksamen Metaboliten mit spezifischer Wirkung möglich erscheint. Abweichende aktuelle Ergebnisse in klinischen Studien wurden beispielweise bei der Analyse der Akkumulation von Epigallocatechingallat (EGCG) aus grünem Tee in Prostatagewebe von Prostatakarzinom-Patienten erhalten, wobei eine Studie nach Einnahme von Grüntee eine Verteilung der Ausgangssubstanz ins Gewebe beschrieb [145], dagegen in einer anderen Arbeit nach Einnahme eines Grüntee-Extraktes (Polyphenon E[®]) kein derartiger Befund erhalten wurde [146]. Übersichtsartikel wie z.B. von Passamonti et al. aus dem Jahr 2009 beschreiben die am Anfang stehende, ein weites Feld eröffnende Erforschung der potentiellen Beteiligung verschiedener membranärer Transportsysteme bei Verteilungsprozessen von Flavonoiden [147].

1.3.1 Fragestellung: Zelluläre Ad-/Absorption von M1

Die bereits erwähnte Diskrepanz zwischen den *in vitro* wirksam eingesetzten und im Gegensatz dazu *in vivo* gefundenen Plasma-Konzentrationen von Polyphenolen führt zur Suche nach Erklärungen für die dennoch vornehmlich in epidemiologischen Studien

gefundenen Hinweise [148] für einen Zusammenhang zwischen der Einnahme dieser Substanzen und der Prävention von Krankheiten.

Eine der Ursachen könnte in einer speziellen Pharmakokinetik der Substanzen wie M1 (mit der begrifflichen Prämisse als Pharmakon betrachtet zu werden) liegen. Die zugrunde liegende bislang spekulative These ist, dass sich Flavonoide oder deren Metabolite in bestimmten Zellen und Mikrokompartimenten über die Zeit anreichern, und dort evtl. höhere Konzentrationen erreicht werden als die bislang im Plasma gefundenen. Fraglich in diesem Zusammenhang bleibt auch, ob Flavonoide für Ihre Wirkung in Analogie zu Antibiotika kurzzeitig hohe lokale Konzentrationsmaxima benötigen oder einen gewissen Konzentrations-Schwellenwert über eine diskrete Zeitspanne gegebenenfalls wiederholt überschreiten müssen [149]. Zur Klärung dieses Sachverhaltes steht am Anfang zunächst die Frage, wie sich die Substanzen zwischen wässrigen Lösungen und festen Biomembran-Phasen – wie hier der Fall zwischen proteinhaltigem Zellkulturmedium und Zellen – verteilen. Derartige Verteilungsvorgänge wurden im Gegensatz zur Aufnahme, Metabolisierung und Exkretion bislang seltener erforscht [150]. Da bei entzündlichen Prozessen bestimmte Zellen eine idiosynkratische Rolle spielen, wurden in den hier vorliegenden Versuchen in diesem Zusammenhang besonders relevante Zellen wie Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen für die Verteilungsversuche ausgewählt. Zur Influxhemmung wurde zusätzlich Phloretin eingesetzt, um zu überprüfen, ob dadurch der membranäre Transport von M1 beeinflusst werden konnte. Phloretin wurde vorher bereits von Kurlbaum [27] zur Modulierung des transmembranären Transports in humanen Erythrozyten verwendet.

Zunächst sollte also untersucht werden, wie sich M1 zwischen Lösung und Zellen über die Zeit verteilt und ob ein möglicher Transport inhibiert werden konnte.

1.3.2 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

In den Versuchen wurde Makrophagen und Monozyten in einem Verhältnis physiologischer Relevanz mit M1 (200 ng/mL ($\approx 1 \mu\text{M}$) M1 mit 5×10^6 Zellen/mL) in Medium mit 10 % FBS suspendiert und über die Zeit bei 37 °C mit leichter Schüttelbewegung in geschlossenen Gefäßen inkubiert wie unter 3.2.3 im Teil Material und Methoden genauer beschrieben. Für jeden Zeitpunkt der Probenahme aus dem Überstand (0, 5, 15, 30, 60, 120 min) wurde ein Ansatz verwendet, zu welchem jeweils eine gleich behandelte Kontrolle nur ohne den Zusatz der Zellen mitgeführt und untersucht wurde. Die Proben wurden für die Variable der Influxhemmung zusätzlich zu M1 mit 55 $\mu\text{g/mL}$ Phloretin ($\approx 200 \mu\text{M}$) sowohl in den Ansätzen

mit als auch ohne Zellen inkubiert und einer Analyse zu den oben genannten Zeitpunkten unterzogen. Die verbleibende Konzentration von M1 im Überstand der Zellen wurde jeweils mittels HPLC-Analytik quantifiziert und auf die Werte der Kontrollen bezogen (Probe/Co).

Für die Versuche mit humanen Endothelzellen wurden die Zellen in 6-well Zellkulturplatten ausgebracht und bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden sie wie oben ausgeführt für jede Variable und Kontrolle entsprechend mit M1 bzw. M1 und Phloretin behandelt. Der Unterschied zu den Versuchen mit suspendierten Monozyten und Makrophagen bestand darin, dass hier die Versuche mit einer festen adhärennten Zellschicht polarisierter Zellen in Zellkulturplatten durchgeführt wurden.

1.3.3 Ergebnisse

1.3.3.1 Ad-/Absorption von M1 an/in murine Makrophagen und humane Monozyten

Die Bindung bzw. die Aufnahme von M1 in murine Makrophagen und primäre humane Monozyten wurde mit und ohne die Anwesenheit von Phloretin bestimmt (Abb. 1.9). Dabei wurde ersichtlich, dass eine Ad- oder Absorption von M1 an oder in die Zellen über einen Zeitraum von 120 min stattfand. In Gegenwart von murinen RAW 264.7 Makrophagen verringerte sich die M1 Konzentration um 57 % mit Quotienten (Probe/Co) von $1,03 \pm 0,01$ am Zeitpunkt $t=0$, wohingegen beim Zeitpunkt $t=120$ min ein Quotient von $0,44 \pm 0,09$ bestimmt wurde. Der Zusatz von Phloretin führte zu einer Abnahme der M1 Konzentration um 48 %, was sich in den Quotienten $0,96 \pm 0,01$ bei $t=0$ und $0,50 \pm 0,04$ bei $t=120$ min widerspiegelte. Eine deutliche Verlangsamung der M1 Konzentrationsabnahme durch Phloretin konnte festgestellt werden, was sich im Unterschied der Quotienten bei $t=60$ min zeigte ($0,55 \pm 0,11$ nur Makrophagen mit M1, $0,75 \pm 0,01$ Makrophagen mit M1 und Phloretin).

Die M1 Konzentration im Überstand des Ansatzes mit Zellen verringerte sich ebenfalls deutlich bei den humanen Monozyten um 92 %, was aus den Werten der Quotienten (Probe/Co) mit $0,92 \pm 0,01$ beim Zeitpunkt $t=0$ und $0,07 \pm 0,01$ nach 120 min hervorging. Im Gegensatz dazu wurde die M1 Konzentration im Versuch mit Monozyten und M1 plus Phloretin nur um 61 % geringer ($0,97 \pm 0,07$ bei $t=0$ und $0,38 \pm 0,06$ bei $t=120$ min). Zwischen den Zeitpunkten $t=0$ und $t=15$ nahm die M1 Konzentration durch den Phloretin-Zusatz im Gegensatz zu dem ohne Phloretin kaum ab (Abb. 1.9).

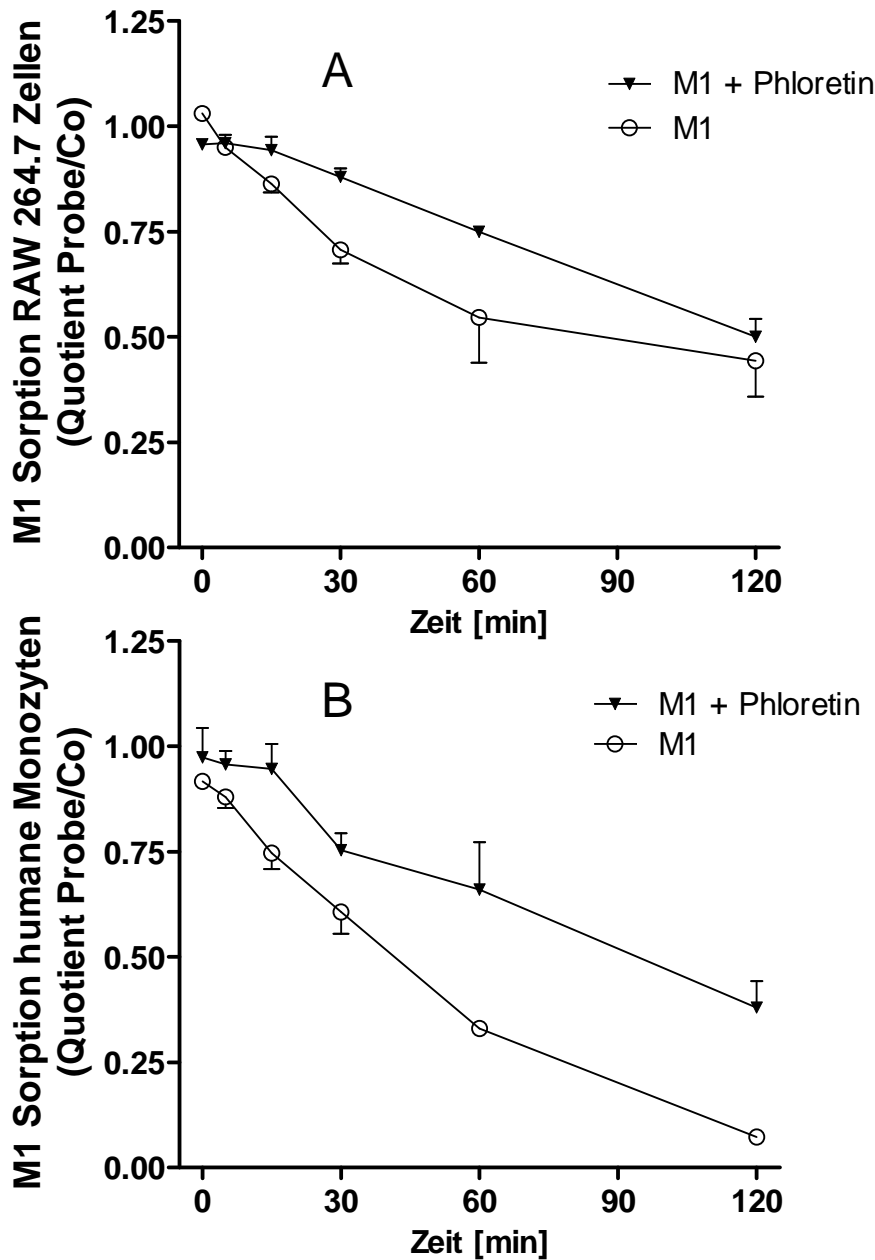


Abb. 1.9: Ad- bzw. Absorption von M1 an/in murine Makrophagen (A) und primäre humane Monozyten (B). Die Zellen wurde in Medium mit 10 % FBS suspendiert und bei 37 °C entweder nur mit 200 ng/mL M1 oder zusätzlich nach 10minütiger Vorinkubation mit 55 µg/mL Phloretin und M1 inkubiert. Parallele Kontrolleexperimente ohne Zellen wurden entsprechend ausgeführt. Die verbleibende Konzentration von M1 im Überstand der Zellen wurde zu den Zeitpunkten $t = 0, 5, 15, 30, 60, 120$ min mittels HPLC-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Quotienten der M1 Konzentration aus dem Ansatz mit Zellen (Probe) und der jeweiligen Kontrolle (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3, \pm$ Standardabweichung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

In Abb. 1.10 wurden die Quotienten-Werte der jeweiligen Kontrollversuche für jede Variable der Versuchsreihen mit Makrophagen und Monozyten bezogen auf den Mittelwert des Zeitpunkts $t=0$ aufgetragen, um eine mögliche direkte Beeinflussung von M1 durch Phloretin zu erkennen und die Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen zu untersuchen. Es konnten keine relevanten Unterschiede über den Zeitverlauf der Versuche gefunden werden.

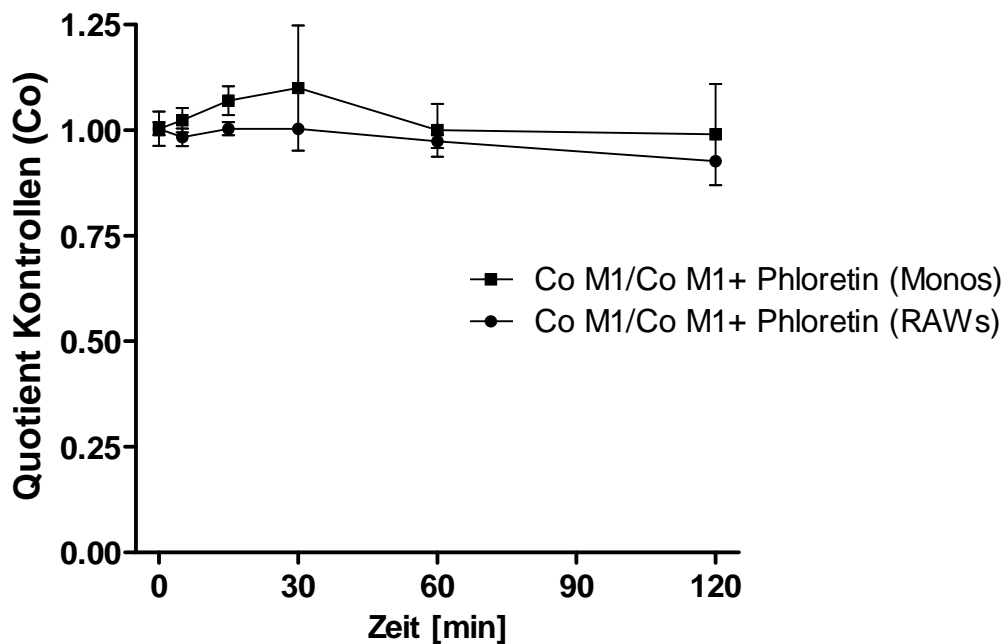


Abb. 1.10: Quotienten der M1 Konzentrationen der Kontrollexperimente (Co) aus den Inkubationsversuche mit Monozyten (Monos) bzw. Makrophagen (RAWs) mit M1 (200 ng/mL) und zusätzlich mit Phloretin (55 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Werte wurden jeweils auf den Mittelwert der M1-Werte des initialen Zeitpunkts $t=0$ bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n=3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

1.3.3.2 Ad-/Adsorption von M1 an/in humane Endothelzellen

Die Bindung bzw. die Aufnahme von M1 wurde auch mit humanen Endothelzellen (EA.hy 926) mit und ohne Phloretin-Zusatz untersucht (Abb. 1.11). Die M1 Konzentration sank dabei um 76 % nach 120 min wiedergegeben durch die Quotienten (Probe/Co) $1,03 \pm 0,01$ bei $t=0$ und $0,24 \pm 0,05$ bei $t=120$ min. Der additive Einsatz von Phloretin führte dagegen zu einer Konzentrationsabnahme von M1 um 62 % ausgedrückt durch die Quotienten $1,00 \pm 0,02$ bei $t=0$ und $0,38 \pm 0,14$ bei $t=120$ min. Auffällig war auch hier die deutliche Verlangsamung der Konzentrationsabnahme durch Phloretin (Quotienten bei $t=60$ mit M1 und Endothelzellen $0,48 \pm 0,21$; demgegenüber $0,83 \pm 0,21$ mit M1, Phloretin und Endothelzellen).

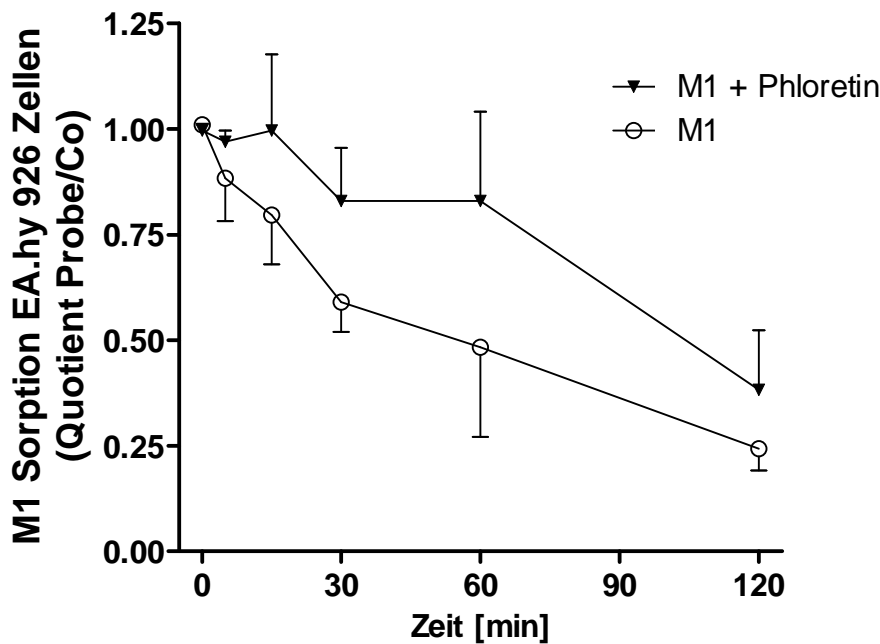


Abb. 1.11: Ad- bzw. Absorption von M1 an/in humane Endothelzellen. Die Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten ausgebracht, bis zur Konfluenz kultiviert und bei 37 °C entweder nur mit 200 ng/mL M1 oder zusätzlich nach 10minütiger Vorinkubation mit 55 µg/mL Phloretin und M1 inkubiert. Parallele Kontrollexperimente ohne Zellen wurden entsprechend in Zellkulturplatten ausgeführt. Die verbleibende Konzentration von M1 im Überstand der Zellen wurde zu den Zeitpunkten t= 0, 5, 15, 30, 60, 120 min mittels HPLC-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Quotienten der M1 Konzentration aus dem Ansatz mit Zellen (Probe) und der jeweiligen Kontrolle (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit n = 3, ± Standardabweichung. Wiedergabe [81] mit Genehmigung von Elsevier.

1.3.4 Diskussion

Durch die Resultate der vorliegenden Untersuchungen konnte erstmalig eine Verteilung des Metaboliten M1 in proteinhaltigem Medium mit Zellen und eine Bindung dessen an primäre humane Monozyten, humane Endothelzellen und murine Makrophagen gezeigt werden. Diese Umverteilung bzw. die Bindung von M1 wurde durch den Zusatz von Phloretin, das sich als Hemmstoff von transmembranären zellulären Transportprozessen auszeichnet, deutlich verringert. Dies könnte auf einen Carrier-vermittelten passiven Transport oder aktive Transportmechanismen und Aufnahme hinweisen.

Die großen Unterschiede zwischen *in vitro* wirksamen und im Plasma *in vivo* gefundenen Flavonoid-Konzentrationen führten induktiv zu der Annahme, dass auch Verteilungsprozesse bei der Wirkung und Aktivität von Flavonoiden eine bedeutende Rolle spielen. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Ad-/Absorption an/in Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen von jeweils mehr als ~50 % nach 60 min bis hin zu 92 % der M1 Ausgangskonzentration (200 ng/mL) im Vergleich zu Kontrollversuchen in

proteinhaltigem Medium über eine Zeit von 120 min gefunden. Für zahlreiche Arzneistoffe wurden bereits Kanal-vermittelte Transportprozesse und eine Anreicherung in bestimmten Geweben beschrieben [151], allerdings ist bislang wenig über die Verteilung in Zellen und Bindung an Zelloberflächen von Flavonoiden bekannt. Kurlbaum untersuchte 2011 erstmalig die Proteinbindung von Bestandteilen und im Körper entstehende Metaboliten des Kiefernextraktes, darunter auch den Metabolit M1 [26], der dabei allerdings die geringste Bindung der untersuchten monomeren Substanzen zu Plasmaproteinen zeigte. Für Quercetin und Resveratrol wurde eine Assoziation dieser Substanzen mit Blutzellen festgestellt, was sich in einer deutlich höheren Wiederfindung der Substanzen bei der Analyse von Blut im Vergleich zum abgetrennten Plasmaanteil widerspiegelte (Resveratrol-Bestimmung aus Plasma ~24 % Wiederfindung, demgegenüber aus Vollblut ~75 %) [152]. Hinweise für eine Aufnahme von Flavonoiden – in diesem Fall Rutosid-Strukturen – in Bereiche des venösen Endothels wurden bereits 1992 von Neumann et al. unter Einsatz einer Laser-Scanning-Mikroskopie Technik gefunden [153].

Um nun der Frage nachzugehen, ob eine rein passive unspezifische Sorption an die Zelloberfläche von M1 der Grund für die verringerte Konzentration im Medium sein konnte, wurde der Influxhemmer Phloretin (55 µg/mL) zugesetzt. Das Flavonoid Phloretin beeinflusst unspezifisch membranäre Transportprozesse in nicht vollständig aufgeklärter Weise, wobei die Substanz offensichtlich die Struktur und das Dipolpotential von Biomembranen verändert [98, 154]. Am prominentesten dürfte wie oben bereits erwähnt die Beeinflussung des Glucosetransports und dabei speziell des ubiquitär vorkommenden Transporters für Glucose GLUT-1 z.B. in Erythrozyten mit K_i -Werten von 0,37 µM sein [155]. Die Anwesenheit von Phloretin im Medium verminderte die Bindung bzw. Aufnahme von M1 vor allem innerhalb der ersten 15 min der Inkubationszeit nahezu vollständig und im weiteren Verlauf blieb die Konzentration von M1 im Überstand der Zellen stets höher als in den Ansätzen ohne Phloretin-Zusatz. Da der Zusatz von Phloretin keine Auswirkungen (die mit der hier verwendeten Analyse-Methode direkt erfasst werden konnten) auf die Stabilität von M1 beim Vergleich der Kontrollversuche zeigte (Abb. 1.10), könnte diese Verringerung bzw. Verzögerung der zellulären Aufnahme von M1 durch Phloretin als Hinweis aufgefasst werden, dass M1 über bestimmte Kanalproteine wie z.B. GLUT-1 aufgenommen werden kann. GLUT-1 wird sowohl in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert [156-158]. Für Quercetin wurde ein Durchtritt durch dieses Kanalprotein bereits dargestellt [159]. In den wenigen bislang publizierten heterogenen Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Flavonoiden wurde die Beteiligung unterschiedlicher Transportsysteme beschrieben. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Endothelzelllinie EA.hy 926 wurde durch Maestro

et al. die Aufnahme des Flavonoids Quercetin (Inkubationskonzentration 10 μM , $\sim 3 \mu\text{g/mL}$) gezeigt, vermutlich unter Beteiligung des Kanalproteins Bilitranslocase, das für den transmembranären Transport von Bilirubin verantwortlich zeichnet [160].

In einer Veröffentlichung von Lancon et al. wurde die Untersuchung der Aufnahme von radioaktiv markiertem Resveratrol in Leberzellen beschrieben (Inkubationskonzentration 30 μM , $\sim 6,8 \mu\text{g/mL}$) [161]. Dabei war zum einen interessant, dass hier primäre Leberzellen eine deutlich stärker ausgeprägte Aufnahmekapazität zeigten – was die nach Zellyse gefundene Substanzkonzentration anbelangt – als im Modell mit Verwendung einer Leberzelllinie. Zum anderen wurde eine Beeinflussung der Aufnahme von Resveratrol durch den Serumgehalt des Mediums mit einer Halbierung der Aufnahme bei Verwendung von Medium mit 5 % FBS gefunden. In den eigenen Untersuchungen wurde – um sich physiologischen Verhältnissen zumindest anzunähern – stattdessen 10 % FBS im Inkubationsmedium eingesetzt. Vaidyanathan bestimmte die Aufnahme eines Flavonoids aus grünem Tee (ECG= (-)Epicatechin-3-gallate, Inkubationskonzentration 50 μM , $\sim 22 \mu\text{g/mL}$) in eine intestinale Epithelzelllinie (Caco-2) [162]. Dabei wurde die Aufnahme von ECG wie in der vorliegenden Arbeit ebenso durch Phloretin gehemmt (bei Phloretin-Konzentrationen $\geq 200 \mu\text{M}$, $\sim 55 \mu\text{g/mL}$). Es wurden dabei auch Versuche zum transepithelialen Transport durchgeführt, allerdings war der Transport vom apikalen zum basolateralen Kompartiment äußerst gering und vergleichbar mit dem marginalen Transport des Markers für parazellulären Transport Mannitol. In der Arbeit wurde Puffer (HBSS= Hank`s Balanced Salt Solution) als Inkubationsmedium für alle Versuche gänzlich ohne Proteinzusatz verwendet.

Häufig wurden Studien zur Aufnahme von Arzneistoffen mit transfizierten oder transformierten Zellen durchgeführt, in welchen die entsprechenden Transporter von Interesse stärker exprimiert wurden. Die Gruppe um Wong et al. [163], die sich dieses Konzept bei der Analyse des Transports von Flavonoiden durch organische Anion-Transporter (OATs) zunutze machten, fand heraus, dass vor allem Phase-II Metaboliten der untersuchten Flavonoide (vor allem Quercetin und Genistein) – speziell sulfatierte und glucuronidierte Flavonoid-Addukte – durch diese Transporter mit potentiell starkem Einfluss auf die Elimination der Substanzen aufgenommen wurden. Die Aglykone schienen jedoch vornehmlich nicht über OATs transportiert zu werden. Als Medium für die Inkubationen der Versuche zur Aufnahme der Substanzen wurde auch hier HBSS eingesetzt. Im Gegensatz dazu bestätigten Yokomizo et al. wiederum die Aufnahme der Aglykone unterschiedlicher Flavonoide wie Quercetin, Luteolin und Apigenin (Inkubationskonzentration 50 μM) in einem Caco-2 Zellkulturmodell, wobei hier der Austausch von HBSS durch DMEM jeweils ohne Proteinzusatz die Aufnahme verringerte. Die Gesamt-Wiederfindung als Summe aus der im

Medium verbleibenden und nach Zellyse extrahierten Menge war erwartungsgemäß für die aufgenommenen Substanzen deutlich geringer als für die nicht aufgenommenen [164].

Analytisch-methodische Probleme sind bei der Untersuchung der Kinetik von reaktiven Substanzen wie Catechol-Strukturen der Flavonoide in einem zellulären Kontext weit verbreitet. Den meisten bislang veröffentlichten Arbeiten zum Transport von Flavonoiden in Zellen ist gemein, dass sie (noch) nicht zwischen Adsorptionsprozessen und einer tatsächlichen intrazellulären Aufnahme unterscheiden konnten. Es wurden dabei oftmals Flavonoid-Konzentration im $\mu\text{g/mL}$ -Bereich appliziert, um nach Waschen der Zellen, Zellyse und Extraktion die Ausgangssubstanz in validen Konzentrationsbereichen quantifizieren zu können. Ebenso sind zumeist wenige Daten zur Massenbilanz und der stark von der Inkubationsdauer und Extraktionsmethodik abhängigen Wiederfindung verfügbar, was teilweise der Instabilität der untersuchten Substanzen und der Irreversibilität der Interaktion von Catecholen mit z.B. Proteinen oder Glutathion in Form einer Chemisorption geschuldet sein dürfte [165]. Durch den Einsatz von radioaktiv markierten Flavonoiden konnte das Ausmaß dieser irreversiblen Bindung von z.B. Quercetin oder Ellagsäure an DNA oder Proteine qua Messung der nach intensiver Extraktion im Zellpellet verbleibenden Aktivität ermittelt werden [166-167]. Dabei verringerte hier interessanterweise die Verwendung von proteinhaltigem Zellkulturmedium für die Inkubation im Gegensatz zu proteinfreiem Puffer die kovalente Bindung von Quercetin mit DNA oder Protein. Nach enzymatischer Oxidation der Substanzen zu reaktiveren chinoiden Systemen wurde der chemisorptiv irreversibel gebundene Anteil erwartungsgemäß gesteigert.

Der in den eigenen Versuchen gewählte Ansatz mit der Messung der verbleibenden Substanz in proteinhaltigem Medium im Überstand der Zellen stellte deswegen was die Aussage über Sorption bzw. Aufnahme der Substanzen an/in Zellen anbelangt ein limitiertes Vorgehen dar. Bedauerlicherweise ist noch kein hinreichend auflösendes Mikroskop oder ein Scanner verfügbar, der radioaktiv markierte Substanzen in physiologisch kultivierten Zellen live verfolgen könnte. Bei Fixierung der Zellen auf Objektträgern kann sich teilweise die membranäre Integrität verändern, und eine Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert häufig stark die physiko-chemischen Eigenschaften der markierten Substanzen.

Es wäre prinzipiell auch möglich, dass die Zellen in Anwesenheit von M1 z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) generierten, die zum schnelleren Abbau von M1 führten und deswegen keine Bindung bzw. Aufnahme oder eine verstärkte unspezifische Chemisorption der reaktiveren Oxidationsprodukte stattfand. Aufgrund der antioxidativen Potenz von Phloretin [168] könnte in diesem Zusammenhang eine Einflussnahme alternativ erklärbar sein. Da die Effekte allerdings bei mehreren Zelltypen aus

sehr unterschiedlichen Gewebebereichen in unterschiedlichen Versuchsanordnungen beobachtet wurden und eine Aufnahme von M1 sowie Hemmung dieser durch Phloretin auch schon für Erythrozyten gezeigt wurde [27], scheint dies eher unwahrscheinlich zu sein.

Somit konnten neue Hinweise gefunden werden, dass der Metabolit M1 sich durch Bindung und mögliche Aufnahme in unterschiedlichen Zellen anreichern kann. Die verringerte Aufnahme durch Blockade des membranären Transports unter Einsatz von Phloretin deutete auf eine mögliche erleichterte Kanalprotein-vermittelte Aufnahme hin. Mit verfeinerten Methoden sollte in zukünftigen Experimenten mit markiertem Metabolit M1, geeigneten Inhibitoren und transfizierten Zellkulturmodellen der möglicherweise beteiligte Transporter identifiziert und die aufgenommene bzw. reversibel oder irreversibel gebundene Menge quantifiziert werden.

2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

2.1 NO und das Gefäßsystem

Der „Stoßdämpfer“ für den Blutfluss auf den unwegsamen und holprigen Straßen des Gefäßsystems – so wurde metaphorisch eine der physiologischen Aufgaben von NO, das durch die vor allem in Endothelzellen vorkommende endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziert wird, im vaskulären System beschrieben [169]. Bei erhöhtem Blutanspruch und Dilatation eines distalen Gefäßes muss das übergeordnete Gefäß sich ebenso erweitern. Überschreitet dabei die Reynolds-Zahl des Blutflusses einen kritischen Wert, so kommt es zu turbulentem Strömungsverhalten, was wiederum Muskelkontraktionen der Gefäßwand auslöst, die zu einer Potenzierung der Turbulenzen führen würden. Durch die verstärkte vaskuläre Schubspannung (= durch das strömende Blut auf das Endothel ausgeübte tangentielle Kraft) wird jedoch die Freisetzung von NO aus dem Endothel induziert, das dann zu seinem prominentesten Effektorprotein, der im Zytosol gelösten Guanylatzyklase [170] diffundieren kann. Aufgrund der damit in Gang gebrachten Kaskade wird letztlich eine Muskelrelaxation sowie eine Gefäßerweiterung (FMD = Flow-mediated dilation) ausgelöst [169, 171] und es herrscht ein laminarer Strom des Blutes vor.

Neben der landläufig bekannten konstitutiven Expression der eNOS in Geweben bzw. Zellverbänden von Endothelzellen wurde das Enzym inzwischen auch in einer Vielzahl anderer Zelltypen wie bronchialen Epithelzellen, Eosinophilen, Fibroblasten, Hepatozyten, oder Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta nachgewiesen [172]. Zudem finden sich auf der Ebene der zellulären Auflösung subzelluläre Verteilungs- und Aktivierungsmuster dieses Enzyms, wie etwa eine fokale Lokalisierung der eNOS an Golgi-Apparat Einheiten, im Nukleus, oder an mitochondrialen Strukturelementen. Abhängig von der Kompartimentierung variiert dadurch die Verfügbarkeit von Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexen für das Enzym [173].

Der nicht einheitlich definierte Begriff der endothelialen Dysfunktion [174] wird in diesem Zusammenhang als pathologische Funktionsstörung des komplexen Zusammenspiels zwischen Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Immunzellen, Thrombozyten und deren sezernierten Faktoren wie NO, Stoffen aus der Arachidonsäure-Kaskade oder Glycosaminglykane wie z.B. Heparin mit Einfluss auf Zell-Zell-Adhäsion und Gerinnung verstanden. Diese Phänomene einer gestörten endothelialen Balance treten häufig mit atherosklerotischen Veränderungen bzw. einer koronaren Herzerkrankung (KHK) koinzident auf. Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes-Erkrankungen, das Metabolische Syndrom, Rauchen, Hypertonie, und erhöhte LDL-Cholesterinspiegel tragen zu

derartigen pathologischen Endothel-Funktionsstörungen bei, wobei die Ursache-Wirkungsrichtung dabei nicht immer eindeutig zugeordnet werden kann. Zudem scheint ein absoluter oder relativer Mangel an NO im Endothel daran beteiligt zu sein, der etwa durch eine verstärkte Produktion von Superoxid-Anionen durch NADPH-Oxidasen bei entzündlichen Vorgängen und der nahezu diffusionskontrollierten Reaktion von NO mit Superoxid zum Peroxynitrit verursacht sein könnte. Schließlich scheint es dadurch auch zu einer Zellmigration mit Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten sowie zur Zellproliferation von Gefäßmuskelzellen und der Bildung atherosklerotischer Läsionen zu kommen.

Die pathologischen Diskriminanten und diagnostischen Parameter einer endothelialen Dysfunktion, wie allen voran die nichtinvasive Messung mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung einer verringerten Flow-mediated dilation der dominanten Arteria brachialis nach suprasystolischer Stauung, oder invasiv die Messung einer verringerten, induzierten Gefäßerweiterung bei einer Herzkatheteruntersuchung mit koronarer Applikation von Acetylcholin und röntgen-computertomographischer Gefäßdarstellung, scheinen prognostisch bei Patienten, die an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) leiden, mit der Wahrscheinlichkeit eines schweren kardiovaskulären Ereignisses wie z.B. eines Myokardinfarkts assoziiert zu sein [175]. Aus diesem Grund sind eine Früherkennung und besonders die primäre sowie sekundäre Prävention einer Endothelialen Dysfunktion und der KHK von großem Interesse. Ob die Einnahme von Polyphenolen dabei und gerade auch bei der Prävention eine Rolle spielen kann, bleibt aufzuklären.

Interessanterweise trägt zur Entstehung von Atherosklerose offenbar auch die unterschiedliche Metabolisierung von Nahrungsbestandteilen durch Darmbakterien entscheidend bei. Für Phosphatidylcholine, die vor allem in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs vorkommen, wurde im Jahr 2011 erstmalig eine Kausalitätskette von der peroralen Aufnahme, zur veränderlichen Verstoffwechslung durch Darmbakterien zum Trimethylamin, und weiter bis zur hepatischen Umwandlung in das atherogene Trimethylamin-N-oxid aufgezeigt [176]. Ob auch der im Darm *in vivo* nach peroraler Einnahme des Kiefernrintenextraktes entstehende Metabolit M1 auf derartige Prozesse Einfluss nehmen kann, blieb bis dato offen [121, 177].

Bislang beeindruckend, was die Prävention und Risikominderung von schweren kardiovaskulären Ereignissen in Risikopopulationen anbelangt, erscheinen die Ergebnisse aus Studien mit Statinen [178], zu deren pleiotropen Effekten offensichtlich auch eine aktivitäts- und expressionssteigernde Wirkung auf die eNOS gehört [179].

2.2 Flavonoide und Gefäßsystem

Ende der 1980iger Jahre wurde die Hypothese einer Beeinflussung von kardiovaskulären Risikofaktoren durch die Einnahme von Flavonoiden parallel verlaufend mit der Prägung des Begriffes *French Paradox* aufgebracht. Dabei gründete sich diese Annahme zunächst auf epidemiologische Beobachtungsdaten, die in Frankreich eine geringe Inzidenz der KHK trotz gleichzeitiger Aufnahme größerer Mengen Cholesterin und gesättigter Fettsäuren zeigten. Die Einordnung und der Vergleich erfolgten gegenüber anderen europäischen Ländern wie etwa Irland oder Finnland [180]. Diese Beobachtung führte zur Generierung von mannigfaltigen Hypothesen und Spekulationen über Assoziationen und Kausalität der geringen Inzidenz der KHK in Frankreich und der hohen z.B. in Finnland. In diesem geographischen Zusammenhang wurde auch immer wieder die Vitamin-D-Hypothese bzw. die Breitengrad-abhängige Lichtexposition als protektiver Faktor für die KHK ins Spiel gebracht, wobei sich die Evidenz dafür in klinischen, prospektiven Studien bislang als eher gering und teils geschlechterspezifisch darstellte [181]. Dunkle, flavonoidhaltige Schokolade, deren regelmäßiger Konsum in manchen Studien einen Nutzen hinsichtlich der Verbesserung einer Endothelialen Dysfunktion vermuten ließ, soll bis zu 1000 IU/25 g Vitamin-D₂ enthalten [182].

Den Stein der Flavonoid-Forschung im Zusammenhang mit KHK weiter ins Rollen brachte dann eine Arbeit von Renaud et al. aus dem Jahr 1992 [183], in welcher eine Verbindung zwischen dem Trinken von Rotwein und der KHK-Inzidenz konstruiert werden konnte. Obwohl dies keinen Beweis für einen kausalen Zusammenhang darstellte, konnte in der folgenden Zeit eine Reduzierung des Risikos für KHK durch moderaten Alkoholkonsum (z.B. ≤ 150 mL Rotwein pro Tag) unter anderem in einer großen Meta-Analyse epidemiologischer Studien gezeigt werden [184], wobei sich interessanterweise dabei beim Vergleich von Bier zu Rotwein ein leichter positiver Trend zum letzteren, was den gesundheitlichen Nutzen anbelangt, ergab. Dementgegen steht die Erhöhung des Risikos für bestimmte maligne Erkrankungen wie z.B. Mamma- oder Lungenkarzinome bei regelmäßigem Konsum von Alkohol [185].

Den derzeitigen Stand der Forschung zur Frage nach der Beeinflussung von Risikofaktoren der KHK im Speziellen durch Flavonoide repräsentiert eine Studie von Hooper et al., die in einer statistischen Synthese in Form einer Meta-Analyse 133 randomisierte, kontrollierte, diese Fragestellung behandelnde Humanstudien zusammenfasste [15]. Die wichtigsten Ergebnisse und Einflüsse von Flavonoiden auf kardiovaskuläre Risikofaktoren waren eine Erhöhung der gemessenen Flow-mediated dilation (für Kakao nach wiederholter Einnahme: 1,45 %; 95 % Konfidenzintervall (KI): 0,62; 2,28), eine Senkung des Blutdrucks

(für Kakao: systolischer Blutdruck -5,88 mmHg; KI: -9,55; -2,21), und eine Verringerung des LDL-Spiegels (grüner Tee: -0,23 mmol/L \approx -8,89 mg/dL; KI: -0,34, -0,12). Allerdings blieben dabei wichtige Fragen nach der Heterogenität der eingeschlossenen Studien („Four apples and five oranges makes four apples and five oranges, not nine appleoranges.“ T.Greenhalgh [186]) mit der Einnahme von teilweise komplexen Pflanzenextrakten oder isolierten Flavonoiden wie (-)-Epicatechin, sowie nach dem gemeinsamen Mechanismus einer Wirkung offen. Zudem gibt es bis dato keine randomisierte und kontrollierte klinische Studie, die eine Einnahme von Flavonoiden bei KHK hinsichtlich harter klinischer kardiovaskulärer Endpunkte die Morbidität und Mortalität betreffend untersuchte.

Für die Einnahme eines Kiefernrintenextraktes und dessen Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren gibt es bislang sowohl klinische Studien, die auf einen möglichen Nutzen hindeuten, als auch eine Arbeit, die keinen belegbaren Nutzen fand [187-188]. Beim betreffenden Studiendesign war einerseits einer der wichtigsten Unterschiede zwischen den angeführten Studien die alleinige Gabe des Extraktes im Gegensatz zur zusätzlichen Gabe zur unterschiedlichen regelmäßigen Medikation der Patienten in Abhängigkeit der Morbidität, was komplexe Interaktionsmöglichkeiten nicht ausschließt. Andererseits ist es in manchen Fällen ethisch nicht zu vertreten, einer Patientenkohorte, die einem möglichen lebensgefährlichen Risiko (z.B. Myokardinfarkt oder Apoplex) ausgesetzt ist, die evidenzbasiert wirksame Medikation vorzuenthalten. Insgesamt scheint die Einnahme des standardisierten Extraktes in der empfohlenen Dosierung (\leq 200 mg/d) sicher zu sein und keinen unmittelbar messbaren gesundheitlichen Schaden zu verursachen.

In einer Studie aus dem Jahr 2011 wurde die tägliche Polyphenol- bzw. Flavonoid-Gesamtaufnahme mit der Nahrung in einer Studie mit n = 4942 Teilnehmern in Frankreich geschätzt [11]. Die mittlere tägliche Aufnahme ergab einen Wert von 820 mg/d (ausgedrückt als Aglykon-Äquivalente) mit den Werten 316, 227 und 87 mg/d für Hydroxyzimtsäuren, Procyanidine und Catechine. Verglichen mit einer Studie aus Finnland mit n = 2007 Teilnehmern [189] war die Polyphenol-Gesamtaufnahme auf ähnlichem Niveau (752 mg/d), allerdings mit Unterschieden, was die Verteilung auf die einzelnen Polyphenolsubgruppen anbelangt (z.B. Procyanidine: 116 mg/d in Finnland versus 227 mg/d in Frankreich).

Den Mechanismus der positiven Einflussnahme durch Flavonoide auf Prozesse der endothelialen Dysfunktion betreffend, die sich in manchen klinischen Studien abzeichnete, konnte bislang das spekulative Stadium der Erklärungsversuche noch nicht überwunden werden. Die Hypothesen reichen dabei von einer Erhöhung der Harnsäurespiegel im Plasma durch die Einnahme von Flavonoiden mit der Folge einer dadurch gesteigerten antioxidativen Kapazität des Plasmas [190], über eine spezifische Inhibierung von NADPH-

Oxidasen durch Flavonoide [191], eine direkte aktivitätssteigernde Wirkung auf die eNOS [192-193], eine verstärkte Reduktion von in der Nahrung enthaltenem Nitrit zu NO durch Flavonoide im Gastrointestinaltrakt [194], bis hin schließlich zu einer Hochregulation von ROS-detoxifizierenden und anti-oxidativen Mechanismen *in vivo* z.B. eine Steigerung der Expression der Superoxiddismutase durch chronische Exposition mit Flavonoiden im Sinne des Konzepts der Mitohormesis [96]. Unter dem seit langem bekannten Begriff „Hormesis“ versteht man dabei eine Dosis-Wirkungsbeziehung, die sich durch stimulierende bei niedriger und hemmende Effekte bei hoher Dosierung auszeichnet [195]. Das Konzept wird allerdings hinsichtlich eines Nutzens einer Exposition mit niedrigen Dosen potentiell toxischer Agenzien äußerst kritisch diskutiert [196-197].

2.2.1 Fragestellung: Effekte von Flavonoiden auf die eNOS in Endothelzellen

Da bislang der Wirkmechanismus der Flavonoide auf zellulärer Ebene, was einen positiven Nutzen bei Endothelialer Dysfunktion betreffen könnte, wie im vorherigen Abschnitt bereits verdeutlicht wurde, nicht aufgeklärt ist, sollte ein Endothelzellmodell verwendet werden, mit welchem es möglich war, Effekte von Flavonoiden des Kiefernrintenextraktes auf die Expression der eNOS und deren NO-Produktion in einem zellulären Kontext zu untersuchen.

Die konstitutiv exprimierte eNOS erzeugt aufgrund der geringeren produzierten Proteinmenge im Vergleich zur vor allem bei Entzündungsprozessen auf der Induktionsebene regulierten iNOS wesentlich weniger NO pro Zelle. Hinzu kommt, dass die zu untersuchenden Substanzen wie Flavonoide teilweise stark und nicht unabhängig mit den bislang publizierten Methoden interferierten. Deshalb sollte eine neue, empfindliche analytische Methode sowie ein Testsystem entwickelt werden, um die NO-Produktion konstitutiver NO-Synthasen in Zellkultursystemen in Gegenwart von Polyphenolen valide quantifizieren zu können.

Mit dieser Methode sollten dann der Kiefernrinten-Gesamtextrakt, die Fraktion I des Extraktes und die monomeren Bestandteile (+)-Catechin, der *in vivo* entstehende Metabolit M1 sowie Resveratrol, das als besonders aussichtsreiche Substanz, die sich für die Erklärung der positiven Effekte des Rotweins verantwortlich zeichnen könnte, galt [198], auf ihre NO-modulierende Eigenschaften untersucht werden. Dies wurde zum einen unternommen durch die Untersuchung der kurzzeitigen, akuten Effekte der jeweiligen Substanzen mit Inkubationszeiten von ≤ 45 min und der darauffolgenden Quantifizierung der entsprechend in dieser Zeit freigesetzten NO-Menge in Form einer Umsetzung mit einer Fluoreszenzsonde (DAF-2= 4,5-Diaminofluorescein), oder durch die Messung des NO-

Surrogatparameters Nitrit im Zellkulturüberstand. Zum anderen wurden Testungen der Langzeitwirkung der Substanzen mit Inkubationszeiten von 14-20 h durchgeführt, wobei hier wiederum im Anschluss die NO-Freisetzung und zudem die relative Änderung der Proteinexpression der eNOS ermittelt wurde.

Ob sich nun daraus Hinweise für einen Wirkmechanismus von Flavonoiden hinsichtlich eines potentiellen Nutzens bei Endothelialer Dysfunktion auf zellulärer Ebene ergeben würden, sollte im Besonderen Gegenstand der Untersuchungen sein.

2.2.2 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

Die Endothelzellen EA.hy 926 wurden in entsprechend gleicher Menge pro Ansatz ausgesät, mit diskreten Konzentrationen (0,01-100 µg/mL) der jeweiligen Substanzen (Gesamtextrakt, Fraktion I, (+)-Catechin, Resveratrol, M1) inkubiert, und über 45 min mit der Calciumionophore 4-Bromo A-23187, dessen bromiertes Derivat eingesetzt wurde, um die Autofluoreszenz der Lösungen gering zu halten, in Gegenwart der Fluoreszenzsonde DAF-2 stimuliert (s. 4 Material und Methoden). Danach erfolgte die jeweilige Quantifizierung der NO-Umsatzprodukte (DAF-2T, NO₂⁻) mittels HPLC-Analytik. Für die entsprechenden Langzeit-Untersuchungen wurden die Zellen 14 oder 20 h mit den zu untersuchenden Substanzen vorinkubiert, gewaschen, und dann im Anschluss wiederum durch die Ionophore ein Calcium-Ioneneinstrom zur eNOS-Aktivierung produziert. Zudem wurde nach Zellyse der Proteingehalt der eNOS nach Inkubation mit den Testsubstanzen mittels Western-Blotting bestimmt. Als Positivkontrolle diente ein Phorbol ester zur Steigerung der eNOS Proteinexpression (PMA) [199]. Der kompetitive eNOS-Inhibitor L-NMMA wurde als Negativkontrolle verwendet [200].

2.2.3 Ergebnisse

2.2.3.1 Kurzzeit-Effekte auf die NO-Freisetzung

In dem Konzentrationsintervall von 0,01-10 µg/mL konnte jeweils ein konzentrationsabhängiger inhibierender Effekt der eingesetzten monomeren Polyphenole auf die akute NO-Freisetzung aus Endothelzellen in Form einer Reduzierung der gebildeten DAF-2T Äquivalente über einen Zeitraum von 45 min beobachtet werden (Abb. 2.1). Ein hemmender Effekt auf die NO-Freisetzung wurde auch bei Einsatz der Fraktion I und des Gesamtextraktes gefunden (Daten nicht gezeigt). Der kompetitive eNOS-Inhibitor L-NMMA reduzierte die zelluläre NO-Freisetzung in allen Ansätzen nahezu vollständig. Gemäß dem

Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (Co) hatte (+)-Catechin den stärksten Einfluss auf den Umsatz von NO mit der Fluoreszenzsonde DAF-2 mit einem Faktor von $0,54 \pm 0,01$ bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{g/mL}$, gefolgt von M1 ($0,72 \pm 0,04$), und Resveratrol ($0,84 \pm 0,05$). Ein vergleichbares Bild im Verhältnis der Substanzen untereinander war auch bei ansteigenden Konzentrationsniveaus zu finden, wie etwa bei der Polyphenol-Konzentration von $1 \mu\text{g/mL}$ mit den entsprechenden Faktor-Werten für (+)-Catechin ($0,03 \pm 0,01$), für M1 ($0,06 \pm 0,01$), und respektive für Resveratrol ($0,17 \pm 0,01$).

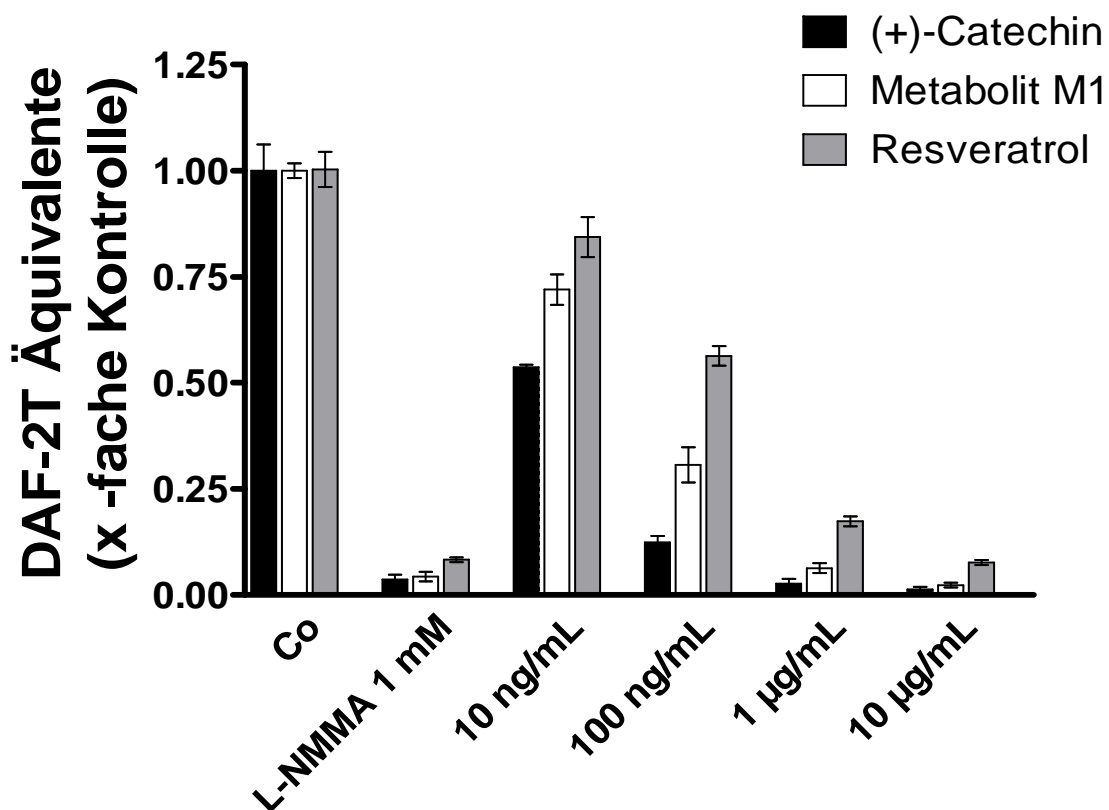


Abb. 2.1: Einflüsse von (+)-Catechin, Metabolit M1 und Resveratrol auf die akute NO-Freisetzung aus Endothelzellen. Die Zellen wurden mit den Substanzen für 5 min vorinkubiert, daraufhin wurden DAF-2 und eine Calciumionophore zugesetzt. Die Ansätze wurden für weitere 45 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln inkubiert. L-NMMA diente als Kontrolle für eine eNOS-Inhibierung. Gleichen Arbeitsabläufen unterzogene Zellen ohne Polyphenol- oder Inhibitorzusatz dienten jeweils als Referenz (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

2.2.3.2 Langzeiteffekte auf die NO-Freisetzung und eNOS-Proteinexpression

Um potentielle Langzeiteffekte der Polyphenole im Testsystem zu untersuchen, wurden die Endothelzellen über 14 h mit (+)-Catechin, M1 und Resveratrol (Konzentrationsbereich: $0,01$ - $30 \mu\text{g/mL}$) inkubiert. Für Resveratrol wurden entsprechend hohe Konzentrationen eingesetzt,

da publizierte Daten zur Erhöhung der eNOS-Expression beim Einsatz von $100\ \mu\text{M}$ $\approx 23\ \mu\text{g/mL}$ vorlagen [202]. Daraufhin wurde die NO-Freisetzung und eNOS-Proteinexpression gemessen (Abb. 2.2; Abb. 2.3). Die Positivkontrolle PMA führte dabei zu einer robusten Erhöhung der eNOS-Expression und damit auch der zellulären NO-Produktion. Die NO-Freisetzung wurde durch die monomeren Polyphenole wiederum konzentrationsabhängig inhibiert in der Reihenfolge des abnehmenden Ausmaßes der Faktoren im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{g/mL}$: (+)-Catechin ($0,63 \pm 0,03$), M1 ($1,02 \pm 0,03$), und Resveratrol ($1,04 \pm 0,01$). Entsprechend waren die Werte bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{g/mL}$ bei (+)-Catechin ($0,66 \pm 0,08$), M1 ($0,83 \pm 0,02$), und bei Resveratrol ($0,85 \pm 0,01$).

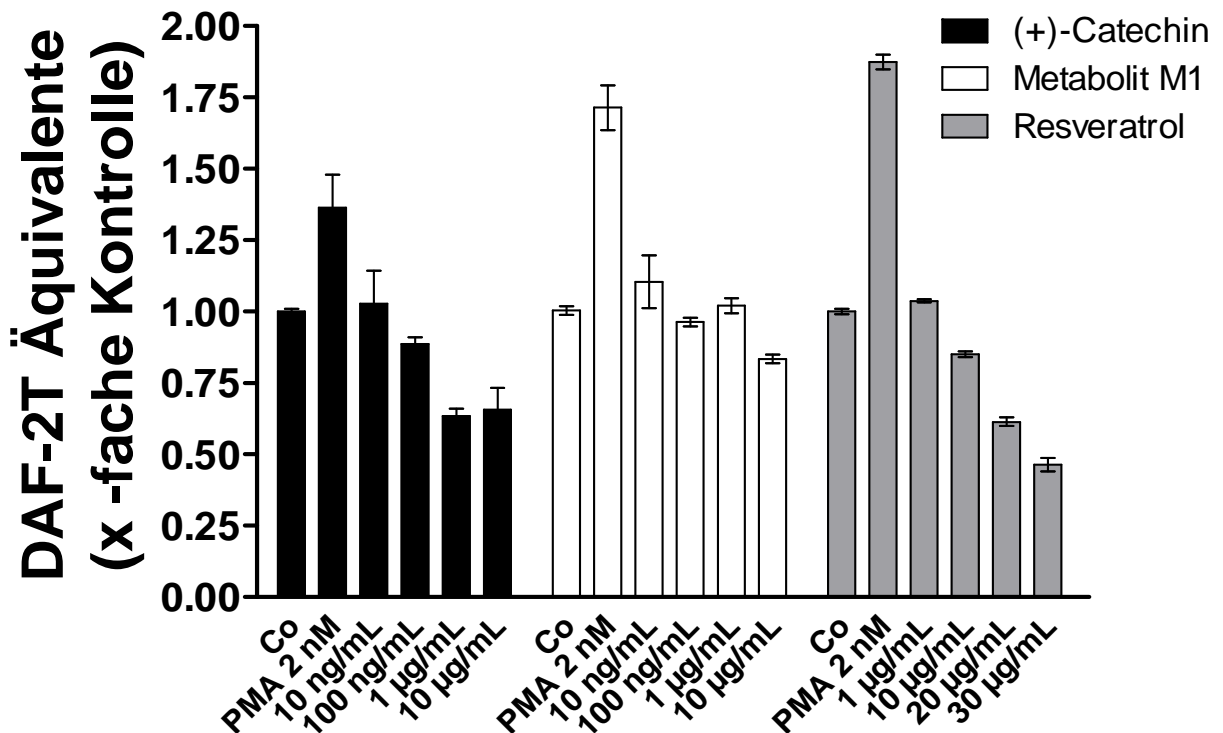


Abb. 2.2: Langzeiteffekte von (+)-Catechin, Metabolit M1 und Resveratrol auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen. Die Zellen wurden mit den Substanzen für 14 h vorinkubiert, gewaschen und daraufhin DAF-2 und eine Calciumionophore zugesetzt. Der Phorbolster PMA diene als Positivkontrolle für eine Erhöhung der eNOS-Proteinexpression. Gleichen Arbeitsabläufen unterzogene Zellen ohne Polyphenol- oder PMA-Zusatz dienen jeweils als Referenz (Co). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Ein hemmender Effekt auf die NO-Freisetzung wurde auch bei Einsatz der Fraktion I und des Gesamtextraktes gefunden (Daten nicht gezeigt). Im Hinblick auf die Fragestellung nach

B Allgemeiner Teil

einer Veränderung der Proteinexpression wurden Western-Blotting Experimente durchgeführt, um einen potentiellen Langzeit-Effekt der eingesetzten Polyphenole auf die eNOS-Proteinmenge zu untersuchen. Wie in Abb. 2.3 repräsentativ für Resveratrol und M1 aufgezeigt ist, wurden keine robusten, deutlich expressionssteigernden Eigenschaften der Substanzen im Testsystem gefunden. Bei hohen Konzentrationen von Resveratrol (20-30 µg/mL) wurde dafür eine eher verminderte Expression der eNOS in den Endothelzellen beobachtet.

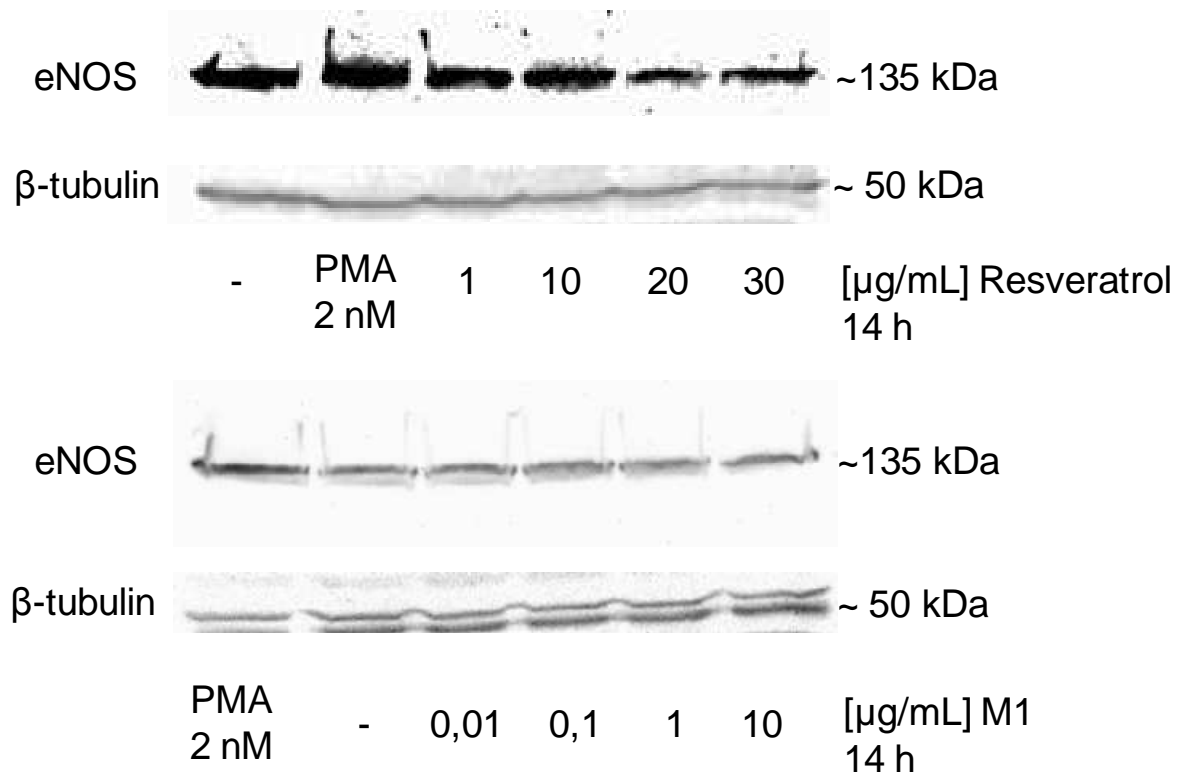


Abb. 2.3: Repräsentative Western-Blots von Lysaten humaner Endothelzellen, inkubiert mit Resveratrol und M1 über 14 h mit spezifischer Immunfärbungs-Detektion der aufgetrennten eNOS- und β-tubulin-Proteine. PMA diente als Positivkontrolle zur Steigerung der eNOS-Proteinexpression.

Eine Erhöhung der Expression anderer NO-Synthasen wurde dabei nicht beobachtet. Eine Induktion der iNOS etwa durch PMA konnte vor allem in Leukozyten bislang ausschließlich durch Co-Stimulation mit pro-inflammatorischen Stimulantien und Cytokinen (LPS, TNF-α, IFN-γ) gezeigt werden; eine synergistische Kombination von IFN-γ mit PMA führte auch in Caco-2 Zellen zur iNOS-Induktion [203].

Für das komplexe Substanzgemisch der Fraktion I des Kiefernrintenextraktes, das vor allem monomere und dimere Polyphenole enthält, wurden ebenfalls Langzeit-Experimente zur Fragestellung nach einer Erhöhung der eNOS-Expression über 20 h

durchgeführt. Die Auswertung eines repräsentativen Western-Blots ist in Abb. 2.4 gezeigt. Die Positivkontrolle PMA führte wiederum zu einer deutlichen Erhöhung der eNOS Expression. Bei sehr hohen Konzentrationen der Fraktion I (100 µg/mL) konnte ein Trend zur geringfügigen Steigerung der eNOS-Proteinmenge in den Zellen verzeichnet werden.

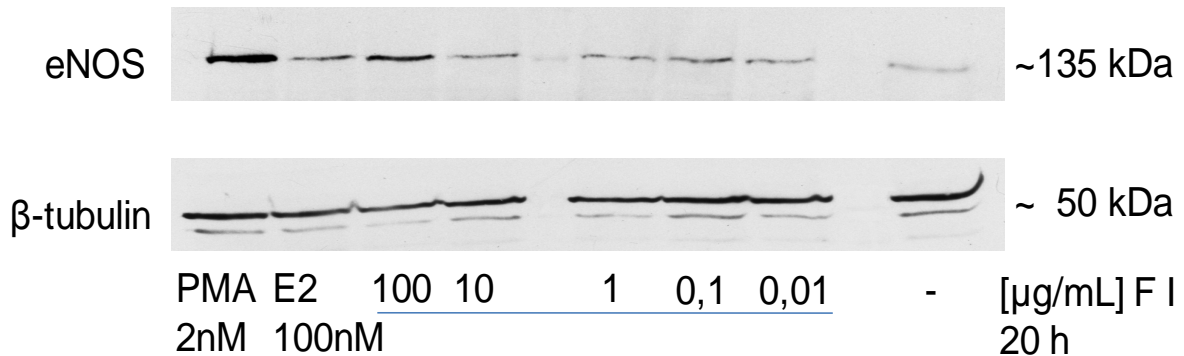


Abb. 2.4: Repräsentativer Western-Blot eines Lysates humaner Endothelzellen, inkubiert mit Fraktion I des Kiefernrendenextraktes über 20 h mit spezifischer Immunfärbungs-Detektion der aufgetrennten eNOS- und β -tubulin-Proteine. PMA und Estradiol (E2) dienen als Kontrollen.

Die korrespondierende densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ist in Abb. 2.5 dargestellt. Neben der eindeutig reproduzierbaren Steigerung der eNOS-Expression durch Inkubation mit 2 nM PMA für 20 h (Faktor in Referenz zur unbehandelten Kontrolle (Co): $2,54 \pm 0,88$), zeichnete sich für die höchste Konzentration von Fraktion I ebenfalls ein expressionssteigernder Trend ab ($2,02 \pm 0,80$), der jedoch vor dem Hintergrund der hohen Varianz als Maß für Streuung, Reproduzierbarkeit und Robustheit der Effekte in den Experimenten gesehen werden muss. Für Estradiol (E2 100 nM) und Fraktion I Konzentrationen von 0,01-10 µg/mL wurden keine expressionssteigernden Effekte gefunden.

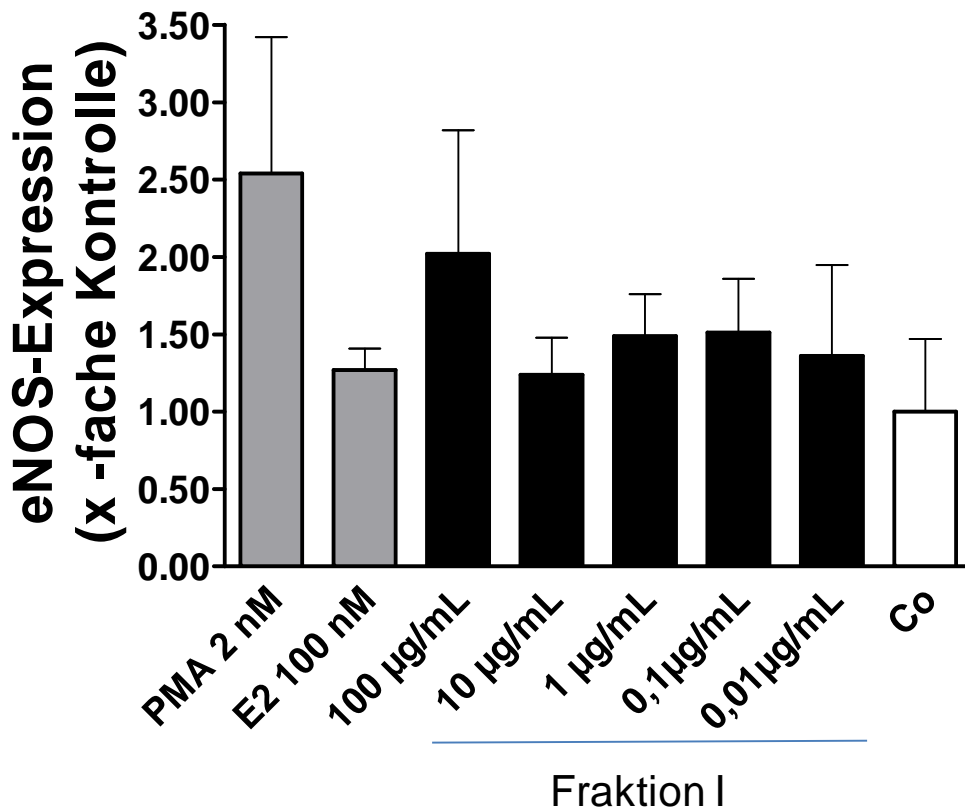


Abb. 2.5: Densitometrische Auswertung durch relativen Bezug der Quotienten aus optischer Bandendichte der angefärbten eNOS-Proteine im Zähler und Bandendichte von β -tubulin-Proteinen zur Normalisierung und Ladungskontrolle im Nenner dreier Western-Blots von Lysaten humaner Endothelzellen, die mit Fraktion I des Kiefernextraktes inkubiert wurden, auf die unbehandelte Kontrolle (Co). PMA und Estradiol (E2) dienten als Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert.

2.2.4 Diskussion

Sowohl was die Kurzzeit- als auch die Langzeit-Effekte auf NO-Freisetzung und eNOS-Protein-Expression der eingesetzten Polyphenole anbelangt, konnten in der vorliegenden Studie mit einem Endothelzellmodell (EA.hy 926) vor allem deutliche konzentrationsabhängige, inhibierende Wirkungen der untersuchten Substanzen gezeigt werden. Dies lässt auf den ersten Blick eine Stimulierung der NO-Freisetzung und Steigerung der eNOS-Expression im gewählten Modell und untersuchten Zeitrahmen als unwahrscheinlich erscheinen, steht damit im Widerspruch zu manchen früher publizierten Arbeiten und soll im Folgenden genauer diskutiert werden.

Die Daten aus den vorliegenden Studien tragen dazu bei, die Mechanismen, die zur Modulation der NO-Freisetzung und eNOS-Proteinexpression in Zellkulturmodellen beitragen, sowie methodische Aspekte der NO-Analytik (zur ausführlichen

Methodendiskussion der NO-Quantifizierung s. Abschnitt 2.3) besser zu verstehen – jedoch auch kritisch zu hinterfragen. Mit der dafür neu entwickelten HPLC-Methode war es möglich, interferenzfrei die Umwandlung der Fluoreszenzsonde DAF-2 mit NO zum Triazol (DAF-2T) in Gegenwart von – und dadurch in Konkurrenz mit – Polyphenolen selektiv zu untersuchen.

Es ist allgemein bekannt und etabliert, dass Polyphenole und besonders die Klasse der Flavonoide mit einer redoxaktiven Catechol-Funktion mit Radikalen wie NO zu reagieren im Stande sind und somit *in vitro* als Radikalfänger gelten [48, 106]. Insofern ist zunächst der logische Schluss zulässig, dass Flavonoide nicht eo ipso zwischen plakativ „gutem“ vasoprotektivem NO (eNOS) und „bösem“ nitrosativem Stress (iNOS) unterscheiden können und somit auch mit dem von Endothelzellen produzierten NO reagieren werden. Diese Annahme konnte in den Versuchen augenscheinlich bestätigt werden. (+)-Catechin zeigte dabei den stärksten und Resveratrol den schwächsten hemmenden Effekt auf die NO-Freisetzung, was in einer anderen Arbeit über die Eigenschaften des NO-Scavengings dieser Flavonoide im Vergleich untereinander in analoger Form beschrieben wurde [204], und sich strukturell durch das Fehlen der Catechol-Funktion beim Resveratrol-Molekül ableiten ließe. Taubert et al. überprüften Polyphenole auf ihre Fähigkeit hin, NO akut aus präparierten koronaren Arterien von Schweineherzen freizusetzen [205]. Die NO-Messung erfolgte dabei mit einer amperometrischen Mikroelektrode. Resveratrol und (+)-Catechin (20 nM ~5 bzw. 6 ng/mL Resveratrol bzw. Catechin) zeigten dabei, sowohl was die NO-Freisetzung als auch eine Relaxierung der Gefäße betraf, keinen signifikanten Effekt. Einige Polyphenole zeigten sogar eine Verstärkung der Gefäßkontraktion (Luteolin, (-)-Epicatechin-gallat). Dabei waren die Experimente zwar darauf ausgelegt, einseitig eine Steigerung der NO-Freisetzung durch die einzelnen Substanzen zu erfassen, allerdings wurde nicht untersucht, ob die Flavonoide die NO-Freisetzung durch den applizierten Reiz (Substanz P) beeinflussen konnten. Da die Verbesserung des physiologischen *in vivo* Korrelats einer gesteigerten Flow-mediated dilation durch vaskuläre Schubspannung ausgelöst wird, kann es von Interesse sein, die Effekte von Flavonoiden bei gleichzeitiger Aktivierung der eNOS-Kaskade zu untersuchen.

Eine direkte eNOS-Enzymhemmung durch (+)-Catechin am isolierten Enzym konnte in einer Untersuchung von Chiesi et al. durch Messung der Umsetzung von radioaktiv markiertem L-Arginin zu L-Citrullin nur bei sehr hohen Konzentrationen (> 300 µM) festgestellt werden [206], eine Mischung aus Procyanidinen allerdings hemmte dagegen deutlich das Enzym. In murinen endothelialen Zellen zeigte Resveratrol ebenso einen deutlich hemmenden Effekt (bei ~5 µg/mL ≥ 50 % Hemmung) auf die durch VEGF stimulierte akute NO-Freisetzung über 10 min [207]. Interessanterweise führte die alleinige Stimulation der Zellen mit hohen Konzentrationen von Resveratrol (50-100 µM, ~11-23 µg/mL) über

10 min zur Freisetzung von Nitrit aus den Zellen. Allerdings ging dieses Phänomen Hand in Hand mit einer deutlichen Steigerung der zytotoxischen Wirkung durch Resveratrol, die durch den Einsatz hoher Konzentrationen von Resveratrol in den eigenen Experimenten ebenso beobachtet wurde.

Derartige Zytotoxizitäts-Phänomene erschienen auch in den eigenen Versuchen bei hohen Konzentrationen Resveratrol (20-30 µg/mL) deshalb wahrscheinlich, da sich dabei bereits nach 14 h ein Trend zu einer verringerten konstitutiven Expression der eNOS abzeichnete (Abb. 2.3). In diesem Zusammenhang zu sehen sind auch die Ergebnisse der eigenen Langzeit-Untersuchungen über 14 bzw. 20 h und die daraufhin gemessene NO-Freisetzung, die ebenfalls den NO-inhibierenden Charakter der eingesetzten Polyphenole vor allem bei hohen Konzentrationen unterstrichen. Wallerath et al. konnten hingegen nach Inkubation von Endothelzellen über 72 h mit 100 µM (~23 µg/mL) Resveratrol einerseits eine Erhöhung der Nitrit-Konzentration im Zellkulturüberstand, andererseits auch eine Steigerung der eNOS-Proteinexpression bei dieser Konzentration feststellen [202]. Appeldoorn et al. zeigten ebenfalls mit einer Messung von Nitrit im Zellkulturüberstand eine Erhöhung dieses NO-Surrogatparameters durch Resveratrol (100 µM) innerhalb von 24 h [192]. Keine Nitrit-freisetzende Wirkung war dabei durch (3,4-Dihydroxyphenyl)propionsäure oder (+)-Catechin zu verzeichnen. Leikert et al. fanden ab einer Konzentration von 400 µg/mL Rotweineextrakt, mit welchem die Zellen über 20 h inkubiert wurden, eine 1,5-fache Erhöhung der eNOS-Proteinexpression in Endothelzellen [193]. Allerdings wurden in diesen Arbeiten jeweils keinerlei Angaben über mögliche zytotoxische Mechanismen angeführt.

Dass das Ausmaß einer Erhöhung der eNOS-Expression parallel zur Zytotoxizität der getesteten Substanzen in Zellkulturmodellen verlaufen kann, zeigte sich unter anderem eindrücklich am Beispiel der Statine [179]. Die Inkubation von Endothelzellen über 24 h mit jeweils 1 µM Cerivastatin bzw. Fluvastatin führte zu Vitalitätseinbußen von 60 bzw. 40 %. Dabei konnte indes auch eine Erhöhung der eNOS-Proteinmenge um den Faktor ~2,4 beobachtet werden. Ein plausibler Erklärungsansatz für dieses unspezifische Phänomen scheint zu sein, dass durch die zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen auf membranäre Zell-Komponenten der eNOS/Caveolin-Komplex gestört wird und es somit zu einer verstärkten Verfügbarkeit, Translokation und Aktivität des Enzyms kommen kann. Damit im Einklang stehend berichteten Feron et al. bei der Inkubation von Endothelzellen mit Atorvastatin über eine Reduzierung der Caveolin-1 Expression, was wiederum zu einer verstärkten eNOS-Aktivität führte [208]. Eine derartige Erklärung könnte auch mit dem beobachteten Trend bezüglich des eNOS-Expressions-steigernden Effektes bei sehr hohen Konzentrationen der Fraktion I des Kiefernriindenextraktes einverständlich sein. Ob durch die

Einwirkung von Polyphenolen auf integrative membranäre Komponenten wie Caveoline auch spezielle methodische Unsicherheiten in Form einer besseren Extraktionseffizienz oder Wiederfindung der eNOS etwa bei der Interpretation von Western-Blotting-Experimenten eine Rolle spielen können, bleibt bislang spekulativ und sollte künftig untersucht werden.

Neben methodischen Aspekten der NO-Analytik (s. 2.3) können die Aussagen, die unter Verwendung der erhobenen Daten getroffen werden, durch weitere Faktoren limitiert sein. Aufgrund der Tatsache, dass keine längeren (≥ 20 h) Inkubationen mit den Substanzen in den hier vorgelegten Untersuchungen durchgeführt wurden, konnten die durch chronische evtl. mehrfache Exposition hervorgerufenen Effekte auf das eNOS-System nicht dargestellt werden. Allerdings könnte dabei im Zellkulturmodell die mangelnde basolaterale Clearance ein technisch anspruchsvoll zu lösendes Problem darstellen, um keine toxische Akkumulation der Testsubstanzen über die Zeit herbeizuführen. Der direkte Einfluss der eingesetzten Polyphenole auf den intrazellulären Ionen(ein)strom wurde aufgrund des Testdesigns mit Zugabe der Calciumionophore 4-Bromo A-23187 als Reiz in Analogie zu vaskulärer Schubspannung nicht separat untersucht. Hinzu kommt, dass der betrachtete Stichprobenumfang und der kleinste Unterschied des Effekts im Verhältnis zur Streuung in den Experimenten im Sinne eines Fehlers 2. Art teilweise nicht ausgereicht haben könnten, um die im Allgemeinen von Polyphenolen ausgelösten moderaten Effekte zu detektieren. Weiterhin wurde beschrieben [209], dass die akuten, positiven Effekte von Polyphenolen *in vivo* erst bei einer pathologischen Veränderung mit einer entzündlichen Komponente im Zusammenhang mit der Endothelialen Dysfunktion wirksam würden, wobei ein derartig komplexes, multifaktorielles Geschehen im Zellkulturmodell nur schwierig abgebildet werden kann.

Obwohl die genauen Mechanismen der Reaktionen von NO mit Polyphenolen und von NO mit Fluoreszenzsonden bislang nur fragmentarisch aufgeklärt sind, erscheinen die Reaktionskonstanten für eine Reaktion von NO mit Polyphenolen vergleichsweise langsam ($k \sim 10^1\text{-}10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, für (+)-Catechin $10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [48]). Im Vergleich dazu verlaufen die radikalische Reaktion von DAF-2 \cdot mit NO $_2\cdot$, oder eine Umsetzung von DAF-2 mit N $_2$ O $_3$ (NO mit O $_2$ zu NO $_2\cdot$ $\sim 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ [210] bzw. zu N $_2$ O $_3$ $k = 8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$ [211], und weiter z.B. Morpholin mit N $_2$ O $_3$ $k = 7,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [212]) deutlich schneller. In Abhängigkeit der vorliegenden kompetitiven Konzentration der Fluoreszenzsonde und der Polyphenole scheint somit eine Quantifizierung des NO wie in den eigenen Versuchen gezeigt im Testsystem möglich zu sein (s. 2.3). Mit dem teilweise bei inflammatorischen Prozessen durch NADPH-Oxidase co-generierten Superoxid-Anion O $_2\cdot^-$ reagiert NO, wie bereits erwähnt, nahezu diffusionskontrolliert (Reaktionskonstante $k = 6,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [213]). Wichtig dabei zu

bedenken ist allerdings, dass NO ganz im Gegensatz zu O_2^- mit einer größeren raumzeitlichen Ausdehnung frei diffundieren kann.

Dass weniger die akute als vielmehr die chronische Exposition über mehrere Tage oder Wochen mit bestimmten Polyphenolen zu einer Veränderung in dem eNOS-Guanylatzyklase-System führen kann, zeigte eine vor Kurzem publizierte *in vitro* Studie, in welcher eine wiederholte Inkubation mit Resveratrol über fünf Tage in physiologisch relevanter und *in vivo* durchaus erreichbarer Konzentration (50 nM, ~11 ng/mL) zu einer Erhöhung der eNOS-Protein Menge in Endothelzellen um den Faktor ~2,5 nach drei Tagen führte [214]. Akute Effekte wurden dabei nicht beobachtet. In dieses Bild passt eine weitere aktuelle Arbeit, in welcher der Konsum von Rotwein (112-336 mL pro Tag) über drei Wochen bei jungen, gesunden Probandinnen – nicht jedoch nach akutem Konsum – langfristig zu einer Veränderung der Ansprechbarkeit glatter Gefäßmuskelzellen und damit einer verstärkten Flow-mediated dilation führte [215]. Dabei könnte eine Art mangelnde Feedback-Hemmung durch die kurzfristig geringere Verfügbarkeit von parakrin sezerniertem NO für die Guanylatzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen durch Konkurrenz mit Polyphenolen langfristig die Ansprechbarkeit des Systems verändern. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die in einer klinischen Studie beobachteten Effekte des Kiefernrintenextraktes auf die Flow-mediated dilation über 8 Wochen sein [216]. Moncada et al. legten für einen derartigen Erklärungsversuch mit einer nachgewiesenen Veränderung der Resonanz des Guanylatzyklase-Systems für Nitrovasodilatoren nach Blockierung der vaskulären NO-Synthese *in vitro* und *in vivo* bereits profunde mechanistische Grundlagen vor [217].

Aus Endothelzellen freigesetztes NO wurde durch die Reaktion mit der Fluoreszenzsonde DAF-2 detektiert, was konzentrationsabhängig durch die untersuchten Substanzen beeinflusst werden konnte. Die Polyphenole schienen im verwendeten Modell sowohl über kurze (45 min) als auch über lange (14-20 h) Inkubationszeiten eine eher hemmende Wirkung über mögliche Scavenging-Mechanismen auf die NO-Freisetzung zu entfalten. Inwieweit hier ein tatsächlich *in vivo* relevanter Mechanismus mit Auswirkung auf die Modulierung des eNOS-Guanylatzyklase-Systems simuliert werden konnte, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

2.2.5 Fragestellung: Einfluss des Kiefernextraktes auf methylierte Arginine und Endothelin-1 als Risikofaktoren der Endothelialen Dysfunktion *in vivo*

2.2.5.1 Endogene Inhibitoren von NO-Synthasen

Asymmetrisches Mono- und Dimethylarginin (NMMA und ADMA) sowie symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) sind Aminosäuren (Abb. 2.6), die aus dem Stoffwechsel des Proteinabbaus stammen. Nach N-Methylierung von Arginin-Resten in Proteinen durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (= PRMTs) und darauffolgender Proteolyse werden diese Aminosäuren *in vivo* zunächst ins Zytoplasma und daraufhin aus der Zelle in den Blutkreislauf freigesetzt.

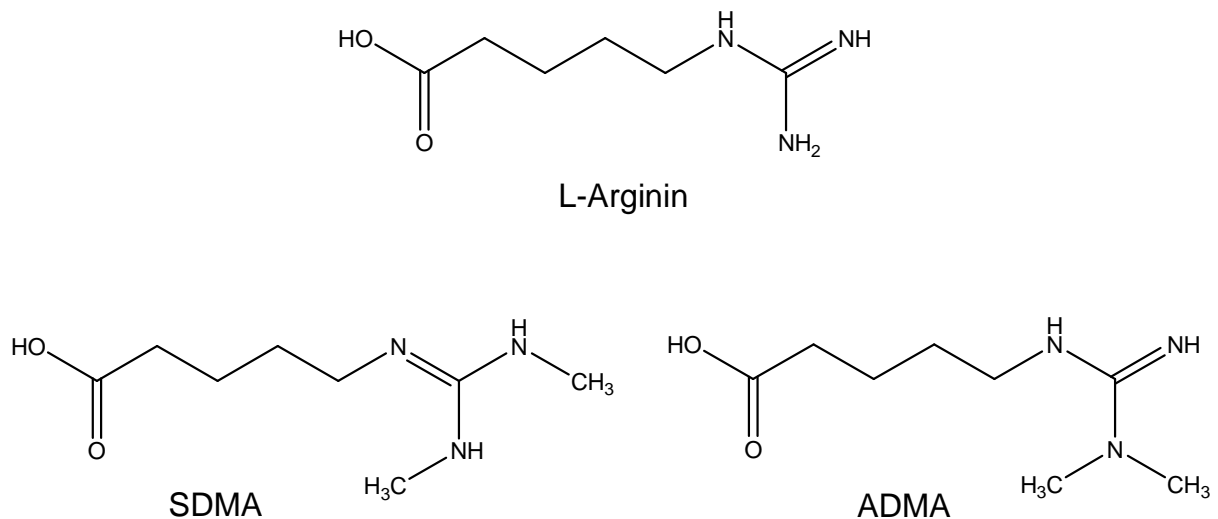


Abb. 2.6: Asymmetrisches (ADMA) und symmetrisches (SDMA) Dimethylarginin

ADMA wird renal eliminiert und durch spezielle Enzyme (Dimethylarginin-dimethylaminohydrolasen (DDAH)) zu L-Citrullin und Di- bzw. Monomethylamin abgebaut, wobei der zweite enzymatische Abbauweg für ~80 % der ADMA-Clearance verantwortlich zeichnet. Falls dieser katabole enzymatische Mechanismus nicht funktionierte, wurde anhand der Proteinumsatzrate mit einer täglichen, geschätzten physiologischen Gesamtproduktion des menschlichen Körpers von ~300 µmol ADMA berechnet, dass die Konzentration von ADMA pro Tag um 5 µM pro Liter Plasma steigen würde [218]. ADMA-Plasmaspiegel von gesunden Probanden schwanken zwischen 0,3-0,5 µM [219]. SDMA wird

im Gegensatz dazu – soweit der aktuelle Wissensstand – vornehmlich renal eliminiert und ist aus diesem Grund auch stark mit dem Nierenfunktionsparameter Cystatin C assoziiert [220].

ADMA erwies sich in einer Studie mit 2543 KHK-Patienten als unabhängiger Faktor für die Vorhersage der allgemeinen und besonders der kardiovaskulären Mortalität [221]. Inzwischen wurden zahlreiche Erkrankungen mit erhöhten ADMA- bzw. SDMA-Plasmaspiegeln in Verbindung gebracht [222]. Am prominentesten war dabei bislang die Rolle von ADMA und NMMA als endogene Inhibitoren von NO-Synthasen und damit zusammenhängend die bereits erwähnte Korrelation erhöhter ADMA-Plasmaspiegel mit KHK und Endothelialer Dysfunktion. Die zugrundeliegende Hypothese beruhte auf Beobachtungen, denen zufolge durch zusätzliche L-Arginin-Supplementierung offensichtlich kurzfristig die NO-Konzentration weiter erhöht werden konnte, trotzdem sich *in vivo* die L-Arginin Konzentrationen mit $\geq 100 \mu\text{M}$ deutlich über dem K_M -Wert für die eNOS ($K_M = 3,14 \mu\text{M} \approx 0,55 \mu\text{g/mL}$ [223]) befanden. Dieses Phänomen – auch bekannt als „L-Arginin-Paradox“ – wurde mit einer pathologischen intrazellulären Anreicherung von ADMA bzw. NMMA und einer kompetitiven Aufhebung dieser Hemmung durch additives L-Arginin erklärt. Der K_i -Wert für ADMA am isolierten eNOS-Enzym wurde mit $0,9 \mu\text{M}$ angegeben, wobei die NO-Produktion des Enzyms bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ADMA um 19 % gesenkt wurde. In intakten Endothelzellen wurde eine intrazelluläre physiologisch vorkommende Konzentration von $3,6 \mu\text{M}$ ADMA gemessen. Eine zugegebene Konzentration von $5 \mu\text{M}$ ADMA im Inkubationspuffer vermochte die NO-Produktion aus kultivierten Endothelzellen um 12 % zu hemmen [223].

Die durchgeführten Humanstudien zeichneten bislang ein sehr heterogenes Bild, was den Nutzen einer zusätzlichen L-Arginin-Applikation angeht. Hypercholesterinämische Patienten ($n = 27$) nahmen über vier Wochen in einer randomisierten, doppelt-blinden, cross-over Studie 21 g L-Arginin pro Tag ein. Es verbesserte sich die Flow-mediated dilation im Vergleich zur Placebo-Intervention von $1,7 \pm 1,3 \%$ auf $5,6 \pm 3,0 \%$ [224]. Im Gegensatz dazu konnten in einer randomisierten, doppelt-blinden Studie, die 133 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit einschloss, mit einer täglichen L-Arginin Dosis von 3 g über sechs Monate keine positiven Effekte, sondern eher Trends zu einer nachteiligen Entwicklung gefunden werden [225]. Diese trat besonders durch eine deutliche Verringerung der Flow-mediated dilation nach der Behandlung mit L-Arginin hervor, was die Autoren unter anderem als Adaptionsprozess deuteten.

Bislang gab es nur sehr wenige publizierte Arbeiten, die eine aktive Intervention mit Polyphenolen hinsichtlich einer Veränderung der ADMA-Plasmaspiegel in einer klinischen

Studie untersuchten. Für die in manchen Studien gefundenen positiven Effekte von Polyphenolen auf kardiovaskuläre Risikofaktoren fehlt bis dato eine schlüssige mechanistische Erklärung. Die am Universitätsklinikum Zürich im Zentrum für Kardiologie unter der Leitung von Frank Enseleit durchgeführte doppelt-blinde, randomisierte, placebo-kontrollierte, cross-over Humanstudie mit KHK-Patienten (n = 23) [216] sollte erstmals unter anderem die Frage beantworten, inwieweit die Einnahme von Pycnogenol® (200 mg/d über acht Wochen) die ADMA- und SDMA-Plasmaspiegel beeinflussen kann.

2.2.5.2 Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptid, das aus 21 Aminosäuren besteht und starke vaskonstriktorische Eigenschaften besitzt. Es ist somit an der komplexen Regulation des Blutdruckes und -flusses wesentlich beteiligt. Zudem scheint es bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu spielen [226]. Die ET-1-Bildung verläuft in einer Kaskade aus mehreren proteolytischen Schritten. Dabei werden aus großen Preproendothelinen (212 Aminosäuren) kleinere wirksame Peptide (Endothelin-1-3) freigesetzt. Durch unterschiedliche Subtypen und Verteilung seiner Rezeptoren wirkt es an glatten Gefäßmuskelzellen vor allem vasokonstringierend, darüber hinaus wurden in Endothelzellen auch NO-freisetzende Phänomene durch Aktivierung von ET-1 Rezeptoren und eine Beteiligung an immunologischen Prozessen beschrieben [227]. Interessanterweise hemmt eine Überexpression des ET_B-Rezeptorsubtyps auf soliden Tumoren die Infiltration mit T-Zellen, was eine Anwendung von selektiven ET-Rezeptorantagonisten in Aussicht stellt, um die Immuntherapie von Tumoren zu verbessern [228]. Derzeit finden Endothelinrezeptorantagonisten wie Bosentan nur bei der Indikation pulmonarer Hypertonie klinische Anwendung. Humanstudien zur Verbesserung der Endothelialen Dysfunktion und frühen Atherosklerose mit ET-1-Antagonisten laufen derzeit und scheinen, wie eine doppelt-blinde, randomisierte, placebo-kontrollierte Arbeit mit 47 Patienten, die an nicht-obstruktiver KHK erkrankt sind und über sechs Monate 10 mg Atrasentan oder Placebo einnahmen, vielversprechend hinsichtlich eines Nutzens zu sein (verbesserte Flow-mediated dilation mit koronarer Applikation von Acetylcholin um 39,67 %, KI: 23,23; 68,21 %, versus Placebo -2,22 %, KI: -27,37; 15,28 %) [229].

Was nun die Bedeutung der Polyphenole in Bezug auf eine Beeinflussung der ET-1 Sekretion bzw. Wirkung betrifft, so gab es aus *in vitro* Studien Hinweise dafür, dass z.B. Epigallocatechingallat (EGCG) – ein Flavonoid aus grünem Tee – in einer Konzentration von 10 µM über acht Stunden die ET-1 Sekretion aus humanen Endothelzellen verringerte [230].

Ebenso wurde für Rotwein-Extrakt in einer Konzentration von 12,5 µg/mL eine > 50 %ige-Hemmung der ET-1 Sekretion aus bovinen Endothelzellen gefunden [231].

Nur wenige publizierte Humanstudien beschäftigten sich bis dato mit der Wirkung von Polyphenolen auf ET-1 Bildung und Sekretion *in vivo*. Die am Universitätsklinikum Zürich im Zentrum für Kardiologie durchgeführte doppelt-blinde, randomisierte, placebo-kontrollierte cross-over Humanstudie mit KHK-Patienten (n = 23) [216] sollte auch die Frage beantworten, inwieweit eine Einnahme von Pycnogenol® (200 mg/d über acht Wochen) die ET-1 Plasmaspiegel beeinflussen kann.

2.2.6 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

In Voruntersuchungen wurde zunächst die Hypothese im Zusammenhang mit dem „L-Arginin-Paradox“ überprüft, ob steigende Mengen an L-Arginin-Aspartat *in vitro* zu einer Steigerung der NO-Produktion von Endothelzellen führen und damit die mögliche intrazelluläre kompetitive Blockade durch methylierte Arginine verändern könnten. Dazu wurden EA.hy 926 Endothelzellen in entsprechender Dichte ausgesät und mit PMA vorstimuliert, um die eNOS-Expression und die Empfindlichkeit des Assays zu erhöhen [199]. Danach wurden die Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen L-Arginin-Aspartat für 5 min vorinkubiert, dann zudem mit Calciumionophore 4-Bromo A-23187 sowie mit der Fluoreszenzsonde DAF-2 versetzt und 45 min im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde die Erhöhung der Fluoreszenz durch gebildetes DAF-2T im Zellkulturüberstand in Relation zur Kontrolle gemessen (s. 4.5 Material und Methoden).

Darüber hinaus wurde in Vorversuchen die kumulative ADMA-Freisetzung zweier Zelllinien untersucht, was neuen *in vitro* Testungen mit Bezug auf den ADMA- und Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase-Stoffwechsel Vorschub leisten könnte. Dafür wurden EA.hy 926 Endothelzellen und A-673 Rhabdomyosarkom-Zellen über 48 h inkubiert und die Anreicherung von ADMA im Zellkulturüberstand mittels ELISA-Testsystem quantifiziert (s. 5 Material und Methoden).

In die Humanstudie eingeschlossen wurden 28 KHK-Patienten, wovon 23 die single-center, prospektive, randomisierte, doppelt-blinde und placebo-kontrollierte cross-over Studie beendeten. Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und erhielten zunächst für acht Wochen zusätzlich zu ihrer regelmäßigen Medikation Pycnogenol® 200 mg/d oder Placebo. Gemäß dem cross-over Design wurde nach einer wash-out Phase von zwei Wochen die Pycnogenol®- oder Placebo-Medikation vice versa verabreicht. Vor Beginn, nach acht, zehn und achtzehn Wochen wurden jeweils Plasmaproben gewonnen und analysiert (s. 5 u. 6

Material und Methoden). Für die ADMA-, SDMA- und ET-1 Bestimmungen wurden jeweils ELISA-Testsysteme verwendet.

2.2.7 Ergebnisse

2.2.7.1 *In vitro*: Voruntersuchungen

In Relation zur unbehandelten Kontrolle (Co) führte die Inkubation der Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen L-Arginin-Aspartat akut zu einer konzentrationsabhängig steigenden NO-Freisetzung, angezeigt durch die erhöhte Bildung von DAF-2T (Abb. 2.7). Dabei erhöhte eine Konzentration von 5 μ M L-Arginin-Aspartat im Inkubationspuffer die NO-Konzentration um den Faktor $1,10 \pm 0,15$. 50 μ M L-Arg-Asp steigerten die extrazelluläre NO-Freisetzung um den Faktor $1,36 \pm 0,05$, sowie 5 mM nochmals auf das 1,65-fache ($\pm 0,09$) der Kontrolle. L-NMMA in einer Konzentration von 1 mM diente als eNOS Inhibitor (Faktor in Relation zur Co: $0,16 \pm 0,04$).

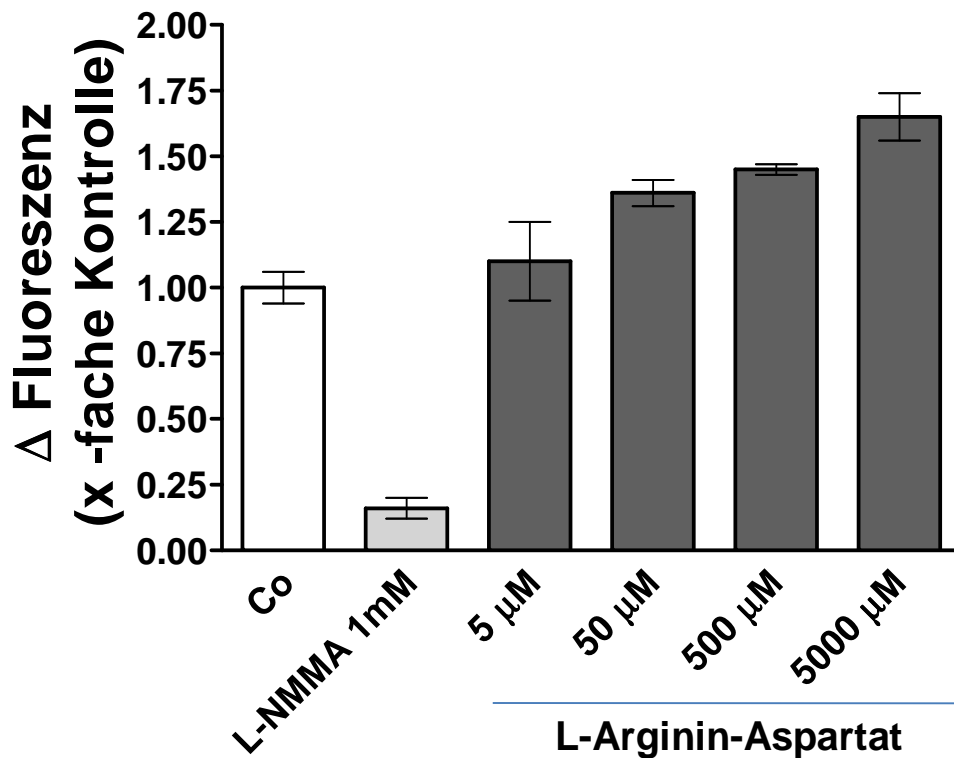


Abb. 2.7: Einfluss von L-Arginin-Aspartat auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen. EA.hy 926 Endothelzellen wurden zunächst mit PMA über 20 h kultiviert. Danach wurden die Zellen für 5 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Arginin-Aspartat (5-5000 μM) vorinkubiert. Daraufhin wurde eine Calciumionophore sowie die Fluoreszenzsonde DAF-2 zugesetzt und die Ansätze für 45 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln inkubiert, woraufhin die Fluoreszenzveränderung im Zellkulturüberstand durch entstandenes DAF-2T gemessen wurde. Dargestellt ist die entsprechende NO-Freisetzung des jeweiligen Ansatzes bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (Co). L-NMMA diente als eNOS-Inhibitor. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung.

Die ADMA-Freisetzung und Sekretion ins Zellkulturmedium von zwei Zelllinien (EA.hy 926 und A-673) wurde in jeweils separaten Ansätzen pro Zeitpunkt mehrfach untersucht (Abb. 2.8). Vom Zeitpunkt $t = 0$ ($0,31 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ADMA) an erhöhte sich durch die Produktion der Endothelzellen die ADMA-Konzentration im Medium über $0,45 \pm 0,03 \mu\text{M}$ nach 12 h bis hin zu einer Verdoppelung der Ausgangswerte mit $0,63 \pm 0,02 \mu\text{M}$ nach 48 h. Im Gegensatz dazu war ausgehend vom Zeitpunkt $t = 0$ mit $0,40 \pm 0,01 \mu\text{M}$ die ADMA-Konzentration im Überstand der Rhabdomyosarkomzellen A-673 bei 12 h $1,23 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Nach 48 h lag die gemessene Konzentration dann um den Faktor ~ 7 höher als die Ausgangskonzentration bei $2,93 \pm 0,20 \mu\text{M}$.

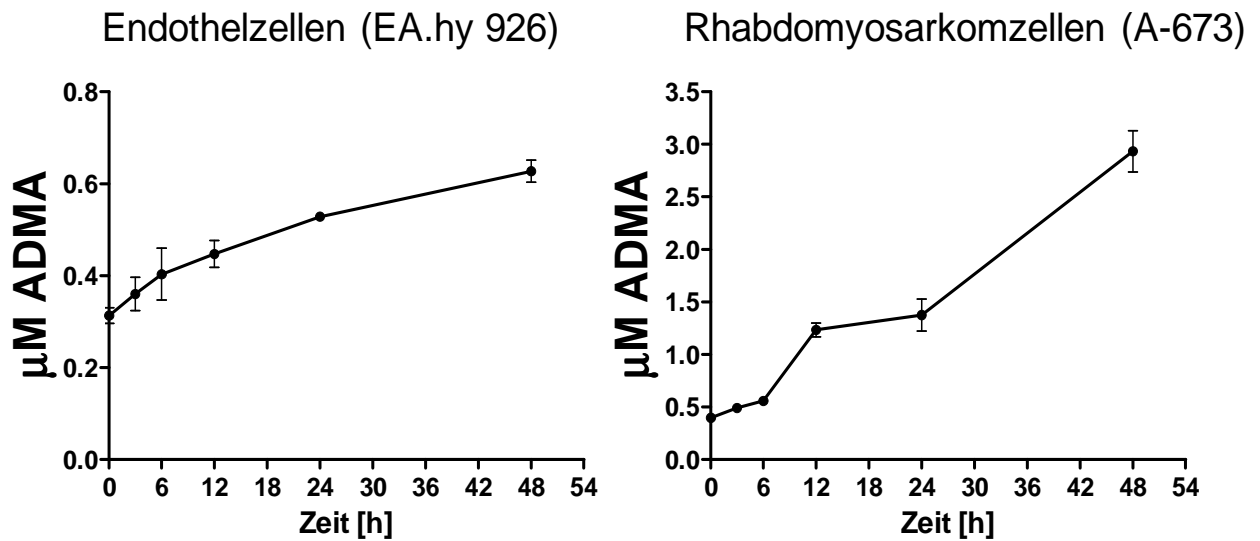


Abb. 2.8: Freisetzung von Asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) aus Endothel- und Rhabdomyosarkomzellen ins Zellkulturmedium über die Zeit. Pro Zeitpunkt wurden jeweils getrennte, unabhängige Ansätze untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 2$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert.

2.2.7.2 *In vivo*: Klinische Studie

Die Mittelwerte der ADMA-Plasmakonzentrationen (μM) waren jeweils vor Beginn der Intervention (Basislinienwerte) bei $0,47 \pm 0,11 \mu\text{M}$ vor der Pycnogenol[®]-Behandlung bzw. $0,45 \pm 0,12 \mu\text{M}$ vor der Behandlung mit Placebo. Nach dem Ende des Behandlungszeitraums (8 Wochen) lagen die Werte bei $0,49 \pm 0,11 \mu\text{M}$ nach Pycnogenol[®]-, und $0,50 \pm 0,12 \mu\text{M}$ nach Placebo-Intervention. In Abb. 2.9 sind die einzelnen ADMA-Werte mit den Mittelwerten und den entsprechenden 95 %-Konfidenzintervallen aufgetragen. Die mittlere Differenz der jeweiligen verbundenen bzw. gepaarten Stichproben mit Bezug auf die Ausgangswerte war für die Pycnogenol[®]-Behandlung $0,01 \pm 0,11 \mu\text{M}$ und für die Placebo-Behandlung $0,05 \pm 0,12 \mu\text{M}$. Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung mit dem D'Agostino-Pearson Test [232] und dem Kolmogorow-Smirnow Test untersucht (GraphPad Prism[™] Version 5.00). Nachdem gemäß dem Kolmogorow-Test alle Daten einer Normalverteilung entsprechend zugeordnet, jedoch die 0-Hypothese beim Pearson-Test lediglich für drei der vier Datenpools der Untersuchungspunkte angenommen werden konnte, wurde mit einem Wilcoxon matched pair test für verbundene Stichproben unter Annahme nicht-normal verteilter Daten der Unterschied zwischen den Daten vor und nach Behandlung untersucht. Es wurden gemäß der gewählten Teststatistik keine signifikanten Unterschiede gefunden (Basislinie versus Behandlung: Pycnogenol[®] $p = 0,988$; Placebo $p = 0,057$).

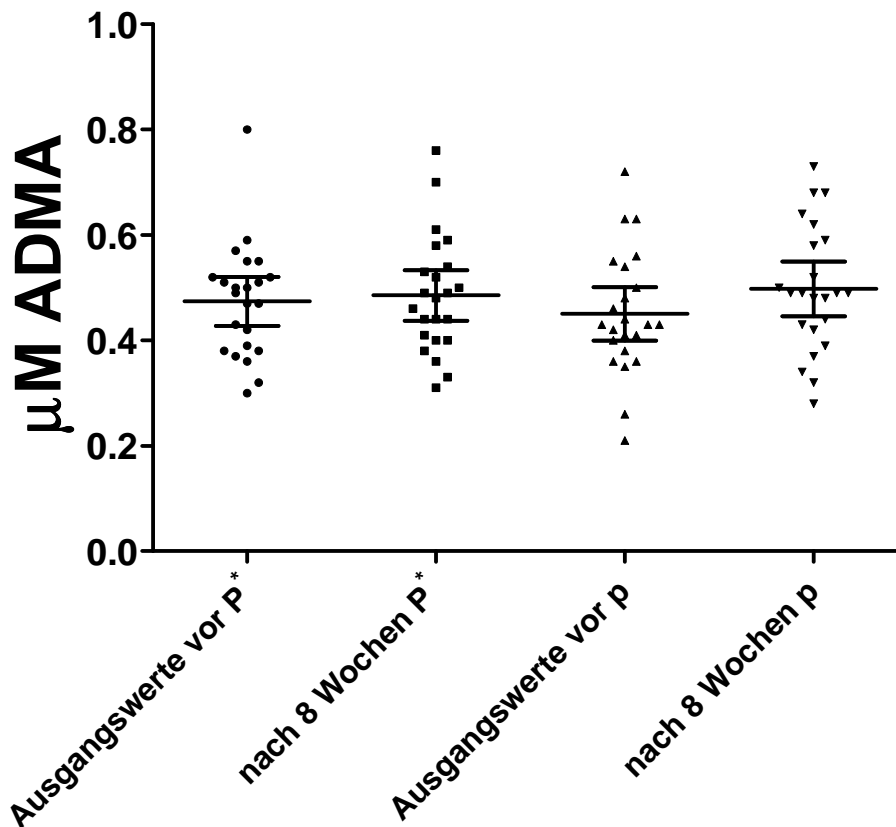


Abb. 2.9: ADMA-Bestimmung im Plasma jeweils vor (Ausgangswerte) und nach (nach 8 Wochen) der Intervention mit Pycnogenol® (P*) oder Placebo (p). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 23$, $\pm 95\%$ Konfidenzintervall.

Die Mittelwerte der SDMA-Plasmakonzentrationen (μM) waren jeweils vor Beginn der Intervention (Basislinienwerte) bei $0,47 \pm 0,13 \mu\text{M}$ vor der Pycnogenol®-Behandlung bzw. $0,45 \pm 0,12 \mu\text{M}$ vor der Behandlung mit Placebo. Nach dem Ende des Behandlungszeitraums (8 Wochen) lagen die Werte bei $0,47 \pm 0,13 \mu\text{M}$ nach Pycnogenol®, und $0,51 \pm 0,13 \mu\text{M}$ nach Placebo-Intervention. In Abb. 2.10 sind die einzelnen SDMA-Werte mit den Mittelwerten und den entsprechenden 95 %-Konfidenzintervallen aufgetragen. Die mittlere Differenz der jeweiligen verbundenen bzw. gepaarten Stichproben mit Bezug auf die Ausgangswerte war für die Pycnogenol®-Behandlung $0,01 \pm 0,18 \mu\text{M}$ und für die Placebo-Behandlung $0,06 \pm 0,14 \mu\text{M}$. Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung mit dem D'Agostino-Pearson Test und Kolmogorow-Smirnow Test untersucht (GraphPad Prism™ Version 5.00). Nachdem die 0-Hypothese bei beiden Tests lediglich für drei der vier Datenpools der Untersuchungspunkte angenommen werden konnte, wurde mit einem Wilcoxon matched pair test für verbundene Stichproben unter Annahme nicht-normal

verteilter Daten der Unterschied zwischen den Daten vor und nach Behandlung untersucht. Es wurden gemäß der gewählten Teststatistik keine signifikanten Unterschiede gefunden (Basislinie versus Behandlung: Pycnogenol® $p=0,637$; Placebo $p=0,051$).

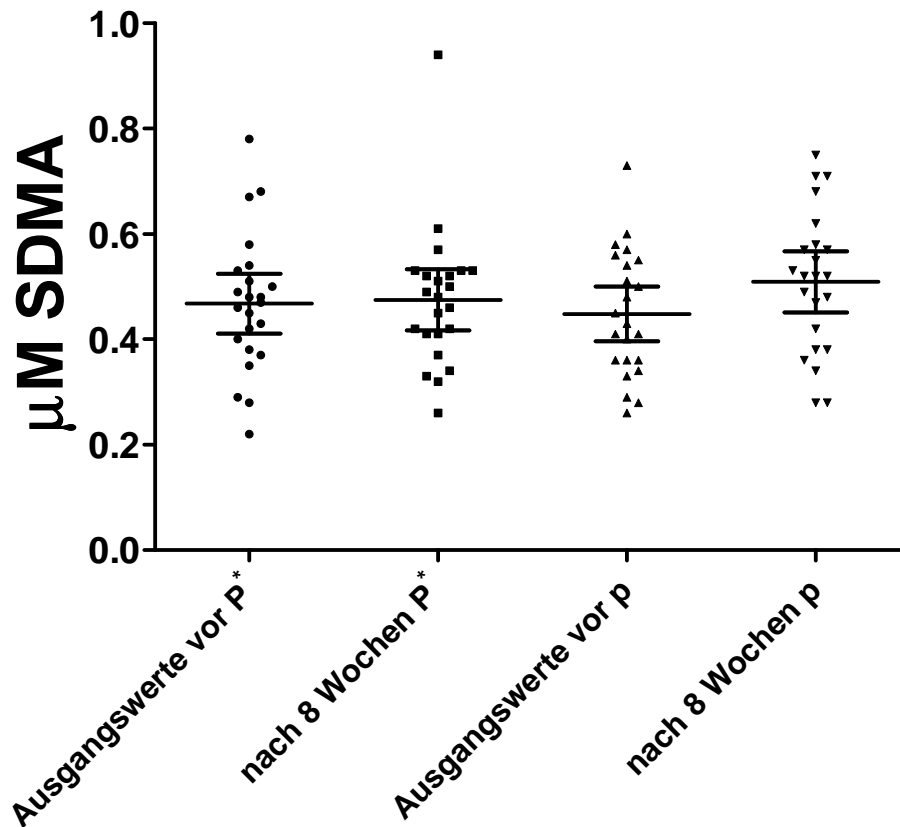


Abb. 2.10: SDMA-Bestimmung im Plasma jeweils vor (Ausgangswerte) und nach (nach 8 Wochen) der Intervention mit Pycnogenol® (P*) oder Placebo (p). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 23$, $\pm 95\%$ Konfidenzintervall.

Die Mittelwerte der ET-1-Plasmakonzentrationen (pg/mL) waren jeweils vor Beginn der Intervention (Basislinienwerte) bei $1,20 \pm 0,36$ pg/mL vor der Pycnogenol®-Behandlung bzw. $1,23 \pm 0,27$ pg/mL vor der Behandlung mit Placebo. Nach dem Ende des Behandlungszeitraums (8 Wochen) lagen die Werte bei $1,27 \pm 0,30$ pg/mL nach der Pycnogenol®, und $1,21 \pm 0,30$ pg/mL nach Placebo-Intervention. In Abb. 2.11 sind die ET-1-Werte mit Mittelwerten und den entsprechenden 95 %-Konfidenzintervallen aufgetragen. Die mittlere Differenz der jeweiligen verbundenen bzw. gepaarten Stichproben der Patienten mit Bezug auf die Ausgangswerte war für die Pycnogenol®-Behandlung $0,07 \pm 0,28$ pg/mL und für die Placebo-Behandlung $-0,01 \pm 0,27$ pg/mL. Die Daten wurden auf ihre Normalverteilung mit dem D`Agostino-Pearson Test und Kolmogorow-Smirnow Test untersucht (GraphPad

Prism™ Version 5.00). Nachdem dies mit hoher Wahrscheinlichkeit bei beiden Tests angenommen werden konnte (Wahrscheinlichkeit, die 0-Hypothese die Daten seien normal verteilt, fälschlicherweise abzulehnen jeweils $p \geq 0,1$), wurde mit einem t-Test für verbundene Stichproben der Unterschied zwischen den Daten vor und nach Behandlung untersucht. Es wurden gemäß der gewählten Teststatistik keine signifikanten Unterschiede gefunden (Basislinie versus Behandlung: Pycnogenol® $p= 0,269$; Placebo $p= 0,822$; Wilcoxon matched pair test: $p= 0,100$ bzw. $p= 0,761$).

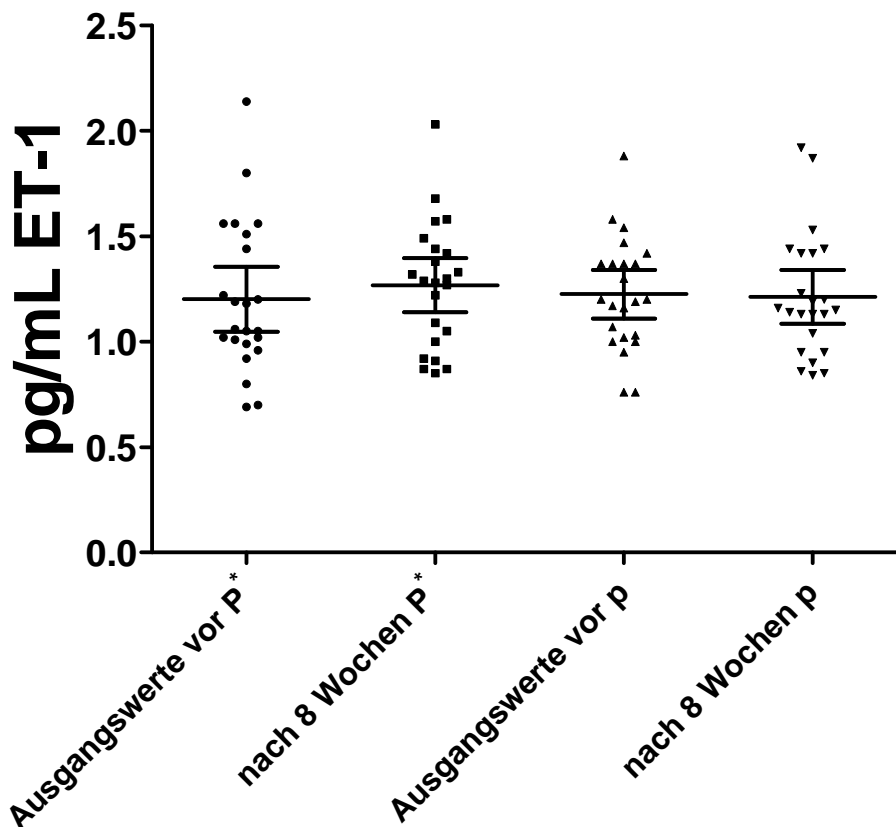


Abb. 2.11: ET-1-Bestimmung im Plasma jeweils vor (Ausgangswerte) und nach (nach 8 Wochen) der Intervention mit Pycnogenol® (P*) oder Placebo (p). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 23$, $\pm 95\%$ Konfidenzintervall.

2.2.8 Diskussion

2.2.8.1 *In vitro*: Voruntersuchungen

Es wurde in Vorversuchen mit einem Zellkulturmodell in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten gezeigt, dass durch steigende Konzentrationen von L-Arginin-Aspartat – trotz einer scheinbar deutlichen Überschreitung des K_m -Wertes der eNOS – eine erhöhte NO-Freisetzung erzeugt werden konnte. Zudem wurde die unterschiedliche ADMA-Freisetzung

ins Zellkulturmedium zweier Zelllinien über die Zeit ermittelt. Die möglichen Gründe für diese Phänomene und deren Relevanz sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Die durchgeführten Experimente stellen ein stark vereinfachtes Modell der tatsächlichen Situation im Endothel *in vivo* dar. In einer grundlegenden mechanistischen Arbeit von Hardy und May [233], die die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin der eNOS in Endothelzellen untersuchten, wurde der K_m -Wert für die eNOS in Endothelzell-Extrakten mit 2 μM beziffert. Dagegen wurde eine halbmaximale Stimulierung der eNOS in intakten Endothelzellen erst bei 29 μM L-Arginin im Medium erreicht. In den vorliegenden eigenen Versuchen steigerten 50 μM L-Arginin-Aspartat die NO-Freisetzung um ~36 %. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der entscheidende „Flaschenhals“ als limitierender Faktor der intrazellulären eNOS-Enzymaktivität die zelluläre L-Arginin Aufnahme durch membranständige γ^+ -Transporter, damit die Verfügbarkeit in den Zellen und dort besonders im Mikrokompartment der Caveolae sei. In den eigenen Versuchen wurde L-Arginin-Aspartat anstatt L-Arginin verwendet, da diese Kombination der Aminosäuren häufig in Nahrungsergänzungsmitteln z.B. für Sportler oder in Potenzmitteln auftaucht – mit zweifelhaftem Nutzen [234].

Die andere Hypothese für eine Erklärung des L-Arginin-Paradoxes, nämlich die der Aufhebung der intrazellulären Hemmung der eNOS durch methylierte Arginin-Derivate (ADMA, NMMA) mittels Zugabe von erhöhten extrazellulären L-Arginin Dosen, verfolgte auch die Gruppe um Jay Zweier. Im Zellkulturmodell mit bovinen Endothelzellen verifizierten sie zunächst die entscheidenden Konzentrationsverhältnisse sowie enzymkinetische Parameter zur intrazellulären eNOS-Inhibition durch ADMA und NMMA. Dabei entdeckten sie, dass sich die methylierten Arginin-Derivate in Zellen anreichern können [223]. Sie schätzten die Inhibition der eNOS im physiologischen Grundzustand der Zellen auf ~12 % bei einer gemessenen intrazellulären Konzentration von 151 μM L-Arginin, 3,6 μM ADMA und 2,9 μM NMMA. Eine intrazelluläre Anreicherung von ADMA und NMMA in EA.hy 926 Endothelzellen (nach 48 h Verdoppelung der extrazellulären Konzentration im Zellkulturmedium s. Abb. 2.8) und eine wiederum kompetitive Verdrängung durch zugesetztes L-Arginin könnte somit auch eine Erklärung für die eigenen Befunde hinsichtlich der Erhöhung der NO-Produktion nach additiver Zugabe von hohen Konzentrationen L-Arginin sein.

Und so scheint es, als könnte additives L-Arginin auch *in vivo* die NO-Freisetzung beeinflussen [235], obwohl sich die physiologischen L-Arginin Werte in humanem Plasma zwischen 40-115 μM [236] bewegen. Ein wissenschaftlich dynamischer Disput darüber, ob die L-Arginin-Supplementierung bei Herz-Kreislauf-Patienten oder bei Gesunden z.B. Sportlern einen Nutzen haben kann, ist in der aktuellen Literatur häufig zu finden, jedoch

dabei keine eindeutige Evidenz-basierte herrschende Meinung auszumachen. Empfehlungen zur aktiven Supplementierung sollten allerdings äußerst restriktiv ausgesprochen werden [237]. Durch die i.v. Applikation von hohen Dosen L-Arginin ließ sich *in vivo* in mehreren Humanstudien eine Vasodilatation vermeintlich durch eine Erhöhung der NO-Freisetzung erreichen. Jedoch scheint dabei auch die gesteigerte Ausschüttung von Wachstumshormonen eine entscheidende Rolle zu spielen und die Effekte sind teilweise schwierig zu trennen. Nach Infusion von 30 g L-Arginin stiegen die Plasmaspiegel nach 30 min auf 6219 μM [235], in den eigenen Arbeiten wurde durch 5000 μM L-Arginin-Aspartat noch eine weitere Steigerung der NO-Freisetzung beobachtet (s. Abb. 2.7). Interessanterweise führten, obwohl die eNOS L-Arginin als Substrat benötigt, sowohl hohe intravasale Dosen von L- als auch von D-Arginin *in vivo* zu einer Vasodilatation [238]. Bei peroraler Applikation konnte man zwar etwa bei einer Einnahme von 6 g L-Arginin nach 90 min einen Anstieg der Plasmakonzentration auf 310 μM erkennen [235], aber es wurden dadurch keine spezifischen messbaren pharmakologischen Effekte *in vivo* akut induziert.

Zudem konnte in eigenen Vorversuchen die unterschiedliche ADMA-Sekretion von zwei Zelllinien in das Zellkulturmedium ermittelt werden. Für EA.hy 926 Endothelzellen wurde dies bereits früher von der Gruppe um Rainer Böger untersucht [239], Daten zu Rhabdomyosarkomzellen (A-673) waren bislang nicht bekannt. Die Experimente können als Grundlage dazu beitragen, in weiterführenden Versuchen das spannende Feld der Regulation des zellulären Proteinmetabolismus und -katabolismus z.B. mit Hinblick auf Proteinmethyltransferasen, des ADMA- und Dimethylaminohydrolase-Stoffwechsels, sowie den Einfluss bestimmter Stoffe auf diese Prozesse genauer zu untersuchen.

In guter Übereinstimmung mit den Werten von Albsmeier et al., die in Zellkulturmedium mit 10 % FBS ADMA-Werte von $\sim 0,3 \mu\text{M}$ bestimmten, wurden in den eigenen Versuchen im Zellkulturmedium mit 10 % FBS Basalwerte zwischen $0,3\text{-}0,4 \mu\text{M}$ ADMA gefunden, deren Quelle offensichtlich dem enthaltenen Serum zuzuschreiben war [239]. Eine Steigerung der sekretierten ADMA-Menge aus den Endothelzellen während der Zeitspanne von 12-48 h um den Faktor $\sim 1,6$ konnte, auch was die Größenordnung anbelangte, in den eigenen Experimenten nachvollzogen werden (Faktor $\sim 1,4$). Im Gegensatz dazu sekretierten die Rhabdomyosarkomzellen – trotz vergleichbarer initialer Aussaatdichte ($0,3 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz in 6-well Zellkulturplatten) – deutlich höhere Mengen ADMA als die Endothelzellen über das vergleichbare Zeitintervall. Dies kann zum einen an den möglicherweise unterschiedlichen Proliferationsraten der Zelllinien liegen, die hier nicht näher untersucht wurden. Zudem stammen die Zellen aus sehr unterschiedlichen

Gewebe und während die Rhabdomyosarkomzelllinie eine klassisch isolierte Tumorzelllinie darstellt [240], sind die Endothelzellen aus einer Fusion von Primärzellen (HUVECs= human umbilical vein endothelial cells) mit der Lungenepithelzelllinie A-549 entstanden [241]. Somit scheint möglicherweise der Grad der malignen Transformierung der Zellen bei der ADMA-Freisetzung eine Rolle zu spielen. Neben den bislang am häufigsten angeführten Einflüssen methylierter Arginine auf NO-Synthasen scheinen sich in diesem Zusammenhang somit auch interessante tumorbiologische Trends hinsichtlich einer Bedeutung von ADMA abzuzeichnen. So wurden in einer Studie mit 43 Patienten, die an einer malignen hämatologischen Erkrankung litten, höhere Werte von ADMA im Plasma als bei einer gesunden Vergleichsgruppe gefunden ($1,59 \pm 0,79 \mu\text{M}$ versus $0,64 \pm 0,33 \mu\text{M}$ ADMA) [242]. Diese Befunde konnten auch japanische Forscher um Ryuji Hamamoto zuletzt bestätigen. Sie fanden in Krebszellen eine deutlich erhöhte Expression von Proteinmethyltransferasen, und auch in Plasmaproben von Patienten, die an verschiedenen malignen Erkrankungen wie Lungen- oder Mammakarzinomen litten, waren die ADMA-Plasmaspiegel im Vergleich zu einer gesunden Kohorte erhöht [243]. Proteinmethyltransferasen spielen offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Methylierung von Arginin-Resten in Histonen [244] und beeinflussen damit deren Funktion innerhalb des dynamischen Chromatinnetzwerks. Arzneimittelentwicklungen mit den Zielproteinen Proteinmethyltransferasen laufen gerade an, allerdings steht die Forschung hier noch am Anfang [245]. Ob sich ADMA als „Tumormarker“ etablieren kann, muss in künftigen Studien evaluiert werden.

2.2.8.2 *In vivo*: Klinische Studie

Durch die vorliegende Studie wurde deutlich, dass die Einnahme des Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) über einen Zeitraum von acht Wochen die ADMA-, SDMA und ET-1-Plasmaspiegel bei den rekrutierten KHK-Patienten nicht signifikant beeinflusste. Die Hintergründe dazu und die Relevanz der erhobenen Daten sollen im Folgenden diskutiert werden.

Erhöhte Plasmaspiegel methylierter Arginine (ADMA und SDMA) rückten in den letzten Jahren vermehrt als neue Risikofaktoren für eine Endotheliale Dysfunktion und damit als Indikatoren für ein gesteigertes kardiovaskuläres Risiko in den Fokus der Forschung [246]. Bislang sind ADMA, NMMA, und in gewissem Ausmaß auch SDMA die einzig bekannten aus post-translationalen Proteinmodifikationen in Form einer Methylierung entstammenden Moleküle, die eine spezifische, bekannte Wirkung auf bestimmte Enzyme (NO-Synthasen) ausüben [222]. Da es einige ermutigende Studien im Hinblick auf eine positive Wirkung von Polyphenolen auf die mit Endothelialer Dysfunktion assoziierten

Risikofaktoren gab [247], war es von großem Interesse, zu untersuchen, ob diese Wirkung auch unter anderem durch eine Modulierung von ADMA- oder SDMA-Plasmakonzentrationen zustande kommt.

Bislang adressierten nur sehr wenige klinische Studien diese Hypothese, und zur Untersuchung des Einflusses von Polyphenolen auf die SDMA-Plasmakonzentration ist bislang keine Publikation bekannt. Eine kleine, kontrollierte Studie, die sich unter anderem mit ADMA-Plasmaspiegeln in Abhängigkeit von der Einnahme von Flavonoiden befasste, zeigte bei einer Dosierung von 1000 mg/d Quercetin über einen Zeitraum von vier Wochen bei acht gesunden Probanden eine Reduzierung der ADMA-Konzentration im Plasma im Mittel um $-0,10 \mu\text{M}$ [248] (vor Behandlung $0,32 \pm 0,07 \mu\text{M}$ versus $0,22 \pm 0,06 \mu\text{M}$ nach Behandlung mit Quercetin; Kontrollgruppe ($n = 5$): $0,48 \pm 0,02$ bzw. $0,50 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Im Gegensatz dazu wurde in einer randomisierten, doppelt-blinden und placebo-kontrollierten cross-over Studie mit 89 postmenopausalen Probandinnen kein signifikanter Einfluss auf ADMA-Plasmakonzentrationen durch eine achtwöchige, tägliche Einnahme von 50 mg Isoflavonen festgestellt (mittlere Differenz mit Bezug auf Ausgangswerte in der Behandlungsgruppe $-0,02 \mu\text{M}$ ADMA 95 % KI: $-0,04-0,03$) [249]. Der Unterschied in der Behandlungsgruppe aus der eigenen Studie mit Kiefernrintenextrakt war eine nicht signifikante Steigerung der ADMA-Plasmakonzentration um $0,01 \mu\text{M}$ (95 % KI: $-0,04-0,06$) nach Behandlung in Relation zu den Ausgangswerten, im Gegensatz zu einer Erhöhung der ADMA-Plasmawerte im Mittel um $0,05 \mu\text{M}$ (95 % KI: $-0,004-0,10$) nach der Placebo-Intervention. Allerdings fanden Shiina et al. wiederum eine signifikante Verringerung der ADMA-Plasmakonzentrationen in einer randomisierten, einfach-blinden Studie mit 39 Probanden nach zweiwöchiger Einnahme von erstaunlicherweise sowohl weißer als auch dunkler Schokolade [250] (Ausgangswerte vorher: Dunkle Schokolade $0,43 \pm 0,10$, weiße Schokolade $0,43 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ADMA; nach Intervention: Dunkle Schokolade $0,38 \pm 0,10$, weiße Schokolade $0,37 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ADMA; Daten aus persönlicher Kommunikation mit N. Funabashi).

Obwohl es nicht auszuschließen ist, dass die potentiellen moderaten Einflüsse des Kiefernrintenextrakts auf ADMA-/SDMA-Plasmaspiegel im Sinne eines statistischen Fehlers 2. Art in der von Enseleit et al. durchgeführten Studie übersehen wurden, so war die Studie ausreichend mit statistischer Power versehen, um einen hypothetischen Unterschied vor und nach Behandlung mit dem Extrakt von $0,09 \mu\text{M}$ ADMA in 95 % der Fälle mit einem gepaarten t-Test als statistisch signifikant ($\alpha = 0,05$) zu bewerten (berechnet mit GraphPad StatMate™ 2.00, $n = 23$, SD der mittleren Differenz $0,12 \mu\text{M}$). Im Falle von SDMA würde ein Unterschied von $0,09 \mu\text{M}$ SDMA als kleinste mittlere Differenz noch in 70 % der Experimente als

signifikant erkannt ($n = 23$, SD der mittleren Differenz $0,18 \mu\text{M}$). Trotz der Assoziation mit einem erhöhten Risiko für KHK und Mortalität bei erhöhten Werten im Vergleich zu gesunden Kohorten [246] wurde noch keine Definition, Festlegung oder Referenzmethode etabliert und proklamiert, ab welchem konkreten Wert die ADMA- oder SDMA-Konzentrationen als pathologisch angesehen werden. So schien es, im Vergleich zu anderen Studien, als ob die Werte der hier untersuchten Patienten im Mittel in einem Bereich lagen, der auch bei gesunden Grundgesamtheiten zu finden ist ($0,3\text{-}0,5 \mu\text{M}$) [219]. Lediglich zwei Patienten erreichten ADMA- und SDMA-Konzentrationen $> 0,7 \mu\text{M}$ in der vorliegenden Studie. Ob bei Patientengruppen mit deutlicher erhöhten ADMA- und SDMA-Werten ein stärker ausgeprägter Effekt des Kiefernrintenextraktes möglich ist, sollte in klinischen Studien mit größeren Patientenzahlen, und wenn möglich, im Zusammenhang mit klinischen Endpunkten untersucht werden.

Endothelin-1 ist ein potent vasokonstringierendes Peptid, das die NO-Freisetzung im Endothel zu verändern vermag und eine pathologische Rolle sowohl bei kardiovaskulären Erkrankungen [251], aber z.B. auch bei septischen Schockzuständen spielt [252]. Es gab – obwohl bislang eine geringe Anzahl von klinischen Studien zu diesem Thema publiziert wurde – Hinweise darauf, dass Polyphenole die ET-1 Plasmaspiegel modulieren könnten. Jedoch konnte dies in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. In einer randomisierten, doppelt-blinden und placebo-kontrollierten Studie mit 60 postmenopausalen Probandinnen von Squadrito et al. [253] wurde allerdings ein Effekt von 54 mg/d des Isoflavonoids Genistein nach Einnahme über sechs Monate auf die ET-1 Plasmaspiegel gefunden (mittlere Ausgangswerte vor Behandlung $14 \pm 4 \text{ pg/mL}$ (Genistein-Gruppe) und $15 \pm 5 \text{ pg/mL}$ (Placebo-Gruppe); nach Behandlung $7 \pm 1 \text{ pg/mL}$ bzw. $13 \pm 6 \text{ pg/mL}$). Die Studie zielte dabei vor allem auf eine potentielle estrogenartige Wirkung von Genistein ab. Über die Rhythmik, Freisetzungreize und multiplen Gleichgewichte der Endothelin-Synthese und des -Abbaus ist bislang wenig bekannt. Akut scheinen bestimmte Polyphenole aus Äpfeln und Spinat zusammen mit dem enthaltenen Nitrat eine deutliche Steigerung der NO-Freisetzung im Blut zu bewirken. Allerdings wurde dabei in einer randomisierten und placebo-kontrollierten Studie mit 30 Probanden kein akuter Effekt auf die ET-1-Plasmakonzentrationen 140 min nach Intervention gefunden (Mittelwerte nach Intervention: Kontrolle ($1,8 \text{ pg/mL}$); Apfel-Gruppe ($1,9 \text{ pg/mL}$); Spinat-Gruppe ($1,7 \text{ pg/mL}$)) [254].

Ganz im Gegensatz dazu fanden Loke et al. in einer randomisierten und placebo-kontrollierten Studie mit 12 männlichen Probanden einen akuten Effekt auf die ET-1 Plasmakonzentration zwei Stunden nach Einnahme von 200 mg Quercetin oder (-)-Epicatechin [255]. Da keine genauen absoluten Werte zur ET-1-Bestimmung im Ergebnis-

Teil der Veröffentlichung angegeben waren, die sich insgesamt vergleichbar mit den in der eigenen Arbeit erhobenen Daten etwa zwischen 1,3-1,8 pg/mL bewegten, konnten die Differenzen zwischen Kontrolle und Behandlung nur graphisch geschätzt werden (~ -0,10 pg/mL für Quercetin-Gruppe). Aus dem dargestellten Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ließ sich die Streuung der Daten als Standardabweichung (SD) dabei ebenso schätzen (SD~ ± 0,12 pg/mL). Mit einer konservativ geschätzten SD der Differenzen (0,20 pg/mL), die im Normalfall stets größer als die SD der Grundgesamtheit ist, ließe sich dabei mit einer Probandenzahl $n = 12$ ein Unterschied von 0,10 pg/mL nur mit einer entsprechenden Wahrscheinlichkeit bei 40 % der durchgeführten Experimente als signifikant erkennen (paired two-tailed t-Test, $\alpha = 0,05$; mit GraphPad StatMate™ 2.00). In der eigenen Arbeit wurde bei einer nahezu doppelt so großen Patientenzahl ($n = 23$) kein signifikanter Unterschied vor und nach der Behandlung mit Kiefernrintenextrakt gefunden (Pycnogenol®-Gruppe vorher/nachher-Differenz: 0,07 pg/mL 95 % KI: -0,06-0,19; Placebo-Gruppe: -0,01 pg/mL 95 % KI: -0,13-0,10).

Jedoch führte in einer doppelt-blinden, randomisierten, placebo-kontrollierten Studie mit 58 hypertensiven Patienten über 12 Wochen die Behandlung mit Nifedipin und 100 mg/d Pycnogenol® im Gegensatz zu Nifedipin und Placebo zu einer Senkung der ET-1 Plasmaspiegel. Die ET-1 Plasmaspiegel, die sich dabei im hohen Bereich von 60-160 pg/mL bewegten, sanken nach drei Monaten in der Placebo-Gruppe um -4,53 und um -21,08 % (jeweils 50. Perzentil= Median-Wert) in der Pycnogenol®-Gruppe [187].

Ein plausibler Grund für einen potentiell nicht entdeckten Effekt des Kiefernrintenextraktes auf die in der eigenen Studie ermittelten Plasmaspiegel der untersuchten Parameter könnte zum einen die Möglichkeit beinhalten, dass die Probenahme am Morgen vor Einnahme der Medikation wahrscheinlich zum Zeitpunkt des $C_{ss, \min}$ (= Minimum der Plasmaspiegel bei Mehrfachdosierung) erfolgte und somit – auch im Hinblick auf eine mögliche circadiane Rhythmik der untersuchten Marker – keine akuten oder transienten, sondern nur dauerhaft veränderte Parameter erfasst wurden. Die gemessenen ET-1 Werte aus den eigenen Untersuchungen in Plasmakonzentrationsbereichen bis zu 2,14 pg/mL erschienen in Relation zu den anderen oben genannten Studien gut vergleichbar, zum Teil wurde aber auch über pathologisch stark erhöhte Werte berichtet (160 pg/mL [187]). Zum anderen sind neben den unterschiedlichen Werten, die offensichtlich auch durch unterschiedliche Messmethoden erhalten wurden, bei der validen Messung von ET-1 ferner die geringe Plasmahalbwertszeit (1-2 min) [256], die starke Proteinbindung [257] und die im Allgemeinen niedrigen Konzentrationen (pg-Bereich), die häufig eine Extraktion

und Aufkonzentrierung erforderlich machen, als kritische Punkte der Analytik zu nennen [258].

Immer wieder werden Zubereitungen mit hohem Gehalt an Polyphenolen z.B. aus den Früchten von *Theobroma cacao* oder aus der Rinde von *Pinus pinaster* (Pycnogenol®) im Zusammenhang mit Prävention oder als zusätzliche sichere Therapieoption bei (kardio-) vaskulären Erkrankungen genannt. Große klinische Effekte über kurze Zeiträume sind dabei nicht zu erwarten. Obwohl in der Studie von Enseleit et al. eine Verbesserung der Flow-mediated dilation und eine Verringerung der 15-F_{2t}-Isoprostan-Plasmakonzentrationen gefunden wurden [216], ist es unwahrscheinlich, dass Pycnogenol® dabei in der gewählten Dosierung (200 mg/d) und dem gewählten Studiendesign Einfluss auf Bildungs- oder Abbaustoffwechselwege von ADMA, SDMA und ET-1 nimmt. Dies fügt sich in das Bild eines vor Kurzem erschienenen Cochrane-Review zur bislang nicht ausreichend belegten Wirksamkeit und Sicherheit der Pycnogenol®-Einnahme bei chronischen Erkrankungen [259]. In dieser systematischen Übersichtsarbeit der zahlreichen klinischen Studien mit Pycnogenol® konnte durch die Schwierigkeiten beim Zusammenfassen der Studien mit teilweise geringen eingeschlossenen Patienten- bzw. Probandenzahlen, großer Heterogenität der Krankheitsbedingungen sowie unterschiedlicher ausgewerteter Endpunkte keine definitive Aussage zur Wirksamkeit des Kiefernextraktes getroffen werden. Der Extrakt sollte daher in zukünftigen, qualitativ hochwertigen Studien prospektiv an großen Probanden- oder Patientengruppen – um mögliche moderate Effekte richtig zu erkennen – mit klar definierten klinischen Endpunkten getestet werden.

2.3 Neue methodische Aspekte der NO-Quantifizierung

2.3.1 Stabilität der untersuchten Substanzen unter Testbedingungen

Die konstitutiven humanen NO-Synthasen (eNOS, nNOS) setzen geringe Mengen NO über die Zeit frei [7]. Mit entsprechender Stimulation der eNOS in Zellkulturmodellen mit Endothelzellen werden NO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich erreicht. Die tatsächlichen *in vivo*-Konzentrationen allerdings sind, auch bedingt durch eine erhöhte Anzahl von möglichen Interaktionspartnern mit NO wie z.B. große Mengen an Hämoglobin im Blut, teilweise wahrscheinlich noch geringer [9]. Die dafür neu entwickelte

Fluoreszenzsonde DAF-2 [41-42] erschien in diesem Zusammenhang für die sehr empfindliche Detektion dieser geringen NO-Konzentrationen geeignet, und deren Verwendung auf dem Gebiet der NO-Analytik ist inzwischen weit verbreitet. Für bestimmte Polyphenole, z.B. aus der Gruppe der Catechine oder Resveratrol, gab es einige Hinweise darauf, dass sie die NO-Freisetzung von konstitutiven NO-Synthasen wie der eNOS zu verändern im Stande wären [260]. Dabei wurde partiell über positive Ergebnisse im Sinne einer schwachen Erhöhung der NO-Produktion durch derartige Substanzen berichtet [192, 202] und dies deshalb im Zusammenhang mit einem möglichen Nutzen z.B. bei KHK-Erkrankungen gesehen. Nicht zuletzt deswegen war die Untersuchung des Einflusses dieser Verbindungen auf die NO-Freisetzung auch in der eigenen vorliegenden Arbeit von großem Interesse. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der untersuchten Spezies NO bekanntermaßen um ein Radikal handelte, die zu erwartenden NO-Konzentrationen im unteren nanomolaren Bereich lagen, und sich die beeinflussenden Substanzen aus der Klasse der Polyphenole bzw. Flavonoide in Lösung teilweise reaktiv und instabil verhielten [261], war das methodische Vorgehen im schwierigen Feld der NO-Analytik bei der Untersuchung derartiger Phänomene besonders entscheidend, um valide Messergebnisse zu erhalten.

In diesem Zusammenhang sollte also zunächst geklärt werden, wie sich die eingesetzten Polyphenole unter den entsprechenden Testbedingungen hinsichtlich einer Interferenz mit der verwendeten Fluoreszenzsonde DAF-2 verhielten, und ob dabei eine valide Quantifizierung des DAF-2T Signals möglich wäre. Dazu wurden die Substanzen (Metabolit M1, (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Resveratrol) in Assay-Puffer gelöst, 5 min bei Raumtemperatur sowie 45 min bei 37 °C inkubiert und ihre Fluoreszenz-Eigenschaften im Kontext des Testsystems untersucht.

2.3.1.1 Ergebnisse und Diskussion

Nach der initialen fluorimetrischen Vermessung (5 min bei RT) von Resveratrol, des Metaboliten M1, von (+)-Catechin sowie (-)-Epicatechin gelöst in Assay-Puffer und darauffolgender Inkubation unter Testbedingungen (45 min bei 37 °C im Dunkeln) zeigte sich besonders bei zwei der untersuchten Substanzen eine massive Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität (Abb. 2.12).

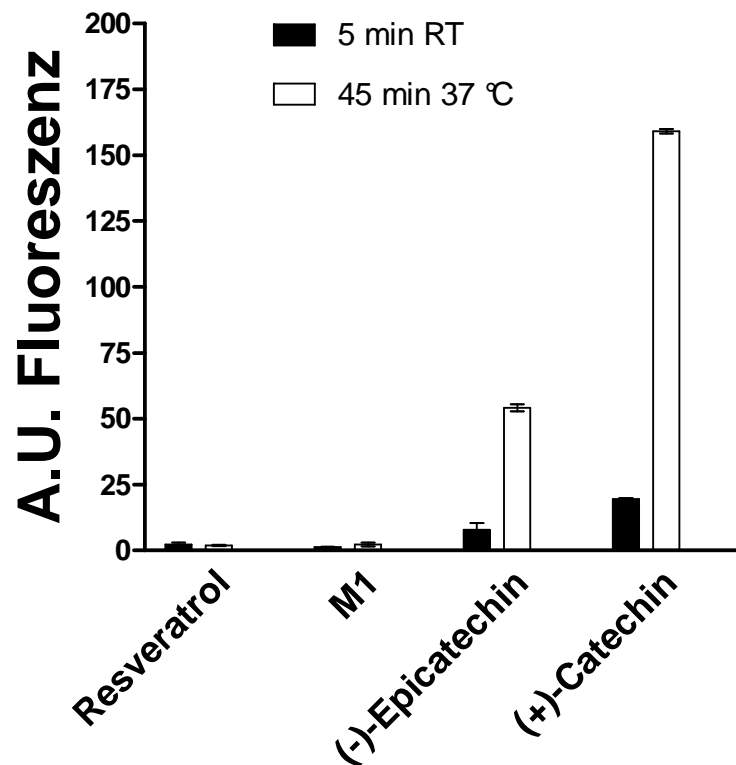


Abb. 2.12: Fluoreszenzsignale (Anregungs- und Emissionswellenlänge: 494 bzw. 515 nm) von verschiedenen Polyphenolen (10 µg/mL in Assay-Puffer), die entweder für 5 min bei RT (RT= Raumtemperatur 24 °C) oder für 45 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Bei (-)-Epicatechin erhöhte sich das Fluoreszenzsignal bei den untersuchten Exzitations- und Emissionswellenlängen (Ex: 494 nm; Em: 515 nm) siebenfach über die Zeit von $7,86 \pm 2,51$ A.U. (= arbitrary fluorescence units) nach 5 min auf $54,16 \pm 1,33$ A.U. nach 45 min. Die Lösung mit (+)-Catechin zeigte ein Ausgangsfluoreszenzsignal von $19,57 \pm 0,34$ A.U., das sich sogar achtfach nach der Inkubation unter Testbedingungen auf $159,01 \pm 0,85$ A.U. steigerte. Dagegen waren bei Resveratrol ($2,24 \pm 0,71$ A.U. nach 5 min; $1,87 \pm 0,27$ A.U. nach 45 min) und M1 ($1,26 \pm 0,11$ A.U.; $2,25 \pm 0,54$ A.U.) keine markanten Erhöhungen der Fluoreszenz im untersuchten Wellenlängenbereich zu verzeichnen.

Einige der untersuchten Substanzen – insbesondere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin – zeigten im Testsystem eine deutliche über die Zeit ansteigende dynamische Eigen-Fluoreszenz. Da sich diese starken Fluoreszenzerhöhungen auch in den Spektrumsbereichen der Exzitations- und Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluoreszenzsonde DAF-2 abspielten, sind Messungen in einem zellulären Testsystem zur NO-Quantifizierung in Gegenwart von Polyphenolen, in dem die Gesamtfluoreszenz des

Ansatzes aufgezeichnet würde, schwierig zu validieren. Deshalb sollten für derartige Untersuchungen selektive chromatographische Methoden eingesetzt werden, die eine isolierte Betrachtung des Umsatzes von DAF-2 mit NO zu DAF-2T erlauben.

Es ist bekannt, dass Polyphenole aufgrund ihrer Struktur und funktionellen Gruppen oxidationsempfindliche reaktive Substanzen sind und bei Anwesenheit in zu analysierenden Proben häufig Störungen und Interferenzen die Analytik betreffend herbeiführen können. Bei höheren pH-Werten steigt im Allgemeinen aufgrund der Deprotonierung der Phenole deren Reduktionsvermögen. Dies wirkt sich auch auf die Stabilität der Verbindungen in wässrigen Lösungen aus. So wurden in einer Pufferlösung mit pH= 9 bereits nach 4 h weder intakte (+)-Catechin- noch (-)-Epicatechin-Moleküle wiedergefunden. Bei pH= 7,4 gingen nach 12 h ~50 % dieser Moleküle verloren [261]. Über die Kinetik der dabei entstehenden Abbauprodukte, Addukte wie z.B. Dimere, oder Konfigurations- und Konformationsisomere ist bislang wenig bekannt. Für einen Bestandteil aus grünem Tee (EGCG= Epigallocatechingallat) wurden als Hauptmechanismen der Instabilität in wässriger Lösung Epimerisierungs- und auto-oxidative Dimerisierungsreaktionen beschrieben [262]. Diese entstehenden Moleküle weisen erwartungsgemäß dann wiederum verschiedene neue spektroskopisch messbare Eigenschaften auf. Besonders problematisch wird dies, wie in den eigenen Versuchen gezeigt wurde, z.B. beim Einsatz von Fluoreszenzsonden und der Messung der Summe der Fluoreszenz z.B. in Küvetten oder Zellkulturplatten. Da die Sonden und *in solutio* entstehende Produkte teilweise überlagernde Fluoreszenzspektren aufweisen und somit die Veränderung der Fluoreszenz nicht selektiv zugeordnet werden kann, könnte eine Fluoreszenzveränderung etwa als falsch positives Signal interpretiert werden. Die Größenordnung der Fluoreszenzsteigerung z.B. durch (+)-Catechin in den durchgeführten Experimenten übertraf dabei um mehr als das doppelte die der durch die NO-Freisetzung erzeugte Erhöhung der DAF-2T Konzentration nach Stimulation der Endothelzellen mit einer Calcium-Ionophore unter vergleichbaren Bedingungen. Hinzu kommt, dass Polyphenole und deren Metabolite teilweise starke Affinitäten zu Proteinen, aber auch zu Plastik-Gefäßen und -Oberflächen mit sowohl reversiblen als auch irreversiblen Bindungsmechanismen zeigten [26, 167]. Somit können die polyphenolischen Substanzen auch nach Inkubation durch rigides und häufiges Waschen teilweise nicht mehr aus dem System entfernt werden, oder werden danach mit einer nur schwer vorhersehbaren Kinetik wieder ins Testsystem freigesetzt.

Einem Teil des Problems ließe sich scheinbar beikommen durch das Mitführen von Kontrollen, die unter vergleichbaren Test-Bedingungen ohne Fluoreszenzsonde nur die zu untersuchende Substanz enthielten, und anschließender Subtraktion der jeweiligen

Eigenfluoreszenz. Dabei zu beachten ist neben anderen Unwägbarkeiten allerdings, dass die Sonde selbst das System beeinflussen kann und z.B. durch die dabei fehlende Konkurrenz ohne Sonde nach Stimulierung mit Ionophoren verstärkt Flavonoid-NO-Addukte sowie weitere Abbauprodukte entstehen können [115], die wiederum neue spektroskopische Eigenschaften aufweisen. Durch geschickte Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlänge mit verbesserter Selektivität könnte der Fehler möglicherweise ebenso reduziert werden, obwohl durch Abweichung von den entsprechenden Anregungs- und Emissionsmaxima deutliche Sensitivitätseinbußen zu erwarten wären. Jedoch kann dabei auch nicht ausgeschlossen werden, dass z.B. direkte Addukte mit der Fluoreszenzsonde mit ähnlichen resultierenden Fluoreszenzspektren eine erhöhte Bildung von DAF-2T Äquivalenten vortäuschen, was für die Entstehung von kovalenten Verbindungen aus DAF-2 und Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure bekannt ist [263]. Ebenso können bei der Messung der Gesamtfluoreszenz dynamische oder statische Quenching-Effekte (Fluoreszenzlöschung) durch die untersuchten Testsubstanzen wie z.B. Polyphenole auftreten.

Die Wahrscheinlichkeit für derartige Fehler lässt sich mit chromatographischen Trennungen weitestgehend vermeiden, wenn auch mit etwas höherem apparativen Aufwand. Dennoch gab es eine Reihe von Publikationen, die als Messgröße eine Fluoreszenzveränderung von Fluoreszenzsonden wie DAF-2 oder DAN (2,3-Diaminonaphthalen) in Gegenwart von Polyphenolen bzw. Flavonoiden zusammen in einem abgeschlossenen System verwendeten und dabei die Veränderung der Summe der Fluoreszenz aufzeichneten [193, 264-265]. Methoden, in welchen die fluoreszierenden Eigenschaften von Catechinen und Resveratrol selbst als Grundlage für deren analytischen Detektion dienten, wurden bereits publiziert, allerdings wurden dabei andere Anregungs- und Emissionswellenlängen den Maxima der Fluoreszenzspektren entsprechend eingesetzt ((+)-Catechin und (-)-Epicatechin: Exzitation/Emission 278/360 nm; Resveratrol: 330/374 nm) [266].

Spekulativ blieb bislang, wie bereits erwähnt, welche Produkte für die in den eigenen Versuchen beobachtete Fluoreszenzerhöhung verantwortlich waren. Dies wäre künftig neben der Charakterisierung der hauptsächlichen Reaktionsprodukte von NO mit Flavonoiden durch spektroskopische und massenspektrometrische Methoden interessant aufzuklären. Da sich die Redoxaktivität der Catechol-Funktion des Flavonoid-C-Rings unter anderem als partiell reversibel mit der Möglichkeit zu zyklischen Redoxprozessen herausgestellt hat [267], könnte nach entsprechender Adduktbildung ein mögliches NO-Reservoir vorliegen. Gebundenes NO könnte dann wieder gegebenenfalls lokal in entsprechend ausgestatteter Mikroumgebung reduktiv ähnlich den Mechanismen bei klinisch

eingesetzten organischen Nitraten freigesetzt werden. Dass polyphenolische Substanzen reduktiv NO-Spezies freizusetzen im Stande sind, wurde für eine Art von Nitrit-Recycling durch Polyphenole z.B. von Jon O. Lundberg bereits früher beschrieben [30, 194]. Ebenso ist bekannt, dass durch eine Reaktion von NO mit Sauerstoff nitrierte Harnsäure kovalent gebundenes NO wieder im Gefäßsystem freisetzt und dabei das Gefäß relaxiert [268].

2.3.2 Eignung der neuen HPLC-Methode zur empfindlichen Quantifizierung von durch Endothelzellen produziertem NO

Die Messung der geringen NO-Konzentrationen, die durch konstitutive NO-Synthasen generiert werden, stellt eine analytische Herausforderung dar. Um die im vorherigen Abschnitt genannten Probleme zu vermeiden und selektiv den Einfluss von Polyphenolen auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen zu untersuchen, wurde eine chromatographische Methode entwickelt (für methodische Details s. Experimenteller Teil 4.7). Dabei wurde ein HPLC-System mit UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion zur Trennung der Fluoreszenzsonde DAF-2 und deren NO-Umsatzprodukt DAF-2T in Zellkulturüberstandmatrix zum Einsatz gebracht. Zur Überprüfung, ob die Methode für die entsprechenden Fragestellungen und Anforderungen geeignet war, wurden sowohl Positiv-Kontrollen (PMA= Phorbol 12-myristate 13-acetat) zur Steigerung der eNOS-Proteinexpression und somit der NO-Freisetzung als auch Negativ-Kontrollen (L-NMMA= N^G-Monomethyl-L-arginin · monoacetat) zur kompetitiven Inhibierung der eNOS eingesetzt. Um die eNOS mit einem entsprechend physiologisch zu einer Flow-mediated dilatation (2.1) führenden, vergleichbaren Reiz zu aktivieren, wurde eine Calcium-Ionophore verwendet, die einen Ioneneinstrom in die Zelle hervorrief und damit die eNOS unter anderem durch verstärkte Verfügbarkeit von Calcium-Calmodulin Komplexen für das Enzym stimulierte.

2.3.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Methode wurde etabliert, um die extrazelluläre NO-Freisetzung durch konstitutive NO-Synthasen in Zellkultursystemen zu untersuchen. Freigesetztes NO diffundiert dann im physiologischen Kontext parakrin bzw. autokrin zu den bislang bekannten Effektor-Proteinen wie z.B. der löslichen Guanylatzyklase. Die hier dargestellte Methode erfasste durch die Verwendung von DAF-2, das im Allgemeinen nicht zellgängig ist, somit vor allem extrazellulär freigesetztes NO optimal. Zur Messung von intrazellulärem NO könnte die Methode mit dem Einsatz der entsprechend diacetylierten Form der Fluoreszenzsonde (DAF-2-DA) ebenso verwendet werden [269], würde dabei allerdings, was die Methoden-

Validierung (s. 4.7.3 Material und Methoden) anbelangt, zusätzliche notwendige Überprüfungen z.B. der komplexen Schritte der Extraktion und Wiederfindung der Sonde aus Zelllysaten umfassen.

Im entwickelten System konnten sowohl die Positivkontrolle mit einer Erhöhung der eNOS-Proteinexpression durch PMA (B Abb. 2.13) als auch die Negativ-Kontrolle mit kompetitiver Inhibierung der eNOS durch L-NMMA sowie die basale NO-Produktion der Zellen nach Ionophoren-Reiz (Co) mit guter Reproduzierbarkeit und einer durch die NO-Freisetzung dementsprechenden Entstehung von DAF-2T Äquivalenten abgebildet werden (A Abb. 2.13).

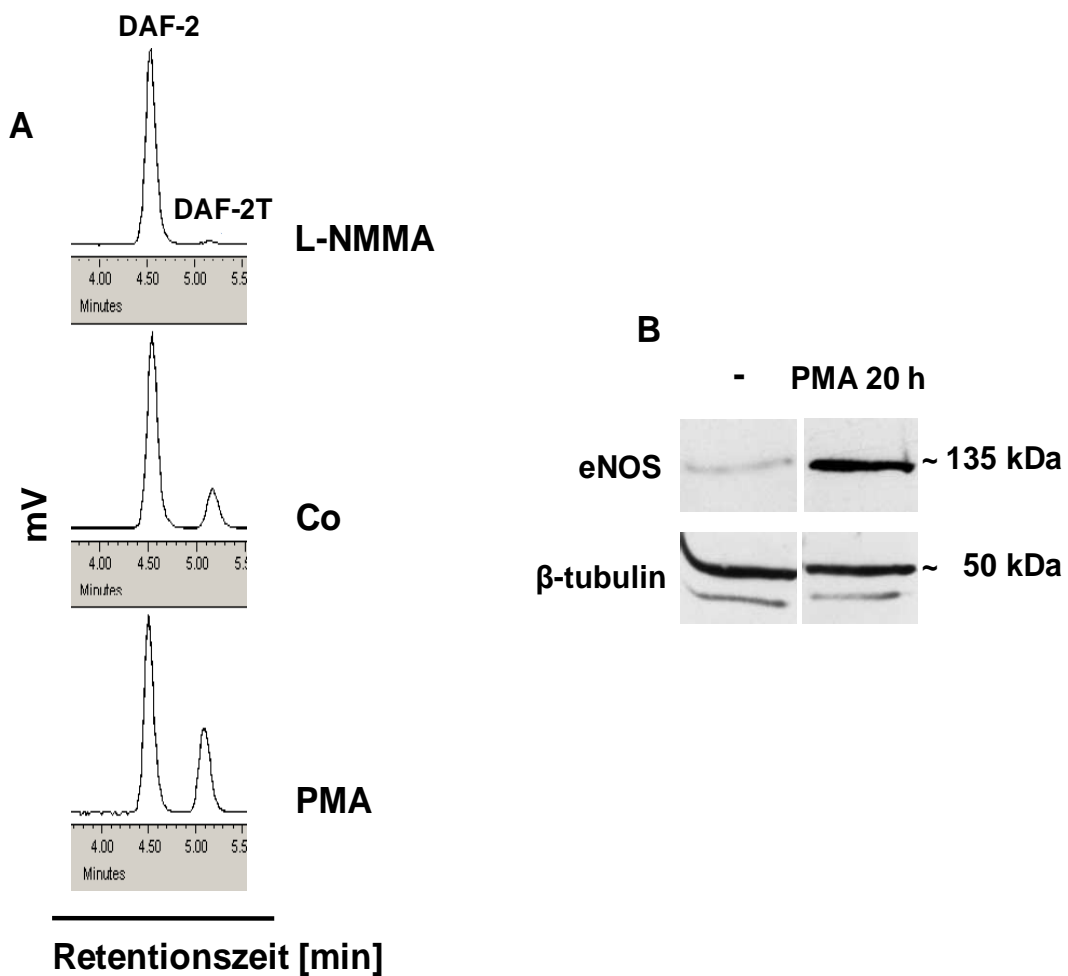


Abb. 2.13: Repräsentative HPLC-Chromatogrammausschnitte (A) der Auftrennung von DAF-2 und aus dem Umsatz mit NO entstehendem DAF-2T in Zellkulturüberständen von Endothelzellen mit Fluoreszenzdetektion. Western-Blot (B) mit Immundetektion der eNOS sowie β -tubulin einer repräsentativen Inkubation mit humanen Endothelzellen. PMA (2 nM) diente vorab zur Steigerung der eNOS-Proteinkonzentration über 20 h, L-NMMA (1 mM) zur spezifischen eNOS-Inhibierung. Co oder - zeigten jeweils entsprechend mitgeführte, unbehandelte Kontrollen an. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Das Ansprechvermögen (= Response) des Testsystems war mit den eingesetzten Kontrollen plausibel in Einklang zu bringen und zeigte für die NO-Freisetzung in Anwesenheit von Zellen im Messbereich linear beschreibbares Verhalten (s. 4.7.3.2 Material und Methoden). Die Retentionszeiten von DAF-2 und DAF-2T waren $4,56 \pm 0,09$ bzw. $5,17 \pm 0,11$ min und dabei wurden keine Interferenzen mit anderen Substanzen festgestellt. Durch Stimulation mit Calcium-Ionophore wurde über 45 min die NO-Konzentration im Zellkulturüberstand auf ~ 10 - 20 nM erhöht, was darüber hinaus durch die Zunahme der eNOS-Proteinmenge in den Zellen durch vorherige Inkubation mit PMA auf das $\sim 1,5$ - 2 fache gesteigert wurde. Als basale NO-Produktion der Zellen ohne Behandlung wurde in den eigenen Versuchen eine erreichte Konzentration im Zellkulturüberstand von ~ 1 nM NO bestimmt. Da die exakte Stöchiometrie und Kinetik der Reaktion von NO mit DAF-2 nicht bekannt und aufgeklärt ist, wurden die Daten aus der Kalibrierung und entsprechender Umsatzeffizienz (s. 2.3.3) mit dem NO-freisetzenden Agens NOC-9 berechnet. Interessanterweise ist der Größenordnungsbereich der zellulären NO-Produktion, der in den eigenen Versuchen gemessen wurde, in guter Übereinstimmung mit anderen publizierten Arbeiten. So wurde z.B. mittels einer konstruierten FRET-Sonde (FRET= Försterresonanzenergie-Transfer), die an funktionelle Einheiten der löslichen Guanylatzyklase gebunden war, ebenso eine basale NO-Produktion aus pulmonaren, arteriellen Endothelzellen von ~ 1 nM gemessen [270]. Die basale NO-Produktion isolierter, humaner Brustwandarterien, die für Koronararterien-Bypass-Operationen verwendet werden, belief sich bei Messungen mit einer NO-empfindlichen Elektrode auf ~ 10 bzw. 15 nM [271]. Dabei steigerte die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Acetylcholin die NO-Produktion auf ~ 30 nM. Demgegenüber berichteten Räthel et al. mit der Verwendung von DAF-2 ($0,1 \mu\text{M}$) und der Messung der Gesamtfluoreszenz über eine Steigerung der NO-Produktion humaner Endothelzellen nach Applikation einer Calciumionophore auf ~ 60 nM [272]. Da das Ansprechvermögen der Methoden mit Fluoreszenzsonden offenbar auch von der eingesetzten DAF-2-Konzentration und damit den entsprechenden Kompetitionsverhältnissen im Testsystem sowie den betrachteten Messbereichen im Hinblick auf die Kalibrierung abhing, sind die Werte schwierig zu vergleichen.

Somit erschien die entwickelte Methode gut geeignet, um die extrazelluläre NO-Freisetzung aus Zellen mit konstitutiv exprimierten NO-Synthasen zu untersuchen und zu bestimmen.

2.3.3 Umsatz-Effizienz von DAF-2 mit NO in Assay-Puffer und in Gegenwart von Zellen

Die neu entwickelte Methode zielte darauf ab, extrazellulär freigesetztes NO zu detektieren. NO als ungeladenes, gelöstes und radikalisches Teilchen hat ein erstaunlich großes raumzeitliches Diffusionsvolumen. Die Diffusionskonstante für NO in biologischem Kontext beträgt $3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit Diffusionsstrecken von bis zu 100-200 μm [273], wobei die typische Größe der meisten menschlichen Zellen im Durchmesser $\sim 5\text{-}30 \mu\text{m}$ beträgt. Die Löslichkeit von NO in lipophilen Solvenzien ist etwa neunmal höher als in wässrigen Lösungen, so dass auch biologische Membranen kein Hindernis für das Molekül darstellen und sehr schnell bei einer biologischen Halbwertszeit von NO im Sekundenbereich überwunden werden [274]. Fraglich bislang blieb dabei weiterhin, ob dadurch auch Anreicherungsprozesse von Reaktionsprodukten von NO mit O_2 in bestimmten bevorzugten Kompartimenten wie lipophilen Membranen auftreten können [275]. Interessanterweise sind die meisten teilweise kovalenten Reaktionen von NO mit biologischen Zielmolekülen wie im Besonderen mit koordinierten Eisen-Zentren z.B. im Hämoglobin-Molekül oder Thiol-Strukturen von Proteinen langsamer als die Diffusion von NO [273]. Dies würde für die Effekte in lokalen Gruppen von Zellen je nach Expression von NO-empfindlichen Proteinen eine direkte Abhängigkeit von der NO-Konzentration und indessen weniger von der raumzeitlichen Diffusion von NO bedeuten.

Eine der entscheidenden Fragen war nun, mit welcher Umsatzeffizienz bzw. Wiederfindung von NO als DAF-2T-Umsatzprodukt die Fluoreszenzsonde mit dem extrazellulär freigesetzten NO in dem Zellkulturmodell reagierte. Zur Simulierung der NO-Freisetzung unter Testbedingungen wurde die Substanz NOC-9 (6-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamin) eingesetzt [276], die pro Mol zwei Äquivalente NO freizusetzen im Stande ist.

2.3.3.1 Ergebnisse und Diskussion

Die neue HPLC-Methode zeigte für das Testsystem gut geeignete Validierungsparameter (s. 4.7.3 Material und Methoden) mit entsprechend linearen Zusammenhängen zwischen NO-Konzentration und DAF-2T-Signal, und der untersuchte Bereich der stimulierten, zellulären NO-Produktion lag jeweils in den mittleren Abschnitten der Kalibriergeraden. In Assay-Puffer ohne Zellen (PBS mit Calcium, Magnesium und L-Arginin, s. 1.4 Material und Methoden) wurde im entwickelten Testsystem eine Umsatzeffizienz von NO mit DAF-2 ($5 \mu\text{M}$) im Mittel von 13 % (sechs Konzentrationsniveaus mit jeweils $n = 3$; Abb. 2.14 A) gefunden.

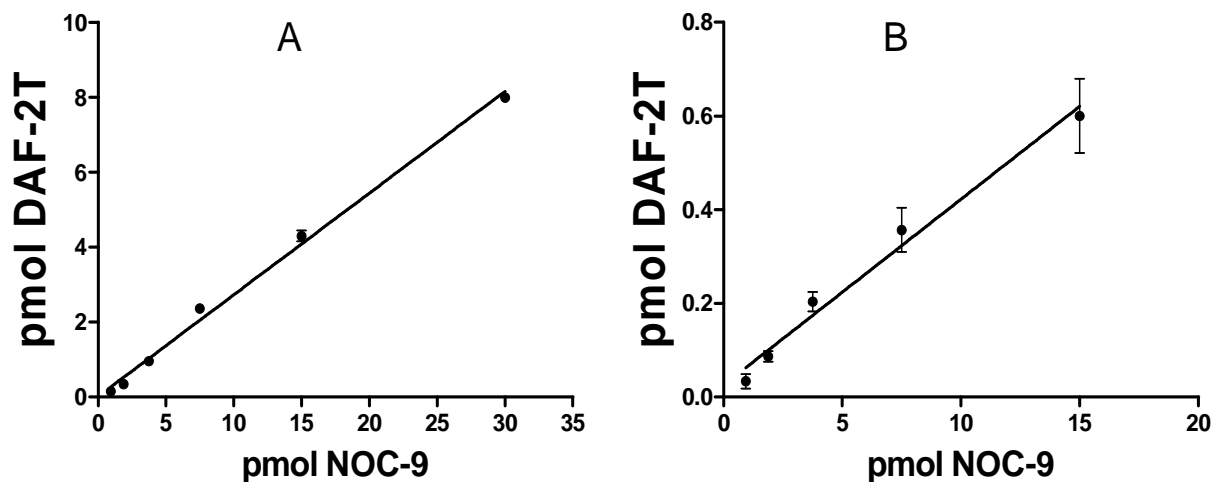


Abb. 2.14: Umsatzeffizienz als Funktion der absoluten Stoffmengen in Testlösung von DAF-2 (5 μM) und NO-freisetzender Substanz NOC-9 mit Umsetzung zu DAF-2T in Assay-Puffer Lösung (A), sowie in Gegenwart von Endothelzellen (B). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Diese Werte stimmten gut – was die Größenordnung anbelangt – mit den in der Originalpublikation von Kojima et al. berichteten überein, worin eine Umsatzeffizienz der Reaktion von NO mit DAF-2 in Abwesenheit von Proteinen oder Zellen von 18 % angegeben wurde [41]. Die etwas höhere Umsatzrate ist vermutlich auch durch die dort in doppelter Konzentration (10 μM) eingesetzte DAF-2 Sonde zu erklären.

Wenn im Testsystem Zellen zugegen waren, sank diese Umsatzrate, wie zu erwarten war, durch die Kollisionen und möglichen, verstärkten Interaktionen auf den Diffusionswegen der NO-Moleküle beträchtlich auf 2 % (fünf Konzentrationsniveaus mit jeweils $n = 3$; Abb. 2.14 B). NO erfährt in wässriger Lösung ~ 10 Milliarden Kollisionen pro Sekunde [277], die durch die Anwesenheit von biologischem Material mit hoher Wahrscheinlichkeit noch wesentlich mit der weiteren Konsequenz der Ausbildung kovalenter Bindungen gesteigert werden. Räthel et al. berichteten beim Einsatz von 0,1 μM DAF-2 in Gegenwart von Endothelzellen von einer Umsatzrate mit NO von 0,2 % [272]. Offensichtlich spielte dabei – was den Unterschied zu den eigenen Werten anbelangt – die eingesetzte, geringere Sondenkonzentration und damit die relative „Trefferwahrscheinlichkeit“ der Sonde mit den reaktiven NO_x -Spezies in Konkurrenz mit anderen Reaktanden eine maßgebliche Rolle.

Bei der Interpretation und Einordnung dieser Werte muss beachtet werden, dass der Reaktionsmechanismus von DAF-2 – wie auch von anderen Phenylendiaminyl-NO-Fluoreszenzsonden – mit NO, wie bereits erwähnt, nicht vollständig aufgeklärt ist, so dass das Schließen auf absolute Umsatzraten und Reaktionskonstanten der Interaktion mit

diskreten NO_x -Spezies und der Rückschluss auf die eigentliche NO-Konzentration in komplexen biologischen Systemen mit großem Bedacht geschehen sollte. Einerseits erscheint ein plausibler Weg der Reaktion in neutraler Lösung zu sein, dass NO mit O_2 zu NO_2 und dieses weiter wiederum mit NO zu N_2O_3 (dem Anhydrid der salpetrigen Säure; $2 \text{HNO}_2 \leftrightarrow \text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$) reagiert, das dann durch Reaktion mit den aromatischen Amin-Funktionen von DAF-2 zum Triazol-Ringschluss führt. Diese schnell verlaufende Reaktion wäre dann im ersten Schritt entsprechend von NO nach einer Kinetik der 2. Ordnung sowie von O_2 nach 1. Ordnung abhängig [210-211] und ist in homogenen Puffertestsystemen bei physiologischen pH-Werten der vermutlich dominierende Mechanismus. In luftgesättigten, wässrigen Testlösungen in offenen Systemen befinden sich $\sim 210 \mu\text{M O}_2$ in Lösung [9].

Andererseits sind aromatische Amine in neutraler wässriger Lösung aufgrund ihres Elektronenreichtums empfindlich gegenüber oxidativen Prozessen. In polaren Lösungsmitteln verlaufen derartige Oxidations-Reaktionen hauptsächlich mit der schnellen Bildung von Chinondiimininen und möglichen weiteren Dimersierungsreaktionen zu Phenazinderivaten. Das Redoxpotential eines Ein-Elektronen-Übergangs bei $\text{pH} = 7$ in wässriger Lösung ist für das p-Phenylendiamin, das sich vermutlich ähnlich im Vergleich zum o-Derivat verhält, dabei allerdings etwas höher als für Catechol (Catechol: 0,53 versus p-Phenylendiamin: 0,73 V [278]). Wardman [279] schlug aufgrund der oxidativen Empfindlichkeit von aromatischen Aminen einen anderen, radikalischen Reaktionsmechanismus von DAF-2 mit NO vor, und zwar sollte dabei NO direkt mit dem durch „nicht-spezifische“ Oxidation entstandenen Aminoaryl- oder Anilinylnyl-Radikal von DAF-2 reagieren. Dies impliziert, dass die Reaktionswahrscheinlichkeit von NO mit der Fluoreszenz-Sonde in zellulären Testsystemen insbesondere auch von oxidativen Prozessen und damit vom Oxidationsgrad der Sonde abhängt [280]. Eine Verwendung des sich in Zellen anreichernden Derivats von DAF-2 (DAF-2-DA= diacetylierte Form) würde sich dabei aufgrund der multiplen intrazellulären Redoxgleichgewichte in unterschiedlichen Kompartimenten – wobei die größte intrazelluläre Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Mitochondrien sind [281] – als noch wesentlich problematischer zu interpretieren erweisen als bei Messungen im extrazellulären Kompartiment. Dabei ebenso zu bedenken ist, dass manche untersuchte Substanzen wie Polyphenole aufgrund ihrer Fähigkeit zur Initiierung zyklischer Redoxprozesse auch in der Lage sind, in Zellkulturmedium z.B. H_2O_2 zu generieren [282], und damit die Redoxgleichgewichte in Testsystemen stark beeinflussen können. Der Vorgang einer unspezifischen Oxidation der Fluoreszenz-Sonde wäre jedoch besonders innerhalb der Zellen durch die hohen physiologischen Konzentrationen von z.B.

Ascorbinsäure oder Glutathion nicht begünstigt. In den eigenen Versuchen wurde das nicht-zellgängige DAF-2 zur Quantifizierung des extrazellulär freigesetzten NO verwendet.

Die multiplen Gleichgewichte von $\text{NO-NO}_2\text{-N}_2\text{O}_4\text{-N}_2\text{O}_3$ sind in heterogenen, biologischen Systemen bei niedrigen NO-Konzentrationen bis dato noch zu wenig verstanden und charakterisiert, um klare Aussagen zu den Reaktionsmechanismen mit designierten Zielmolekülen, sowohl was die thermodynamische als auch die kinetische Kontrolle anbelangt, zu etablieren [212]. Unpolare Umgebungen wie Biomembranen begünstigen die Bildung von Radikalen wie NO_2 , das mit seinem Dimer N_2O_4 im Gleichgewicht steht. Da Polyphenole ebenso eine hohe Affinität zu membranären Komponenten im zellulären Kontext zeigten (s. 1.3), könnte in diesen Kompartimenten möglicherweise bevorzugt eine Interaktion von NO_x -Spezies mit Polyphenolen stattfinden.

Im eigenen zellulären Testsystem in Kombination mit der entsprechenden HPLC-Analytik konnte also eine direkte Abhängigkeit zwischen der NO-Freisetzung und dem entstehenden DAF-2T Signal gezeigt sowie damit entsprechende Umsatzeffizienzen berechnet werden.

2.3.4 Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2 unter Test- und Lagerungsbedingungen

Ein äußerst wichtiges Kriterium einer validen Methode ist die Stabilität der Ergebnisse über die entsprechende Zeit bzw. unter variierenden Bedingungen, was dann unter anderem als Robustheit einer Methode beschrieben werden kann und die Vermeidung von Artefakten gewährleistet. Nachdem größere Mengen der Proben bei bestimmten Versuchsreihen anfielen, in welchen die NO-Freisetzung mittels der Fluoreszenzsonde DAF-2 in einem zellulären Testsystem untersucht wurde, wurden manche Proben danach bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren, um – gemäß der Motivation in den meisten Fällen bioanalytischer Verfahren – Proben mit möglichen thermolabilen und empfindlichen Bestandteilen für darauffolgende Analysen zu konservieren. Es fiel erstaunlicherweise dabei auf, dass die Proben nach dem Auftauen eine höhere Konzentration von DAF-2T enthielten als vor dem Einfrieren. Dieses Phänomen wurde zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben und sollte folglich systematisch untersucht werden.

Dazu wurde die Fluoreszenzsonde DAF-2 in Abwesenheit von NO-Donatoren oder NO-produzierenden Zellen in Assay-Puffer entsprechend den Testbedingungen gelöst und über definierte Zeiträume unterschiedlichen Bedingungen vor allem mit einer Variation der Temperatur ausgesetzt. Daraufhin wurde der DAF-2T Gehalt sowohl quantitativ als auch zusätzlich qualitativ mittels LC-MS/MS-Methodik vor und nach den jeweiligen Inkubationen

untersucht. Darüber hinaus wurden, um sich der Aufklärung des möglichen Mechanismus der Hintergrund-Umsetzung von DAF-2 zu DAF-2T anzunähern, die Proben mit Nitrit- bzw. Nitrat-Ionen versetzt und die DAF-2T Entstehung nach einem Einfrier-/Auftauvorgang bei -40 °C analysiert.

2.3.4.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2 und deren Umwandlung zum NO-Addukt DAF-2T wurde unter den entwickelten Testbedingungen und weiteren unterschiedlichen Inkubations- oder Aufbewahrungsbedingungen untersucht. Die Konzentration von DAF-2 und DAF-2T wurde zum einen direkt nach dem Lösen in Assay-Puffer ($t=0$) und im weiteren Verlauf nach 45 min, 6, 12 bis hin zu 24 h bei Raumtemperatur (= RT) untersucht. Vergleichbare Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert sowie bei -40 °C über 24 h eingefroren und jeweils bei RT aufgetaut (Abb. 2.15). Während bei RT nach dieser Zeitspanne (24 h) lediglich minimale Mengen von DAF-2T nachgewiesen werden konnten (Kehrwert des Quotienten aus DAF-2 und DAF-2T: $0,0028 \pm 0,002$ nach $t=0$ min versus $0,0159 \pm 0,0061$ nach 24 h), entstand nach 24 h bei 37 °C etwas mehr DAF-2T ($0,1002 \pm 0,0231$ nach 24 h). Erstaunlicherweise erhöhte ein Einfrier-/Auftau-Zyklus bei -40 °C von DAF-2 in Puffer-Lösung das DAF-2T Signal dramatisch ($9,2820 \pm 0,7668$ nach 24 h), was eine ausgeprägte Umwandlung zum entsprechenden Triazol anzeigte. Im Gegensatz dazu blieb das Umsatzprodukt DAF-2T sowohl beim Einfrieren und Auftauen als auch bei der Lagerung in Assay-Puffer über mehrere Wochen im Dunkeln bei 4 °C stabil (Daten nicht gezeigt).

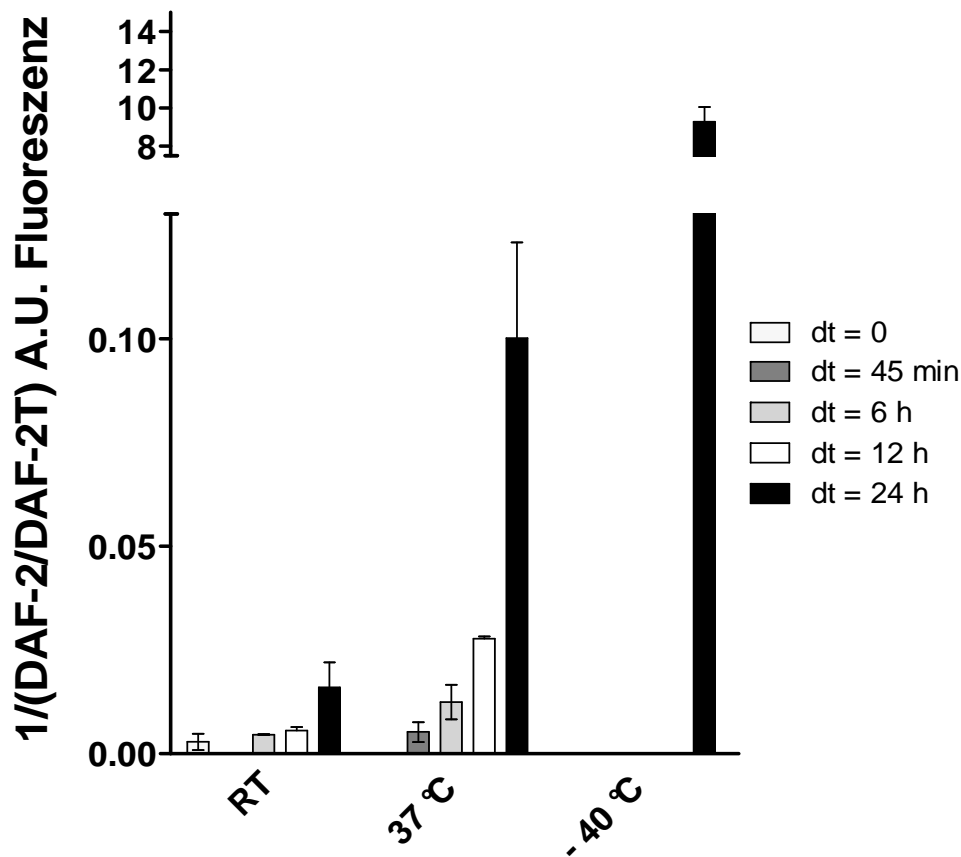


Abb. 2.15: Umwandlung von DAF-2 in Assay Puffer (PBS mit Calcium, Magnesium und L-Arginin) in DAF-2T über die Zeit (dt) unter verschiedenen Bedingungen mit Variation der Temperatur (RT= Raumtemperatur; 37 °C; -40 °C). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Um die entsprechende Selektivität, die durch die chromatographische Auftrennung mittels HPLC mit anschließender UV/VIS- und Fluoreszenzdetektion gegeben war, zusätzlich qualitativ zu verifizieren, wurden die Ansätze entsprechend mit einem LC-MS/MS-System untersucht (s. 4.7.3.4 Experimenteller Teil). Full-Scan und MRM (= Multiple-reaction monitoring) Methoden wurden angewendet, um entstandenes DAF-2T zu detektieren. Die entsprechenden Massenspektren mit Produktionen-Scans zeigten hohe Intensitäten für DAF-2 (Precursor-Ion $[M-H]^-$ 361,1 m/z) mit den zugehörigen Qualifier- bzw. Quantifier-Produktionen (316,1 bzw. 275,0 m/z), sowie für DAF-2T ($[M-H]^-$ 372,1 m/z) mit den Produkt-Ionen (299,1 bzw. 273,1 m/z) wie in Abb. 2.16 gezeigt.

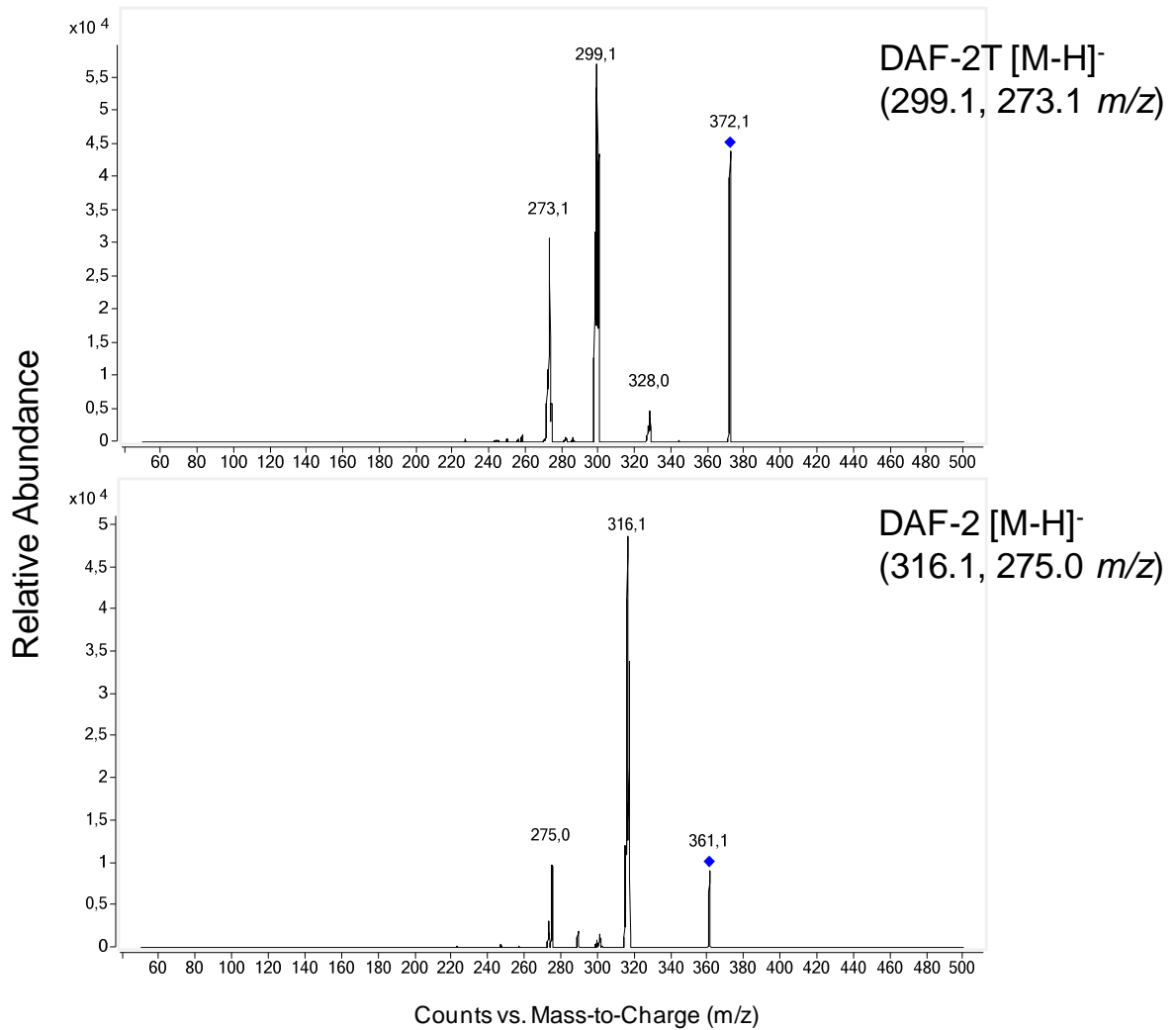


Abb. 2.16: Exemplarische Massenspektren mit Produkt-Ionen-Scans von DAF-2T (oben; Precursor-Ion: 372,1 m/z ; Produkt-Ionen: 299,1 und 273,1 m/z) und von DAF-2 (unten; Precursor-Ion: 361,1 m/z ; Produkt-Ionen: 316,1 und 275,0 m/z). Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Nach dem Lösen von 5 μM DAF-2 in Assay-Puffer bei Raumtemperatur konnte durch eine darauffolgende massenspektrometrische Untersuchung sowohl im MRM- wie auch im Full-Scan-Modus kein DAF-2T nachgewiesen werden (s. Abb. 2.17).

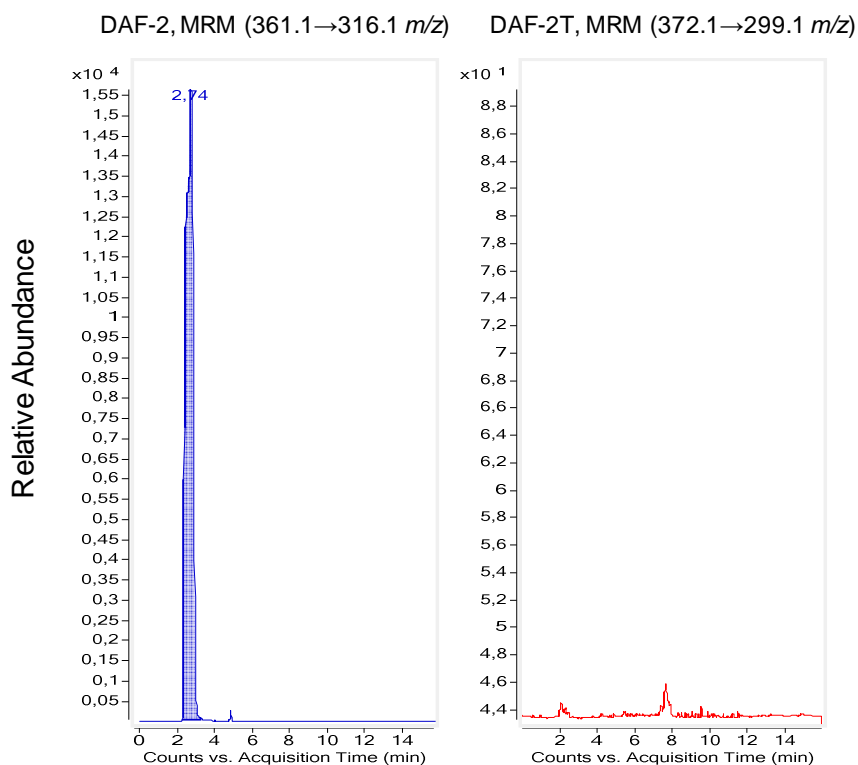


Abb. 2.17: Übergänge der Precursor- in Produkt-Ionen von DAF-2 (links) und DAF-2T (rechts) im MRM (Multiple-reaction monitoring Modus) der Lösung von 5 μ M DAF-2 in Assay-Puffer bei Raumtemperatur. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Ganz im Gegensatz dazu konnte nach einem Einfrier-/Auftau-Zyklus über 24 h bei -40 $^{\circ}$ C DAF-2T in der Testlösung sowohl im Full-Scan- als auch im MRM-Modus deutlich detektiert werden (s. Abb. 2.18). Dies bestätigte eindeutig die Ergebnisse, die zuvor aus den HPLC-Untersuchungen erhalten wurden, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Einfrieren und Auftauen eine Bildung von DAF-2T interessanterweise induziert werden konnte.

Eine der entscheidenden Fragen war nun – in Anbetracht der Tatsache, dass die Bildung und Umwandlung von DAF-2 zu DAF-2T definitiv NO_x-Spezies benötigte – woher eben diese nitrosierenden Agenzien kamen, da sowohl hochreine Reagenzien als auch ultrareines Milli-Q Wasser zur Herstellung der Testlösungen verwendet wurden.

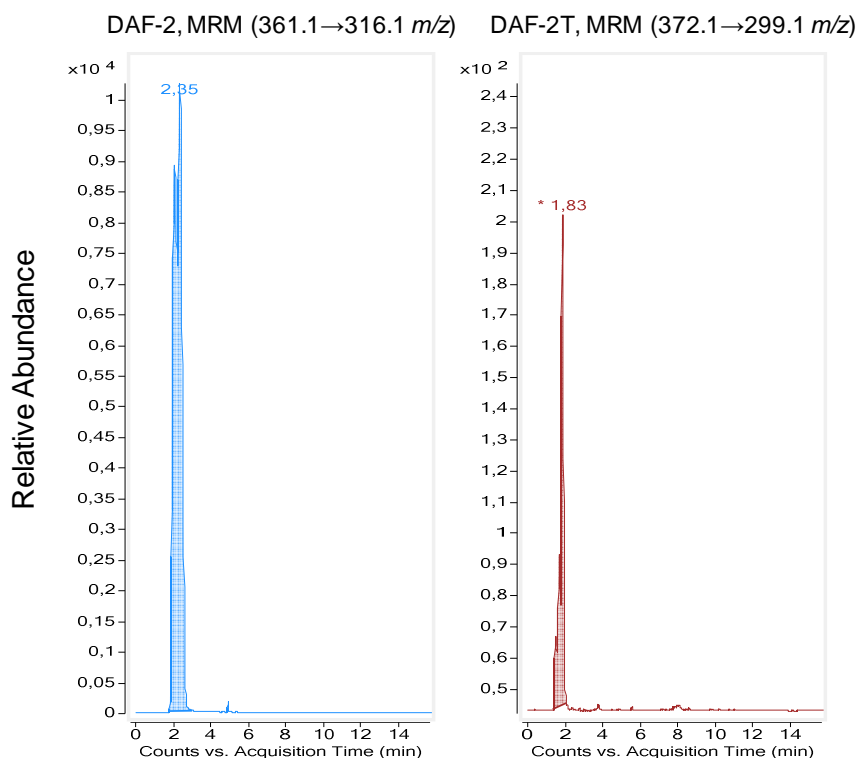


Abb. 2.18: Übergänge der Precursor- in Produktionen von DAF-2 (links) und DAF-2T (rechts) im MRM (Multiple-reaction-monitoring Modus) der Lösung von 5 μ M DAF-2 in Assay-Puffer, die bei -40 $^{\circ}$ C eingefroren wurde und bei Raumtemperatur nach 24 h aufgetaut wurde. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Um dies nun weiter zu untersuchen, wurden Testlösungen von DAF-2 in Assay-Puffer bei RT mit Natrium-Nitrit oder -Nitrat versetzt und direkt auf die Anwesenheit von DAF-2T untersucht. Dabei konnte in diesen Lösungen zunächst kein DAF-2T nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Proben bei -40 $^{\circ}$ C eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Es zeigte sich ein deutlicher zusätzlicher Anstieg der DAF-2T-Konzentration in den Proben, in denen additives Nitrit vorhanden war (Abb. 2.19). Ohne Nitrat- oder Nitrit-Zusatz wurden beim Einfrier-/Auftauprozess $18,39 \pm 2,07$ nM DAF-2T gebildet. Durch Zugabe von 100 nM Nitrit wurde die Konzentration auf etwa das fünffache auf $86,77 \pm 3,03$ nM DAF-2T gesteigert. 500 nM zusätzliches Nitrit im Ansatz führte zur Entstehung von $363,47 \pm 36,98$ nM des Triazol-Produkts, was einer Steigerung um den Faktor ~ 20 entspricht. Die entsprechenden Nitrat-Zusätze (100-500 nM) erhöhten die DAF-2T Konzentration nach dem Einfrieren und Wiederauftauen nicht über das Niveau des Umsatzes in den Testlösungen ohne Ionenzugabe hinaus (100 nM Nitrat: $15,90 \pm 5,72$ nM DAF-2T; 500 nM Nitrat: $16,15 \pm 2,37$ nM DAF-2T).

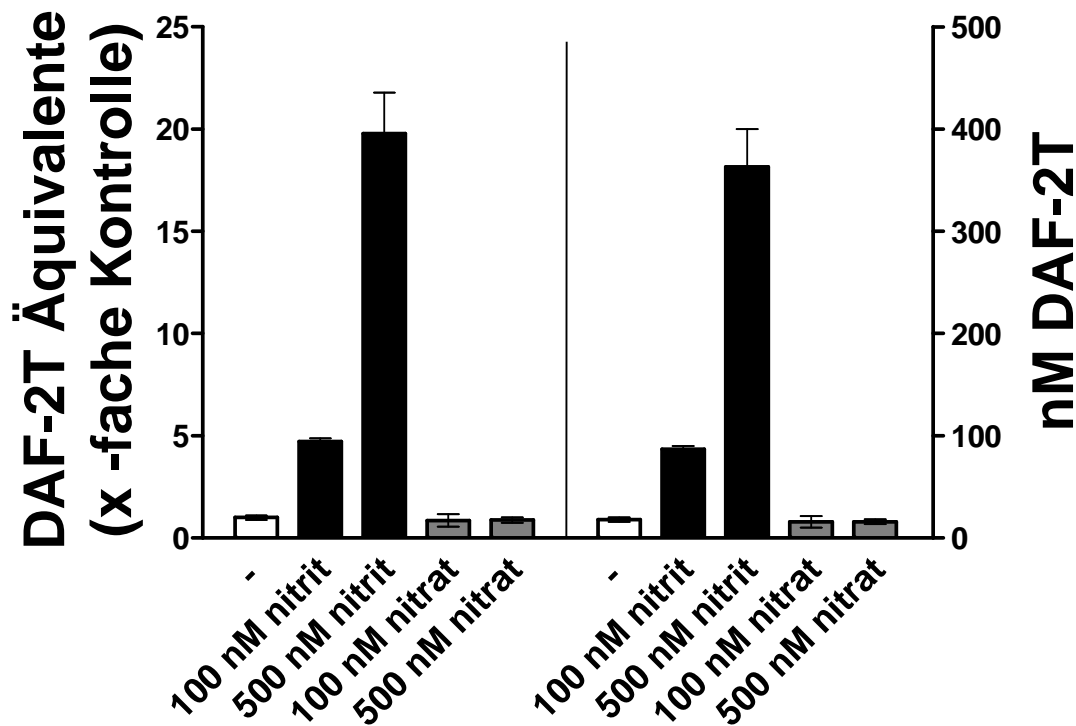


Abb. 2.19: Erhöhung der DAF-2T Bildung durch Zugabe von Salzen der salpetrigen- und Salpetersäure (Natrium-Nitrit/-Nitrat) zu einer DAF-2-Lösung (5 μ M) in Assay-Puffer nach einem Einfrier-/Auftauzyklus bei -40 $^{\circ}$ C. Links die entsprechende x-fache Erhöhung bezogen auf die Kontrolle ohne Nitrit/Nitrat-Zusätze. Rechts die korrespondierenden absoluten Werte (nM) der DAF-2T Konzentration in den jeweiligen Ansätzen nach dem Auftauen. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

DAF-2 zeigte also unter bestimmten Test- und Aufbewahrungsbedingungen deutliche Instabilität mit einem Umsatz zu DAF-2T, der möglicherweise – ohne entsprechende Kontrollen zur Hintergrund-DAF-2 \rightarrow DAF-2T-Konversion – in manchen experimentellen Anordnungen zu Artefakten z.B. in Form von falsch-positiven Ergebnissen führen könnte. Daher sollte bei den entsprechenden Messungen der NO-Freisetzung aus zellulären Testsystemen mit Hilfe der Fluoreszenzsonde DAF-2 in Puffersystemen, um entsprechend valide Messergebnisse zu erhalten, die Probenaufbewahrung bei Raumtemperatur in möglichst geschlossenen Gefäßen vorgenommen sowie die DAF-2T-Konzentration am gleichen Tag der Versuchsdurchführung mit einem selektiven chromatographischen System quantifiziert werden.

Auf dem Gebiet der NO-Analytik, besonders beim Nachweis von NO aus Systemen mit konstitutiven NO-Synthasen, in welchen NO-Konzentrationen im nano- bzw. picomolaren Bereich gemessen werden, ist es von großer Bedeutung, eine umfassende Methodvalidierung durchzuführen, um mögliche Interferenzen bzw. falsch-negative oder

falsch-positive Fehler im Testsystem zu vermeiden. Bei den hier dargestellten Fallstricken im Zusammenhang mit der Hintergrund-Bildung von DAF-2T unter bestimmten Bedingungen drängte sich die Frage auf, woher die entsprechenden Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen wie NO und seine höheren Oxide, die für eine Nitrosierung von DAF-2 und der Umwandlung zum Triazol besonders beim Einfrieren und Auftauen benötigt werden, stammten, und wie es dabei mechanistisch zur Umwandlung zu DAF-2T kam.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Stickoxide (NO_x) für diese Umwandlung mit hoher Wahrscheinlichkeit hauptsächlich aus der Laborluft herrührten. So stellten Fang et al. in Kongruenz mit der Plausibilität einer derartigen Annahme fest, dass sich die Nitrit-Konzentration in einem offenen Gefäß mit Pufferlösung nach 3 h um ~400 nM erhöhte, was einem Geschwindigkeitsfaktor – bei angenommener konstanter Akkumulationsgeschwindigkeit – einer Erhöhung von ~2 nM Nitrit pro Minute in der Lösung entspräche [283]. Tsikas et al. konnten diese Ergebnisse nochmals unter Einsatz einer GC-MS-Methode zur Nitrit-Bestimmung bestätigen [38]. Dabei zeigte sich, dass bereits nach 10 min die Nitrit-Konzentration in humanem Serum, das in offenen Gefäßen der Laborluft ausgesetzt war, um 400 nM angestiegen war. Wenn die Proben zusätzlich gekühlt wurden, schien sich die Akkumulation von NO_x aus der Luft noch zu verstärken, was wahrscheinlich auch durch eine gesteigerte Löslichkeit der entsprechenden Gase in den Testlösungen bei niedrigeren Temperaturen zu erklären ist. In den eigenen Versuchen wurden die Ansätze der Testlösungen lediglich für Pipettierarbeiten geöffnet und waren dabei der Laborluft ausgesetzt.

Weiterhin offen blieb die Frage nach dem Mechanismus der Reaktion von potentiellen NO_x aus der Luft mit der Fluoreszenzsonde, was zum einen die deutliche Steigerung der Konversion zum Triazol nach dem Einfrieren bei -40 °C und darauffolgendem Wiederauftauen, und zum anderen die geringere Umwandlung der Sonde nach Inkubation bei 37 °C über 24 h anbelangte. Gelöstes Nitrit, welches durch die Anreicherung von Stickoxiden aus der Luft nach Oxidation mit Sauerstoff gebildet wurde, wird zum nitrosierenden Agens nur im Sauren aktiviert ($\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HNO}_2$; $2 \text{HNO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Ebenso können wiederum radikalische Reaktionen, die bei höheren Temperaturen wie 37 °C begünstigt ablaufen, von z.B. NO_2 , das in wässriger Lösung auch wieder direkt zu NO und NO_3^- disproportionieren kann, mit einem oxidativ gebildeten Arylaminyli-Radikal von DAF-2 für die Bildung von DAF-2T verantwortlich sein. Letzteres war mit hoher Wahrscheinlichkeit der Fall bei der geringen Umwandlung (in der Größenordnung von ~1 nM NO) von DAF-2 in DAF-2T bei 37 °C über 24 h. In der atmosphärischen Luft als für äußerst empfindliche

Detektionssysteme plausible NO-Quelle wurden z.B. Konzentrationen von 0,7-2,4 nM NO₂ gemessen [284].

Im Gegensatz dazu festigte sich dann auch die Vermutung, dass beim Einfrieren und Auftauen durch NO_x entstandenes und akkumuliertes Nitrit aktiviert wurde, und zwar durch eine pH-Veränderung des PBS-Puffers beim Einfrieren. Das Phänomen der pH-Wert-Veränderung von Phosphat-Puffern ist schon länger bekannt und wurde ursächlich durch das Entfernen von HPO₄²⁻ aus der gefrierenden Lösung durch frühes Auskristallisieren von Na₂HPO₄ · 12H₂O erklärt [285], was eine Verschiebung des pH-Wertes der restlichen Lösung um mehrere log-Einheiten zum Säuren hin zur Folge haben kann. Die Hypothese dieses ablaufenden Mechanismus konnte durch die Zugabe von Nitrit zu den DAF-2 Testlösungen weiter gestützt werden, denn nach dem Auftauen war dadurch eine konzentrationsabhängige Steigerung der DAF-2T Bildung festzustellen. Dagegen führte die Zugabe von Nitrat vor dem Einfrieren nicht zu einer Erhöhung der DAF-2T Bildung über das Maß der durch NO_x aus der Luft zustande kommenden Konzentration wie in dem Ansatz ohne Nitrit-/Nitrat-Zusätze hinaus.

Interessanterweise fanden Daiber et al. einen ähnlichen Mechanismus für die Bildung von Nitro-Tyrosinen und Nitroso-Cysteinen durch Einfrieren und Auftauen von Nitrit-haltigen Phosphat-Puffern [286]. In der Studie wurde auch über eine Oxidation von Nitrit zu Nitrat beim Einfrieren berichtet. Allerdings ließ sich dabei die Nitrierung von Tyrosin nicht vollständig mit dem oben beschriebenen Mechanismus aus Ermangelung der Bildung von HNO₃ erklären, da die Veränderung des pH-Wertes in Phosphat-Puffern beim Einfrieren vermutlich nicht für eine Protonierung der Salpetersäure ausreicht (HNO₃ pK_s = ~ -1,4).

Die Veränderung des pH-Wertes in einfrierenden Pufferlösungen ist von deren Zusammensetzung und der Geschwindigkeit des Einfrierens abhängig [285]. Ob vergleichbare Effekte in Plasma, mit der Verwendung von Kalium-haltigen Puffersubstanzen oder HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) ebenfalls auftreten oder dadurch eine Artefakt-Bildung effektiv vermieden werden kann, bleibt aufzuklären. Durch Aufbewahrung der Proben bei Raumtemperatur in geschlossenen Gefäßen mit geringem Luftüberstand und Analyse innerhalb von 24 h nach Versuchsdurchführung sind die beschriebenen Fallstricke ohne weitere Probleme vermeidbar und eine valide NO-Analytik möglich.

2.3.5 Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener Detektionssysteme

Neben direkten Methoden zur Messung von NO wie z.B. durch geeignete Elektroden werden zumeist Umsatzprodukte von NO mit Sauerstoff wie z.B. Nitrit, oder Umsatzprodukte mit Sonden wie z.B. mit Hämoglobin oder verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bei der Analyse von NO in biologischen Systemen nachgewiesen. Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, ist bislang wenig über die raumzeitliche Rhythmik sowie die Inhibierung der NO-Freisetzung von NO-Synthasen nach Aktivierung durch unterschiedliche Reize auf zellulärer Ebene bekannt. Vermutlich spielen dabei auch Auto-Inhibierungs-Prozesse durch NO direkt [287], kompetitive Inhibierung durch physiologisch vorkommende Substranaloga wie z.B. methylierte Arginine (s. 2.2.5.1), aber auch bestimmte auto-inhibitorische, bewegliche Protein-Strukturen am Enzym eine Rolle [288].

Um zum einen die Reaktionsfolge weiter aufzuklären, die zur Bildung von DAF-2T bzw. Nitrit durch die Freisetzung von NO führte, und zum anderen mögliche Unterschiede der in Zellkulturversuchen häufig eingesetzten eNOS-aktivierenden Substanzen wie Calcium-Ionophoren (A23187) oder Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) und deren NO-freisetzende Profile zu untersuchen, wurden humane Endothelzellen mit diesen oben genannten Agenzien über einen Zeitraum von 45 min inkubiert. Zur Detektion von NO wurde entweder die Fluoreszenzsonde DAF-2 eingesetzt oder entstandenes Nitrit nach Umsetzung zu S-Nitroso-N-Acetylcystein [289] im jeweiligen Ansatz gemessen.

2.3.5.1 Ergebnisse und Diskussion

Humane Endothelzellen wurden mit endothelialelem vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF= vascular endothelial growth factor), der Calcium-Ionophore A23187 und dem spezifischen eNOS-Inhibitor L-NMMA inkubiert und die NO-Freisetzung entweder durch Umsatz mit der Fluoreszenzsonde DAF-2 oder als NO-Metabolit in Form von Nitrit gemessen (Abb. 2.20).

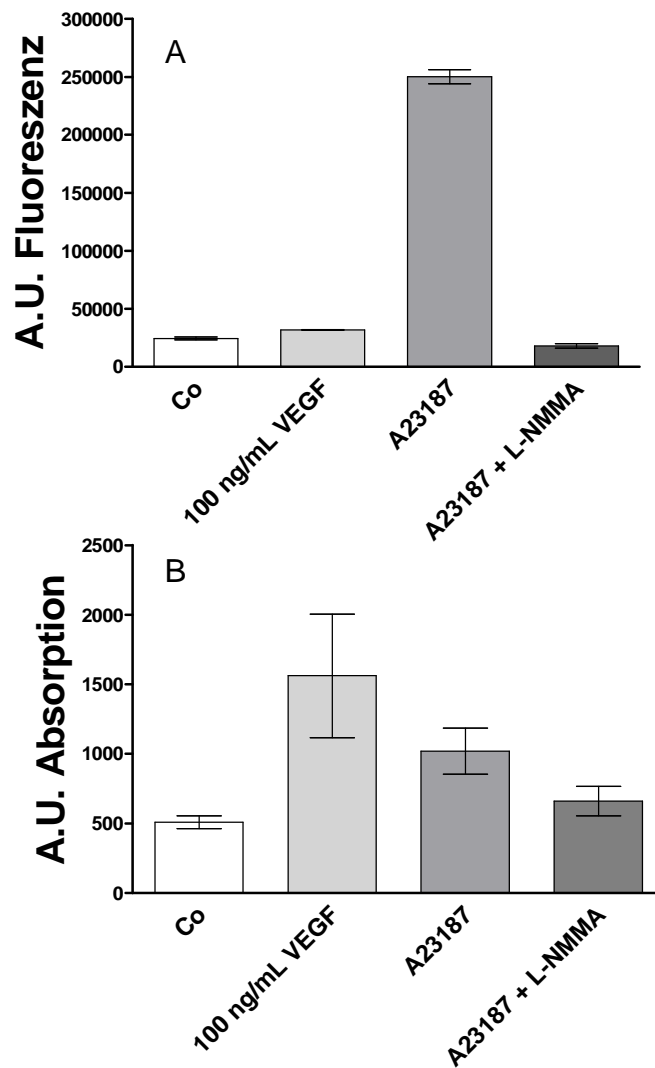


Abb. 2.20: Ansprechvermögen (= Response) unterschiedlicher analytischer Systeme mit der Quantifizierung von NO aus Endothelzellen durch die Fluoreszenzsonde DAF-2 (A), oder des NO-Metaboliten Nitrit (B). Als Stimulanzen wurden eine Calcium-Ionophore (10 μ M A23187), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (100 ng/mL VEGF) sowie zur eNOS-Inhibierung L-NMMA (1 mM) eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm Standardabweichung. Wiedergabe [201] mit Genehmigung von Elsevier.

Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede insofern, als die Ionophore in Relation zu VEGF bei der Verwendung von DAF-2 zur Detektion von NO ein wesentlich höheres Signal erzeugte (250172 ± 6161 für A23187 versus 31778 ± 243 für VEGF; Abb. 2.20 A). L-NMMA antagonisierte dabei die durch die Ionophore ausgelöste NO-Freisetzung. Demgegenüber reduzierte L-NMMA bei der Messung von Nitrit die dadurch (A23187) ausgelöste NO-Freisetzung nicht vollständig und das entsprechende NO_2^- -Signal war bei Verwendung von VEGF zur Stimulation deutlich höher als beim Einsatz der Ionophore (1561 ± 444 VEGF versus 1020 ± 166 A23187 Abb. 2.20 B).

Offensichtlich beeinflusste das gewählte Detektionssystem zur NO-Freisetzung die erhaltenen Ergebnisse mit den entsprechenden Signalintensitäten und damit interessanterweise auch die Relation der verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen zueinander. Sowohl die Ionophore A23187 als auch VEGF erhöhten im Testsystem die NO-Produktion, was im Einklang mit früher publizierten Arbeiten steht [290-291]. Durch die Unterschiede in den Reaktionsmechanismen und der Bildung der untersuchten Spezies (DAF-2T; Nitrit) war von gewissen Differenzen auszugehen, allerdings übertrafen dabei das Ausmaß und die verschiedenen Verhältnisse die Erwartungen. Ein direkter Vergleich der beiden Methoden – die Quantifizierung von NO mittels DAF-2 sowie von Nitrit als S-Nitroso-N-Acetylcystein – wurde bislang noch nicht untersucht. Bei rein heterolytischer Reaktionsfolge sollten theoretisch für zwei Äquivalente extrazellulär freigesetztes NO, das dann mit Sauerstoff weiter zum Distickstofftrioxid reagiert, sowohl ein Äquivalent DAF-2T als auch ein Äquivalent Nitrit entstehen.

Ähnliche Beobachtungen im Kontext von NO, jedoch in diesem Fall mit einem anderen Zielmolekül der Analytik, nämlich eine deutliche Abhängigkeit der quantifizierten Konzentration von S-Nitrosothiolen von der verwendeten Methode mit Konzentrationsunterschieden von mehreren Zehnerpotenzen, wurden von Giustarini et al. beschrieben [292]. Obwohl es scheint, als würden die Nitrit-Plasmakonzentrationen *in vivo* die NO-Produktion von konstitutiven NO-Synthasen gut widerspiegeln [293], gab es doch große Unterschiede (0,19-4,2 μM), was die durch unterschiedliche HPLC-Methoden bestimmten basalen Plasmakonzentrationen von Nitrit bislang betraf [294]. Der Reiz durch die Ionophore im vorliegenden Zellsystem erzeugte bei der Anwendung von DAF-2 zur NO-Messung, wie bereits erwähnt, Signale, die dem Größenordnungsbereich von $\sim 10\text{-}20\text{ nM}$ freigesetztem NO im Medium zuzuordnen waren. Die Stimulation durch VEGF war dagegen vergleichbar mit sehr geringen Konzentrationen im Bereich von $\sim 1\text{-}2\text{ nM}$ NO. Mit der Messung von Nitrit dagegen wurde eine Erhöhung von $\sim 100\text{ nM}$ NO_2^- durch den Einsatz von VEGF gefunden, die Ionophore steigerte die NO_2^- -Konzentration um $\sim 50\text{ nM}$. Bei Takahashi et al. erhöhte der Einsatz von 10 ng/mL VEGF – im Gegensatz zu den in den eigenen Versuchen verwendeten VEGF-Konzentration von 100 ng/mL – die NO_2^- -Konzentration im Medium von Endothelzellen um $\sim 22\text{ nM}$ [207], allerdings innerhalb von 10 min. Die Inkubationszeiten der eigenen Versuche beliefen sich auf 45 min. Brouet et al. berichteten über unterschiedliche zeitliche Abläufe der NO-Freisetzung durch VEGF und Ionophore A23187 [295]. Letztere schien einen starken akuten Puls der NO-Freisetzung innerhalb von wenigen Minuten auszulösen, wohingegen VEGF offensichtlich über einen längeren Zeitraum (30 min) eine ansteigende NO_2^- -Freisetzung bewirkte [295]. Dies könnte eine der

Ursachen für die gefundenen Unterschiede von VEGF und A23187 bei der NO- bzw. NO₂⁻-Freisetzung in den eigenen Untersuchungen sein. Wenig ist bislang darüber bekannt, wie NO-Synthasen physiologisch nach Aktivierung wieder inhibiert werden, und vor allem wie schließlich beim NO-Effektorprotein lösliche Guanylatzyklase die starke Bindung von NO an die koordinierten Eisen-Häm-Komplexe aufgelöst wird. Ebenso spärlich sind bislang die Kenntnisse der Bildungs-, Stoffwechsel- und Transportwege von Nitrit in verschiedenen Kompartimenten *in vivo* [119]. In diesem Zusammenhang wäre ein naheliegender logischer Schluss, dass sich möglicherweise die durch die Stimulierung mit VEGF induzierte Nitrit-Bildung bereits in der Zelle über NO₂ und N₂O₃ vollzogen hatte, denn Nitrosonium-Ionen sind in wässriger Lösung instabil und würden die Zelle auch nicht verlassen. Aus der Zelle ausgeschleustes NO₂⁻ (über das Gleichgewicht: $\text{HNO}_2 \leftrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+$) könnte bei physiologischem pH-Wert nicht mehr mit der nur extrazellulär verfügbaren Fluoreszenzsonde reagieren.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die HPLC-Methoden mit UV/VIS-Detektion zur Analyse von Nitrit in Zellkultursystemen aufgrund der geringen NO-Produktion der Zellen im Gegensatz zur Analyse im Plasma häufig in Bereichen des LLOQ (= lower limit of quantification) bzw. LOD (= limit of detection) zu operieren gezwungen waren [37, 294]. Lediglich ein kommerziell erhältliches HPLC-System mit einem speziellen Aufbau zur Ionen-Trennung und anschließender *in situ* Umwandlung von Nitrit zu einer Azoverbindung durch eine Griess-Reaktion vor der Detektionszelle (ENO-20, Eicom Corporation, Kyoto, Japan) berichtet über ein LOD von 1 nM in 100 µL Injektionsvolumen [296].

Mit sorgfältig geplanten und validierten Methoden können NO bzw. dessen Metaboliten in Zellkultursystemen auch in Gegenwart von Polyphenolen, wie in der eigenen Arbeit gezeigt wurde, bestimmt werden. Wenn möglich, sollten dabei mehrere, unterschiedliche Methoden zur NO-Detektion zum Einsatz kommen, um potentielle Schwächen und Fallstricke der einzelnen Herangehensweisen auszugleichen. Sinnvoll dabei ist es auch möglichst direkte Methoden zu verwenden, um die kausalen Zusammenhänge im Bereich der komplexen NO-Analytik gemäß einer Ockham'schen Rasur, also mit möglichst wenigen klar in Beziehung zueinander stehenden Variablen, zu identifizieren und zu verifizieren.

3 Neuronale NO-Synthase (nNOS)

3.1 NO und das Gehirn

Das Gehirn produziert im normalen physiologischen Zustand etwa zwanzigmal mehr NO als das gesamte Gefäßsystem des menschlichen Körpers [1, 297]. Aus stoffwechselphysiologischer Sicht war bekannt, dass im Harnstoffzyklus zwar L-Arginin in L-Citrullin umgewandelt werden kann und diese Konversion auch im Gehirn stattfand, jedoch konnte das für einen funktionierenden Harnstoffzyklus notwendige Enzym Arginase im Gehirn nicht nachgewiesen werden. Verantwortlich jedoch für diese Aminosäure-Umwandlung im Gehirn zeichnet vor allem die dann neu entdeckte neuronale NO-Synthase (nNOS), die als erste der drei bis heute bekannten NO-produzierenden Enzyme im Menschen – neben der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase – 1990 isoliert und kloniert wurde [298]. Die nNOS wird neben der Expression in neuronalen Zellen auch besonders in Muskelgeweben wie Herz- und Skelettmuskulatur in relevanten Mengen gebildet [299-300]. Durch die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Spleiß-Varianten scheint die nNOS im Vergleich zur eNOS und iNOS einer komplexeren genomischen Organisation unterworfen zu sein [301]. Zusätzlich enthält das nNOS-Protein im Gegensatz zu eNOS und iNOS eine sogenannte PDZ-Domäne, die nach folgenden Proteinen, für die als erstes bekannt wurde dieses Bindungsmotiv zu teilen, akronymisch benannt wurde: Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), Zonula occludens-1 protein (zo-1)). Diese PDZ-Proteinstruktur ist aus ~90 Aminosäuren aufgebaut und an der Erkennung und Interaktion mit Proteinbindungspartnern im Bereich des C-terminalen Endes von Proteinen beteiligt. Eine Assoziation und Interaktion der nNOS mit anderen Proteinen über eine derartige PDZ-Verbindung wurde z.B. für sarkolemmale, ATP-abhängige Calciumpumpen in der Herzmuskulatur beschrieben [302].

Im Gehirn finden sich vor allem postsynaptisch nNOS-Enzyme mit ionotropen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren assoziiert, wodurch z.B. eine Beteiligung von NO an Gedächtnisprozessen vor allem durch retrograde synaptische Signalwirkung und dabei besonders an einer Modulation der Langzeitpotenzierung von Synapsen wahrscheinlich ist. Interessanterweise reichen offenbar schon sehr geringe Mengen von synaptisch freigesetztem NO (~0,3 nM) aus, um eine deutlich amplifizierte Rezeptorantwort und darauffolgende Produktion von cGMP (~0,4 µM) durch das Effektorprotein zyklische Guanylatzyklase zu induzieren [303]. In der Gehirnentwicklung trägt die fokale Freisetzung von NO dazu bei, sich synchron entladende Neuronengruppen, die in das gleiche neuronale

Netzwerkareal projizieren, herauszuformen [304]. Im Lichte seiner erfolgreichen Evolution und im Vergleich zu anderen vor allem extrazellulär an Oberflächen-Rezeptorproteine bindenden Neurotransmittern wie z.B. biogenen Aminen oder Aminosäuren nimmt NO aufgrund seiner besonderen Eigenschaften wie z.B. radikalische Eigenart, freie Diffusion ohne membranäre Begrenzung, keine direkte Möglichkeit der Speicherung, und durch die Vielseitigkeit seiner ausgelösten Effekte eine besondere Stellung ein [303].

Ebenso vielfältig sind die möglichen Beeinflussungen physiologischer und pathophysiologischer Prozesse durch NO in Nervengeweben, und diesbezüglich besonders im Gehirn. Die Neurogenese als weiterer Beleg für die dichotomen Eigenschaften von NO betreffend scheint es, als ob zum einen das Wachstum von Neuronen in subventrikulären Arealen durch NO gehemmt [305], zum anderen die Neurogenese im Hippocampus gesteigert würde [306]. Bei zytotoxischen Effekten durch überschießende Aktivierung von N-Methyl-D-Asparat-Rezeptoren zusammen mit einem starken Calciumeinstrom in die Zellen (= „Exzitotoxizität“) spielt die nNOS unter anderem mit dem Beitrag zur Bildung von reaktivem Peroxynitrit eine entscheidende Rolle [307]. Ähnliche Einflüsse sind in Verbindung mit einem Untergang von Neuronen unter Beteiligung der nNOS ursächlich für die Entstehung von Morbus Parkinson beschrieben worden [308]. Eine genetische Assoziationsstudie zeigte eine Verbindung zwischen verschiedenen genetischen Sequenz-Variationen der nNOS und iNOS und dem Auftreten der Parkinson'schen Erkrankung [309]. Zerebraler nitrosativer Stress mit der Konsequenz einer erhöhten nachweisbaren Nitrierung von Proteinresten steht offensichtlich neben anderen Faktoren auch in koinzidentem Verhältnis zum klinischen Bild der Alzheimer'schen Erkrankung [310-311]. Klinische Studien mit einer prospektiven Intervention zur Beeinflussung der zerebralen NO-Produktion wurden bislang nicht durchgeführt, und bis dato fehlen selektive und spezifische Ansätze zur lokalen NOS-Inhibierung. Interessanterweise reagieren auch catecholaminartige Neurotransmitter wie Adrenalin und Dopamin, deren Konzentrationsveränderungen im Gehirn mit verschiedenen zerebralen Erkrankungen einhergehen und die strukturelle Ähnlichkeiten mit verschiedenen Flavonoiden aufweisen, bereits in geringen Konzentrationen auch kovalent mit NO [115, 312].

3.2 Flavonoide und das Gehirn

Wichtige grundlegende Fragen, die sich im Kontext mit einer möglichen Wirkung von Flavonoiden auf Prozesse im Gehirn bewegen, sind: wie ist die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden im Gehirn, kommen diese überhaupt dort an, um lokale Effekte auszulösen? Und

falls dem nicht so ist, was wären mögliche plausible Hypothesen für indirekte Effekte? Welche Konzentrationen werden dabei erreicht? Was für Wirkmechanismen kommen in Frage?

Es gab unter anderem Hinweise aus einer prospektiven epidemiologischen Human-Studie darauf, dass sich die erhöhte Einnahme von Polyphenolen bei einer Probanden-Population (mittleres Alter 77 Jahre, $n = 1640$) über einen längeren Zeitraum (Beobachtungszeitraum zehn Jahre) positiv auf kognitive Funktionen und deren Erhalt auswirkte [313]. In einer weiteren epidemiologischen Arbeit konnte die Einnahme von Flavonoiden und besonders von Anthocyanen mit einer Verlangsamung der kognitiven Einbußen über die Zeit (Beobachtungszeitraum vier Jahre) assoziiert werden ($n = 16\ 010$, Alter ≥ 70 Jahre) [314]. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelt-blinden klinischen Studie mit Patienten ($n = 61$), die an einer Aufmerksamkeitsdefizitstörung litten, führte die vierwöchige Einnahme des Kiefernridenextraktes unter anderem zu einer Verbesserung der Konzentrationsfähigkeit im Vergleich zu Placebo [315].

Was nun die bisher publizierten Daten zur Bioverfügbarkeit, die sich hauptsächlich aus Tierversuchen mit dem Einsatz von Nagern etwa zur zerebralen Aufnahme von (-)-Epicatechin [316] und wenigen Studien z.B. zur Verteilung von Quercetin in Schweinen [317] zusammensetzten, zur Aufnahme von Polyphenolen ins Gehirn anbelangte, so können derzeit zwei Aussagen getroffen werden. Zum einen scheint es wahrscheinlich, dass Polyphenole ins Gehirn aufgenommen werden. Zum anderen sind jedoch die Konzentrationen, die dabei im Gehirn erreicht wurden, sehr gering (≤ 1 nmol/g Gewebe). Dabei waren häufig große methodische Unterschiede und Unsicherheiten beim Vergleich der jeweiligen Werte in den verschiedenen Arbeiten anzutreffen, und Aspekte der Validierung wie z.B. Wiederfindung, Normalisierung oder Robustheit der Methoden wurden teilweise unzureichend behandelt. In einer Arbeit von Prasain et al. wurde nach peroraler Applikation eines Traubenkernextraktes in Ratten 53 ng (+)-Catechin ($\sim 0,2$ nmol) pro Gramm Hirngewebe gefunden [318], wohingegen Ferruzzi et al. in einem vergleichbaren Tiermodell, allerdings mit unterschiedlichen Dosierungsschemata des Traubenkernextraktes, eine Konzentration von 0,57 ng/g (+)-Catechin im Gehirn der Tiere bestimmte [319]. Aufgrund der in Relation zu den Polyphenolen in großem Überschuss vorliegenden physiologisch vorkommenden Antioxidantien wie Glutathion oder Ascorbinsäure (1,5 μ mol pro Gramm Gewebe in perfundierten Schweinehirnen [320]) wäre damit der allgemeine antioxidative Beitrag von Polyphenolen im Gehirn als eher gering einzuschätzen, abgesehen von einer möglichen spezifischen Wirkung oder Anreicherung in diskreten Kompartimenten.

Da die Einnahme von Flavonoiden vor allem in Verbindung mit Fructose die Harnsäure-Plasmaspiegel erhöhen kann [190], wäre alternativ auch denkbar, dass die neuroprotektiven Effekte auf diesem Weg indirekt ausgelöst werden. Interessanterweise sind, wie aus epidemiologischen Studien hervorging, erhöhte Harnsäurespiegel mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit an Morbus Parkinson zu erkranken assoziiert [321-322]. Möglicherweise tragen Radikalfänger-Eigenschaften der Harnsäure einerseits zu den beobachteten, protektiven Effekten bei [268]. Andererseits jedoch scheint eine Hyperurikämie auch mit einer endothelialen Dysfunktion vergesellschaftet aufzutreten [323], was somit eine verbesserte Durchblutung als Erklärung unwahrscheinlich macht.

In den letzten Jahren richteten Forscher ihre Aufmerksamkeit vermehrt auf die Interaktion der bakteriellen Darmflora mit dem menschlichen Körper und es wurde damit verbunden die Beteiligung der Darmbakterien und ihres Stoffwechsels an der Pathophysiologie unterschiedlicher Erkrankungen auch außerhalb des Gastrointestinaltrakts erkannt [324]. Im Jahr 2010 wurde von einer Gruppe um Jeffrey Weiser beschrieben, dass ein von Darmbakterien gebildetes Peptidoglykan, das in die Blutzirkulation aufgenommen wird, dafür verantwortlich zu sein scheint neutrophile Granulozyten im Knochenmark in einen prä-aktiven funktionellen Zustand zu versetzen. Dies führte dazu, dass die Aktivität der Zellen gegen Infektionen mit pathogenen Keimen wie z.B. *Streptococcus pneumoniae* deutlich erhöht war [325]. Im komplexen Wechselspiel und Schmelztiegel evolutionärer Prozesse mit dem Aufeinandertreffen und gegenseitiger Beeinflussung von xenobiotischen Nahrungsbestandteilen, Bakterien und humanen Zellen im Darm werden durch die Metabolisierung von Polyphenolen neue Substanzen gebildet, die sich durch eine veränderte Bioverfügbarkeit auszeichnen und somit für die in epidemiologischen Studien gefundenen positiven Effekte auch auf pathophysiologische zerebrale Vorgänge verantwortlich sein könnten. Für derartige Metabolite wie den *in vivo* nach Einnahme des Kiefernrintenextraktes gebildeten und im Plasma nachweisbaren Metabolit M1 [24] lagen bislang keine Daten zur Wirkungsweise und möglicher zerebraler Akkumulation vor.

Beim selektiven Durchtritt von Wirkstoffen durch die Blut-Hirnschranke, bei der es sich um ein Barriersystem handelt, das die Homöostase der Prozesse im Gehirn aufrechterhält, müssen die Moleküle diese evolutionär herausgebildete Kontrollinstanz in Form von Biomembranen und vielfältigen Influx- und Efflux-Proteinsystemen überwinden. Die stringente Kontrolle wird durch eine besonders fest abschließende Endothelzellschicht mit sogenannten „Tight Junctions“ in den Kapillargefäßen erreicht, die mit einer Gesamtlänge von ~600 km das Gehirn durchziehen [326] und deren Aufbau einen parazellulären Transport nahezu ausschließt. Als Transportmotive für die Biomembrangängigkeit von Molekülen

können die rein passive Diffusion, ein durch Kanalproteine erleichtert vermittelter passiver Transport, ein aktiver mit dem Verbrauch von Energie gekoppelter Transport, und eine korpuskuläre Absorption in Form von Pinozytose oder Phagozytose verstanden werden. Im Zuge umfangreicher Expressionsstudien wurden bislang Sequenzen im Genom von über 700 verschiedenen Transportern entdeckt, die sich in zwei große Familien, nämlich die solute carrier (SLC) [140] und die ATP-binding cassette carrier (ABC) [141] einteilen lassen, wovon im Speziellen die Transporter aus der Familie der MRP-Proteine (MRP= multi drug resistance protein) und p-Glycoproteine eine Rolle beim zerebralen Efflux von Xenobiotika spielen.

Jede unabhängige physikochemische Moleküleigenschaft wie z.B. Lipophilie oder Molekülgestalt trägt einen Informationsanteil für die Blut-Hirnschranken-Permeation. Die Eigenschaft der Blut-Hirnschrankendurchtrittsfähigkeit einer Substanz gibt an, welcher Mengenanteil der entsprechenden Substanz in der Lage ist die Blut-Hirnschranke zu überwinden. Es werden hauptsächlich zwei methodische Ansätze zur Beschreibung der Penetration einer Substanz durch die Blut-Hirnschranke ins Gehirn verwendet. Zum einen wird die Gleichgewichtsverteilung zwischen Blut und Gehirn beschrieben, die unter anderem auch abhängig ist von membranären Transportsystemen und dem Bindungsverhalten von Substanzen gegenüber Plasmaproteinen und Gehirngewebe. Dies wird über den logBB-Wert ausgedrückt:

$$\log BB = \log \left(\frac{[\text{Konzentration im Gehirn}]}{[\text{Konzentration im Blut}]} \right)$$

3.1

Es wird bei den meisten bislang bekannten Verfahren und untersuchten Substanzen davon ausgegangen, dass bei einem logBB-Wert von $> -0,3$ eine Substanz die Blut-Hirnschranke in ausreichendem Maß überwinden kann, um relevante Effekt auszulösen [327]. Zum anderen wird als Parameter der Gehirn-Penetration von Substanzen der logPS-Wert (= Permeability surface area product) z.B. in Tiermodellen häufig durch *in situ*-Gehirnperfusionsen bestimmt, und der Wert stellt somit eine Art von Aufnahme-Clearance [Einheit= mL/s/g] der Substanzen durch die Blut-Hirnschranke dar [328]. Abhängig von entsprechenden experimentellen Bedingungen der *in vitro*- und *in vivo*-Versuchsanordnungen oder *in silico*-generierten Vorhersage-Modellen sind die erhaltenen logBB- und logPS-Werte teilweise schwierig zu vergleichen. Die Relevanz einer Vorhersage des Substanzverhaltens im menschlichen

Körper ist durch die verschiedenen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften mit unterschiedlicher pharmakologischer Wirkung und Potenz einzelner Substanzen kompliziert zu bewerten.

3.2.1 Fragestellung: Mögliche zerebrale Aufnahme von M1 und Effekte auf nNOS-Expression

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Polyphenolen und einem (präventiven) Nutzen bei bestimmten zerebralen Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer. Bislang sind dazu nur sehr wenige Daten vornehmlich aus epidemiologischen Erhebungen verfügbar. Zunächst sollte deshalb in der eigenen Arbeit im Kontext NO-produzierender Enzyme grundlegend untersucht werden, ob der Metabolit M1 auf zellulärer Ebene einen Effekt auf die Proteinexpression der nNOS ausübt, die an einer Vielzahl physiologischer- und pathophysiologischer Prozesse im Gehirn beteiligt zu sein scheint [311]. Zusätzlich sollte, da sehr großes Interesse an der validen Vorhersage einer möglichen Blut-Hirnschranken-Permeation von potenziell zerebral wirksamen Substanzen besteht, ein *in silico*-Modell in Zusammenarbeit mit Dr. Manuel Nietert, Arbeitsgruppe Statistische Bioinformatik, Universität Göttingen, zur ersten, orientierenden Computer-basierten Vorhersage der Blut-Hirnschrankengängigkeit ausgewählter Polyphenole bzw. deren *in vivo* Metabolite etabliert werden.

3.2.2 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

Für die Western-Blotting Experimente wurde die Rhabdomyosarkom-Zelllinie A-673 [240], die die nNOS in nachweisbarer Konzentration konstitutiv exprimiert, mit unterschiedlichen Konzentrationen von M1 (0,1-10 µg/mL) über 20 h inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde Dibutyryl-cAMP (= db-cAMP) eingesetzt, das ein Analogon von cAMP (= zyklisches Adenosinmonophosphat) darstellt und nach intrazellulärer Hydrolyse Proteinkinasen aktiviert. Nach der Stimulation mit M1 oder db-cAMP wurden die Zellen lysiert und der nNOS-Protein-Gehalt mittels Western-Blotting Technik bestimmt (s. 7.5 Material und Methoden). Auf die oben genannte permanente, aus Sarkom-Gewebe isolierte Zelllinie wurde zurückgegriffen, da die untersuchten neuronalen Zelllinien wie z.B. SK-N-SH [329] die nNOS nicht in ausreichender Konzentration hinsichtlich der Nachweisgrenze des eingesetzten Detektionssystems exprimierten und primäres neuronales Zell-Material nicht zur Verfügung stand.

Das *in silico*-Modell basierte auf einem Trainingsdatensatz mit 177 Strukturen für die jeweils experimentell bestimmte logBB-Werte vorlagen, sowie einem davon unterschiedlichen Validierungsdatensatz mit 181 Strukturen, der von Submaranian und Kitchen publiziert wurde und in elektronischer Form zur Verfügung stand [330]. Mit einer multiplen linearen Regressionsanalyse und entsprechender Aufstellung eines ordinären Differentialgleichungssystems, in welchem die gewählten und für die Strukturen berechneten 12 MOE-Deskriptoren (s. 7.6 Material und Methoden; Computerprogramm MOE= Molecular Operating Environment) mit entsprechenden Gewichtungsfaktoren multipliziert aufsummiert wurden, wurde ein Modell mit dem Programm KNIME erstellt und eine Vorhersage der logBB-Werte unterschiedlicher Polyphenole wie Protocatechusäure, Quercetin, Cyanidin, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Phloretin und des Metaboliten M1 generiert.

3.2.3 Ergebnisse

3.2.3.1 Western-Blotting

In Lysaten der Zelllinie A-673, die aus einem Rhabdomyosarkom einer 15jährigen weiblichen Patientin von Giard et al. isoliert wurde [240], konnte die nNOS nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Zum Vergleich der Laufhöhen im PAGE-Gel und zur Überprüfung der Antikörperspezifität für die nNOS wurde zusätzlich ein Lysat aus Rattenhirn aufgetragen. Dabei konnte die nNOS mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden.

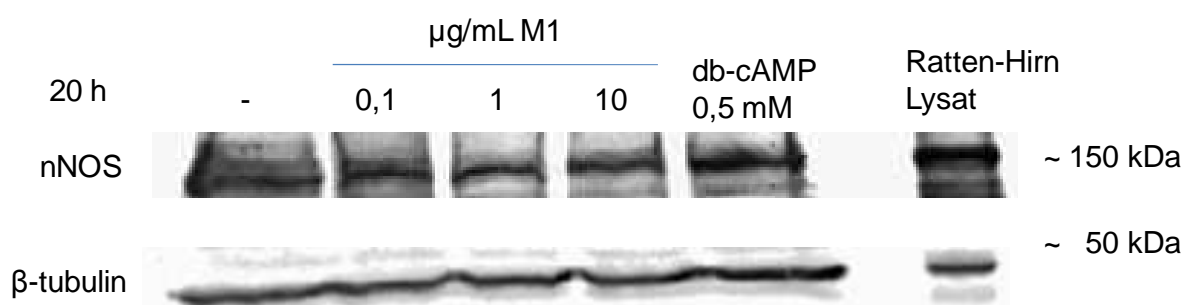


Abb. 3.1: Exemplarische Darstellung eines Western-Blots von Lysaten der mit M1 (0,1-10 µg/mL) über 20 h behandelten A-673 Rhabdomyosarkom-Zellen mit spezifischer Immunfärbungs-Detektion der aufgetrennten nNOS- und β-tubulin-Proteine. db-cAMP (Dibutyl- zyklisches Adenosinmonophosphat) diente als Positivkontrolle zur Steigerung der nNOS-Proteinexpression. Ratten-Hirn-Lysat wurde als Positivkontrolle zur nNOS Detektion eingesetzt.

Es wurde ein geringer Trend zur Steigerung der nNOS-Expression durch 0,5 mM Dibutyryl-cAMP erkannt, allerdings ohne das Ausmaß und die Robustheit eines zur validen Auswertung und Quantifizierung in Frage kommenden Effekts. Die verschiedenen Konzentrationen von M1 zeigten keinen eindeutigen negativen oder positiven Einfluss auf die Expression der nNOS, so dass davon ausgegangen werden muss, dass der Metabolit M1 in den gewählten Konzentrationen im entsprechenden Modell keinen bedeutenden Einfluss auf die konstitutive Expression der nNOS ausübt.

3.2.3.2 Computer-basierte Vorhersage der Blut-Hirnschrankengängigkeit

Nach der Entwicklung und Training des Modells wurde für die Korrelation der jeweiligen experimentellen und vorhergesagten logBB-Werte aus dem Datensatz der in Abb. 3.2 entsprechend gezeigte Scatter-Plot mit einem Korrelationswert von $r = 0,78$ erhalten.

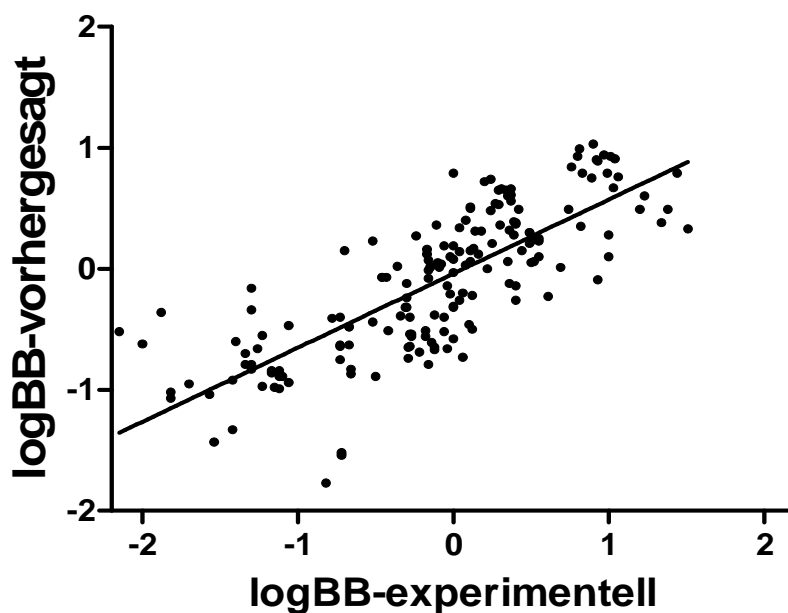


Abb. 3.2: Regressionsanalyse des Differentialgleichungssystem des Vorhersage-Modells unter Verwendung des Trainingsdatensatzes ($n = 177$ Strukturen) mit experimentell bestimmten logBB-Werten, berechneten MOE-Deskriptoren und entsprechend vorhergesagten logBB-Werten. Der Korrelationsfaktor der experimentellen und vorhergesagten logBB-Werte im entwickelten Modell war dabei $r = 0,78$ (berechnet mit KNIME Version 2.5.1).

Die Standardabweichung der Differenzen zwischen experimentellen und vorhergesagten logBB-Werten war dabei $\pm 0,47$ log-Einheiten. Vor der Modellierung und Anpassung des Vorhersage-Systems wurde der Zusammenhang zwischen den einzelnen verwendeten

Deskriptoren und den für die Eingabe zur Verfügung stehenden experimentell bestimmten logBB-Werten überprüft (s. Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Berechnete Korrelationsfaktoren zwischen den einzelnen Deskriptoren (Beschreibung der Eigenschaften und Berechnung der Deskriptoren s. 7.6.2 Material und Methoden) und den experimentell bestimmten logBB-Werten im Trainingsdatensatz vor Erstellung des Vorhersage-Modells.

MOE-Deskriptoren	Linearer Korrelationsfaktor (r) mit experimentell bestimmten logBB-Werten
logP (o/w)	0,41
SlogP	0,25
TPSA	-0,70
Weight	-0,25
ASA	-0,24
ASA_H	0,04
ASA_P	-0,55
glob	0,23
lip_acc	-0,62
lip_don	-0,44
vsa_acid	-0,17
vsa_base	-0,22

Der stärkste positive Zusammenhang mit den experimentell bestimmten logBB-Werten wurde für den Wasser/Oktanol-Verteilungskoeffizienten (logP (o/w)) mit einem Korrelationswert von 0,41 gefunden. Im Gegensatz dazu war die stärkste negative Korrelation zu den logBB-Werten durch die Beschreibung der polaren Oberfläche der Moleküle (TPSA= topological polar surface area) mit einem Wert von -0,70 gekennzeichnet.

Die Überprüfung der Zuordnung eines Validierungsdatensatzes (n = 181 Strukturen) von Subramanian und Kitchen [330], für welchen mit dem oben beschriebenen Computer-Modell logBB-Werte generiert wurden, führte zu einer signifikanten ($p < 0,0001$) Unterscheidung der ZNS-gängigen und nicht-ZNS-gängigen Strukturen (s. Abb. 3.3). Die Annahme der ZNS-Permeation (ZNS-/ZNS+) der Strukturen gründete sich dabei auf Literaturdaten, die auf der bekannten Aktivität [331-333] der Moleküle gegenüber im ZNS-lokalisierten Zielstrukturen beruhten.

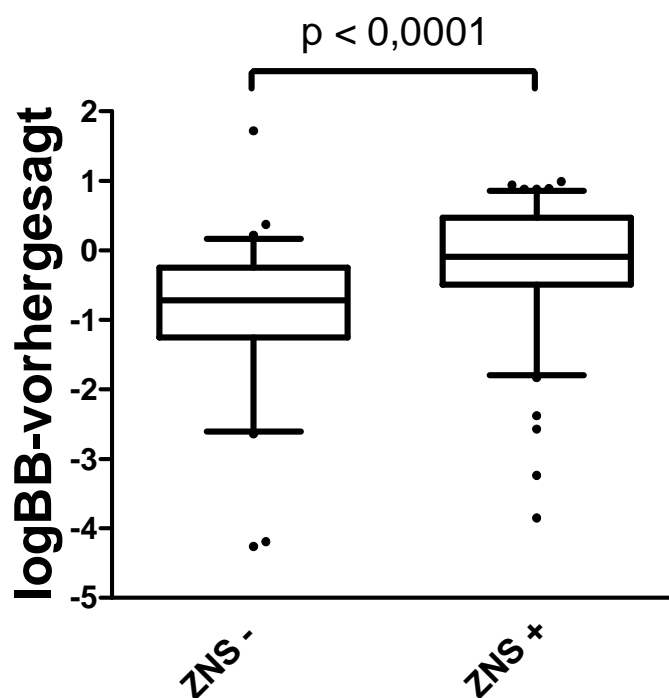
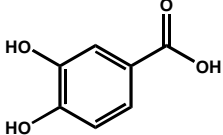
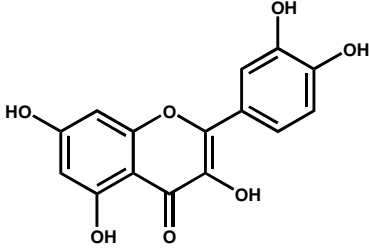
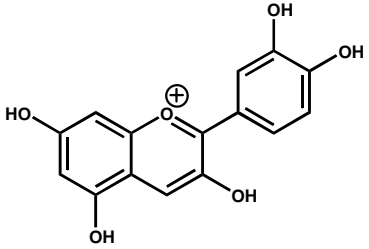
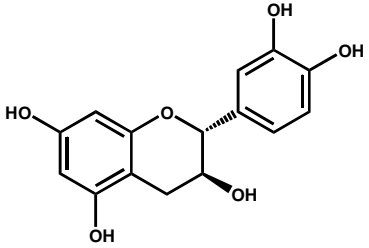
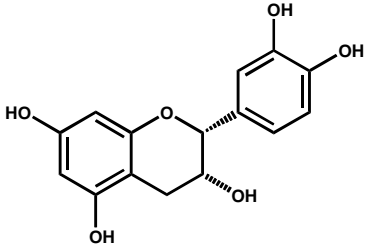
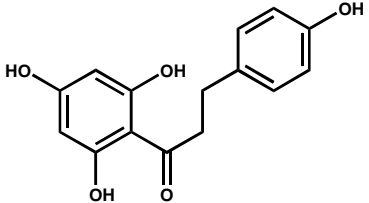
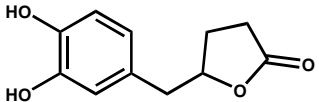


Abb. 3.3: Zuordnung der vorhergesagten logBB-Werte des Validierungsdatensatzes (n = 181 Strukturen) zur ZNS-gängigen (ZNS+) und nicht-ZNS-gängigen (ZNS-) Gruppe mit dem entwickelten Vorhersage-Modell (Whisker schließen das 95 % Konfidenzintervall der Werte ein). „ZNS+“ bedeutete, dass eine Interaktion mit entsprechender Aktivität des jeweiligen Moleküls innerhalb des ZNS gegenüber bestimmter Zielstrukturen bekannt war [330-333]. Der dargestellte p-Wert wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t-test (GraphPad Prism™) berechnet.

Die mit dem Vorhersage-Modell berechneten logBB-Werte der ausgewählten Polyphenole sind in Tab. 3.2 nach ansteigenden positiven Werten angeordnet gezeigt. Der geringste logBB-Wert wurde dabei von Protocatechusäure erreicht (-1,18), wohingegen der höchste Wert, somit gemäß dem Modell die höchste Wahrscheinlichkeit ins Gehirn zu gelangen, für den Metaboliten M1 mit einem logBB-Wert von -0,33 gefunden wurde.

Tab. 3.2: Vorhersage der logBB-Werte ausgewählter Polyphenole

Struktur	Name	Vorhergesagter logBB-Wert
	Protocatechusäure	-1,18
	Quercetin	-1,02
	Cyanidin	-0,94
	(+)-Catechin	-0,90
	(-)-Epicatechin	-0,84
	Phloretin	-0,76
	Metabolit M1	-0,33

Nach Festlegung eines Schwellenwertes im Trainingsdatensatz bei einem *experimentellen* logBB-Wert von -0,30, ab welchem eine ZNS-Penetration angenommen wurde, wurde der Datensatz in zwei Gruppen aufgeteilt (ZNS-gängige (ZNS+) und nicht-ZNS-gängige (ZNS-) Moleküle). Danach erfolgte eine Zuordnung der berechneten logBB-Werte zu den jeweiligen Gruppen. Dabei erreichte das Modell einen positiv prädiktiven Wert bei der Vorhersage der nicht-ZNS-Gängigkeit (ZNS-) von 0,84 und bei der Vorhersage der ZNS-Gängigkeit (ZNS+) einen positiv prädiktiven Wert von 0,80. Der Metabolit M1 kam nach dieser Einteilung als Struktur der untersuchten Polyphenole mit dem höchsten logBB-Wert von -0,33 dem Bereich der ZNS-Gängigkeit am nächsten. Die polphyenolischen Strukturen schienen nach dieser Einteilung eher schwach ZNS-gängig zu sein. Die zugehörige Box-Plot-Graphik ist in Abb. 3.4 gezeigt.

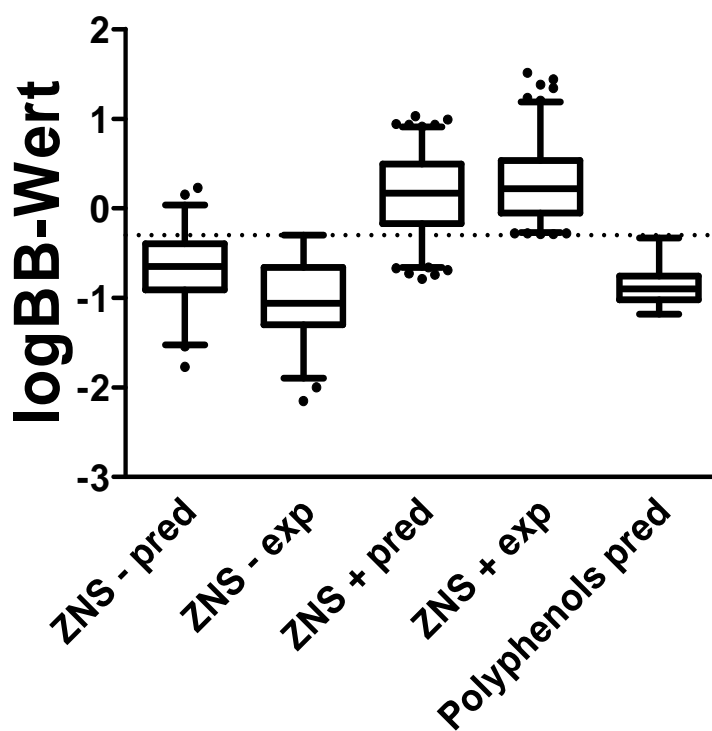


Abb. 3.4: Zuordnung der experimentell (exp= experimentell) bestimmten und vorhergesagten logBB-Werte (pred= vorhergesagt) des Trainingsdatensatzes (n = 177 Strukturen) zur ZNS-gängigen (ZNS+) und nicht-ZNS-gängigen (ZNS-) Gruppe mit dem entwickelten Vorhersage-Modell (Whisker schließen das 95 % Konfidenzintervall der Werte ein). Ganz rechts ist der Box-Plot der Vorhersage-Werte der ausgewählten Polyphenole gezeigt. Die Zuordnung „ZNS+“ bedeutete, dass ein experimenteller logBB-Schwellenwert von -0,30 (gestrichelte Linie) überschritten wurde.

3.2.4 Diskussion

Im Zellkulturmodell mit nNOS-exprimierenden Rhabdomyosarkom-Zellen wurde kein eindeutig steigernder oder inhibierender Effekt hinsichtlich der Beeinflussung der zellulären nNOS-Proteinkonzentration nach Behandlung mit dem *in vivo* entstehenden Metabolit M1 des Kiefernextrakts gefunden. Im Computer-basierten Modell zur Vorhersage der Blut-Hirnschranken-Permeation ausgewählter Flavonoide, das einen guten Korrelationskoeffizient zwischen experimentell bestimmten und vorhergesagten logBB-Werten sowie hohe prädiktive Werte für eine ZNS-Gängigkeit bzw. ZNS-nicht-Gängigkeit erreichte, wurde folgende Reihenfolge mit ansteigenden logBB-Werten – d.h. einer wahrscheinlich höheren Blut-Hirnschranken-Gängigkeit – berechnet: Protocatechusäure < Quercetin < Cyanidin < (+)-Catechin < (-)-Epicatechin < Phloretin < M1. Der Metabolit M1 zeigte somit den höchsten logBB-Wert und nach dem Modell die höchste Wahrscheinlichkeit der untersuchten Polyphenole, die Blut-Hirnschranke zu überwinden.

Ein direkter Einfluss von Polyphenolen auf konstitutive NO-Synthasen wie die nNOS wurde in A-673 Zellen bislang noch nicht vergleichbar untersucht. Boissel et al. konnten mit der gleichen Zelllinie (A-673) eine Steigerung der Expression der nNOS durch den Einsatz von hohen Konzentrationen von Dibutyryl-cAMP zeigen [334], was in der eigenen Arbeit zum Teil bestätigt werden konnte, allerdings keinen robusten Effekt darstellte. Erstaunlicherweise fanden Boissel et al. auch eine Verringerung des bioaktiven, freigesetzten NO durch die Erhöhung der nNOS-Proteinkonzentration in den Zellen. In einer Arbeit von Braidy et al. mit der Verwendung von primären Neuronen, die aus durch induzierte Aborte erhaltenen Feten isoliert werden konnten, wurde ein neuronales Zellkultur-Modell untersucht, in dem zytotoxische Zustände durch den Einsatz von Chinolinsäure geschaffen und daraufhin der Einfluss unterschiedlicher Polyphenole auf die Zytotoxizität und die damit verbundene NO-Freisetzung evaluiert wurde [335]. Dabei reduzierte z.B. (+)-Catechin im Einklang mit seinen Radikalfänger-Eigenschaften die NO-Freisetzung der Neuronen, welche als Nitrit-Konzentration im Medium bestimmt wurde, um ~50 % bei Einsatz einer Konzentration von 50 µM des Flavonoids. Allerdings wurde dabei die Proteinexpression der nNOS im Verhältnis zur Nitrit-Entstehung nicht untersucht und keine Hinweise gegeben, ob evtl. auch andere NO-Synthasen an der NO-Freisetzung beteiligt waren. Der Begriff „Exzitotoxizität“ wird im Zusammenhang mit der pathologischen N-Methyl-D-Aspartat-vermittelten Überaktivierung der Zellen durch z.B. Chinolinsäure im oben genannten Modell gebraucht, und beschreibt das Phänomen einer glutamergen Hyperstimulation von Neuronen sowie einem darauffolgenden verstärkten intrazellulären Calcium-Einstrom mit der Produktion von schädigenden reaktiven Sauerstoff- und nitrosativen Spezies [336]. Dieser Prozess spielt *in*

vivo bei zerebralen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer eine Rolle und lässt sich möglicherweise durch Polyphenole positiv beeinflussen [337].

Einschränkend muss, was die eigenen Versuche anbelangt, erwähnt werden, dass auch möglicherweise aufgrund der geringen Konzentration der nNOS in den A-673 Zellen keine eindeutigen Effekte von M1 erkannt werden konnten. Allerdings wurde bis dato noch kein alternatives auf nicht-transformierten oder -transfizierten Zelllinien basierendes Zellkulturmodell zur praktikablen Untersuchung der nNOS etabliert. Somit könnten künftig mit einer weiteren Verbesserung der Nachweisgrenze des Detektionssystems, mit der Verwendung von primärem Zellmaterial und einer optionalen Erzeugung von pathophysiologisch relevanten Zellzuständen im Sinne der oben genannten „Exzitotoxizität“ abweichende Ergebnisse zur Beeinflussung der nNOS durch den Metaboliten M1 erhalten werden.

Eine der entscheidenden Frage war nun, wie wahrscheinlich es ist, dass Polyphenole im Gehirn überhaupt ankommen, um dort lokale Effekte auszulösen, oder ob die in epidemiologischen Studien gefundenen Effekte eher indirekten Mechanismen zuzuschreiben waren. Da die lokale zerebrale Bioverfügbarkeit in hohem Maße von den physikochemischen Moleküleigenschaften abhängig ist, wurden sieben polyphenolische Modellsubstanzen ausgewählt (Protocatechusäure, Quercetin, Cyanidin, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Phloretin, Metabolit M1) und deren logBB-Werte mit einem dafür etablierten Computer-basierten Modell zur Beschreibung der Blut-Hirnschranken-Gängigkeit berechnet. Dabei zeigte sich, dass der Metabolit M1 mit der höchsten vorhergesagten Verteilung ins ZNS im Vergleich zu den anderen untersuchten Strukturen die Blut-Hirnschranke überwindet.

Insgesamt waren die logBB-Werte der untersuchten Polyphenole klein und damit die Substanzen eher nicht bis äußerst gering ZNS-gängig, was gut mit den bislang durchgeführten experimentellen Untersuchungen übereinstimmte [316, 318-319], in welchen sehr geringe Konzentrationen von Polyphenolen im Gehirn von Versuchstieren gefunden wurden und zum Teil auch keine polyphenolischen Substanzen im ZNS nach peroraler Gabe nachweisbar waren [317]. Humanstudien etwa mit radioaktiv markierten polyphenolischen Substanzen und einer Positronen-Emissions-tomographischen Auswertung wurden bislang nicht durchgeführt. Was die prädiktiven Zuordnung zu ZNS-gängigen bzw. nicht-ZNS-gängigen Gruppen anbelangt, so gab es vergleichbare Untersuchungen, wenn auch mit anderen *in silico* Klassifizierungsmethoden zur ZNS-Gängigkeit (z.B. Support vector machines oder künstliche neuronale Netze), die ähnliche prädiktive Werte für eine Blut-Hirnschranken-Permeation zeigten (Zuordnung (ZNS-): 0,80; (ZNS+): 0,83 [338]).

Übereinstimmend mit bisherigen Erkenntnissen, dass sich die Anwesenheit von Säurefunktionen mit einem pK_a -Wert $\leq 4-5$ im Molekül im Allgemeinen – abgesehen von möglichen spezifischen membranären Transportsystemen – negativ auf den logBB-Wert auswirkte [332], zeigte die Protocatechusäure in den eigenen Untersuchungen den kleinsten logBB-Wert (-1,18). Dass eine Säurefunktion in Flavonoid-Molekülen zu einem verringerten Blut-Hirnschrankendurchtritt führen kann, wurde von Youdim et al. in Zellkulturexperimenten bestätigt [339]. Im Gegensatz dazu scheinen viele Stickstoff-haltige Substanzen wie z.B. Phenylethylamin-Derivate trotz ihrer Ladung bei physiologischem pH-Wert die Blut-Hirnschranke gut zu überwinden. Neben den Moleküleigenschaften wie Lipophilie, Molekülgröße, Wasserstoff-Brücken-Bindungsvermögen, und der Anzahl der Sauerstoff- und Stickstoffatome scheint auch die sphärische Form der Moleküle eine Rolle bei der Wahrscheinlichkeit eines Übertritts ins ZNS zu spielen, was in zwei *in silico*-Modellen übereinstimmend zuvor beschrieben wurde [327, 340]. In der eigenen Arbeit war die spherische Form (= Globularity) schwach positiv mit den experimentellen logBB-Werten assoziiert. Plausibel und besonders ausgeprägt im eigenen Modell war die Korrelation der Blut-Hirnschrankenpermeation mit den berechneten polaren Oberflächeneigenschaften der Moleküle (TPSA= topological polar surface area), was in vergleichbarer Weise zuvor schon von Kelder et al. als dominierender Parameter für den transzellulären Substanzdurchtritt durch die Blut-Hirnschranke dargelegt wurde [341].

Entsprechend der Möglichkeiten der Darstellung von *in vivo* ablaufenden komplexen Prozessen in Computer-basierten Modellen und in Anbetracht der geflügelten Worte von George Box („Essentially, all models are wrong, but some are useful.“ [342]) hat das hier gezeigte Modell einige Limitierungen, die den allgemein übertragbaren Aussagewert der damit getroffenen Schlussfolgerungen einschränken. Dazu gehört, dass es bis dato noch nicht gelungen ist, die aktiven Influx- und Effluxtransportprozesse an der Blut-Hirnschranke, deren Kontrolle vornehmlich an oder in der Membran lokalisierten dynamischen Proteinkomplexen obliegt, in Computer-Modellen differenziert aufzunehmen und abzubilden. Betroffen davon wäre z.B. Levodopa, das als Aminosäure bekanntermaßen durch aktive Aufnahme ins Gehirn gelangt [343], im Gegensatz zu Carbidopa, das im eigenen Validierungsdatensatz auch enthalten war, und nicht in dem gleichen Ausmaß wie Levodopa aktiv in das Gehirn transportiert wird [344]. Einige der Substanzen mit belegter zerebraler Wirkung bei Epilepsie wie z.B. Phenobarbital, Phenytoin oder Lamotrigin scheinen möglicherweise auch Substrate von p-Glycoprotein-Transportern zu sein [345]. Allerdings ist bei der Verwendung von experimentellen logBB-Werten als Verteilungskonstanten, wie im

eigenen Modell geschehen, grundlegend anzunehmen, dass diese Werte implizit alle möglichen Transportprozesse mit einschließen und beschreiben.

Bei der Einteilung von Datensätzen nach ihrer ZNS-Gängigkeit bedient man sich zum einen eines harten Cut-Offs im Sinne eines \log_{BB} -Grenzwertes z.B. $\log_{BB} = -0,30$, ab welchem man eine ausreichende Aufnahme ins ZNS annimmt. Diese Grenze ist dabei zum Teil als willkürlich anzusehen, da beim Treffen einer relevanten Aussage hinsichtlich *in vivo* Testsubstanzen viele voneinander abhängige Faktoren wie z.B. die pharmakologische Potenz der untersuchten Substanzen und kinetisch oder thermodynamisch kontrollierte Gleichgewichtsveränderungen über die Zeit in der Realität eine Rolle spielen können. Bei einem \log_{BB} -Wert von $-0,30$ lägen im Blut immernoch etwa doppelt so viele Moleküle pro Volumeneinheit vor als im Gehirn. Zum anderen werden die Substanzen in ZNS-gängige (ZNS+) und nicht-ZNS-gängige (ZNS-) Substanzen aufgrund ihrer bekannten Aktivität gegenüber Zielstrukturen, die im Gehirn nachgewiesen wurden, eingeteilt. Dies scheint prädiktiv gut für Substanzen zu funktionieren, die tatsächlich eine augenscheinliche Wirkung im ZNS entfalten – besonders für Psychopharmaka wie z.B. Neuroleptika oder bestimmte aktive Psychodysleptika wie z.B. Lysergsäurederivate. Unsicherheiten entstehen allerdings bei der Zuordnung zu nicht-ZNS-gängigen Gruppen, da für diese Substanzen bislang keine zerebrale Aktivität bzw. eine mögliche Zielstruktur im Gehirn beschrieben wurde, was jedoch keinesfalls induktiv ausschließt, dass diese Substanzen dennoch dazu in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden. Optimalerweise liegen für die Substanzen zusätzliche experimentelle Daten zum Blut-Hirnschrankenübertritt vor. Für mögliche ZNS-/ZNS+-Einteilungen gibt es umfangreiche Datensammlungen wie z.B. die COBRA-Datenbank der Gruppe um Gisbert Schneider, die umfangreiche Informationen als Liganden-basierte Datenbank unter anderem zu Zielstrukturen und Indikationen von Wirkstoffen enthält [346]. Allerdings umfassen die meisten Datensätze für experimentell bestimmte \log_{BB} -Werte derzeit weniger als ~ 150 Strukturen [347], was nach wie vor vermutlich keine repräsentative Stichprobe des „Chemical Space“ [10] darstellt. Hinzu kommt die häufige implizite Annahme der Homogenität der verwendeten \log_{BB} -Werte, wobei die experimentellen Bedingungen und methodischen Vorgehensweisen der Bestimmung der Werte zum Teil deutliche Unterschiede aufweisen können. Häufig, wie auch der Fall bei den eigenen Daten, stammten die \log_{BB} -Werte hauptsächlich aus Tierversuchen mit Nagern, wo sowohl die Substanzkonzentration in Blut-Proben als auch die Konzentration in Gehirn-Homogenisaten analysiert wurde [341].

Die Standardabweichung der Vorhersage des eigenen Modells belief sich auf $\pm 0,47$ \log -Einheiten, was in guter Übereinstimmung mit bisher publizierten Computer-basierten

Modellen war [347]. Dies erscheint einerseits was das Intervall der vorhergesagten logBB-Werte (-1,77-1,03) anbelangt relativ hoch zu sein, andererseits liegen die Standardabweichungen der experimentell erhaltenen Verteilungsdaten häufig ebenso in logBB-Werte-Bereichen von $\pm 0,3$ log-Einheiten, so dass sich diese Streuung der experimentellen Daten offensichtlich auch in den Computer-basierten Modellen widerspiegelte.

Mögliche nächste Schritte wären nun *in vitro* Test-Systeme z.B. in Gestalt von Zellkulturexperimenten einzusetzen, um die hier berechneten Vorhersagen für die oben genannten Polyphenole experimentell zu verifizieren. Zusätzlich sollte nach Möglichkeiten gesucht werden, bisher ungelöste dynamische Probleme der *in silico*-Modellierung wie aktive Influx- und Efflux-Transportvorgänge an membranären Grenzflächen wie der Blut-Hirnschranke besser zu beschreiben. Besonders auch die Erkennung, Beschreibung und Vorhersage der Substratspezifität von Effluxproteinen wie z.B. p-Glycoproteinen an der Blut-Hirnschranke scheinen essentiell. Dabei können auch moleküldynamische Simulationen, die eine strukturelle Überlappung und Vergleich mit bekannten Substraten von bestimmten Transportern berechnen, hilfreich sein, wie von Kurlbaum für M1 bereits in Ansätzen durchgeführt [27]. Da M1 nach Hydrolyse Strukturmerkmale der γ -Hydroxybuttersäure aufweist, die über einen Monocarboxylat-Transporter aktiv ins Gehirn aufgenommen wird [348], wäre ein Vergleich naheliegend.

Inwieweit in der systemischen Zirkulation erscheinende Polyphenole oder deren im Kolon durch metabolisierende Darmbakterien entstandene Metabolite diese aktiven Transportmechanismen in Form einer Wechselwirkung mit z.B. Glucose-Transportern an der Blut-Hirnschranke beeinflussen können, ist bislang unzureichend aufgeklärt [349]. Dabei fehlt häufig noch systembiologisches Verständnis der zugrunde liegenden Abläufe und Mechanismen sowie ihrer zeitlichen und räumlichen Auflösung. Ein selektives Drug-Targeting im Sinne von Ehrlich's „Magic Bullet“ im Gehirn etwa über den Weg viraler Mustererkennungstrukturen scheint somit noch fern [350].

4 Einfluss eines Noni-Extraktes auf die MMP-9 Sekretion aus humanen, primären Monozyten

4.1 Die medizinische Anwendung der Noni-Pflanze

Die Pflanze *Morinda citrifolia* L. (Noni) kommt ausschließlich in tropischen Klimazonen vor und wird bis zu sechs Meter hoch. Deren kartoffelförmige, faulig nach Käse riechende Frucht erreicht eine Größe von bis zu zwölf Zentimetern. Aus dieser werden verschiedene flüssige und halb feste Zubereitungen wie Noni-Saft, -Püree und -Konzentrat gewonnen, die seit den frühen neunziger Jahren [351] auf dem internationalen Markt (vor allem durch die Firma Tahitian Noni® International Inc., Provo, Utah, USA durch Netzwerk- oder Multilevel-Marketing vertrieben) kommerzialisiert erhältlich sind. Durch die weite Verbreitung der Pflanze – historisch vermutlich durch seefahrende polynesischen Völker bedingt – im indopazifischen Raum, auch in Indien, Australien und auf Hawaii, sind traditionelle medizinische Anwendungen vor allem im Bereich von lokalen Applikationen bei Entzündungen oder innerlich bei Diarrhoe über eine lange Zeit tradiert worden [352]. Aus phytochemischer Sicht fällt zunächst auf, dass in frischem Noni-Saft – für Fruchtsäfte allerdings nicht ganz untypisch – der Kalium-Gehalt mit 2,20 g/L [353] bzw. 2,25 g/L [354] relativ hoch im Vergleich zu anderen Lebensmitteln sein kann (z.B. Apfelsaft 1,09-1,25 g/L [355]). In unterschiedlichen Mengen vorkommende Gruppen von Stoffen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze in der Frucht beinhalten hauptsächlich Fettsäureglykoside, Iridoide, Lignane und ein großes Spektrum der 1-Hydroxyanthrachinone, allerdings in eher geringen Konzentrationen [351]. Exakte Daten zum quantitativen Gehalt einzelner Substanzen bzw. Monomere im Noni-Saft sind bis heute nicht oder nur spärlich bekannt. Bedauerlicherweise sind bislang auch keine validen Standardisierungs- oder Qualitätskontrollverfahren publiziert, so dass mit – sowohl was die authentische kontrollierte Herkunft als auch die einzelnen Inhaltsstoffe in fertigen Produkten auf dem Markt anbelangt – großer Heterogenität und Qualitätsunterschieden gerechnet werden muss [356].

Da es immer wieder Fälle gab, in denen das Marketing der seriösen Wissenschaft vorseilte und irreführende Werbeaussagen zu medizinischer und gesundheitsfördernder Wirkung in Zusammenhang mit Noni-Produkten gemacht wurden [357], wird im Folgenden eine kurze auch juristische Einordnung und Abgrenzung derartiger Produkte vorgenommen: Am 21. April 2010 hat die Europäische Kommission die Zulassung für Noni-Püree und Noni-Konzentrat nach der Verordnung (EG) Nr. 258/97 als „neuartige Lebensmittel“ bzw. „Lebensmittelzutaten“ erlassen [358]. Noni-Saft ist seit 2003 als „neuartiges Lebensmittel“ in

der Europäischen Union zugelassen [359]. Da in der Bundesrepublik Deutschland das Heilmittelwerbegesetz, was gemeinhin Werbeaussagen zur medizinischen Wirksamkeit anbelangt, im Speziellen nur für Arzneimittel, Medizinprodukte und andere Mittel, vor allem kosmetischer Natur, den rechtlichen Rahmen bildet, greift bei der Einordnung von Produkten und Aussagen über die krankheitsbezogenen Effekte der Noni-Frucht als Lebensmittel europaweit derzeit hauptsächlich die Verordnung (EG) Nr. 1924/06 („Health Claims“) [360], deren Anforderungen von der Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA = European Food Safety Authority) festgelegt werden. In Deutschland wiederum sind nach § 12 Lebensmittelgesetzbuch krankheitsbezogene Angaben beim Verkehr mit Lebensmitteln, bei Werbung für Lebensmittel allgemein oder im Einzelfall generell verboten, so dass auch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht dazu verwendet werden dürfen, die in klinischen Studien, wie im Folgenden erläutert, bisher ungenügend bestätigten positiven Effekte von Zubereitungen der Noni-Pflanze hinsichtlich medizinischer Anwendungen zu verallgemeinern oder eine Einnahme unkritisch zu legitimieren.

4.2 Klinische Studien mit Noni-Produkten

Die konkreten, teilweise noch nicht publizierten Daten aus den wenigen, im hier dargestellten Kontext relevanten, klinischen Interventions-Studien mit Noni-Produkten, die öffentlich einsehbar bei der von der NIH (U.S. National Institutes of Health) geführten Webseite <http://clinicaltrials.gov/> registriert wurden, und zu deren bekräftigenden Unterstützung *in vitro* Daten beitragen könnten, umfassen zunächst eine Phase I Studie, die offiziell im Juni 2006 beendet wurde (ClinicalTrials.gov.Identifier: NCT00033878) und deren Veröffentlichung noch aussteht. Diese Studie befasste sich bei einer Krebspatienten-Kohorte vor allem mit der Generierung von Daten zur maximal tolerierten Dosis bei der Einnahme von 500 mg Kapseln eines Noni-Extraktes, zur Toxikologie nach Einnahme, zur Sammlung von ersten Informationen über die eventuell vorhandenen Anti-Tumoraktivität und Symptomkontrolle, und zur Identifizierung von Extraktbestandteilen, die zur pharmakokinetischen Charakterisierung von neuartigen Lebensmitteln aus Bestandteilen der Noni-Pflanze dienen können. Eine andere nicht in der Datenbank der NIH registrierte Humanstudie der gleichen Arbeitsgruppe wurde dann 2008 publiziert [361], in welcher initiale pharmakokinetische Parameter eines geeigneten Markers (Scopoletin) für die Noni-Einnahme im Blut und Urin in einem gesunden freiwilligen Probandenkollektiv (n = 9) bestimmt werden sollten. Eine weitere registrierte Studie, die offiziell im Februar 2007 beendet (ClinicalTrials.gov.Identifier: NCT01070264) und als open-label, drei-monatige Interventions-Pilotstudie geführt wurde,

war auf die Beantwortung der Frage ausgelegt, ob der Konsum von Tahitian Noni® Saft eine sichere zusätzliche Behandlungsalternative zur Verbesserung der Symptome und der Lebensqualität bei einem an Osteoarthritis (OA) erkrankten Patientenkollektiv darstellte. Die Ergebnisse dieser Studie sind 2011 publiziert worden [362] und werden zusammen mit den oben erwähnten Studien und einer weiteren nicht registrierten Studie einer Arbeitsgruppe aus Nigeria aus dem Jahr 2006, die den Einfluss von Noni-Saft als Zusatztherapie zu physiotherapeutischen Maßnahmen bei Spondylose der Halswirbelsäule untersuchte [363], im Abschnitt (4.7 Diskussion) im Kontext mit den eigenen Ergebnissen genauer beleuchtet. Beim europäischen Portal-Pendant des Registers für klinische Studien <https://www.clinicaltrialsregister.eu/> der EMA (European Medicine Agency), das seit März 2011 online öffentlich einsehbar ist – allerdings mit Beschränkung auf alle pädiatrischen Studien und Phase II-IV Studien mit Erwachsenen – sind bis dato keine Studien mit Noni-Produkten angeführt.

4.3 Arthropathien, MMP-9 und Pflanzenextrakte

Es gibt durchaus Schnittmengen bei der Einteilung und Abgrenzung von Arthropathien mit Bezug auf die Leitlinien des American College of Rheumatology (ACR): ausgehend von den Begrifflichkeiten Osteoarthritis (OA = im Allgemeinen eine von degenerativen Prozessen des Gelenkknorpels (Osteochondrose) verursachter lokaler, schmerzhafter, entzündlicher Prozess vor allem in Hüft- und Kniegelenken, ohne serologische Auffälligkeiten [364-365]) und rheumatoider Arthritis (RA = entzündliche, schmerzhafte Allgemeinerkrankung mesenchymalen Gewebes, häufige Manifestation als Synovialitis, besonders in stammfernen Gelenken, mit serologischen Auffälligkeiten [366]), sollen im Weiteren hauptsächlich diese beiden Formen genannt und differenziert werden. Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind an der Ätiologie beider Arthritiden beteiligt.

Bei OA, jedoch auch bei anderen entzündlichen Erkrankungen mit teilweise autoimmunologischem Hintergrund wie RA, systemische Sklerose, oder Polymyositis, scheint neben den Matrixmetalloproteasen MMP-1 und MMP-3 (Stromelysin-1) [367], insbesondere MMP-9 eine bedeutenden Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen zu spielen [368]. Das nach seinem in der extrazellulären Matrix bevorzugten Substrat Gelatine benannten, aus eben der Unterfamilie „Gelatinasen“ der Matrixmetalloproteinasen stammende Enzym mit Zink im aktiven Zentrum der katalytischen Kaskade zur Proteolyse (Zinkproteasen), wird von unterschiedlichen Zelltypen wie Keratinozyten, Monozyten, Gewebemakrophagen und von maligne entarteten Zellen produziert und sezerniert. Dabei

wird MMP-9 vor allem als Zymogen (Proenzym) durch Induktion der Transkription durch Cytokine oder durch direkte zelluläre Interaktion freigesetzt, und kann wiederum seinerseits im Extrazellulärraum proteolytisch aktiviert werden. Dadurch kann die katalytische Tasche bzw. Substratbindungsstelle mit Zink im aktiven Zentrum für ein hydrolytisch wirksames Wassermolekül geöffnet werden und in proteolytische Aktion treten [369]. Der dynamische Umbau der extrazellulären Matrix sowie Spaltung und Abbau von denaturierten Kollagenfasern, die unter anderem Hauptbestandteil der Basalmembranen sind, zielen zunächst darauf ab, es Zellen, vornehmlich Leukozyten, bei entsprechendem Stimulus zu ermöglichen, die Blut- und Lymphzirkulation zu verlassen und ins Gewebe einzuwandern. Um die empfindliche Balance zwischen nötiger Auflösung der integrativen, membranären Strukturen zur Zelleinwanderung oder zum Umbau, und der potentiellen strukturell schädigenden Wirkung und pathologischen Freisetzung von neuen Epitopen, die autoimmunologische Prozesse in Gang setzen können, zu regulieren, werden zusätzlich zusammen mit den Proenzymen – ähnlich der feinen Regulation der Gerinnungskaskade – spezifische Inhibitoren (z.B. tissue inhibitor of metalloproteinase 1 = TIMP-1) sekretiert.

Offensichtlich sind die Verhältnisse freigesetzte Protease/Inhibitoren und Aktivität/Inhibition bei bestimmten Erkrankungen wie der OA oder RA durch pathologische Zustände gestört und das homöostatische System befindet sich in einem Phasenübergang weg von der physiologischen Regulation. Dies führt zur dauerhaften proteolytischen Schädigung von Gewebe- und Gelenkstrukturen durch verstärkte Aktivität und Produktion von MMP-9, die dann wiederum in einem *circulus vitiosus* neue inflammatorische Stimuli generiert und weitere Immunzellen anlockt.

In die Lücke des Mangels an konservativen bzw. medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten der Symptome und Progression der OA stoßen immer häufiger [370] – mehr oder weniger evidenzbasiert [371-372] – Produkte der komplementär- und alternativmedizinischen Stoffe bzw. Nahrungsergänzungsmittel, somit auch (noch) nicht als Arzneimittel zugelassene Pflanzenextrakte, die ebenso bei RA, trotz der Anwendung von häufig mit Nebenwirkungen behafteten *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) und modernen teuren Biologicals wie monoklonale Antikörper, manchmal als nebenwirkungsarme Alternativen erfolgreich eingesetzt werden können [373].

4.4 Fragestellung: Effekte des Noni-Extraktes auf monozytäre MMP-9 Sekretion

Im Zuge einer Studie der Gruppe um Prof. Westendorf, Hamburg, die sich vor allem mit analgetischen Effekten des Extraktes der Noni-Frucht im Tier-Modell beschäftigte [374], bot sich die Möglichkeit bisher unbekannte und neue Daten zur anti-inflammatorischen Wirkung des Extraktes anhand eines Zellkultur-Modells mit frisch isolierten, primären humanen Monozyten im Kontext der Arthropathien zu gewinnen, indem frischer Noni-Frucht-Extrakt als Versuchsmaterial im Monozyten-Modell, wie zuvor von Grimm dargestellt [23], eingesetzt werden konnte. Die hier verwendeten primären Immunzellen und deren weiter differenzierte Folgezellen sind an der Produktion von MMP-9 bei Arthritis maßgeblich beteiligt [375] sowie natürlicherweise immortalisierten Zelllinien in Bezug auf physiologische Relevanz und Übertragbarkeit auf einen *in vivo* Kontext überlegen.

Die Noni-Frucht findet traditionell im südpazifischen Raum als Heilmittel bevorzugt gegen entzündliche Erkrankungen wie Arthritis Verwendung, jedoch sind dazu als Erklärungsgrundlage lediglich vor allem klassische *in vitro* Daten von Experimenten (teilweise nur in Konferenzbeiträgen und -abstracts publiziert) zur Inhibierung der bei an isolierten, entzündungs- und schmerzassoziierten Enzymen ausgeführten Untersuchungen am häufigsten betrachteten 5-Lipoxygenase (LOX-5) [376] sowie der Cyclooxygenasen (COX-1 und -2) [377-378] in Verbindung mit dem Krankheitsbild der Arthropathien vorhanden. Deshalb war es interessant zu untersuchen, ob derartige Wirkungen auch zum einen in einem primären, komplexeren Zellkultur-Modell näher an der *in vivo* Situation abgebildet werden können, und zum anderen welche Wirkung auf die Produktion des bei der OA/RA potentiell gewebsschädigenden Enzyms MMP-9 zu erkennen ist.

Um somit einen neuen Baustein zur Verkleinerung der Lücke zwischen klassischen *in vitro* und spärlichen vorhandenen *in vivo* Daten zur Wirkung der Noni-Frucht beizutragen, ging es also dabei zunächst um die Frage, ob der Gesamtextrakt in primären, frisch isolierten Monozyten einen Einfluß auf die MMP-9 Produktion der Zellen nach einem Entzündungsreiz hat.

4.5 Prinzipien der Bestimmung und Methodik

Aus zwei frischen, gepoolten Blutprodukten isolierte Monozyten – wie in 8.3 Experimenteller Teil genauer beschrieben – wurden mit verschiedenen Verdünnungen des Noni-Extraktes (1:100, 1:200, 1:500) in Zellkulturmedium vorinkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen dann

über 24 h einem Entzündungsreiz durch Hinzufügen von Lipopolysaccharid (LPS) ausgesetzt. Danach wurde die MMP-9 Konzentration im Überstand mittels eines sensitiven Sandwich-ELISA-Systems bestimmt. Als Positiv-Kontrolle zur Hemmung bei inflammatorischem Stimulus wurde Hydrocortison verwendet. Für jede Extrakt-Verdünnung wurde jeweils eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) angesetzt.

4.6 Ergebnisse

Normalisiert auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz ergaben sich absolute Werte [$10^6 \cdot \text{ng/mL MMP-9} \cdot (1 \cdot 10^6 \text{ Zellen})^{-1}$] mit einer mittleren Abweichung vom Mittelwert aus jeweils drei Ansätzen ($n = 3$) bei maximaler Sekretion (100 % Wert) von $6,09 \pm 0,25 \text{ ng/mL MMP-9}$ im Zellkulturüberstand. Die Behandlung mit $10^{-5} \text{ M Hydrocortison}$ führte zu einer Reduktion der MMP-9 Sekretion über die Zeit auf $3,98 \pm 0,12 \text{ ng/mL}$. Im Vergleich dazu verringerte der Einsatz einer 1:500 Verdünnung des Noni-Extraktes in Medium die MMP-9 Sekretion auf $4,36 \pm 0,41 \text{ ng/mL}$. Bei der assoziierten DMSO-Kontrolle (Kontrolle 1:500) wurde ein Wert von $6,20 \pm 0,33 \text{ ng/mL}$ gemessen. In Bezug darauf verhielt sich die Verdünnung 1:200 mit $3,01 \pm 0,28 \text{ ng/mL}$ erwartungsgemäß als stärker hemmend. Die Messwerte der Kontrolle lagen hier bei $5,94 \pm 0,16 \text{ ng/mL}$ (Kontrolle 1:200). Die 1:100 Verdünnung lieferte Werte von $2,72 \pm 0,05$ für die Behandlung, im Gegensatz zu $4,83 \pm 0,15 \text{ ng/mL}$ für die assoziierte DMSO-Kontrolle (Kontrolle 1:100). Bei relativem Bezug der Messwerte auf die jeweiligen Kontrollen wurden folgende prozentuale Werte der verbleibenden MMP-9 Sekretion durch Verdünnungen des Extraktes erhalten: (1:100) $56,31 \pm 1,03 \%$, (1:200) $50,75 \pm 4,66 \%$, (1:500) $70,38 \pm 6,69 \%$, (HC) $65,35 \pm 2,02 \%$ jeweils als Mittelwert aus $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert (Abb. 4.1).

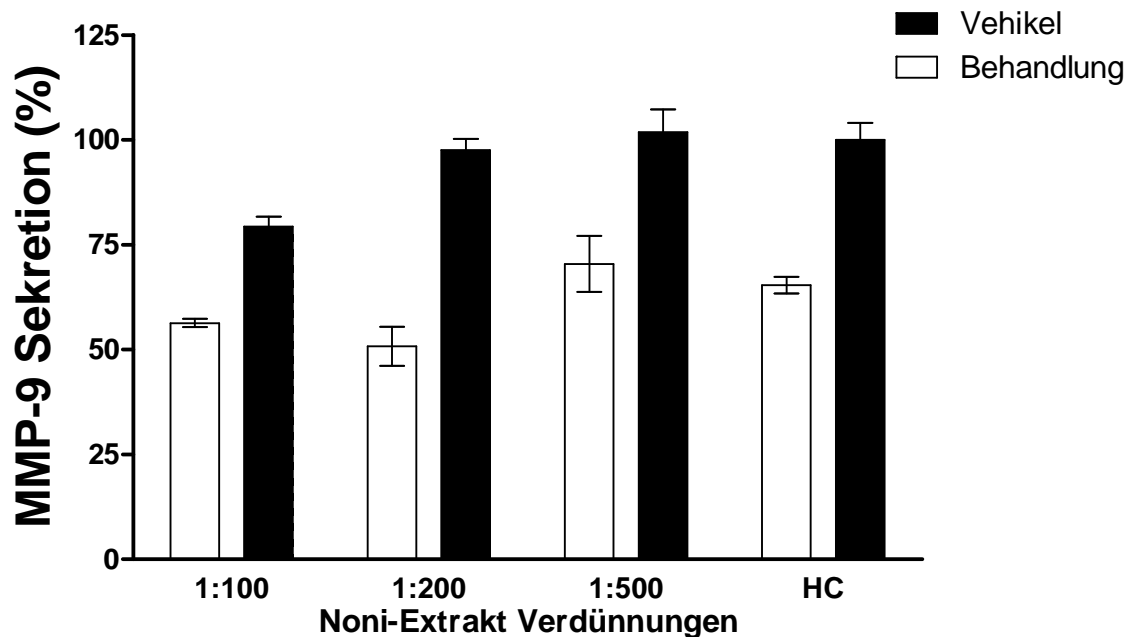


Abb. 4.1: Inhibierung der MMP-9 Sekretion aus frisch isolierten, humanen Monozyten durch Noni-Extrakt Verdünnungen (1:100, 1:200, 1:500). Die Zellen wurden 1 h mit Noni-Extrakt verdünnt oder mit 10^{-5} M Hydrocortison (HC; Positivkontrolle) in Medium vorbehandelt. Dann wurden die Zellen mit 10 ng/mL LPS für 24 h stimuliert und die MMP-9 Konzentration im Überstand gemessen. Die schwarzen Säulen repräsentieren % der Vehikel-Kontrollen in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (maximale Stimulation 100 %), die weißen Säulen stellen % der assoziierten Vehikel-Kontrollen dar. Gezeigt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm mittlere Abweichung vom Mittelwert. Wiedergabe [374] mit Genehmigung von John Wiley & Sons.

4.7 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass Verdünnungen eines Noni-Extraktes eine profunde Hemmwirkung auf die Freisetzung von MMP-9 nach einem Entzündungsreiz aus primären Monozyten haben können, die vergleichbar mit oder sogar stärker als die Hemmung durch Hydrocortison ist. Die Bedeutung und Relevanz dieser Ergebnisse soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Stimulation der frisch isolierten Monozyten mit LPS über 24 h führte in den Experimenten zu vergleichbaren absoluten Konzentrationen von MMP-9 im Zellkulturüberstand – was den 100 %-Wert über die Zeit anbelangt – wie in früheren Arbeiten mit gleichem Aufbau des Experiments bereits untersucht (6,09 ng/mL MMP-9 in der vorliegende Arbeit versus 7,17 ng/mL MMP-9 in der Arbeit von Grimm [379]). Die Behandlung mit Hydrocortison resultierte in einer Hemmung der MMP-9 Freisetzung auf

65,4 % der maximalen Stimulation. Ein vergleichbarer Effekt kann auch *in vivo* bei Applikation von Hydrocortison intravenös (100 mg i.v.) und Messung der MMP-9 Konzentration im Plasma nach einer bzw. zwei Stunden bei gesunden Probanden (Erniedrigung der Konzentration auf 86,8 % bzw. 79,1 % des Basalwertes [380]) beobachtet werden.

Da bei Patienten mit chronischen Entzündungen wie etwa OA oder RA bekanntermaßen die MMP-9 Konzentration, deren Hauptquelle häufig Monozyten oder Makrophagen sind, im Serum, aber auch speziell in Knochen- und Knorpelgewebe bzw. in der Synovialflüssigkeit erhöht sein kann [381], sehen die Ergebnisse dieses Experiments auf den ersten Blick mit einer deutlichen Hemmung der MMP-9 Sekretion auf 50,8 % (1:200 Noni-Extrakt Verdünnung) vielversprechend für eine Anwendung der Noni-Frucht bei diesen Krankheitsbildern aus. Diese Aussage steht im Einklang mit der Arbeit von Basar et al. [374], in der mit einem aus den gleichen Früchten, aus welchem auch der in der eigenen Arbeit verwendete Extrakt hergestellt wurde, gewonnenen gefriergetrockneten Konzentrat deutliche analgetische Effekte im Hot-Plate-Test [382] bei Mäusen gefunden wurden. Dabei war, was die Verzögerungszeit der Reaktion der Mäuse auf der heißen Platte anbelangt, eine 1:10 Verdünnung des Noni-Frucht-Konzentrates im Trinkwasser der Mäuse für vier Tage vor dem Experiment vergleichbar mit eine Stunde vor dem Test subcutan injiziertem Tramadol oder Metamizol. Die schmerzhemmenden Effekte von Noni waren durch die zusätzliche vorherige Gabe von Naloxon eine Stunde vor dem Experiment teilweise antagonisierbar.

Übereinstimmend mit der Hemmung der MMP-9 Freisetzung aus Monozyten und der potentiellen Wirkung der Noni-Frucht auf Symptome und Pathophysiologie der OA steht eine kürzlich erschienene Arbeit [378], die *in vitro* antiinflammatorische Effekte mit einer Hemmung der PGE₂-Freisetzung aus mit LPS/IFN- γ stimulierten murinen Makrophagen durch Noni darstellt. Zudem wurden in der gleichen Arbeit von Dussossoy et al. an isolierten Enzymen moderate Hemmeffekte von Noni-Extrakt sowohl auf COX-1 als auch COX-2 gefunden (Verringerung der COX-1 Aktivität um 32,7 % und der COX-2 Aktivität um 23,1 % durch 1,5 mg Noni-Extrakt/mL). Im Tiermodell (Wistar Ratten) mit einer durch die Injektion von Carrageen in die Pfote der Tiere induzierten Entzündung zeigte sowohl die per os (37 mg/kg) als auch die intraperitoneale Applikation des Extraktes (7,4-37 mg/kg) einen mäßigen Hemmeffekt (Inhibierung um 19-32 %) auf die Ausbildung des entzündlichen Ödems. Die Autoren erklären die von ihnen gezeigten Effekte vor allem mit dem Gehalt an Flavonoiden in der Noni-Frucht, besonders Rutin (4,63 mg/100 g Gewicht der frischen Früchte (FW= fresh weight)), Quercetin (0,29 mg/100 g FW) und Scopoletin (1,32 mg/100 g FW). Relativ dazu enthalten manche Zwiebeln bereits bis zu 55,8 mg/100 g FW freies

Quercetin [383]. Der Rutingehalt erscheint eher mäßig hoch zu sein im Vergleich zu Apfelschale (67,1 mg/100 g FW) [384] oder etwa zu Buchweizen-Blättern (4904 mg/100 g FW) [385], wobei hier ein direkter Vergleich aufgrund der gänzlich unterschiedlichen Zubereitungs-, Extraktions- und Herstellungsverfahren nicht immer zwingend sinnvoll sein mag. Was Scopoletin anbelangt, so konnte in einer Mastzelllinie gezeigt werden, dass dieses Coumarin-Derivat in höheren Konzentrationen in der Lage ist, hemmend in die NF- κ B-Kaskade einzugreifen [386], außerdem konnte am isolierten Enzym eine 15-LOX Hemmung festgestellt werden [376].

Den Umbau von Gewebe- bzw. Gefäßstrukturen betreffend hat sich gezeigt, dass Noni-Saft in einer 1:10-1:20 Verdünnung in der Lage ist, die Neovaskularisierung in Angiogenese-Modellen zu inhibieren [387], was durchaus mit der Hemmung der an diesen Umbauarbeiten intensiv beteiligten MMP-9 in Verbindung gebracht werden kann [388]. Weitere Hinweise, dass bestimmte Noni-Komponenten nicht nur zu einer Hemmung des Abbaus durch MMPs, sondern zu einem aktiven Aufbau von extrazellulärer Matrix durch humane Fibroblasten *in vitro* führen könnten, liefert eine Arbeit von Kim et. al [389]. Dabei führte die Anwendung von Noni-Extrakt und einem daraus isolierten Anthrachinon (beide 50 μ g/mL) in diesem Modell zu einer Steigerung der Synthese von Glykosaminglykanen und Prokollagen sowie zu einer Hemmung der Bildung von MMP-1 mRNA.

Einschränkende Faktoren zur Vergleichbarkeit der bisher publizierten Daten in Verbindung mit Noni sind die in den verschiedenen Studien gänzlich unterschiedliche Extrakterstellung aus Früchten unterschiedlicher Herkunft und Qualität sowie die oben bereits erwähnte fehlende Standardisierung auf bestimmte Inhaltsstoffe des Extraktes. Insofern können, trotz unverkennbar deutlichen Hinweisen auf potentielle Wirkung der Noni-Frucht bei OA, schwerlich konkretere Aussagen über eine Vergleichbarkeit der hier ermittelten und in der Literatur bislang beschriebenen Ergebnisse getroffen werden. Ansätze zur Standardisierung der Noni-Erzeugnisse [390] z.B. auf Scopoletin, eine relativ spezifische Fettsäure ((2E,4Z,7Z)-Decatrienoic acid (DTA)) und Kalium sind vorhanden [354], allerdings wurden in verschiedenen Zubereitungen diese Marker zum Teil nicht gefunden, und es scheint eine große Heterogenität des Gehalts dieser Verbindungen in kommerziellen Noni-Produkten vorhanden zu sein [391]. Die Identifizierung der wirksamen Komponenten des Extraktes mitsamt einer validen Extraktstandardisierung sollte Gegenstand zukünftiger Bemühungen sein.

Es muss beständig bedacht werden, dass die Situation in der Zellkultur nur orientierende Hinweise hinsichtlich eines potentiellen *in vivo* Effekts bzw. Nutzens geben kann, und das Ausmaß der möglichen Wirkung muss durch qualitativ hochwertige klinische

Interventionsstudien am Menschen verifiziert werden. Bisher wurde nur eine Humanstudie publiziert, die den Nutzen von Noni-Zubereitungen direkt bei OA untersuchte [362]. In dieser Studie, als open-label explorative Pilot-Interventionsstudie deklariert – also weder verblindet noch randomisiert noch (placebo)-kontrolliert – nahmen die Patienten (n = 101) über eine Dauer von zwölf Wochen täglich 85 g Noni-Saft ein. Zur Erfassung weicher Endpunkte wurden am Anfang und am Ende der Studie Fragebögen jeweils zur Quality of Life (QoL) und zum subjektiven Schmerzempfinden ausgefüllt, klinisch-chemische Standardparameter aus Blutproben wurden zur Erfassung der Sicherheit der Intervention gewonnen. Eine andere nicht verblindete, nicht (placebo)-kontrollierte Interventionsstudie von Akinobo et al. [363] untersuchte bei neunzig Patienten (n = 90) mit Spondylose der Halswirbelsäule das subjektive Schmerzempfinden und als weiteren Endpunkt die Beweglichkeit des Halses nach Einnahme von Noni-Saft (30 mL pro Tag) für vier Wochen als Zusatztherapie zu physiotherapeutischen Maßnahmen. Zusammenfassend lassen sich aus diesen beiden Studien – trotz dort zum Teil dargestellten positiven Trends – bislang aufgrund des Studiendesigns und der Methodik nur Hinweise schwacher Evidenz in Verbindung mit den hier gezeigten Ergebnissen aus dem Zellkultur-Assay für eine potentiell sinnvolle Anwendung von Extrakten aus Noni-Früchten bei OA ableiten. Eine jeweils eingehendere kritische Diskussion zur Verwendung von Fragebögen bei klinischen Studien findet sich in [392-393], zur Messung der QoL in [394], zu publication bias [395] auch bei Nahrungsergänzungsmitteln bzw. Pflanzenextrakten in [396], sowie zu klinischen Studien speziell bei OA und RA in [397].

Eine Einschränkung, die die Aussage der hemmenden Effekte von Noni-Extrakt auf die Freisetzung von MMP-9 aus Monozyten limitiert, stellt das Problem der Zytotoxizität dar. Obgleich die Anwendung von Zubereitungen der Noni-Frucht als relativ sicher gilt [361-363], und obwohl in umfassenden toxikologischen Untersuchungen von Westendorf et.al [398] keine geno- oder hepatotoxisch bedenklichen Daten zu Tage traten, gibt es dennoch Unwägbarkeiten, was sowohl die in der Zellkultur beobachteten Effekte als auch klinisch die potentielle Hepatotoxizität von Noni-Zubereitungen betrifft [399]. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von primären humanen Monozyten wurde in der vorliegenden Arbeit keine sich über den eingesetzten Konzentrationsbereich des Extraktes erstreckende zytotoxische Analyse durchgeführt. Einschränkend muss hier auch die Möglichkeit der direkten Wechselwirkung von LPS mit Flavonoiden erwähnt werden [400-401], so dass eine direkte molekulare Interaktion und Bindung mit etwaiger Inaktivierung von LPS bereits vorgelagert vor dem eigentlichen Entzündungs-Signalweg in der Zelle stattfände. Ebenso wurden die Effekte auf die MMP-9 Sekretion erst beim Einsatz relativ hoher Konzentrationen des Noni-

Extraktes beobachtet, was auch in Zellkulturexperimenten anderer Arbeiten mit Noni zuvor beschrieben wurde [378] und die Aussagekraft den Vergleich mit *in vivo* Gegebenheiten betreffend begrenzt.

Besonders interessant erscheint auch die in Zellkultur bei murinen Makrophagen kürzlich beschriebene Hemmung der NO-Freisetzung durch Noni-Extrakt [378], denn es ist bekannt, dass die Freisetzung von NO bei Matrixmetalloproteasen durch S-Nitrosylierung zur Aktivierung beitragen sowie zur Steigerung der Expression dieser Enzyme führen kann [402-403]. Dies könnte einer der entscheidenden Zusammenhänge in der Regulation von MMP-9 besonders im Knorpelgewebe vor allem bei speziellen (auto)-immunologischen Erkrankungen des Formenkreises der Arthropathien sein [404-405], da eine vermehrte NO-Freisetzung auch direkt zur Hypertrophie und Apoptose von Chondrozyten und zur Hemmung des Aufbaus von Knorpelsubstanz führen kann [406-407].

Resümierend kann festgestellt werden, dass die hier gezeigte Hemmung der Freisetzung von MMP-9 aus primären Monozyten durch einen Noni-Extrakt positive Hinweise für einen möglichen, sinnvollen Einsatz von Zubereitungen der Noni-Pflanze im Bereich der Arthropathien liefert. Allerdings muss in weiteren, größer und langfristiger angelegten Versuchsreihen im Bereich klinische Studien, Zytotoxizität, und konkreten Wirkmechanismen von identifizierten aktiven Komponenten in standardisierten Zubereitungen gezeigt werden, ob tatsächlich ein belegbarer Nutzen bei OA- oder RA-Patienten *in vivo* durch Noni erreicht werden kann.

C Material und Methoden

1 Häufig verwendete Reagenzien, Geräte und Puffer

1.1 Reagenzien

- Kiefernrintenextrakt Pycnogenol® [408] von Horphag Research, Genf, Schweiz, sprühgetrocknet, aufgetrennt durch spezielle Größenausschlusschromatographie mit Elutionsmittel Ethanol (96 %) auf Sephadex®LH-20 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) als Säulenmaterial in vier Fraktionen [20]:
 - Fraktion I: Phenolcarbonsäuren wie Ferula- und Kaffeesäure, glykosidisch gebunden oder frei, sowie monomere Flavonoide wie (+)-Catechin und (±)-Taxifolin
 - Fraktion II: dimere und trimere Procyanidine
 - Fraktion III: tetramere bis hexamere Procyanidine
 - Fraktion IV: höher oligomere Procyanidine
- Bovines Serum Albumin (BSA, H Type I), Gerbu Biochemicals, Gaiberg
- Dimethylsulfoxid, Carl Roth, Karlsruhe
- Tween 20, Carl Roth
- 30%ige Acrylamid-Lösung (Rotiphorese®), Carl Roth
- Monomere Flavonoide aus dem Kiefernrintenextrakt als Reinsubstanzen, alle Puffersalze und Chemikalien für häufig verwendete Lösungen stammten, wenn nicht explizit anders erwähnt, von Sigma-Aldrich, Taufkirchen.
- Der Metabolit M1(5-(3,4-dihydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3H)-one) wurde im Arbeitskreis von Frau Prof. Schirmeister von Herrn Matthias Rappold synthetisiert [409].
- Alle Lösungsmittel waren mindestens vom Merkmal *analytical grade* oder von besserer Qualität. Für die HPLC-Untersuchungen entsprach die Qualität immer mindestens dem Merkmal *gradient grade*. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Lösungsmittel von VWR, Darmstadt, bezogen.

1.2 Stammlösungen

Wenn nicht explizit anders erwähnt, wurden die Stammlösungen der meisten Substanzen aufgrund ihrer besseren Löslichkeit und Stabilität in DMSO konzentriert angesetzt, danach entweder bei 4 °C gelagert oder bei -20 °C in Übereinstimmung mit der Robustheit der Substanzen in Lösung eingefroren. Diese Lösungen wurden dann entsprechend den Anforderungen und Fragestellungen der einzelnen Versuche verdünnt und verwandt.

1.3 Geräte

- Vortex, Modell K-550-GE, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
- Zentrifuge, Kendro Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
- Zentrifuge, Microfuge 22 R, Beckmann Coulter, Krefeld
- ELISA-washer, Titertek microplate washer, Flow Laboratories, VA, USA
- Inversmikroskop, Eclipse TS 100, Nikon, Düsseldorf
- Microplate-Reader, Mithras LB 940, Berthold Technology, Bad Wildbad
- Microplate-Reader, Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Ultraschallbad, VWR
- Zellkulturplatten, 6-well, 96-well-plates, 75 cm² EasyFlask™, Nunclon™, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Sterilwerkbank, HerasafeKS 12, Thermo Fisher Scientific
- Zellkulturbrutschrank, Heracell 240 i, Thermo Fisher Scientific
- Gel-Elektrophorese Apparatur, Mini-Protean Tetra, Biorad, Hercules, CA, USA
- Semidry Blotting Apparatur, Peqlab, Erlangen
- Imager ChemiDoc XRS+, Biorad
- Plattformschüttler Unimax 1010, Heidolph, Schwabach
- Alle Gefäße zur Vorbereitung, Aufbewahrung und Behandlung von Feststoffen und Lösungen wie Eppendorf-Reaktionsgefäße und sterile Zentrifugenröhrchen stammten – wenn nicht explizit anders erwähnt – entweder von Carl Roth oder Sarstedt AG & Co, Nümbrecht.

1.4 Puffer

Der häufig verwendete PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) wurde nach folgender Rezeptur hergestellt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: PBS (Phosphate Buffered Saline)

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Konzentration c [mmol/L]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358,14	8,1
KH_2PO_4	136,09	1,5
NaCl	58,44	137,0
KCl	74,56	2,7
Milli-Q H_2O ad 2000mL pH = 7,4 (mit HCL)		

Für den PBS-Puffer mit Calcium- und Magnesium-Ionen wurden jeweils 20fach konzentrierte Stocklösungen hergestellt, die entsprechend gemischt und verdünnt wurden (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: PBS mit Calcium und Magnesium (20x)

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Konzentration c [mmol/L]
KH_2PO_4	136,09	29,4
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358,14	162,0
Milli-Q H_2O ad 1000 mL =Lsg. A		
NaCl	58,44	2740,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	228,46	9,8
KCl	74,56	53,6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	18,0
Milli-Q H_2O ad 1000 mL =Lsg. B		

Lösung A und B aus Tab. 1.2 wurden direkt vor Gebrauch 1:1 gemischt und dann entsprechend zwanzigfach verdünnt. Es entstand ein Niederschlag, der sich beim Verdünnen wieder auflöste. Dieser rührte von einer transienten Überschreitung des Löslichkeitsprodukts des Calciumphosphats her. Der Zusatz zweiwertiger Kationen zu physiologischen Puffern wurde bei manchen Versuchsreihen notwendig, da vor allem

Calcium – in gewissem Ausmaß auch Magnesium – essentiell ist für die Anhaftung der Zellen an das Zellkulturplastik unter Ausbildung einer extrazellulären Matrix und für bestimmte Signalkaskaden, die mit einem Einstrom von Calcium ins Zytosol einhergehen.

2 Untersuchungen der iNOS

2.1 Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien

- Polyklonaler Rabbit iNOS-Antikörper, Type II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- Lipopolysaccharid (rough strains), Salmonella Minnesota Re 595, Sigma-Aldrich;
Stammlösungskonzentration (2,5 g/L)
- Griess-Reagenzien: Sulfanilsäure und N-(1-naphthyl-)ethylenediamin-dihydrochlorid,
Sigma-Aldrich
- L-N⁶-(1-iminoethyl)-lysine-HCl (L-NIL), Enzo Life Sciences, Lausen;
Stammlösungskonzentration (0,1 mol/L, gelöst in Milli-Q Wasser)
- Rabbit β -tubulin III Antikörper, Sigma-Aldrich
- Hydrocortison, Sigma-Aldrich; Stammlösungskonzentration (200 g/L)

2.2 Zellkultur

Die murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 (TIB-71TM) stammt aus der American Type Culture Collection ATCC (Rockville, MD, USA) [410]. Die Zelllinie produziert entgegen früheren Ansichten offenbar ein funktionelles, replikationskompetentes, murines Leukämievirus [411].

2.3 Medien

Als Hauptmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Standardrezeptur [412], wenn nicht anders erwähnt mit 3,7 g/L NaHCO₃ und 4,5 g/L D-Glucose, jedoch ohne Phenolrot eingesetzt, da Phenolrot unter manchen Bedingungen eine signifikante Beeinflussung biochemischer Prozesse zeigt [413-414] und zu einem schlechteren S/N-

Verhältnis (S/N = Signal-to-noise ratio) bei direkten Absorptionsmessungen aus dem Zellkulturüberstand führen kann.

Weitere Medium-Zusätze (Endkonzentrationen):

- 10 % Fetales bovines Serum (FBS)
- 2 mM L-Glutamin (ist in Lösung bei 4 °C maximal 4 Wochen ausreichend stabil)
- 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)
- 100 U/mL Penicillin
- 100 µg/mL Streptomycin

Im Neutral-Rot-Assay 2.5 und im Griess-Assay 2.6 wurde unter bestimmten Bedingungen das Medium wie oben beschrieben nur ohne FBS-Zusatz angesetzt.

Alle Medien und Reagenzien für die Zellkultur wurden von der Biochrom AG, Berlin, bezogen.

2.4 Routinemethoden der Zellkultur

2.4.1 Einfrieren und Auftauen

Das vorgekühlte Einfriermedium bestand, wenn nicht anders erwähnt, aus DMEM mit 20 % FBS als Schutzkolloid und 10 % DMSO Endkonzentration. In diesem wurden die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Zellen in entsprechender Dichte suspendiert und in ein Kryoröhrchen (Sarstedt) überführt (5×10^6 Zellen/mL für RAW 264.7), um daraufhin in ein aus Polycarbonat bestehendes Einfrierbehältnis (Nalgene, Thermo Fisher) – das zuvor mit 2-Propanol befüllt und bei 4 °C gelagert wurde – platziert und dann in einem -80 °C Gefrierschrank über 20 h eingefroren zu werden. Diese Art des Einfrierens garantierte eine Absenkung der Temperatur in den Einfriergefäßen um 1 °C/min, was eine geeignete Kühlrate hinsichtlich der Bildung intrazellulärer Eiskristalle und der Verweildauer der Zellen in sehr konzentrierten Lösungen darstellt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryogefäße mit der Zellsuspension in einen Stickstofftank mit einer Temperatur von -196 °C überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen direkt und möglichst schnell aus der flüssigen Stickstoffphase in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, immer wieder im Kryogefäß durch

vorsichtiges Umdrehen bewegt, bis keine Kristalle mehr erkennbar waren, und hernach im vorgewärmten Medium in entsprechender Dichte verdünnt und ausgesät.

2.4.2 Passagieren und Kultivieren

Aufgrund des starken Anhaftens der RAW. 264.7 Zellen an die Plastikoberfläche wurden diese hier mittels eines sterilen Zellschabers zügig von den Platten abgelöst, in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und bei niedriger Geschwindigkeit (300 g) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Mediums wurden sie anschließend mit frischem Medium gewaschen, sorgfältig resuspendiert und in entsprechender Dichte wie für folgende Versuchsreihen (genauer unter 2.5, 2.6, und 2.7 beschrieben) benötigt in Zellkulturplatten ausgebracht. Dann wurden die Zellen bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank weiter kultiviert.

2.4.3 Zellzählung und Vitalitätstest

Zur Zellzählung wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen, mit einer 0,5 %igen (m/V) Trypan-Blau Lösung (Biochrom AG) 1:10 oder 1:100 verdünnt und in einer Neubauerkammer mäanderförmig unter einem Inversmikroskop (TS 100, Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgezählt, wobei, um doppeltes Zählen von Zellen, die auf den Linien des Zählnetzes lagen, zu vermeiden, immer jeweils zwei Ränder diskriminiert wurden.

Vitale, unter dem Mikroskop leuchtend weiß erscheinende wurden von toten Zellen, die den Farbstoff in das Zytosol aufnehmen und somit unter dem Durchlichtmikroskop blau-schwarz erscheinen, durch diese Art von Ausschlussfärbung unterschieden und gezählt.

2.5 Zytotoxizitäts-Testung mit Neutral Rot

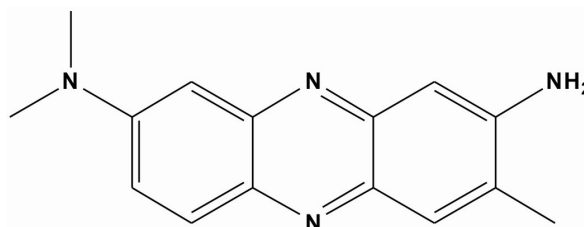


Abb. 2.1: Neutral Rot

Sehr empfindliches Detektieren von zytotoxischen Prozessen im Vergleich zu anderen Zytotoxizitätstests [102, 415], besonders auch die Integrität von membranären Strukturen und deren teilweise aktiv aufrechterhaltene Gradienten betreffend, ist mit der Inkubation von Zellen mit dem Phenazin-Farbstoff Neutral Rot (Abb. 2.1) möglich, der in seiner nicht-protonierten Form membrangängig ist und sich in sauren Kompartimenten der Zelle durch Protonierung anreichert. Das Test-Protokoll wurde in Anlehnung an die Arbeit von Repetto et al. [416] mit einigen Änderungen, vor allem was die Behandlung der Farbstofflösung angeht, die im Folgenden kurz beschrieben werden, entwickelt und durchgeführt.

RAW 264.7 Zellen wurden in einer Menge von $0,3 \times 10^6$ pro well in 96-well Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät und mit den entsprechend zu testenden Substanzen gelöst in einem Endvolumen von 300 μL Zellkulturmedium über 14 bzw. 24 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Dimethylsulfoxid (DMSO) 10 % (V/V) und Zinkchlorid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dienten als Positiv-Kontrollen. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit Medium und PBS wurden die Zellen mit 100 μL einer vorgewärmten Lösung von Neutral Rot in Zellkulturmedium (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Neutral Rot Lösung wurde zuvor über Nacht bei 37 °C gehalten und vor Gebrauch bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert, um ungelöste Farbstoffpräzipitate und -kristalle zu entfernen. Direkt nach Inkubation mit der Neutral Rot Lösung wurde diese abgesaugt und nach einem weiteren Waschschrift mit PBS der Farbstoff mit 150 μL einer Lösung aus 50 % Ethanol (96 %), 49 % Ultrapure Milli-Q Wasser, und 1 % Eisessig für 10 min auf einem Horizontalschüttler extrahiert. Die Absorption der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

Ein analoges Prozedere wurde ebenso für die Testung der Zytotoxizität von Substanzen in EA.hy 926 Zellen angewandt, wobei die Aussaatmenge der Zellen in der 96-well Zellkulturplatte dabei $0,1 \times 10^6$ pro well betrug.

2.6 Nitrit-Messung mit modifizierter Griess-Reaktion

RAW 264.7 Zellen wurden in einer Menge von 3×10^6 pro Ansatz in 6-well Zellkulturplatten ausgesät und einen weiteren Tag bis zur Konfluenz im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden in Inkubationsmedium mit den entsprechenden Substanzen in folgenden Endkonzentrationen für 5 min vorinkubiert (M1 0,1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fraktion I 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Hydrocortison 36,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Als Negativ-Kontrolle diente der spezifische iNOS-Inhibitor L-NIL in einer Endkonzentration von 1 mM [200]. Im Anschluss wurden die Zellen dann zusätzlich mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS in einem Endvolumen von

2 mL über die entsprechende Zeit (14 h) inkubiert. Die Verdünnungsschritte wurden hierbei so gewählt, dass die DMSO-Endkonzentration immer $\leq 0,03\%$ war, da DMSO erwartungsgemäß durchaus einen starken Einfluss auf die NO-Produktion und die Vitalität der Zellen haben kann, wie auch eigene Untersuchungen zeigten (1.2.3 Allgemeiner Teil).

Die Bestimmung von Nitrit, wobei Nitrit hier als Surrogat-Parameter der Stickstoffmonoxid-Produktion der Zellen diente, wurde, wie bereits früher beschrieben, mit einigen Veränderungen, vor allem die Messung der Eigenabsorption bei separater Reagenzien-Zugabe betreffend, durchgeführt [417]. Dabei wurden 200 μL des Zellkulturüberstandes mit 50 μL einer 6,5 mol/L HCL und 50 μL einer 37,5 mmol/L Sulfanilsäure-Lösung in Milli-Q Wasser gemischt, danach wurde die Absorption dieser Lösung als Autoabsorption bestimmt, die später von der nach finaler Zugabe von N-(1-naphthyl-)ethylenediamin erhaltenen Absorption subtrahiert wurde. Diese separate Zugabe der Reagenzien bei Systemen ohne Trennselektivität der Analyten stellt einen wichtigen Schritt dar, der – neben der Verbesserung der Empfindlichkeit für Nitrit [417] – die Messung der unspezifischen Eigenabsorption der Flavonoid-haltigen Proben nach HCL-Zugabe ermöglichte. Bestimmte Flavonoide sind, auch in Abhängigkeit vom pH-Wert, in wässriger Lösung nicht stabil und zeigten, wie auch eigene Untersuchungen bestätigten, eine deutliche, über die Zeit dynamische Eigenabsorption und -fluoreszenz. Somit wurden nachfolgend 50 μL einer 12,5 mmol/L N-(1-naphthyl-)ethylenediamin-Lösung hinzugefügt, gemischt, und nach 10 min bei Raumtemperatur die Absorption im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) bei 600 nm gemessen.

Eine zusätzliche, externe Überprüfung der Meßwerte wurde bei einigen Ansätzen durch eine selektive HPLC-Methode zur Nitrit-Bestimmung mittels Umsetzung mit N-Acetylcystein wie im Folgenden unter 2.7 beschrieben durchgeführt.

2.7 Nitrit-Messung als S-Nitroso-N-Acetylcystein

Eine HPLC-Methode zur sensitiven und selektiven Messung von Nitrit in biologischen Matrices, die sich damit auch für die Messung von Nitrit in humanem Plasma eignet, wurde überwiegend wie von Tsikas et al. publiziert übernommen. 200 μL Zellkultur- bzw. Inkubationsmedium oder Plasma, bei welchem vorher durch Centrisart® I Filtereinheiten mit einem cut-off von 20 kDa (Sartorius, Göttingen) größere Proteine abgetrennt wurden, wurden zur Derivatisierung des Nitrits in der Probelösung mit 40 μL einer frisch hergestellten N-Acetylcystein-Lösung (50 mM in Milli-Q Wasser) eingesetzt [289]. Nach Zugabe des Thiols wurde die Lösung mit 10 μL 4 M HCl angesäuert und 200 μL der Lösung mit entstandenem

S-Nitroso-N-Acetylcystein-Addukt dem analytischen Chromatographie-System zugeführt. Das HPLC-System samt apparativer Ausstattung entsprach dem in 3.2.1 beschriebenen. Beim genannten UV/VIS-Detektor wurde entsprechend für alle HPLC-Messungen zur Addukt-Detektion eine Wellenlänge von 333 nm eingestellt. Als Säule für die chromatographische Trennung diente eine C₁₈ Sunfire[®] Säule (150 x 4,6 mm I.D., 5 µm) von Waters. Der Eluent war ein 10 mM PBS-Puffer mit pH 2,0 (eingestellt mit Phosphorsäure 86 %) und 14 % Acetonitril (V/V), bei einer isokratischen Flußrate von 1 mL/min. Die Validierungsparameter der Methode waren, kurz zusammengefasst, wie folgt: Die Linearität der Methode war zwischen 0,05-100 µM Nitrit beschrieben durch fünf Konzentrationsniveaus mit guten Bestimmtheitsmaßen gegeben ($R^2 = 0,981$ ($R^2 = 0,975$ [289])); lineare Kalibrierfunktion (best-fit Parameter mit GraphPad Prism[™] Version 5.00): Steigung= $10690 \pm 526,8$; y-Achsenabschnitt= $-525,2 \pm 2368$; LOD (= limit of detection) 50 nM Nitrit mit S/N (= Signal-to-noise ratio) $\geq 3:1$. Die Methode wurde von Tsikas et al. mit einer GC-MS Methode zur Nitrit-Messung verglichen und lieferte dabei gut korrelierte Werte ($R^2 = 0,995$).

2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Normalisierung der Messwerte aus Zell-Versuchen oder zur Bestimmung der bei der Gelelektrophorese aufzuladenden Proteinmenge wurde der Protein-Gehalt der Proben mit der Methode nach Bradford bestimmt [418]. Die Zellen wurden dafür von der Platte mit einem Zellschaber oder mit Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % Lösung (Biochrom AG) in PBS abgelöst, lysiert (2.9.1), zentrifugiert, und darauffolgend z.B. speziell für das Western-Blotting aufgearbeitet. 5 µL Zelllysat-Proteinlösung wurde in 250 µL Bradford-Reagenz (0,025 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 mL Ethanol (96 %), 25 mL Phosphorsäure (85 %) mit Milli-Q Wasser in einem Endvolumen von 250 mL gelöst) pipettiert, gemischt und nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 600 nm gemessen. Bovines Serum Albumin (BSA) wurde für Kalibrierungen im Konzentrationsbereich von 25-1000 µg/mL gelöst in Milli-Q Wasser wie exemplarisch in Abb. 2.2 gezeigt verwendet.

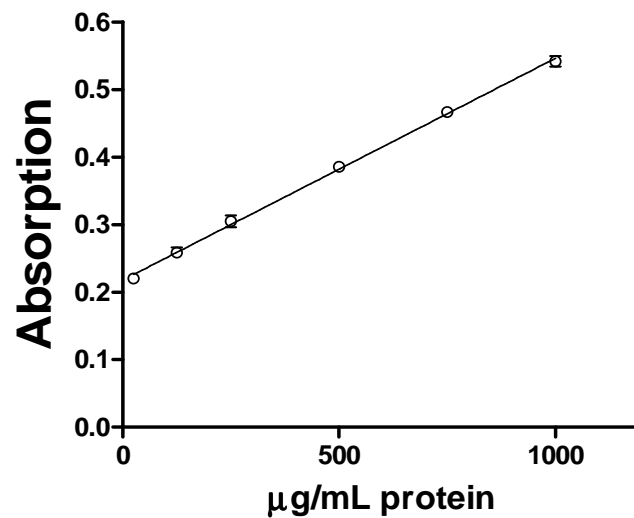


Abb. 2.2: Exemplarische Darstellung einer Kalibriergeraden des Bradford-Assays bei der Vermessung von BSA in Milli-Q Wasser ($R^2 = 0,996$). Dargestellt sind Mittelwerte mit $n = 3$, \pm SD.

2.9 Western-Blotting

Zum semiquantitativen Nachweis von Veränderungen der Proteinexpression der iNOS in Relation zur als konstant und konstitutiv angesehenen Expression des housekeeping-Proteins β -tubulin (zur genaueren Diskussion zur Stabilität der Expression und Wahl von housekeeping-Genen und -Proteinen [419-420]) nach Behandlung der Zellen mit M1, Fraktion I oder Hydrocortison wurden Western-Blots in Anlehnung an die Methodik von Li et al. [199, 421] sowie auch mit Anwendung der Arbeitsabläufe der Probenvorbereitung, die unter 4.8 zur eNOS Bestimmung genauer beschrieben sind, wie im Folgenden dargestellt angefertigt und ausgewertet.

2.9.1 Zell-Lyse

Der Lysepuffer nach Li et al. [199] wurde aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften zur Solubilisierung und Stabilisierung von großen Proteinen wie NO-Synthasen verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist in Tab. 2.1 aufgeführt:

Tab. 2.1: Lysepuffer

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Endkonzentration c [mmol/L]
Tris-HCL	157,59	50,0
EDTA	372,24	0,5
EGTA	380,35	0,5
DL-Dithiothreitol	154,25	2,0
Glutathion (red.)	307,32	7,0
CHAPS	614,88	20,0
Glycerol	92,10	10 % (V/V)
Complete, EDTA free		1/2 Tablette gelöst in 1 mL Milli-Q H ₂ O
Milli-Q H ₂ O ad 25 mL		
pH= 7,5		

Der Protease-Inhibitor Mix Complete[®], Roche, Basel, Schweiz, wurde aus Gründen der Stabilität erst jeweils kurz vor Verwendung dem Lysepuffer zugesetzt. Die mit entsprechend zu testenden Substanzen behandelten Zellen (2.6) wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Eiskalter Lysepuffer wurde direkt danach in entsprechender Menge (70 µL) auf die gewaschenen Zellansätze pipettiert und die Zellen wurden mittels Zellschaber zügig abgelöst. Nach Überführung dieser Suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde sie 15 min lang bei -40 °C oder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren, danach für 35 sec in ein Ultraschallbad (VWR, Darmstadt) gestellt und darauffolgend bei 16 000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde wie unter 2.8 beschrieben bestimmt. Die Proben wurden mit reduzierendem Elektrophoresepuffer (Carl Roth) versetzt und bei 70 °C für 8 min erhitzt, im Anschluss entweder bei -40 °C eingefroren oder direkt einer Gelelektrophorese wie unter 2.9.2 nachfolgend beschrieben unterzogen.

2.9.2 Gelelektrophorese

Folgende Puffer und Reagenzien wurden zur Herstellung der Gele und für eine erfolgreiche Elektrophorese benötigt:

Der 10fach konzentrierte Elektrophorese Puffer für die SDS-Page wurde nach folgender Rezeptur hergestellt (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Elektrophorese Puffer (10x)

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Endkonzentration c [mol/L]
Glycine	75,07	1,92
Tris-Base	121,14	0,25
SDS 20%-Lsg.	288,40 (Reinsubstanz)	5 % (V/V)
Milli-Q H ₂ O ad 1000mL		
pH≈ 8,9		
Niemals pH nachstellen.		

Dieser Puffer wurde bei Bedarf entsprechend 1:10 verdünnt und gemäß den Anweisungen des Herstellers bemessen in die Elektrophoresekammer gefüllt.

Eine 10%ige Lösung von Ammoniumperoxodisulfat (Tab. 2.3) wurde zu Initiierung der radikalischen Polymerisation eingesetzt.

Tab. 2.3: 10 % Ammoniumperoxodisulfat – Lösung

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Endkonzentration c [mol/L]
APS	228,2	0,44
Milli-Q H ₂ O ad 2 mL		

Zur Gewährleistung des optimalen pH-Werts im Gel-System wurden jeweils ein 1 M Tris-HCL Puffer mit pH= 6,8 und 8,8 hergestellt (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: 1 M Tris-HCL, pH = 6,8

Stoff	Molekulargewicht M _w [g/mol]	Endkonzentration c [mol/L], pH = 6,8	Endkonzentration c [mol/L], pH = 8,8
Tris-Base	121,40	0,05	0,85
Tris-HCL	157,60	0,95	0,15
Milli-Q H ₂ O ad 1000 mL			

Die genaue Zusammensetzung der Gele im Laemmli-System [422] war wie folgt (Tab. 2.5 und Tab. 2.6):

Tab. 2.5: Sammelgel 5% (ausreichend für 4 x Minigele)

Stoff	Menge
30% Acrylamid-Lsg.	1,33 mL
1M Tris-HCl pH 6,8	1,00 mL
H ₂ O	5,54 mL
SDS 10%-Lsg.	80 µL
10% APS-Lsg.	40 µL
TEMED	8 µL

Tab. 2.6: Trenngel 7,5 % (ausreichend für 4 x Minigele)

Stoff	Menge
30% Acrylamid-Lsg.	5,00 mL
1M Tris-HCl pH 8,8	7,50 mL
H ₂ O	7,12 mL
SDS 10%-Lsg.	200 µL
10% APS-Lsg.	160 µL
TEMED	16 µL

Das Trenngel wurde direkt nach dem Einbringen der noch nicht polymerisierten Lösung in die Apparatur zunächst mit Milli-Q Wasser überschichtet, um eine scharfe und glatte Grenzflächentrennung vor dem anschließenden Aufbringen des Sammelgels zu erhalten. Nachdem Gießen und Aushärten der Gele war es wichtig, die Taschen von unpolymerisierten Acrylamidresten zu befreien, indem die Taschen jeweils mit 70 µL Laufpuffer mehrmals gespült wurden, um ein störungsfreies Auftragen der Proben zu gewährleisten.

C Material und Methoden

Nach dem Aufladen der bei jeder Probe gleichen Menge an Gesamtprotein (typischerweise 20-30 µg) und des zur Visualisierung der Auftrennung sowie zur Größenmarkierung verwendeten farbigen Proteinmarkers (PageRuler™ Plus von Fermentas, Thermo Scientific; Größenbereich: 10-250 kDa) wurde die SDS-Page zunächst 20 min bei 100 V, danach 1 h bei 120 V entwickelt.

2.9.3 Semidry-Blotting

Um die im Gel aufgetrennten Proteine spezifisch zu detektieren, wurden sie auf eine Membran übertragen, auf welcher dann die Antigen-Strukturen für eine Immunfärbung mit entsprechend markierten Antikörpern zugänglich waren. Im Folgenden sind die dafür benötigten Puffer, Reagenzien-Lösungen und Arbeitsabläufe genauer beschrieben.

Der zur Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran benötigte Towbin-Puffer [423] wurde gemäß Tab. 2.7 hergestellt:

Tab. 2.7: Towbin - Puffer

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Endkonzentration c [mmol/L]
Tris-Base	121,40	25
Glycin	75,07	192
MetOH	32,04	20% (V/V)
Milli-Q H ₂ O ad 1000 mL		
Niemals pH nachstellen, pH muss zwischen 8,2-8,4 liegen.		

Eine Ponceau-Rot Färbelösung wurde zur Blotting-Kontrolle und zur besseren Fixierung der Proteine verwendet (Tab. 2.8).

Tab. 2.8: Ponceau-Rot-Färbelösung

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Endkonzentration c [mmol/L]
Ponceau-S	760,56	2,6
Trichloressigsäure	163,39	18,36
Milli-Q H ₂ O ad 100 mL		

Der TBS-T Puffer (Tris Buffered Saline mit Tween 20) wurde für das Waschen der Blots und Verdünnung der Antikörperlösungen eingesetzt (Tab. 2.9).

Tab. 2.9: TBS-T (Tris Buffered Saline mit Tween 20)

Stoff	Molekulargewicht M_w[g/mol]	Endkonzentration c [mol/L]
Tris-Base	121,40	0,025
NaCl	58,44	0,19
Tween 20		0,1 % (V/V)
Milli-Q H ₂ O ad 1000 mL		
pH=7,4 mit HCL		

Das Gel wurde aus der Apparatur genommen, mit Towbin-Puffer (Tab. 2.7) abgewaschen und auf eine zuvor bei 4 °C 1 h in eben diesem Puffer eingelegte Nitrocellulose-Membran (Biosciences Whatman Filtration Schleicher & Schuell, Maidstone, UK) aufgelegt. Darunter und darüber wurde ein Stapel aus Filterpapieren positioniert (Whatman, UK) und Luftblasen aus dem Stapel durch sanften Rolldruck entfernt, so dass ein kompaktes Sandwich mit dem Gel auf der Membran in der Mitte des Stapels entstand. In der semidry-blotting Apparatur (Peglab) wurden die Proteine durch den anliegenden Strom von 65 mA pro Minigel bei einer maximalen Spannungsbegrenzung von 8 V über 70 min auf die Membran transferiert. Danach wurde die Membran mit Ponceau-Rot Lösung (Tab. 2.8) inkubiert, um den Proteintransfer zu überprüfen und die Proteine durch die enthaltene Säure stärker zu fixieren. Daraufhin wurde die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit 3 % BSA (m/V) und 0,1 % Tween 20 (V/V) in TBS-T (Tab. 2.9) über mindestens 5 h bei RT oder 4 °C über Nacht blockiert. Die Membran wurde auf einer Höhe von 70 kDa in zwei Teile geschnitten. Der obere Teil mit den schwereren Proteinen wurde mit iNOS-AK als primärem AK inkubiert, wohingegen der untere Teil mit den leichteren Proteinen auf den Gehalt von β -tubulin zur Ladungskontrolle und Normalisierung untersucht wurde. Nach einem Waschschrift mit TBS-T wurden die Membranen jeweils mit primären Antikörper-Lösungen (1:1250 für iNOS-AK, 1:3000 für β -tubulin AK, verdünnt in TBS-T mit 3 % BSA und 0,02 % Natriumazid) über Nacht bei 4 °C oder 6 h bei RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Ausgiebigen Waschschriften mit TBS-T (fünf- bis sechsmal für 10 min) – um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren – folgte jeweils die Inkubation mit sekundärem goat anti-rabbit AK (1:30000 in TBS-T mit 3 % BSA) bei RT für 1 h. Wiederum wurde fünf- bis sechsmal mit TBS-T für 10 min gewaschen und die Membran dann mit 1:1 (stabile Peroxid-Lösung: Luminol/Enhancer) gemischter Substrat Working Solution (SuperSignal West Pico Rabbit

IgG Detection Kit, Thermo Scientific) für 1 min überschichtet. Die Seite der Membran mit den geblotteten Proteinen darauf wurde auf eine herkömmliche Frischhaltefolie gelegt und einschichtig sowie luftblasenfrei umschlossen. Anschließend wurde sie entweder im Dunkelraum auf einen Röntgenfilm (Typ Agfa Cronex 5, Agfa, Morsel, Belgien) aufgelegt und die ablaufende ECL-Reaktion entwickelt, oder in das ChemiDoc XRS+ analyzing system (Biorad) eingebracht und die emittierten Lichtquanten mittels CCD-Kamera quantitativ erfasst.

Die densitometrische Auswertung der erhaltenen Western-Blot Bilder erfolgte mittels des Java-Computerprogramms ImageJ des NIH [424].

3 Bestimmung der Ad-/Absorption des Metaboliten M1 an/in primäre, humane Monozyten und Endothelzellen

3.1 Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien

- Humane Monozyten wurden durch Zellseparation (Leukapherese) an der Universitätsklinik Würzburg hoch rein gewonnen, danach wie unter 2.4.3 gezählt, sofort wie unter 2.4.1 beschrieben – jedoch aufgrund der Empfindlichkeit dieser primären Zellen mit 40 % Serumanteil – eingefroren, und für die Versuche wie ebendort beschrieben aufgetaut und wiederum gezählt. Die Vitalitätsrate der Zellen nach einem Einfrier-Auftauzyklus betrug ≥ 50 %.
- EA.hy 926 Zellen wurden wie unter 4.4 beschrieben kultiviert und verwendet
- Trichloressigsäure (TCA); 10 %ige (m/V) Lösung in Milli-Q Wasser
- DMEM, ohne Phenolrot, mit 10 % FBS, wie unter 2.3 beschrieben hergestellt
- Phloretin, Sigma-Aldrich; Stammlösungskonzentration (200 g/L)

3.2 HPLC-Methode zur direkten Bestimmung von M1 in Zellkulturüberständen und -lysaten

3.2.1 HPLC-Geräte und Bedingungen

Das HPLC-System bestand aus dem Modell 1525 für binäre Hochdruckgradienten als Pumpe und einem In-Line Vakuum Degaser Modell 1525. Der Autosampler war vom Modell 717plus und der UV/VIS Detektor vom Modell 2487. Der Hersteller aller dieser Teile war die Firma Waters, Milford, USA. Ein Spektrum im UV/VIS-Bereich des hier untersuchten Metaboliten M1 wurde aufgenommen (UV/VIS Spektralphotometer mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) und ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 279 nm gefunden. Diese Wellenlänge (279 nm) wurde dann beim oben genannten UV/VIS Detektor Modell 2487 von Waters entsprechend für alle HPLC-Messungen zur M1 Detektion eingestellt. Als Säule für die chromatographische Trennung diente eine C₁₈ Sunfire[®] Säule (150 x 4,6 mm I.D., 5 µm) von Waters. Der Eluent war ein 10 mM PBS-Puffer mit pH 2,0 (eingestellt mit Phosphorsäure 85 %) und 14 % Acetonitril (V/V), bei einer isokratischen Flußrate von 1 mL/min. Das typische Injektionsvolumen der Proben war dabei 200 µL. Zur Steuerung der Anlage und Datenverarbeitung wurde die Software Breeze[™] Version 3.3. von Waters benutzt.

3.2.2 Validierungsparameter der M1 HPLC-Methode

3.2.2.1 Selektivität/Spezifität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode zur Unterscheidung aller interessierenden Stoffe in der Probe [425]. In diesem Fall handelt es sich um einen Stoff, nämlich M1, der von analytischem Interesse ist, insofern könnte hier auch von Spezifität gesprochen werden. Die Matrix wurde durch mindestens drei Proben auf Spezifität für M1 untersucht. In Abb. 3.1 sind exemplarisch Musterchromatogramme der Bestimmung gezeigt:

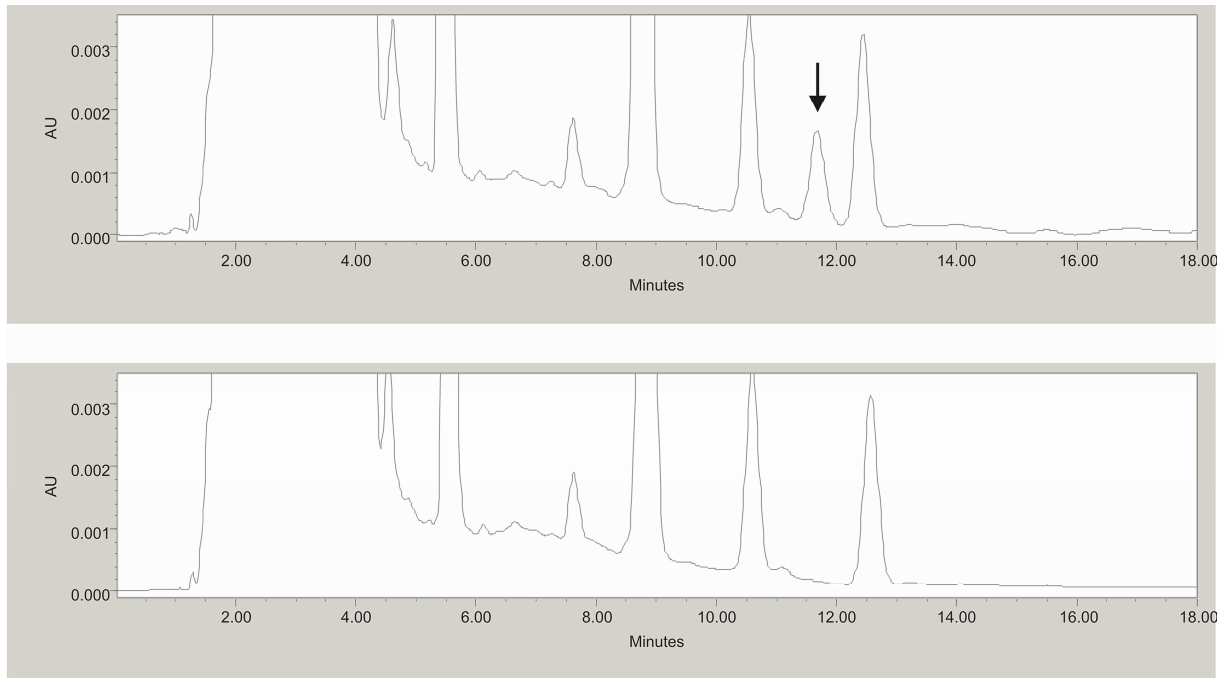


Abb. 3.1: Musterchromatogramme für die Darstellung der Selektivität bzw. Spezifität der M1 HPLC-Methode. Oben dargestellt ist ein Chromatogramm einer Probe mit 200 ng/mL M1 (Peak durch Pfeil gekennzeichnet) gelöst in der Matrix DMEM mit 10 % FBS und entsprechenden Zusätzen (siehe 2.3), die einer Analyse mit der Methode wie in 3.2.3 beschrieben unterzogen wurde. Darunter ein Chromatogramm, das durch Injektion einer mit der Methode (3.2.3) aufgearbeiteten Leerprobe (blank) dieser Matrix erhalten wurde.

Wie auch im Folgenden unter 3.2.2.3 gezeigt wurde die Richtigkeit der Methode ebenso bewiesen und da es nicht zur Interferenz mit Peaks anderer Substanzen bei der entsprechenden Retentionszeit kam, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer für M1 spezifischen bzw. selektiven Methode ausgegangen werden.

3.2.2.2 Linearität/Kalibrierfunktion

Linearität ist die Fähigkeit einer Methode innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [425]. Um die Linearität bei dieser Methode zu belegen, wurden sieben äquidistante Konzentrationen (0,031-2 µg/mL) in dem erwarteten Konzentrationsbereich von M1 in der Matrix untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass eine leichte Basisliniendrift in den Chromatogrammen vorhanden war, die Peaks eher kritisch hinsichtlich der Auflösung als der Symmetrie bzw. Breite oder Größe zu sehen waren, und bei robusten, isokratischen Methoden mit konstanter Retentionszeit (t_R) (Retentionszeit M1 $t_R = 11,62 \text{ min}$, $\pm 0,06 \text{ min}$, mit $n = 100$) die Auswertung über die Fläche mit häufig schlechteren Variationskoeffizienten teilweise historisch bedingt ist, wurde hier eine Auswertung über die Peakhöhe vorgenommen [426-

427]. Nach Durchführung einer linearen Regressionsanalyse wurden für folgende Geradengleichung die in Tab. 3.1 aufgeführten Werte erhalten.

$$y = a x + b$$

mit y = Peakhöhen-Quotient, a = Steigung, b = y-Achsenabschnitt, x = Konzentration der Probe

Tab. 3.1: Validierungsparameter Linearität M1 HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten best-fit Parameter der M1 HPLC-Methode, wobei in den Klammern das jeweilige 95 % Konfidenzintervall angegeben ist ($n = 3$).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
M1	1,9215 (1,9041 - 1,9389)	-0,0165 (-0,0308 - -0,0023)	0,9998

3.2.2.3 Präzision und Richtigkeit

Als Streu- und Lageparameter wurden die Präzision und Richtigkeit der Methode durch Analyse von drei Konzentrationsniveaus von M1 in der Matrix im unteren, mittleren und oberen Bereich des linearen Analysebereiches ermittelt. Dafür wurden zur Bestimmung der Intraday-Präzision und -Richtigkeit die Analyselösungen sechsmal an einem Tag hergestellt und vermessen, wohingegen bei der Interday-Präzision und -Richtigkeit an vier aufeinander folgenden Tagen diese Konzentrationen der Analyselösungen hergestellt, aufgearbeitet und analysiert wurden. Da eine hinreichende Bedingung für eine stochastische Zuordnung der erhaltenen Kenngrößen eine Gaußsche Normalverteilung der Daten ist, wurde der Schnelltest nach David [425] zur Überprüfung der Werte auf Normalverteilung herangezogen. Bei allen drei Konzentrationsniveaus waren demnach die Werte mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 99 \%$ normalverteilt. Die Werte in Tab. 3.2 beziehen sich auf die Verhältnisse aus errechneter und eingesetzter bzw. als richtig angesehener Konzentration von M1 in den Referenzanalyselösungen. Die Werte der Präzision sind nachfolgend als relative Standardabweichung bzw. Variationskoeffizienten (V_K) angegeben.

C Material und Methoden

Tab. 3.2: Validierungsparameter Richtigkeit und Präzision der M1 HPLC-Methode. Dargestellt sind die Intraday-Richtigkeit und -Präzision mit jeweils $n = 6$, und die Interday-Richtigkeit und Präzision mit $n = 4$ Ansätzen.

Konzentration M1 [$\mu\text{g/mL}$]	Intraday- Richtigkeit (%)	Interday- Richtigkeit (%)	Intraday- Präzision (%)	Interday- Präzision (%)
1	94,4	94,8	1,6	5,2
0,25	95,9	95,2	1,3	3,6
0,063	102,4	99,9	2,5	4,2

3.2.2.4 Bestimmungsgrenze (LLOQ)

Die Bestimmungsgrenze oder auch LLOQ (= lower limit of quantification) wurde ermittelt, indem bewiesen wurde, dass eine sechsfache Bestimmung der Konzentration einer verdünnten Analyselösung mit M1 in der Matrix einen noch akzeptablen Variationskoeffizienten bzw. ein noch akzeptables Unsicherheitslevel mit Bezug auf die Empfehlungen von EURACHEM [428] bzw. das IUPAC Orange bzw. Gold Book [429] aufwies. Die geforderten Grenzwerte ($V_k \leq 10\%$) wurden deutlich eingehalten (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Validierungsparameter Bestimmungsgrenze der M1 HPLC-Methode. Sechsfache ($n = 6$) Bestimmung der Konzentration einer M1 Analyselösung als LLOQ (= lower limit of quantification).

Konzentration M1 [$\mu\text{g/mL}$]	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
0,031	100,1	3,5

3.2.2.5 Stabilität

Ein durchaus kritischer Punkt der Methode ist die Stabilität des Analyten M1 in wässriger Analyselösung was die Hydrolyse der Lactonstruktur und Oxidation vornehmlich der Catecholstruktur des ehemaligen Flavonoid-B-Rings der M1 Struktur anbelangt. Bei niedrigem pH-Wert sollte die Struktur deutlich stabiler sein (Hydrolyse der Lactonstruktur vermutlich analog γ -Butyrolacton= GBL [430], Stabilität von (+)-Catechin in Abhängigkeit vom pH-Wert [261], Mechanismus der (+)-Catechin-Oxidation [267]). Die Stabilität von M1 in saurer Analyselösung nach Aufarbeitung gemäß der Methode 3.2.3 von drei Konzentrationsniveaus (1 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,063 $\mu\text{g/mL}$) in dreifacher Ausführung ($n = 3$) und über 24 h im Autosampler bei RT (= Raumtemperatur) aufbewahrt, wurde überprüft und folgende Parameter dabei ermittelt (Tab. 3.4).

$$y = \left(\frac{M1 \text{ Peakhöhe } t = 24 \text{ h}}{M1 \text{ Peakhöhe } t = 0 \text{ h}} \right) 100$$

Tab. 3.4: Validierungsparameter y Stabilität der Analyselösung nach Aufarbeitung. Drei unabhängige Ansätze (n = 3) der unten aufgeführten Konzentration wurden über 24 h bei RT unter Analysebedingungen (im Autosampler) nach Aufarbeitung aufbewahrt und analysiert.

Konzentration M1 [$\mu\text{g/mL}$]	y (%)	V _K (%)
1	99,1	3,5
0,25	107,8	7,8
0,063	110,3	12,9

3.2.3 Versuchsbedingungen und Vorgehensweise

3.2.3.1 Monozyten/Makrophagen

Humane Monozyten oder murine Makrophagen wurden in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{mL}$ vitaler Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium 2.3 suspendiert und mit den entsprechenden Mengen von M1 (0,2-20 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 1 μM Endkonzentration) versetzt. Bei manchen Versuchsreihen erfolgte eine 10minütige Vorinkubation mit dem unspezifischen Hemmer zellulärer Membran-Transportsysteme Phloretin [98, 154, 431] in einer Endkonzentration von 55 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 200 μM . Parallel dazu wurde für die exakt gleich behandelten entsprechenden Kontrollen eine Lösung von M1 mit und ohne Phloretin in Medium in gleichen Konzentrationen angesetzt. Auf einem Plattformschüttler (Heidolph) wurden die Ansätze in Eppendorf-Reaktionsgefäße (1 mL) verteilt und bei 37 °C und einer Schüttelbewegung von 70 rpm im Brutschrank über den entsprechenden Zeitraum inkubiert. An den Zeitpunkten t = 0, 5, 15, 30, 60, 120 min wurden die Ansätze zentrifugiert (2 min bei 2000 g), Proben aus den Überständen entnommen, die dann direkt 1:1 mit einer 10 %igen TCA-Lösung versetzt, zur Abtrennung der ausgefallenen Proteine 10 min bei 10 000 g zentrifugiert und der Überstand direkt der HPLC-Analytik wie unter 3.2.1 beschrieben unterzogen wurden. Typischerweise wurden 200 μL direkt in das HPLC-System injiziert.

Danach wurde der restliche Überstand verworfen, das Zellpellet einmal mit Medium und hernach nochmals mit PBS gewaschen, dann in 500 μL PBS aufgenommen und sofort in flüssigem N₂ eingefroren. Zur Extraktion der noch vorhandenen, intrazellulären Menge an M1 wurde die gefrorene Lösung 2 min ins Ultraschallbad zur Zellyse gestellt, dann eine Proteinbestimmung nach Bradford wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt, und die Lösung

entweder mit 500 μL 1:1 mit einer 10 %igen TCA-Lösung oder mit 700 μL eiskaltem MeOH mit 0,025 M HCL versetzt. Danach wurden die Proben 10 min bei 10 000 g zentrifugiert, 200 μL des Überstandes der TCA-Aufarbeitung direkt in das HPLC-System injiziert, oder vom MeOH Ansatz 900 μL abgenommen, unter gleichmäßiger N_2 -Strömung getrocknet, in 210 μL Fließmittel aufgenommen, wovon 200 μL dann wie oben beschrieben ins HPLC-System eingebracht wurden.

3.2.3.2 EA.hy 926

EA.hy 926 Endothelzellen wurden wie unter 4.7.2 beschrieben ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und die entsprechende Endkonzentration von M1 (0,2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 1 μM) in 1 mL serumhaltigen Medium- oder Pufferüberstand (PBS+ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Tab. 1.2) eingestellt. Bei manchen Versuchsreihen erfolgte eine 10minütige Vorinkubation mit dem unspezifischen Hemmer zellulärer Transportsysteme Phloretin in einer Endkonzentration von 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 200 μM . Parallel dazu wurde für die exakt gleich behandelten entsprechenden Kontrollen jeweils 1 mL Medium oder Puffer mit der gleichen Konzentration von M1 mit und ohne Phloretin in eine 6-well Zellkulturplatte pipettiert und die Ansätze bei 37 °C auf einem Plattformschüttler bei 70 rpm inkubiert. An den diskreten Zeitpunkten ($t = 0, 5, 15, 30, 60, 120$ min) wurden Proben aus den jeweiligen Zellkulturüberständen entnommen, die dann wie unter 3.2.3.1 beschrieben analysiert wurden.

Danach wurde das Medium abgesaugt, der jeweilige Zellrasen in den 6-well Zellkulturplatten einmal mit 2 mL Medium, nachfolgend einmal mit 2 mL PBS pro well gewaschen, dann mit 500 μL Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % Lösung versetzt und bei 37 °C im Brutschrank für 4 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgelöst, die aufgenommenen Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und suspendiert, wie unter 2.4.3 beschrieben gezählt, und sofort in flüssigem N_2 eingefroren. Die gefrorene Lösung wurde 2 min ins Ultraschallbad zur Zellyse gestellt, anschließend eine Proteinbestimmung nach Bradford wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt, 500 μL der Lösung 1:1 mit einer 10 %igen TCA-Lösung versetzt oder eine Extraktion wie in 3.2.3.1 beschrieben durchgeführt und analysiert.

4 Untersuchungen der eNOS

4.1 Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien

- 4, 5-Diaminofluorescein (DAF-2), Enzo; Stammlösungskonzentration (5 mmol/L)
- Calcium-ionophore 4-Bromo A-23187, Enzo; Stammlösungskonzentration (0,04 mol/L)
- N^G-Monomethyl-L-arginin · monoacetat (L-NMMA), Enzo; Stammlösungskonzentration (0,1 mol/L in Milli-Q Wasser gelöst)
- Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA), Enzo; Stammlösungskonzentration ($3,24 \cdot 10^{-3}$ mol/L)
- Diaminofluorescein-triazol (DAF-2T), Genaxxon, Ulm; Stammlösungskonzentration ($2,68 \cdot 10^{-3}$ mol/L)
- (Z)-1-(N-Methyl-N-[6-(N-methylammoniohexyl)amino])-diazen-1-ium-1,2-diolate (NOC-9), Enzo; Stammlösungskonzentration (0,025 mol/L in eiskalter 0,01 M NaOH)
- Polyklonaler Rabbit eNOS-Antikörper, Becton Dickinson
- Resveratrol, Enzo; Stammlösungskonzentration (1,1 mol/L)
- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor = VEGF), Biochrom; Stammlösungskonzentration (0,1 mg/mL in Milli-Q Wasser)
- L-Arginin, Sigma-Aldrich; Stammlösungskonzentration (20 g/L in Milli-Q Wasser)
- L-Arg-Asp (L-Arginin-Aspartat), Horphag Research; Stammlösungskonzentration 0,01 g/mL in Milli-Q Wasser

Als Assay-Puffer für die Versuchsreihen zur NO-Freisetzung der eNOS in Endothelzellen diente, wenn nicht anders beschrieben, PBS-Puffer mit Calcium und Magnesium wie unter 1.4 beschrieben hergestellt, dem L-Arginin in einer Endkonzentration von 100 μ M zugesetzt wurde.

4.2 Zellkultur

Die Zelllinie EA.hy 926 als humane endotheliale Zelllinie (Fusionszelllinie entsprechend durch Fusion von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs = human umbilical vein endothelial cells) und A549 Lungenepithelzellen entstanden) wurde dankenswerterweise von Dr. Cora Jean Edgell, Universität von North Carolina, NC, USA [241] zur Verfügung gestellt.

4.3 Medien

Wie unter Punkt 2.3 beschrieben wurde das Kultur- und Inkubationsmedium (beides DMEM) auch hier mit entsprechenden Zusätzen ohne Phenolrot eingesetzt.

4.4 Routinemethoden der Zellkultur

4.4.1 Einfrieren und Auftauen

Die Verfahrensabläufe wurden dabei wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied der Ablösung der Zellen unter Zuhilfenahme einer Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % Lösung (Biochrom) (4.4.2).

4.4.2 Passagieren und Kultivieren

Die Vorgänge wurden wie unter Punkt 2.4.2 Routinemethoden der Zellkultur beschrieben gehandhabt. Allerdings wurden hier die Zellen aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Einflüssen nicht mit einem Zellschaber abgelöst, sondern zunächst mit sterilem PBS gewaschen und dann mit einer Lösung von Trypsin/EDTA 0,05/0,02 % in adäquater Menge versetzt (auf adhärente Endothelzellen in einer Nunclon™-Zellkulturflasche mit ~80 cm² Grundfläche wurden 4 mL Trypsinisierungslösung gegeben). Im Anschluss wurden die Zellen 4 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, um mit Hilfe des Komplexbildners und Enzyms bei optimaler Arbeitstemperatur die Anhaftung der Zellen durch die extrazelluläre Matrix an die Oberfläche der Zellkulturplatte aufzulösen. Mittels mehrmaligem Aufnehmen und Pipettieren der entstandenen Zellsuspension in Voll-Medium mit 10 % FBS wurde durch Überschuss an Proteinen die proteolytische Aktivität des Trypsins daraufhin schnell beendet. Danach wurden die Zellen entsprechend bei 300 g zentrifugiert,

gewaschen, und in der für die jeweiligen Ansätze wie unter 4.7.2, 4.8 oder 3 beschriebenen benötigten Menge ausgesät.

4.4.3 Zellzählung und Vitalitätstest

Die Testungen wurden wie unter 2.4.3 und 2.5 beschrieben durchgeführt.

4.5 L-Arginin-Abhängigkeit der NO-Produktion der eNOS

EA.hy 926 Zellen wurden in einer Menge von $0,3 \times 10^6$ pro well in 6-well Zellkulturplatten (Nunc) ausgebracht und jeweils in 3 mL Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Danach folgte eine Vorbehandlung mit PMA 2 nM für 20 h, um die eNOS Proteinkonzentration in den Zellen zu erhöhen und damit eine höhere Empfindlichkeit des Systems zu erreichen. Die Zellen wurden mit Assay-Puffer (PBS mit Calcium und Magnesium s .1.4) ohne L-Arginin Zusatz zweimal gewaschen und danach mit unterschiedlichen Konzentrationen von L-Arginin-Aspartat (1,5-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 5 min vorinkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente der spezifische eNOS-Inhibitor L-NMMA in einer Konzentration von 1 mM. Danach folgte der Zusatz der Calciumionophore 4-Bromo A-23187 10 μM und DAF-2 0,1 μM in einem Gesamtvolumen von 2 mL pro Ansatz. Nach 35 min bei 37 °C wurden die Überstände abgenommen, 1:1 mit Assay-Puffer verdünnt, zentrifugiert (10 min bei 10 000 g) und in einem Fluoreszenzspektrophotometer (Cary Eclipse, Varian, Walnut Creek, CA, USA) bei einer Exzitationswellenlänge von 494 nm und Emissionswellenlänge von 515 nm mit einer Lichtquellen- und Detektor-Spaltbreite im Strahlengang von 10 nm vermessen.

4.6 Stabilitätsuntersuchungen und fluorimetrische Aktivität von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Resveratrol und M1

Dazu wurden Lösungen von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der einzelnen verwendeten Monomere ((+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Resveratrol, M1) in Assay-Puffer angesetzt und nach 5 min bei Raumtemperatur in einer Spezialglas QS-Küvette (Helma, Müllheim) in einem Fluoreszenzspektrophotometer (Cary Eclipse, Varian) bei einer Exzitationswellenlänge von 494 nm und Emissionswellenlänge von 515 nm mit einer jeweiligen Spaltbreite von 10 nm vermessen. Parallel angesetzte Lösungen gleicher Konzentration wurden gemäß den gewählten Versuchsbedingungen (4.7.2) über 45 min bei 37 °C in geschlossenen

Polypropylen-Gefäßen (Sarstedt) im Brutschrank inkubiert und unter gleichen Bedingungen vermessen. Bei der Programmierung des Fluorometers wurde der Modus der höchsten Empfindlichkeit (high sensitivity mode) gewählt.

4.7 Entwicklung einer HPLC-Methode zur störungsfreien Messung der NO-Freisetzung konstitutiver NO-Synthase im Zellkultursystem

4.7.1 HPLC-Geräte und Bedingungen

Das HPLC-System bestand aus dem Modell 1525 für binäre Hochdruckgradienten als Pumpe, einem In-Line Vakuum Degaser Modell 1525, der Autosampler war das Modell 717plus und der UV/VIS Detektor das Modell 2487; der Hersteller aller dieser Teile war die Firma Waters, Milford, USA. Über ein Satelliten-Interface verbunden war ein Fluoreszenz Detektor Model RF-10A_{XL} von Shimadzu, Kyoto, Japan, bei welchem die Anregungswellenlänge von 494 nm und die Emissionswellenlänge von 515 nm entsprechend den Anregungs- und Emissionsmaxima des DAF-2 bzw. DAF-2T Fluoreszenzspektrums eingestellt wurden. Als Säule für die chromatographische Trennung diente eine dC₁₈ Atlantis[®] Säule (150 x 3.9 mm I.D., 3 µm) von Waters. Der Eluent war ein 10 mM PBS-Puffer mit pH 7,4 und 6 % Acetonitril (V/V). Die Auftrennung der Zellkulturüberstände erfolgte bei Raumtemperatur und einer isokratischen Flußrate von 1 mL/min. Zur Steuerung der Anlage und Datenverarbeitung wurde die Software Breeze[™] Version 3.3. von Waters benutzt.

4.7.2 Versuchsbedingungen und Vorgehensweise

EA.hy926 Zellen in Suspension wurden gezählt und deren Vitalität durch Trypanblau-Färbung getestet, dann in einer Menge von $0,3 \times 10^6$ pro well in 6-well Zellkulturplatten (Nunc) ausgebracht und in 3 mL Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Um entsprechende schnelle Effekte, wie etwa eine direkte Aktivierung der NO-produzierenden Enzyme durch Rezeptorkaskaden z.B. mit Änderung des Phosphorylierungszustandes des Proteins oder einem Ioneneinstrom in die Zelle, und langsamere Effekte, wie etwa eine Veränderung der Proteinexpression, zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit den unterschiedlichen Substanzen 5 min in Assay-Puffer für die Kurzeffekte vorinkubiert oder für die langsameren Effekte 14-24 h zusammen mit den Substanzen in Zellkulturmedium gehalten. Die untersuchten Konzentrationsbereiche für Resveratrol, M1 und (+)-Catechin erstreckten

sich von 0,01-30 $\mu\text{g/mL}$. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Assay-Puffer gründlich gewaschen. Danach wurde dem Assay-Puffer die Calcium-Ionophore 4-Bromo A-23817 in 10 μM und der Fluoreszenz Farbstoff DAF-2 in 5 μM Endkonzentration in einem Endvolumen von jeweils 1,5 mL pro Ansatz zugesetzt.

In Abb. 4.1 ist der Umsatz der Fluoreszenzsonde DAF-2 im Zellkulturüberstand mit nitrosierenden Agentien wie extrazellulärem NO, das von Endothelzellen produziert wurde, zum Produkt DAF-2T gezeigt.

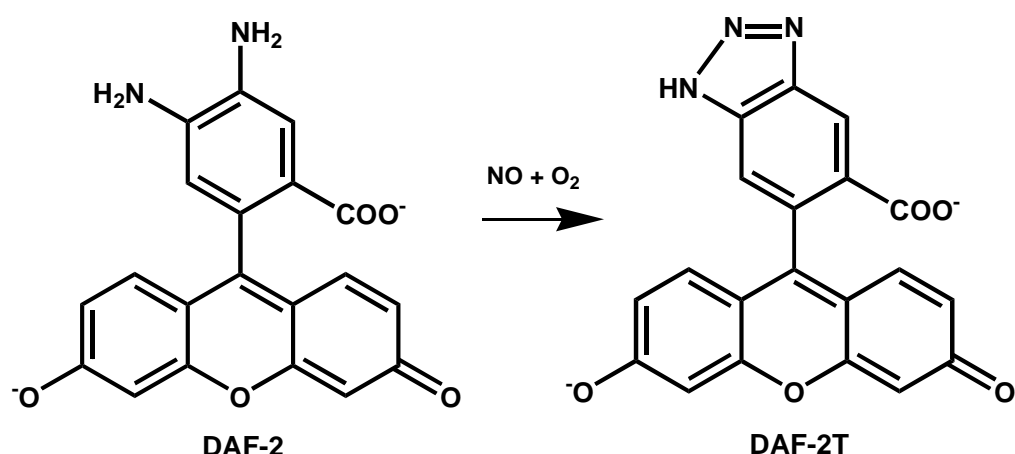


Abb. 4.1: Umsatz von DAF-2 zum Triazol DAF-2T, das eine um den Faktor 200 höhere Quantenausbeute als das Edukt besitzt [41-42], durch nitrosierende Agenzien.

Nach 45 min bei 37 °C im Dunkeln wurden die Überstände abgenommen, 5 min bei 10 000 g zentrifugiert und direkt der HPLC-Analytik unterzogen. Typischerweise wurde 150 μL Zellkulturüberstand als Probe direkt in das analytische System injiziert. Entsprechende Umsatzkontrollen unter den exakt gleichen Bedingungen nur ohne Zellen wurden parallel angesetzt, um z.B. eine (Auto)-Oxidation oder Hintergrund-Konversion des Farbstoffes auszuschließen.

4.7.3 Validierung der DAF-2 HPLC-Methode

4.7.3.1 Validierungsplan

Aufgrund der Tatsachen, dass die Analytik von NO als Radikal an sich besonders aber in komplexen zellulären Systemen mit vielen Fallstricken behaftet ist [36, 279], sollte eine Methode entwickelt werden, mit welcher eine störungsfreie Messung von durch konstitutive NO-Synthasen (eNOS, nNOS) produziertem NO aus kultivierten Zellen auch in Gegenwart von photometrisch und fluorimetrisch aktiven Substanzen möglich ist. Als wichtiger

C Material und Methoden

Parameter für die Eignung, Zuverlässigkeit und Beurteilung der Ergebnisunsicherheit der angewandten Methode wurde die zielgerichtete Überprüfung des mathematischen Zusammenhangs zwischen der im zellulären Kontext unter Assay-Bedingungen freigesetzten NO-Menge und dem davon abhängigen gemessenen Signal erachtet und diese entsprechend durchgeführt. Darüber hinaus wurde – vor allem um falsch-positive Signale auszuschließen – ein besonderes Augenmerk auf die Überprüfung der Robustheit und Verfahrensstabilität hinsichtlich der Eigenschaften und des Verhaltens der Fluoreszenzsonde DAF-2 unter Assay-Bedingungen, zudem bei der Probenvorbereitung und -lagerung unter variierenden Bedingungen gelegt.

4.7.3.2 Linearität und Bestimmungsgrenzen (LLOQs) des Systems

Die Linearität als Validierungsparameter der Methode wurde zunächst für DAF-2T untersucht. Dabei wurden neun äquidistante Konzentrationsniveaus von DAF-2T in Assay-Puffer gelöst (0,025-6,4 nM) und analysiert. Das LLOQ für DAF-2T in Assay-Puffer war 0,05 nM. In Tab. 4.1 sind die entsprechenden Parameter dargestellt:

Tab. 4.1: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter der Kalibriergeraden für DAF-2T Konzentrationen (0,025-6,4 nM) in Assay-Puffer \pm SD (n = 3).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	696600 \pm 1043	-8129 \pm 2570	0,999

Die Parameter für die Absolutmengen von DAF-2T (3,75-960 fmol), die dabei auf der Chromatographie-Säule analysiert wurden, sind in Tab. 4.2 gezeigt. Das LLOQ war hierbei 7,5 fmol DAF-2T.

Tab. 4.2: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter der Kalibriergeraden für absolute analysierte Mengen DAF-2T auf der Säule (3,75-960 fmol) \pm SD (n = 3).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	4644 \pm 6,956	-8129 \pm 2570	0,999

In Abb. 4.2 ist demnach das HPLC-Fluoreszenzsignal des jeweiligen DAF-2T peaks gegen die Konzentration von DAF-2T gelöst in Assay-Puffer aufgetragen.

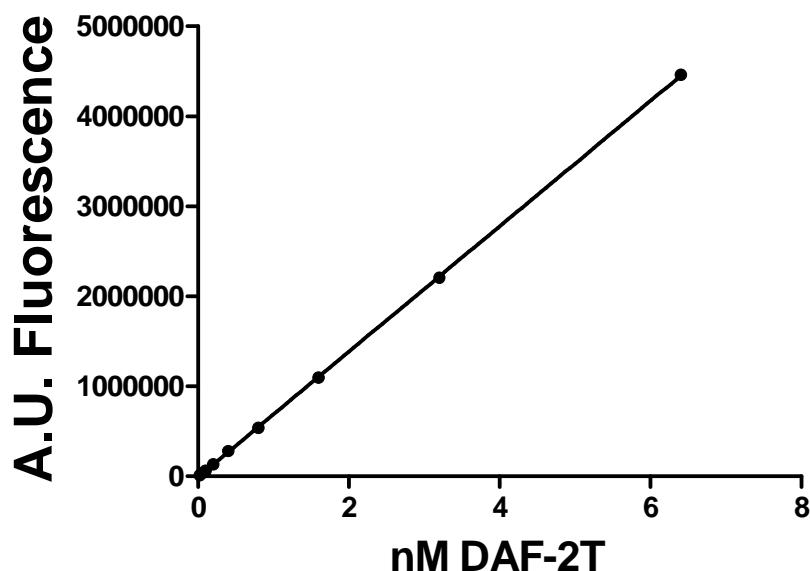


Abb. 4.2: HPLC-Fluoreszenzsignal [A.U.= arbitrary units] gegen die Konzentration von DAF-2T in Assay-Puffer (0,025-6,4 nM; entsprechend den Validierungsparametern der HPLC-Methode in Tab. 4.1) \pm SD mit $n = 3$.

Zusätzlich wurde die Umsetzung von DAF-2 mit NOC-9 unter Assay Bedingungen zum Triazol DAF-2T untersucht. Der NO-Donor NOC-9 hat eine kurze Halbwertszeit von 2,7 min und setzt typischerweise zwei Äquivalente NO frei [276]. 5 μ M DAF-2 wurden mit sechs äquidistanten Konzentrationen NOC-9 (0,625-20 nM) zunächst in Assay-Puffer 45 min inkubiert und danach die Überstände analysiert. Das LLOQ für NOC-9 war dabei 0,625 nM NOC-9. In Tab. 4.3 sind die entsprechenden Parameter dargestellt:

Tab. 4.3: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter für die Kalibriergeraden von mit 5 μ M DAF-2 inkubierten NOC-9 Konzentrationen (0,625-20 nM) und daraus generiertem DAF-2T in Assay-Puffer \pm SD ($n = 3$).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	189100 \pm 3549	-3333 \pm 33450	0,995

C Material und Methoden

Die Parameter der Absolutmengen von durch NOC-9 (0,125-4 nmol pro μmol DAF-2) generiertem DAF-2T, die auf der Säule analysiert wurden, sind in Tab. 4.4 gezeigt. Das LLOQ war hierbei 0,125 nmol NOC-9.

Tab. 4.4: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter für die Kalibriergeraden der absolut analysierten Mengen DAF-2T auf der Säule, welche durch NOC-9 (0,125-4 nmol pro μmol DAF-2) generiert wurden \pm SD (n = 3).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	203,7 \pm 3,869	0,8954 \pm 7,295	0,995

In Abb. 4.3 ist das Fluoreszenzsignal von DAF-2T gegen die Konzentration von NOC-9 umgesetzt mit 5 μM DAF-2 in Assay-Puffer aufgetragen.

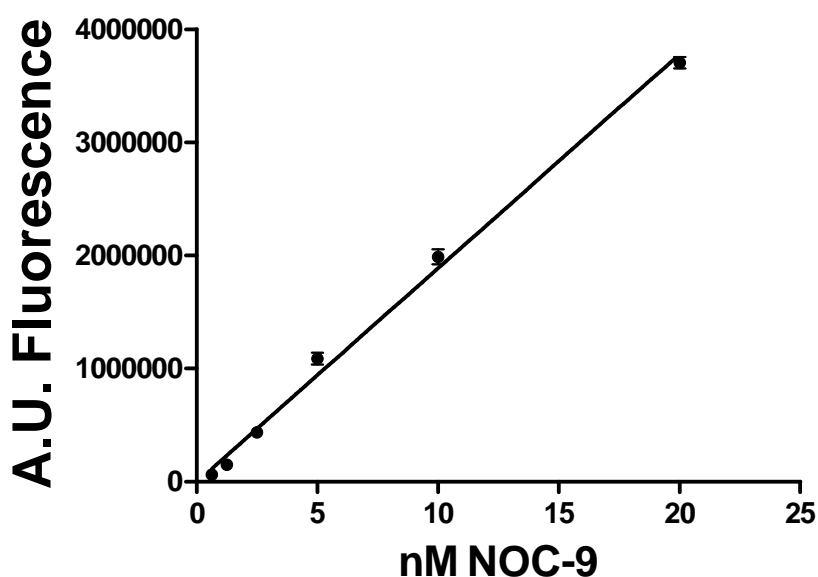


Abb. 4.3: DAF-2T HPLC-Fluoreszenzsignal gegen NOC-9 Konzentrationen (0,625-20 nM) umgesetzt mit DAF-2 5 μM in Assay-Puffer (entsprechend den Validierungsparametern in Tab. 4.3) \pm SD mit n = 3.

Um die NO-Freisetzung unter Assay Bedingungen zu simulieren, wurden Zellen wie unter 4.7.2 beschrieben ausgesät und die Umsetzung von fünf äquidistanten Konzentrationen

NOC-9 (0,625-10 nM) mit DAF-2 im Zellkulturüberstand unter diesen Bedingungen untersucht. Die detektierten NO-Konzentrationen waren etwa um den Faktor zehn geringer im Vergleich zur Inkubation ohne Zellen. Wahrscheinlich wird ein Teil des freigesetzten NO durch die Zellen absorbiert [432]. Das LLOQ lag bei 0,625 nM NOC-9. In Tab. 4.5 sind die Validierungsparameter bezogen auf die entsprechenden Konzentrationen dargestellt:

Tab. 4.5: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter für die Kalibriergeraden von mit 5 µM DAF-2 inkubierten NOC-9 Konzentrationen (0,625-10 nM) und daraus generiertem DAF-2T in Assay-Puffer in Gegenwart von Endothelzellen, ± SD (n = 3).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	27710 ± 1637	3364 ± 8448	0,983

Die Parameter der Absolutmengen von DAF-2T gegen die Absolutmenge von NOC-9 auf der Chromatographie-Säule sind in Tab. 4.6 gezeigt. Das LLOQ war 0,125 nmol NOC-9.

Tab. 4.6: Validierungsparameter Linearität DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode. Dargestellt sind die mit dem Programm GraphPad Prism™ Version 5.00 durch lineare Regressionsanalyse errechneten *best-fit* Parameter für die Kalibriergeraden von absolut analysierten Mengen DAF-2T auf der Säule, die durch NOC-9 (0,125-2 nmol pro µmol DAF-2) in Gegenwart von Endothelzellen in Assay-Puffer generiert wurden, ± SD (n = 3).

Stoff	Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R ²)
DAF-2T	29,77 ± 1,788	2,528 ± 1,845	0,983

In Abb. 4.4 ist das Fluoreszenzsignal des DAF-2T peaks im Chromatogramm gegen die Konzentration von NOC-9 umgesetzt mit 5 µM DAF-2 in Assay-Puffer und zusätzlich in Gegenwart von Endothelzellen unter Assay-Bedingungen aufgetragen, wobei die NO-Eigenproduktion der Zellen jeweils subtrahiert wurde.

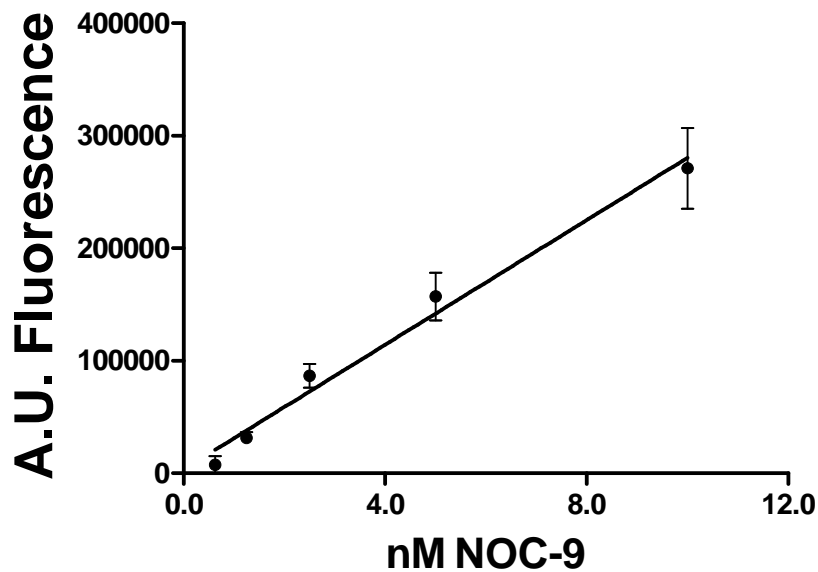


Abb. 4.4: DAF-2T HPLC-Fluoreszenzsignal gegen NOC-9 Konzentrationen (0,625-10 nM) umgesetzt mit 5 μ M DAF-2 in Assay-Puffer in Gegenwart von Endothelzellen (NO-Eigenproduktion der Zellen subtrahiert; entsprechend den Validierungsparametern in Tab. 4.5) \pm SD mit n = 3.

4.7.3.3 Stabilitätsuntersuchungen von DAF-2 und DAF-2T

Da besonders beim Einfrieren und der Lagerung von Proben, die DAF-2 enthielten, Stabilitätsprobleme mit einer Hintergrund-Konversion von DAF-2 zu DAF-2T auftraten, wurde die Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2 und des NO-Adduktes DAF-2T systematisch untersucht. Dazu wurden DAF-2 und DAF-2T in Assay-Puffer in den Konzentrationen wie unter 4.7.2 und 4.7.3 beschrieben (5 μ M bzw. 0,05-6,4 nM) gelöst und verschiedenen Bedingungen mit Zeit- und der Temperaturvariablen (RT= Raumtemperatur; 37 $^{\circ}$ C; -40 $^{\circ}$ C) ausgesetzt. Zu diskreten Zeitpunkten (t= 0, 6, 12, 24 h) wurden Proben gezogen und direkt der HPLC-Analytik zugeführt.

Zusätzlich wurden Nitrit- und Nitrat-Ionen (NaNO_2 bzw. NaNO_3) im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 nM in einem Endvolumen von 1,5 mL des Assay-Puffers, der 5 μ M DAF-2 enthielt, gelöst. Die Behandlung und Prozessabläufe wurden gemäß den Versuchs-Bedingungen bei Vermessung von Zellkulturüberständen eingehalten. Die Lösungen wurden direkt nach dem Herstellen per HPLC-Analytik auf die Anwesenheit von DAF-2T untersucht. Danach wurden die Lösungen für 24 h bei -40 $^{\circ}$ C eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben bei Raumtemperatur (RT= 24 $^{\circ}$ C) wurden die Proben abermals auf den Gehalt von DAF-2T hin untersucht.

4.7.3.4 LC-MS/MS Analytik: Qualitative Verifizierung der Hintergrund-Konversion von DAF-2

Um die Selektivität der DAF-2/DAF-2T HPLC-Methode weiter zu verifizieren, wurden die Versuche, bei welchen eine starke Umwandlung von DAF-2 zum korrespondierenden Triazol DAF-2T aufgrund des Einfrier- und Auftauvorgangs bei -40 °C festgestellt wurde, wiederholt und mittels LC-MS/MS Analytik untersucht.

Dazu wurde DAF-2 (5 µM) in Assay-Puffer gelöst und direkt vor sowie nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus bei -40 °C für 24 h analysiert. 40 µL wurden jeweils in das LC-MS/MS System eingebracht, das aus den Komponenten LC-Hochdruck-Pumpen (1200 series binary pump SL), einem Diodenarray-Detektor (DAD G1315 CID), und einem Triple-Quadrupol Massenspektrometerelement (LC-MS 6460) mit einem Elektronenspray-Interface (ESI) bestand. Alle Geräte waren von Agilent, Santa Clara, CA, USA. Als Säule für die chromatographische Trennung diente eine dC₁₈ Atlantis[®] Säule (150 x 3.9 mm I.D., 3 µm) von Waters. Die mobile Phase mit einer Flussrate von 1 mL/min bestand aus der Komponente A (hochreines Milli-Q Wasser) und Komponente B (Acetonitril; HiPerSolv CHROMANORM[®], VWR). Zur Elution wurde ein schneller Gradientenlauf (20-95 % B in 10 min) angewendet. Die ESI-Quelle befand sich im negativen Modus (ESI-) und wurde mit einer Kapillarspannung von 3500 V betrieben. Der Gasfluss (N₂) war 10 L/min bei einer Temperatur von 300 °C. Der Vernebelungs-Druck wurde bei 45 psi und die Gastemperatur in der Schutzhülle der Vernebelungsdüse bei 350 °C mit einer Flussrate von 10 L/min festgesetzt. Massenspektren im Full-Scan Modus wurden über den Bereich 350-400 *m/z* aufgenommen. Die als Quantifizier bzw. Qualifizier beobachteten Übergänge von DAF-2 bzw. DAF-2T des Multiple-Reaction-Monitoring Modus (MRM-mode) waren ausgehend vom Precursor Ion 361,1 *m/z* zu den Produkt Ionen 316,1 und 275,0 *m/z* für DAF-2, ferner 372,1 *m/z* zu 299,1 und 273,1 *m/z* für DAF-2T. Dabei war die Fragmentor-Spannung jeweils auf 135 V, die Kollisionsenergie auf 20 eV und Fokussierungsdauer auf die entsprechenden Massen (Dwell-time) auf 200 ms eingestellt.

Zur Auswertung und Erstellung der Messmodi wurde die Mass Hunter Optimizer[®]- bzw. Mass Hunter Qualitative Analysis[®]-Software Version B 02.00 von Agilent verwendet.

4.8 Western-Blotting

Die Versuchsabläufe und Verfahrenstechniken der Zellyse, SDS-Page und Blotting-Vorgänge waren analog den in 2.9 beschriebenen. EA.hy 926 Zellen in Suspension wurden gezählt und deren Vitalität durch Trypanblau-Färbung getestet, dann in einer Menge von 0,3

$\times 10^6$ pro well in 6-well Zellkulturplatten (Nunc) ausgebracht und in 3 mL Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen gelöst in Zellkulturmedium für 14-24 h behandelt. Die jeweiligen Konzentrationsbereiche erstreckten sich bei Resveratrol über 1-30 $\mu\text{g/mL}$, bei M1 über 0,01-10 $\mu\text{g/mL}$, bei Pycnogenol®-Gesamtextrakt über 0,01-10 $\mu\text{g/mL}$ und bei Fraktion I des Kiefernrintenextraktes über 0,01-100 $\mu\text{g/mL}$. PMA diente in einer Konzentration von 2 nM als Positivkontrolle zur selektiven Steigerung der eNOS-Proteinexpression [199]. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und wie in 2.9 beschrieben lysiert, aufgearbeitet und die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Konzentration des primären Antikörpers für die eNOS war dabei 1:1200, 1:3000 für β -tubulin AK, beide verdünnt in TBS-T mit 3 % BSA und 0,02 % Natriumazid.

4.9 Untersuchung von Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener Detektionssysteme

Das Ansprechvermögen (engl.: response) im Sinne des detektierten Signals bezogen auf NO-Konzentrationseinheiten verschiedener NO-Analysemethoden wurde verglichen. Unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Agentien stimulierte Endothelzellen, die vorher wie unter 4.7.2 behandelt wurden, dienten dabei als NO-produzierende Quelle. Es wurde die HPLC-Methode mit Verwendung der Fluoreszenz-Sonde DAF-2 (4.7) und die Quantifizierung des NO-Surrogat-Parameters Nitrit (2.7) bei Verwendung der eNOS-Stimulantien (4-Bromo A-23187 10 μM ; VEGF 100 ng/mL) und spezifischem eNOS-Inhibitor (L-NMMA 1 mM) über 45 min im Zellkulturüberstand gegenübergestellt.

5 Untersuchungen methylierter Arginin-Derivate in Plasmaproben mittels kompetitivem ELISA-System

5.1 Studienpopulation, -design und -protokoll

Die klinische Studie wurde unter der Federführung von Frank Enseleit, Klinikum für Kardiologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz, durchgeführt [216]. Eingeschlossen wurden

28 Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK), die durch Koronarangiographie, Kernspinresonanz-abhängige bildgebende Verfahren oder einen positiven Stresstest diagnostiziert wurde. Alle Patienten gaben ihre informierte Einwilligung zur Durchführung der Studie. 23 Patienten beendeten die single-center, prospektive, randomisierte, doppelt-blinde und placebo-kontrollierte Studie. Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und erhielten zunächst für acht Wochen zusätzlich zu ihrer regelmäßigen Medikation Pycnogenol® 200 mg/Tag oder Placebo. Gemäß dem cross-over Design wurde nach einer wash-out Phase von zwei Wochen die Pycnogenol®- oder Placebo-Medikation vice versa verabreicht. Vor Beginn, nach acht, zehn und achtzehn Wochen wurden jeweils Plasmaproben gewonnen und analysiert.

5.2 Kompetitives ELISA-Test-System für ADMA und SDMA

Die Konzentration des asymmetrischen (ADMA) und symmetrischen (SDMA) Dimethylarginin im Plasma der Patienten wurde mittels ELISA-Test von DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, bestimmt. Dabei lag der Messung ein kompetitives Prinzip mit einer vorgeschalteten Derivatisierungsreaktion zugrunde [433], in der die Aminosäuren quantitativ durch N-hydroxysuccinimido-carbonsäure in N-Acyl-ADMA bzw. N-Acyl-SDMA als Antigene mit gesteigerter Immunogenität im Vergleich zu nicht umgesetzten Aminosäuren umgewandelt wurden. Mittels eines Peroxidase-Antikörper-Konjugats (AK-POD), welches gegen den gebundenen N-Acyl-ADMA- bzw. SDMA-Antikörperkomplex gerichtet war, wurde über den Umsatz von Tetramethylbenzidin (TMB) dann das entstehende Signal, das hier indirekt proportional zur entsprechenden ADMA- bzw. SDMA-Konzentration in der Probe war, photometrisch gemessen. Damit dieses Prinzip funktioniert, müssen die freien Bindungsstellen der zugegebenen Antikörper für die Antigen-Strukturen in der Probe und die konkurrierenden, an der Oberfläche gebundenen den limitierenden Faktor darstellen.

Die Validierungsparameter des ADMA-Assays wie vom Hersteller angegeben beinhalteten die Kalibrierfunktion zwischen 0,1 und 5,0 $\mu\text{mol/L}$ mit guten Bestimmtheitsmaßen ($R^2 \geq 0,99$), das LOD (limit of detection; Nachweisgrenze) mit 0,05 $\mu\text{mol/L}$, der Intra-assay-Variationskoeffizient (CV) bei einer Konzentration von 0,66 $\mu\text{mol/L}$ war 5,7 %, bei 1,01 $\mu\text{mol/L}$ 6,4 %, der Inter-assay-Variationskoeffizient war diesbezüglich 8,3 % bzw. 10,3 %. Die cross-Reaktivität mit Arginin und anderen Methylargininen war gering (Arginin < 0,02 %; N^G-monomethyl-L-arginin 1,0 %; SDMA 1,2 %). Die Korrelationskoeffizienten mit LC-MS und GC-MS Daten waren hoch (0,991;

0,984), mit guter Linearität zwischen 0,1 und 5,0 $\mu\text{mol/L}$. Es wurden jeweils 20 μL jeder Plasmaprobe in dem ADMA Assay-System untersucht.

Die Validierungsparameter des SDMA-Assays beinhalteten die Kalibrierfunktion zwischen 0,08 und 3,0 $\mu\text{mol/L}$ mit guten Bestimmtheitsmaßen ($R^2 \geq 0,99$), das LOD (limit of detection; Nachweisgrenze) mit 0,05 $\mu\text{mol/L}$, der Intra-assay-Variationskoeffizient bei einer Konzentration von 0,52 $\mu\text{mol/L}$ war 5,7 %, bei 0,75 $\mu\text{mol/L}$ 6,1 %, und bei 1,72 $\mu\text{mol/L}$ 4,7 %. Die cross-Reaktivität mit Arginin und anderen Methylargininen war gering (Arginin < 0,01 %; N^G -monomethyl-L-arginin 0,7 %; ADMA 0,44 %). Es wurden jeweils 20 μL Plasma in dem SDMA Assay-System untersucht.

5.3 Auswertung und nicht-lineare Regression

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte unter Anwendung des Statistik-Programms GraphPad PrismTM Version 5.00. In Abb. 5.1 sind exemplarisch Kalibrierfunktionen der ADMA- und SDMA-Bestimmungen dargestellt:

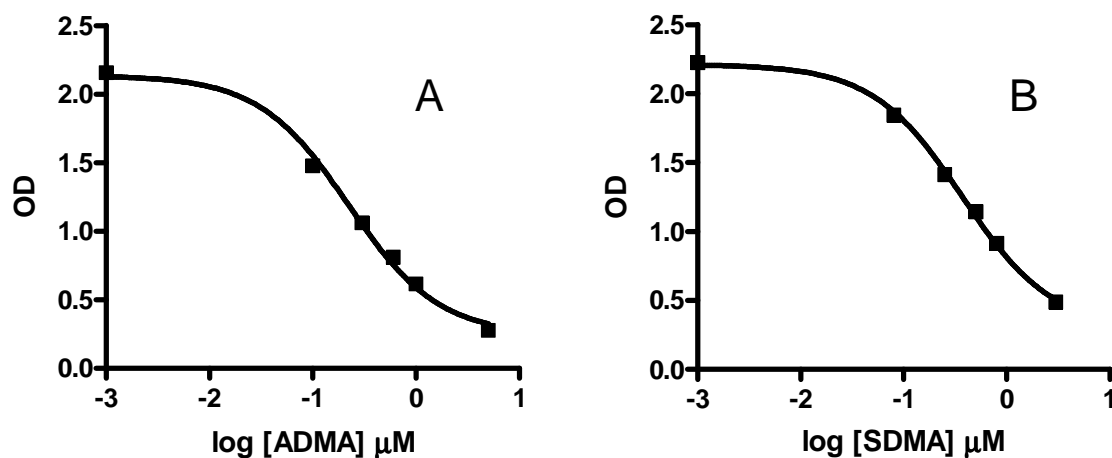


Abb. 5.1: Exemplarische One-site competition Kalibrierfunktionen der ELISA-Systeme für die Messung von ADMA bzw. SDMA in Humanplasma-Proben, OD = Optical density, ausgewertet mit Graph Pad PrismTM Version 5.00. (A) ADMA Kalibrierfunktion ($R^2 = 0,995$), (B) SDMA Kalibrierfunktion mit ($R^2 = 0,998$) mit jeweils Gesamtanzahl der Werte ($n = 6$).

6 Untersuchung von Endothelin-1 (ET-1) in Plasmaproben mittels Sandwich-ELISA

6.1 Studienpopulation, -design und -protokoll

Die Studienparameter entsprachen den in 5.1 beschriebenen.

6.2 Probenaufarbeitung und Extraktion

Die direkte ET-1 Bestimmung aus Plasma gestaltete sich aufgrund der geringen Menge des Antigens und der stark interferierenden Plasma-Proteine im ELISA-System als nicht praktikabel und valide, so dass eine Extraktion und Anreicherung von ET-1 durchgeführt werden musste. Hierbei wurden in Anlehnung an das Vorgehen von Abdel-Sayed et al. [434] 500 μL Plasma mit 650 μL eiskalter Extraktionsmischung (Aceton: 1 N HCL: Milli-Q Wasser (40:1:5)) versetzt, sofort gemischt, und in einer auf 4 $^{\circ}\text{C}$ gekühlten Zentrifuge bei 15 000 g für 15 min zentrifugiert. Die gesamte Pipettierarbeit wurde dabei in einem Kühlraum bei 4 $^{\circ}\text{C}$ mit vorgekühlten Plastikgefäßen und -spitzen durchgeführt, um die Flüchtigkeit der Extraktionsmischung auf ein Minimum zu reduzieren. Von dem erhaltenen Überstand wurden 900 μL abgenommen, unter gleichmäßigem Strom von N_2 abgedampft und der Rückstand danach in 120 μL Assay-Puffer aufgenommen. 100 μL dieser Lösung wurden in dem Assay-System eingesetzt.

6.3 Sandwich-ELISA-System für Endothelin-1 (ET-1)

Als sensibles Assay-Prinzip, um die geringe zu erwartende Antigenmenge im Plasma zu bestimmen, wurde das ELISA-Sandwich-Testsystem von Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA, gewählt. Die Sensitivität des Assays für ET-1 war nach Angaben des Herstellers 0,41 pg/mL , die Intra-assay-Variationskoeffizienten waren 6,7 % bei 35,9 pg/mL , 8,9 % bei 2,3 pg/mL und 8,8 % bei 1,1 pg/mL . Die cross-Reaktivität mit human Big ET-1, ET-2 und ET-3 war insgesamt gering (human Big ET-1 < 0,1 %; ET-2 21 %; ET-3 3,6 %). Die Kalibrierfunktion wurde über den Bereich zwischen 0,78 pg/mL bis 3,13 pg/mL mit jeweils guter Linearität ($R^2 \geq 0,99$) erstellt.

7 Untersuchungen der nNOS

7.1 Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien

- Dibutyryl-cAMP, ein zellpermeables Analogon von cAMP (= zyklisches Adenosinmonophosphat) zur Aktivierung von intrazellulären Proteinkinasen, Enzo; Stammlösungskonzentration (0,2 mol/L)
- Polyklonaler Rabbit nNOS-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- Rat Brain Lysat, nNOS Positivkontrolle, Santa Cruz

7.2 Zellkultur

Die Rhabdomyosarkom-Zelllinie A-673 [240] wurde von CLS-Cell Line Services, Eppelheim, bezogen.

7.3 Medien

Wie unter Punkt 2.3 beschrieben wurde das Kultur- und Inkubationsmedium (beides DMEM) auch hier mit entsprechenden Zusätzen angesetzt, allerdings war im Unterschied hier jeweils der Indikator Phenolrot und Natrium-Pyruvat (1 mM) zusätzlich enthalten.

7.4 Routinemethoden der Zellkultur

Die Prozesse und Arbeitsabläufe des Einfrier- und Auftau-Vorgangs, Passagierens und Kultivierens der Zellen, sowie der Zellzählung und der entsprechenden Vitalitätstests wurde in gleicher Verfahrensweise wie bei den EA.hy 926 Endothelzellen beschrieben durchgeführt (s. 4.4). Aufgrund der Empfindlichkeit der A-673 Zellen mussten diese im Unterschied zu den endothelialen und mononukleären Zellen nur für einen sehr kurzen Zeitraum (< 1 min) mit der Trypsin/EDTA 0,05/0,02 %-Lösung zur Ablösung von den Plastikoberflächen behandelt werden.

7.5 Western-Blotting

Die Versuchsabläufe und Verfahrenstechniken der Zellyse, SDS-Page und Blotting-Vorgänge waren analog den in 2.9 und 4.8 beschriebenen. Im Unterschied zu der dort beschriebenen Vorgehensweise wurde für die Zellyse der A-673 Zellen mit entsprechender Ultraschallbehandlung aufgrund der großen Empfindlichkeit der Zellen und des auftretenden Problems der massiven Viskositätserhöhung durch frei werdende DNA-Fragmente ein anderer Lyse-Puffer (modifizierter RIPA-Puffer; RIPA= Radio Immuno Precipitation Assay [435]) verwendet (Tab. 7.1).

Tab. 7.1: Modifizierter RIPA-Puffer

Stoff	Molekulargewicht M_w [g/mol]	Konzentration c [mmol/L]
Tris-HCL	157,59	50
NaCl	58,44	150
EDTA	372,24	1,0
Triton-X 100		1 % (V/V)
SDS 20% Lsg.		0,5 % (V/V)
Complete, EDTA free		1/2 Tablette, gelöst in 1 mL Milli-Q H ₂ O
Milli-Q H ₂ O ad 25mL pH = 7,4		

7.6 Computer-basierte Entwicklung eines Modells zur Vorhersage des Blut-Hirnschranken-Übertritts ausgewählter Flavonoide und Metabolite

7.6.1 Verwendete Programme

- KNIME, Konstanz Information Miner, Version 2.5.1
- MOE, Molecular Operating Environment, Version 2010.10, Chemical Computing Group, Montreal, Kanada
- R, Statistical Computing, Version 2.13.2
- GraphPadPrism™, Version 5.00

7.6.2 Verwendete molekulare Deskriptoren (MOE)

Die Deskriptoren wurden entsprechend den in vorherigen publizierten Arbeiten zumeist verwendeten [347, 436] sowie zusätzlich als plausibel hinsichtlich der Blut-Hirnschranken-Gängigkeit erscheinenden ausgewählt (s. Tab. 7.2).

Tab. 7.2: Verwendete MOE-Deskriptoren mit Beschreibungen des Programms.

MOE-Deskriptor		
logP (o/w)	Log of the octanol/water partition coefficient (including implicit hydrogens). This property is calculated from a linear atom type model [437] with $R^2 = 0,931$, RMSE= 0,393 on 1847 molecules.	2D
SlogP	Log of the octanol/water partition coefficient (including implicit hydrogens). This property is an atomic contribution model [438] that calculates logP from the given structure; i.e., the correct protonation state (washed structures). Results may vary from the logP(o/w) descriptor. The training set for SlogP was ~7000 structures.	2D
TPSA	Polar surface area calculated using group contributions to approximate the polar surface area from connection table information only. The parameterization is that of Ertl et al. [439].	2D
Weight	Molecular weight (including implicit hydrogens) with atomic weights taken from [440].	2D
ASA	Water accessible surface area calculated using a radius of 1,4 Angström for the water molecule. A polyhedral representation is used for each atom in calculating the surface area.	3D
ASA_H	Water accessible surface area of all hydrophobic ($ q_i < 0.2$) atoms.	3D
ASA_P	Water accessible surface area of all polar ($ q_i \geq 0.2$) atoms.	3D
glob	Globularity or inverse condition number (smallest eigenvalue divided by the largest eigenvalue) of the covariance matrix of atomic coordinates. A value of 1 indicates a perfect sphere while a value of 0 indicates a two- or one-dimensional object.	3D
lip_acc	The number of O and N atoms.	2D
lip_don	The number of OH and NH atoms.	2D
vsa_acid	Approximation to the sum of VDW (= van der Waals) surface areas of	2D

	acidic atoms.	
vsa_base	Approximation to the sum of VDW surface areas of basic atoms.	2D

7.6.3 Datensätze

Der Trainingsdatensatz (logBB-united, mit $n = 177$ Strukturen) setzte sich aus den in experimentellen Ansätzen erhaltenen logBB-Werten zusammen, die jeweils von Subramanian und Kitchen [330], von Lobell, Molnar und Keseru [327], und von Norinder, Osterberg und Sjoberg [441] zuvor publiziert wurden. Teile des Datensatzes wurden bereits in der Diplomarbeit (Titel: „Vorhersage der Blut-Hirnschrankengängigkeit von Molekülen durch künstliche neuronale Netzwerke“, Goethe Universität Frankfurt am Main, Betreuer: Prof. Dr. Gisbert Schneider) von Dr. Manuel Nietert verwendet. Der vom Trainingsdatensatz unabhängige Validierungsdatensatz ($n = 181$ Strukturen) wurde in der Arbeit von Subramanian und Kitchen bereits zuvor eingesetzt [330]. Die Datensätze wurden in das Programm MOE eingelesen, energetisch minimiert, entsprechend physiologisch protoniert, die in 7.6.2 beschriebenen molekularen Deskriptoren berechnet und im SDF-Format (= Structure-Data file) dem Programm KNIME zur weiteren Bearbeitung übergeben.

7.6.4 Aufbau des Modells

quality checks - picked single descriptor columns should already correlate with target column values

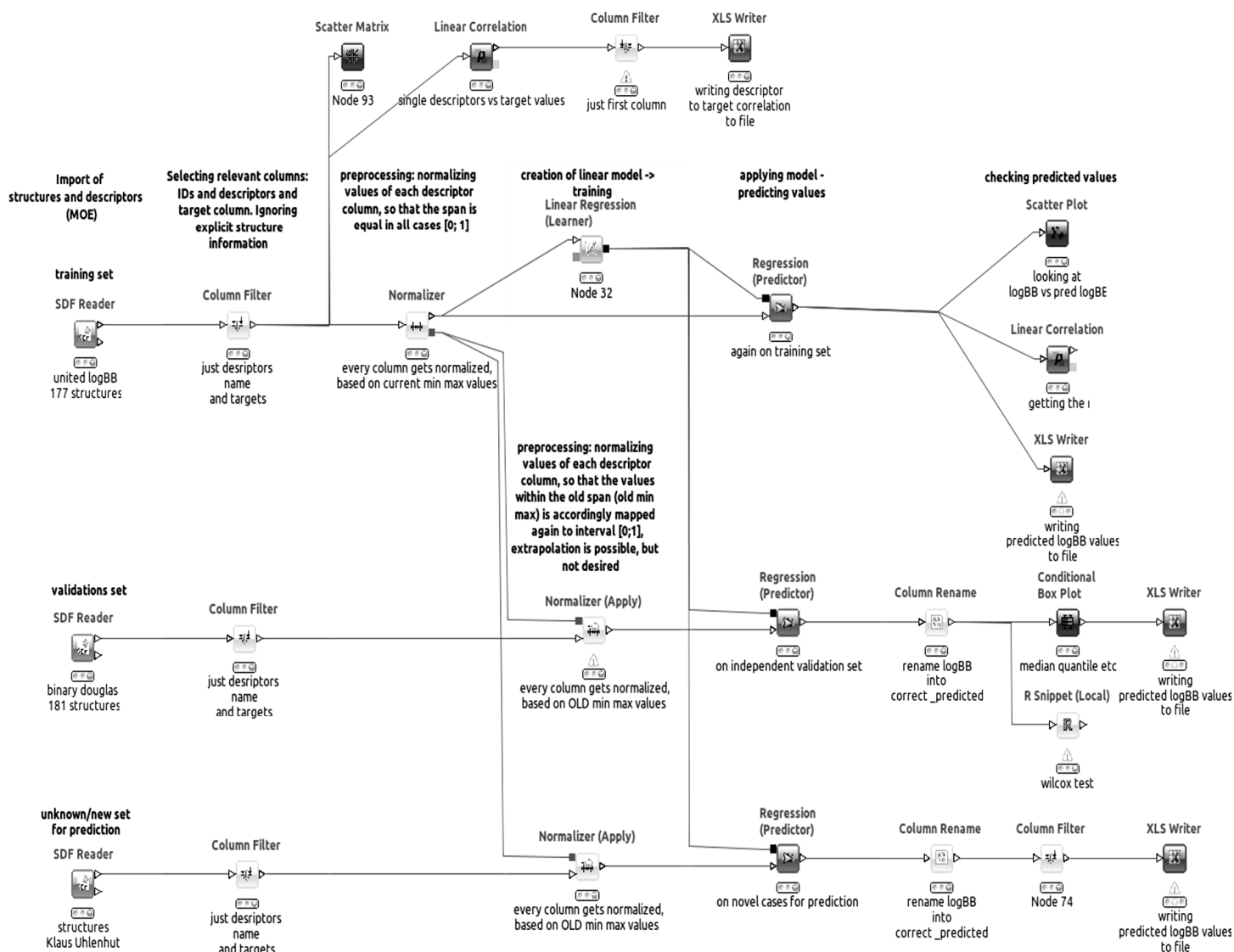


Abb. 7.1: Darstellung des KNIME-Workflows zur Erstellung des Computer-basierten Blut-Hirnschrankenmodells. Auf der linken Seite werden die Molekül-Daten samt Deskriptoren (Trainingsdatensatz, Validierungsdatensatz, unbekannte Strukturen) dem System übergeben, in der Mitte das Modell trainiert (Node 32; multiple linear Regression, „Learner“), dann die Werte vorhergesagt (Regression, „Predictor“), auf der rechten Seite entsprechend statistisch ausgewertet und für den Export in andere Programme zugänglich gemacht.

Die entsprechenden KNIME-files und die Datensätze im SDF-Format sind auf Anfrage bei Frau Prof. Dr. Petra Högger, Klaus Uhlenhut oder Dr. Manuel Nietert in elektronischer Form erhältlich.

8 Untersuchung des Einflusses eines Noni-Extraktes auf die MMP-9 Freisetzung aus primären, humanen Monozyten

8.1 Spezielle Materialien, Chemikalien und Reagenzien

- Noni-Extrakt in Lösung wurde freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Johannes Westerndorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt; Stammlösung: 340 mg des speziell aufgearbeiteten [374] Extraktes wurden in 1 mL DMSO gelöst
- ELISA-kit Quantikine™, Human MMP-9 (total) Immunoassay, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
- Hydrocortison- und LPS-Stammlösungen wie unter 2.1 beschrieben
- Oak-Ridge-Zentrifugenröhrchen, Merck, Darmstadt

8.1.1 Trennlösungen zur modifizierten, isopyknischen Dichtegradienten-Zentrifugation

- Biocoll- oder Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/mL, isotonisch, Biochrom
- Percoll-Trennlösung, Dichte 1,124 g/mL, Biochrom
- Percoll-Mischung (Percoll-Trennlösung: Earle's Salzlösung: MEM-Spinner (46:5:49 V/V))

8.2 Medien

- McCoy's 5A modifiziertes Flüssigmedium, Biochrom
- Minimal Essential Medium Eagle (MEM), Spinner Modifikation, Sigma-Aldrich
- MEM-Earle's Salzlösung (10 x), Biochrom

Die entsprechenden Serum- und Antibiotika sowie Aminosäure-Zusätze wurden wie unter 2.3 beschrieben hinzugefügt.

8.3 Isolierung humaner Monozyten

Humane Monozyten wurden mittels eines in unserem Arbeitskreis etablierten Dichtegradienten-Protokolls isoliert wie zuvor bereits ausführlich beschrieben [442]. Kurz zusammenfassend konnten dabei diskrete Leukozytenpopulationen als Banden in Gradientensystemen durch Aufladen von Zellmaterial aus Leukocytendepletionsfiltern [443], buffy coats, LRC-S (leucocyte reduction chambers) [444] oder aus Vollblutkonserven durch zwei aufeinander folgende Zentrifugationen mit anschließenden Waschschritten isoliert werden. Für die konkrete Isolierung von Monozyten wurden hier die Zellsuspensionen zunächst auf einen Ficoll-Gradienten vorsichtig aufgeladen (30 mL Blutzellsuspension auf 20 mL Ficoll-Gradient) und dann bei 604 g für 40 min ohne Bremse zentrifugiert.

Die gewünschten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) bestehend aus Monozyten, Lymphozyten aber auch samt Thrombozyten, reicherten sich bei einer derartigen isopyknischen Zentrifugation aufgrund Ihrer Dichten über der Ficoll-Flüssigkeit an, wo sie vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt werden konnten. Durch anschließendes, mehrmaliges Waschen mit MEM-Spinner Medium wurden die Thrombozyten weitestgehend entfernt. Das Zellpellet bestand aus Erythrozyten und Granulozyten und wurde verworfen. Da die Dichten von Monozyten und Lymphozyten nahe beieinander liegen, bedurfte es somit eines weiteren Gradientensystems, um die beiden Zellpopulationen aufzutrennen. Dies wurde mit einem präformierten Percoll-Gradient erreicht, wobei 30 mL Percoll-Mischung 60 min lang bei 3345 g, RT, ohne Bremse zentrifugiert wurden, danach eine konzentrierte Suspension aus mononuklearen Zellen ($5 \cdot 10^8$ Zellen absolut in 2-3 mL MEM-Spinner Medium) vorsichtig aufgeladen und anschließend bei 1011 g für 25 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert wurde.

Die oberste, deutlich weiße Bande repräsentierte die angereicherte Monozytenpopulation, die vorsichtig abgenommen, gewaschen, auf die adäquate Zellzahl eingestellt ($1 \cdot 10^6$ /mL) und entsprechend in 24-well Zellkulturplatten für die entsprechenden Versuchsansätze in McCoy's 5a Medium ausgebracht wurde.

Die Zellen wurden für 12 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und danach der Assay wie unten beschrieben durchgeführt.

8.4 Versuchsbedingungen, Inkubation und Stimulation der Monozyten

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und frisches Medium mit entsprechender Menge Noni-Extrakt (1:100, 1:200, 1:500 verdünnt in McCoy's 5a Medium) wurde hinzugefügt und für 1 h im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Konzentration des Vehikels DMSO war hierbei in jedem Fall $\leq 1\%$ (V/V) bezogen auf das Endvolumen von 1 mL im well. Danach wurde jeweils LPS für die Endkonzentration von 10 ng/mL zugegeben und die Zellen weitere 24 h bei 37 °C im Brutschrank gehalten. Kontrollexperimente mit ausschließlich den entsprechenden Vehikelkonzentrationen (DMSO) wurden parallel angesetzt und gleich behandelt. Als Negativ-Kontrolle für den Entzündungsreiz und dessen Einfluß auf die MMP-9 Sekretion diente Hydrocortison in einer Endkonzentration von 10^{-5} M. Vor Abnahme der Überstände wurden die Zellkulturplatten bei 300 g für 4 min zentrifugiert. Alle Ansätze wurden in dreifacher, separater Ausführung (n = 3) angesetzt.

8.5 Bestimmung der MMP-9 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels Sandwich-ELISA System

Hier wurde ein sensitives Sandwich-ELISA System gewählt, bei welchem die gemessenen Absorptionswerte direkt proportional zur im Medium vorhandenen Konzentration von MMP-9 waren und somit im erwarteten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Absorptionmesswerten und MMP-9 Konzentration bestand. Die nach der entsprechenden Inkubationszeit abgenommenen Zellkultur-Überstände wurden zunächst 5 min bei 10 000 g zentrifugiert, 1:25 mit Calibrator Diluent RD5-10 nach Anweisungen des Herstellers verdünnt, und danach typischerweise 100 µL des verdünnten Überstand als Probelösung im ELISA-System eingesetzt.

Die genannten Validierungsparameter des Assays waren entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt: Linearität war zwischen 0,31 ng/mL und 10 ng/mL MMP-9 Konzentration mit guten Bestimmtheitsmaßen ($R^2 \geq 0,99$) gegeben, die mittlere Wiederfindung in verschiedenen Matrices (Zellkulturmedium, Serum, Speichel, Urin) war $\geq 90\%$ (n = 4-5). Bei der Intra-assay Präzision (n = 20) lag der Variationskoeffizient (CV) bei drei unterschiedlichen Konzentration (0,83 ng/mL, 2,04 ng/mL, 11,00 ng/mL) zwischen 1,9 und 2,9 %, bei der Inter-assay Präzision (n = 40) lag der CV bei drei verschiedenen Konzentrationen (0,97 ng/mL, 2,35 ng/mL, 12,2 ng/mL) zwischen 6,9 und 7,9 %. Das LOD (limit of detection; Nachweisgrenze) war 0,16 ng/mL. Die Spezifität und cross-Reaktivität

C Material und Methoden

waren sehr niedrig mit schwacher Interferenz der Faktoren rhTIMP-1 und TIMP-1 bei Konzentrationen größer als 6,25 bzw. 200 ng/mL.

D Tabellarischer Anhang

1 Zytotoxizität von M1 in murinen Makrophagen (RAW 264.7)

x-fache Kontrolle	I	II	III	MW	MD
M1 [$\mu\text{g/mL}$]					
Co	0,98	1,00	1,02	1,00	0,01
ZnCl ₂ 50 $\mu\text{g/mL}$	0,32	0,34	0,33	0,33	0,01
DMSO 10 % (V/V)	0,17	0,17	0,16	0,17	0,00
M1 0,1	1,16	1,27	1,19	1,21	0,04
M1 1	1,10	1,16	1,06	1,11	0,03
M1 10	0,93	1,12	0,98	1,01	0,07
M1 25	0,90	1,06	0,93	0,96	0,07
M1 50	0,88	0,83	0,85	0,85	0,01
M1 100	0,78	0,58	0,72	0,70	0,07

MD= mean deviation (mittlere Abweichung vom Mittelwert)

MW= Mittelwert

2 Inhibierung der NO-Freisetzung muriner Makrophagen (RAW 264.7) durch M1

2.1 Inhibierung der NO-Freisetzung durch M1 im Vergleich zu Hydrocortison und Fraktion I des Kiefernringenextraktes

x-fache Kontrolle	I	II	III	MW	MD
Co	1,03	1,03	0,95	1,00	0,04
L-NIL 1 mM	0,08	0,12	0,07	0,09	0,02
HC 36,25 µg/mL	0,59	0,64	0,52	0,58	0,05
M1 1 µg/mL	0,49	0,57	0,43	0,50	0,05
FI 1 µg/mL	0,82	0,78	0,69	0,77	0,05

[µmol Nitrit/g Protein]	I	II	III	MW	SD
Co	19,03	18,60	17,48	18,37	0,80
L-NIL 1 mM	1,46	2,17	1,25	1,63	0,48
HC 36,25 µg/mL	10,72	11,59	9,29	10,53	1,16
M1 1 µg/mL	9,00	10,76	7,88	9,21	1,45
FI 1 µg/mL	15,24	14,24	13,01	14,16	1,11

SD= standard deviation (Standardabweichung)

2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung der NO-Freisetzung aus murinen Makrophagen durch M1

x-fache Kontrolle	I	II	III	IV	MW	SD
M1 [$\mu\text{g/mL}$]						
Co	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
L-NIL 1 mM	0,06	0,09	0,10	0,11	0,09	0,02
M1 0,1	0,97	1,00	0,98	1,03	0,99	0,02
M1 1	0,61	0,52	0,59	0,62	0,58	0,05
M1 10	0,06	0,13	0,10	0,24	0,13	0,08
M1 25	0,08	0,16	0,07	0,20	0,13	0,07
M1 50	0,01	0,03	0,07	0,03	0,03	0,02

[$\mu\text{mol Nitrit/g Protein}$]	I	II	III	IV	MW	SD
M1 [$\mu\text{g/mL}$]						
Co	22,13	10,20	25,38	6,67	16,10	9,06
L-NIL 1 mM	1,46	1,01	2,35	0,68	1,38	0,72
M1 0,1	21,92	8,97	24,65	6,28	15,45	9,17
M1 1	13,73	5,12	14,48	3,91	9,31	5,57
M1 10	1,30	1,44	2,63	1,57	1,73	0,61
M1 25	1,80	1,83	2,01	1,36	1,75	0,28
M1 50	0,22	0,35	1,96	0,20	0,68	0,85

2.3 Densitometrische Auswertung der Western-Blots zur Untersuchung des Einflusses von M1 auf die iNOS-Proteinexpression

x-fache Kontrolle M1 [$\mu\text{g/mL}$]	I	II	III	MW	MD
	Co -	0,01	0,05	0,06	0,04
Co +	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
M1 1	1,01	0,47	0,80	0,76	0,19
M1 10	0,55	0,13	0,20	0,29	0,17
M1 25	0,30	0,03	0,12	0,15	0,10
M1 50	0,05	0,03	0,08	0,05	0,02

3 Sorption M1 an/in humane Monozyten, Endothelzellen und murine Makrophagen

3.1 Humane primäre Monozyten

Quotient Probe/Co Zeit [min]	<i>M1 ohne Phloretin</i>					<i>M1 mit Phloretin</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
	0	0,91	0,92	0,92	0,92	0,01	0,96	1,05	0,91	0,97
5	0,91	0,86	0,87	0,88	0,03	0,92	0,98	0,97	0,96	0,03
15	0,79	0,73	0,72	0,75	0,04	0,88	0,97	0,99	0,95	0,06
30	0,62	0,55	0,65	0,61	0,05	0,76	0,71	0,79	0,75	0,04
60	0,34	0,31	0,34	0,33	0,02	0,59	0,79	0,60	0,66	0,11
120	0,08	0,07	0,07	0,07	0,01	0,45	0,36	0,33	0,38	0,06

3.2 Murine Makrophagen (RAW 264.7)

Quotient Probe/Co Zeit [min]	<i>M1 ohne Phloretin</i>					<i>M1 mit Phloretin</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
	0	1,02	1,03	1,03	1,03	0,01	0,97	0,95	0,95	0,96
5	0,96	0,93	0,96	0,95	0,02	0,96	0,98	0,94	0,96	0,02
15	0,87	0,84	0,88	0,86	0,02	0,93	0,92	0,98	0,94	0,03
30	0,73	0,67	0,72	0,71	0,03	0,88	0,86	0,90	0,88	0,02
60	0,50	0,47	0,67	0,55	0,11	0,75	0,74	0,76	0,75	0,01
120	0,54	0,38	0,41	0,44	0,09	0,55	0,47	0,48	0,50	0,04

3.3 Humane Endothelzellen (EA.hy 926)

Quotient Probe/Co Zeit [min]	<i>M1 ohne Phloretin</i>					<i>M1 mit Phloretin</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
	0	1,01	1,02	1,01	1,01	0,01	1,00	1,01	0,98	1,00
5	1,00	0,82	0,83	0,88	0,10	0,98	0,99	0,94	0,97	0,03
15	0,75	0,71	0,93	0,80	0,12	1,08	1,12	0,79	1,00	0,18
30	0,56	0,54	0,67	0,59	0,07	0,82	0,96	0,71	0,83	0,13
60	0,42	0,31	0,72	0,48	0,21	0,91	0,99	0,59	0,83	0,21
120	0,30	0,23	0,20	0,24	0,05	0,53	0,37	0,25	0,38	0,14

3.4 Verhältnisse der Kontrollversuche mit und ohne Phloretin

Quotient Co/Co+Phloretin Zeit [min]	<i>Humane Monozyten</i>					<i>Murine Makrophagen</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
	0	1,01	1,04	0,96	1,00	0,04	1,02	1,00	0,99	1,00
5	0,99	1,04	1,04	1,02	0,03	1,00	0,99	0,96	0,98	0,02
15	1,03	1,09	1,09	1,07	0,03	0,99	1,02	1,00	1,00	0,02
30	1,03	1,27	1,00	1,10	0,15	1,01	1,00	1,00	1,00	0,01
60	0,98	1,07	0,95	1,00	0,06	0,97	0,96	0,99	0,97	0,02
120	0,87	1,11	0,99	0,99	0,12	0,92	0,92	0,94	0,93	0,01

4 Einflüsse von (+)-Catechin, Metabolit M1 und Resveratrol auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen

4.1 Akute, kurzzeitige Effekte auf die NO-Freisetzung

x-fache Kontrolle	<i>(+)-Catechin</i>					<i>Metabolit M1</i>					<i>Resveratrol</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
Co	0,98	0,95	1,07	1,00	0,06	1,02	0,99	0,99	1,00	0,02	1,05	0,99	0,97	1,00	0,04
L-NMMA	0,03	0,05	0,03	0,04	0,01	0,03	0,05	0,05	0,04	0,01	0,09	0,08	0,08	0,08	0,01
0,01	0,54	0,54	0,53	0,54	0,01	0,75	0,73	0,68	0,72	0,04	0,79	0,88	0,86	0,84	0,05
0,1	0,12	0,11	0,14	0,12	0,02	0,34	0,32	0,26	0,31	0,04	0,59	0,55	0,55	0,56	0,02
1	0,02	0,04	0,02	0,03	0,01	0,07	0,05	0,07	0,06	0,01	0,18	0,18	0,16	0,17	0,01
10	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,08	0,07	0,08	0,08	0,01

L-NMMA-Konzentration= 1 mM

4.2 Langzeit-Effekte auf die NO-Freisetzung

x-fache Kontrolle [µg/mL]	<i>(+)-Catechin</i>					<i>Metabolit M1</i>					<i>Resveratrol</i>				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
Co	1,01	1,00	0,99	1,00	0,01	1,02	1,00	0,99	1,00	0,02	0,99	1,01	1,00	1,00	0,01
PMA 2 nM	1,23	1,44	1,42	1,36	0,12	1,80	1,65	1,69	1,71	0,08	1,85	1,87	1,90	1,87	0,03
0,01	1,16	0,95	0,97	1,03	0,12	1,18	1,00	1,13	1,10	0,09					
0,1	0,90	0,86	0,90	0,89	0,02	0,95	0,98	0,96	0,96	0,02					
1	0,61	0,63	0,66	0,63	0,03	1,01	1,00	1,05	1,02	0,03	1,03	1,04	1,04	1,04	0,01
10	0,57	0,69	0,71	0,66	0,08	0,85	0,82	0,83	0,83	0,02	0,85	0,86	0,84	0,85	0,01
20											0,63	0,61	0,60	0,61	0,02
30											0,45	0,49	0,45	0,46	0,02

5 Einfluss von L-Arginin-Aspartat auf die NO-Freisetzung aus Endothelzellen

x-fache Kontrolle L-Arg-Asp [µM]	I	II	III	MW	SD
Co	0,94	1,04	1,02	1,00	0,05
L-NMMA 1 mM	0,12	0,19	0,18	0,16	0,04
5	0,96	1,07	1,25	1,09	0,15
50	1,31	1,41	1,36	1,36	0,05
500	1,38	1,50	1,46	1,45	0,06
5000	1,65	1,74	1,56	1,65	0,09

6 ADMA-Freisetzung aus Endothel- und Rhadomyosarkomzellen

ADMA [μM]	<i>EA.hy 926</i>				<i>A-673</i>			
	I	II	MW	MD	I	II	MW	MD
0	0,329	0,296	0,313	0,017	0,404	0,390	0,397	0,007
3	0,396	0,324	0,360	0,036	0,487	0,494	0,490	0,003
6	0,459	0,348	0,404	0,056	0,560	0,555	0,557	0,002
12	0,476	0,417	0,447	0,029	1,299	1,168	1,233	0,065
24	0,518	0,537	0,528	0,009	1,222	1,526	1,374	0,152
48	0,651	0,604	0,627	0,024	2,735	3,129	2,932	0,197

7 ADMA-, SDMA-, und ET-1 Bestimmung in Plasmaproben der klinischen Studie

ADMA [μM]	<i>Pycnogenol[®]</i>		<i>Placebo</i>	
	vorher	nachher	vorher	nachher
1	0,43	0,50	0,43	0,68
2	0,52	0,59	0,50	0,49
3	0,55	0,52	0,63	0,49
5	0,38	0,61	0,40	0,64
6	0,80	0,70	0,72	0,73
22	0,36	0,44	0,56	0,32
7	0,50	0,46	0,35	0,48
9	0,59	0,48	0,41	0,49

D Tabellarischer Anhang

10	0,49	0,76	0,63	0,62
11	0,47	0,44	0,55	0,58
13	0,51	0,44	0,54	0,68
14	0,47	0,40	0,36	0,37
15	0,42	0,41	0,43	0,52
16	0,57	0,53	0,41	0,50
17	0,52	0,54	0,36	0,48
18	0,38	0,36	0,43	0,49
19	0,55	0,58	0,44	0,59
20	0,37	0,40	0,42	0,34
21	0,30	0,49	0,46	0,42
24	0,51	0,49	0,38	0,44
25	0,50	0,31	0,21	0,43
26	0,39	0,33	0,48	0,39
27	0,32	0,38	0,26	0,28

SDMA [μ M]	<i>Pycnogenol</i> [®]		<i>Placebo</i>	
	vorher	nachher	vorher	nachher
1	0,68	0,37	0,41	0,49
2	0,42	0,53	0,34	0,36
3	0,53	0,94	0,43	0,62
5	0,37	0,42	0,26	0,28
6	0,78	0,42	0,57	0,75
22	0,49	0,61	0,36	0,52
7	0,43	0,45	0,50	0,38

9	0,58	0,32	0,56	0,58
10	0,38	0,53	0,45	0,71
11	0,22	0,41	0,36	0,57
13	0,29	0,33	0,55	0,28
14	0,40	0,46	0,33	0,71
15	0,45	0,52	0,51	0,57
16	0,48	0,53	0,60	0,68
17	0,48	0,50	0,29	0,47
18	0,35	0,41	0,41	0,52
19	0,51	0,48	0,40	0,38
20	0,47	0,52	0,58	0,55
21	0,28	0,57	0,54	0,52
24	0,54	0,49	0,73	0,53
25	0,46	0,26	0,28	0,34
26	0,50	0,34	0,48	0,48
27	0,67	0,51	0,36	0,42

ET-1 [pg/mL]	<i>Pycnogenol[®]</i>		<i>Placebo</i>	
	vorher	nachher	vorher	nachher
1	1,22	1,68	1,20	1,15
2	0,92	1,09	1,16	0,84
3	1,05	1,29	1,37	0,95
5	1,05	1,33	1,17	1,44
6	2,14	1,30	1,88	1,92
7	1,19	1,38	1,47	1,13

D Tabellarischer Anhang

9	1,44	1,57	1,03	1,44
10	1,06	1,05	1,19	0,86
11	1,02	1,44	1,02	1,19
13	1,02	1,00	1,20	1,53
14	0,96	1,22	1,00	0,95
15	1,80	2,03	1,54	1,87
16	0,99	0,85	0,76	1,04
17	0,69	0,92	1,37	1,20
18	1,56	1,58	1,58	1,23
19	1,56	1,42	1,42	1,13
20	0,80	0,87	0,76	0,85
21	1,18	1,49	1,37	1,42
22	1,56	1,28	1,30	1,16
24	0,70	0,91	1,00	0,90
25	1,01	0,87	0,95	1,13
26	1,20	1,32	1,07	1,42
27	1,51	1,27	1,37	1,14

8 Stabilität von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, M1, und Resveratrol unter Versuchs-Bedingungen

[A.U. Fluoreszenz]	5 min RT					45 min 37 °C				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
M1	1,10	1,33	1,36	1,26	0,14	1,44	2,66	2,66	2,25	0,70
Resveratrol	1,47	2,39	2,86	2,24	0,71	2,13	1,88	1,60	1,87	0,27
(-)-Epicatechin	5,90	6,99	10,68	7,86	2,51	54,19	55,48	52,82	54,16	1,33
(+)-Catechin	19,83	19,70	19,18	19,57	0,34	158,11	159,80	159,13	159,01	0,85

RT= Raumtemperatur

9 Stabilität der Fluoreszenzsonde DAF-2

[1/(DAF-2/DAF-2T)]	RT					37 °C					- 40 °C				
	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD	I	II	III	MW	SD
Zeit [h]															
0	0,001	0,005	0,003	0,003	0,002										
0,75						0,008	0,005	0,003	0,005	0,002					
6	0,005	0,004	0,005	0,005	0,000	0,008	0,012	0,017	0,012	0,004					
12	0,005	0,007	0,005	0,006	0,001	0,027	0,028	0,028	0,028	0,000					
24	0,023	0,015	0,011	0,016	0,006	0,112	0,074	0,115	0,100	0,023	10,162	8,755	8,929	9,282	0,767

10 Erhöhung der DAF-2T Bildung durch Zusatz von Natrium-nitrit/-nitrat beim Einfrieren/Auftauen

DAF-2T [nM]	I	II	III	MW	SD
Co	17,73	16,72	20,71	18,39	2,07
+ 100 nM Nitrit	83,68	86,92	89,72	86,77	3,03
+ 500 nM Nitrit	339,82	344,51	406,08	363,47	36,98
+ 100 nM Nitrat	12,54	12,66	22,50	15,90	5,72
+ 500 nM Nitrat	18,77	14,15	15,52	16,15	2,37

11 Disparitäten des NO-Ansprechvermögens beim Vergleich verschiedener analytischer Detektionssysteme

A.U. Fluoreszenz (Peakfläche)	I	II	III	MW	SD
Co	25442	24926	23016	24461	1278
100 ng/mL VEGF	31528	31793	32014	31778	243
A23187-Br 10 µM	245755	247552	257210	250172	6161
A23187-Br 10 µM + L-NMMA 1 mM	20060	16634	17214	17969	1834

A.U. Absorption (Peakfläche)	I	II	III	MW	SD
Co	454	474	599	509	79
100 ng/mL VEGF	2074	1316	1293	1561	444
A23187-Br 10 µM	1187	856	1017	1020	166
A23187-Br 10 µM + L-NMMA 1 mM	689	545	749	661	105

12 Einfluss eines Noni-Extrakts auf die Freisetzung von MMP-9 aus primären humanen Monozyten

%maximale Freisetzung [Noni-Verdünnungen]	<i>Noni-Behandlung</i>					<i>Vehikel</i>				
	I	II	III	MW	MD	I	II	III	MW	MD
1:100	55,54	57,86	55,54	56,31	1,03	79,32	75,74	82,89	79,32	2,38
1:200	57,73	50,40	44,11	50,75	4,66	101,09	93,53	98,02	97,55	2,68
1:500	71,38	60,34	79,42	70,38	6,69	93,63	106,00	105,79	101,81	5,45
Hydrocortison 10^{-5} M	68,38	63,27	64,39	65,35	2,02	93,93	101,70	104,36	100,00	4,04

E Zusammenfassung

Um die Grundlagen für die in klinischen Studien beim Einsatz des standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) gefundenen Effekte auf einer mechanistischen zellulären Ebene aufzuklären, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss der Komponenten des Extraktes und dessen Metabolit M1 (chemisch benannt δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton bzw. 5-(3,4-Dihydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3*H*)-on) hinsichtlich der Wirkung auf Stickstoffmonoxid(= NO)-produzierende Systeme untersucht. NO ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in lebenden Organismen beteiligt.

Im Menschen sind bislang drei NO-Synthasen bekannt: die induzierbare (iNOS), die hinsichtlich der Pathologie vor allem mit entzündlichen Vorgängen assoziiert wird, die endotheliale (eNOS), die bei Gefäß- und Herzkreislauferkrankungen eine Rolle spielt, und die neuronale (nNOS), die mit der Gedächtnisbildung, aber auch mit zytotoxischen Prozessen im Gehirn etwa bei Morbus Alzheimer oder der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht wird.

Der nach peroraler Einnahme des Extraktes im Darm durch metabolisierende Kolonbakterien entstehende und darauf im Plasma erscheinende Metabolit M1, dem bei allen durchgeführten Untersuchungen besonderes Augenmerk zuteil wurde, zeigte eine starke konzentrationsabhängige Inhibierung der NO-Freisetzung der iNOS aus einer durch einen Entzündungsreiz stimulierten murinen Makrophagenzellkultur (IC_{50} = 1,28 μ g/mL). Im Vergleich mit Fraktion I des Kiefernrintenextraktes, die vor allem monomere Extraktbestandteile enthält, und Hydrocortison zeigte M1 zusätzlich einen stärkeren Hemmeffekt auf die NO-Freisetzung nach dem Entzündungsreiz. Die Zytotoxizität von M1 im Testsystem war dabei als gering einzustufen. Interessanterweise wurde neben den NO-Radikalfängereigenschaften von M1 auch ein deutlich hemmender konzentrationsabhängiger Effekt auf die iNOS-Proteinexpression gefunden (IC_{50} = 3,78 μ g/mL).

Da die bislang im Plasma bestimmten M1-Konzentrationen deutlich geringer als die in Zellkulturversuchen wirksamen waren, wurde eine mögliche Anreicherung von M1 in Gegenwart von Serumproteinen in humanen Endothelzellen, primären Monozyten und murinen Makrophagen untersucht. Dabei wurde eine starke Bindung von M1 an die Zellen gezeigt und Hinweise für eine potentiell erleichterte Aufnahme von M1 durch membranständige Transporter unter Einsatz eines Influx-Hemmers (Phloretin) gefunden.

Zur Untersuchung der eNOS, die sehr geringe Mengen NO produziert, wurden neue methodische Ansätze entwickelt. In diesem Zusammenhang wurden zuvor unbekannte Fallstricke bei der Verwendung der Fluoreszenzsonde DAF-2 (4,5-Diaminofluorescein) zur NO-Detektion und dem Einsatz unterschiedlicher Detektionssysteme entdeckt. DAF-2 zeigte unter verschiedenen Bedingungen auch ohne extern zugegebene NO-Quelle und besonders beim Einfrieren/Auftauen unerwarteterweise eine Konversion zum korrespondierenden NO-Addukt (DAF-2T). Die eingesetzten monomeren Testsubstanzen ((+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Resveratrol, M1) waren über die Testzeiträume deutlich instabil mit dynamischer Eigenfluoreszenz. Sowohl über kurze (≤ 45 min) als auch über längere Zeiträume (14-20 h) wurde entsprechend der Redoxaktivität der eingesetzten Polyphenole eine konzentrationsabhängige scheinbar hemmende Wirkung auf die extrazelluläre NO-Freisetzung der eNOS gezeigt. Die eNOS-Proteinexpression blieb durch die verwendeten Monomere weitestgehend unbeeinflusst. Durch eine hohe Konzentration der Fraktion I des Kiefernrintenextraktes wurde eine Steigerung der eNOS-Proteinkonzentration in Endothelzellen gefunden, wobei zytotoxische Artefakte dabei nicht auszuschließen waren.

Als kompetitive endogene Inhibitoren der NOS wurden *in vivo* in jüngster Zeit methylierte Arginine (ADMA= asymmetrisches, SDMA= symmetrisches Dimethylarginin) entdeckt. In einer randomisierten, kontrollierten, doppelt-blinden klinischen Studie mit einem Cross-over Design am Universitätsklinikum Zürich mit 28 Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung litten, wurden die Plasmaspiegel methylierter Arginine vor und nach 8-wöchiger Einnahme des Kiefernrintenextraktes bestimmt. Es zeigte sich dabei trotz einer Verbesserung der flussinduzierten Gefäßerweiterungskapazität (Flow-mediated dilation) und Verringerung der 15-F_{2t}-Isoprostan-Plasmaspiegel keine signifikante Veränderung der Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA und ET-1 (Endothelin-1) durch die Einnahme des Extraktes.

Die nNOS kommt vor allem im Gehirn, aber auch in Muskelzellen vor. Der Einsatz des Metaboliten M1 führte zu keinen deutlichen Effekten auf die konstitutive nNOS-Expression in einem Rhabdomyosarkom(A-673)-Zellkulturmodell. Zur Beantwortung der Frage, wie wahrscheinlich es ist, dass zur möglichen Beeinflussung von (patho)-physiologischen zerebralen Prozessen Polyphenole *in vivo* das Gehirn erreichen, wurde erstmals ein *in silico*-Modell zur Vorhersage der Verteilung von ausgewählten polyphenolischen Substanzen zwischen Blut und Gehirn entwickelt. Damit wurde anschließend eine Reihenfolge mit logBB-Werten (logarithmierter Quotient aus Konzentration im Blut und im Gehirngewebe) geordnet nach einer entsprechend dem Modell wahrscheinlich höheren Verteilung ins Gehirn für die untersuchten Substanzen berechnet:

Protocatechusäure < Quercetin < Cyanidin < (+)-Catechin < (-)-Epicatechin < Phloretin < M1. Insgesamt schienen die untersuchten polyphenolischen Substanzen eher schwach bluthirnschrankengängig zu sein. Der Metabolit M1 zeigte den höchsten logBB-Wert und somit die höchste Wahrscheinlichkeit der untersuchten Polyphenole, die Blut-Hirnschranke *in vivo* zu überwinden.

Im Kontext einer möglichen Anwendung bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wurde zusätzlich ein Extrakt aus der Frucht von *Morinda citrifolia* L. in einem primären Monozyten-Zellkulturmodell auf seine Eigenschaften hin die Sekretion der Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) aus Immunzellen nach einem Entzündungsreiz zu beeinflussen untersucht. Dabei zeigten die Extraktverdünnungen deutliche konzentrationsabhängige Hemmeffekte um bis zu ~50 % der maximalen MMP-9 Sekretion, die mit dem Einsatz von Hydrocortison vergleichbar waren.

Somit konnten in der vorliegenden Arbeit neue Beiträge zur Wirkungsweise der untersuchten Pflanzenextrakte und vor allem zum Verständnis der möglichen Effekte von Polyphenolen auf physiologisch relevante NO-Systeme sowie zur methodischen Wissenserweiterung der komplexen NO-Analytik geleistet werden.

Summary

Many clinical trials with the administration of a standardized maritime pine bark extract (Pycnogenol®) have shown beneficial effects. In order to study the basic mechanistic principles of how the extract might work on a cellular level the impact of the extract components and especially of the metabolite M1 (chemically named δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone or 5-(3,4-Dihydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one) on nitric oxide (NO) producing systems was tested and evaluated. NO is involved in many physiological and pathophysiological processes in living organisms.

There are three different isoforms of NO-synthases (NOS) known in humans so far: the inducible NOS (iNOS) is pathologically associated with inflammatory processes, the endothelial NOS (eNOS) is linked to (cardio-)vascular diseases, and the neuronal NOS (nNOS) plays a role in memory formation, but is also put in context to neuronal cytotoxicity within the course of Alzheimer's and Parkinson's disease.

The metabolite M1 is generated by microbiota in the human colon after per os ingestion of the pine bark extract and thereafter enters the circulation. M1 showed a strong concentration dependent inhibition of NO-release by iNOS from murine macrophages after an inflammatory stimulus (IC_{50} = 1.28 μ g/mL). M1 was even more potent at inhibiting NO-release from macrophages than fraction I of the pine bark extract, which predominantly contains monomeric extract compounds, and slightly more potent than hydrocortisone. Cytotoxicity of M1 was found to be modest in the test system. In addition to the NO-radical scavenging activities of M1 there were also profound concentration dependent inhibitory effects on iNOS protein expression (IC_{50} = 3.78 μ g/mL).

As there is a gap between determined plasma concentrations of M1 after pine bark extract ingestion and required bioactive concentrations in cell culture test systems the binding of M1 to human endothelial cells, human monocytes and murine macrophages in the presence of serum proteins was determined in order to test for cellular M1 accumulation. There was a strong binding of M1 to these cells and a possible facilitated uptake via distinct membrane transporters was shown with using an influx-inhibitor (phloretin).

In order to analyze the very small amounts of NO produced by eNOS new methodic approaches were established. Formerly unknown pitfalls and limitations with using the fluorescence dye DAF-2 (4,5-diaminofluorescein) and with applying different detection systems for NO were revealed. DAF-2 was subject to conversion to the NO adduct triazolofluorescein (DAF-2T) even without an externally added NO source under certain assay and storage conditions, especially after freezing and thawing sample solutions. Thus

control of spontaneous reagent conversion is advisable. The monomers (+)-catechin, (-)-epicatechin, resveratrol, and M1 were not stable over time and displayed highly dynamic auto-fluorescence. In accordance with their radical scavenging activity the polyphenols seemingly showed a concentration dependent inhibitory effect on NO-release from endothelial cells over short (≤ 45 min) and longer incubation periods (14-20 h). After incubation with the monomers eNOS-protein expression was not markedly affected. When applying very high concentrations of fraction I of the extract an increase of cellular eNOS protein content was observed, but cytotoxic artefacts could not be ruled out though.

Recently, competitive endogenous *in vivo* inhibitors of NOS were identified as methylated arginines (ADMA= asymmetric-, SDMA= symmetric dimethylarginine). In the course of a randomized, double-blind, placebo-controlled and cross-over designed clinical trial, which was conducted at the University of Zurich and enrolled 28 coronary heart disease patients, plasma concentrations of methylated arginines before and after the 8-week intake of pine bark extract were determined. Despite of improvements in flow-mediated dilation parameters and decrease of 15-F_{2t}-Isoprostane plasma concentrations there was no significant alteration of plasma concentrations of ADMA, SDMA and ET-1 (endothelin-1) after the pine bark extract intake.

The nNOS is found in neuronal cells but is also expressed in other cell types like muscle cells. In a rhabdomyosarcoma (A-673) cell culture model the metabolite M1 had no meaningful effect on nNOS expression. In order to contribute answering the question whether polyphenols are likely to cross the blood brain barrier an *in silico* model for predicting polyphenol distribution between blood and brain tissue (logBB) was developed. logBB values for selected polyphenols were calculated and resulted in the following rank order with increasing probability of an uptake into the brain: protocatechuic acid < quercetin < cyanidin < (+)-catechin < (-)-epicatechin < phloretin < M1. The metabolite M1 showed the highest logBB value of the tested polyphenols and thus had the highest predicted feasibility for crossing the blood brain barrier as described with the newly established computer based model.

The extract of the fruits from *Morinda citrifolia* L. is traditionally utilized for the treatment of inflammatory diseases. Applying a primary human monocyte cell culture model the extract was tested for its ability to inhibit the secretion of matrix-metalloprotease-9 after an inflammatory stimulus. Dilutions of the extract in cell culture media showed profound concentration dependent inhibitory effects with up to a ~50 % decrease of metalloprotease secretion that were comparable to hydrocortisone.

E Zusammenfassung

Thus, new and substantial contributions were made in this work allowing a better understanding of the mode of action of the tested plant extracts, especially of the effects of polyphenols on physiological relevant nitric oxide systems, and gaining a deeper methodical knowledge in the challenging field of NO-analysis.

F Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serum Albumin
CaM	Calmodulin
CL	Chemilumineszenz
Da	Dalton
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DDAH	Dimethylarginin-dimethylaminohydrolase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPR	Electron paramagnetic resonance
ET-1	Endothelin-1
FMD	Flow-mediated dilation
GLUT	Glucose-Transporter
HC	Hydrocortison
HPLC	High performance liquid chromatography
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
k	Reaktionskonstante
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantification

F Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
M1	Metabolit M1
MD	Mean deviation (Mittlere Abweichung vom Mittelwert)
MeOH	Methanol
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NMMA	N-Monomethylarginin
NOS	NO-Synthase
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PRMT	Protein Arginin N-Methyltransferase
r	Korrelationsfaktor
R ²	Bestimmtheitsmaß
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor

G Literaturverzeichnis

- [1] Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**:315-424; 2007.
- [2] Hill, B. G.; Dranka, B. P.; Bailey, S. M.; Lancaster, J. R., Jr.; Darley-Usmar, V. M. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* **285**:19699-19704; 2010.
- [3] Murad, F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* **355**:2003-2011; 2006.
- [4] Mutschler, E. Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 2001.
- [5] Yao, D.; Gu, Z.; Nakamura, T.; Shi, Z. Q.; Ma, Y.; Gaston, B.; Palmer, L. A.; Rockenstein, E. M.; Zhang, Z.; Masliah, E.; Uehara, T.; Lipton, S. A. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10810-10814; 2004.
- [6] Barglow, K. T.; Knutson, C. G.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R.; Marletta, M. A. Site-specific and redox-controlled S-nitrosation of thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:E600-606; 2011.
- [7] Daff, S. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide-Biol Ch* **23**:1-11; 2010.
- [8] Besson-Bard, A.; Courtois, C.; Gauthier, A.; Dahan, J.; Dobrowolska, G.; Jeandroz, S.; Pugin, A.; Wendehenne, D. Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol Plant* **1**:218-228; 2008.
- [9] Hall, C. N.; Garthwaite, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* **21**:92-103; 2009.
- [10] Kirkpatrick, P.; Ellis, C. Chemical space. *Nature* **432**:823-823; 2004.
- [11] Perez-Jimenez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr* **93**:1220-1228; 2011.
- [12] Yochum, L.; Kushi, L. H.; Meyer, K.; Folsom, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* **149**:943-949; 1999.
- [13] McCullough, M. L.; Peterson, J. J.; Patel, R.; Jacques, P. F.; Shah, R.; Dwyer, J. T. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr* **95**:454-464; 2012.
- [14] Hodgson, J. M.; Puddey, I. B.; Woodman, R. J.; Mulder, T. P.; Fuchs, D.; Scott, K.; Croft, K. D. Effects of black tea on blood pressure: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* **172**:186-188; 2012.
- [15] Hooper, L.; Kroon, P. A.; Rimm, E. B.; Cohn, J. S.; Harvey, I.; Le Cornu, K. A.; Ryder, J. J.; Hall, W. L.; Cassidy, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* **88**:38-50; 2008.
- [16] Ioannidis, J. P. Why most published research findings are false. *PLoS Med* **2**:e124; 2005.

- [17] Galati, G.; O'Brien, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* **37**:287-303; 2004.
- [18] Zeegers, M. P.; Tan, F. E.; Goldbohm, R. A.; van den Brandt, P. A. Are coffee and tea consumption associated with urinary tract cancer risk? A systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* **30**:353-362; 2001.
- [19] Monograph. Maritime Pine Bark Extrakt. *USP 30*:965-966.
- [20] Pirasteh, G. Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer. *Dissertation, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Münster*; 1988.
- [21] Moini, H.; Guo, Q.; Packer, L. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol: effect on xanthine oxidase. *J Agric Food Chem* **48**:5630-5639; 2000.
- [22] Schafer, A.; Hogger, P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract* **77**:41-46; 2007.
- [23] Grimm, T.; Schafer, A.; Hogger, P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic Biol Med* **36**:811-822; 2004.
- [24] Grimm, T.; Skrabala, R.; Chovanova, Z.; Muchova, J.; Sumegova, K.; Liptakova, A.; Durackova, Z.; Hogger, P. Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers. *BMC Clin Pharmacol* **6**:4; 2006.
- [25] Schaefer, A. Effekte von Bestandteile und Metaboliten eines Rindenextraktes von *Pinus maritima* (Pycnogenol®) auf pathologische Aspekte des metabolischen Syndroms. *Dissertation, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg* 2007.
- [26] Kurlbaum, M.; Hogger, P. Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP). *J Pharm Biomed Anal* **54**:127-132; 2011.
- [27] Kurlbaum, M. Verteilungsvorgänge und Metabolismus eines standardisierten Kiefernextraktes in menschlichem Blut. *Dissertation, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg*; 2011.
- [28] Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sanchez-Patan, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gomez-Cordoves, C.; Andres-Lacueva, C.; Bartolome, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* **1**:233-253; 2010.
- [29] Rooks, M. G.; Garrett, W. S. Bacteria, food, and cancer. *F1000 Biol Rep* **3**:12; 2011.
- [30] Lundberg, J. O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**:156-167; 2008.
- [31] Kelm, M.; Schrader, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* **66**:1561-1575; 1990.
- [32] Fukuto, J. M.; Dutton, A. S.; Houk, K. N. The chemistry and biology of nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity. *ChemBiochem* **6**:612-619; 2005.
- [33] Irvine, J. C.; Ritchie, R. H.; Favaloro, J. L.; Andrews, K. L.; Widdop, R. E.; Kemp-Harper, B. K. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci* **29**:601-608; 2008.

- [34] Miranda, K. M.; Yamada, K.; Espey, M. G.; Thomas, D. D.; DeGraff, W.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C.; Colton, C. A.; Wink, D. A. Further evidence for distinct reactive intermediates from nitroxyl and peroxyxynitrite: effects of buffer composition on the chemistry of Angeli's salt and synthetic peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **401**:134-144; 2002.
- [35] Tsikas, D. Analysis of the L-arginine/nitric oxide pathway: The unique role of mass spectrometry. *Curr Pharm Anal* **1**:15-30; 2005.
- [36] Hetrick, E. M.; Schoenfisch, M. H. Analytical chemistry of nitric oxide. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* **2**:409-433; 2009.
- [37] Grau, M.; Hendgen-Cotta, U. B.; Brouzos, P.; Drexhage, C.; Rassaf, T.; Lauer, T.; Dejam, A.; Kelm, M.; Kleinbongard, P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**:106-123; 2007.
- [38] Tsikas, D.; Mitschke, A.; Gutzki, F. M.; Engeli, S.; Jordan, J. Evidence by gas chromatography-mass spectrometry of ex vivo nitrite and nitrate formation from air nitrogen oxides in human plasma, serum, and urine samples. *Anal Biochem* **397**:126-128; 2010.
- [39] Kelm, M.; Dahmann, R.; Wink, D.; Feelisch, M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction. *J Biol Chem* **272**:9922-9932; 1997.
- [40] Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**:51-70; 2007.
- [41] Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. *Anal Chem* **70**:2446-2453; 1998.
- [42] Kojima, H.; Sakurai, K.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **46**:373-375; 1998.
- [43] Barker, S. L.; Clark, H. A.; Swallen, S. F.; Kopelman, R.; Tsang, A. W.; Swanson, J. A. Ratiometric and fluorescence-lifetime-based biosensors incorporating cytochrome c' and the detection of extra- and intracellular macrophage nitric oxide. *Anal Chem* **71**:1767-1772; 1999.
- [44] Yoshimura, T.; Kotake, Y. Spin trapping of nitric oxide with the iron-dithiocarbamate complex: chemistry and biology. *Antioxid Redox Signal* **6**:639-647; 2004.
- [45] Kleschyov, A. L.; Wenzel, P.; Munzel, T. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**:12-20; 2007.
- [46] Shin, J. H.; Privett, B. J.; Kita, J. M.; Wightman, R. M.; Schoenfisch, M. H. Fluorinated xerogel-derived microelectrodes for amperometric nitric oxide sensing. *Anal Chem* **80**:6850-6859; 2008.
- [47] Hodnick, W. F.; Milosavljevic, E. B.; Nelson, J. H.; Pardini, R. S. Electrochemistry of Flavonoids - Relationships between Redox Potentials, Inhibition of Mitochondrial Respiration, and Production of Oxygen Radicals by Flavonoids. *Biochemical Pharmacology* **37**:2607-2611; 1988.
- [48] Haenen, G. R.; Bast, A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods Enzymol* **301**:490-503; 1999.

- [49] Hrbac, J.; Gregor, C.; Machova, M.; Kralova, J.; Bystron, T.; Ciz, M.; Lojek, A. Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited using optimized electropolymerization procedure. *Bioelectrochemistry* **71**:46-53; 2007.
- [50] McDonald, C. C.; Phillips, W. D.; Mower, H. F. An Electron Spin Resonance Study of Some Complexes of Iron Nitric Oxide and Anionic Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **87**:3319-8; 1965.
- [51] Bateman, R. M.; Ellis, C. G.; Freeman, D. J. Optimization of nitric oxide chemiluminescence operating conditions for measurement of plasma nitrite and nitrate. *Clin Chem* **48**:570-573; 2002.
- [52] Xie, Q. W.; Cho, H. J.; Calaycay, J.; Mumford, R. A.; Swiderek, K. M.; Lee, T. D.; Ding, A.; Troso, T.; Nathan, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**:225-228; 1992.
- [53] Charles, I. G.; Palmer, R. M.; Hickery, M. S.; Bayliss, M. T.; Chubb, A. P.; Hall, V. S.; Moss, D. W.; Moncada, S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11419-11423; 1993.
- [54] MacMicking, J. D.; North, R. J.; LaCourse, R.; Mudgett, J. S.; Shah, S. K.; Nathan, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5243-5248; 1997.
- [55] Blos, M.; Schleicher, U.; Soares Rocha, F. J.; Meissner, U.; Rollinghoff, M.; Bogdan, C. Organ-specific and stage-dependent control of Leishmania major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol* **33**:1224-1234; 2003.
- [56] Lundberg, J. O.; Hellstrom, P. M.; Lundberg, J. M.; Alving, K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* **344**:1673-1674; 1994.
- [57] Szabo, C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species--relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide* **14**:169-179; 2006.
- [58] Naura, A. S.; Zerfaoui, M.; Kim, H.; Abd Elmageed, Z. Y.; Rodriguez, P. C.; Hans, C. P.; Ju, J.; Errami, Y.; Park, J.; Ochoa, A. C.; Boulares, A. H. Requirement for inducible nitric oxide synthase in chronic allergen exposure-induced pulmonary fibrosis but not inflammation. *J Immunol* **185**:3076-3085; 2010.
- [59] Zeiger, R. S.; Schatz, M.; Zhang, F.; Crawford, W. W.; Kaplan, M. S.; Roth, R. M.; Chen, W. Elevated exhaled nitric oxide is a clinical indicator of future uncontrolled asthma in asthmatic patients on inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* **128**:412-414; 2011.
- [60] Lindberg, S.; Cervin, A.; Runer, T. Low levels of nasal nitric oxide (NO) correlate to impaired mucociliary function in the upper airways. *Acta Otolaryngol* **117**:728-734; 1997.
- [61] Pifferi, M.; Bush, A.; Maggi, F.; Michelucci, A.; Ricci, V.; Conidi, M. E.; Cangiotti, A. M.; Bodini, A.; Simi, P.; Macchia, P.; Boner, A. L. Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* **37**:572-577; 2011.
- [62] Fukumura, D.; Kashiwagi, S.; Jain, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **6**:521-534; 2006.
- [63] Raspollini, M. R.; Amunni, G.; Villanucci, A.; Boddi, V.; Baroni, G.; Taddei, A.; Taddei, G. L. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecol Oncol* **92**:806-812; 2004.

- [64] Glynn, S. A.; Boersma, B. J.; Dorsey, T. H.; Yi, M.; Yfantis, H. G.; Ridnour, L. A.; Martin, D. N.; Switzer, C. H.; Hudson, R. S.; Wink, D. A.; Lee, D. H.; Stephens, R. M.; Ambs, S. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J Clin Invest* **120**:3843-3854; 2010.
- [65] Vicetti Miguel, R. D.; Cherpes, T. L.; Watson, L. J.; McKenna, K. C. CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. *J Immunol* **185**:6706-6718; 2010.
- [66] Ambrosini, G.; Adida, C.; Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**:917-921; 1997.
- [67] Vincent, J. L.; Zhang, H.; Szabo, C.; Preiser, J. C. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* **161**:1781-1785; 2000.
- [68] Preiser, J. C.; De Backer, D. Novel insights into the effects of inducible nitric oxide synthase inhibition during sepsis. *Crit Care Med* **36**:359-360; 2008.
- [69] Crawford, J. H.; Chacko, B. K.; Pruitt, H. M.; Piknova, B.; Hogg, N.; Patel, R. P. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* **104**:1375-1382; 2004.
- [70] Cuzzocrea, S.; Chatterjee, P. K.; Mazzon, E.; McDonald, M. C.; Dugo, L.; Di Paola, R.; Serraino, I.; Britti, D.; Caputi, A. P.; Thiemermann, C. Beneficial effects of GW274150, a novel, potent and selective inhibitor of iNOS activity, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* **453**:119-129; 2002.
- [71] Singh, D.; Richards, D.; Knowles, R. G.; Schwartz, S.; Woodcock, A.; Langley, S.; O'Connor, B. J. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **176**:988-993; 2007.
- [72] De Alba, J.; Clayton, N. M.; Collins, S. D.; Colthup, P.; Chessell, I.; Knowles, R. G. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **120**:170-181; 2006.
- [73] Hosseini, S.; Pishnamazi, S.; Sadrzadeh, S. M.; Farid, F.; Farid, R.; Watson, R. R. Pycnogenol((R)) in the Management of Asthma. *J Med Food* **4**:201-209; 2001.
- [74] Cisar, P.; Jany, R.; Waczulikova, I.; Sumegova, K.; Muchova, J.; Vojtassak, J.; Durackova, Z.; Lisy, M.; Rohdewald, P. Effect of pine bark extract (Pycnogenol) on symptoms of knee osteoarthritis. *Phytother Res* **22**:1087-1092; 2008.
- [75] Virgili, F.; Kobuchi, H.; Packer, L. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* **24**:1120-1129; 1998.
- [76] Park, Y. C.; Rimbach, G.; Saliou, C.; Valacchi, G.; Packer, L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett* **465**:93-97; 2000.
- [77] Kutschera, M.; Engst, W.; Blaut, M.; Braune, A. Isolation of catechin-converting human intestinal bacteria. *J Appl Microbiol* **111**:165-175; 2011.
- [78] Appeldoorn, M. M.; Vincken, J. P.; Aura, A. M.; Hollman, P. C.; Gruppen, H. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J Agric Food Chem* **57**:1084-1092; 2009.

- [79] Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J. W.; Barron, D.; Clifford, M. N. A comparison of the in vitro biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Mol Nutr Food Res* **54**:747-759; 2010.
- [80] Kohri, T.; Suzuki, M.; Nanjo, F. Identification of metabolites of (-)-epicatechin gallate and their metabolic fate in the rat. *J Agric Food Chem* **51**:5561-5566; 2003.
- [81] Uhlenhut, K.; Hogger, P. Facilitated cellular uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase by a metabolite of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Free Radic Biol Med*; 2012.
- [82] Das, N. P. Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem Pharmacol* **20**:3435-3445; 1971.
- [83] Duweler, K. G.; Rohdewald, P. Urinary metabolites of French maritime pine bark extract in humans. *Pharmazie* **55**:364-368; 2000.
- [84] Li, C.; Lee, M. J.; Sheng, S.; Meng, X.; Prabhu, S.; Winnik, B.; Huang, B.; Chung, J. Y.; Yan, S.; Ho, C. T.; Yang, C. S. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem Res Toxicol* **13**:177-184; 2000.
- [85] Roowi, S.; Stalmach, A.; Mullen, W.; Lean, M. E.; Edwards, C. A.; Crozier, A. Green tea flavan-3-ols: colonic degradation and urinary excretion of catabolites by humans. *J Agric Food Chem* **58**:1296-1304; 2010.
- [86] Gonthier, M. P.; Cheyrier, V.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Morand, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Remesy, C.; Scalbert, A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr* **133**:461-467; 2003.
- [87] Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Llorach, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; Jauregui, O.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Andres-Lacueva, C. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1216**:7258-7267; 2009.
- [88] Denis, M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* **55**:682-684; 1994.
- [89] Skorokhod, O. A.; Schwarzer, E.; Ceretto, M.; Arese, P. Malarial pigment haemozoin, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta and LPS do not stimulate expression of inducible nitric oxide synthase and production of nitric oxide in immuno-purified human monocytes. *Malar J* **6**:73; 2007.
- [90] Croen, K. D. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J Clin Invest* **91**:2446-2452; 1993.
- [91] Conforti, F.; Menichini, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. *Curr Med Chem* **18**:1137-1145; 2011.
- [92] Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* **25**:1600-1603; 2002.
- [93] Chai, P. C.; Long, L. H.; Halliwell, B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem Biophys Res Commun* **304**:650-654; 2003.
- [94] Akagawa, M.; Shigemitsu, T.; Suyama, K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:2632-2640; 2003.

- [95] Wargovich, M. J.; Issa, A. Y.; Volate, S. R. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J Food Compos Anal* **19**:405-419; 2006.
- [96] Ristow, M.; Schmeisser, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **51**:327-336; 2011.
- [97] Sehm, J.; Polster, J.; Pfaffl, M. W. Effects of varied EGCG and (+)-catechin concentrations on proinflammatory cytokines mRNA expression in cona-stimulated primary white blood cell cultures. *J Agric Food Chem* **53**:6907-6911; 2005.
- [98] Cseh, R.; Benz, R. Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change. *Biophys J* **77**:1477-1488; 1999.
- [99] Actis-Goretta, L.; Romanczyk, L. J.; Rodriguez, C. A.; Kwik-Urbe, C.; Keen, C. L. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. *J Nutr Biochem* **19**:797-808; 2008.
- [100] Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**:230S-242S; 2005.
- [101] Plochmann, K.; Korte, G.; Koutsilieri, E.; Richling, E.; Riederer, P.; Rethwilm, A.; Schreier, P.; Scheller, C. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* **460**:1-9; 2007.
- [102] Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* **288**:369-376; 2005.
- [103] Dirsch, V. M.; Kiemer, A. K.; Wagner, H.; Vollmar, A. M. Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* **139**:333-339; 1998.
- [104] Patel, R.; Attur, M. G.; Dave, M.; Abramson, S. B.; Amin, A. R. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J Immunol* **162**:4191-4197; 1999.
- [105] Lambert, J. D.; Rice, J. E.; Hong, J.; Hou, Z.; Yang, C. S. Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:873-876; 2005.
- [106] Nakagawa, T.; Yokozawa, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* **40**:1745-1750; 2002.
- [107] Wang, J.; Mazza, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* **50**:850-857; 2002.
- [108] Terra, X.; Valls, J.; Vitrac, X.; Merrillon, J. M.; Arola, L.; Ardevol, A.; Blade, C.; Fernandez-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvado, J.; Blay, M. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J Agric Food Chem* **55**:4357-4365; 2007.
- [109] Kim, H. K.; Cheon, B. S.; Kim, Y. H.; Kim, S. Y.; Kim, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **58**:759-765; 1999.
- [110] Tournaire, C.; Croux, S.; Maurette, M. T.; Beck, I.; Hocquaux, M.; Braun, A. M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J Photochem Photobiol B* **19**:205-215; 1993.

- [111] Sanchez-Patan, F.; Chioua, M.; Garrido, I.; Cueva, C.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J.; Moreno-Arribas, M. V.; Bartolome, B.; Monagas, M. Synthesis, analytical features, and biological relevance of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone, a microbial metabolite derived from the catabolism of dietary flavan-3-ols. *J Agric Food Chem* **59**:7083-7091; 2011.
- [112] van Acker, S. A.; van den Berg, D. J.; Tromp, M. N.; Griffioen, D. H.; van Bennekom, W. P.; van der Vijgh, W. J.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **20**:331-342; 1996.
- [113] Horner, L.; Geyer, E. Zur Kenntnis Der O-Chinone .27. Redoxpotentiale Von Brenzcatechin-Derivaten. *Chem Ber-Recl* **98**:2016-&; 1965.
- [114] Bartberger, M. D.; Liu, W.; Ford, E.; Miranda, K. M.; Switzer, C.; Fukuto, J. M.; Farmer, P. J.; Wink, D. A.; Houk, K. N. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:10958-10963; 2002.
- [115] Daveu, C.; Servy, C.; Dendane, M.; Marin, P.; Ducrocq, C. Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. *Nitric Oxide* **1**:234-243; 1997.
- [116] Butterfield, D. A.; Reed, T.; Sultana, R. Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Free Radic Res* **45**:59-72; 2011.
- [117] Schneemann, M.; Schoeden, G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol* **81**:579; discussion 580; 2007.
- [118] Phillips, D. I.; Barker, D. J.; Fall, C. H.; Seckl, J. R.; Whorwood, C. B.; Wood, P. J.; Walker, B. R. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* **83**:757-760; 1998.
- [119] Jensen, F. B. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim Biophys Acta* **1787**:841-848; 2009.
- [120] Shimoi, K.; Nakayama, T. Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods Enzymol* **400**:263-272; 2005.
- [121] Lee, H. C.; Jenner, A. M.; Low, C. S.; Lee, Y. K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol* **157**:876-884; 2006.
- [122] Gusarov, I.; Shatalin, K.; Starodubtseva, M.; Nudler, E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* **325**:1380-1384; 2009.
- [123] Saavedra, M. J.; Borges, A.; Dias, C.; Aires, A.; Bennett, R. N.; Rosa, E. S.; Simoes, M. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med Chem* **6**:174-183; 2010.
- [124] Kelm, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* **1411**:273-289; 1999.
- [125] Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**:907-916; 2001.
- [126] Lin, Y. L.; Lin, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* **52**:465-472; 1997.
- [127] Pautz, A.; Art, J.; Hahn, S.; Nowag, S.; Voss, C.; Kleinert, H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* **23**:75-93; 2010.
- [128] Murakami, A. Chemoprevention with phytochemicals targeting inducible nitric oxide synthase. *Forum Nutr* **61**:193-203; 2009.

- [129] Roh, E.; Lee, H. S.; Kwak, J. A.; Hong, J. T.; Nam, S. Y.; Jung, S. H.; Lee, J. Y.; Kim, N. D.; Han, S. B.; Kim, Y. MD-2 as the target of nonlipid chalcone in the inhibition of endotoxin LPS-induced TLR4 activity. *J Infect Dis* **203**:1012-1020; 2011.
- [130] Csak, T.; Velayudham, A.; Hritz, I.; Petrasek, J.; Levin, I.; Lippai, D.; Catalano, D.; Mandrekar, P.; Dolganiuc, A.; Kurt-Jones, E.; Szabo, G. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**:G433-441; 2011.
- [131] Crozier, A.; Del Rio, D.; Clifford, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med* **31**:446-467; 2010.
- [132] Gu, L.; Laly, M.; Chang, H. C.; Prior, R. L.; Fang, N.; Ronis, M. J.; Badger, T. M. Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *J Agric Food Chem* **53**:6858-6863; 2005.
- [133] Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Akiyama, H.; Kanda, T.; Ohtake, Y.; Goda, Y. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **54**:884-892; 2006.
- [134] Kim, S. F.; Huri, D. A.; Snyder, S. H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* **310**:1966-1970; 2005.
- [135] Leuenberger, H. Martin Physikalische Pharmazie 4. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 2002.
- [136] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**:3-26; 2001.
- [137] Dobson, P. D.; Kell, D. B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov* **7**:205-220; 2008.
- [138] Westerhoff, H. V.; Kell, D. B.; Kamp, F.; van Dam, K. *Microcompartmentation* (ed. Jones, D.P.):115-154; 1988
- [139] Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L., et al. Molecular Cell Biology, 4th edition, . *New York: W.H. Freeman and Company*, 2000.
- [140] Hediger, M. A.; Romero, M. F.; Peng, J. B.; Rolfs, A.; Takanaga, H.; Bruford, E. A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch* **447**:465-468; 2004.
- [141] Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**:123-142; 2005.
- [142] von Mering, J. Ueber kunstlichen Diabetes. *Centralbl Med Wiss* 1886 **xxii**:531; 1886.
- [143] Panayotova-Heiermann, M.; Loo, D. D.; Wright, E. M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem* **270**:27099-27105; 1995.
- [144] Kasahara, T.; Kasahara, M. Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **315** (Pt 1):177-182; 1996.
- [145] Wang, P.; Aronson, W. J.; Huang, M.; Zhang, Y.; Lee, R. P.; Heber, D.; Henning, S. M. Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* **3**:985-993; 2010.

- [146] Nguyen, M. M.; Ahmann, F. R.; Nagle, R. B.; Hsu, C. H.; Tangrea, J. A.; Parnes, H. L.; Sokoloff, M. H.; Gretzer, M. B.; Chow, H. H. Randomized, Double-blind, Placebo Controlled Trial of Polyphenon E in Prostate Cancer Patients before Prostatectomy: Evaluation of Potential Chemopreventive Activities. *Cancer Prev Res (Phila)*; 2011.
- [147] Passamonti, S.; Terdoslavich, M.; Franca, R.; Vanzo, A.; Tramer, F.; Braidot, E.; Petrusa, E.; Vianello, A. Bioavailability of flavonoids: a review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Curr Drug Metab* **10**:369-394; 2009.
- [148] Arts, I. C.; Hollman, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* **81**:317S-325S; 2005.
- [149] Frimodt-Moller, N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *Int J Antimicrob Agents* **19**:333-339; 2002.
- [150] Lin, J. H. Tissue distribution and pharmacodynamics: a complicated relationship. *Curr Drug Metab* **7**:39-65; 2006.
- [151] Kushihara, H.; Sugiyama, Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* **78**:43-54; 2002.
- [152] Biasutto, L.; Marotta, E.; Garbisa, S.; Zoratti, M.; Paradisi, C. Determination of quercetin and resveratrol in whole blood--implications for bioavailability studies. *Molecules* **15**:6570-6579; 2010.
- [153] Neumann, H. A.; Carlsson, K.; Brom, G. H. Uptake and localisation of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall, measured by laser scanning microscopy. *Eur J Clin Pharmacol* **43**:423-426; 1992.
- [154] Andersen, O. S.; Finkelstein, A.; Katz, I.; Cass, A. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. *J Gen Physiol* **67**:749-771; 1976.
- [155] Martin, H. J.; Kornmann, F.; Fuhrmann, G. F. The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chem Biol Interact* **146**:225-235; 2003.
- [156] Malide, D.; Davies-Hill, T. M.; Levine, M.; Simpson, I. A. Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *Am J Physiol* **274**:E516-526; 1998.
- [157] Fu, Y.; Maianu, L.; Melbert, B. R.; Garvey, W. T. Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood Cells Mol Dis* **32**:182-190; 2004.
- [158] Olson, A. L.; Pessin, J. E. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* **16**:235-256; 1996.
- [159] Cunningham, P.; Afzal-Ahmed, I.; Naftalin, R. J. Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. *J Biol Chem* **281**:5797-5803; 2006.
- [160] Maestro, A.; Terdoslavich, M.; Vanzo, A.; Kuku, A.; Tramer, F.; Nicolini, V.; Micali, F.; Decorti, G.; Passamonti, S. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovasc Res* **85**:175-183; 2010.
- [161] Lancon, A.; Delmas, D.; Osman, H.; Thenot, J. P.; Jannin, B.; Latruffe, N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun* **316**:1132-1137; 2004.

- [162] Vaidyanathan, J. B.; Walle, T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:745-752; 2003.
- [163] Wong, C. C.; Botting, N. P.; Orfila, C.; Al-Maharik, N.; Williamson, G. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochem Pharmacol* **81**:942-949; 2011.
- [164] Yokomizo, A.; Moriwaki, M. Effects of uptake of flavonoids on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human intestinal Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:1317-1324; 2006.
- [165] Schweigert, N.; Zehnder, A. J.; Eggen, R. I. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ Microbiol* **3**:81-91; 2001.
- [166] Whitley, A. C.; Stoner, G. D.; Darby, M. V.; Walle, T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid--extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol* **66**:907-915; 2003.
- [167] Walle, T.; Vincent, T. S.; Walle, U. K. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharmacol* **65**:1603-1610; 2003.
- [168] Rezk, B. M.; Haenen, G. R.; van der Vijgh, W. J.; Bast, A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:9-13; 2002.
- [169] Griffith, T. M.; Edwards, D. H.; Davies, R. L.; Harrison, T. J.; Evans, K. T. EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* **329**:442-445; 1987.
- [170] Potter, L. R. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* **23**:1921-1926; 2011.
- [171] Balligand, J. L.; Feron, O.; Dessy, C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* **89**:481-534; 2009.
- [172] Villanueva, C.; Giulivi, C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* **49**:307-316; 2010.
- [173] Jagandandan, D.; Sessa, W. C.; Fulton, D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**:C1024-1033; 2005.
- [174] Munzel, T.; Sinning, C.; Post, F.; Warnholtz, A.; Schulz, E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* **40**:180-196; 2008.
- [175] Heitzer, T.; Schlinzig, T.; Krohn, K.; Meinertz, T.; Munzel, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**:2673-2678; 2001.
- [176] Wang, Z.; Klipfell, E.; Bennett, B. J.; Koeth, R.; Levison, B. S.; Dugar, B.; Feldstein, A. E.; Britt, E. B.; Fu, X.; Chung, Y. M.; Wu, Y.; Schauer, P.; Smith, J. D.; Allayee, H.; Tang, W. H.; DiDonato, J. A.; Lusis, A. J.; Hazen, S. L. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**:57-63; 2011.
- [177] Selma, M. V.; Espin, J. C.; Tomas-Barberan, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* **57**:6485-6501; 2009.

- [178] Ridker, P. M.; Danielson, E.; Fonseca, F. A.; Genest, J.; Gotto, A. M., Jr.; Kastelein, J. J.; Koenig, W.; Libby, P.; Lorenzatti, A. J.; MacFadyen, J. G.; Nordestgaard, B. G.; Shepherd, J.; Willerson, J. T.; Glynn, R. J. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* **359**:2195-2207; 2008.
- [179] Meda, C.; Plank, C.; Mykhaylyk, O.; Schmidt, K.; Mayer, B. Effects of statins on nitric oxide/cGMP signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacol Rep* **62**:100-112; 2010.
- [180] Artaud-Wild, S. M.; Connor, S. L.; Sexton, G.; Connor, W. E. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation* **88**:2771-2779; 1993.
- [181] Sun, Q.; Shi, L.; Rimm, E. B.; Giovannucci, E. L.; Hu, F. B.; Manson, J. E.; Rexrode, K. M. Vitamin D intake and risk of cardiovascular disease in US men and women. *Am J Clin Nutr* **94**:534-542; 2011.
- [182] Comment from Barbara J Boucher on: Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis (BMJ 2011 Aug 26;343:d4488. doi: 10.1136/bmj.d4488). Available at: <http://www.bmj.com/content/343/bmj.d4488?tab=responses> (30.04.2012).
- [183] Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**:1523-1526; 1992.
- [184] Di Castelnuovo, A.; Rotondo, S.; Iacoviello, L.; Donati, M. B.; De Gaetano, G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* **105**:2836-2844; 2002.
- [185] Chen, W. Y.; Rosner, B.; Hankinson, S. E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* **306**:1884-1890; 2011.
- [186] Greenhalgh, T. How to read a paper, 4th ed. *Wiley-Blackwell*; 2010.
- [187] Liu, X.; Wei, J.; Tan, F.; Zhou, S.; Wurthwein, G.; Rohdewald, P. Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci* **74**:855-862; 2004.
- [188] Drieling, R. L.; Gardner, C. D.; Ma, J.; Ahn, D. K.; Stafford, R. S. No beneficial effects of pine bark extract on cardiovascular disease risk factors. *Arch Intern Med* **170**:1541-1547; 2010.
- [189] Ovaskainen, M. L.; Torronen, R.; Koponen, J. M.; Sinkko, H.; Hellstrom, J.; Reinivuo, H.; Mattila, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* **138**:562-566; 2008.
- [190] Lotito, S. B.; Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* **41**:1727-1746; 2006.
- [191] Schewe, T.; Steffen, Y.; Sies, H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**:102-106; 2008.
- [192] Appeldoorn, M. M.; Venema, D. P.; Peters, T. H.; Koenen, M. E.; Arts, I. C.; Vincken, J. P.; Gruppen, H.; Keijer, J.; Hollman, P. C. Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *J Agric Food Chem* **57**:7693-7699; 2009.

- [193] Leikert, J. F.; Rathel, T. R.; Wohlfart, P.; Cheynier, V.; Vollmar, A. M.; Dirsch, V. M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* **106**:1614-1617; 2002.
- [194] Gago, B.; Lundberg, J. O.; Barbosa, R. M.; Laranjinha, J. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic Biol Med* **43**:1233-1242; 2007.
- [195] Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**:175-197; 2003.
- [196] Kaiser, J. Hormesis. Sipping from a poisoned chalice. *Science* **302**:376-379; 2003.
- [197] Gori, T.; Munzel, T. Biological effects of low-dose radiation: of harm and hormesis. *Eur Heart J* **33**:292-295; 2012.
- [198] Koo, S. H.; Montminy, M. In vino veritas: a tale of two sirt1s? *Cell* **127**:1091-1093; 2006.
- [199] Li, H.; Oehrlein, S. A.; Wallerath, T.; Ihrig-Biedert, I.; Wohlfart, P.; Ulshofer, T.; Jessen, T.; Herget, T.; Forstermann, U.; Kleinert, H. Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **53**:630-637; 1998.
- [200] Vallance, P.; Leiper, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* **1**:939-950; 2002.
- [201] Uhlenhut, K.; Hogger, P. Pitfalls and limitations in using 4,5-diaminofluorescein for evaluating the influence of polyphenols on nitric oxide release from endothelial cells. *Free Radic Biol Med*; 2012.
- [202] Wallerath, T.; Deckert, G.; Ternes, T.; Anderson, H.; Li, H.; Witte, K.; Forstermann, U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**:1652-1658; 2002.
- [203] Chen, X. M.; Kitts, D. D. Determining conditions for nitric oxide synthesis in Caco-2 cells using Taguchi and factorial experimental designs. *Anal Biochem* **381**:185-192; 2008.
- [204] Ciz, M.; Pavelkova, M.; Gallova, L.; Kralova, J.; Kubala, L.; Lojek, A. The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by murine macrophages RAW 264.7. *Physiol Res* **57**:393-402; 2008.
- [205] Taubert, D.; Berkels, R.; Klaus, W.; Roesen, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J Cardiovasc Pharmacol* **40**:701-713; 2002.
- [206] Chiesi, M.; Schwaller, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem Pharmacol* **49**:495-501; 1995.
- [207] Takahashi, S.; Uchiyama, T.; Toda, K. Differential effect of resveratrol on nitric oxide production in endothelial f-2 cells. *Biol Pharm Bull* **32**:1840-1843; 2009.
- [208] Feron, O.; Dessy, C.; Desager, J. P.; Balligand, J. L. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* **103**:113-118; 2001.
- [209] Loffredo, L.; Carnevale, R.; Perri, L.; Catasca, E.; Augelletti, T.; Cangemi, R.; Albanese, F.; Piccheri, C.; Nocella, C.; Pignatelli, P.; Violi, F. NOX2-mediated arterial dysfunction in smokers: acute effect of dark chocolate. *Heart* **97**:1776-1781; 2011.
- [210] Lewis, R. S.; Deen, W. M. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions. *Chem Res Toxicol* **7**:568-574; 1994.

- [211] Espey, M. G.; Miranda, K. M.; Thomas, D. D.; Wink, D. A. Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry* **276**:30085-30091; 2001.
- [212] Nedospasov, A. A. Is N₂O₃ the main nitrosating intermediate in aerated nitric oxide (NO) solutions in vivo? If so, where, when, and which one? *J Biochem Mol Toxic* **16**:109-120; 2002.
- [213] Huie, R. E.; Padmaja, S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* **18**:195-199; 1993.
- [214] Takahashi, S.; Nakashima, Y. Repeated and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells. *Br J Nutr*:1-7; 2011.
- [215] Botden, I. P.; Langendonk, J. G.; Meima, M. E.; Boomsma, F.; Seynhaeve, A. L.; ten Hagen, T. L.; Jan Danser, A. H.; Sijbrands, E. J. Daily red wine consumption improves vascular function by a soluble guanylyl cyclase-dependent pathway. *Am J Hypertens* **24**:162-168; 2011.
- [216] Enseleit, F.; Sudano, I.; Periat, D.; Winnik, S.; Wolfrum, M.; Flammer, A. J.; Frohlich, G. M.; Kaiser, P.; Hirt, A.; Haile, S. R.; Krasniqi, N.; Matter, C. M.; Uhlenhut, K.; Hogger, P.; Neidhart, M.; Luscher, T. F.; Ruschitzka, F.; Noll, G. Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study. *Eur Heart J*; 2012.
- [217] Moncada, S.; Rees, D. D.; Schulz, R.; Palmer, R. M. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2166-2170; 1991.
- [218] Achan, V.; Broadhead, M.; Malaki, M.; Whitley, G.; Leiper, J.; MacAllister, R.; Vallance, P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1455-1459; 2003.
- [219] Horowitz, J. D.; Heresztyn, T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: methodological considerations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**:42-50; 2007.
- [220] Meinitzer, A.; Kielstein, J. T.; Pilz, S.; Drechsler, C.; Ritz, E.; Boehm, B. O.; Winkelmann, B. R.; Marz, W. Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem* **57**:112-121; 2011.
- [221] Meinitzer, A.; Seelhorst, U.; Wellnitz, B.; Halwachs-Baumann, G.; Boehm, B. O.; Winkelmann, B. R.; Marz, W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* **53**:273-283; 2007.
- [222] Leiper, J.; Nandi, M. The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov* **10**:277-291; 2011.
- [223] Cardounel, A. J.; Cui, H.; Samouilov, A.; Johnson, W.; Kearns, P.; Tsai, A. L.; Berka, V.; Zweier, J. L. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* **282**:879-887; 2007.

- [224] Clarkson, P.; Adams, M. R.; Powe, A. J.; Donald, A. E.; McCredie, R.; Robinson, J.; McCarthy, S. N.; Keech, A.; Celermajer, D. S.; Deanfield, J. E. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* **97**:1989-1994; 1996.
- [225] Wilson, A. M.; Harada, R.; Nair, N.; Balasubramanian, N.; Cooke, J. P. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* **116**:188-195; 2007.
- [226] Lerman, A.; Edwards, B. S.; Hallett, J. W.; Heublein, D. M.; Sandberg, S. M.; Burnett, J. C., Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* **325**:997-1001; 1991.
- [227] Verhaar, M. C.; Strachan, F. E.; Newby, D. E.; Cruden, N. L.; Koomans, H. A.; Rabelink, T. J.; Webb, D. J. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* **97**:752-756; 1998.
- [228] Buckanovich, R. J.; Facciabene, A.; Kim, S.; Benencia, F.; Sasaroli, D.; Balint, K.; Katsaros, D.; O'Brien-Jenkins, A.; Gimotty, P. A.; Coukos, G. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* **14**:28-36; 2008.
- [229] Reriani, M.; Raichlin, E.; Prasad, A.; Mathew, V.; Pumper, G. M.; Nelson, R. E.; Lennon, R.; Rihal, C.; Lerman, L. O.; Lerman, A. Long-term administration of endothelin receptor antagonist improves coronary endothelial function in patients with early atherosclerosis. *Circulation* **122**:958-966; 2010.
- [230] Reiter, C. E.; Kim, J. A.; Quon, M. J. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology* **151**:103-114; 2010.
- [231] Corder, R.; Douthwaite, J. A.; Lees, D. M.; Khan, N. Q.; Viseu Dos Santos, A. C.; Wood, E. G.; Carrier, M. J. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* **414**:863-864; 2001.
- [232] Dagostino, R. B.; Belanger, A.; Dagostino, R. B. A Suggestion for Using Powerful and Informative Tests of Normality. *Am Stat* **44**:316-321; 1990.
- [233] Hardy, T. A.; May, J. M. Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **32**:122-131; 2002.
- [234] Colombani, P. C.; Bitzi, R.; Frey-Rindova, P.; Frey, W.; Arnold, M.; Langhans, W.; Wenk, C. Chronic arginine aspartate supplementation in runners reduces total plasma amino acid level at rest and during a marathon run. *Eur J Nutr* **38**:263-270; 1999.
- [235] Bode-Boger, S. M.; Boger, R. H.; Galland, A.; Tsikas, D.; Frolich, J. C. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* **46**:489-497; 1998.
- [236] Luneburg, N.; Xanthakis, V.; Schwedhelm, E.; Sullivan, L. M.; Maas, R.; Anderssohn, M.; Riederer, U.; Glazer, N. L.; Vasan, R. S.; Boger, R. H. Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine:asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort. *J Nutr* **141**:2186-2190; 2011.
- [237] Boger, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* **137**:1650S-1655S; 2007.
- [238] Calver, A.; Collier, J.; Leone, A.; Moncada, S.; Vallance, P. Effect of local intra-arterial asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the forearm arteriolar bed of healthy volunteers. *J Hum Hypertens* **7**:193-194; 1993.

- [239] Albsmeier, J.; Schwedhelm, E.; Schulze, F.; Kastner, M.; Boger, R. H. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **809**:59-65; 2004.
- [240] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**:1417-1423; 1973.
- [241] Edgell, C. J.; McDonald, C. C.; Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:3734-3737; 1983.
- [242] Szuba, A.; Chachaj, A.; Wrobel, T.; Dzietczenia, J.; Mazur, G.; Antonowicz-Juchniewicz, J.; Kuliczowski, K.; Andrzejak, R. Asymmetric dimethylarginine in hematological malignancies: a preliminary study. *Leuk Lymphoma* **49**:2316-2320; 2008.
- [243] Yoshimatsu, M.; Toyokawa, G.; Hayami, S.; Unoki, M.; Tsunoda, T.; Field, H. I.; Kelly, J. D.; Neal, D. E.; Maehara, Y.; Ponder, B. A.; Nakamura, Y.; Hamamoto, R. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* **128**:562-573; 2011.
- [244] Pal, S.; Sif, S. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol* **213**:306-315; 2007.
- [245] Spannhoff, A.; Heinke, R.; Bauer, I.; Trojer, P.; Metzger, E.; Gust, R.; Schule, R.; Brosch, G.; Sippl, W.; Jung, M. Target-based approach to inhibitors of histone arginine methyltransferases. *J Med Chem* **50**:2319-2325; 2007.
- [246] Boger, R. H.; Maas, R.; Schulze, F.; Schwedhelm, E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med* **43**:1124-1129; 2005.
- [247] Zhu, Y.; Xia, M.; Yang, Y.; Liu, F.; Li, Z.; Hao, Y.; Mi, M.; Jin, T.; Ling, W. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem* **57**:1524-1533; 2011.
- [248] Nickel, T.; Hanssen, H.; Sisic, Z.; Pfeiler, S.; Summo, C.; Schmauss, D.; Hoster, E.; Weis, M. Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo. *Eur J Nutr* **50**:163-172; 2011.
- [249] Reimann, M.; Dierkes, J.; Carlsohn, A.; Talbot, D.; Ferrari, M.; Hallund, J.; Hall, W. L.; Vafeiadou, K.; Huebner, U.; Branca, F.; Bugel, S.; Williams, C. M.; Zunft, H. J.; Koebnick, C. Consumption of soy isoflavones does not affect plasma total homocysteine or asymmetric dimethylarginine concentrations in healthy postmenopausal women. *J Nutr* **136**:100-105; 2006.
- [250] Shiina, Y.; Funabashi, N.; Lee, K.; Murayama, T.; Nakamura, K.; Wakatsuki, Y.; Daimon, M.; Komuro, I. Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults. *Int J Cardiol* **131**:424-429; 2009.
- [251] Spieker, L. E.; Flammer, A. J.; Luscher, T. F. The vascular endothelium in hypertension. *Handb Exp Pharmacol*:249-283; 2006.
- [252] Wanecek, M.; Weitzberg, E.; Rudehill, A.; Oldner, A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* **407**:1-15; 2000.

- [253] Squadrito, F.; Altavilla, D.; Morabito, N.; Crisafulli, A.; D'Anna, R.; Corrado, F.; Ruggeri, P.; Campo, G. M.; Calapai, G.; Caputi, A. P.; Squadrito, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* **163**:339-347; 2002.
- [254] Bondonno, C. P.; Yang, X.; Croft, K. D.; Considine, M. J.; Ward, N. C.; Rich, L.; Puddey, I. B.; Swinny, E.; Mubarak, A.; Hodgson, J. M. Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med* **52**:95-102; 2012.
- [255] Loke, W. M.; Hodgson, J. M.; Proudfoot, J. M.; McKinley, A. J.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr* **88**:1018-1025; 2008.
- [256] Weitzberg, E.; Ahlborg, G.; Lundberg, J. M. Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **180**:1298-1303; 1991.
- [257] Brunner, F.; Stessel, H.; Watzinger, N.; Löffler, B. M.; Opie, L. H. Binding of endothelin to plasma proteins and tissue receptors: effects on endothelin determination, vasoactivity, and tissue kinetics. *FEBS Lett* **373**:97-101; 1995.
- [258] Rossi, G. P.; Seccia, T. M.; Albertin, G.; Pessina, A. C. Measurement of endothelin: clinical and research use. *Ann Clin Biochem* **37 (Pt 5)**:608-626; 2000.
- [259] Schoonees, A.; Visser, J.; Musekiwa, A.; Volmink, J. Pycnogenol((R)) for the treatment of chronic disorders. *Cochrane Database Syst Rev* **2**:CD008294; 2012.
- [260] Schmitt, C. A.; Dirsch, V. M. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide* **21**:77-91; 2009.
- [261] Zhu, Q. Y.; Holt, R. R.; Lazarus, S. A.; Ensunsa, J. L.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J Agric Food Chem* **50**:1700-1705; 2002.
- [262] Sang, S.; Lee, M. J.; Hou, Z.; Ho, C. T.; Yang, C. S. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem* **53**:9478-9484; 2005.
- [263] Zhang, X.; Kim, W. S.; Hatcher, N.; Potgieter, K.; Moroz, L. L.; Gillette, R.; Sweedler, J. V. Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem* **277**:48472-48478; 2002.
- [264] Steffen, Y.; Schewe, T.; Sies, H. (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **359**:828-833; 2007.
- [265] Elies, J.; Cuinas, A.; Garcia-Morales, V.; Orallo, F.; Campos-Toimil, M. Trans-resveratrol simultaneously increases cytoplasmic Ca(2+) levels and nitric oxide release in human endothelial cells. *Mol Nutr Food Res* **55**:1237-1248; 2011.
- [266] Rodriguez-Delgado, M. A.; Malovana, S.; Perez, J. P.; Borges, T.; Garcia Montelongo, F. J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J Chromatogr A* **912**:249-257; 2001.
- [267] Janeiro, P.; Brett, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta* **518**:109-115; 2004.
- [268] Skinner, K. A.; White, C. R.; Patel, R.; Tan, S.; Barnes, S.; Kirk, M.; Darley-Usmar, V.; Parks, D. A. Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J Biol Chem* **273**:24491-24497; 1998.

- [269] Thomas, S.; Kotamraju, S.; Zielonka, J.; Harder, D. R.; Kalyanaraman, B. Hydrogen peroxide induces nitric oxide and proteasome activity in endothelial cells: A bell-shaped signaling response. *Free Radical Bio Med* **42**:1049-1061; 2007.
- [270] Sato, M.; Hida, N.; Umezawa, Y. Imaging the nanomolar range of nitric oxide with an amplifier-coupled fluorescent indicator in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14515-14520; 2005.
- [271] He, G. W.; Liu, Z. G. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation* **104**:1344-349; 2001.
- [272] Rathel, T. R.; Leikert, J. J.; Vollmar, A. M.; Dirsch, V. M. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. *Biol Proced Online* **5**:136-142; 2003.
- [273] Lancaster, J. R., Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* **1**:18-30; 1997.
- [274] Shaw, A. W.; Vosper, A. J. Solubility of Nitric-Oxide in Aqueous and Non-Aqueous Solvents. *J Chem Soc Farad T 1* **73**:1239-1244; 1977.
- [275] Moller, M. N.; Li, Q.; Vitturi, D. A.; Robinson, J. M.; Lancaster, J. R., Jr.; Denicola, A. Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the *NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* **20**:709-714; 2007.
- [276] Fitzhugh, A. L.; Keefer, L. K. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radic Biol Med* **28**:1463-1469; 2000.
- [277] Wise, D. L.; Houghton, G. Diffusion Coefficients of Neon Krypton Xenon Carbon Monoxide and Nitric Oxide in Water at 10-60 Degree C. *Chem Eng Sci* **23**:1211-&; 1968.
- [278] Steenken, S.; Neta, P. One-Electron Redox Potentials of Phenols - Hydroxyphenols and Aminophenols and Related-Compounds of Biological Interest. *J Phys Chem-Us* **86**:3661-3667; 1982.
- [279] Wardman, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* **43**:995-1022; 2007.
- [280] Jour'dheuil, D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **33**:676-684; 2002.
- [281] Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**:1-13; 2009.
- [282] Lapidot, T.; Walker, M. D.; Kanner, J. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agr Food Chem* **50**:3156-3160; 2002.
- [283] Fang, Y. I.; Hatori, Y.; Ohata, H.; Honda, K. Nitrogen oxide air pollutants interfere with the measurement of nitric oxide using 2,3-diaminonaphthalene: reduction of background interference. *Anal Biochem* **393**:132-134; 2009.
- [284] Morales, J. A.; Walsh, J. E. Detection of atmospheric nitrogen dioxide using a miniaturised fibre-optic spectroscopy system and the ambient sunlight. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **61**:2073-2079; 2005.

- [285] Gomez, G.; Pikal, M. J.; Rodriguez-Hornedo, N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharm Res* **18**:90-97; 2001.
- [286] Daiber, A.; Bachschmid, M.; Kavakli, C.; Frein, D.; Wendt, M.; Ullrich, V.; Munzel, T. A new pitfall in detecting biological end products of nitric oxide-nitration, nitros(yl)ation and nitrite/nitrate artefacts during freezing. *Nitric Oxide* **9**:44-52; 2003.
- [287] Grider, J. R.; Murthy, K. S. Autoinhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in gut smooth muscle by nitric oxide. *Regul Pept* **151**:75-79; 2008.
- [288] Nishida, C. R.; Ortiz de Montellano, P. R. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem* **274**:14692-14698; 1999.
- [289] Tsikas, D.; Rossa, S.; Sandmann, J.; Frolich, J. C. High-performance liquid chromatographic analysis of nitrite and nitrate in human plasma as S-nitroso-N-acetylcysteine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **724**:199-201; 1999.
- [290] Reihill, J. A.; Ewart, M. A.; Hardie, D. G.; Salt, I. P. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun* **354**:1084-1088; 2007.
- [291] Schneider, J. C.; El Kebir, D.; Chereau, C.; Lanone, S.; Huang, X. L.; De Buys Roessingh, A. S.; Mercier, J. C.; Dall'Ava-Santucci, J.; Dinh-Xuan, A. T. Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H2311-2319; 2003.
- [292] Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R.; Dalle-Donne, I.; Rossi, R. Nitric oxide, S-nitrosothiols and hemoglobin: is methodology the key? *Trends Pharmacol Sci* **25**:311-316; 2004.
- [293] Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Lauer, T.; Rassaf, T.; Schindler, A.; Picker, O.; Scheeren, T.; Godecke, A.; Schrader, J.; Schulz, R.; Heusch, G.; Schaub, G. A.; Bryan, N. S.; Feelisch, M.; Kelm, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* **35**:790-796; 2003.
- [294] Jobgen, W. S.; Jobgen, S. C.; Li, H.; Meininger, C. J.; Wu, G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **851**:71-82; 2007.
- [295] Brouet, A.; Sonveaux, P.; Dessy, C.; Balligand, J. L.; Feron, O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* **276**:32663-32669; 2001.
- [296] Rassaf, T.; Bryan, N. S.; Kelm, M.; Feelisch, M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med* **33**:1590-1596; 2002.
- [297] Garthwaite, J.; Boulton, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* **57**:683-706; 1995.
- [298] Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:9030-9033; 1989.
- [299] Rothe, F.; Langnaese, K.; Wolf, G. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study. *Nitric Oxide* **13**:21-35; 2005.

- [300] Huber-Abel, F. A.; Gerber, M.; Hoppeler, H.; Baum, O. Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* **112**:155-162; 2012.
- [301] Silvagno, F.; Xia, H.; Bredt, D. S. Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* **271**:11204-11208; 1996.
- [302] Oceandy, D.; Cartwright, E. J.; Emerson, M.; Prehar, S.; Baudoin, F. M.; Zi, M.; Alatwi, N.; Venetucci, L.; Schuh, K.; Williams, J. C.; Armesilla, A. L.; Neyses, L. Neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart is regulated by the sarcolemmal calcium pump 4b. *Circulation* **115**:483-492; 2007.
- [303] Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**:2783-2802; 2008.
- [304] Gouge, R. C.; Marshburn, P.; Gordon, B. E.; Nunley, W.; Huet-Hudson, Y. M. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* **58**:875-879; 1998.
- [305] Matarredona, E. R.; Murillo-Carretero, M.; Moreno-Lopez, B.; Estrada, C. Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res* **995**:274-284; 2004.
- [306] Hua, Y.; Huang, X. Y.; Zhou, L.; Zhou, Q. G.; Hu, Y.; Luo, C. X.; Li, F.; Zhu, D. Y. DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* **200**:231-242; 2008.
- [307] Eliasson, M. J.; Huang, Z.; Ferrante, R. J.; Sasamata, M.; Molliver, M. E.; Snyder, S. H.; Moskowitz, M. A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* **19**:5910-5918; 1999.
- [308] Gatto, E. M.; Riobo, N. A.; Carreras, M. C.; Chernavsky, A.; Rubio, A.; Satz, M. L.; Poderoso, J. J. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* **4**:534-539; 2000.
- [309] Hancock, D. B.; Martin, E. R.; Vance, J. M.; Scott, W. K. Nitric oxide synthase genes and their interactions with environmental factors in Parkinson's disease. *Neurogenetics* **9**:249-262; 2008.
- [310] Castegna, A.; Thongboonkerd, V.; Klein, J. B.; Lynn, B.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* **85**:1394-1401; 2003.
- [311] Zhou, L.; Zhu, D. Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **20**:223-230; 2009.
- [312] Nagata, N.; Momose, K.; Ishida, Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem* **125**:658-661; 1999.
- [313] Letenneur, L.; Proust-Lima, C.; Le Gouge, A.; Dartigues, J. F.; Barberger-Gateau, P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol* **165**:1364-1371; 2007.
- [314] Devore, E. E.; Kang, J. H.; Breteler, M. M.; Grodstein, F. Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline. *Ann Neurol*; 2012.

- [315] Trebaticka, J.; Kopasova, S.; Hradecna, Z.; Cinovsky, K.; Skodacek, I.; Suba, J.; Muchova, J.; Zitnanova, I.; Waczulikova, I.; Rohdewald, P.; Durackova, Z. Treatment of ADHD with French maritime pine bark extract, Pycnogenol. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **15**:329-335; 2006.
- [316] Abd El Mohsen, M. M.; Kuhnle, G.; Rechner, A. R.; Schroeter, H.; Rose, S.; Jenner, P.; Rice-Evans, C. A. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med* **33**:1693-1702; 2002.
- [317] de Boer, V. C.; Dihal, A. A.; van der Woude, H.; Arts, I. C.; Wolffram, S.; Alink, G. M.; Rietjens, I. M.; Keijer, J.; Hollman, P. C. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* **135**:1718-1725; 2005.
- [318] Prasain, J. K.; Peng, N.; Dai, Y.; Moore, R.; Arabshahi, A.; Wilson, L.; Barnes, S.; Michael Wyss, J.; Kim, H.; Watts, R. L. Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* **16**:233-243; 2009.
- [319] Ferruzzi, M. G.; Lobo, J. K.; Janle, E. M.; Cooper, B.; Simon, J. E.; Wu, Q. L.; Welch, C.; Ho, L.; Weaver, C.; Pasinetti, G. M. Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **18**:113-124; 2009.
- [320] Lykkesfeldt, J.; Trueba, G. P.; Poulsen, H. E.; Christen, S. Vitamin C deficiency in weanling guinea pigs: differential expression of oxidative stress and DNA repair in liver and brain. *Br J Nutr* **98**:1116-1119; 2007.
- [321] De Vera, M.; Rahman, M. M.; Rankin, J.; Kopec, J.; Gao, X.; Choi, H. Gout and the risk of Parkinson's disease: a cohort study. *Arthritis Rheum* **59**:1549-1554; 2008.
- [322] Alonso, A.; Rodriguez, L. A.; Logroscino, G.; Hernan, M. A. Gout and risk of Parkinson disease: a prospective study. *Neurology* **69**:1696-1700; 2007.
- [323] Ho, W. J.; Tsai, W. P.; Yu, K. H.; Tsay, P. K.; Wang, C. L.; Hsu, T. S.; Kuo, C. T. Association between endothelial dysfunction and hyperuricaemia. *Rheumatology (Oxford)* **49**:1929-1934; 2010.
- [324] Rhee, S. H.; Pothoulakis, C.; Mayer, E. A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**:306-314; 2009.
- [325] Clarke, T. B.; Davis, K. M.; Lysenko, E. S.; Zhou, A. Y.; Yu, Y.; Weiser, J. N. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nat Med* **16**:228-231; 2010.
- [326] Langguth, P.; Fricker, G.; Wunderli-Allenspach, H. Biopharmazie. *WILEY-VCH Verlag, Weinheim*; 2004.
- [327] Lobell, M.; Molnar, L.; Keseru, G. M. Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure. *J Pharm Sci* **92**:360-370; 2003.
- [328] Liu, X.; Tu, M.; Kelly, R. S.; Chen, C.; Smith, B. J. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos* **32**:132-139; 2004.
- [329] Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**:2643-2652; 1973.
- [330] Subramanian, G.; Kitchen, D. B. Computational models to predict blood-brain barrier permeation and CNS activity. *J Comput Aided Mol Des* **17**:643-664; 2003.

- [331] van de Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target* **6**:151-165; 1998.
- [332] Fischer, H.; Gottschlich, R.; Seelig, A. Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *J Membr Biol* **165**:201-211; 1998.
- [333] Ajay; Bemis, G. W.; Murcko, M. A. Designing libraries with CNS activity. *J Med Chem* **42**:4942-4951; 1999.
- [334] Boissel, J. P.; Bros, M.; Schrock, A.; Godtel-Armbrust, U.; Forstermann, U. Cyclic AMP-mediated upregulation of the expression of neuronal NO synthase in human A673 neuroepithelioma cells results in a decrease in the level of bioactive NO production: analysis of the signaling mechanisms that are involved. *Biochemistry* **43**:7197-7206; 2004.
- [335] Braidy, N.; Grant, R.; Adams, S.; Guillemin, G. J. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *FEBS J* **277**:368-382; 2010.
- [336] Tseng, E. E.; Brock, M. V.; Lange, M. S.; Troncoso, J. C.; Blue, M. E.; Lowenstein, C. J.; Johnston, M. V.; Baumgartner, W. A. Glutamate excitotoxicity mediates neuronal apoptosis after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* **89**:440-445; 2010.
- [337] Williams, R. J.; Spencer, J. P. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **52**:35-45; 2012.
- [338] Doniger, S.; Hofmann, T.; Yeh, J. Predicting CNS permeability of drug molecules: comparison of neural network and support vector machine algorithms. *J Comput Biol* **9**:849-864; 2002.
- [339] Youdim, K. A.; Dobbie, M. S.; Kuhnle, G.; Proteggente, A. R.; Abbott, N. J.; Rice-Evans, C. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* **85**:180-192; 2003.
- [340] Ooms, F.; Weber, P.; Carrupt, P. A.; Testa, B. A simple model to predict blood-brain barrier permeation from 3D molecular fields. *Biochim Biophys Acta* **1587**:118-125; 2002.
- [341] Kelder, J.; Grootenhuis, P. D.; Bayada, D. M.; Delbressine, L. P.; Ploemen, J. P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res* **16**:1514-1519; 1999.
- [342] Box, G. E. P.; Draper, N. R. Empirical Model-Building and Response Surfaces. *WILEY*:424; 1987.
- [343] Pardridge, W. M.; Oldendorf, W. H. Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta* **401**:128-136; 1975.
- [344] Clark, W. G.; Oldendorf, W. H.; Dewherst, W. G. Blood-brain barrier to carbidopa (MK-486) and Ro 4-4602, peripheral dopa decarboxylase inhibitors. *J Pharm Pharmacol* **25**:416-418; 1973.
- [345] Luna-Tortos, C.; Fedrowitz, M.; Loscher, W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology* **55**:1364-1375; 2008.
- [346] Schneider, P.; Schneider, G. Collection of bioactive reference compounds for focused library design. *Qsar Comb Sci* **22**:713-718; 2003.
- [347] Clark, D. E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov Today* **8**:927-933; 2003.
- [348] Roiko, S. A.; Felmler, M. A.; Morris, M. E. Brain uptake of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid in rats. *Drug Metab Dispos* **40**:212-218; 2012.

- [349] Zhang, S.; Morris, M. E. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1258-1267; 2003.
- [350] de Boer, A. G.; Gaillard, P. J. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:323-355; 2007.
- [351] Potterat, O.; Hamburger, M. Morinda citrifolia (Noni) fruit--phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Med* **73**:191-199; 2007.
- [352] McClatchey, W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of Morinda citrifolia (Rubiaceae). *Integr Cancer Ther* **1**:110-120; discussion 120; 2002.
- [353] Mueller, B. A.; Scott, M. K.; Sowinski, K. M.; Prag, K. A. Noni juice (Morinda citrifolia): hidden potential for hyperkalemia? *Am J Kidney Dis* **35**:310-312; 2000.
- [354] Basar, S.; Westendorf, J. Identification of (2E,4Z,7Z)-Decatrienoic Acid in Noni Fruit and Its Use in Quality Screening of Commercial Noni Products. *Food Anal Method* **4**:57-65; 2011.
- [355] Williams, E.; Fulop, M. A puzzling case of hyperkalaemia. *Lancet* **357**:1176; 2001.
- [356] Deng, S. X.; West, B. J.; Jensen, C. J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. *Food Chem* **122**:267-270; 2010.
- [357] FDA warning letters on Noni-juice marketing. Available at: <http://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/2004/ucm146367.htm>, <http://www.fda.gov/downloads/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/2000/UCM078235.pdf> (30.04.2012).
- [358] Beschluss der Kommission vom 21. April 2010 über die Genehmigung des Inverkehrbringens von Püree und Konzentrat aus Früchten von Morinda citrifolia als neuartige Lebensmittelzutat gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates. Available at: http://www.bfr.bund.de/cm/208/pueree_und_konzentrat_aus_den_fruechten_von_morinda_citrifolia.pdf (30.04.2012).
- [359] Entscheidung der Kommission vom 5. Juni 2003 zur Genehmigung des Inverkehrsbringens von "Noni-Saft" (Saft aus der Frucht der Spezies Morinda citrifolia L.) als neuartige Lebensmittelzutat im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und Rates. Available at: http://www.bfr.bund.de/cm/208/morinda_citrifolia.pdf (30.04.2012).
- [360] REGULATION (EC) No 1924/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1924:20100302:EN:PDF> (30.04.2012).
- [361] Issell, B. F., A. Franke, R.M. Fielding. Pharmacokinetic Study of Noni Fruit Extract. *Journal of Dietary Supplements* **5**:373-382; 2008.
- [362] Wang, M. Y., et al. Morinda citrifolia L. (noni) improves the Quality of Life in adults with Osteoarthritis. *Functional Foods in Health and Disease* **2**:75-90; 2011.
- [363] Akinbo, S. R. A., C.C. Noronha, A.O. Okanlawon, and M.A. Danesi. Comparative study of the effect of Morinda citrifolia (Noni) with Selected Physiotherapy Modalities in the Management of Patients with Cervical Spondylosis. *Nigerian Journal of Health and Biomedical Sciences* **5**:6-11; 2006.

- [364] Altman, R.; Alarcon, G.; Appelrouth, D.; Bloch, D.; Borenstein, D.; Brandt, K.; Brown, C.; Cooke, T. D.; Daniel, W.; Feldman, D.; et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* **34**:505-514; 1991.
- [365] Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheum* **43**:1905-1915; 2000.
- [366] Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; Healey, L. A.; Kaplan, S. R.; Liang, M. H.; Luthra, H. S.; et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**:315-324; 1988.
- [367] Martel-Pelletier, J.; McCollum, R.; Fujimoto, N.; Obata, K.; Cloutier, J. M.; Pelletier, J. P. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* **70**:807-815; 1994.
- [368] Ram, M.; Sherer, Y.; Shoenfeld, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* **26**:299-307; 2006.
- [369] Van den Steen, P. E.; Dubois, B.; Nelissen, I.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**:375-536; 2002.
- [370] Ernst, E. Usage of complementary therapies in rheumatology: a systematic review. *Clin Rheumatol* **17**:301-305; 1998.
- [371] Long, L.; Soeken, K.; Ernst, E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* **40**:779-793; 2001.
- [372] De Silva, V.; El-Metwally, A.; Ernst, E.; Lewith, G.; Macfarlane, G. J. Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* **50**:911-920; 2011.
- [373] Goldbach-Mansky, R.; Wilson, M.; Fleischmann, R.; Olsen, N.; Silverfield, J.; Kempf, P.; Kivitz, A.; Sherrer, Y.; Pucino, F.; Csako, G.; Costello, R.; Pham, T. H.; Snyder, C.; van der Heijde, D.; Tao, X.; Wesley, R.; Lipsky, P. E. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* **151**:229-240, W249-251; 2009.
- [374] Basar, S.; Uhlenhut, K.; Hogger, P.; Schone, F.; Westendorf, J. Analgesic and antiinflammatory activity of Morinda citrifolia L. (Noni) fruit. *Phytother Res* **24**:38-42; 2010.
- [375] Jovanovic, D. V.; Martel-Pelletier, J.; Di Battista, J. A.; Mineau, F.; Jolicoeur, F. C.; Benderdour, M.; Pelletier, J. P. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:1134-1144; 2000.
- [376] Deng, S. X.; Palu, A. K.; West, B. J.; Su, C. X.; Zhou, B. N.; Jensen, J. C. Lipoxigenase inhibitory constituents of the fruits of noni (Morinda citrifolia) collected in Tahiti. *J Nat Prod* **70**:859-862; 2007.
- [377] Palu, A., C. Su, B. Zhou. Morinda citrifolia L., a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX enzymes. *Proceedings of the 5th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Food, San Francisco, CA, USA* **470**; 2004.
- [378] Dussossoy, E.; Brat, P.; Bony, E.; Boudard, F.; Poucheret, P.; Mertz, C.; Giaimis, J.; Michel, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (Morinda citrifolia L.). *J Ethnopharmacol* **133**:108-115; 2011.

- [379] Grimm, T. Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten Kiefernextraktes. *Dissertation*; 2005
- [380] Aljada, A.; Ghanim, H.; Mohanty, P.; Hofmeyer, D.; Tripathy, D.; Dandona, P. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). *J Clin Endocrinol Metab* **86**:5988-5991; 2001.
- [381] Hulejova, H.; Baresova, V.; Klezl, Z.; Polanska, M.; Adam, M.; Senolt, L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine* **38**:151-156; 2007.
- [382] Macdonald, A. D.; Woolfe, G.; et al. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br J Pharmacol Chemother* **1**:4-14; 1946.
- [383] Slimestad, R.; Fossen, T.; Vagen, I. M. Onions: a source of unique dietary flavonoids. *J Agric Food Chem* **55**:10067-10080; 2007.
- [384] Escarpa, A.; Gonzalez, M. C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A* **823**:331-337; 1998.
- [385] Kalinova, J.; Triska, J.; Vrchatova, N. Distribution of Vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J Agric Food Chem* **54**:5330-5335; 2006.
- [386] Moon, P. D.; Lee, B. H.; Jeong, H. J.; An, H. J.; Park, S. J.; Kim, H. R.; Ko, S. G.; Um, J. Y.; Hong, S. H.; Kim, H. M. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur J Pharmacol* **555**:218-225; 2007.
- [387] Hornick, C. A.; Myers, A.; Sadowska-Krowicka, H.; Anthony, C. T.; Woltering, E. A. Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). *Angiogenesis* **6**:143-149; 2003.
- [388] Ebrahim, Q.; Chaurasia, S. S.; Vasanji, A.; Qi, J. H.; Klenotic, P. A.; Cutler, A.; Asosingh, K.; Erzurum, S.; Anand-Apte, B. Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. *Am J Pathol* **176**:496-503; 2010.
- [389] Kim, S. W.; Jo, B. K.; Jeong, J. H.; Choi, S. U.; Hwang, Y. I. Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (Noni) fruit. *J Med Food* **8**:552-555; 2005.
- [390] Lachenmeier, K., et al.,. Authentication of Noni (*Morinda citrifolia*) juice. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* **102**:58-61; 2006.
- [391] Potterat, O.; Felten, R. V.; Dalsgaard, P. W.; Hamburger, M. Identification of TLC markers and quantification by HPLC-MS of various constituents in noni fruit powder and commercial noni-derived products. *J Agric Food Chem* **55**:7489-7494; 2007.
- [392] Boynton, P. M. Administering, analysing, and reporting your questionnaire. *BMJ* **328**:1372-1375; 2004.
- [393] Boynton, P. M.; Greenhalgh, T. Selecting, designing, and developing your questionnaire. *BMJ* **328**:1312-1315; 2004.
- [394] Dijkers, M. Measuring quality of life: methodological issues. *Am J Phys Med Rehabil* **78**:286-300; 1999.

- [395] Stern, J. M.; Simes, R. J. Publication bias: evidence of delayed publication in a cohort study of clinical research projects. *BMJ* **315**:640-645; 1997.
- [396] Pittler, M. H.; Abbot, N. C.; Harkness, E. F.; Ernst, E. Location bias in controlled clinical trials of complementary/alternative therapies. *J Clin Epidemiol* **53**:485-489; 2000.
- [397] Miller, C. G., Reid, D. M. Clinical Trials in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis, ed 1. *Springer Verlag, London*; 2008.
- [398] Westendorf, J.; Effenberger, K.; Iznaguen, H.; Basar, S. Toxicological and analytical investigations of noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *J Agric Food Chem* **55**:529-537; 2007.
- [399] Stadlbauer, V.; Weiss, S.; Payer, F.; Stauber, R. E. Herbal does not at all mean innocuous: the sixth case of hepatotoxicity associated with morinda citrifolia (noni). *Am J Gastroenterol* **103**:2406-2407; 2008.
- [400] Delehanty, J. B.; Johnson, B. J.; Hickey, T. E.; Pons, T.; Ligler, F. S. Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J Nat Prod* **70**:1718-1724; 2007.
- [401] Azumi, S.; Tanimura, A.; Tanamoto, K. A novel inhibitor of bacterial endotoxin derived from cinnamon bark. *Biochem Biophys Res Commun* **234**:506-510; 1997.
- [402] Bove, P. F.; Wesley, U. V.; Greul, A. K.; Hristova, M.; Dostmann, W. R.; van der Vliet, A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:138-146; 2007.
- [403] Gu, Z.; Kaul, M.; Yan, B.; Kridel, S. J.; Cui, J.; Strongin, A.; Smith, J. W.; Liddington, R. C.; Lipton, S. A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**:1186-1190; 2002.
- [404] Murrell, G. A.; Jang, D.; Williams, R. J. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* **206**:15-21; 1995.
- [405] Pelletier, J. P.; Jovanovic, D. V.; Lascau-Coman, V.; Fernandes, J. C.; Manning, P. T.; Connor, J. R.; Currie, M. G.; Martel-Pelletier, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* **43**:1290-1299; 2000.
- [406] Nishida, K.; Doi, T.; Matsuo, M.; Ishiwari, Y.; Tsujigiwa, H.; Yoshida, A.; Shibahara, M.; Inoue, H. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* **9**:232-237; 2001.
- [407] Taskiran, D.; Stefanovic-Racic, M.; Georgescu, H.; Evans, C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:142-148; 1994.
- [408] USP, M. Maritime Pine Bark Extrakt. *USP* **30**:965-966.
- [409] Rappold, M. Synthese von -(3',4'-Dihydroxyphenyl)- -valerolacton und Derivaten sowie die Enantiomerentrennung der Zwischenstufen an chiraler Phase und Synthese des - Azidoanilin-8-azidoadenosintriphosphat-Lithiumsalzes *Diplomarbeit, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg*; 2010.
- [410] Raschke, W. C.; Baird, S.; Ralph, P.; Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**:261-267; 1978.

- [411] Hartley, J. W.; Evans, L. H.; Green, K. Y.; Naghashfar, Z.; Macias, A. R.; Zervas, P. M.; Ward, J. M. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology* **5**:1; 2008.
- [412] Dulbecco, R.; Freeman, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**:396-397; 1959.
- [413] Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:2496-2500; 1986.
- [414] Wesierska-Gadek, J.; Schreiner, T.; Maurer, M.; Waringer, A.; Ranftler, C. Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cell Mol Biol Lett* **12**:280-293; 2007.
- [415] Babich, H.; Borenfreund, E. Cytotoxic effects of food additives and pharmaceuticals on cells in culture as determined with the neutral red assay. *J Pharm Sci* **79**:592-594; 1990.
- [416] Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* **3**:1125-1131; 2008.
- [417] Guevara, I.; Iwanejko, J.; Dembinska-Kiec, A.; Pankiewicz, J.; Wanat, A.; Anna, P.; Golabek, I.; Bartus, S.; Malczewska-Malec, M.; Szczudlik, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* **274**:177-188; 1998.
- [418] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254; 1976.
- [419] Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakaye, B.; De Borman, B.; Coumans, B.; Hennen, G.; Grisar, T.; Igout, A.; Heinen, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**:291-295; 1999.
- [420] Pfaffl, M. W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**:509-515; 2004.
- [421] Raethel, T. Untersuchung zum Einfluß von Sojaisoflavonen und Rotweinpolyphenolextrakten auf die Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase. *Dissertation, Institut für Pharmazie, Universität München*; 2005.
- [422] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685; 1970.
- [423] Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354; 1979.
- [424] ImageJ. Available at: <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (30.04.2012).
- [425] Kromidas, S. Validierung in der Analytik. *WILEY-VCH Verlag, Weinheim*; 1999.
- [426] Kromidas, S. K., H.J. Chromatogramme richtig integrieren und bewerten. Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC. *WILEY-VCH Verlag, Weinheim*; 2008.
- [427] HPLC-Tipp: 01-2008 von Kromidas Stavros. Available at: <http://www.labo.de/hplc-tipp/HPLC-Tipp---Der-HPLC-Tipp-971168.htm> (30.04.2012).
- [428] EURACHEM. Available at: <http://www.eurachem.org/> (30.04.2012)
- [429] IUPAC. Available at: <http://www.iupac.org/> (30.04.2012).

- [430] Ciolino, L. A.; Mesmer, M. Z.; Satzger, R. D.; Machal, A. C.; McCauley, H. A.; Mohrhaus, A. S. The chemical interconversion of GHB and GBL: forensic issues and implications. *J Forensic Sci* **46**:1315-1323; 2001.
- [431] Mitchell, R. W.; Edmundson, C. L.; Miller, D. W.; Hatch, G. M. On the mechanism of oleate transport across human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* **110**:1049-1057; 2009.
- [432] Griffiths, C.; Garthwaite, J. The shaping of nitric oxide signals by a cellular sink. *J Physiol* **536**:855-862; 2001.
- [433] Schulze, F.; Wesemann, R.; Schwedhelm, E.; Sydow, K.; Albsmeier, J.; Cooke, J. P.; Boger, R. H. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* **42**:1377-1383; 2004.
- [434] Abdel-Sayed, S.; Nussberger, J.; Aubert, J. F.; Gohlke, P.; Brunner, H. R.; Brakch, N. Measurement of plasma endothelin-1 in experimental hypertension and in healthy subjects. *Am J Hypertens* **16**:515-521; 2003.
- [435] Ngoka, L. C. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci* **6**:30; 2008.
- [436] Ecker, G. F.; Noe, C. R. In silico prediction models for blood-brain barrier permeation. *Curr Med Chem* **11**:1617-1628; 2004.
- [437] Labute, P. MOE LogP(Octanol/Water) Model. unpublished. *Source code in \$MOE/lib/svl/quasar.svl/q_logp.svl*; 1998.
- [438] Wildman, S. A., Crippen, G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **39**:868-873; 1999.
- [439] Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* **43**:3714-3717; 2000.
- [440] CRC Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press*; 1994.
- [441] Norinder, U.; Sjoberg, P.; Osterberg, T. Theoretical calculation and prediction of brain-blood partitioning of organic solutes using MolSurf parametrization and PLS statistics. *J Pharm Sci* **87**:952-959; 1998.
- [442] Timmermann, M. Zelluläre Regulation und klinische Aspekte des monocytenspezifischen Proteins CD163. *Dissertation, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg*; 2005.
- [443] Meyer, T. P.; Zehnter, I.; Hofmann, B.; Zaisserer, J.; Burkhart, J.; Rapp, S.; Weinauer, F.; Schmitz, J.; Illert, W. E. Filter Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J Immunol Methods* **307**:150-166; 2005.
- [444] Dietz, A. B.; Bulur, P. A.; Emery, R. L.; Winters, J. L.; Epps, D. E.; Zubair, A. C.; Vuk-Pavlovic, S. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion* **46**:2083-2089; 2006.