

**Interventionsstudien und *in-vitro*-Untersuchungen
zum Effekt von Polyphenolen und ω -3-Fettsäuren
auf Endothelialfunktionen und Hautphysiologie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Karin Isolde Neukam
aus Dormagen

Düsseldorf, Januar 2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wilhelm Stahl

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2006

meinen Eltern
und Großeltern

Inhalt

ABKÜRZUNGEN	1
TABELLEN	8
ABBILDUNGEN	10
1 EINLEITUNG	14
1.1 NUTRACEUTICALS	14
1.2 PHYSIOLOGIE DES BLUTKREISLAUFES UND DER HAUT	16
1.2.1 REGULATION DER SAUERSTOFF-HOMÖOSTASE.....	16
1.2.1.1 Endothel-abhängige Vasorelaxation	16
1.2.1.2 Mikrozirkulation	18
1.1.2.3 Endotheliale Dysfunktion	19
1.1.2.4 Hypoxie.....	21
1.1.2.5 Arteriosklerose und LDL-Oxidation	21
1.1.3 DIE HAUT	23
1.1.3.1 Aufbau und Funktion	23
1.1.3.2 Photoprotektion.....	25
1.1.4 LIPIDSTOFFWECHSEL MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN	26
1.3 POLYPHENOLE	31
1.3.1 ALLGEMEINES	31
1.2.2 KLASSIFIZIERUNG DER FLAVONOIDE.....	31
1.2.3 VORKOMMEN	33
1.2.4 PHARMAKOKINETIK DER FLAVONOIDE.....	34
1.2.5 PHYSIOLOGISCHE EFFEKTE DER FLAVONOIDE	41
1.4 ZELLULÄRE KOMMUNIKATION ÜBER GAP JUNCTIONS	45
1.5 ZIELSETZUNG	48

2 MATERIAL UND METHODEN	49
2.1 CHEMIKALIEN, GERÄTE UND MATERIALIEN:	49
2.2 NAHRUNGSSUPPLEMENTE, STRUKTURFORMELN DER TESTSUBSTANZEN UND STAMMLÖSUNGEN	52
2.3 QUANTIFIZIERUNG: INSTRUMENTELLE ANALYTIK:	55
2.3.1 ANALYTIK DER FLAVANOLE:	55
2.3.1.1 Probenaufbereitung:	55
2.3.1.1.1 Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten	55
2.3.1.1.2 Lebensmittelproben: Kakaopulver	55
2.3.1.2 Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	56
2.3.2 ANALYTIK DER FLAVANONE.....	57
2.3.2.1 Probenaufarbeitung	57
2.3.2.1.1 Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten	57
2.3.2.1.2 Nahrungssupplemente (Interventionsstudie III).....	58
2.3.2.2 RP-HPLC-Analytik der Flavanone:	58
2.3.3 BESTIMMUNG DES FETTSÄUREMUSTERS	59
2.3.3.1 Fettsäureextraktion.....	59
2.3.3.1.1 Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten	59
2.3.3.1.2 Nahrungssupplemente.....	59
2.3.3.2 Basenkatalysierte Transmethylierung zur Herstellung von FAME	60
2.3.3.3 Gaschromatographie – Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	60
2.4 INTERVENTIONSSTUDIEN	61
2.4.1 ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN AN DIE TEILNEHMER.....	61
2.4.2 GEWINNUNG UND PRÄPARATION VON PLASMA UND ERYTHROZYTEN	61
2.4.3 POLYPHENOLSTUDIE: HOHER VS. NIEDRIGER POLYPHENOL-GEHALT – EINFLUSS AUF HAUTQUALITÄT UND SONNENSCHUTZ (INTERVENTIONSSTUDIE I)	62
2.4.3.1 Studiendesign	62
2.4.3.2 Messung der Hautparameter	63
2.4.4 LIPIDSTUDIE: EINFLUSS ω -3-REICHER UND ω -3-ARMER NAHRUNGSSUPPLEMENTE AUF SENSITIVE HAUT (INTERVENTIONSSTUDIE II)	65
2.4.4.1 Studiendesign.....	65
2.4.4.2 Messung der Hautparameter	65
2.4.5 PAT-STUDIE: EINFLUSS VON FLAVONOIDEN AUF DIE VASODILATATION WÄHREND REAKTIVER HYPERÄMIE (INTERVENTIONSSTUDIE III)	66
2.4.5.1 Studiendesign.....	66
2.4.5.2 Bestimmung des peripheren arteriellen Tonus als Antwort auf reaktive Hyperämie (RH) ...	66

Inhaltsverzeichnis

2.5 ZELLKULTUR	67
2.5.1 CHARAKTERISTIKA DER ZELL-LINIE.....	67
2.5.2 ANZUCHT UND KULTIVIERUNG DER ZELLEN	67
2.5.3 INKUBATIONSBEDINGUNGEN	68
2.5.4 ZELLVIABILITÄTSBESTIMMUNG MITTELS MTT-TEST.....	68
2.5.5 KOMMUNIKATIONS-TEST: FARBSTOFF-TRANSFER-ASSAY	69
2.5.6 WESTERN-BLOT-ANALYTIK	70
2.5.6.1 Herstellung der Zell-Lysate.....	70
2.5.6.2 Proteinbestimmung	70
2.5.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
2.5.6.4 Semi-Dry-Blotting	71
2.5.6.5 Immunologischer Nachweis von Connexin43 und eNOS.....	73
2.5.6.5 Ladungskontrolle	73
2.5.7 IMMUNOCYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CONNEXIN43.....	74
2.5.8 DAPI-FÄRBUNG	74
2.6 DENITROSIERUNG VON S-NITROSOGLUTATHION: IN-VITRO EFFEKT VON EPICATECHIN	75
2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	77
3 ERGEBNISSE	78
3.1 METHODENENTWICKLUNG ZUR SIMULTANEN BESTIMMUNG VON FLAVANOLEN UND DEREN O-METHYL-METABOLITE IN BIOLOGISCHEM MATERIAL MITTELS HPLC	78
3.1.1 INSTRUMENTELLE PARAMETER	78
3.1.1.1 Detektion.....	78
3.1.1.4 Mobile Phase:.....	79
3.1.2 PROBENAUFBEREITUNG	81
3.1.3 VALIDIERUNG DER METHODE	81
3.2 INTERVENTIONSSTUDIEN	85
3.2.1 ANALYSEN DER NÄHRUNGSSUPPLEMENTE.....	85
3.2.1.1 Kakaopulver	85
3.2.1.2 Öl-Weichgelatine-Kapseln.....	89
3.2.1.3 Flavanon-Tabletten	91
3.2.1.3 Oligomere Procyanidin OPC-Kapseln	93
3.2.2 INTERVENTIONSSTUDIE I: SUPPLEMENTIERUNG MIT KAKAOPULVER MIT HOHEM UND GERINGEM POLYPHENOL-GEHALT	94
3.2.2.1 Einmal-Dosierung	94
3.2.2.1.1 Bioverfügbarkeit der Flavanole.....	94

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.1.2	Kutane und subkutane Mikrozirkulation.....	96
3.2.2.2	Bioverfügbarkeit, Mikrozirkulation, UV-Schutz und Hautphysiologie nach Mehrfachdosierung.....	99
3.2.2.2.1	Flavanol-Gehalt in Plasma und Erythrozyten nach täglichem Konsum von Kakao-Polyphenolen aus HP- und LP-Pulver.....	99
3.2.2.2.2	Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäure-Musters im Blut nach 3-monatiger Supplementierung mit HP- und LP-Pulver.....	101
3.2.2.2.3	Mikrozirkulation, Photoprotektion und Hautphysiologie.....	103
3.2.3	INTERVENTIONSSTUDIE II: ω -3-FETTSÄURE-REICHE VS. ω -3-FETTSÄURE-ARME NAHRUNGSERGÄNZUNG.....	114
3.2.3.1	Gaschromatographische Analyse von Plasma und Erythrozyten.....	114
3.2.3.1.1	Bioverfügbarkeit der FS nach Einmal-Dosis.....	114
3.2.3.1.2	Beeinflussung des Fettsäure-Musters durch 3-monatige Supplementierung mit ω -3-FS-reichem bzw. -armen Öl.....	116
3.2.3.2	Bestimmung von Sensitivität, Barrierefunktion und Physiologie der Haut vor und nach Supplementierung mit ω -3-FS-reichem und ω -3-FS-armen Öl.....	121
3.2.4	INTERVENTIONSSTUDIE III – EINFLUß VON FLAVONOIDEN AUF DEN PERIPHÄREN ARTERIELLEN TONUS ALS ANTWORT AUF REAKTIVE HYPERÄMIE (RH).....	125
3.2.4.1	Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen.....	125
3.2.4.1.1	Flavanole.....	126
3.2.4.1.2	Flavanone.....	128
3.2.4.1.3	Oligomere Procyanidine aus Traubenkernextrakt.....	130
3.2.4.1.3	Kontrolle.....	131
3.2.4.2	Bestimmung des periphären arteriellen Tonus als Antwort auf Reaktive Hyperämie.....	132
3.3	ZELLKULTUR.....	136
3.3.1	ZELLVIABILITÄT.....	136
3.3.2	FARBSTOFF-TRANSFER-ASSAY.....	137
3.3.2	WESTERN-BLOT ANALYSE.....	139
3.3.3	IMMUNOCYTOCHEMIE.....	141
3.3	EINFLUSS VON EPICATECHIN AUF DIE STABILITÄT VON S-NITROSOGLUTATHION.....	145
4	DISKUSSION.....	147
4.1	INTERVENTIONSSTUDIEN: EFFEKTE AUF DAS ENDOTHEL UND DIE HAUT.....	147
4.1.1	EINFLUß EINER EINMALDOSIS KAKAOPOLYPHENOLE AUF DIE KUTANE MIKROZIRKULATION.....	147
4.1.2	12-WOCHEN-SUPPLEMENTIERUNG MIT KAKAO-POLYPHENOLEN.....	149

Inhaltsverzeichnis

4.1.3	EINFLUß VON LINOL- UND α -LINOLENSÄURE AUF PHYSIOLOGIE, MORPHOLOGIE UND SENSITIVITÄT DER HAUT.....	154
4.1.4	EINFLUß DER TESTSUBSTANZEN AUF DEN PERIPHÄREN ARTERIELLEN TONUS	157
4.2	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON POLYPHENOLEN	160
4.2.1	EINFLUß VON EPICATECHIN AUF DIE STABILITÄT VON S-NITROSOGLUTATHION.....	160
4.2.2	INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION ÜBER GAP JUNCTIONS.....	161
4.2	ANALYTIK UND BIOVERFÜGBARKEIT DER POLYPHENOLE	163
4.2.1	BIOVERFÜGBARKEIT DER FLAVANOLE	164
4.2.2	FLAVANOL-KONZENTRATIONEN NACH SUPPLEMENTIERUNG ÜBER 12 WOCHEN.....	165
4.2.3	BIOVERFÜGBARKEIT OLIGOMERER PROCYANIDINE	166
4.2.4	BIOVERFÜGBARKEIT DER FLAVANONE.....	167
4.2.5	ERYTHROZYTEN	169
	ZUSAMMENFASSUNG:	170
	SUMMARY.....	172
	LEBENS LAUF	174
	LITERATUR.....	175
	DANKSAGUNG	195

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALA	α -Linolensäure
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AU	<i>arbitrary units</i> ; relative Masseinheit
BD	Blutdruck
BF	Blutfluss
BHT	butyliertes Hydroxytoluol
BV	Blutfluss-Geschwindigkeit
CBG	cytosolische β -Glykosidase
CHCl ₃	Chloroform
COMT	Catecholamin- <i>O</i> -Methyltransferase
Cx	Connexin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DGLA	Dihomo- γ -Linolensäure
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPA	Docosapentaensäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECD	elektrochemischer Detektor
EPA	Eicosapentaensäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
FAME	Fettsäure-Methylester
FCS	fötale Kälberserum
FL	Fluoreszenz
GAP-DH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion
GE	Genistein
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt

Abkürzungsverzeichnis

GJ	Gap Junctions
GJIC	Gap Junctional Intercellular Communication
GLA	γ -Linolensäure
GSH	Glutathion (reduziert)
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HCl	Salzsäure
HGLA	Homo- γ -Linolensäure
HP	<i>high polyphenol</i> ; hoher Polyphenol-Gehalt
HT	Hesperetin
KHK	koronare Herzerkrankung
LA	Linolsäure
LP	<i>low polyphenol</i> ; geringer Polyphenol-Gehalt
LPH	Laktat-Phlorizin-Hydrolase
3-MEC	3'-O-Methyl-Epicatechin
MED	minimale Erythem-bildende Dosis
MeOH	Methanol
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
N.N.	nicht nachweisbar
NO	Stickstoffmonooxid
NOS	NO-Synthase
OPC	Oligomere Proanthocyanidine
PAT	peripherer arterieller Tonus
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoff-Spezies
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> ; reaktive Stickstoff-Spezies
RH	reaktive Hyperämie
rHb	relative Hämoglobinsättigung
RBC	<i>red blood cells</i> ; Erythrozyten
RPG	Rotiphorese Gel 401
RP-HPLC	<i>reversed-phase liquid chromatography</i> ; Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SELS	<i>surface evaluation of living skin</i> ; Oberflächenevaluierung lebender Haut
S-O ₂	Sauerstoffsättigung
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TEMED	N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TEWL	<i>transepidermal water loss</i> ; transepidermaler Wasserverlust
TKE	Traubenkernextrakt
Tris	Trihydroxymethylammoniummethan

Tabellen

- Tab. 1.1:** Auflistung der gängigen, physiologisch relevanten FS mit Summen-Kurzform, verwendeter Abkürzung, Trivialnamen und IUPAC-Bezeichnung
- Tab. 2.1:** Verwendete Antikörper; die jeweiligen Volumen-% geben die Verdünnung in 1 % Magermilchpulver an
- Tab. 2.2:** Molekulargewicht, Lösungsmittel und Konzentrationen der Stammlösungen der in den Studien verwendeten Substanzen
- Tab. 2.3:** Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Versuches zur GSNO-Stabilität
- Tab. 3.1:** Zusammensetzung einer Dosisinheit HP- bzw. LP-Kakaopulver
- Tab. 3.2:** Zusammensetzung der Öl-Weichgelatine-Kapseln
- Tab. 3.3:** Flavanol- und Procyanidin-Gehalt einer Traubenkern-Extrakt-Kapsel
- Tab. 3.4:** Epicatechin-Konzentrationen in Plasma nach einer Dosis HP- bzw. LP-Pulver
- Tab. 3.5:** Mikrozirkulationsparameter nach Einnahme einer Dosis HP-Pulver (\pm SD; n=10)
- Tab. 3.6:** Mikrozirkulationsparameter nach Einnahme einer Dosis LP-Pulver (\pm SD; n=10)
- Tab. 3.7:** Plasma-Gehalte von Epicatechin und dessen *O*-Methyl-Metabolite während 3-monatiger Supplementierung mit HP- bzw. LP-Pulver
- Tab. 3.8:** Gehalte von Epicatechin und dessen *O*-Methyl-Metabolite in Erythrozyten nach 3-monatiger Supplementierung mit HP- bzw. LP-Pulver
- Tab. 3.9:** Fettsäure-Zusammensetzung in Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen
- Tab. 3.10:** Fettsäure-Zusammensetzung in Erythrozyten vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen
- Tab. 3.11:** Parameter der Mikrozirkulation, nach täglicher Einnahme einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver (\pm SD)
- Tab. 3.12:** Photoprotektion nach täglicher Einnahme einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver (\pm SD)
- Tab. 3.13:** Hautphysiologie nach täglichem Konsum von einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver (\pm SD)

- Tab. 3.14:** Anteile von α -Linolen (ALA) - und Linolsäure (LA) an gesamt- ω -6- und ω -3-FS, sowie das ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis nach Einnahme von Produkt A bzw. B (\pm SEM; n=3)
- Tab. 3.15:** FS-Zusammensetzung im Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit ω -3-FS-reichen (Produkt A) bzw. ω -3-FS-armen (Produkt B) Kapseln (\pm SEM; n=13)
- Tab. 3.16:** FS-Zusammensetzung in Erythrozyten vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit ω -3-FS-reichen (Produkt A) bzw. ω -3-FS-armen (Produkt B) Kapseln (\pm SEM; n=13)
- Tab. 3.17:** Sensitivität, Physiologie und Barrierefunktion der Haut nach täglichem Konsum von 4 Kapseln A (ω -3-reich) (\pm PCM; n=13)
- Tab. 3.18:** Sensitivität, Physiologie und Barrierefunktion der Haut nach täglichem Konsum von 4 Kapseln B (ω -3-arm) (\pm PCM; n=13)
- Tab. 3.19:** Auflistung der aufgenommenen Menge an Polyphenolen (Einfachdosierung)
- Tab. 3.20:** Flavanol-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 36 g HP-Kakaopulver (entsprechend 117 mg Flavanol-Monomere); 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl-Epicatechin
- Tab. 3.21:** Flavanon-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 151,9 mg Flavanonen
- Tab. 3.22:** Flavanol-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 1,62 g TKE; 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl-Epicatechin
- Tab. 3.23:** Flavanol-, Flavanon- und Metabolit-Konzentrationen in Plasma bzw. RBC an den Kontrolltagen (keine Supplementierung); 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl-Epicatechin
- Tab. 3.24:** Δ PAT-Indices nach Supplementierung mit HP-Kakao, Flavanon-Tabletten oder OPC-Kapseln
- Tab. 3.25:** Zahl kommunizierender Zellen (\pm SD) nach Behandlung mit den Testsubstanzen für 3, 12 und 24 h
- Tab. 3.26:** Abweichung der Zahl kommunizierender Zellen (\pm SD) von der Kontrolle nach Behandlung mit den Testsubstanzen für 3, 12 und 24 h
- Tab. 3.27:** Stabilität von GSNO in Anwesenheit von Epicatechin, $\text{Fe}^{2+/3+}$, DFOA und/oder Ascorbat; Angaben in % der Konzentration zu Inkubationsbeginn

Abbildungen

- Abb. 1.1:** Übersicht der wichtigsten vasomotorischen Funktionen des Endothels
- Abb. 1.2:** Schematische Darstellung des Gefäßverlaufes in der Mikrozirkulation
- Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der einzelnen Hautschichten
- Abb. 1.4:** Transport von in Melanozyten gebildeten Melanosomen in Keratinozyten
- Abb. 1.5:** Strukturformel von α -Linolensäure
- Abb. 1.6:** Metabolismus essentieller Fettsäuren
- Abb. 1.7:** Eicosanoid-Synthese aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA)
- Abb. 1.8:** Strukturmerkmale der Flavonoide
- Abb. 1.9:** Absorption und Metabolismus der Flavonoide
- Abb. 1.11:** Metabolisierung des Epicatechins: Epicatechin liegt im Organismus als 5- oder 7-*O*- β -D-Glucuronid, 5- oder 7-*O*-Sulfat, 3'- oder 4'-*O*-Methyl-Derivat vor.
- Abb. 1.11:** (A-B) Schematische Darstellung der Gap Junctions; jeweils 6 Untereinheiten bilden einen Halbkanal (Connexon); (C) Membrantopologie der Connexine
- Abb. 2.1:** Strukturen der Testsubstanzen der Interventions- und *in-vitro*-Studien
- Abb. 2.2:** Struktur von Lucifer Yellow
- Abb. 2.3:** Farbstoff-Transfer-Assay: Mikroskopisches Bild der Injektion von Lucifer Yellow in eine Zelle
- Abb. 2.4:** Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blotting-Aufbaus
- Abb. 2.5:** Reaktionsgleichung der Synthese von *S*-Nitrosoglutathion (GSNO) aus Glutathion und Natriumnitrit
- Abb. 3.1:** HPLC-Chromatogramm einer Standardlösung; (A): (I) $U=+550$ mV bzw. (II) $U=+210$ mV; (B): $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$
- Abb. 3.2:** HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Plasma-Aliquotes (A): Plasma nach Zugabe eines Standard-Gemisches; $U=+550$ mV; $T = 35^{\circ}\text{C}$; (B): Plasmakontrolle
- Abb. 3.3:** HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Plasma-Aliquotes (A): Plasma nach Zugabe eines Standardgemisches; $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$; (B): Plasmakontrolle

- Abb. 3.4:** HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines RBC-Aliquotes (**A**): RBC-Suspension nach Zugabe eines Standardgemisches; $U=+550$ mV; $T = 35^{\circ}\text{C}$; (**B**): RBC-Suspension (Kontrolle)
- Abb. 3.5:** HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines RBC-Aliquotes (**A**): RBC-Suspension nach Zugabe eines Standardgemisches; $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$; (**B**): RBC-Suspension (Kontrolle)
- Abb. 3.6:** HPLC-Chromatogramm eines HP-Extraktes; $U=+550$ mV, $T=35^{\circ}\text{C}$
- Abb. 3.7:** HPLC-Chromatogramm eines Dimer-Gemisches; $U=+550$ mV, $T=35^{\circ}\text{C}$;
- Abb. 3.8:** GC-Chromatogramm eines Fettsäuremethylester (FAME) –Standardgemische
- Abb. 3.9:** GC-Chromatogramme nach Transmethylierung von Öl aus (**A**): ALA-reichen Kapseln (Produkt A) und (**B**): ALA-armen Kapseln (Produkt B)
- Abb 3.10:** HPLC-Chromatogramme eines Flavanon-Tabletten-Extraktes nach Inkubation mit Hesperidinase/Naringinase (**I**) und einer Standardlösung (**II**); $\lambda=280$ nm
- Abb.3.11:** Verlauf des gesamt-Epicatechin-Gehaltes in Plasma nach Einnahme von einer Dosis HP-Pulver bzw. LP-Pulver
- Abb. 3.12:** (**I**) Änderung des periphären Blutflusses (BF) nach Supplementierung mit HP-Pulver und LP-Pulver in 1 mm Hauttiefe; (**II**) siehe Abb. 3.11: Epicatechin-Konzentration in Plasma nach Einnahme von HP-Pulver und LP-Pulver
- Abb. 3.13:** (**I**) Änderung der Sauerstoffsättigung ($S\text{-O}_2$) nach Supplementierung mit HP-Pulver und LP-Pulver in 1 mm Hauttiefe; (**II**) im Vergleich Abb. 3.11: Epicatechin-Konzentration in Plasma nach Einnahme von HP-Pulver und LP-Pulver
- Abb. 3.14:** $\omega\text{-6}/\omega\text{-3}$ -FS-Verhältnis in Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen aus HP-Pulver und LP-Pulver
- Abb. 3.15:** Änderung des Blutflusses (BF) nach täglichem Konsum von HP-Pulver und LP-Pulver in (**I**) 1 mm und (**II**) 6-8 mm Hauttiefe
- Abb. 3.16:** Änderung der Sauerstoffsättigung ($S\text{-O}_2$) nach täglichem Konsum von HP-Pulver und LP-Pulver in (**I**) 1 mm und (**II**) 6-8 mm Hauttiefe
- Abb. 3.17:** Änderung der Hautröte (Δa -Werte) im UV-induzierten Erythem nach täglichem Konsum von HP-Pulver und LP-Pulver
- Abb. 3.18:** Beispiel eines mit dem SELS-Verfahren ermittelten Oberflächenprofils der Haut, sowie das reale Bild (**I**) vor und (**II**) nach 12-wöchiger Einnahme von HP-Pulver
- Abb. 3.19:** Beispiel einer Aufnahme zur Dichtebestimmung mittels des Ultraschall B-scan-Verfahrens (**I**) vor und (**II**) nach 12-wöchiger Einnahme von HP-Pulver

- Abb. 3.20:** Änderung des FS-Anteils von α -Linolensäure und Linolsäure nach Supplementierung mit 3 Kapseln (I) des Produktes A bzw. (II) des Produktes B
- Abb. 3.21:** Änderung des ω -6/ ω -3-FS-Verhältnisses nach Supplementierung mit ω -6/ ω -3FS-haltigen Kapseln: Produkt A, ω -3-reich; Produkt B, ω -3-arm
- Abb. 3.22:** Anteil von (I) Linolsäure und (II) Linolensäure an den gesamt- ω -6/ ω -3-FS nach Supplementierung mit ω -6/ ω -3-FS-haltigen Kapseln
- Abb. 3.23:** Einfluß der Supplementierung mit Produkt A und Produkt B auf (I) die Hautrötung und (II) den Blutfluss im Nicotinat-induzierten Erythem
- Abb. 3.24:** Verläufe der Konzentrationen von gesamt-Epicatechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin und 4'-O-Methyl-Epicatechin in (I) Plasma und (II) Erythrozyten nach Einnahme von 36 g HP-Kakaopulver (entsprechend 117 mg Flavanol-Monomere)
- Abb. 3.25:** Konzentrationsverläufe von Hesperetin und Naringenin in Plasma nach Einnahme von 5 Flavanon-Tabletten; exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Plasmaprobe zum Zeitpunkt t = 4 h; Detektion: UV = 280 nm
- Abb. 3.26:** Konzentrationen Epicatechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin und 4'-O-Methyl-Epicatechin in Plasma nach Einnahme von 1,6 g oligomerer Procyanidine
- Abb. 3.27:** Darstellung der Bestimmung des Endo-PAT-Index vor (A) und nach (B) Supplementierung mit Kakaoflavanolen; Strecke I: PWA im Grundzustand; Strecke II: PWA während der Okklusion; Strecke III: PWA während reaktiver Hyperämie; die erhöhte Amplitude stellt einen Indikator für erhöhte endotheliale Aktivität dar
- Abb. 3.28:** (I) PAT-Index nach Einnahme von zwei Dosen (36 g) HP-Kakaopulver im Vergleich zur Kontrolle; (II) im Vergleich **Tab. 3.22:** Flavanol-Konzentration in Plasma Epicatechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin und 4'-O-Methyl-Epicatechin; n = 4
- Abb. 3.29:** PAT-Index nach Einnahme von 5 Tabletten (2,43 g) Flavanon-Konzentrat im Vergleich zur Kontrolle; n = 4
- Abb. 3.30:** PAT-Index nach Einnahme von 5 Kapseln (1,62 g) TKE im Vergleich zur Kontrolle; n = 4
- Abb. 3.31:** Ermittlung der Zellviabilität nach 3-, 12- und 24-stündiger Inkubation mittels MTT-Test; als Kontrolle wurde Medium mit 0,1% DMSO eingesetzt
- Abb. 3.32:** Änderung der ZZK (% Kontrolle) nach 3-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin und Genistein; Kontrolle: DMSO
- Abb. 3.33 :** Nachweis des Gap junction-Proteins Connexin43 aus MAEC-Zellextrakt nach 3 stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin und Genistein für 3 h; Kontrolle: DMSO

- Abb. 3.34:** Immunocytochemische Färbung von Connexin43 und Zellkernen in MAEC nach 3-stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin, Genistein und 0,1 % DMSO (Kontrolle)
- Abb. 3.36:** Immunocytochemische Färbung von Connexin43 und Zellkernen in MAEC nach 12-stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin, Genistein und 0,1 % DMSO (Kontrolle);
- Abb. 3.37:** Immunocytochemische Färbung von Connexin43 und Zellkernen in MAEC nach 24-stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin, Genistein und 0,1 % DMSO (Kontrolle);
- Abb. 3.38:** HPLC- Chromatogramm von oxidiertem Glutathion (GSH), reduziertem Glutathion (GSSG) und GSNO
- Abb. 3.39:** Stabilität von GSNO in Puffer in Anwesenheit von Epicatechin, $\text{Fe}^{2+/3+}$, Deferoxamin und/oder Ascorbat

1 Einleitung

1.1 Nutraceuticals

Der Begriff *Nutraceutical* stammt aus dem englischen „*nutritional pharmaceutical*“ und ist definiert als eine Substanz oder eine Kombination von Substanzen, die aus Nahrungsmitteln stammen und deren Verzehr gesundheitliche Vorteile mit sich bringt [1]. Abhängig von der Darreichungsform unterscheidet man zwischen den isolierten, in definierten Dosen erhältlichen Nahrungsergänzungsmitteln (den eigentlichen Nutraceuticals) und den funktionellen Nahrungsmitteln („*functional food*“), die in der Darreichung konventioneller Nahrung entsprechen [2]. Es handelt sich also um natürliche Nahrungskomponenten, denen ein prophylaktischer oder therapeutischer Nutzen in Hinblick auf verschiedene pathologische Zustände zugesprochen wird.

Die ersten funktionellen Nahrungsmittel wurden Mitte des 20. Jahrhunderts eingeführt; es handelte sich um Brotaufstriche, die mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) angereichert waren [3]. Angesprochen wurden Hypercholesterinämie-Patienten. Auch Formulierungen von essentiellen ω -3 und ω -6-FS, die in Verbindung mit einer Prävention von koronaren Herzerkrankungen (KHK) gebracht werden, genießen nach wie vor hohe Beliebtheit. Die best erforschte Wirkung zeigen hier die aus Hochseefischen gewonnenen langkettigen mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren (LCPUFA) Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) (siehe **Kapitel 1.2.3**). Der Zusammenhang zwischen erhöhter Einnahme von LCPUFA und vermindertem Risiko von KHK ergab sich aus zufälligen Beobachtungen traditioneller Ernährungsmuster einzelner Bevölkerungsgruppen, in diesem Fall der Eskimos. Ähnliche Effekte konnten durch die in Leinsamen vorkommende α -Linolensäure erzielt werden. So führt die Einnahme von 1-2 g Leinsamenöl pro Tag zu einem ähnlich verringerten KHK-Risiko [4]. Neben den Lipidmetabolismus beeinflussenden Substanzen ist eine Vielzahl weiterer Präparate aus anderen Indikationsgruppen auf dem Markt anzutreffen: Immunmodulatoren, Nukleotide, Aminosäuren wie Glutamin, L-Arginin und Ornithin- α -ketoglutarat, Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Glutathion und Carotinoide, Vitamine und Mineralstoffe.

Die hohe und rasch zunehmende Anzahl von Präparaten unterstreicht die Notwendigkeit, einen pharmakologischen Wirksamkeitsnachweis zu führen. Ein erfolgreicher

Wirksamkeitsnachweis kann bedeuten, dass das Präparat pharmazeutischem Recht und damit einer Reihe von Zulassungsverfahren unterliegt. Die komplexe rechtliche Lage, sowie das Fehlen geeigneter Nachweismethoden für die im Vergleich zu Arzneistoffen geringen Effekte, führen zur Einführung zahlreicher Präparate mit fraglicher Wirksamkeit.

Die Anwendung von Nahrungskomponenten in der Medizin setzt die Kenntnis verschiedener, aus der AM-Zulassung bekannter Parameter voraus. Um eine reproduzierbare Wirkung zu erzielen, ist es notwendig, die entsprechenden Extrakte oder Substanzgemische hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu charakterisieren und zu standardisieren.

Eine Modifikation des Lebensmittels, wie beispielsweise die Änderung der biologischen Matrix durch Verarbeitung oder die Isolierung der wirksamen Komponente zur Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln, kann mitunter problematisch sein. So erwies sich der Extrakt von Kava-Kava (*Piper methysticum*) als hepatotoxisch, was zu einem Entzug der Zulassung führte [5]. Im Falle des L-Tryptophans kam es aufgrund unzureichender Kontrollen zur Herstellung einer Charge mit einem hohen Anteil an Verunreinigungen, die zu vermehrten Fällen von eosinophilem Myalgie-Syndrom führten [6].

Auch bei erwünschter Wirkung muss bei der Anwendung von Nutraceuticals beachtet werden, dass es sich zwar aufgrund der geringen pharmakologischen Wirkung(en) nicht um ein Arzneimittel im Sinne des § 2 AMG handelt, dem Körper jedoch konstant eine physiologisch aktive Substanz zugeführt wird. Dabei kann es zu einer nicht vorhersehbaren Akkumulation und zu Wechselwirkungen mit anderen Substanzen und Arzneistoffen kommen. Dieses Phänomen wird bei Medikamenten berücksichtigt, bei Nahrungsmitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln aber oft unterschätzt. Ein Beispiel stellen Produkte aus der Grapefruit, *Citrus paradisi*, dar, die Cytochrom-P450-inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Dies kann eine verlängerte Halbwertszeit von Arzneistoffen zur Folge haben, wie es für das Antimykotikum Ketokonazol und Cyclosporin beschrieben wird.

Die Bezeichnung **Cosmeceuticals** steht für kosmetische Pflegeprodukte, die Substanzen mit pharmakologischen Effekten enthalten. Sie stellen eine Verbindung zwischen Medizin, Ernährung und Kosmetik her, unterliegen jedoch aufgrund der Wirkstoffbeschaffenheit nicht dem AMG. Oft werden in diesen Produkten sekundäre Pflanzenstoffe als aktive Inhaltsstoffe verwendet.

1.2 Physiologie des Blutkreislaufes und der Haut

1.2.1 Regulation der Sauerstoff-Homöostase

Die Gewährleistung der Sauerstoff-Homöostase ist essentiell für das Überleben aller Wirbeltierorganismen. Die Regulation der Blutzirkulation wird von systemischen Faktoren (vegetatives Nervensystem) und lokalen Faktoren bestimmt, zu denen der myogene Tonus, Druck, Temperatur, vasodilatatorische Metabolite, Enzyme und Gewebshormone sowie endotheliale Substanzen zählen.

1.2.1.1 Endothel-abhängige Vasorelaxation

Eine wichtige, schnelle physiologische Reaktion auf hämodynamische Kraftübertragung ist die akute Regulation des arteriellen Durchmessers. Das Endothel der Gefäße stellt die Verbindung zwischen der Gefäßmuskulatur und dem Strombett dar und reguliert die Konzentration der im Blut zirkulierenden Substanzen. Es besteht aus einer einlagigen Zellschicht, die alle Gefäße im menschlichen Körper auskleidet. Furchgott und Zawadzki [7] beschrieben erstmals, dass die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation von einem intakten Endothel abhängt. Wenn der Blutfluss steigt, kommt es zu einer endothel-abhängigen, sympathikus-unabhängigen Relaxation der Zellen der glatten Muskulatur, die das Endothel ringförmig umschließt. Der intraarterielle Druck spielt bei der endothel-kontrollierten Vasoaktivität nur eine untergeordnete Rolle: die kontraktile Antwort der glatten Gefäßmuskulatur auf steigenden Druck (myogene Antwort) ist muskelabhängig, jedoch größtenteils endothel-unabhängig.

Die größte hämodynamische Kraft der endothelialen Vasoregulation stellt die Schubspannung (*shear-stress*) dar: sie reguliert die Freisetzung der endothelialen Relaxationsfaktoren (EDRF; *endothelial-derived relaxing factors*) Prostacyclin, Endothelin-1 und vor allem NO. NO-Freisetzung ist also sowohl Blutfluss-, als auch Endothel-abhängig [8]. Im Ruhezustand wird durch konstante Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur (myogener Tonus) und Impulse des sympathischen Systems (neuronaler Tonus) ein Basaltonus erzeugt; demgegenüber steht eine kontinuierliche Bildung von NO. NO ist ein kurzlebige Molekül, das durch die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin durch die membranständige, endotheliale NO-Synthase (eNOS)

entsteht. Als zentraler endothelialer Mediator in der vaskulären Physiologie weist NO vasodilatatorische, antiinflammatorische und antiarteriosklerotische Wirkungen auf. NO ist ein Gas, das frei durch Membranen diffundieren kann und so das Zielgewebe erreicht [9]. Es aktiviert die Guanylatcyclase, wodurch es zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) kommt. Dies führt zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und einer damit verbundenen Vasodilatation. In **Abb. 1.1** sind die wichtigsten vasomotorischen Reaktionen graphisch dargestellt. Auch in Thrombozyten kommt es durch NO zu einer erhöhten cGMP Bildung, wodurch die Thrombozytenaggregation gehemmt wird.

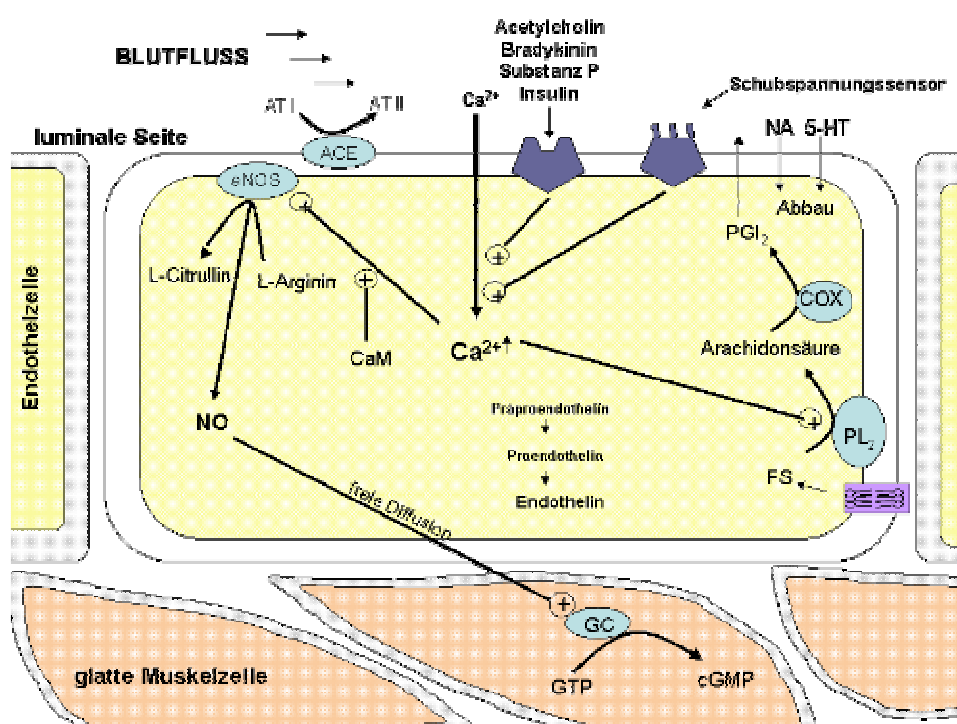


Abb. 1.1: Übersicht der wichtigsten vasomotorischen Funktionen des Endothels; CaM: Calmodulin; eNOS: endotheliale NO-Synthase; ACE: Angiotensin Conversions-Enzym; AT: Angiotensin; NA: Noradrenalin; 5-HT: Serotonin; PGI₂: Prostacyclin; FS: Fettsäure; PLA₂: Phospholipase A₂; GC: Guanylatcyclase; GTP: Guanosintriphosphat; cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat

Die Reaktion von NO mit Thiol-Gruppen von Proteinen oder Thiolen geringen Molekulargewichtes führt zur Bildung von S-Nitroso-Verbindungen (RSNO). RSNO stabilisieren NO im Organismus und können dessen physiologische Effekte modulieren [10].

Sie spielen eine Rolle in der Blutdruckregulation, der Thrombozyten- und Bronchoaktivität. S-Nitrosoglutathion (GSNO) gehört zu den wichtigsten S-Nitrosoverbindungen und hat einen entscheidenden Einfluß auf die physiologische Aktivität von NO [11,12].

Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) ist ein potenter Thrombozytenaggregationshemmer, dessen Synthese und Ausschüttung durch Schubspannung ausgelöst werden kann; das vasodilatatorische Potential ist geringer, als das von NO. Endothelin ist ein potenter, langlebiger Vasokonstriktor, dessen Aktivität bei erhöhter Schubspannung herabreguliert wird [13].

1.2.1.2 Mikrozirkulation

Die kleinsten Gefäße im menschlichen Körper sind die Kapillaren. Es sind kreiszylinderähnliche Strukturen, deren Innendurchmesser in der Größenordnung der roten Blutzellen von 5-8 µm liegt. Durchschnittlich hat jede Kapillare eine Länge von 0,1-1 mm; dennoch ist der Widerstand wegen ihres kleinen Durchmessers groß. Die Kapillaren zweigen von den Arteriolen ab und entleeren sich in die Venolen. Oft bilden sie ein dreidimensionales Netzwerk, das aus mehreren kleinen Arterien mit Querverbindungen gespeist wird (Kollateralen). Hier können von so genannten Metarteriolen gespeiste Hauptstrombahnen liegen. Am Übergang von der Arteriole zur Kapillare befindet sich ein Ring glatter Muskelzellen, der präkapillare Sphinkter. Es wird angenommen, dass er den Blutfluss in den nachfolgenden Kapillaren durch Öffnen und Schließen des Kapillartores reguliert. Da die Kapillaren keine muskulären Wandelemente besitzen, ist ihre Weite von der jeweils wirksamen Differenz des kapillaren Blutdrucks (Schubspannung) und des äußeren Gewebedrucks abhängig (transmuraler Druck). Direkte Verbindungen zwischen kleinen Arterien und kleinen Venen bezeichnet man als arteriovenöse Anamostosen, die insbesondere in der Haut der Akren zu finden sind und der Thermoregulation dienen. Die Aufgabe der Mikrogefäße ist die Organdurchblutung als Ganzes und die Blutverteilung innerhalb eines Organs entsprechend dem jeweiligen Bedarf.

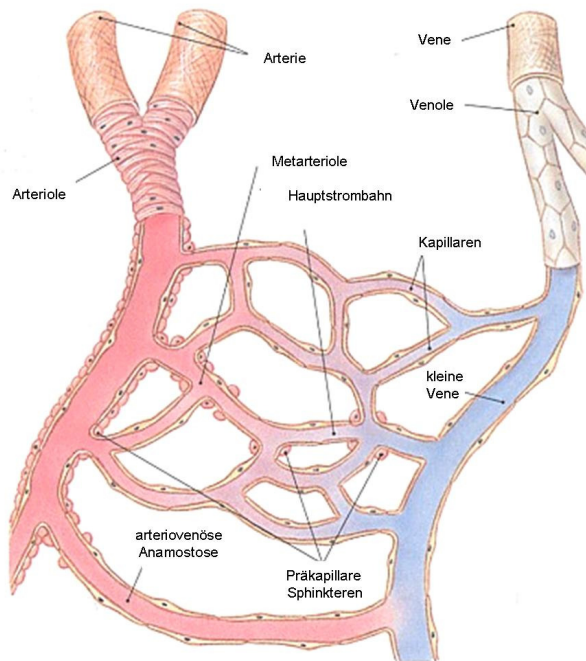


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Gefäßverlaufes in der Mikrozirkulation

Den Blutfluss in der Mikrozirkulation prägt ein koordiniertes Zusammenspiel der arteriellen, kapillaren und venösen Segmente, abhängig vom lokalen Sauerstoffbedarf. In den Skelettmuskeln kann zwischen maximaler Hyperämie während körperlicher Betätigung und sympathikus-reguliertem Ruhezustand ein bis um den Faktor 100 differierender Blutfluss auftreten. Erhöhter Metabolismus führt aufgrund eines höheren

Sauerstoffbedarfs zu funktioneller Vasodilatation. Dadurch wird die kapillare Oberfläche erhöht und so eine gesteigerte Sauerstoffaufnahme des umliegenden Gewebes ermöglicht. Entlang der versorgenden Arterien bis hin zu den Arteriolen liegen Nerven des sympathischen Systems. Die hyperämische Antwort wird neben einem erhöhten Sauerstoffbedarf durch den vasomotorischen Druck moduliert. Dieser wird durch Interaktion hämodynamischer Kräfte bestimmt, die auf die glatte Muskulatur (transmuraler Druck) und Endothelzellen (luminale Schubspannung) wirken und durch ionische Mechanismen zur Vasodilatation und somit zu einem schnellen Anstieg der Gewebepfusion führen [14].

1.1.2.3 Endotheliale Dysfunktion

Vaskuläre endotheliale Dysfunktion (peripher und koronar) ist eine systemische Fehlfunktion, die ein frühes Stadium der Arteriosklerose darstellt und mit Hypertonie, Herzversagen und KHK sowie Diabetes Mellitus in Verbindung gebracht wird. Sie kann als unabhängiger Indikator für kardiovaskuläre Vorfälle gesehen werden [15-18]. Charakteristisch für eine endotheliale Dysfunktion ist die Dysregulation des NO-Metabolismus und anderen vasoaktiven Molekülen und daraus resultierender verminderter endothel-abhängiger Gefäßrelaxation.

Eine verminderte vaskuläre Reaktivität auf physiologische und pharmakologische Stimuli resultiert aus einer abnormalen Regulation des Gefäßtonus und dem Verlust verschiedener vasoprotektiver Effekte des gesunden Endothels [19]. So wird eine verminderte endothel-abhängige Vasomotion einer ungenügenden NO-Synthese bzw. -Freisetzung zugeschrieben [20].

Nach dem derzeitigen Standard-Verfahren wird die koronare endotheliale Funktion durch die Blutflusszunahme nach intrakoronarer Infusion einer definierten Dosis des Parasympathomimetikums Acetylcholin (ACh) ermittelt (soll > 50 %) [21]. Abnormale Vasokonstriktion der koronaren oder systemischen Arterien nach ACh-Gabe und eine Verminderung der Blutfluss-induzierten Dilatation (*flow mediated dilation*, FMD) ist vor allem für Personen mit Risikofaktoren für KHK wie Raucher und Patienten mit arterieller Hypertonie, Diabetes Mellitus und Hypercholesterinämie dokumentiert [21-24]. Endotheliale Dysfunktion kann neben den Koronararterien auch in peripheren Gefäßen auftreten, was die Möglichkeit nicht-invasiver Untersuchungen erschließt, da über die periphere vaskuläre Endothelfunktion Aussagen über das Vorliegen einer KHK getroffen werden können [19]. Es wurde bereits eine Korrelation zwischen der FMD in der Brachialarterie (BAUS-Verfahren - *brachial artery ultrasound scanning*) während reaktiver Hyperämie (rH) und der Reaktion der Koronararterie auf ACh beschrieben [25].

Die PWA (*pulse wave amplitude*: gefäßpulsationsbedingte Änderung des arteriellen Durchmessers) während reaktiver Hyperämie wird von kardiovaskulären Risikofaktoren und koronaren arteriellen Erkrankungen beeinflusst; so zeigen Patienten mit Arteriosklerose abnormale PWA auf. Die PWA könnte somit als klinischer Marker kardiovaskulärer Vorfälle eingesetzt werden. Die Elastizität ist in den periphären Gefäßen deutlich höher, als in den großen Gefäßen. Mit neuartigen Messverfahren wie Endo-PAT (siehe **Kapitel 2.4.5.2**) kann die PWA in der periphären Zirkulation gemessen werden. Es konnte gezeigt werden, dass PWA-Messungen mit dem Endo-PAT ähnliche Abnormalitätenmuster wie die BAUS-Messungen der FMD aufzeigen können [26]. Endo-PAT-Messungen sind somit geeignet, periphere vaskuläre endotheliale Funktionen zu untersuchen.

1.1.2.4 Hypoxie

Die Anwesenheit von Sauerstoff ist essentiell für die Zellatmung und damit für das Überleben der Zelle. Als Hypoxie wird ein herabgesetzter Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes oder der Sauerstoffmangel in Geweben und Organen bezeichnet. Ursachen können verengte Gefäße, koronare oder pulmonale Erkrankungen und Anämie sein. Die Folgen sind Bewusstseinsstörungen, Dyspnoe, Muskelschwäche und graue oder zyanotische Haut, sowie Mydriasis als Folge sympathischer Aktivität. Durch hypoxische Zustände kommt es zu einer ungenügenden ATP-Synthese in den Mitochondrien. Verringerte ATPase-Aktivität und Membrandepolarisation sind die Folge, wodurch es zu unkontrolliertem Ca^{2+} -Influx durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Phospholipasen und Proteasen kommt. Dies führt zu einem Anschwellen der Zelle und der Lyse von Zellkomponenten. Bei andauernder Sauerstoffunterversorgung kommt es zum Absterben von Zellen. [27,28]. Spezielle chemosensorische Systeme die im arteriellen Kreislauf und den Atemwegen anzutreffen sind und Herz- und Lungenrate regulieren, sowie die direkte Antwort der vaskulären glatten Muskulatur sorgen für die eine optimale Sauerstoffversorgung [14].

1.1.2.5 Arteriosklerose und LDL-Oxidation

Arteriosklerotische Gefäßveränderungen sind die Folge zahlreicher komplexer Vorgänge. Begünstigt durch Risikofaktoren (Hyperlipoproteinämie, Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus) führt mechanische Einwirkung zunächst zu Läsionen des Endothels. An der dadurch freigelegten subendothelialen Basalmembran kommt es zu Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Die Thrombozyten setzen Thromboxan A_2 sowie Wachstumsfaktoren frei. Die Wachstumsfaktoren bewirken eine erhöhte Proliferation glatter Muskelzellen und deren Migration in den subendothelialen Raum, wodurch es weiterhin zu einer verstärkten Neubildung bindegewebeartiger Substanz mit einem veränderten Kollagen- und Proteoglykan-Verteilungsmuster (Fibrosen) kommt. Weiterhin sezernieren die Thrombozyten und die geschädigten Endothelzellen chemotaktische Substanzen, die die Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten bewirken. Lipide, besonders LDL (*low density lipoprotein*), welches die Haupttransportform von Cholesterol darstellt, können die geschädigte Endothelzellschicht der Arterien passieren. Im subendotheliellen Raum wird das LDL an extrazelluläre Matrixproteine gebunden, wobei Komponenten des LDL durch biochemische

Prozesse oxidiert werden können [29]. Oxidativ modifiziertes LDL bindet an den Scavenger-Rezeptor von Makrophagen. Dadurch kommt es zu einer Aufnahme von LDL in Makrophagen; mit Cholesterin überladene Makrophagen verwandeln sich in Schaumzellen. Die Schaumzellbildung führt zu einer progressiven Okklusion der Arterien, bis hin zu einem so genannten arteriosklerotischen Plaque. Im weiteren Verlauf kann es zur Bildung von Nekrosen, einer Ablagerung von Calciumsalzen („Verkalkung“) und einem Einreißen der Plaques kommen, wodurch neue Endothelläsionen entstehen. Im ungünstigen Fall wird das Gefäßlumen bis zum völligen Verschluss eingeengt.

Arteriosklerose wird derzeit als primäre Ursache für die Manifestation arterieller Durchblutungsstörungen angesehen; diese stellen in den Industrieländern die häufigste Todesursache dar. Daher besteht ein hohes Interesse an Substanzen, die die oxidative Modifikation von LDL verhindern oder vermindern. Die antioxidativen Eigenschaften von Flavonoiden können hier von Bedeutung sein (siehe **Kapitel 1.2.5**) [30].

1.1.3 Die Haut

1.1.3.1 Aufbau und Funktion

Die Haut ist das größte Organ des Körpers. Bei einer Fläche von bis zu 2 m² und einer mittleren Dicke der oberen beiden Schichten von 2-3 mm wiegt sie 3-5 kg. Rund 2 x 10⁹ Hautzellen schützen den Organismus vor Mikroorganismen und Sonneneinstrahlung, aber auch vor Überhitzung und Dehydrierung. Neben der Schutzfunktion ist sie Sinnesorgan für Temperatur und Tasten. Die Haut ist in Ober-, Leder- und Unterhaut unterteilt, wie in **Abb. 1.3** zu sehen ist.

Die Oberhaut (Epidermis) ist ein Deckepithel, dessen Basalmembran sich 100-500 µm tief in die Lederhaut senkt und die beiden Schichten miteinander verbindet; die Bindegewebszapfen der Lederhaut werden Papillen genannt. Die Epidermis ist unterteilt in Basalzellschicht, Stachelzellschicht, Körnerschicht und Hornschicht. In den Epithelzellen der Basalzellschicht findet ständig Mitose statt, wodurch sich die Epidermis immer wieder neu generiert. In der Basalzellschicht sind Melanozyten und Langerhans-Zellen des Immunsystems anzutreffen. Die Körnerschicht bildet den Hauptteil der Epidermis. Sie besteht aus Keratinozyten, die Keratohyalinkörperchen enthalten. Nachdem die Keratinozyten in die Hornschicht (Stratum corneum) gewandert sind, verbinden sich die Keratohyalinkörperchen mit Tonofilamenten zum Keratin. Im Gegensatz zu den anderen Schichten besteht die Hornschicht aus abgestorbenen, auf weniger als 1 µm abgeplatteten Epithelzellen.

Die Lederhaut (Dermis, Corium) besteht aus länglichen Zellen, den Fibroblasten. Sie ist im stark gefalteten Bereich der Papillen besonders gut durchblutet, da ihre Kapillaren auch die Zellen der nicht durchbluteten Epidermis versorgen müssen. Unter der Papillarschicht breitet sich ein Netzwerk aus kleinen venösen Blutleitern aus. Zur Thermoregulation sowie aus psychischen Ursachen kann das vegetative Nervensystem eine Vasodilatation auslösen (Erröten, Erythem). Wird das körpereigene Abwehrsystem von den Langerhans-Zellen der Epidermis mobilisiert, pumpt der Körper Blut und Lymphe in die betreffende Hautregion. Die Haut rötet sich, schwillt an und bildet Quaddeln und Pusteln. Ebenfalls in der Lederhaut befinden sich die Nervenfasern, die für die Wahrnehmung von Druck, Berührung, Schmerz, Temperatur und Juckreiz zuständig sind. Die Festigkeit der Haut geht von der kollagenfaserreichen Geflechschicht aus. Neben den Kollagenfasern besitzt die Geflechschicht auch schwache elastische Netze, welche die Haut immer wieder in ihre

ursprüngliche Form zurückbringen. Im Alter degenerieren diese elastischen Fasern, ein Prozess, der durch UV-A-Strahlung beschleunigt wird (Photoalterung).

Die Unterhaut (Subcutis) dient in erster Linie der Speicherung von energiereichen Verbindungen, Schutz vor Druckbelastung und Kälte. Hier sind auch Talg- und Schweißdrüsen lokalisiert, die den Schutzfilm für die Oberhaut produzieren. Das Unterhautgewebe besteht vorwiegend aus Fettgewebe mit mehreren Millimetern großen Fettkissen und wird von größeren Nervensträngen und Blutgefäßen durchzogen; besonders an der Grenze zur Lederhaut befindet sich ein gefäßreiches Netzwerk [31].

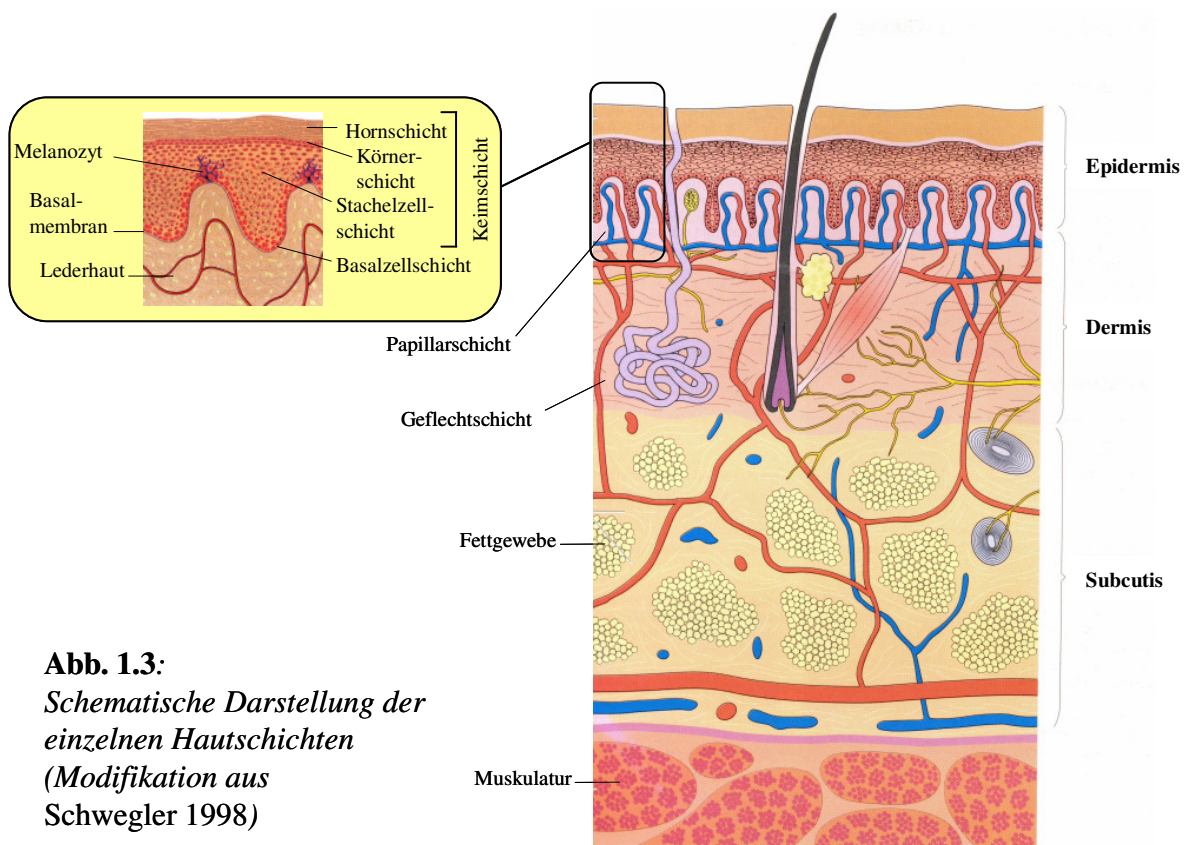
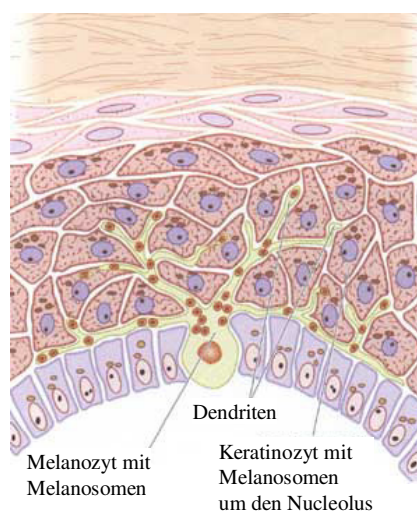


Abb. 1.3:
*Schematische Darstellung der
einzelnen Hautschichten
(Modifikation aus
Schwegler 1998)*

1.1.3.2 Photoprotektion

Ultraviolette Strahlung kann zu irreversiblen Hautschädigungen führen. UV-A-Strahlen (315-380 nm) können bis in die Dermis vordringen. Unter Beteiligung von reaktiven Sauerstoff-Spezies führt UV-Bestrahlung zur Erythembildung und beschleunigten Hautalterung. UV-B-Strahlen (280-315 nm) gelangen nur bis zur Basalschicht und werden in höherer Masse als UVA-Strahlen absorbiert und führen zu direkten DNA-Schädigungen. Das UVB-induzierte Erythem (=Sonnenbrand) stellt eine Entzündungsreaktion dar und ist ein Resultat kumulierter Hautzellschädigungen, das zum Absterben der Zellen führt. In der Epidermis führt UV-B-Strahlung zu einer verstärkten Verhornung (Lichtschwiele), welche ihrerseits UV-Schutz bietet [32].

Endogenen Schutz gegen UV-Belastung bieten Melanine, die in Melanozyten gebildet werden. UV-B-Exposition führt zu einer lang anhaltenden Bräunung durch gesteigerte Melanogenese. Über Zwischenstufen wird Tyrosin durch das Enzym Tyrosinase zu Indochinon oxidiert, polymerisiert und an ein Protein gebunden. Im nächsten Schritt werden Melanin-beladene Melanosomen von den Melanozyten über Dendriten der Zellmembranen in



Keratinocyten transportiert (siehe **Abb. 1.4**). Durch UV-A-Strahlung erfolgt eine Photooxidation von Melaninvorstufen, was zu einer direkten Bräune führt. Während der Bräunung eine exogene Induktion zugrunde liegt, sind Hautfarbe und Hauttyp genetisch determiniert.

Abb. 1.4: Transport von in Melanozyten gebildeten Melanosomen in Keratinozyten (aus: Gray, 1997 [33])

Die Anwesenheit von Melanin und die Verdickung der Hornschicht stellen primäre Sonnenschutzmechanismen dar, die UV-absorptiv und lichtstreuend wirken. Dieses Prinzip wird auch in topischen Sonnenschutzmitteln genutzt. Chronische Sonnenlichtexposition reguliert sekundäre Verteidigungssysteme gegen oxidativen Stress hoch. Zu den enzymatischen Systemen zählen hier die Hämoxxygenase-1 und die Superoxiddismutase. Auch nicht-enzymatische Antioxidantien spielen eine Rolle. Sie können wie Glutathion endogener Herkunft sein, oder dem Körper zugeführt werden, wie am Beispiel der Carotinoide und α -

Tocopherol gezeigt werden konnte [34-36]. Diese Substanzen können die während der Photooxidation gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies abfangen und so die Zellbestandteile vor Schädigungen durch oxidative Reaktionen schützen.

1.1.4 Lipidstoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren

Fettsäuren

Fettsäuren (FS) haben wichtige physiologische Funktionen: sie sind Komponenten von Phospho- und Glykolipiden, verursachen lipophile Modifikationen von Proteinen, stellen Energiespeicher dar und wirken als Hormone und interzelluläre Botenstoffe. Sie werden im Fettgewebe als Triacylglyceride gespeichert. In **Tab. 1.1** sind physiologische und ernährungsrelevante FS aufgelistet. Bei der Nomenklatur wird erst die Anzahl der Kohlenstoffatome, dann die Anzahl der Doppelbindungen angegeben. Der Buchstabe ω bezeichnet die Position der ersten Doppelbindung ausgehend vom Methyl-Ende. Das Carboxyl-Ende wird als Δ -Ende bezeichnet. In **Abb. 1.5** ist die Struktur der FS am Beispiel von Linolensäure dargestellt.

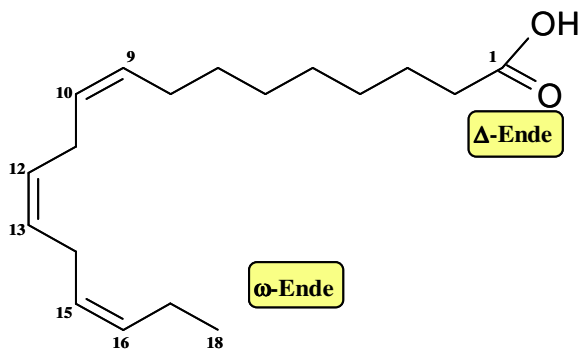


Abb. 1.5: Strukturformel von α -Linolensäure
(*cis*-9,12,15-Octadecatriensäure)

Kapitel 1 - Einleitung

Tab. 1.1 : Auflistung der gängigen, physiologisch relevanten FS mit Summen-Kurzform (Spalte I), im Weiteren verwendeten Abkürzung (Spalte II), Trivialnamen und IUPAC-Bezeichnung

I	II	Trivialname	Kennzeichnung nach IUPAC
14:0		Myristinsäure	Tetradecansäure
16:0		Palmitinsäure	Hexadecansäure
16:1n-7		Palmitoleinsäure	<i>cis</i> -9-Hexadecensäure
17:0		Margarinsäure	Heptadecansäure
18:0		Stearinsäure	Octadecansäure
18:1n-9		Eladinsäure	<i>trans</i> -Octadecansäure
18:1n-9		Ölsäure	<i>cis</i> -9-Octadecansäure
18:2n-6		Linoladinsäure	<i>trans</i> -12-Octadecadiensäure
18:2n-6	LA	Linolsäure	<i>cis</i> -9,12-Octadecadiensäure
18:3n-6	GLA	γ -Linolensäure	<i>cis</i> -6,9,12-Octadecatriensäure
18:3n-3	ALA	α -Linolensäure	<i>cis</i> -9,12,15-Octadecatriensäure
20:0		Arachinsäure	Eicosansäure
20:1n-9		Gondosäure	<i>cis</i> -11-Eicosensäure
20:2n-6		Eicosadiensäure	<i>cis</i> -11,14-Eicosadiensäure
20:3n-6	HGLA	Homo- γ -linolensäure	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatriensäure
20:3n-3	DGLA	Dihomo- γ -linolensäure	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatriensäure
20:4n-6	AA	Arachidonsäure	<i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraensäure
20:5n-3	EPA	Timnodonsäure	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure
22:0		Behensäure	Docosansäure
22:5n-3	DPA	Docosapentaensäure	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-Docosapentaensäure
22:6n-3	DHA	Docosahexaensäure	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure
23:1n-9		Erucasäure	<i>cis</i> -13-Docosensäure
24:0		Lignocerinsäure	Tetracosansäure
24:1n-9		Nervonsäure	<i>cis</i> -15-Tetracosensäure

Biosynthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren (poly-unsaturated fatty acids; PUFA)

Die zelluläre Biosynthese von PUFA findet durch Verlängerung der Kohlenstoffkette und Einfügung von Doppelbindungen statt; diese Prozesse werden von Elongasen und mikrosomalen Monooxygenase-Systemen, den Desaturasen, katalysiert. Letztere bestehen typischerweise aus einer Acyltransferase, einer Hydroxylase und einer Dehydratase.

Im menschlichen Körper können Desaturasen vom Carboxylende aus gesehen nur bis zum C₉ Doppelbindungen einfügen. Demnach kann zwar die ω-9-FS Ölsäure vom Körper synthetisiert werden, die physiologisch relevanten FS Linolsäure (LA) und α-Linolensäure (ALA) jedoch nicht. LA und ALA sind essentielle FS, die die Ausgangssubstanzen langkettiger PUFA darstellen. Nach der Aufnahme werden sie sukzessiv verlängert und desaturiert [37]. Der Metabolismus essentieller FS ist schematisch in **Abb. 1.6** abgebildet.

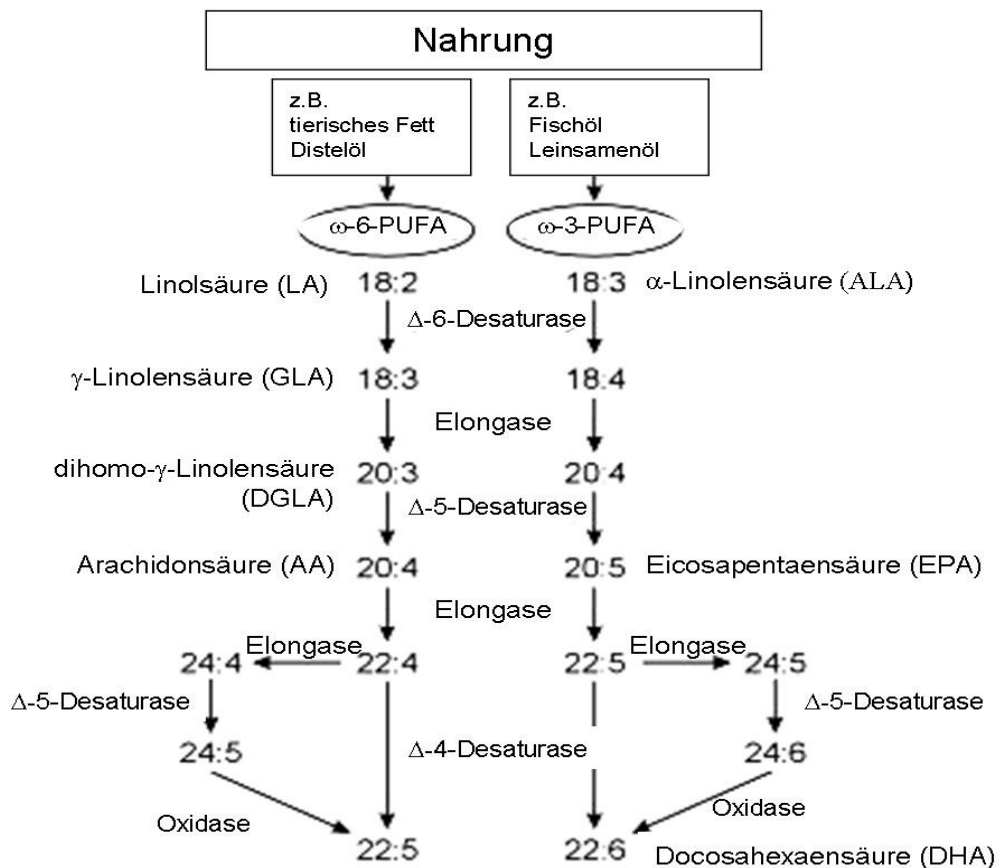


Abb. 1.6: Metabolismus essentieller Fettsäuren (aus Haag, 2001 [37])

Der Sättigungsgrad der PUFA hat einen großen Einfluß auf die räumliche Anordnung der FS und damit auf ihre Funktion. Bei *cis*-Konfiguration führt eine steigende Doppelbindungsanzahl zu einer erhöhten räumlichen Krümmung des FS-Moleküls, was bei einem Einbau in Membranen zu einer Erhöhung der Fluidität führt. Doppelbindungen in *trans*-Konfiguration, wie sie in Fetten einiger Nahrungsmittel (z.B. Margarine) zu finden sind, führen dagegen zu einer linearen Molekülform, wodurch die FS ihre Funktion nicht mehr ausüben kann.

Funktion von PUFA

DGLA, AA und EPA sind Vorstufen eicosanoider Signalmoleküle. Aus ihnen werden Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane (Cyclooxygenase-Weg) bzw. Leukotriene und Lipoxine (Lipoxygenase-Weg) gebildet; während AA in prothrombotische, proinflammatorische Eicosanoide umgewandelt wird, sind die ω -3-FS EPA und DHA in erster Linie Vorläufer schwach bzw. anti-inflammatorischer Eicosanoide [38,39] (siehe **Abb. 1.7**).

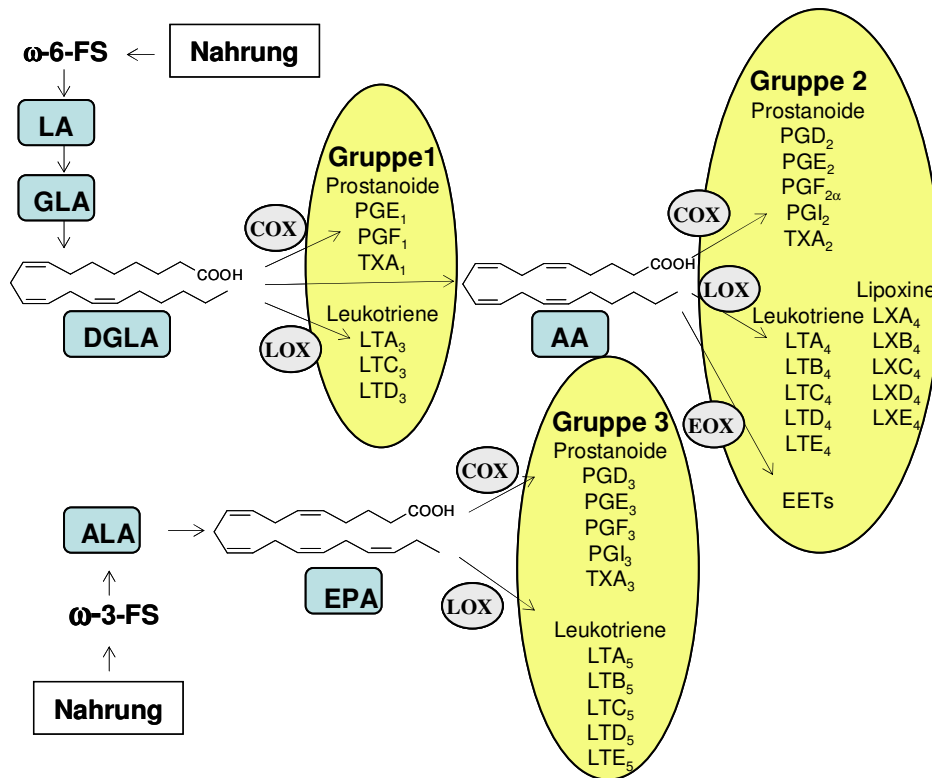


Abb. 1.7: Eicosanoid-Synthese aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA);
 COX: Cyclooxygenase; LOX: Lipoxygenase; EOX: Epoxygenase; PG: Prostaglandin;
 TX: Thromboxan; PGI: Prostacyclin; LX: Lipoxin; EET: Epoxyeicosatriensäure
 (Modifikation aus: Haag, 2001 [37])

Prostaglandine und andere Eicosanoide sind kurzlebige, lokal wirkende Hormone. Sie stimulieren Entzündungsreaktionen, regulieren den Blutfluss zu bestimmten Organen, kontrollieren den Ionentransport durch Membranen, modulieren die synaptische Übertragung und lösen den Schlaf aus [40].

Als Teil von Phospholipiden können PUFA in biologische Membranen eingeschlossen werden. Die Fluidität der Membranen wird in erster Linie durch den Abstand zwischen den FS-Ketten bestimmt. Der Einbau ungesättigter FS erhöht die Fluidität der Membran. Zudem schützt die erhöhte Dichte an π -Elektronen die Thiol-Gruppen der Membranproteine. PUFA können durch Phospholipasen aus den Membranen freigesetzt werden.

PUFA sind in der Lage, durch direkte Interaktion mit Protein-Polypeptidketten die Aktivität von Enzymen zu beeinflussen. Als second-messenger können sie Protein-Phosphorylierungen durch Proteinkinase A und C vermitteln, sowie die Signaltransduktionswege der Tyrosin-Kinasen und der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) modulieren. Durch Beeinflussung der Genexpression können PUFA die Proteinsynthese steuern [41-43].

DHA spielt eine Schlüsselrolle bei der kardioprotektiven Wirkung der PUFA. Eine konstante Gabe von DHA mit der Nahrung führt sowohl zu erhöhten DHA-Konzentrationen in den Skelettmuskeln als auch im Myokard, was in Verbindung mit einer verbesserten Herzfunktion und damit zu einem verminderten Risiko für KHK gebracht wird [44]. Eine Unterversorgung mit DHA kann zu vermindertem Wachstum, kardiovaskulären Vorfällen, kognitiven Störungen und Schädigungen der Zellmembranen, besonders in der Haut und der Retina, führen. Vor allem in der Wachstumsphase ist eine ausreichende Versorgung mit essentiellen PUFA nötig [45-47]. Oft wird das ω -6/ ω -3-Verhältnis betont, da die Bildung prothrombotischer Eicosanoide bei einem erhöhten AA-Angebot begünstigt ist. Dabei wird ein Verhältnis von ω -6/ ω -3 von 5:1 als ideal angesehen [48,49].

Therapeutischen Einsatz findet eine Supplementierung mit ALA, DHA oder EPA vor allem bei entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis, Colitis, Multiple Sklerose, Rheuma, Psoriasis und Neurodermitis, bei kardiovaskulären Erkrankungen und deren Risikofaktoren wie Arteriosklerose, Hypercholesterinämie, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus sowie bei der Entwicklung der Gehirn- und Sehleistung bei Babys [39,50-52].

1.3 Polyphenole

1.3.1 Allgemeines

Polyphenole sind Substanzen des Polyketidstoffwechsels, die im Pflanzenreich verschiedenste Funktionen erfüllen: sie bieten Schutz vor Pathogenen, Mikroorganismen, UV-Einwirkung und Bedingungen des oxidativen Stress. Tannine halten Herbivore davon ab, die adstringierenden Früchte zu fressen. Phenolische Komponenten wie Salicylsäure fungieren als Signalmoleküle und Lignin sorgt für mechanische Stützung des Zytoskeletts. Ein phenolisches Molekül ist oft charakteristisch für eine Pflanzenart. Zurzeit sind über 4000 polyphenolische Verbindungen pflanzlichen Ursprungs bekannt [53].

Die Unterteilung der Polyphenole erfolgt entsprechend der Struktur ihres Kohlenstoffskeletts in Phenolsäuren, Flavonoide und die weniger häufigen Stilbene und Lignane. Phenolsäuren kommen in vielen Lebensmitteln vor; am häufigsten findet man Kaffesäure und Ferulasäure. Die Kaffeesäure liegt oft als Ester vor, der bekannteste Kaffeoyl ester ist die Chlorogensäure (bis 150 mg pro 200 ml Kaffee). Die am häufigsten vorkommenden Polyphenole in unserer Nahrung stellt die Klasse der Flavonoide dar.

1.2.2 Klassifizierung der Flavonoide

Flavonoide gehören zu der Klasse der Phenylchromanderivate, deren Grundgerüst das Flavan (2-Phenylchroman) ist. Die über eine C₃-Brücke verbundenen aromatischen Ringe sind unterschiedlich substituiert: Ring A weist das Substitutionsmuster des Phloroglucins oder des Resorcins auf, Ring B ist gewöhnlich in 4'-Stellung, 3',4'-Stellung oder 3',4',5'-Stellung hydroxyliert. Die Hydroxygruppen können alkyliert, acyliert, mit Mono-, Di- und seltener auch Trisacchariden verknüpft oder mit Schwefelsäure verestert sein. Anhand des Substitutionsmusters am C-Ring werden die Flavonoide in die Flavanole (3-Hydroxyflavane), Flavandiole (3,4-Dihydroxyflavane), Flavanone (4-Oxoflavane) und Flavone (3-Oxoflav-2-ene) unterteilt [54]. In **Abb. 1.8** ist eine Übersicht der Flavonoid-Unterklassen dargestellt.

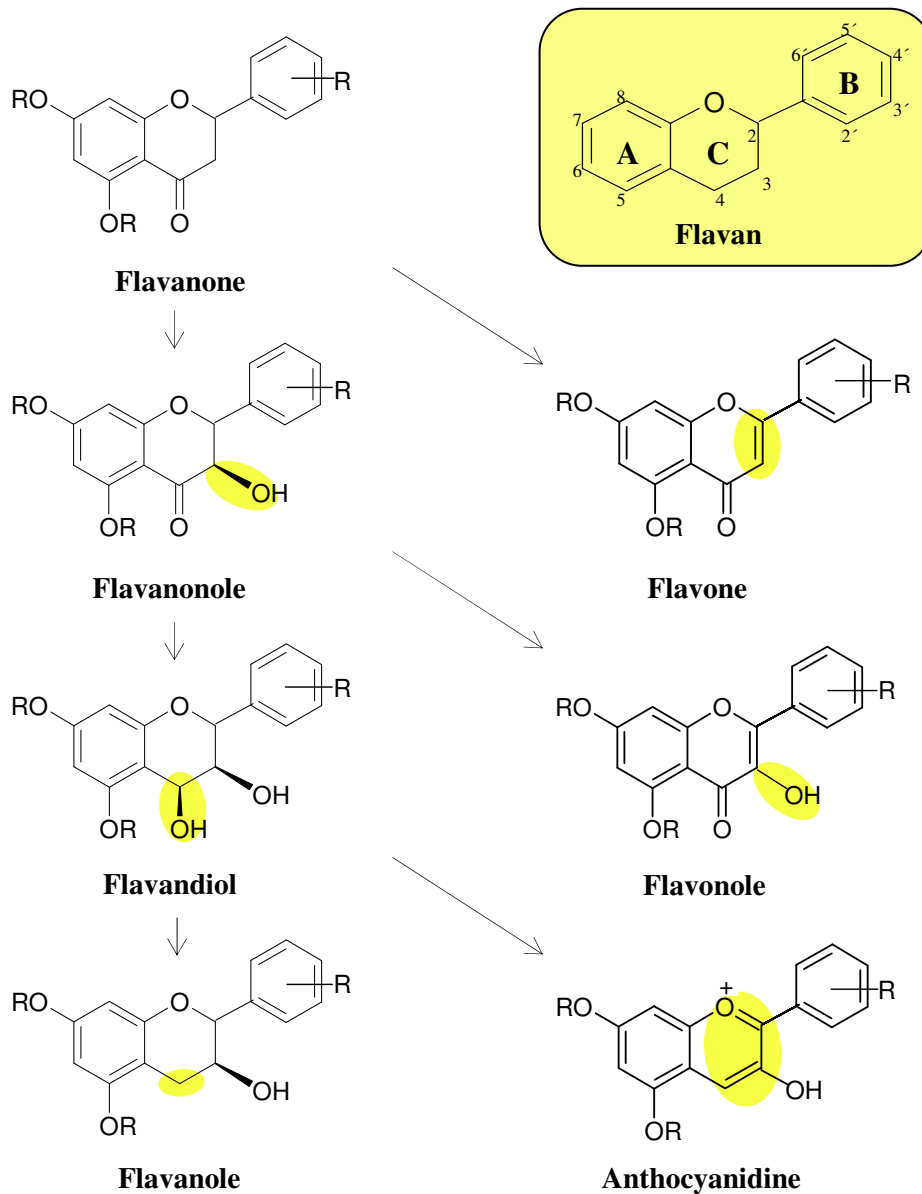


Abb. 1.8: Strukturmerkmale der Flavonoide

Die Flavanole werden auch als Catechine bezeichnet, besitzen eine Catecholstruktur am B-Ring und liegen zum Teil an Gallussäure gebunden vor. Proanthocyanidine sind zu Di- bis Oligomeren kondensierte Flavanole. Galloylierte Flavanole bilden die Prodelphinidine, bestehen sie nur aus Catechin- und Epicatechin-Untereinheiten, werden sie als Procyanidine bezeichnet. Die Procyanidine werden anhand der Polymerisierungsposition unterteilt: im A-Typ liegen zwei Bindungsstellen vor (meist 2→7-O und 4→8); im B-Typ sind nur die Kohlenstoffatome 4 und 8 in β (Procyanidin B1 und B2) oder in α -Stellung (Procyanidin B3

und B4) kondensiert. Auch 4→6 Verbindungen kommen vor (Procyanidin B5-8), die bei höheren Polymerisierungsgraden zu Verzweigungen des Moleküls führen [55].

1.2.3 Vorkommen

Mit der Nahrung, insbesondere Früchten und Getränken, werden pro Tag durchschnittlich 1g Polyphenole aufgenommen; ein Drittel davon stellen Phenolsäuren dar, die anderen zwei Drittel machen die Flavonoide aus. Die Hauptvertreter der Flavonoide in der Nahrung sind die Flavane (Catechine plus Proanthocyanidine), Anthocyanine und deren Oxidationsprodukte [56]. Das Vorkommen der Gallate und Gallocatechine ist fast ausschließlich auf Tee beschränkt. Ein Aufguss grünen Tees enthält ca. 1 g Catechine pro Liter [57], wobei schwarzer Tee aufgrund der Fermentation nur noch die Hälfte des Catechin-Gehaltes aufweist [56]. (+)-Catechin-Konzentrationen sind besonders hoch in Bohnen, roten Trauben, Aprikosen und Erdbeeren; (-)-Epicatechin ist in hohen Konzentrationen in Äpfeln, Brombeeren, Bohnen, Kirschen, roten Trauben, Birnen, Himbeeren und Schokolade zu finden. Pflaumen, Avocados, Erdnüssen, Curry und Zimt enthalten A-Typ Procyanidine, B-Typ Procyanidine sind besonders in Kakao, Brombeeren, Kirschen, Feigen, Pflaumen, roten Trauben, Wein und Äpfeln anzutreffen [58]. In der Natur kommen sie normalerweise zusammen mit den Monomeren Untereinheiten vor, am häufigsten sind Di- und Trimere zu finden [59].

Das Hauptmonomer des Kakaos (*Theobroma cacao* L.) ist (-)-Epicatechin [60]. Gu et al. [58] fanden in LC-MS-MS–Untersuchungen, dass Kakaobohnen Catechin, Epicatechin, und Procyanidine des B-Types enthalten. Der Polymerisierungsgrad der Procyanidine beträgt von 2 (Procyanidin B2) bis > 10. A-Typ-Kondensate, heteromere Untereinheiten, Afzelechin, Epiafzelechin, Gallocatechin oder Epigallocatechin, sowie glykosidisch gebundene Flavane liegen in Kakao nicht vor; entsprechend der Monomer-Zusammensetzung sind nur Procyanidine und keine Prodelphinidine anzutreffen. Nach Adamson et al. [61] enthält Kakao einen Procyanidin-Gehalt von 0,5-14,5 mg/g bei einem Monomer-Gehalt von 0,2-4,9 mg/g, was in jüngeren Studien, in denen ein Flavanol-Gehalt von bis zu 1,64 mg/g [62] gezeigt wurde, bestätigt werden konnte. Rios et al beschreiben einen gesamt-Polyphenol-Gehalt in Kakao von 5-8,4 mg/g, mit einem Oligo- und Polymeranteil von >90 % [63]. Weiterhin enthalten frische Kakaobohnen 0,3 mg/g des Flavonols Quercetin [64], sowie ca. 0,09 µmol/g bzw. 22 µmol/g der Xanthinderivate Coffein und Theobromin.

In den roten Trauben des Weins (*Vitis vinifera*) sind vornehmlich Procyanidine vom B-Typ anzutreffen, die monomeren Untereinheiten machen nur einen geringen Anteil aus; der

höchste Flavanol-Anteil ist in den Kernen zu finden, während in der Schale in erster Linie das Phytoalexin Resveratrol nachzuweisen ist.

Die Schätzungen der durchschnittlichen Flavanol- und Procyanidin-Aufnahme belaufen sich auf ca. 50-100 mg/d an Catechin-Monomeren und mehreren 100 mg/d an Oligo- und Polymeren [65-67].

Flavanone, aufgrund ihres Vorkommens auch als Zitrusflavonoide bezeichnet, tragen einen geringeren Anteil zur durchschnittlichen Flavonoid-Einnahme bei. Die Hauptvertreter sind die Rhamnoglucoside Hesperidin, Narirutin und Naringin. In Zitronen (*Citrus limonium*) und Orangen (*Citrus sinensis*) sind in erster Linie Hesperidin und Narirutin anzutreffen; Naringin ist das Hauptflavonoid der Grapefruit (*Citrus paradisi*) und verantwortlich für den bitteren Geschmack. Die tägliche Aufnahme der Aglykone Naringenin und Hesperetin beträgt ca. 10 mg/d bzw. 30 mg/d [68]. Der Gehalt an Flavonoiden ist stark abhängig von Spezies und Kultivierungsbedingungen. In einem Liter Orangensaft sind ca. 450 mg Hesperidin und 95 mg Narirutin enthalten [69].

1.2.4 Pharmakokinetik der Flavonoide

Die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus der Flavonoide sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden ist ein Überblick der bisher erlangten Erkenntnisse über Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination der Flavonoide mit dem Schwerpunkt Flavanole, Flavone und Procyanidine, gegeben (s. **Abb. 1.9**).

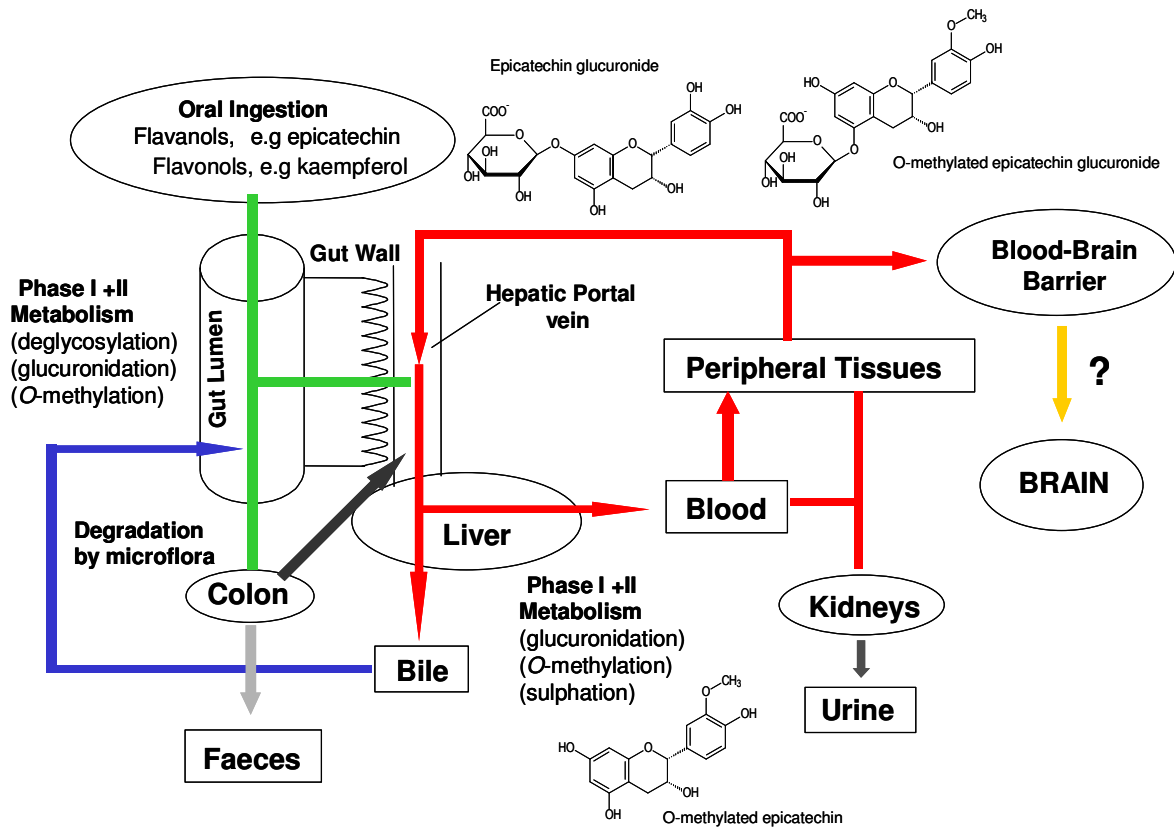


Abb. 1.9: Absorption und Metabolismus der Flavonoide (aus: Stahl et al. 2002 [70])

Absorption

Die intestinale Absorption, sowie auch spätere Phase-II Reaktionen, werden in erster Linie von der chemischen Struktur der Polyphenole bestimmt. Viele Polyphenol-Klassen wie Flavonole, Isoflavone, Flavone, Flavanone und Anthocyanine liegen in der Natur glycosyliert vor. Bei dem Zuckerrest handelt es sich oft um Glucose oder Rhamnose, es kommen aber auch Galaktose, Arabinose, Xylose, Glucuronsäure oder andere Zucker vor. Meist besteht der Zuckerrest aus einer Komponente, teilweise aber auch aus zwei oder drei, die wiederum substituiert vorliegen können. Das Glykosylierungsmuster bestimmt die Lipophilie und damit die Aufnahme in die Zelle durch passive Diffusion durch biologische Membranen wie die Dünndarm-Wand [56].

Um eine ausreichende Lipophilie zu erreichen, müssen glykosylierte Flavonoide in ihre Aglykone gespalten werden. Dies kann auf enzymatischem Weg durch Glykosidasen erreicht werden, die entweder mit der Nahrung selbst zugeführt werden oder endogener Herkunft sind. So enthalten Zellen der gastrointestinalen Mucosa Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) die sowohl β -Glykoside als auch Glucosylceramide, Laktosylceramide und Laktose spaltet.

Humane Zellen exprimieren gewebeabhängig β -Glykosidasen, die Glucose- und zum Teil auch Arabinose- oder Xylose-Reste abspalten können; hier wäre die lösliche **CBG** (*cytosolic β -glucosidase*) zu nennen, welche in vielen Geweben, vor allem in der Leber, vorkommen.

Rhamnose dagegen ist kein Substrat für humane β -Glukosidasen, sie kann nur von den der Mikroflora des Colons sezernierten α -Rhamnosidasen gespalten werden. Nach der enzymkatalysierten Spaltung von Flavonoid-Konjugaten im Colon können die intakten Polyphenole entweder durch das Colonepithel absorbiert und dem Blutkreislauf zugeführt oder weiter in niedermolekulare phenolische Strukturen gespalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser mikrobiellen Metabolite biologische Effekte aufweisen und somit das entsprechende Flavonoid als Prodrug fungierte [71,72].

Die *nicht*-enzymatische Deglykosylierung ist von untergeordneter Bedeutung, da Flavonoide weder unter den sauren Bedingungen des Magens, noch durch Darmsekrete in ausreichender Geschwindigkeit chemisch zersetzt werden [73,74]. Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide ist demnach stark von der Enzyrnaustattung an Glykosidasen abhängig. Die maximalen Plasmakonzentrationen (t_{\max}) von Flavonoiden liegt meist bei ca. 1-2 h nach Einnahme; die Eliminationshalbwertszeit im Blut beträgt in der Regel 1-2 h, so dass oft 6-8 h nach Zufuhr der Basalwert wieder erreicht wird. Eine Ausnahme bilden solche Polyphenole, die vor der Absorption durch die Colon-Mikroflora gespalten werden müssen; die t_{\max} von Hesperidin (Hesperetin-7-rhamnoglucosid) beträgt 5 h, die von Rutin sogar 9 h.

Flavanole gehören zu den wenigen Flavonoiden, die in ihrer nativen Form nicht an einen Zuckerrest gebunden sind, jedoch liegen sie nicht selten acyliert vor (besonders mit Gallussäuren). Diese Substitution verursacht im Gegensatz zur Glykosylierung nur geringe Veränderungen in der Lipophilie und beeinflusst die Bioverfügbarkeit kaum. Flavanole können biologische Membranen mittels passiver Diffusion passieren und werden ohne vorherige Dekonjugation oder Hydrolyse absorbiert [58].

Distribution

Flavonoide werden nach der Absorption von Enterozyten und hepatischen Zellen aufgenommen, wo sie metabolisiert werden. Flavonoid-Konjugate können von Zellen aufgenommen werden, wo sie wiederum dekonjugiert werden [75]. In welchem Maß die Aufnahme stattfindet, hängt von Zelltyp und Flavonoid ab; die Aufnahme und Metabolisierung *in-vivo* ist noch ungeklärt. Zellkulturexperimente haben ergeben, dass Epicatechin und dessen 3'- und 4'-*O*-Metabolite, nicht aber das Glucuronid, von Hautfibroblasten und Endothelzellen aufgenommen werden [76]. Ähnliche Beobachtungen wurden für Hesperetin und Naringenin gemacht werden. Im Falle des Flavonols Quercetin wird intrazellulär ein Quercetin-Glutathion-Addukt gebildet [77]. Die physiologische Bedeutung der Konjugate ist ungeklärt. Glucuronide könnten Transportform der aktiven Substanz sein [78,79].

Metabolismus

In Darmmucosa und Leber werden Flavonoide methyliert, sulfatiert und glucuronidiert. Diese Konjugationen (= Rekonjugierung) finden enzymatisch statt und sind abhängig von der Verteilung und der Spezifität der entsprechenden Enzyme. Studien an isoliertem Ratten-Dünndarm haben gezeigt, dass schon bei dem Transfer von der mukosalen zur serosalen Seite ein ausgeprägter Metabolismus der Flavonoide in den Enterozyten stattfindet [80].

Wie auch beim Metabolismus von Arzneistoffen können diese Detoxifizierungsreaktionen eine Änderung des Wirkprofils der Substanzen hervorrufen. Generell sind nach Dosen, die im Bereich der Zufuhr mit Nahrungsmitteln liegen, freie Polyphenol-Aglykone nicht im Plasma nachweisbar [81,82]. Es gibt mittlerweile einige Hinweise, dass nicht alle Glykoside gespalten werden, da es in einigen Studien gelang, geringe Mengen an Flavonol-Glykosiden im Plasma nachzuweisen [83,84]. Deren Metabolisierung sollte von der der Aglykone abweichen: Glucoside sollten langsam von hepatischen β -Glukosidasen hydrolysiert werden, wohingegen Rutinoside lange Halbwertszeiten aufweisen dürften, da endogen keine α -Rhamnosidasen vorliegen. Die in den Metabolismus der Polyphenole involvierten Enzyme sind aufgrund ihrer Rolle im Metabolismus verschiedener Arzneistoffe gut erforscht: die **COMT** (Catecholamin-*O*-methyltransferase) ist eines der Hauptenzyme im Dopamin-Stoffwechsel. Sie ist weit verbreitet im Organismus und methyliert Polyphenole an den Hydroxygruppen des Catecholrings. Da einige Polyphenole allerdings von Cytochrom P450

an der 4'-, jedoch nicht an der 3'-Position wieder demethyliert werden, dirigiert eher die Spezifität von CytP450 den Ort der Methylierung [85]. Die höchste Methylierungs-Aktivität für Epicatechin wurde in Leber und Niere bestimmt [86]. Die **UDPGT (Uridin-5'-diphosphat-glucuronosyltransferase; UGT)** ist ein Phase-II-Enzym, das die Konjugation von Flavonoiden an Glucuronsäure katalysiert. Sie ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und in zahlreichen Geweben vorhanden. Die Glucuronidierung der Flavonoide findet in erster Linie durch Enzyme der Familie UGT1A statt, die vor allem im Intestinaltrakt, der Leber und den Nieren zu finden sind [86]. Nahrung, Umwelteinflüsse und genetische Faktoren beeinflussen die UGT-Aktivität, was zu interindividuellen Unterschieden im Glucuronidierungsmuster führen kann, wie bereits im Falle des Catechins von Yang et al. beschrieben [87]. Die Spezifität ist für stark reduzierende Flavonoide wie die am B-Ring 3,4-dihydroxylierten Flavanole und Luteolin deutlich höher, als für monohydroxylierte Verbindungen wie z.B. Hesperetin. Eine Gruppe zytosolischer Enzyme stellen die **P-PST (Phenolsulfotransferasen, SULT)** dar. Sie sind weit verbreitet und vor allem in der Leber (SULT1A1) und im Colon (SULT1A3) vorhanden. SULT1A3 weist eine hohe Spezifität für Catecholgruppen auf [86]. Einige Sulfotransferasen werden durch Polyphenole inhibiert [88]. In **Abb 1.10** sind Strukturen möglicher Metabolite am Beispiel des Epicatechins dargestellt.

Die Konjugation an Glucuronsäure ist eine häufige Detoxifizierungsreaktion, die zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit führt und damit die Exkretion begünstigt. Aufgrund ihres Molekulargewichtes werden die Flavonoidkonjugate vermutlich vor allem biliär ausgeschieden. Polyphenole, die über den enterohepatischen Kreislauf meist glucuroniert über die Galle in den Darm gelangen, werden durch bakterielle **β -Glucuronidasen** teilweise dekonjugiert. Humane β -Glucuronidasen sind saure Hydrolasen, die in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten, wie Niere, Leber und Serum exprimiert werden. Die potentielle Verfügbarkeit von freien Flavonoiden in Geweben hängt mitunter von der Spezifität dieser dekonjugierenden Enzyme ab [79].

Die Mikroflora des Colons enthält ca. 10^{12} Mikroorganismen/cm² und hat damit ein hohes katalytisches und hydrolytisches Potential. Die Hydroxylierung an 5-, 7-, 3-, 3'- und 4'-Position der Catechine begünstigt eine Ringöffnung nach Hydrolyse; aus dem B-Ring entstehen in erster Linie Dihydrophenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure, Homovanillinsäure und deren Konjugate, aus dem C-Ring entstehen die Phenolsäuren. Falls wie bei den Flavanolen keine C-4-Carbonylgruppe vorhanden ist, werden spezifische Metabolite wie Phenylvalerolactone und Phenylpropionsäuren gebildet, die zu Benzoesäure-Derivaten weitermetabolisiert werden können [83].

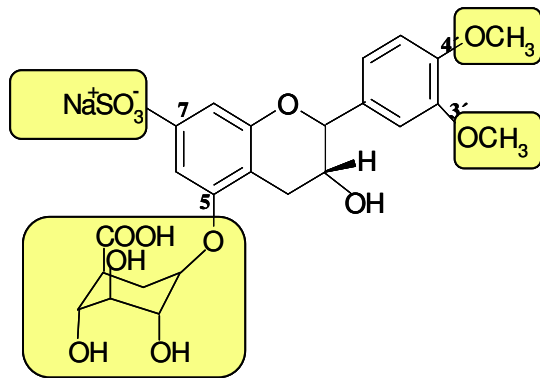


Abb 1.10: Metabolisierung des Epicatechins: Epicatechin liegt im Organismus als 5- oder 7-O- β -D-Glucuronid, 5- oder 7-O-Sulfat, 3'- oder 4'-O-Methyl-Derivat vor. Mischformen sind ebenfalls möglich (s. Text)

In der Literatur sind unterschiedlichste Konzentrationsangaben für Flavanole und deren Metabolite in Plasma zu finden. So konnten Piskula et al. und Okushio et al. nach Gabe von 36,4 bzw. 364 μmol Epicatechin/kg Körpergewicht gesamt-Flavanol-Konzentrationen von 39 bzw. 210 $\mu\text{mol/L}$ Plasma erzielen. Die Absorption ist dosisabhängig, jedoch nicht linear [86,89]. Einen guten Überblick liefert eine 2001 von Baba et al. durchgeführte Studie über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von Epicatechin und Catechin. Interessanterweise war bei äquimolarer Einnahme die Epicatechin-Konzentration in Plasma doppelt so hoch wie die des Catechins. Wurden die Substanzen zeitgleich eingenommen war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, allerdings waren die Konzentrationen beider Substanzen niedriger. Dies lässt vermuten, dass die Absorption von Epicatechin im oberen intestinalen Trakt effektiver ist, als die von Catechin und/oder die Flavanole kompetitiv im Gastrointestinal(GI)-Trakt absorbiert werden. Die AUC der methylierten Catechin-Metabolite ist signifikant niedriger, als die der Epicatechin-Metabolite.

Der Hauptmetabolit des Catechins ist das Glucuronid in nicht-methylierter Form, während der Hauptmetabolit des Epicatechins das Sulfoglucuronid und Glucuronid in nicht-methylierter Form, sowie das 3'-O-methylierte Sulfat ist. Dies kann auf eine unterschiedliche Affinität der Catechine zu UGT, COMT und PST zurückzuführen sein [90].

Der Metabolismus der Procyanidine ist derzeit noch nicht aufgeklärt und die verfügbaren Daten sind widersprüchlich. In Humanstudien wurde nach Verzehr von 2 g procyanidinreichen Traubenextraktes eine Procyanidin B1 Plasmakonzentration von lediglich 10 nmol/l erreicht [91]. Nach Konsum von 0,375 g Kakao/kg Körpergewicht wurden 41 nmol/l Procyanidin B2 gefunden [92]. Die Gabe von gereinigtem Procyanidin B3 und B3-haltigem Traubenkernextrakt an Ratten führte zu keinen detektierbaren Mengen an freiem

oder konjugierten B3 im Blut oder Urin [93]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird in der Literatur eine Spaltung der Procyanidine in ihre monomeren Untereinheiten in Betracht gezogen [80,94,95].

Möglicherweise sind bisher unidentifizierte Metabolite der Procyanidine für die physiologischen Wirkungen verantwortlich, die in humanen Interventionsstudien mit procyanidinreicher Nahrung bei niedrigen Plasmaspiegeln gefunden wurden. Auch hier könnten biologisch aktive, mikrobielle Metabolite eine Rolle spielen; auch Proanthocyanidine unterliegen dem mikrobiellen Abbau zu strukturell einfacheren aromatischen Molekülen [72].

Elimination

Von zentraler Bedeutung für den Eliminationsweg ist das Molekulargewicht. Aufgrund ihres relativ hohen Molekulargewichtes wird die biliäre Exkretion als Haupteliminationsweg für Flavonoide angenommen. Auch spielen viele weitere Faktoren wie der Abbau zu Phenolsäuren eine Rolle (s. *Metabolismus*). Dies erklärt zumindest teilweise die geringe renale Elimination [96].

Die renale Elimination der Polyphenole variiert von Substanz zu Substanz. Die Wiederfindungsrate von Catechinen aus grünem Tee und Kakao (3-8 %), Isoflavonen aus Soja (9 %), Flavanonen aus Zitrusfrüchten (2-5 %) oder Procyanidinen aus Rotwein liegt zwischen 3-27 %. Das Dimer Procyanidin B2 und Epigallocatechingallat wurden nicht im Urin gefunden [54]. Galloylierte Catechine sind in ca. 10-fach geringerer Konzentration im Urin zu finden, als nicht-galloylierte. Die Phenylvalerolactone (-)-5,3-(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- γ -valerolacton und (-)-5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton sind spezifische Metabolite der Catechine und können ca. 7-13 h nach Flavonoid-Einnahme im Urin nachgewiesen werden [97,98].

1.2.5 Physiologische Effekte der Flavonoide

Epidemiologie

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass ein bestimmtes Ernährungsverhalten den allgemeinen Gesundheitszustand beeinflussen und vor chronischen Krankheiten schützen kann.

Der tägliche nahrungsbedingte Konsum der Flavonoide ist deutlich höher als der anderer Mikronährstoffe (z.B. antioxidativer Vitamine und Provitamine), ein Aspekt, der das Interesse der Wissenschaft weckte und zu zahlreichen *in-vivo* und *in-vitro* Studien führte. Das vermutlich best untersuchte Flavonoid ist das Flavonol Quercetin, welches glykosidisch gebunden vor allem in *Ginkgo biloba*, *Crataegus*-Arten und seinem Namensgeber *Quercus ssp.* (Eiche) zu finden ist. Epidemiologische Studien belegen eine Korrelation zwischen erhöhtem Flavonoid-Konsum und einem verminderten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen [99], Schlaganfälle [100], und koronare Herzerkrankungen (KHK) [101-104]. Neuere Untersuchungen konnten ähnliche Effekte für Procyanidine und deren Flavanol-Untereinheiten aufzeigen [105-108]. Die Eigenschaften der Flavanole und Procyanidine können als antiinflammatorisch, vasoprotektiv, antibronchokonstriktorisch, antiarteriosklerotisch und antikarzinogen charakterisiert werden. Meist liegen den Effekten komplexe Wirkmechanismen zugrunde.

Oxidativer und nitrosativer Stress

Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Oxidantien, so genannten reaktiven Sauerstoff (ROS)-Spezies und antioxidativen Abwehrsystemen. Prooxidative Prozesse werden als Mechanismus in der Pathogenese von Krankheiten wie KHK und anderer vaskulärer Erkrankungen, Schlaganfall, entzündlichen Prozessen, neurodegenerativen Fehlfunktionen und Krebs diskutiert [109]. Lipide, Proteine und Nukleinsäuren sind Zielstrukturen von ROS, die durch Oxidationsreaktionen ihre Funktion teilweise oder auch ganz verlieren. Ein Beispiel für diese Schädigung ist die Lipidperoxidation, die zum Verlust dynamischer Eigenschaften der Zellmembran oder zur oxidativen Modifikation von LDL führen kann. LDL-Oxidation spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung von Arteriosklerose. Darüber hinaus können die aus dem oxidativen Angriff resultierenden Produkte weiterreagieren und biologisch relevante Moleküle schädigen. Die Stärkung der

antioxidativen Verteidigungssysteme wird als eine Möglichkeit in der Prävention von Krankheiten gesehen, in deren Pathogenese oxidativer Stress eine Rolle spielt.

Viele Flavonoide, im Besonderen Epicatechin, weisen antioxidative Wirkungen auf. Aufgrund ihrer Struktur haben Flavanole wie alle Polyphenole reduzierende Eigenschaften und können radikalisch ablaufende Kettenreaktionen (z.B. Lipidperoxidation) unterbrechen. Sie interagieren mit anderen Antioxidantien wie α -Tocopherol (Vitamin E), β -Carotin (Provitamin A) oder Ascorbinsäure (Vitamin C) und schützen, als Bestandteil des antioxidativen Netzwerks, Zellbestandteile vor dem Angriff von ROS. Die chemische Struktur bestimmt ihr Redox-Potential, wobei Polyphenole mit zwei vicinalen Hydroxygruppen am aromatischen Rest bessere antioxidative Eigenschaften besitzen, als solche mit nur einer freien Hydroxygruppe [110]. Epicatechin ist ein besseres Antioxidans, als Catechin [111-115].

Bei Untersuchungen mit Quercetin stellte sich heraus, dass Sulfatester und Glucuronide einen Teil ihrer antioxidativen Eigenschaften behalten und *in-vitro* die Oxidation von LDL verzögern können [82]. Studien zu sulfatierten oder glucuronidierten Flavanolen stehen noch aus. Am Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass Flavonoide den Arterioskleroseprozess verzögern [116].

Auch durch reaktive Stickstoff-Spezies (RNS) wie NO, Peroxynitrit oder Nitrit verursachter nitrosativer Stress kann zu Modifikationen von Zellbestandteilen führen. Peroxynitrit (NOO^\bullet) ist neben Nitrit (NO_2^-) ein Produkt von NO, das unter anderem eine Tyrosin-Nitrierung im LDL-Apoprotein verursacht. Epicatechin ist in der Lage, diese Reaktion *in-vitro* zu hemmen [117]. Auch in anderen Systemen wurden Peroxynitrit-induzierte Nitrierungsreaktionen schon durch niedrige Epicatechin-Konzentrationen unterdrückt, während für die Hemmung oxidativer Reaktionen höhere EC-Konzentrationen notwendig waren [118].

Einfluß auf prooxidative Enzyme

Um ein besseres Verständnis für die protektiven Mechanismen gegen die ROS-induzierten oxidativen Schädigungen zu erlangen, wurden Studien zur Interaktion von Flavanolen mit prooxidativen Enzymsystemen durchgeführt.

Schwerpunkt dieser Studien sind Enzyme und Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels. Arachidonsäure ist Substrat für Lipoxygenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX). Eine LOX-Aktivierung führt zur Bildung verschiedener inflammatorischer Mediatoren; hierbei sind vor allem die Leukotriene, konjugierte Hydroxyeicosatetraensäuren, Hepoxiline und

Lipoxine zu nennen. Hinzu kommen die durch **Cyclooxygenasen** (COX) gebildeten Eicosanoide wie die Prostaglandine, Prostacycline und die Thromboxane (s. **Kapitel 1.1.4**).

Viele dieser Substanzen werden in Verbindung mit frühen Stadien der Arteriosklerose gebracht und können somit ein potentielles Ziel für kardioprotektiv-wirkende Agentien sein [119]. Eine Hemmung dieser Enzyme führt zu antiinflammatorischen, vasoprotektiven und antibronchokonstriktorisches Effekten [78].

Studien zu den Effekten von Flavanolen und Procyanidinen zeigten eine Inhibierung verschiedener LOX durch Mono- bis Dekamere [120,121]. Es wird vermutet, dass Flavonoide sowohl die LOX-Aktivität hemmen, als auch die während der LOX-induzierten Lipidperoxidation (LPO) entstehenden freien Radikale abfangen. Diese Mechanismen werden unter anderem zur Erklärung der Effekte von Kakaoflavonoiden auf das vaskuläre Endothel herangezogen [78].

Die genaue Interaktion zwischen Flavonoiden und Arachidonsäure-Metaboliten ist noch nicht vollständig geklärt. In einer humanen Interventionsstudie führte die Einnahme von Kakao mit hohem Flavonoid-Gehalt zu einer signifikanten Abnahme des Verhältnisses von Cysteinyl-Leukotrienen zu Prostacyclin (=Prostaglandin I₂) im Plasma [122].

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein weiteres prooxidatives Enzym, das nach inflammatorischen Stimuli von Neutrophilen, Macrophagen oder Phagozyten sezerniert wird und sowohl an inflammatorischen, als auch arteriosklerotischen Reaktionen beteiligt ist [123,124]. Epicatechin und Procyanidine können einer MPO/Nitrit-induzierten Oxidation von LDL entgegenwirken: sie verlängern dosisabhängig die lag-Phase der Bildung konjugierter Diene und vermindern die Reaktionsrate der Lipidperoxidation. Im Gegensatz zur Interaktion mit Lipoxygenasen basiert die Interaktion mit MPO und Flavonoiden nicht auf einer direkten Enzyminhibierung, sondern alleine auf der antioxidativen Wirkung [125].

Thrombozytenaggregation:

Thrombozytenaggregation ist eine kritische Reaktion, die während der Initiation koronarer Thrombose stattfindet. Eine Verminderung der Thrombozytenaggregation spielt in der Prävention von Myokardinfarkten und Schlaganfällen eine Rolle. Studien zur Thrombozytenfunktion in Anwesenheit von Flavanolen und Procyanidinen zeigten eine erniedrigte Thrombozytenaktivierung und Aggregation *ex-vivo* [126-128]. Nach Konsum von Kakao konnte in Humanstudien eine Erniedrigung der primären Hämostase, der Thrombozytenaggregation und des mittleren Thrombozytenvolumens beobachtet werden [129-131]. Rein et al. postulieren, dass diese Effekte von Kakao-Flavonoiden auf einem verminderten Arachidonsäure-Metabolismus und einer damit verbundenen Verminderung der Thromboxan(TX)_{A₂}-Synthese basieren. Die molekulare Zielstruktur der Flavanole konnte bisher nicht identifiziert werden [126,127].

Neben diesen direkt oder indirekt mit antioxidativen Prozessen verbundenen Mechanismen werden mittlerweile auch nicht-antioxidative Wirkmechanismen von Flavonoiden diskutiert. Eine dieser Eigenschaften ist die Modulation der Zell-Zell-Kommunikation durch Flavonoide.

1.4 Zelluläre Kommunikation über Gap Junctions

Eine direkte Form der Kommunikation zwischen Zellen beruht auf der Diffusion niedermolekularer Substanzen durch Zell-Zellkanäle (*Gap junctions*, GJ), die eine cytosolische Verbindung zwischen benachbarten Zellen und somit eine funktionelle Kopplung des Zellverbandes herstellen [132]. Diese Form der interzellulären Kommunikation über GJ (*Gap junctional intercellular communication*, GJIC) wird kurz als Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) bezeichnet.

Aufbau und Funktion

Gap Junctions dienen dem Austausch von Molekülen von bis zu 1 kDa (z.B. Zucker, Peptide, Nukleotide oder Signalstoffe). Dazu werden aus jeweils zwei Hemikanälen, den Connexonen, wassergefüllte Kanäle mit einem Durchmesser von 2-4 μm ausgebildet, die das Cytoplasma benachbarter Zellen miteinander verbinden. Jedes Connexon besteht aus sechs Untereinheiten unterschiedlicher Größe, den Connexinen (**Abb. 1.11 A-B**).

Die Einteilung der Connexine erfolgt nach ihrem Molekulargewicht; so hat das Connexin43-Protein ein Molekulargewicht von 43 kDa. Connexine sind in nahezu allen Geweben nachweisbar [133]. Die Membrantopologie ist für alle Connexine ähnlich. Die Polypeptidkette eines Connexins durchläuft die Membran viermal in einer M-Form, mit den amino- und carboxyterminalen Regionen sowie der zentralen Schleife im Cytoplasma (**Abb. 1.11 C**). In den zwei extrazellulären Schleifen befinden sich drei Cysteinreste, die an der Bildung funktionsfähiger Kanäle beteiligt sind [134]. Die carboxyterminale Region variiert stark zwischen den Connexinen und reguliert vermutlich die GJ-Bildung und die Kanalpermeabilität.

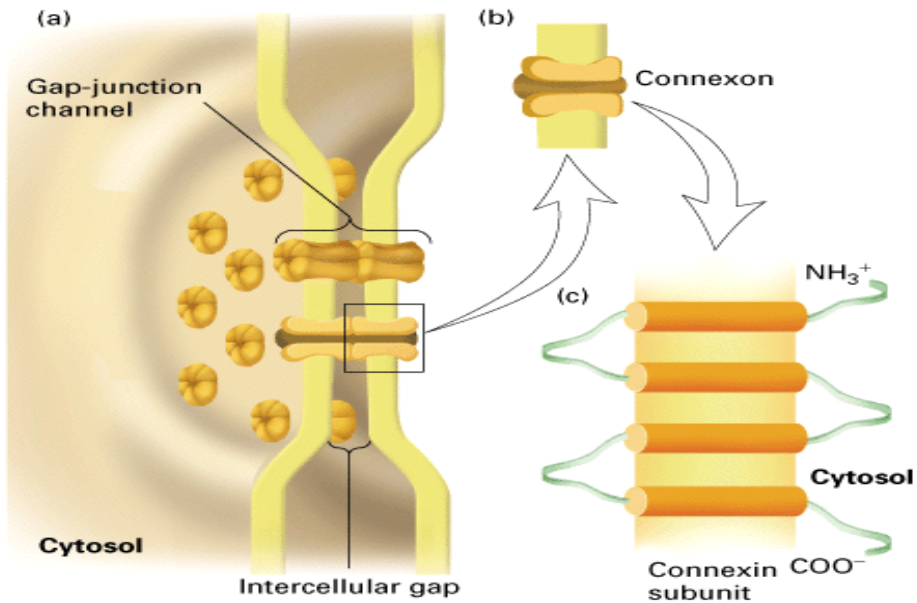


Abb. 1.11: (A-B) Schematische Darstellung der Gap Junctions; jeweils 6 Untereinheiten (Connexine) bilden einen Halbkanal (Connexon); (C) Membrantopologie der Connexine (aus: Willecke et al. 2002 [135])

Die Funktionsfähigkeit der GJ ist abhängig vom korrekten Ein- und Aufbau der Connexine. Nach Synthese der Connexin-Untereinheiten in membrangebundenen Ribosomen erfolgt eine Oligomerisation zu Connexonen im endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Transport über Vesikel zum Golgi-Apparat [136]. Mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (2-5 Std.) werden Connexine aus der Membran ausgebaut und von Lysosomen oder Proteasomen abgebaut [137,138].

Mit Ausnahme von einigen Neuronen, Erythrozyten und Spermien sind Connexine im gesamten Organismus anzutreffen. Die Verteilung der Connexine ist gewebe-spezifisch; das in der Epidermis, im Rückenmark, im Myokard und in den Endothelzellen anzutreffende Connexin43 ist das am häufigsten vorkommende [132,139].

Regulierung der ZZK

Die Connexin-Expression wird als Reaktion auf ein rezeptor-aktiviertes Signalsystem gesteuert. Viele toxikologisch und pharmakologisch aktive Substanzen sind in der Lage, sowohl die direkte als auch die verzögerte Regulation der Connexinmenge zu beeinflussen. Die wichtigsten endogenen Faktoren sind der pH-Wert, cAMP und die Calciumkonzentration. Inhibitoren der ZZK sind Tumorpromotoren, Wachstumsfaktoren und Onkogene [134,140]. Ein basales Niveau an posttranslationaler Phosphorylierung ermöglicht den Zusammenbau funktioneller Kanäle und die Aktivierung der GJIC [141]; eine Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins an den Aminosäuren Serin und Threonin führt dagegen zu einer Hemmung der Kommunikation.

Die für die Regulierung der ZZK wichtigsten Proteinkinasen sind Proteinkinase A, Proteinkinase C und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Sie phosphorylieren Serin- oder Threoninreste am C-terminalen Ende. In der Sequenz des Connexin43-Proteins gibt es mehrere Positionen, die phosphoryliert werden können. Neben der Regelung der ZZK durch Proteinphosphorylierung spielt auch die Beeinflussung der Connexin-Expression eine Rolle. [142,143].

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung Mikronährstoff-haltiger Supplemente mit Hilfe unabhängiger Messverfahren am Menschen zu untersuchen. Dazu sollten verschiedene Interventionsstudien am Menschen durchgeführt werden:

Effekt einer Einmaldosis Polyphenole aus verschiedenen Quellen auf die endotheliale Funktion: Nach Einnahme von Flavanol-, Flavanon- und Procyanidin-haltigen Präparaten sollte über einen Zeitraum von 6 h der periphere arterielle Tonus während reaktiver Hyperämie bestimmt werden. Zugleich sollten die Konzentrationen der Testsubstanzen und die verschiedener Metabolite mittels HPLC analysiert werden.

Weitergehend sollten die Langzeiteffekte nach täglicher Supplementierung mit Flavanolen in Hinblick auf Photoprotektion, Mikrozirkulation, Physiologie und Hydratation der Haut untersucht, sowie eine mögliche Änderung der Flavanol-Konzentrationen in Plasma- und Erythrozyten untersucht werden. Für den Versuch standen zwei Formulierungen mit unterschiedlichem Flavanol-Gehalt zur Verfügung, die über 12 Wochen eingenommen wurden.

Um den Einfluß von ω -3- und ω -6-Fettsäure-haltigen Nahrungssupplementen auf sensible Haut zu untersuchen, sollte eine weitere Studie über 12 Wochen durchgeführt werden, bei der die Probanden täglich Ölkapseln mit unterschiedlichem ω -6/ ω -3-Fettsäure-Anteil einnehmen. Gemessen werden sollte die Verminderung der Hautsensitivität im Nicotinat-Test, sowie Parameter der Hautphysiologie und des Hydrationszustandes. Simultan sollte festgestellt werden, ob die Supplementierung zu einem veränderten Verhältnis von ω -6/ ω -3-Fettsäuren in Plasma und Erythrozyten führt.

Zusätzlich sollten *in-vitro*-Untersuchungen zur Stabilität von S-Nitrosoglutathion in Gegenwart und Abwesenheit von Epicatechin durchgeführt werden. Des Weiteren sollten die in den Studien eingesetzten Flavonoide auf ihre Fähigkeit geprüft werden, die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen zu beeinflussen. Als Modellsystem wurde eine murine Aorten-Endothelzelllinie verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Materialien:

Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit fanden die im Folgenden aufgelisteten Chemikalien, Geräte und Materialien Verwendung. Geräte und Materialien, die für spezielle Anwendungen eingesetzt wurden, werden in den entsprechenden Methodenabschnitten aufgelistet. Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte mit membranfiltriertem Wasser, zu dessen Gewinnung eine Milli-Q® académic Reinstwasseranlage (Millipore GmbH, Eschborn) Anlage diente.

Chemikalien:

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungsmittel und Chemikalien von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D) oder Merck (Darmstadt, D) bezogen und hatten mindestens p.A.-Qualität.

Fettsäuremethylester (*FAME*)-Standards wurden von Supelco (Deisenhofen, D) bezogen. Stickstoff der Reinheit 5.0, Helium (höchste Reinheit) und synthetische Luft (höchste Reinheit) wurden von Linde (Höllriegelskreuth, D) geliefert. SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate stammt von Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA). Für die SDS-PAGE wurde ein Proteinmarker der Fa. Biomol GmbH (Hamburg, D) verwendet.

3'-*O*-Methyl-Catechin, 4'-*O*-Methyl-Catechin, 3'-*O*-Methyl-Epicatechin, 4'-*O*-Methyl-Epicatechin wurden von Mars Inc. (Hackettstown, NJ, USA), eine Fraktion Procyanidin-Dimere freundlicherweise von Prof. Schewe zur Verfügung gestellt.

Verwendete Enzyme:

Hesperidinase aus *Aspergillus niger*

Naringinase aus *Penicillium decumbens*

β -Glucuronidase/Sulfatase Typ H-2 aus *Helix pomatia*

Verwendete Antikörper:

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper; die jeweiligen Volumen-% geben die Verdünnung in 1 % Magermilchpulver [in TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20, siehe **Kapitel 2.5.6.3**) (w/v)] an. Abweichungen werden in den einzelnen Kapiteln beschrieben.

	Hersteller	v/v
primäre Antikörper		
monoklonaler rabbit-anti-Connexin43 C6219	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	1:2000
mouse-anti-eNOS	Becton Dickinson, Plymouth, UK	1:1000
mouse-anti-GAPDH	Chemicon, Hampshire, UK	1:2000
sekundäre Antikörper		
ImmunoPure® Peroxidase conjugated goat-anti-mouse IgG (H+L)	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA	1:20000
ImmunoPure® Peroxidase conjugated goat-anti-rabbit IgG (H+L)	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA	1:10000
Alexa 546 goat-anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D	1:800

Verwendete Geräte und Materialien:

Semi-Dry-Blotter:	EBU-4000, CBS Scientific Co, Del Mar, CA, USA
Elektrophoresekammer:	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Elisa-Reader:	PowerWaveX, Bio-Tek Instruments,
Femtotips:	Eppendorf, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop:	Typ IM 35, Eppendorf, Hamburg, D
Küvetten:	No 67.742, 1dm, Plastik, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Magnetrührer:	IkamagRCT, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., D
Mikroinjektor:	Typ 5242, Eppendorf, Hamburg, D
Mikromanipulator:	Typ S170, Eppendorf, Hamburg, D
SPE-Säulen:	C-18 Nr. 400020, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
SPE-Pumpe:	Laboport, KNF Neuberger, Freiburg, D

pH-Meter:	pH211 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments, IJsselstein, NL
Photopapier	Kodak Biomax Light Film, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Pipetten:	Eppendorf AG, Hamburg, D
Power Supply:	Typ E835, Consort, Turnhout, B
Probengefäße(GC):	1,5 ml Rollrand Probenfläschchen, Glas, mit Bördelkappen und Septum (Perkin Elmer, Shelton, USA)
Probengefäße (HPLC):	2,0 ml Gewindefläschchen, Glas, mit Septen (G8-Sil/gS) und 200 µl-Mikroeinsätzen (G30) (CS-Chromatographie Service, München, D)
Reaktionsgefäße:	Safe-Lock, 1,5 ml und 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, D PP-Röhrchen Natur 12, 15 und 50, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Schüttler:	Typ 3016, GFLmbH, Burgwedel, D Rotamax 120, Heidolph Instruments, Schwabach, D
Trockenschrank:	UT 6200 Heraeus Instruments, Hanau, D
Ultraschallbad:	Sonorex Super Digital, Bandelin electronic, Berlin, D
Spektrophotometer:	Du®530 Life Science, Beckmann Industries, München, D
Vortexer:	VortexGenie 2, Scientific Industries Inc, Bohemia, NY, USA
Waagen:	1603MP und 2442, Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbäder:	Thermo-Temp, mgw, Lauda, D Typ 1083, GFLmbH, Burgwedel, D
Zentrifugen:	Universal 30RF, Hettich AG, Mühlheim a.d. Ruhr, D Sepatech Biofuge A, Heraeus, Düsseldorf, D

HPLC-Systeme:

Pumpen:	L-7100, L-6200, L-6200A, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Säulenofen:	655A-52, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Autosampler:	L-2200, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Interface:	D-7000, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Software:	D-7000-HSM, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Elektrochemischer Detektor:	Coulochem Model 5100A, ESA Inc.; Bedford, MA, USA
Fluoreszenzdetektor:	L-7485, Merck Hitachi, Darmstadt, D
UV/VIS-Detektor:	L-4250, Merck Hitachi, Darmstadt, D
Integrator:	D-7500, Merck Hitachi, Darmstadt, D

Gaschromatographie / Flammenionisationsdetektion:

Clarius 500 PE AutoSystem GC mit eingebautem Autosampler, Perkin Elmer, Shelton, USA
Die Auswertung erfolgt über TotalChrom Navigator Software Version 6.2.1 2003 von Perkin Elmer, Shelton, USA

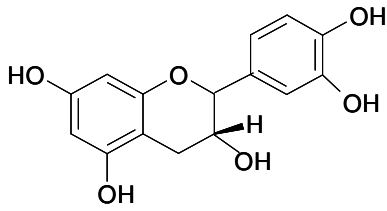
2.2 Nahrungssupplemente, Strukturformeln der Testsubstanzen und Stammlösungen

Nahrungssupplemente für die Interventionsstudien

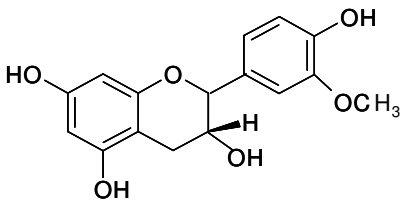
Kakaopulver mit hohem bzw. niedrigem Polyphenolgehalt wurde von Mars Inc. (Hackettstown, NJ, USA) geliefert und lag bereits in wasserdichten Packungen à 18 g (entsprechend einer Dosis) abgepackt vor. Der *Traubenkernextrakt* (TKE) wurde von Eurochem Feinchemie GmbH (Gröbenzell, D) bereitgestellt. Für die Studie wurde der TKE in Hartgelatine-Steckkapseln Gr. 0 verkapselt. Die Flavanon-Tabletten stammen von KAL (Park City, UT, USA), die Öl-Weichgelatine-Kapseln aus dem Institut für Dermatologie in Witten-Herdecke.

Die Zusammensetzungen der einzelnen Supplemente werden in **Kapitel 3.2.1** behandelt.

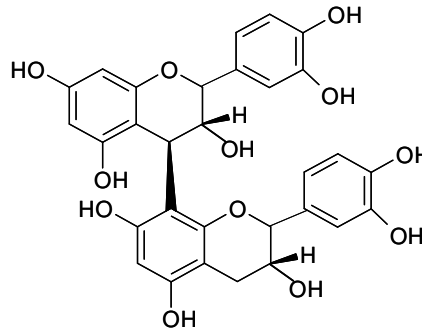
Strukturformeln der Testsubstanzen:



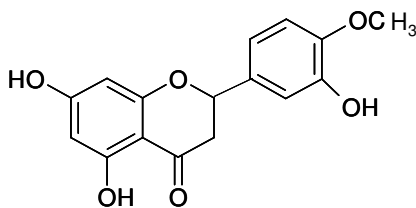
(-)-Epicatechin
(5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan)



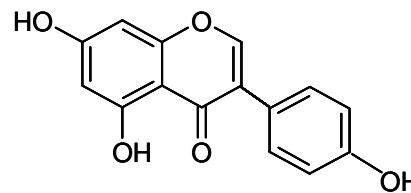
3'-O-Methyl(-)-epicatechin
(5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavan)



Procyanidin B2
[(-)-Epicatechin-(4-β→8)-(-)-Epicatechin]



Hesperetin
(5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavon)



Genistein
(5,7,3'-Trihydroxy-3-isoflavon)

Abb. 2.1: Strukturen der Testsubstanzen der Interventions- und in-vitro-Studien

Stammlösungen:

Tab. 2.2: Molekulargewicht, Lösungsmittel und Konzentrationen der Stammlösungen der in den Studien verwendeten Substanzen

	M_r	Konzentration	Lösungsmittel
HPLC-Analytik			
(+)-Catechin	290,3	3,45 µM	MeOH
(-)-Epicatechin	290,3	3,45 µM	MeOH
3'- <i>O</i> -Methyl-Catechin	320,32	3,12 nM	MeOH
4'- <i>O</i> -Methyl-Catechin	320,32	3,12 nM	MeOH
3'- <i>O</i> -Methyl-Epicatechin	320,32	3,12 nM	MeOH
4'- <i>O</i> -Methyl-Epicatechin	320,32	6,24 nM	MeOH
Procyanidin B2	578,52	3,46 µM	MeOH
Hesperetin	302,3	3,31 µM	MeOH
(+/-)- Naringenin	272,3	3,67 µM	MeOH
GC-Analytik			
FAME-Mischung	-	2-6 %	CHCl ₃
Zellkultur			
(-)-Epicatechin	290,3	40 mM	DMSO
Procyanidin B2	578,52	40 mM	DMSO
3'- <i>O</i> -Methyl-Epicatechin	320,32	40 mM	DMSO
Hesperetin	302,3	40 mM	DMSO
Genistein	270,2	40 mM	DMSO

Alle Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.3 Quantifizierung: instrumentelle Analytik:

2.3.1 Analytik der Flavanole:

2.3.1.1 Probenaufbereitung:

2.3.1.1.1 *Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten*

Enzymatische Hydrolyse

Flavanole liegen im Blut in ihren metabolisierten Formen vor. Um nicht nur die *O*-methylierten Flavanole sondern auch die Glucuronide, Sulfate oder Sulfoglucuronide nachzuweisen, müssen diese erst in ihre freie Form überführt werden. Dazu wird ein 500 µl-Aliquot von frisch aufgetautem Plasma bzw. Erythrozytensuspension mit 1 ml 100 mM Natriumsulfat-Puffer pH 5 gemischt und mit 20 µl β-Glucuronidase/Sulfatase-Gemisch versetzt (entsprechend 2000 bzw. 150 Units Enzym). Die Hydrolyse erfolgt im Wasserbad bei 37°C für 30 min.

Extraktion mit tert-Butylmethylether (TBME)

Die Flavanole werden 1 min mit 6 ml TBME unter Schütteln extrahiert und zur Phasentrennung 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert. 5 ml des organischen Überstandes werden in ein separates Reaktionsgefäß überführt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet, die Reagensgefäßwände werden kurz vor der Trockne mit 1 ml Diethylether gewaschen und erneut abgeblasen. Für die HPLC-Analyse wird der Rückstand in 20 µl Methanol aufgenommen und mit weiteren 100 µl Fließmittel versetzt.

2.3.1.1.2 *Lebensmittelproben: Kakaopulver*

500 mg Kakaopulver werden mit 25 ml Extraktionsmittel (H₂O/MeOH 1:1 v/v) 30 min unter konstantem Rühren extrahiert. Das Gemisch wird nun auf ein Endvolumen von 50 ml gefüllt, 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird weitere 30 min mit 25 ml frischem Extraktionsmittel gerührt, auf 50 ml aufgefüllt und erneut unter

obigen Bedingungen zentrifugiert; man erhält den 2. Extrakt. Die Extrakte werden mit Mikrofiltern (Porengröße 45µm) von Schwebstoffen befreit und unverdünnt einzeln mittels HPLC analysiert.

2.3.1.2 Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

In dem hier verwendeten HPLC-System kann die Detektion sowohl elektrochemisch als auch per Fluoreszenz erfolgen. Die Elution erfolgt isokratisch, wobei das Fliessmittel in einem zirkulierenden System gehalten wird.

Mobile Phase:	2 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 3,0/ACN ; 84/16 ; v/v
Injektionsvolumen:	50 µl
Flussrate:	1 ml/min, isokratisch
Vorsäule:	RP 18e (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Säule:	LiChrospher 100 RP18e, 150 mm x 4,6 mm, 5µM (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Säulenofen:	37 °C
Detektion:	ECD: Schutzzelle: +800 mV, Vorzelle: +100 mV analytische Zelle: +550 mV Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Anregung}}$: 280 nm, $\lambda_{\text{Emission}}$: 310 nm

Die Quantifizierung erfolgt über die externe Standard-Methode. Die Stammlösungen werden in 100 mM Phosphatpuffer pH 5 auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt und mit biologischem Material gemischt, so dass Endkonzentrationen von 0 bis 200 ng/ml erreicht werden. Das Volumen und die Aufarbeitung werden hierbei wie unter 2.3.1.1.1 beschrieben gehalten. Zur Bestimmung des Flavanol-Gehaltes in Lebensmittelproben werden die Arbeitslösungen in 50% MeOH hergestellt und direkt in das System HPLC-System injiziert.

2.3.2 Analytik der Flavanone

2.3.2.1 Probenaufarbeitung

2.3.2.1.1 *Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten*

Enzymatische Hydrolyse

Da sowohl Hesperetin als auch Naringenin nicht frei in Plasma vorliegen, muss der Bestimmung eine Deglucuronidierungs- bzw. Desulfatierungsreaktion voran gehen. Dazu wurde eine Modifikation der Routinemethoden von Erlund und Matsumoto verwendet [68,144]. Die Inkubationsansätze enthalten jeweils 500 µl frisch aufgetautes Plasma, 500 µl Phosphatpuffer (100 mM pH 6,0) und 20 µl β -Glucuronidase/Sulfatase (entsprechend 2000 bzw. 150 Units Enzym). Die Reaktionsdauer beträgt 2h (37°C im Wasserbad).

Reinigung und Aufkonzentration:

Die Aufreinigung der freien Flavanone mittels Festphasenextraktion (SPE) dient dazu, Störungen durch Plasmabestandteile in der nachfolgenden HPLC-Analytik zu vermeiden. C18-Umkehrphase-Kartuschen (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) werden mit 3 ml MeOH aktiviert, mit 3 ml Kalium-Phosphatpuffer (70 mM pH 2,5) equilibriert und mit dem Inkubationsansatz versehen. Zur Erhöhung der Fliessgeschwindigkeit wird hier mit einer SPE-Pumpe ein Vakuum erzeugt. Anschließend wird mit 6 ml des Puffers und 1 ml dest. H₂O gewaschen, um die Salzkonzentration zu verringern. Die Elution erfolgt mit 3 ml MeOH in ein separates Plastikröhrchen. Die Probe wird nun unter Stickstoff eingedampft, die Wände des Röhrchens mit Diethylether gespült und erneut eingedampft.

Das trockene Konzentrat wird unmittelbar vor der Analyse mit 100 µl FM aufgenommen. Im Falle der Erythrozytenaufarbeitung wird der Rückstand nach Redispersion vor der Analyse mit 1 ml TBME extrahiert, erneut eingedampft und in 100 µl FM aufgenommen.

2.3.2.1.2 *Nahrungssupplemente (Interventionsstudie III)*

Enzymatische Deglykosidierung zur Bestimmung des Hesperetin- und Naringenin-Gehaltes in den eingesetzten Supplementen

Die Zitrusfrucht-Tabletten werden gemörsert und jeweils 100 mg des Pulvers mit 50 ml Enzymlösung versetzt. Für die Deglykosidierung wurden folgende Enzymlösungen eingesetzt: 2 mg Hesperidinase /ml 5 mM Tris pH 3,8 (entsprechend 2 mU/ml) und 2 mg Naringinase / ml 5 mM Tris pH 4,0 (entsprechend 0,6 U/ml). Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 40°C im Wasserbad. Anschließend werden die Inkubationsansätze bei 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Messung erfolgt direkt aus dem filtriertem Überstand (45µm Porengröße).

2.3.2.2 RP-HPLC-Analytik der Flavanone:

Mobile Phase: 70 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2.4/ACN/TFA ; 70/30/0,1; v/v/v
Injektionsvolumen: 50µl
Flussrate: 0,8 ml/min, isokratisch
Säule: Suplex pKb100, Länge: 25 cm x 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
Detektion: UV-metrisch, $\lambda=280$ nm

2.3.3 Bestimmung des Fettsäuremusters

2.3.3.1 Fettsäureextraktion

2.3.3.1.1 *Biologisches Material: Plasma und Erythrozyten*

Extraktion aus Plasma:

Die Probenaufbereitung erfolgt nach einer Modifikation der Methode von Folch et al. [145]. Hierbei werden 500 µl frisch aufgetautes Plasma in einem Reaktionsgefäß aus Glas mit Schraubverschluß und Teflondichtung mit 5 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung [2:1 v/v; 200 mg/l BHT als Antioxidanz]. Der Ansatz wird 45 min bei 37°C auf dem Schwenkwasserbad gehalten. Nach Zugabe von 1,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung wird 5 min bei 4000 rpm / 4°C zentrifugiert, die untere Phase mit einer Glaspipette entnommen und mit 500 µl MeOH/NaCl 0,9%/CHCl₃ 48/47/3 v/v/v gewaschen.

Extraktion aus Erythrozyten:

500 µl frisch aufgetaute Erythrozytensuspension werden mit 2,5 ml MeOH homogenisiert und mit 2,5 ml CHCl₃/BHT [200 mg/l BHT] bei Raumtemperatur konstant gemischt. Die lipophile Phase wird mit einer Glaspipette abgetrennt und der Zellrückstand mit weiteren 3 ml des CHCl₃/BHT-Gemisches extrahiert. Die Phasen werden durch Zentrifugation bei 2000 rpm / 4°C für 5 min getrennt, die lipophilen Phasen vereinigt und anschließend mit 1 ml NaCl [0,9 % w/v] gewaschen.

2.3.3.1.2 *Nahrungssupplemente*

Kakaopulver (Interventionsstudie I und III)

500 mg des Kakaopulvers werden in einem Glasröhrchen mit 4 ml Diethylether 20 min bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 5000 rpm / 15°C wird der etherische Überstand abpipettiert und in ein austariertes Glasröhrchen überführt. Die Extraktion wird zweimal wiederholt und die Phasen vereint.

Öl-Weichgelatine- Kapseln (Interventionsstudie II)

Vor der Extraktion wird das Gewicht der Kapseln bestimmt. Anschließend wird die Kapselhülle mit einem Skalpell zerstört und der Inhalt mit Hexan extrahiert; aus der Tara der leeren Kapselhülle errechnet sich die eingesetzte Ölmenge.

2.3.3.2 Basenkatalysierte Transmethylierung zur Herstellung von FAME

Die jeweiligen lipophilen Extrakte werden unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eindampft. Die Transmethylierung erfolgt in Anlehnung an Eder et al. [146] in einem Glasröhrchen mit Schraubverschluß unter H₂O-Ausschluss. Dazu wird Natriummethylat in zuvor mit Natriumsulfat getrocknetem MeOH gelöst, so dass eine 3%ige Lösung entsteht. Die trockenen Extrakte werden mit 3 ml Transmethylierungs-Reagens versetzt und für 1,5 h bei 60°C inkubiert, wobei sie alle 20 min durchmischt werden. Danach wird das Gemisch durch Zusatz von 1 ml 0,25 M HCl neutralisiert und die Fettsäure-Methylester (FAME) 2 mal mit je 3 ml Hexan extrahiert und auf ein Endvolumen von 350 µl eingengt. Das Konzentrat wird in Probengefäße überführt und kann nach Versiegelung mit einer Metallkappe mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

2.3.3.3 Gaschromatographie – Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Trärgas:	N ₂ ; Geschwindigkeit 14 cm/s (linear)
Säule:	50 %-Cyanopropylmethyl-50 %-phenylmethylpolysiloxan, 320 µm / 30 m
Injektionsvolumen:	2 µl (Plasma und Nahrungssupplemente); 3 µl RBC-Proben
Split:	1:10
Injektortemperatur:	230°C
Temperaturprogramm:	120°C → 160°C (20°C/min konstant) 160°C → 220°C (1°C/min konstant; 23 min final hold)
Detektortemperatur:	260°C

Die Peak-Identifizierung erfolgt über eine standardisierte FAME-Mischung; der relative Gehalt an FS wird durch Integration der Peakfläche und anschließender Division durch die Fläche aller detektierbaren Peaks ermittelt (100 % - Methode).

2.4 Interventionsstudien

2.4.1 Allgemeine Anforderungen an die Teilnehmer

An den folgenden Studien nahmen Probanden im Alter von 18-65 Jahren mit einem BMI von 18-25 kg/m² teil. Alle Probanden wiesen einen guten allgemeinen Gesundheitszustand auf. Ausschlusskriterien waren Rauchen, Malabsorption, pathogener Lipidstoffwechsel, Lebererkrankungen, Photosensibilität, kardiovaskuläre Erkrankungen, Einnahme von Medikamenten, die das Ergebnis der Studie beeinflussen könnten, Einnahme von Vitaminen und Nahrungssupplementen, sowie Schwangerschaft und Stillzeit. Die Probanden wurden angewiesen, während den Studien ihre normalen Eßgewohnheiten beizubehalten und UV-Exposition (Sonnenbäder und Solarien) zu vermeiden. 24 h vor den Blutentnahmen und/oder Messungen der Hautparameter wurde auf flavonoid- und lipidreiche Nahrung verzichtet, sowie 12 h vorher gefastet.

Die Probanden von Studie I und II wurden vom Dermatologischen Institut in Witten-Herdecke rekrutiert. Die Probanden der Studie III waren Freiwillige des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I der Universität Düsseldorf.

Alle Probanden erhielten detaillierte Informationen über den Ablauf der Studie und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.4.2 Gewinnung und Präparation von Plasma und Erythrozyten

Zur Blutentnahme wurde einheitlich das Vacutainer®-System (Becton Dickinson, Plymouth, UK) in Kombination mit 10 ml ETDA-beschichteten Plastikröhrchen (S-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht, D) verwendet. Die Blutproben wurden unmittelbar nach Entnahme 10 min bei 5000 rpm / 4°C zentrifugiert und die oberen 2/3 des Plasmaüberstandes, sowie die unteren 2/3 des Blutkuchens in PP-Röhrchen überführt. Die Zellwände der Erythrozyten werden durch wiederholtes Einfrieren/Auftauen gesprengt, so dass eine homogene Zellsuspension entsteht. Das Probenmaterial wird bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.4.3 Polyphenolstudie: hoher vs. niedriger Polyphenol-Gehalt – Einfluß auf Hautqualität und Sonnenschutz (Interventionsstudie I)

2.4.3.1 Studiendesign

Einzel dosis-abhängiger Einfluss auf die Mikrozirkulation der Haut

An dieser Studie nahmen 10 Probanden mit gesunder Haut des Typs II nach Fitzpatrick und Pathak [147] im randomisierten *Cross-over*-Design teil. Zu Beginn der Studie (t₀) wurde eine erste Blutprobe entnommen und die Mikrozirkulations-Parameter Sauerstoffsättigung der Haut (S-O₂), relative Hämoglobinkonzentration (rHb), Blutfluss (BF) und –geschwindigkeit (BV) in 1 mm und 8 mm Hauttiefe bestimmt. Danach verzehrten jeweils 5 Personen eine Portion (18 g Kakaopulver in 100 ml heissem Wasser) Kakao mit hohem (HP) bzw. niedrigem (LP) Polyphenolgehalt (detaillierte Zusammensetzung siehe **Tab.3.1**). Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 6 h wurde erneut eine Blutprobe entnommen sowie die vier Hautmessungen durchgeführt. Nach Einhaltung einer Ausschwemmphase von 14 Tagen wurde der Versuch wiederholt, so dass jeder Proband sowohl das Kakaoprodukt mit dem hohen als auch mit dem niedrigen Polyphenol(PP)-Gehalt in einem unabhängigen Experiment eingenommen hatte.

Einfluss von täglicher Kakaopolyphenol-Einnahme auf dermatologische Größen und Photoprotektion

Um den Effekt einer täglichen Einnahme von Polyphenolen aus Kakaopulver zu untersuchen, konsumierten jeweils 12 Probanden mit gesunder Haut des Typs II nach Fitzpatrick und Pathak [147] über einen Zeitraum von 12 Wochen täglich eine Portion Kakaopulver. Dabei erhielt eine Gruppe 18 g Kakaopulver mit hohem (HP-Gruppe), die Kontrollgruppe 18 g mit niedrigem (LP-Gruppe) PP-Gehalt. Mit Ausnahme der Messtage erfolgte die Einnahme morgens zu einer Mahlzeit, das Kakaopulver wurde in 100 ml heissem Wasser gelöst. Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen wurden folgende, mit Photoprotektion und Hautzustand in Verbindung stehende Parameter gemessen: Sensitivität gegenüber UV-Exposition, Hautstruktur und –textur, Hydratation, transepidermaler Wasserverlust, Elastizität, Haaranalyse

und Mikrozirkulationsgrößen (S-O₂, rHb, BF, BV) in 1 mm und 8 mm Hauttiefe; zeitgleich wurden Blutproben entnommen.

2.4.3.2 Messung der Hautparameter

Sensitivität gegenüber UV-Exposition – MED

Vor Studienbeginn wurde für jede Testperson mit Hilfe eines Sonnenlichtsimulators (Sol 3, Hönle, München, D) die minimale Dosis ermittelt, bei der Erythembildung auftritt (MED). Zu den Testzeitpunkten wurde dorsale Haut (Schulterregion) mit 1,25-facher MED bestrahlt und die Hautfarbe vor, sowie 24 h nach Bestrahlung (Erythemmaximum) in einem 3-dimensionalen Farbsystem (*L*, *a*, *b*-Werte) chromametrisch gemessen (Chromameter CR 300 Minolta, Ahrensburg, D). Die *L*-Werte geben Auskunft über Helligkeit der Haut, die *b*-Werte (Blau/Gelb-Achse) sind abhängig vom Pigmentierungsgrad. Mit Hilfe der *a*-Werte (Rot/Grün-Achse) ist die Quantifizierung der Hautantwort auf UV-Bestrahlung möglich, sie stellen ein Maß für Erythembildung dar und werden als differentielle Werte angegeben (*a*-Wert nach – *a*-Wert vor Bestrahlung).

Parameter der Mikrozirkulation – kutaner und subkutaner Blutfluss

Die Messgrößen Sauerstoffsättigung (S-O₂), relative Hämoglobinkonzentration rHb, peripherer Blutfluss (BF) und Flussgeschwindigkeit (BV) wurden mit Hilfe des O₂C-Systems (Lea Instruments, Giessen, D) bestimmt, einer Kombination aus Laserlicht und Weißlicht. Die Messung wurde so konzipiert, dass mit einer Glasfasersonde die Durchblutungsparameter zeitgleich in zwei getrennten Schichten (1 und 8 mm) tiefenselektiv in einer Messung bestimmt werden können. Die Bestimmung von BV und BF basieren auf dem Doppler-Effekt, wobei durch Erythrozytenbewegung eine Verschiebung in der Frequenz des detektierten Laserlichts entsteht; mit steigender Erythrozytenzahl nimmt das Signal zu. Die Determination von rHb und S-O₂ erfolgt photometrisch simultan über dieselbe Sonde. Die S-O₂ wird in %, alle anderen Messgrößen werden in AU (*arbitrary units*) angegeben.

Physiologie: Struktur und Textur der Haut

Zur Bestimmung der Hautdicke und -dicke wurde ein Hochfrequenz Ultrasound B-Scan (20 MHz) mit 2-D-Konfiguration (Derma Scan C, Cortex Technology, Dänemark) eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht die nicht invasive Differenzierung einzelner Gewebestrukturen. Den verschiedenen Echoamplituden werden 256 Falschfarben zugeordnet, dabei entsprechen helle Farben einer hohen und dunkle Farben einer schwachen Reflektion (dargestellt in Pixeln). Geringe Unterschiede im Reflektionsverhalten von Geweben können so sichtbar gemacht werden. Die Charakterisierung der Oberflächenprofile erfolgte über die SELS-Methode (*Surface Evaluation of Living Skin*, Visioscan, Courage & Khazaka Electronics, Köln, D), welche auf der graphischen Darstellung lebender Haut unter Speziallicht, sowie elektronischer Verarbeitung und Analyse des Bildes basiert. In einem definierten Testfeld werden die Parameter Rauigkeit, Schuppung, Glätte und Faltigkeit ermittelt. Die Darstellung erfolgt in AU (arbitrary units) [36,148].

Elastizität

Elastizitätsmessungen wurden mit dem Cutometer (Courage & Khazaka Elektronik, Köln, D) durchgeführt. Es besteht aus einer mikroprozessorgesteuerten Pneumatik mit elektronischer Messungsvorrichtung sowie einer Spezialmesssonde. Die Haut wird während der Messung durch Unterdruck in eine Öffnung der Mess-Sonde gezogen. Dabei wird die Eindringtiefe der Haut in die Öffnung durch ein optisches Meßsystem berührungslos erfasst. Die Ansaugphase wird durch den Parameter R6 (viskoelastische Eigenschaften) und die Rückbildungsphase durch den Parameter R7 (biologische Elastizität) wiedergegeben.

Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) und Hauthydratation

Der TEWL wurde mit Hilfe eines TEWA-Meters (TM 300, Courage & Khazaka Electronics, Köln, D) bestimmt und in g/hm^2 angegeben, wobei die Wasserverdunstung als Maß für die Barrierefunktion der Haut direkt an der Hautoberfläche mittels einer Spezialsonde gemessen wird [149]. Die Hauthydratation wurde corneometrisch gemessen (Corneometer CM 825, Courage & Khazaka Electronics, Köln, D). Hierbei wird in relativen Messeinheiten (AU) mittels einer kapazitiven Methode die Hautfeuchtigkeit bestimmt.

Haaranalyse (Trichoscan)

Die Trichoscanmethode kann als Modifikation des klassischen Trichogramms angesehen werden. Hierbei werden zunächst auf einem kleinen Kopfhautareal von ca. 2 cm² die Haare mittels einer Lochschablone gekürzt. Nach 3 Tagen werden die gekürzten Haare angefärbt und ein Videobild in 20-facher Vergrößerung gespeichert. Mittels einer entsprechenden Software werden automatisch die Anzahl der Haare und die Anagen-/Telogenhaare berechnet.

2.4.4 Lipidstudie: Einfluss ω -3-reicher und ω -3-armer Nahrungssupplemente auf sensitive Haut (Interventionsstudie II)

2.4.4.1 Studiendesign

An dieser Doppelblind-Studie nahmen 26 weibliche Personen im Alter von 18-65 Jahren teil. Alle Probanden wiesen trockene, sensitive Haut auf. Die Gruppe A konsumierte über einen Zeitraum von 12 Wochen täglich vier Weichgelatine kapseln mit ca. 560 mg Leinsamenöl, die Gruppe B erhielt dagegen eine angegliche Menge Kapseln mit ca. 560 mg Distelöl. Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen wurden die Parameter Hydration, TEWL, Textur und nicotinat-induzierte Erythembildung bestimmt, sowie Blutproben entnommen. Die Probanden wurden angehalten, das Supplement an den Versuchstagen im Anschluss an die Messungen einzunehmen.

2.4.4.2 Messung der Hautparameter

Die Messung der Parameter Hydration, TEWL und Oberflächenstruktur (SELS-Verfahren) erfolgt wie in **Kapitel 2.4.3.2** beschrieben.

Um die Sensitivität der Haut weiter zu charakterisieren, wurde ein Nicotinat-Test durchgeführt; hierbei werden 5 μ l/cm² 0,25 %ige Nicotinatlösung auf den Unterarm der Probanden appliziert und die Erythembildung nach einer definierten Zeit chromametrisch gemessen (Chromameter CM300, Minolta, Ahrensburg, D). Als zusätzliches Maß für die Erythembildung wird der kapillare BF bestimmt.

2.4.5 PAT-Studie: Einfluss von Flavonoiden auf die Vasodilatation während reaktiver Hyperämie (Interventionsstudie III)

2.4.5.1 Studiendesign

Die Studie wurde mit 4 weiblichen Probanden durchgeführt, zwischen den Testtagen lagen mindestens zwei Wochen. Zu Beginn des Testtages wurde den Probanden eine Blutprobe entnommen, sowie Puls und Blutdruck (BD) und PAT-Index (*Peripheral Arterial Tonometry*) bestimmt. Danach konsumierten sie entweder 36 g Kakaopulver mit hohem (HP) Polyphenolgehalt, 5 Zitrusfrucht-Tabletten, 5 Traubenkernextrakt-Kapseln mit jeweils 200 ml Wasser beziehungsweise reines Wasser (Kontrolle). Zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 6 h wurden erneut Blutproben entnommen, sowie Puls, BD und PAT-Index bestimmt.

2.4.5.2 Bestimmung des periphären arteriellen Tonus als Antwort auf reaktive Hyperämie (RH)

Um Störungen des Meßsignales durch sympathische Aktivität zu vermeiden, werden die Probanden während des gesamten Studientages in liegender Position gehalten, beginnend 30 min vor der ersten Messung zur Akklimatisierung. Mindestens 20 min vor jeder Messung wird eine dorsale Position eingenommen und sichergestellt, dass Arme und Beine frei, in waagerechter Position liegen. Die Raumtemperatur wird während der Studie konstant gehalten. Die periphere arterielle Tonometrie ist eine Form der Okklusions-Plethysmographie und wird mit dem ENDO-PAT (Itamar Medical Inc., Cesarea, Israel) bestimmt. Sie spiegelt Veränderungen oder Anomalien der endothelialen Gefäßfunktion. Zu Beginn der Messung wird eine Blutdruckmanschette um den Unterarm des Messarmes gelegt; die Mittelfinger werden über inflatable Messsonden mit dem ENDO-PAT verbunden. Nach 10-minütiger Ermittlung der Basislinie wird die Manschette für exakt 5 min auf mindestens 30 mmHg über dem systolischen BD gepumpt. Nach der Deflation kommt es durch das einströmende Blut zu reaktiver Hyperämie, das Signal wird weitere 5 min aufgezeichnet. Der PAT-Index wird berechnet als Bruch der durchschnittlichen Amplitude (*PWA, Pulse Wave Amplitude*) des PAT-Signals über ein Zeitintervall von 1 Minute, beginnend 1 Minute nach Deflation, geteilt durch die durchschnittliche Amplitude des PAT-Signals über ein 3,5-Minuten-Intervall vor

Okklusion (Basislinie). Danach wird der PAT-Index-Wert durch den des Kontrollarmes normalisiert.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Charakteristika der Zell-Linie

Alle Versuche wurden mit murinen Aorta-Endothel-Zellen (MAEC) bis Passage 29 durchgeführt; die Zellen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Kolb-Bachhofen (Immunologie der Hautklinik Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Anzucht und Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in einer gesättigten Wasserdampf-Atmosphäre und unter 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot kultiviert, dem 20% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) zugefügt wurden. In speziellen Kryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden unmittelbar nach dem Auftauen in Kulturflaschen überführt, wobei der Dimethylsulfoxid(DMSO)-Gehalt (10% im Einfriermedium) auf unter 1% gebracht wird, um Membranschäden zu vermeiden. Nach 4 Stunden erfolgt erneut ein Mediumwechsel, im weiteren Versuchsverlauf wird das Medium alle 3-4 Tage gewechselt. Nach Erreichen von ca. 80% Konfluenz werden die Zellen 1:10 passagiert. Hierfür werden sie nach Entfernung des Mediums mit PBS gewaschen und mit Trypsin (33% in PBS) 5 min inkubiert, bis sie sich vollständig von den Kulturflaschen gelöst haben. Danach wird die Trypsinaktivität mit dem 2,5-fachen Volumen an Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und in neue Zellkulturgefäße überführt.

2.5.3 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen mit den Testsubstanzen wurden über einen Zeitraum von 3, 12 und 24 h in 35 mm-Zellkulturschalen durchgeführt. 24 h vor Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die konfluenten Zellen mit einem FCS-freien Medium inkubiert, um die durch das FCS erhöhte Grundkommunikation zu erniedrigen. Die Stammlösungen (siehe **Tab. 2.2**) werden um den Faktor 1000 in FCS-freiem Medium unmittelbar vor Inkubationsbeginn verdünnt; als Kontrolle dient Medium mit einem DMSO-Gehalt von 0,1%.

2.5.4 Zellviabilitätsbestimmung mittels MTT-Test

Im MTT-Test wird die Aktivität einer mitochondrialen Dehydrogenase bestimmt. Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid) wird nur von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien mit NADH zu blauvioletten Formazan-Kristallen reduziert. Die Bildung des Farbstoffes ist direkt proportional zum Anteil lebender Zellen.

Um die Viabilität der MAEC unter den gegebenen Inkubationsbedingungen zu kontrollieren, werden diese in 24-well-Kulturplatten wie in **Kapitel 2.5.2** beschrieben kultiviert. Nach Absaugen des Inkubationsmediums und Waschen mit PBS werden die Zellen mit jeweils 500 µl MTT-Lösung [10% 0,5%ige (w/v) MTT-PBS-Lösung in FCS-freiem Komplettmedium] für 2 h im Inkubationsschrank gehalten. Nach Absaugen der Reaktionslösung und Resuspendierung in 500 µl DMSO wird die Intensität der Blaufärbung photometrisch bei 700 nm quantifiziert, wobei der von Schwebstoffen ausgelöste Fehler durch die Absorption bei 570 nm subtrahiert wird:

$$A_{\text{ges}} = A_{700} - A_{570}$$

2.5.5 Kommunikations-Test: Farbstoff-Transfer-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Mikroinjektion eines Fluoreszenzfarbstoffes angewandt. Über das Ausmaß der Diffusion des injizierten Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow CH (siehe **Abb. 2.2**) über Zell-Zell-Kanäle von der injizierten Zielzelle zu den Nachbarzellen lässt sich eine Aussage über den Kopplungsgrad des Zellverbandes bzw. die relative Zahl geöffneter Gap Junctions ableiten. Die

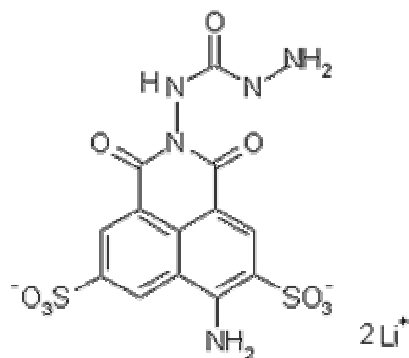


Abb. 2.2:

Struktur von Lucifer Yellow

Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow CH liegt bei 426 nm und das Emissionsmaximum bei 540 nm. In der hier eingesetzten Konzentration ist der Farbstoff nicht zytotoxisch. Die Messung der Zell-Zell-Kommunikation wird mittels einer Gerätekombination aus Fluoreszenzmikroskop, Mikromanipulator und Mikroinjektor durchgeführt. Die intrazelluläre Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes (10% in 0,33 M Lithiumchlorid) erfolgt mit Hilfe von Femtotips; dabei entspricht bei einem

Injektionsdruck von 50 hPa und einer Injektionsdauer von 0,5 s ein Injektionsvolumen von 50-200 fl. Für jede Messreihe werden jeweils 10 Zellen pro Kulturschale zufällig für die Injektionen ausgewählt. Die Anzahl der benachbarten, fluoreszierenden Zellen 10 s nach der Injektion stellt ein direktes Maß für die interzelluläre Kommunikation dar (siehe **Abb. 2.3**) [150]. Aus den 10 Einzelmessungen wird der arithmetische Mittelwert (+/- SD) ermittelt; die Messungen werden 3-mal wiederholt.

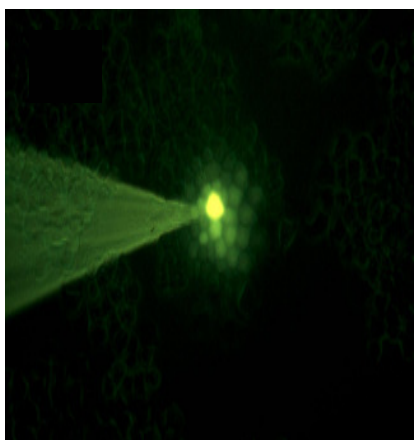


Abb. 2.3: *Farbstoff-Transfer-Assay: Mikroskopisches Bild der Injektion von Lucifer Yellow in eine Zelle*

2.5.6 Western-Blot-Analytik

2.5.6.1 Herstellung der Zell-Lysate

Nach Abschluss der Inkubation mit den Testsubstanzen wird das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie mit 100 µl SDS versetzt, mit einem Zell-Schaber mechanisch gelöst und in ein verschließbares Eppendorf-Plastikgefäß überführt. Alle Schritte werden auf Eis durchgeführt, die Zell-Lysate werden bei -80°C gelagert.

2.5.6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach Ultraschallbehandlung mittels des „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad, München, D) nach Lowry et al. 1951 gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers.

2.5.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die unter denaturierenden Bedingungen stattfindende Auftrennung von Proteinen erfolgt in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen bei maximal 40 mA pro Minigel.

Folgende Lösungen wurden eingesetzt:

Trypan-Blau-Lösung:

40 %	MeOH (v/v)
2 %	Eisessig (v/v)
0,2 %	Trypan Blau (w/v)

Trypan-Blau-Entfärbelösung:

50 %	MeOH (v/v)
7 %	Eisessig (v/v)
43 %	H ₂ O

Sammelgel (5% Polyacrylamid):

70,6 %	H ₂ O (v/v)
13 %	1 M Tris pH: 6,8 (v/v)
1 %	10 % SDS (w/v)
14,8 %	RPG (v/v)
0,1 %	TEMED (v/v)
1 %	10 % APS in H ₂ O (v/v)

Trenngel (10% Polyacrylamid):

48 %	H ₂ O (v/v)
25 %	1,5 M Tris pH: 8,8 (v/v)
1 %	10 % SDS (w/v)
25 %	RPG (v/v)
0,04 %	TEMED (v/v)
1 %	10 % APS in H ₂ O (v/v)

SDS-Laufpuffer:

50 mM	Tris
384 mM	Glycin
0,1 %	SDS (w/v)

Herstellung der Minigele:

Nach Mischen des Trenngels wird dieses zügig in eine Gelkassette überführt und mit H₂O überschichtet, um es vor Oxidation zu schützen. Nach Abschluß der Polymerisierungsreaktion wird es mit frisch hergestelltem Sammelgel überschichtet. Die polymerisierten Gele sind mehrere Tage bei 4-8°C haltbar.

Die Proben werden mit 5 µl Proteinmarker/DTT versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wird das Gel mit je 20 µg Protein beladen. Die Auftrennung erfolgt über 2-3 h bei 25 mA/Gel im Sammelgel und 40 mA/Gel im Trenngel.

Um die Gleichmäßigkeit der Proteine zu überprüfen, wird das Gel mit Trypan-Blau-Lösung angefärbt und durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung wieder entfärbt.

2.5.6.4 Semi-Dry-Blotting

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem SDS-PA-Gel mittels Semi Dry Blotting auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) übertragen. Dazu wurde die Membran zur Aktivierung in H₂O gelegt und mit Anodenpuffer 1 befeuchtet.

Gel und Membran werden nun nach dem in **Abb. 2.4** abgebildeten Schema sandwichartig in Filterpapier (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) welches als Ionenreservoir dient, gelegt und von den Elektroden eingerahmt. Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.



Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Semi-Dry-Blotting-Aufbaus

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris
10 % MeOH (v/v) pH: 10,4

Anodenpuffer 2:

50 mM Tris
200 mM Glycin
10 % MeOH (v/v) pH: 10,4

Kathodenpuffer:

25 mM Tris
40 mM Glycin
10 % MeOH (v/v) pH: 9,4

TBST:

50 mM Tris
150 mM NaCl

Der Transfer findet 2 h lang bei 60 mA/Gel statt; als Kontrolle für einen erfolgreichen Proteintransfer dient eine reversible Anfärbung der Proteinbanden mit Ponceau S [0,1% Ponceau S (w/v) in 5% Essigsäure (v/v)].

2.5.6.5 Immunologischer Nachweis von Connexin43 und eNOS

Nach Waschen mit TBST wird die Membran über Nacht in 5%iger Blocklösung [Magermilchpulver in TBST (w/v)] bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wird nun die Membran für 1,5 h bei RT mit primärem Antikörper (rabbit anti-Cx43) [1:2000 (v/v) in 1% Magermilchpulver in TBST (w/v)] inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 20 min, um unspezifisch gebundene Erstantikörper zu entfernen, erfolgt die Inkubation mit Meerrettichperoxidasegekoppeltem anti-rabbit-sekundärem Antikörper [(1:10000 (v/v) in 1% Magermilchpulver in TBST (w/v)] für 1,5 h. Nach sorgfältigem Waschen mit TBST wird die Membran in eine Folie eingeschweißt und die gebundenen Antikörper über Chemilumineszenz (Super Signal® West Femto Substrate, nach Angaben des Herstellers) durch Auflegen eines Filmes nachgewiesen. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößen (Connexin: 43 kDa, eNOS: 135 kDa) kann im Anschluss ein Nachweis von endothelialer NO-Synthase erfolgen, ohne dass ein „strippen“ notwendig ist. Die Durchführung erfolgt wie für Connexin43 beschrieben; primärer mouse-anti-eNOS/NOS Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000, sekundärer goat anti-mouse Antikörper 1:10000 eingesetzt Antikörper [(v/v) in 1% Magermilchpulver in TBST (w/v)].

2.5.6.5 Ladungskontrolle

Ungleichmäßige Proteinmengen können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Um einen gleichmäßigen Proteinanteil in den Proben sicherzustellen, wird die Proteinmenge über einen immunologischen Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Nach Entfernen („strippen“) der Membran mit Strip-Puffer [1% Tween 20 (v/v), 0,1% SDS (w/v) in H₂O pH: 2,2] für 2,5 h und erneutem Blocken mit 5% Magermilchpulver (v/v) in TBST wird verfahren wie unter 2.5.6.5 beschrieben. Als primärer Antikörper wird hierbei mouse-anti-GAPDH [(1:2000 (v/v) in 1% Magermilchpulver in TBST (w/v)], als sekundärer goat-anti-mouse [(1:20000 (v/v) in 1% Magermilchpulver in TBST (w/v)] eingesetzt.

2.5.7 Immunocytochemischer Nachweis von Connexin43

Zellen wurden in 6-well-Kulturplatten, die mit frisch sterilisierten, runden Deckgläschen ausgestattet waren, wie unter 2.5.3 beschrieben behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen in -20°C kaltem MeOH 10 min fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen werden nun mit Blocklösung [3% Ziegennormalserum (v/v) und 0,3% Triton X-100 (v/v) in PBS] für 45 min bei RT behandelt. Anschließend wird der primäre Antikörper rabbit-anti-Connexin43 [1:1500 in PBS mit 1% Ziegennormalserum] über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS wurden die fixierten Zellen mit sekundärem Antikörper Alexa 546 goat-anti-rabbit IgG [1:800 in PBS] für 45 min bei 37°C inkubiert. Sie wurden erneut mit dem PBS dreimal je 5 min gewaschen, mit einem Tropfen Immunomount auf einem Objektträger befestigt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.5.8 DAPI-Färbung

Um die Wirkung der Substanzen auf den Zellkern der MAEC zu beobachten, wurden die Zellen vor dem Fixieren auf dem Objektträger mit ca. 1 ml DAPI-Lösung [0,5 mg/ml in PBS, v/v] für 5 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben weiter verfahren.

2.6 Denitrosierung von S-Nitrosoglutathion: in-vitro Effekt von Epicatechin

S-Nitrosoglutathion (GSNO) dient als endogener Speicher für Stickstoffmonoxid (NO). Vasodilatatorische Effekte einer Substanz könnten auf der Freisetzung von NO durch eine Denitrosierung von GSNO beruhen; um diesen möglichen Mechanismus der gefäßerweiternden Wirkung von Epicatechin zu untersuchen, wurde die Stabilität von GSNO in Anwesenheit von Epicatechin im Vergleich zu $\text{Fe}^{2+/3+}$ und Ascorbat untersucht. Für diese zwei Substanzen wurde eine Modulation der Bioaktivität von GSNO gezeigt, sie führten zu einem erhöhten Abbau von GSNO. Als Kontrolle wurde der unspezifische Eisen-Chelator Deferoxamin (DFOA) verwendet.

Synthese von GSNO:

Die Synthese erfolgte unmittelbar vor den Inkubationsversuchen nach einer Standardmethode von Methews und Kerr [11].

500 μl einer Glutathionlösung [20 mM in 0,1 N HCl] wurden mit 500 μl NaNO_2 -Lösung [20 mM in H_2O] 5 min bei RT inkubiert und mit 175 μl 0,1 N NaOH neutralisiert. Der Ablauf der Reaktion wurde photometrisch bei $\lambda=330$ nm überprüft (Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{\text{GSNO};330} = 767 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); die Reaktionsgleichung ist in **Abb. 2.4** zu sehen. Für die Inkubationen wurde der Reaktionsansatz mindestens 1:100 mit 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH= 7 verdünnt.

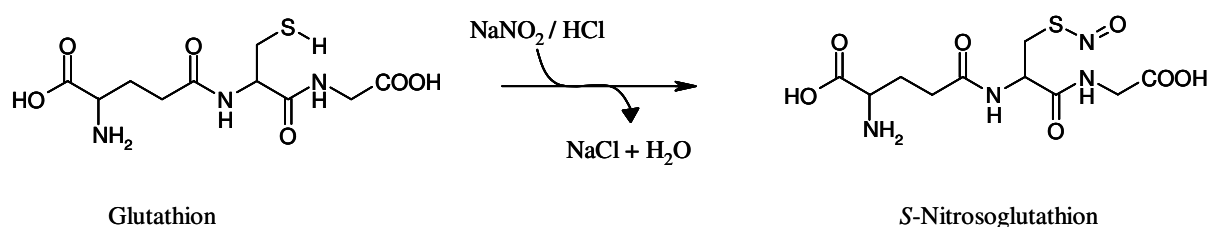


Abb. 2.5: Reaktionsgleichung der Synthese von S-Nitrosoglutathion (GSNO) aus Glutathion und Natriumnitrit

Inkubationsansätze:

Die Inkubationen erfolgten bei 37°C im Wasserbad. Es wurden jeweils 400 µl GSNO-Lösung [10 µM in 10 mM Phosphatpuffer pH=7] mit 400 µl Inkubationslösung [Epicatechin, FeCl₃/FeSO₄, Ascorbinsäure oder DFOA in 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer pH= 7] versetzt, so dass folgende Endkonzentrationen entstanden:

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Versuches zur GSNO-Stabilität

GSNO	Puffer	Epicatechin	Fe ^{2+/3+}	Ascorbat	DFOA
10 µM	10 mM	170 µM	50 µM	114 µM	151 µM
+	+	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-
+	+	+	+	-	-
+	+	+	-	+	-
+	+	-	+	-	-
+	+	-	-	+	-
+	+	-	-	-	+

Der Verlauf des GSNO-Zerfalls wurde mittels HPLC verfolgt. Dazu wurde zu den Zeitpunkten 0, 17 und 34 min jeweils eine Probe entnommen und unverdünnt in das u. a. System injiziert.

HPLC-Parameter:

Mobile Phase: 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,5 /
0,1 % Trifluoressigsäure / 6 % MeOH ; v/v/v

Injektionsvolumen: 50 µl

Flussrate: 1 ml/min, isokratisch

Vorsäule: RP 18e (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland)

Säule: RP C30 4,6 x 250 mm, YMC-carotenoid (YMC Ltd., Japan)

Detektion: UV-metrisch, λ= 236 nm

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt durch Berechnung der Mittelwerte, relativen Standardabweichungen, Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveaus. Die Standardabweichungen werden entsprechend der Kennzeichnung mit \pm SD (*standard deviation; Standardabweichung*) bzw. \pm SEM (*standard error of means; Standardfehler des Mittelwertes*) angegeben. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Berechnung des Signifikanzniveaus p mit Hilfe des Student's t-Test; die Berechnung der Hautparameter in der Interventionsstudie II erfolgte mittels des Vorzeichenrangtests nach Wilcoxon.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung zur simultanen Bestimmung von Flavanolen und deren O-Methyl-Metabolite in biologischem Material mittels HPLC

Um einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Nahrungssupplementen bzw. Ernährungsmustern und physiologischen Effekten herzustellen, ist es unerlässlich, die Bioverfügbarkeit der wirksamen Substanzen zu belegen („proof of absorption“). Nach der Einnahme von Catechin-haltiger Nahrung oder Nahrungssupplementen liegen in Plasma glucuronidierte, sulfatierte und methylierte Formen der Catechine vor; in den hier durchgeführten Studien sind die Catechine (-)-Epicatechin und (+)-Catechin von Bedeutung. Nach enzymatischer Deglucuronidierung/Desulfatierung werden Glucuronid- und Sulfat-Metabolite als freies Epicatechin bzw. Catechin nachgewiesen. Die vorgestellte Methode erlaubt eine simultane Identifizierung und Quantifizierung von freien Catechinen, sowie deren 3'- und 4'-O-Methyl-derivate in humanem Plasma und Erythrozyten. Die hier beschriebene Methode wurde in Anlehnung an Warden et al. und Lee et al. [97,151] entwickelt und im Verlauf ihrer Optimierung modifiziert.

3.1.1 Instrumentelle Parameter

Das hier eingesetzte HPLC-System besteht neben Hochdruckpumpe und elektrochemischen Detektor aus einem Autoinjektor, Säulenofen und Fluoreszenzdetektor.

3.1.1.1 Detektion

Elektrochemische Detektion:

Bei dieser Art der Amperometrie werden die Analyten in Abhängigkeit ihres elektrischen Potentials durch eine von einer Messelektrode erzeugten Spannung oxidiert bzw. reduziert. Der dabei entstehende Elektronenfluß wird gegen eine Referenzelektrode gemessen und an

den Integrator weitergeleitet. Aufgrund ihrer Phenolstruktur können die Flavanole bei entsprechender Spannung leicht oxidiert werden und sind somit für diese Art des Nachweises zugänglich. Um die Anzahl der Störsignale möglichst gering zu halten ist es günstig, die kleinstmöglichen Arbeitspotentiale zu wählen. Zwar sind die nativen Formen Catechin und Epicatechin schon bei einer Spannung von +210 mV detektierbar, die 3'-O-Methyl-Metabolite jedoch bleiben unter diesen Bedingungen undetektiert, was auf die Blockade der Hydroxygruppen am Catecholring zurückzuführen ist. Bei einem Arbeitspotential von +550 mV ergeben sowohl Catechin und Epicatechin als auch 3'-O-Methyl-Catechin, 4'-O-Methyl-Catechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin, 4'-O-Methyl-Epicatechin und das Procyanidin B2 ein Signal im ECD.

Fluoreszenzdetektion:

Flavanole haben, wie die meisten Flavonoide, aufgrund ihrer Elektronenverteilung die Fähigkeit zu fluoreszieren. In biologischem Material sind trotz intensiver Aufreinigung oft Störsignale zu finden, welche Signale der zu analysierenden Substanzen verdecken können. Um eine erhöhte Spezifität der einzelnen Analyten zu erzielen, wurde hier neben der elektrochemischen Detektion ein Fluoreszenzdetektor verwendet.

3.1.1.4 Mobile Phase:

Der Einsatz einer Kombination aus Acetonitril (ACN) und Phosphatpuffer in weit gefächerten Zusammensetzungen und Salzkonzentrationen wurde zur Trennung polyphenolischer Verbindungen in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [93,96,97,151,152]. Um Auskristallisation zu verhindern und die Stabilität des Systems zu gewährleisten, wurde hier mit einer relativ niedrig konzentrierten K_2HPO_4 / KH_2PO_4 – Pufferlösung (2 mM) gearbeitet; die Salzkonzentration ist damit um einen Faktor >10 geringer als in den zuvor beschriebenen Methoden. Nach Einstellung auf einen pH-Wert von 3,0 wurde die mobile Phase durch Filtration (Porengröße: 45 μm) von Schwebstoffen befreit. Die Retentionszeiten werden in hohem Maße durch den ACN-Gehalt beeinflusst; in dem hier verwendeten System wurde ein idealer ACN-Anteil von 15 % ermittelt. Die Analyten sind bei einer Analysenzeit von unter 20 min ohne Verwendung eines Fließmittelgradienten basisliniengetrennt (**Abb. 3.1**). Um bei elektrochemischer Detektion eine stabile Basislinie zu erhalten, müssen die beiden

Komponenten der mobilen Phase vor der Anwendung gemischt und 5 min mit Helium entgast werden. Des Weiteren wurde die mobile Phase im Kreislauf-System equilibriert, wodurch das Basisrauschen durch Voraboxidation des Fließmittels gering gehalten werden konnte. Auch während der Analyse wurde das Fließmittel im Kreislauf gepumpt. Dabei ist ein Verlust der leicht flüchtigen ACN-Phase unvermeidbar, so dass der ACN-Anteil vor den jeweiligen Analysen anhand der Retentionszeiten überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden musste, um Zuordnungsfehler zu vermeiden. In **Abb. 3.1** sind charakteristische Chromatogramme der Flavanole und ihrer 3'- bzw. 4'-O-Metabolite nach elektrochemischer und Fluoreszenzdetektion (Standardsubstanzen in mobiler Phase) dargestellt.

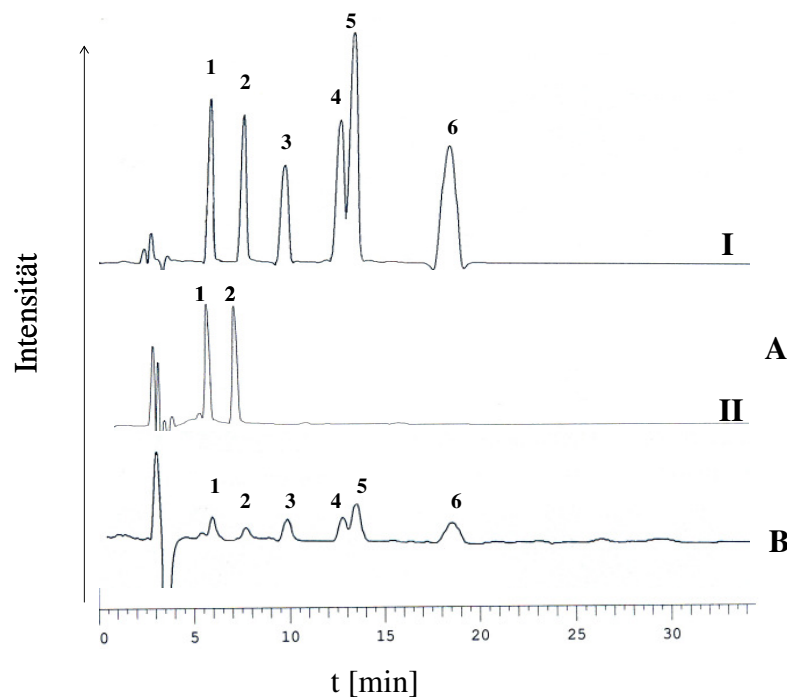


Abb. 3.1: HPLC-Chromatogramm einer Standardlösung; (A): (I) $U=+550$ mV bzw. (II) $U=+210$ mV; (B): $\lambda_{Ex}=280$ nm, $\lambda_{Em}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Epicatechin, 3: 3'-O-Methyl-Catechin, 4: 4'-O-Methyl-Catechin, 5: 3'-O-Methyl-Epicatechin, 6: 4'-O-Methyl-Epicatechin

3.1.2 Probenaufbereitung

Die Aufarbeitung von biologischem Material erfolgte nach Modifikation der Methodik von Rein et al., Richelle et al. und Lee et al. [112,151,153]. Für die Optimierung der Probenaufarbeitung, wurden aliquotierte Plasmaproben verwendet, die eine Stunde nach Einnahme von polyphenolreichen Supplementen gewonnen wurden.

Für die Aufarbeitung wurde ein optimales Probenvolumen von 500 µl (Plasma bzw. RBC) ermittelt; dies gewährleistet, dass auch Konzentrationen in den unteren nano-molaren Bereichen im anschließenden Chromatogramm zu einem Signal oberhalb der Bestimmungsgrenze führen. Auch könnten besonders bei der hochviskosen RBC-Suspension kleinere Probenvolumina zu pipettierbedingten, zufälligen Fehlern führen. Für die Enzyminkubation wurden die Proben mit entsprechendem Puffer versetzt, um in dem für die β -Glucuronidase/Sulfatase optimalen pH-Bereich von 5,0 zu arbeiten, und bei 37°C inkubiert. Vorversuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten ergaben, dass die enzymatische Deglucuronidierung/Desulfatierung nach 30 min vollständig abgelaufen ist und somit ein längeres Inkubieren nicht sinnvoll ist, da die Stabilität der Analyten unnötig beansprucht wird. Die Extraktion mit TBME wurde mehrfach durchgeführt, wobei sich zeigte, dass bereits nach dem ersten Extraktionsschritt mehr als 95 % der Analyte in die lipophile Phase übergegangen waren. Anders als bei den Proben aus humanem Material ist der Polyphenolgehalt in den untersuchten Supplementen, respektive den in den vorliegenden Studien eingesetzten Kakaopulvern, verhältnismäßig hoch; um hier eine genaue Aussage über den Polyphenolgehalt zu treffen, wurden die Extrakte aus zwei gesonderten Extraktionsschritten vereint.

3.1.3 Validierung der Methode

Selektivität:

Die Selektivität ist definiert als „die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und somit eindeutig zu identifizieren“ [154]. Während die eindeutige Identifizierung in Chromatogrammen der Reinsubstanzen verhältnismäßig leicht fällt, ist die Auftrennung der zahlreichen Signale in biologischem Material komplizierter. Zur Identifizierung der einzelnen Substanzen

zugehörigen Peaks und zur Bestimmung der Selektivität wurde einem Aliquot Nüchtern-Plasma bzw. -RBC-Suspension ein in Inkubationspuffer gelöstes Standardgemisch zudosiert, so dass Endkonzentrationen von 10 ng/ml Epicatechin und Catechin, sowie 40 ng/ml der *O*-methylierten Metabolite gegeben war. Durch den Vergleich der Retentionszeiten erfolgt die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Substanzen; die Abstände der Signale voneinander erlaubt eine Aussage über die Selektivität: die Peaks der Standards sind eindeutig von benachbarten Peaks zu unterscheiden. Lediglich bei 4'-*O*-Methyl-Catechin ist eine Basislinientrennung nicht möglich; dennoch ist bis zu einer Konzentration wenigstens 1,6 ng/ml eine Quantifizierung möglich. In **Abb. 3.2** und **Abb. 3.3** sind die Chromatogramme der Plasmaproben, in **Abb. 3.4** und **Abb. 3.5** die der entsprechenden RBC-Proben dargestellt. Diese Proben wurden sowohl mittels elektrochemischer als auch mittels Fluoreszenzdetektion ausgewertet.

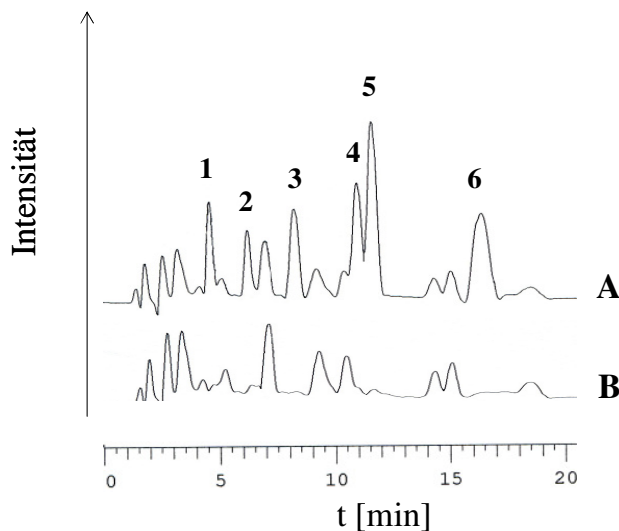


Abb. 3.2: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Plasma-Aliquotes (A): Plasma nach Zugabe eines Standard-Gemisches; $U=+550$ mV; $T = 35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Epicatechin, 3: 3'-*O*-Methyl-Catechin, 4: 4'-*O*-Methyl-Catechin, 5: 3'-*O*-Methyl-Epicatechin, 6: 4'-*O*-Methyl-Epicatechin; (B): Kontrollplasma

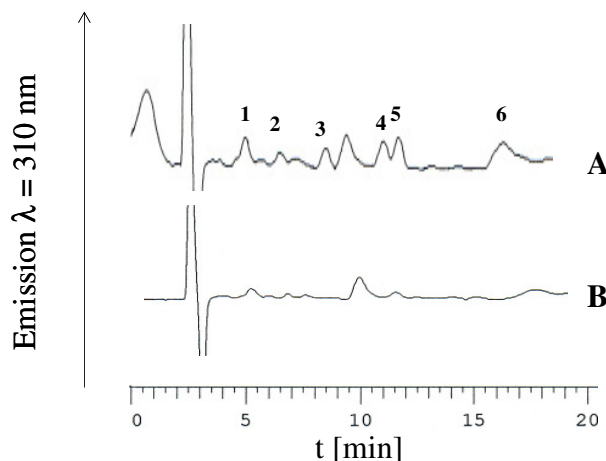


Abb. 3.3: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines Plasma-Aliquotes (A): Plasma nach Zugabe eines Standardgemisches; $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Epicatechin, 3: 3'-*O*-Methyl-Catechin, 4: 4'-*O*-Methyl-Catechin, 5: 3'-*O*-Methyl-Epicatechin, 6: 4'-*O*-Methyl-Epicatechin (B): Kontrollplasma

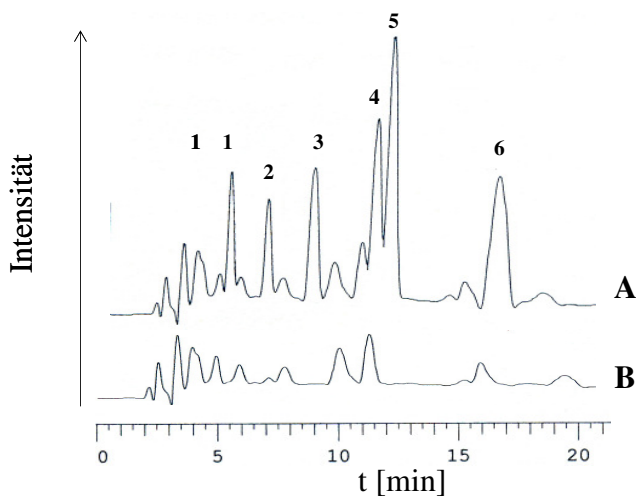


Abb. 3.4: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines RBC-Aliquotes (A): RBC-Suspension nach Zugabe eines Standardgemisches; $U=+550$ mV; $T = 35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Epicatechin, 3: 3'-O-Methyl-Catechin, 4: 4'-O-Methyl-Catechin, 5: 3'-O-Methyl-Epicatechin, 6: 4'-O-Methyl-Epicatechin; (B): RBC-Suspension (Kontrolle)

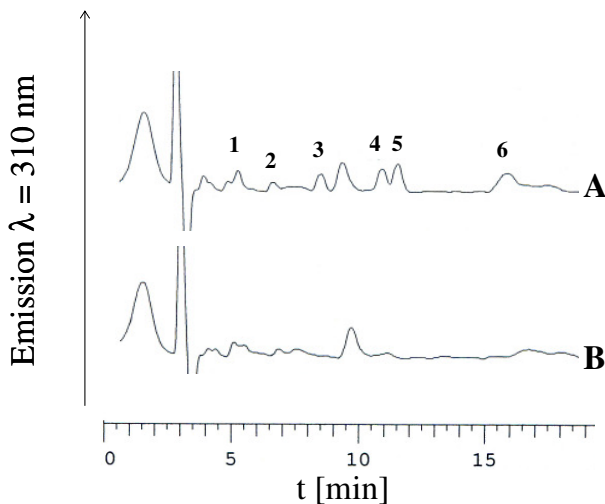


Abb. 3.5: HPLC-Chromatogramm nach Extraktion eines RBC-Aliquotes (A): RBC-Suspension nach Zugabe eines Standardgemisches; $\lambda_{\text{Ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{Em}}=310$ nm; $T = 35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Epicatechin, 3: 3'-O-Methyl-Catechin, 4: 4'-O-Methyl-Catechin, 5: 3'-O-Methyl-Epicatechin, 6: 4'-O-Methyl-Epicatechin; (B): RBC-Suspension (Kontrolle)

Kalibrierfunktion und Quantifizierung:

Die Linearität von Kalibrierungskurven gibt an, ob die Methode innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse liefert, bei denen die Konzentration des Analyten direkt proportional zum Signal ist [154]. Die Linearität wird durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten r geprüft. Um den Verlauf der Kalibrierungskurve in verschiedenen Konzentrationsbereichen und einen eventuell vorhandenen Einfluß der biologischen Matrices beurteilen zu können, werden die Standards je einmal in mobiler Phase sowie in Plasma und RBC-Suspension vermessen. Aufgrund des zu erwartenden Bereiches der Zielkonzentrationen [92,112,155] wird ein Konzentrationsbereich von 1-200 ng/ml als Arbeitsbereich festgelegt.

Der Verlauf der Kalibrationskurven ist in diesem Bereich linear. Um später Rückschlüsse auf die Konzentration des Analyten ziehen zu können, werden die Standardverdünnungen in biologischen Systemen der gleichen Aufarbeitungsprozedur unterzogen wie die Proben; eine Wiederfindungskorrektur kann somit umgangen werden. Die Quantifizierung aller darauf folgenden Messwerte geschieht dann durch den Vergleich der jeweiligen Höhe der Peaks mit denjenigen in den entsprechenden Kalibriergeraden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Kalibrierfunktionen verwendet, deren Korrelationskoeffizient mindestens 0,99 betrug.

Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze, oft auch als Detektionsgrenze bezeichnet, ist definiert als die kleinste nachweisbare Menge eines Analyten in einer Probe [154]. Im Falle der HPLC ist dies diejenige Konzentration, bei welcher der Substanzpeak noch signifikant höher als das Hintergrundrauschen der Basislinie ist. Für die hier verwendete Methode wird ein minimales Verhältnis von 3 zu 1 zwischen Peak und Grundrauschen festgelegt. Zur Ermittlung des Grundrauschens wird mindestens die zehnfache Breite der Peakbasis beobachtet.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgt über eine Verdünnungsreihe eines Standardgemisches in mobiler Phase. Für die elektrochemische Detektion ergaben sich Nachweisgrenzen von 0,1 ng/ml (0,345 nM) für Catechin und Epicatechin und 0,2 ng/ml (0,624 nM) für 3'-O-Methyl-Catechin, 4'-O-Methyl-Catechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin und 4'-O-Methyl-Epicatechin. Die Nachweisgrenzen in der Fluoreszenzdetektion wurden bei 2,5 ng/ml (8,63 nM) für Catechin und Epicatechin und 3 ng/ml (9,36 nM) für 3'-O-Methyl-Catechin, 4'-O-Methyl-Catechin, 3'-O-Methyl-Epicatechin und 4'-O-Methyl-Epicatechin festgelegt. Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion ist folglich um mehr als den Faktor 10 geringer, als die der elektrochemischen Detektion. Aus diesen Werten lässt sich die Bestimmungsgrenze der einzelnen Substanzen unter den entsprechenden Bedingungen ermitteln; sie ist definiert als die kleinste quantifizierbare Menge und wird als ein dreifaches der Nachweisgrenze berechnet [154].

3.2 Interventionsstudien

3.2.1 Analysen der Nahrungssupplemente

3.2.1.1 Kakaopulver

Der Gehalt der Polyphenole wurde aus zwei für die Interventionsstudien verwendeten Kakaopulver-Chargen bestimmt. Laut Herstellerangaben unterscheiden sie sich deutlich in der Konzentration der Polyphenole, weswegen im Weiteren zwischen „HP“ (*high polyphenol*, hoher Polyphenolgehalt) und „LP“ (*low polyphenol*, geringer Polyphenolgehalt) differenziert wird. Die Extraktion erfolgt wie unter 2.3.1.1.2 und 2.3.3.1.2 beschrieben. Die Detektion der Polyphenole erfolgt elektrochemisch bei einer Arbeitsspannung von +550 mV. Die Retentionszeiten betragen 5,7 min (Catechin), 6,4 min (Procyanidin B2), 8,0 min (Epicatechin) und 24,4 min (unidentifiziertes Dimer D_x). In **Abb 3.6** ist das Chromatogramm eines Extraktes des HP-Kakaopulvers dargestellt.

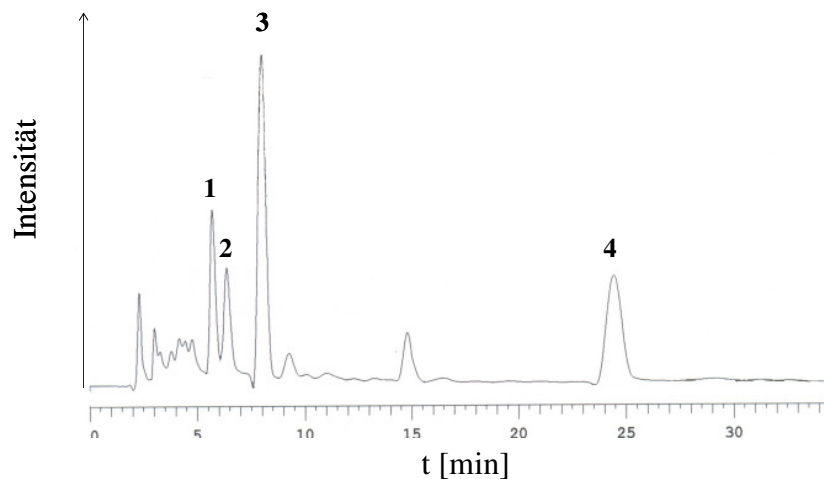


Abb. 3.6: HPLC-Chromatogramm eines HP-Extraktes; $U=+550$ mV, $T=35^{\circ}\text{C}$; 1: Catechin, 2: Procyanidin B2; 3: Epicatechin; 4: unidentifiziertes Dimer D_x

Die Quantifizierung der Monomere erfolgte über externe Kalibrierung. Im HP-Pulver wurde ein Gehalt von 1,05 mg Catechin/g Pulver und 2,2 mg Epicatechin/g Pulver ermittelt. Für das LP Pulver wurde ein Catechin-Gehalt von 0,14 mg/g Pulver und 0,23 mg Epicatechin/g Pulver ermittelt.

Zur Quantifizierung der Dimere wurde ein Dimergemisch eingewogen und nach Abzug des ermittelten Epicatechin-Anteils von 7,18 % (m/m) eine Kalibriergerade in mobiler Phase über die Summe der Peakhöhen des Dimer-Gemisches erstellt. Der Dimer-Gehalt in den Extrakten wird als Massenanteil angegeben. Die Identifizierung des Procyanidin B2 war mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Standards möglich. In **Abb 3.7** ist ein typisches Chromatogramm eines Dimer-Gemisches dargestellt. Auffallend ist das Verhältnis von Procyanidin B2 und einem nicht identifizierten Dimer (D_x), welches auch in den Kakaosextrakten zu finden ist. Für das HP-Pulver wurde eine Dimer-Menge von 8,96 mg/g Kakaopulver, für das LP-Pulver 0,58 mg/g Kakaopulver ermittelt.

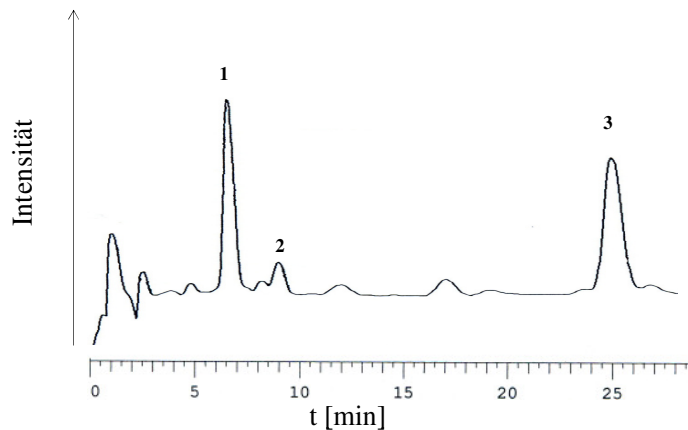


Abb. 3.7: HPLC-Chromatogramm eines Dimer-Gemisches; $U=+550\text{ mV}$, $T=35^\circ\text{C}$;
1: Procyanidin B2;
2: Epicatechin;
3: unidentifiziertes Dimer D_x

In Kakaopulver liegen die Fettsäuren (FS) zu mehr als 98 % als Triglyceride vor. Zur Gewinnung der FS-Ester wurde eine lipophile Extraktion mit n-Hexan durchgeführt. Nach der in Abschnitt 2.3.3.2 beschriebenen Transmethylierung wurde die FS-Zusammensetzung gaschromatographisch bestimmt. Die Peak-Identifizierung erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten mit denen eines Standardgemisches (siehe **Abb. 3.8**) [156]. Die ermittelte Verteilung in HP- bzw. LP-Kakao von Palmitinsäure (21,3 % bzw. 26,2 %), Stearinsäure (31,7 % bzw. 36,5 %) und Ölsäure (27,8 % und 33,1%) entspricht den in der Literatur angegebenen Richtwerten [156,157]. Der Gehalt an ungesättigten FS in beiden Pulvern beträgt 54,7 % im HP- und 66,9 % im LP-Pulver. Auffallend jedoch ist die Zusammensetzung der ungesättigten FS im HP-Pulver: 17 % der FS liegen als ω -3-FS vor, der Hauptanteil ist

hierbei Docosapentaensäure (DPA; 12,0 %). Der ω -6-FS-Anteil beträgt 0,42 % (γ -Linolensäure). Dagegen konnten im LP-Pulver weder ω -3- noch ω -6-FS nachgewiesen werden; hier wird der Anteil der ungesättigten FS ausschließlich durch die ω -9-FS Ölsäure bestimmt.

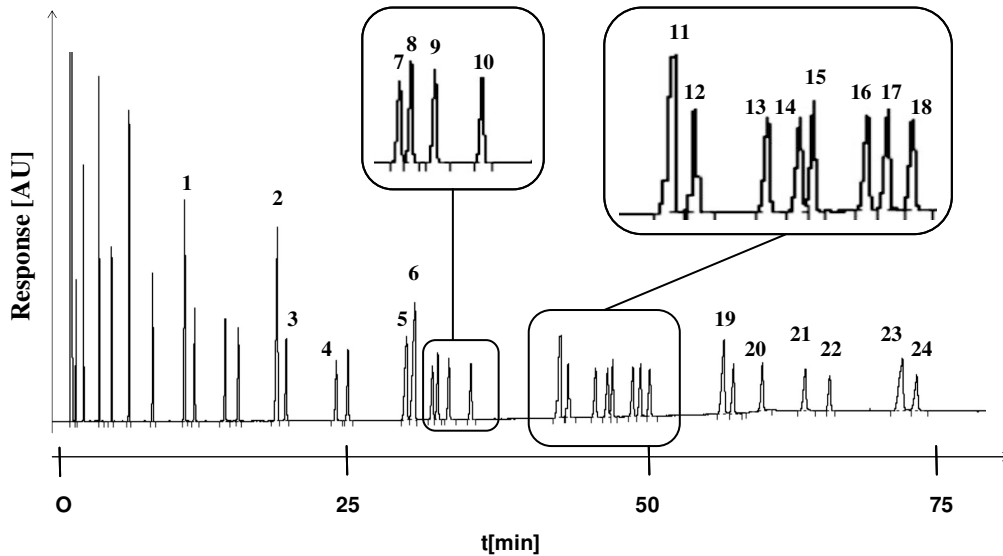


Abb. 3.8: GC-Chromatogramm eines Fettsäuremethylester (FAME) -Standardgemisches; Methylester der 1: Myristinsäure; 2: Palmitinsäure; 3: Palmitoleinsäure; 4: Heptadecansäure; 5: Stearinsäure; 6: Ölsäure; 7: Linoladinsäure; 8: Linolsäure; 9: γ -Linolensäure; 10: α -Linolensäure; 11: Arachinsäure; 12: Eicosensäure; 13: Eicosadiensäure; 14: Homo- γ -linolensäure; 15: Arachidonsäure; 16: Dihomo- γ -linolensäure; 17: Eicosapentaensäure; 18: Behensäure; 19: Erucasäure; 20: Docosapentaensäure; 21: Docosahexaensäure; 22: Lignocerinsäure; 23: Nervensäure

Eine Dosisinheit (1 Packet Kakaopulver entsprechend ca. 18 g) setzt sich demnach wie in **Tab. 3.1** zusammenfassend dargestellt zusammen.

Tab. 3.1: Zusammensetzung einer Dosisseinheit HP- bzw. LP-Kakaopulver

	HP-Kakaopulver	LP-Kakaopulver
Gesamt-Polyphenolgehalt (mg)	326[†]	27[†]
Catechin	18,9	2,5
Epicatechin	39,6	4,2
Dimere	161,3	10,4
Fett (g)	1,0[†]	1,0[†]
gesättigte FS (%)	54,7	66,9
Palmitinsäure	21,3	26,6
Stearinsäure	31,7	36,5
ungesättigte FS (%)	45,3	33,1
Ölsäure	27,8	33,1
ω -3-FS	16,9	-
ω -6-FS	0,4	-
Sonstige Bestandteile		
Cholesterin	-	-
Natrium (mg)	60 [†]	140 [†]
Gesamt-Kohlenhydrate (g)	9 [†]	9 [†]
Zucker (g)	5 [†]	5 [†]
Protein (g)	5 [†]	5 [†]
Ballaststoffe (g)	4 [†]	4 [†]
Coffein (mg)	10,6 [†]	12,3 [†]
Theobromin (mg)	195 [†]	190 [†]

[†]nach Angaben des Herstellers

3.2.1.2 Öl-Weichgelatine-Kapseln

In der in dieser Arbeit beschriebenen Studie II sollte der Einfluß von ω -3 und ω -6-FS in Nahrungssupplementen auf die Konstitution sensibler Haut untersucht werden. Bei den eingesetzten Präparaten handelt es sich um in Weichgelatine verkapselte Öle. Ein Supplement enthielt das ω -3-FS-reiche Leinsamenöl, das aus den Samen von *Linum usitatissimum* gewonnen wird (Produkt A); das zweite Öl stammt aus den Samen der Färberdistel (*Carthamus tinctorius*) und zeichnet sich durch ein hohes ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis aus (Produkt B). Um die genaue FS-Zusammensetzung zu ermitteln wurden die Öle wie unter 2.3.3 beschrieben extrahiert und das FS-Muster bestimmt. Die Zuordnung der Peaks erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten im Gaschromatogramm einer kommerziell erworbenen FS-Methylester (FAME)-Mischung (**Abb. 3.8**).

Der Gesamtanteil an ω -6-FS beträgt 16,5 % in Produkt A und 72,8 % in Produkt B. In Produkt A beträgt der ω -3-Anteil 49,1 %, in Produkt B nur 0,64 %, woraus sich ein ω -6/ ω -3-Verhältnis von 0,34 für Produkt A und 113,56 für Produkt B ergibt. Diese ungleiche Verteilung wird in den Chromatogrammen ersichtlich (**Abb. 3.9**); sie wird in erster Linie durch den Linolsäure (LA)-Anteil (A: 15,6 %; B: 48,8 %) und den α -Linolensäure (ALA)-Anteil (A: 48,8 %; B: 0,64 %) bestimmt. Unter Berücksichtigung weiterer Additiva ist eine Dosisinheit (entsprechend einer Kapsel) wie in **Tab. 3.2** angegeben zusammengesetzt. In der vorliegenden Studie wurden 4 Kapseln pro Tag eingenommen.

Tab. 3.2 : Zusammensetzung der Öl-Weichgelatine-Kapseln

		Kapsel A	Kapsel B
Fettsäuren (mg)		555,3	559,2
	Summe ω -6-Fettsäuren	88,5	397,5
	Summe ω -3-Fettsäuren	263,4	3,5
14:0	Myristinsäure	N.N.	1,1
16:0	Palmitinsäure	26,7	40,4
16:1	Palmitoleinsäure	0,45	0,57
17:0	Heptadecansäure	0,70	N.N.
18:0	Stearinsäure	19,9	14,4
18:1n9	Ölsäure	113,9	69,2
18:2n6	Linoladinsäure	4,11	3,88
18:2n6	Linolsäure	83,7	393,2
18:3n6	γ -Linolensäure	0,73	0,42
18:3n3	α -Linolensäure	261,4	3,50
20:0	Arachinsäure	0,87	2,49
20:1	Eicosensäure	2,64	1,12
20:2	Eicosadiensäure	0,97	0,89
22:0	Behensäure	1,05	1,57
22:6n3	Docosahexaensäure	1,93	N.N.
23:0	Erucasäure	N.N.	3,05
24:0	Lignocerinsäure	N.N.	1,04
24:1	Nervensäure	N.N.	1,10
	nicht identifizierte FS	17,2	8,25
sonstige Bestandteile			
	D- α -Tocopherol (mg)	3,85	N.N.
	Rosmarinextrakt (mg)	0,83	0,83

N.N. = nicht nachweisbar

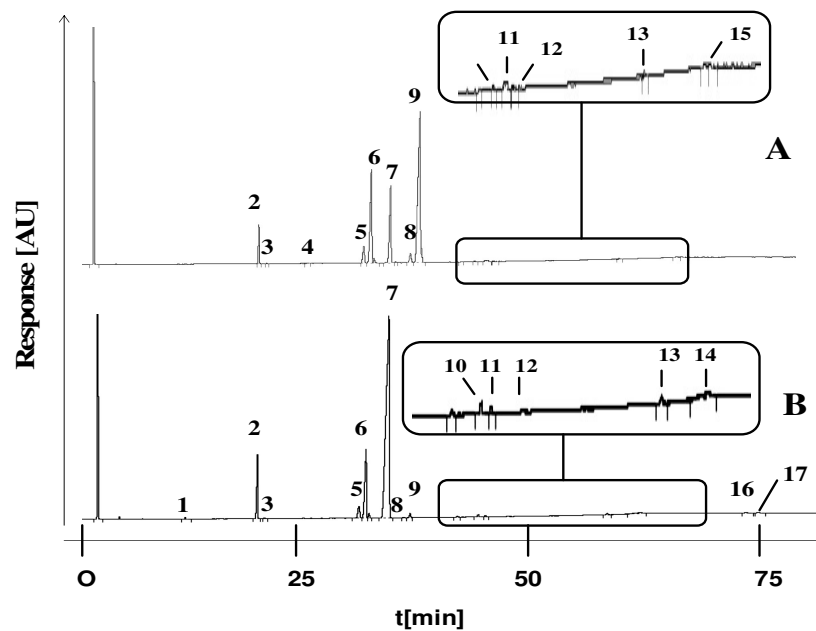


Abb. 3.9: GC-Chromatogramme nach Transmethylierung von Öl aus (A): ALA-reichen Kapseln (Produkt A) (B): ALA-armen Kapseln (Produkt B); 1: Myristinsäure; 2: Palmitinsäure; 3: Palmitoleinsäure; 4: Heptadecansäure; 5: Stearinsäure; 6: Ölsäure; 7: Linolsäure (LA); 8: γ -Linolensäure; 9: α -Linolensäure (ALA); 10: Arachinsäure; 11: Eicosensäure; 12: Eicosadiensäure; 13: Behensäure; 14: Erucasäure; 15: Docosahexaensäure; 16: Lignocerinsäure; 17: Nervensäure

3.2.1.3 Flavanon-Tabletten

Bei den Flavanon-Tabletten handelt es sich um Preßlinge aus getrocknetem und zerkleinertem Pflanzenmaterial aus *Citrus limonium* (Zitrone), *Citrus sinensis* (Orange) und *Citrus paradisi* (Grapefruit). Von Seiten des Herstellers lagen keine Angaben zur Flavanon-Konzentration vor. Da pflanzliches Material oft starke Gehaltsschwankungen der Sekundärstoffe aufweist, wurde nach einem enzymatischen Aufschluss der Glykoside der Gehalt an Hesperetin und Naringenin pro Preßling bestimmt.

In **Abb 3.10** ist das Chromatogramm eines Extraktes nach Inkubation mit Hesperidinase/Naringinase im Vergleich mit dem einer Standardlösung von Hesperetin und Naringenin dargestellt.

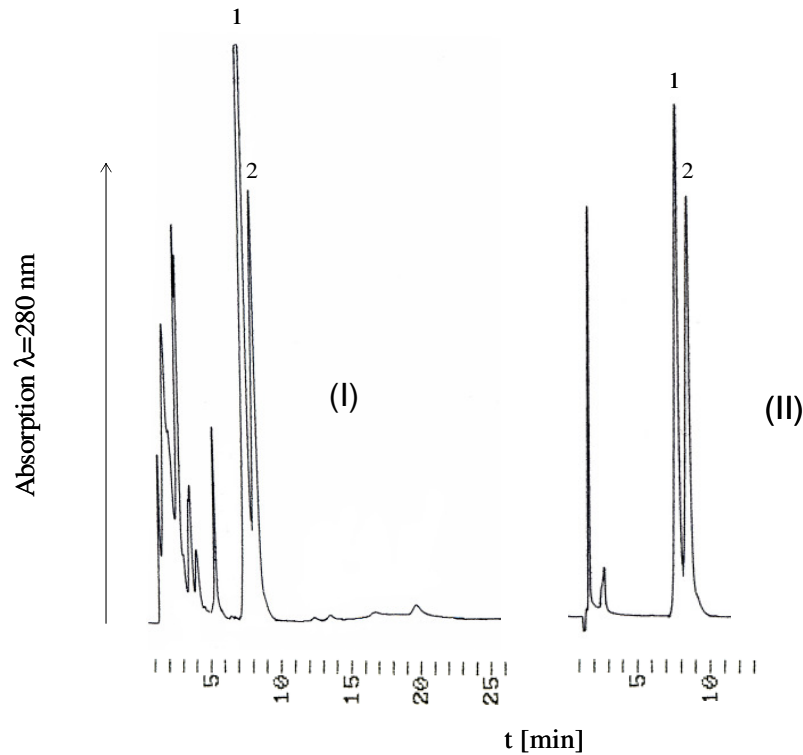


Abb 3.10: HPLC-Chromatogramme eines Flavanon-Tabletten-Extraktes nach Inkubation mit Hesperidinase/Naringinase (I) und einer Standardlösung (II); $\lambda = 280$ nm; 1: Naringenin, 2: Hesperetin

Nach Quantifizierung über externe Standards [5 mM Tris, pH= 4,0] wurde eine Hesperetin-Konzentration von 0,67 mg und eine Naringenin-Konzentration von 1,38 mg pro 100 mg Trockensubstanz errechnet. Damit konnte eine Dosis von 20,43 mg Naringenin und 9,95 mg Hesperetin / Tablette (mittleres Tablettengewicht: 1,49 g) festgelegt werden.

3.2.1.3 Oligomere Procyanidin (OPC) -Kapseln

Der für die OPC-Kapseln verwendete Traubenkernextrakt (TKE) wurde in Hartgelatinekapseln portioniert; das mittlere Kapselgewicht betrug 323,43 mg. Anhand des Analysenzertifikates des Herstellers wurde die Dosis/Kapsel wie in **Tab. 3.3** zusammengestellt errechnet.

Tab. 3.3: Flavanol- und Procyanidin-Gehalt einer Traubenkern-Extrakt-Kapsel

	Gehalt (%)	Gehalt/Kapsel (mg)
Epicatechin	0,75 ± 0,25	2,47 ± 0,85
Catechin	0,75 ± 0,25	2,47 ± 0,85
Di- und Trimere	3 ± 1	9,71 ± 9,75
> Trimere	95,5 ± 1,5	310,4 ± 6,35
gesamt OPC	>98	320,1

3.2.2 Interventionsstudie I: Supplementierung mit Kakaopulver mit hohem und geringem Polyphenol-Gehalt

In dieser Studie wurden die Effekte von Kakao mit hohem Polyphenol-Gehalt (HP-Kakaopulver) und geringem Polyphenol-Gehalt (LP-Kakaopulver), jeweils gelöst in 100 ml heissem Wasser, in einer 12-wöchigen Studie untersucht. Gemessen wurde der Einfluss auf den Flavanol-Gehalt in Plasma und Erythrozyten, sowie auf Parameter der Hautphysiologie, Mikrozirkulation und Photoprotektion. In einem gesonderten Versuch wurden die Bioverfügbarkeit und Einflüsse auf die kutane Mikrozirkulation nach einer Einmaldosis des HP- bzw. LP-Kakaopulvers bestimmt.

3.2.2.1 Einmal-Dosierung

3.2.2.1.1 Bioverfügbarkeit der Flavanole

Bei diesem Versuch nahmen jeweils 10 Probanden eine Dosis des HP- bzw. LP-Kakaopulvers ein. Der Flavanol-Gehalt in Plasma wurde mittels HPLC-elektrochemischer Detektion (U= +210 mV) bestimmt.

In den Gruppen wurden Basiswerte von $11,6 \pm 2,35$ und $9,54 \pm 0,53$ nM an gesamt-Epicatechin (als Summe von freiem, glucuronidiertem und sulfatiertem Epicatechin) bestimmt (siehe **Tab. 3.4**). Nach einer Stunde erreichte der Epicatechin-Gehalt im Plasma in der HP-Gruppe einen statistisch signifikanten Anstieg auf ein Maximum von $63 \pm 11,3$ nM ($p < 0,002$), wobei bei den einzelnen Teilnehmern Konzentrationen von 37,0 bis 144,9 nM erreicht wurden. Diese Werte sind vergleichbar mit in der Literatur angegebenen Konzentrationsbereichen [92,112,155]. Nach einer Stunde nahmen die Epicatechin-Konzentrationen konstant ab, bis sie nach 6 h ($15,2 \pm 1,59$ nM) fast wieder auf den Basalwert zurückgekehrt waren.

Damit unterschieden sich die Plasma-Epicatechin-Werte zu den Zeitpunkten 1 h und 2 h ($p < 0,002$) und 4 h und 6 h ($p < 0,005$) statistisch signifikant von den entsprechenden Epicatechin-Konzentrationen in der LP-Gruppe. In der LP-Gruppe wurde nach einer Stunde ein nicht signifikanter Anstieg von $9,54 \pm 0,53$ auf $11,7 \pm 1,92$ nM gemessen. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den einzelnen Epicatechin-Plasmakonzentrationen

in der LP-Gruppe festgestellt werden. In **Tab. 3.4** sind die Epicatechin-Konzentrationen für beide Gruppen zusammengefasst, der Verlauf der Plasmakonzentrationen ist in **Abb. 3.11** dargestellt. Catechin sowie Procyanidin B2 konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der simultan bestimmten Mikrozirkulations-Parameter werden in **Kapitel 3.2.2.1.2** behandelt.

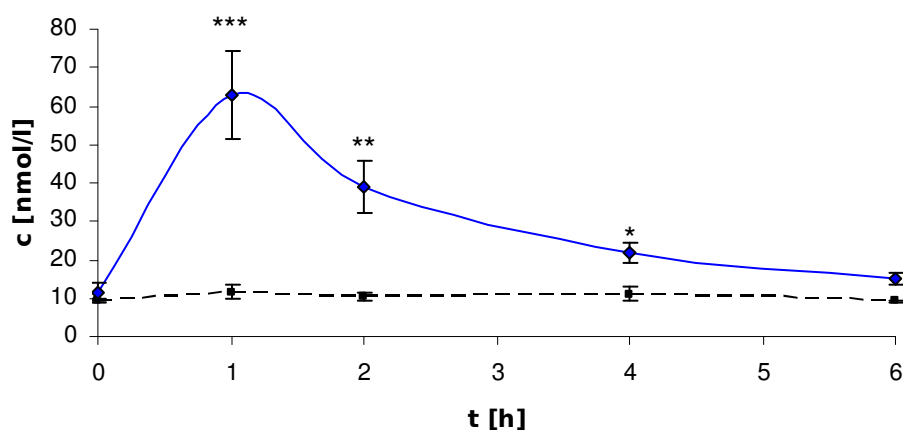


Abb.3.11: Verlauf des gesamt-Epicatechin-Gehaltes in Plasma nach Einnahme von einer Dosis HP-Pulver (—) bzw. LP-Pulver (----)

Tab. 3.4: Epicatechin-Konzentrationen in Plasma nach einer Dosis HP- bzw. LP-Pulver (\pm SEM)

t [h]	Epicatechin-Konzentration (nM)				
	0	1	2	4	6
HP-Produkt (n=10)	11,6 \pm 2,35	63 \pm 11,3 ^{***}	38,8 \pm 6,79 ^{**}	21,8 \pm 2,42 [*]	15,2 \pm 1,59
LP-Produkt (n=10)	9,54 \pm 0,53	11,7 \pm 1,92	10,5 \pm 0,99	11,2 \pm 2,06	9,3 \pm 0,27

* signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,01

** signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,003

*** signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,002

3.2.2.1.2 Kutane und subkutane Mikrozirkulation

Eine optimale Hautdurchblutung gewährleistet die Versorgung der Haut mit Nährstoffen und Sauerstoff. Sie stellt damit einen Parameter für die Hautgesundheit dar (siehe **Kapitel 1.2.1.2**).

Mit Hilfe der hier angewendeten Methode werden die Durchblutungsgrößen relativer Blutfluss (BF) und -geschwindigkeit (BV), im Messvolumen einer Glasfasersonde, sowie die Sauerstoffsättigung (S-O₂) und die relative Hämoglobinkonzentration (rHb) im beleuchteten Gewebevolumen bestimmt. Das O₂C-Meßgerät verwendet Laserlicht für die Bestimmung der Durchblutungsgrößen im Gewebe. Durch die Bewegung der Erythrozyten wird eine Dopplerverschiebung hervorgerufen. Dieser Dopplershift in der Frequenz gibt die BV an. Außerdem wird eine Weißlichtquelle für die Bestimmung der Hämoglobinparameter S-O₂ und rHb verwendet. Die Messung erfolgt simultan im kutanen (1 mm Hauttiefe) und subkutanen (6-8 mm Hauttiefe) Gewebe.

In einer Hauttiefe von 1 mm konnte 2 h nach Einnahme des polyphenolreichen Supplementes (HP-Gruppe) eine Zunahme des relativen Blutflusses auf $49 \pm 9,4$ im Vergleich zu $30 \pm 11,4$ zum Zeitpunkt $t = 0$ h beobachtet werden (**Abb. 3.12**); dies entspricht einer Zunahme um 63 % ($p < 0,001$). Gleichzeitig war hier die S-O₂ um das 1,8-fache auf ihren Maximalwert gestiegen (von $25 \% \pm 6,3 \%$ auf $45 \% \pm 10,7 \%$, $p < 0,0002$). Diese Effekte konnten in der LP-Gruppe nicht nachgewiesen werden; hier wurde ein nicht signifikanter Anstieg der S-O₂ von $30 \% \pm 12,2 \%$ zum Zeitpunkt $t = 0$ h auf $38 \% \pm 17,2 \%$ nach 2 h beobachtet. Der relative Blutfluss erreichte in dieser Gruppe einen Maximalwert von $29 \pm 18,9$ nach nur einer Stunde im Vergleich zum Ausgangswert ($23 \pm 16,8$); die Zunahme war statistisch nicht signifikant (**Abb. 3.13**).

Eine Veränderung der Blutflussgeschwindigkeit oder der relativen Hämoglobinkonzentration konnte hier in keiner der beiden Gruppen beobachtet werden.

Die Messung in einer Hauttiefe von 6-8 mm ergab in beiden Gruppen weder eine Veränderung der Durchblutungsgrößen noch der Sauerstoffsättigung oder relativen Hämoglobinkonzentration. Die Einzeldaten für die HP- sowie die Kontroll-Gruppe sind in **Tab. 3.5** und **Tab. 3.6** aufgeführt.

Tab. 3.5: Mikrozirkulationsparameter nach Einnahme einer Dosis HP-Pulver (\pm SD)

HP-Produkt (n=10)					
t [h]	0	1	2	4	6
Kapillare Zirkulation					
1 mm Meßtiefe					
S-O ₂ (%)	25 ± 6,3	33 ± 10,9	45 ± 10,7**	31 ± 6,3	26 ± 5,6
rHb (AU)	24 ± 3,2	25 ± 4,6	25 ± 3,7	26 ± 4,0	25 ± 2,6
BF (AU)	30 ± 11,4	37 ± 12,4	49 ± 9,4*	31 ± 8,5	32 ± 15,6
BV (AU)	29 ± 7,5	31 ± 9,8	29 ± 7,6	28 ± 7,2	33 ± 10,4
6-8 mm Meßtiefe					
S-O ₂ (%)	79 ± 4,3	79 ± 5,8	77 ± 3,3	79 3,7	81 ± 3,6
rHb (AU)	78 ± 10,2	79 ± 9,9	76 ± 9,7	79 ± 9,9	80 ± 10,2
BF (AU)	220 ± 53,8	244 ± 60,6	249 ± 39,9	232 ± 56,5	208 ± 65,9
BV (AU)	42 ± 13,6	43 ± 12,7	41 ± 9,5	41 ± 14,3	39 ± 13,0

* signifikant unterschiedlich zu t=0 p<0,001

** signifikant unterschiedlich zu t=0 p<0,0002

Tab. 3.6: Mikrozirkulationsparameter nach Einnahme einer Dosis LP-Pulver (\pm SD)

LP-Produkt (n=10)					
t [h]	0	1	2	4	6
Kapillare Zirkulation					
1 mm Meßtiefe					
S-O ₂ (%)	30 ± 12,2	35 ± 16,0	38 ± 17,2	34 ± 14,5	34 ± 18,6
rHb (AU)	24 ± 2,5	24 ± 3,1	23 ± 2,8	24 ± 3,0	25 ± 3,0
BF (AU)	23 ± 16,8	29 ± 18,9	23 ± 10,6	23 ± 11,1	26 ± 20,9
BV (AU)	28 ± 11,0	31 ± 13,8	26 ± 4,5	26 ± 7,9	27 ± 10,9
6-8 mm Meßtiefe					
S-O ₂ (%)	78 ± 4,6	77 ± 4,8	78 ± 4,3	78 ± 4,8	77 ± 6,1
rHb (AU)	78 ± 10,9	76 ± 12,5	77 ± 12,4	72 ± 7,8	75 ± 10,3
BF (AU)	228 ± 42,0	224 ± 71,2	245 ± 75,9	220 ± 67,1	231 ± 58,8
BV (AU)	45 ± 10,0	43 ± 16,4	41 ± 14,3	38 ± 14,8	43 ± 14,1

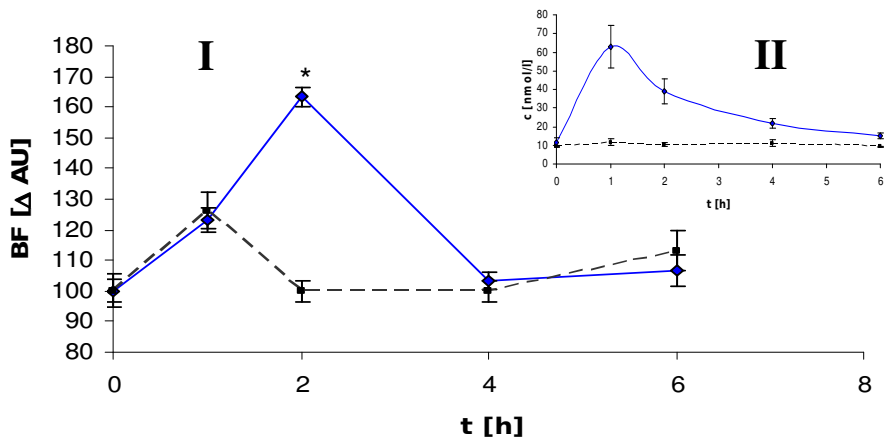


Abb. 3.12: (I) Änderung des peripheren Blutflusses (BF) nach Supplementierung mit HP-Pulver (—) und LP-Pulver (---) in 1 mm Hauttiefe; (II) im Vergleich Abb. 3.11: Epicatechin-Konzentration in Plasma nach Einnahme von HP-Pulver (—) und LP-Pulver (---)

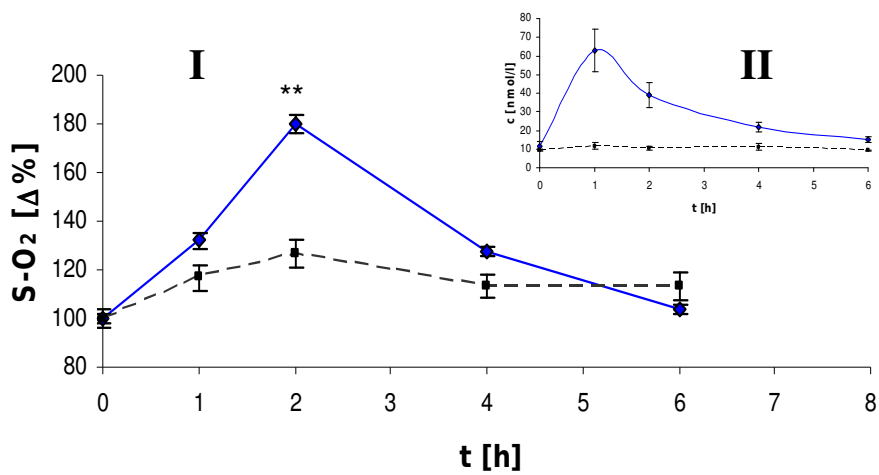


Abb. 3.13: (I) Änderung der Sauerstoffsättigung (S-O₂) nach Supplementierung mit HP-Pulver (—) und LP-Pulver (---) in 1 mm Hauttiefe; (II) im Vergleich Abb. 3.11: Epicatechin-Konzentration in Plasma nach Einnahme von HP-Pulver (—) und LP-Pulver (---)

3.2.2.2 Bioverfügbarkeit, Mikrozirkulation, UV-Schutz und Hautphysiologie nach Mehrfachdosierung

3.2.2.2.1 *Flavanol-Gehalt in Plasma und Erythrozyten nach täglichem Konsum von Kakao-Polyphenolen aus HP- und LP-Pulver*

In diesem Teil der Studie wird untersucht, ob ein mehrwöchiger Konsum von 18 g HP- bzw. LP-Kakaopulver pro Tag in 100 ml Wasser zu einer Akkumulation von Flavanolen und/oder deren Metabolite im Blut führt. Analysiert wurden hierzu sowohl Plasma als auch Erythrozyten. Die Blutentnahmen erfolgten nüchtern, die letzte Supplementierung lag mindestens 12 Stunden zurück.

Um eine Erfassung der *O*-methylierten Flavanole zu gewährleisten, wurde die Spannung des elektrochemischen Detektors von +210 auf +550 mV erhöht.

In **Tab. 3.7** sind die Ergebnisse der Plasma-Analyse, in **Tab. 3.8** die der Erythrozyten zusammengefasst. Der Gehalt an freiem, glucuronidiertem und sulfatiertem Epicatechin stieg im Plasma in der HP-Gruppe nach 6 Wochen von $3,78 \pm 3,33$ nM auf $8,51 \pm 2,95$ nM, jedoch war diese Zunahme statistisch nicht signifikant. Auch der Gehalt an methyliertem Epicatechin blieb nahezu konstant. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die LP-Gruppe erhalten.

In keiner der untersuchten Gruppen konnten Unterschiede in den Epicatechin-Gehalten der Erythrozyten (RBC) festgestellt werden (freies, glucuronidiertes oder sulfatiertes Epicatechin). Auch der Gehalt der Methyl-Metabolite zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Basiswerten.

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.7: Plasma-Gehalte von Epicatechin und dessen O-Methyl-Metabolite während 3-monatiger Supplementierung mit HP- bzw. LP-Pulver (\pm SEM)

Wochen	Flavanolgehalt im Plasma (nM)		
	0	6	12
HP-Produkt (n=7)			
Epicatechin (n=12)	3,78 \pm 3,33	8,51 \pm 2,95	4,33 \pm 3,58
3'-O-Methyl-Epicatechin	2,61 \pm 0,33	2,51 \pm 0,43	3,00 \pm 0,48
4'-O-Methyl-Epicatechin	7,56 \pm 1,14	8,41 \pm 0,99	7,19 \pm 0,78
LP-Produkt (n=12)			
Epicatechin	2,63 \pm 0,57	1,82 \pm 0,17	2,19 \pm 0,21
3'-O-Methyl-Epicatechin	1,68 \pm 0,39	1,3 \pm 0,2	1,65 \pm 0,3
4'-O-Methyl-Epicatechin	6,84 \pm 0,74	5,13 \pm 0,66	6,68 \pm 0,83

Tab. 3.8: Gehalte von Epicatechin und dessen O-Methyl-Metabolite in Erythrozyten nach 3-monatiger Supplementierung mit HP- bzw. LP-Pulver (\pm SEM)

Wochen	Flavanolgehalt in Erythrozyten (nM)		
	0	6	12
HP-Produkt (n=7)			
Epicatechin	4,82 \pm 1,82	4,28 \pm 1,62	5,22 \pm 1,97
3'-O-Methyl-Epicatechin	2,02 \pm 0,76	1,61 \pm 0,61	2,11 \pm 0,8
4'-O-Methyl-Epicatechin	5,96 \pm 2,25	6,71 \pm 2,53	6,21 \pm 2,35
LP-Produkt (n=12)			
Epicatechin	12,87 \pm 3,57	12,28 \pm 3,41	11,93 \pm 3,31
3'-O-Methyl-Epicatechin	3,49 \pm 0,97	1,32 \pm 0,37	2,57 \pm 0,71
4'-O-Methyl-Epicatechin	5,17 \pm 1,43	5,75 \pm 1,6	5,77 \pm 1,6

3.2.2.2 Gaschromatographische Bestimmung des Fettsäure-Musters im Blut nach 3-monatiger Supplementierung mit HP- und LP-Pulver

Untersucht wurde das Verhältnis von ω -6/ ω -3-FS, sowie die Anteile der vorherrschenden Fettsäuren dieses Kakaos (Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure) in Plasma und Erythrozytenlipiden.

In der HP-Gruppe konnte eine statistisch signifikante Veränderung des ω -6/ ω -3-FS-Verhältnisses zwischen dem Startwert ($11,4 \pm 1,37$) und nach 12 Wochen-Supplementierung ($6,89 \pm 0,95$; $p < 0,03$) beobachtet werden (**Abb. 3.14**). In der LP-Gruppe gab es keine Veränderung. Auch der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte nach 12 Wochen einen signifikanten Unterschied des ω -6/ ω -3-Verhältnisses zwischen der HP-Gruppe ($6,89 \pm 0,95$) und der LP-Gruppe ($17 \pm 3,41$; $p < 0,02$). In Erythrozyten traten keine Änderungen des ω -6/ ω -3-FS-Verhältnisses auf.

Eine signifikante Änderung des Anteils von Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure an der Summe der Fettsäuren in Plasma oder Erythrozyten konnte in keiner der beiden Gruppen festgestellt werden. Die Ergebnisse der Plasma-Analytik sind in **Tab. 3.9**, die der Erythrozyten-Analytik in **Tab. 3.10** aufgelistet.

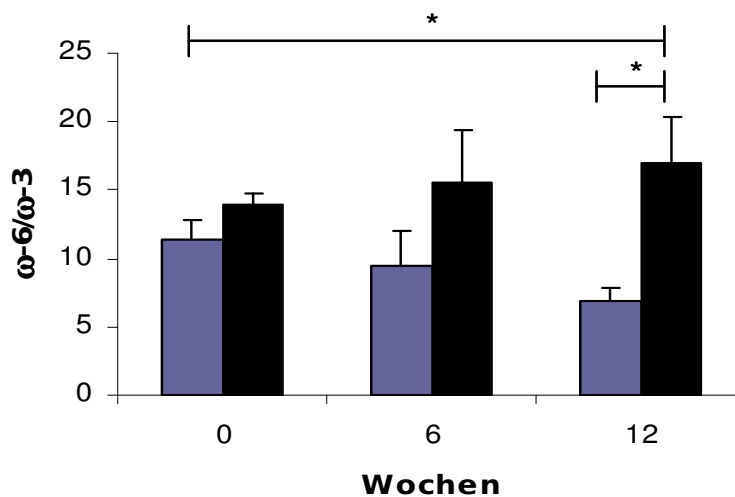


Abb. 3.14: ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis in Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen aus HP-Pulver (blau) und LP-Pulver (schwarz)

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.9: Fettsäure-Zusammensetzung in Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen (\pm SEM)

Wochen	0	6	12
HP-Produkt (n=6)			
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	11,38 \pm 1,37	9,43 \pm 2,54	6,89 \pm 0,95* **
Palmitinsäure (%)	18,87 \pm 3,50	21,21 \pm 1,66	20,86 \pm 1,32
Stearinsäure (%)	6,42 \pm 0,38	6,54 \pm 0,38	9,12 \pm 1,85
Ölsäure (%)	24,4 \pm 1,29	22,7 \pm 1,37	21,8 \pm 1,44
LP-Produkt (n=9)			
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	14,02 \pm 0,79	15,48 \pm 3,90	16,98 \pm 3,41
Palmitinsäure (%)	17,9 \pm 2,61	24,11 \pm 4,19	17,94 \pm 2,34
Stearinsäure (%)	4,78 \pm 0,94	6,30 \pm 0,68	6,54 \pm 0,36
Ölsäure (%)	22,7 \pm 1,82	22,9 \pm 3,04	24,9 \pm 1,89

* signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,03

** signifikant unterschiedlich zur LP-Gruppe; p<0,02

Tab. 3.10: Fettsäure-Zusammensetzung in Erythrozyten vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit Kakaopolyphenolen (\pm SEM)

Wochen	0	6	12
HP-Produkt (n=6)			
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	3,08 \pm 0,35	3,63 \pm 0,38	3,52 \pm 0,29
Palmitinsäure (%)	N.N.	N.N.	N.N.
Stearinsäure (%)	18,93 \pm 1,53	19,87 \pm 1,15	18,53 \pm 4,13
Ölsäure (%)	26,19 \pm 1,72	24,63 \pm 4,30	23,31 \pm 4,20
LP-Produkt (n=9)			
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	5,23 \pm 0,35	6,62 \pm 1,03	5,52 \pm 0,57
Palmitinsäure	N.N.	N.N.	N.N.
Stearinsäure	27,12 \pm 1,89	23,25 \pm 1,57	25,22 \pm 9,41
Ölsäure	28,08 \pm 3,32	29,53 \pm 0,56	20,83 \pm 4,14

N.N.: nicht nachweisbar

3.2.2.2.3 Mikrozirkulation, Photoprotektion und Hautphysiologie

Kutane und subkutane Mikrozirkulation

In **Kapitel 3.2.2.1.2** wurde ein Anstieg des relativen Blutflusses (BF) und der Sauerstoffsättigung (S-O₂) 2 h nach Verzehr einer Einmaldosis HP-Kakaopulver gemessen. Dieser Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob diese Verbesserung der Mikrozirkulation auch bei täglichem Konsum einer Dosis HP-Kakaopulver über einen Zeitraum von 12 Monaten auftritt. Dabei wurde zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen die kutane (1 mm Hauttiefe) und subkutane (6-8 mm Hauttiefe) Hautdurchblutung mit den Messparametern Sauerstoffsättigung, relativer Blutfluss, Blutflussgeschwindigkeit (BV) und relative Hämoglobinkonzentration (rHb) charakterisiert.

Hautmessungen in 1 mm Tiefe zeigten, dass der BF in der HP-Gruppe nach 6 Wochen von $16 \pm 7,1$ auf 24 ± 12 ($p < 0,07$) angestiegen war. Nach 12 Wochen stieg der BF auf $32 \pm 16,1$ ($p < 0,008$) an. Die Sauerstoffsättigung stieg von $37 \% \pm 17,0 \%$ zu Beginn der Studie um das 1,6-fache auf $58 \% \pm 16,6 \%$ ($p < 0,06$) nach 12 Wochen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.15** und **Abb. 3.16** graphisch dargestellt. Keine Veränderungen wurden in der HP-Gruppe bei der relativen Hämoglobin-Konzentration und der Blutfluss-Geschwindigkeit festgestellt.

Die Messung der Durchblutungsgrößen in subkutanem Gewebe (6-8 mm) ergab einen Anstieg des Blutflusses von $133 \pm 57,4$ auf $183 \pm 65,7$ ($p < 0,07$) in der HP-Gruppe. Zudem wurde eine Erhöhung der Sauerstoffsättigung des Blutes von $63 \% \pm 19,0 \%$ auf $79 \% \pm 7,1$ ($p < 0,02$) nach 6 Wochen und $82 \% \pm 4,9 \%$ ($p < 0,007$) nach 12 Wochen gemessen. Die Anstiege der relativen Hämoglobinkonzentration und der relativen Blutflussgeschwindigkeit waren statistisch nicht signifikant.

Nach Einnahme des LP-Kakaogetränkes war die Sauerstoffsättigung des Blutes in 1 mm Tiefe von $17 \% \pm 7,8 \%$ auf $21 \% \pm 13,2 \%$ leicht erhöht (statistisch nicht signifikant). Eine Erhöhung des relativen Blutflusses konnte nicht festgestellt werden; auch die Blutflussgeschwindigkeit und die relative Hämoglobinkonzentration änderten sich in der LP-Gruppe nicht.

Die Messung der Durchblutungsgrößen in tieferen Schichten (6 bis 8 mm) ergab keinerlei Erhöhung der Sauerstoffsättigung oder des relativen Blutflusses.

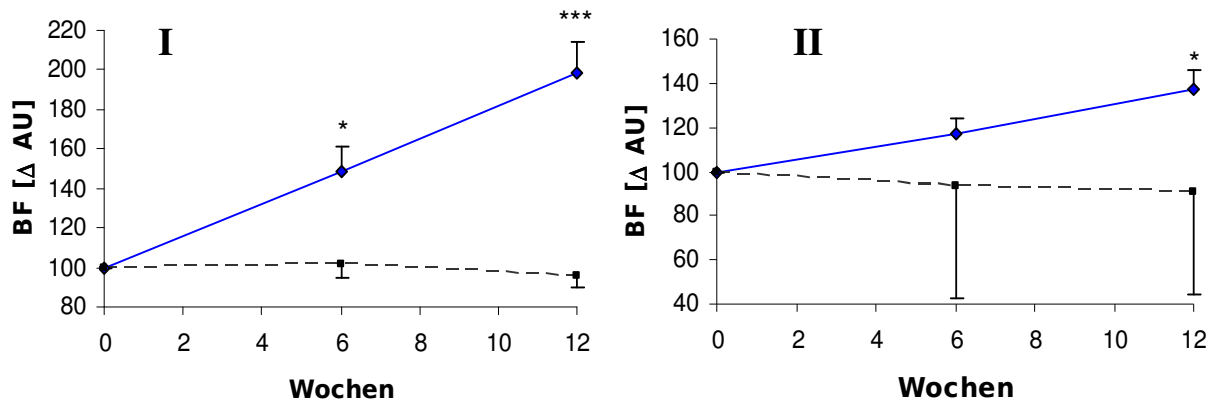


Abb. 3.15: Änderung des Blutflusses (BF) nach täglichem Konsum von HP-Pulver (—) und LP-Pulver(---) in (I) 1 mm und (II) 6-8 mm Hauttiefe

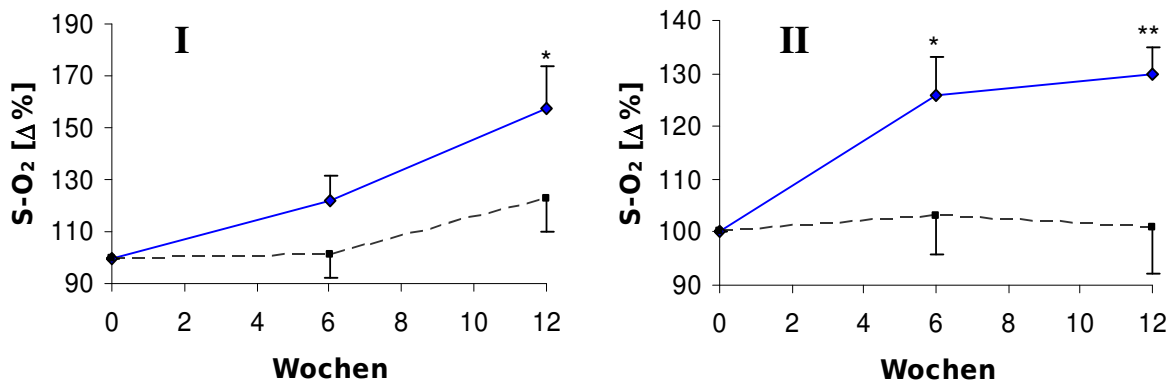


Abb. 3.16: Änderung der Sauerstoffsättigung (S-O₂) nach täglichem Konsum von HP-Pulver (—) und LP-Pulver (---) in (I) 1 mm und (II) 6-8 mm Hauttiefe

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.11: Parameter der Mikrozirkulation, nach täglicher Einnahme einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver(\pm SD)

Wochen	0	6	12
HP-Kakaopulver (n=12)			
1 mm Meßtiefe			
S-O ₂ (%)	37 \pm 17,0	45 \pm 10,2	58 \pm 16,6*
rHb (AU)	24 \pm 5,6	23 \pm 3,6	24 \pm 3,1
BF (AU)	16 \pm 7,1	24 \pm 12*	32 \pm 16,1***
BV (AU)	21 \pm 12,6	20 \pm 12,9	22 \pm 8,7
6-8 mm Meßtiefe			
S-O ₂ (%)	63 \pm 19	79 \pm 7,1**	82 \pm 4,9***
rHb (AU)	72 \pm 14,3	72 \pm 14,7	78 \pm 15,3
BF (AU)	133 \pm 57,4	155 \pm 61,1	183 \pm 65,7*
BV (AU)	35 \pm 17,4	31 \pm 15,6	43 \pm 16,6
LP-Kakaopulver (n=12)			
1 mm Meßtiefe			
S-O ₂ (%)	17 \pm 7,8	17 \pm 9,1	21 \pm 13,2
rHb (AU)	25 \pm 6,9	21 \pm 4,1	21 \pm 4,0
BF (AU)	17 \pm 8,6	17 \pm 6,3	16 \pm 5,5
BV (AU)	17 \pm 6,9	15 \pm 4,3	14 \pm 5,2
6-8 mm Meßtiefe			
S-O ₂ (%)	76 \pm 8,6	78 \pm 7,2	76 \pm 8,7
rHb (AU)	66 \pm 13,1	65 \pm 13,9	63 \pm 11,6
BF (AU)	144 \pm 45,2	134 \pm 50,4	131 \pm 46,9
BV (AU)	30 \pm 8,7	27 \pm 11,2	27 \pm 8,6
* statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,06			
** statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,04			
*** statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,008			

Photoprotektive Effekte

In mehreren Interventionsstudien ist gezeigt worden, dass eine erhöhte Aufnahme von Mikronährstoffen Schutz vor dem UV-induzierten Erythem vermittelt. In der vorliegenden Studie wurde eine verminderte Erythembildung (Sonnenbrand-Reaktion) als Indikator einer photoprotektiven Wirkung vermessen. Die Probanden wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen mit HP- bzw. LP-Kakaopulver (18g/Tag) supplementiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 6$ und 12 Wochen wurde mittels eines Sonnenlichtsimulators (Bestrahlung mit 1,25 MED) in einem kleinen Hautareal ein Erythem erzeugt. Die Erythemintensität wurde mittels Chromametrie ermittelt. Hierbei ist der Chromametrie a -Wert Indikator für die Hautröte. Die Intensität des Erythems wird 24 h nach UV-Exposition (stärkste Ausprägung des Sonnenbrands) durch Messung des a -Wertes ermittelt. Von diesem a -Wert (24 h) muss die individuelle Grundrötung der Haut (a -Wert vor Bestrahlung) subtrahiert werden. Der Δa -Wert ist also ein Maß für die Stärke der Sonnenbrandreaktion. Wenn die Intervention mit Kakaopolyphenolen protektiv wirkt, sollte der Δa -Wert im Studienverlauf abnehmen.

Es wurde deutlich, dass in der HP-Gruppe bereits nach 6 Wochen eine statistisch signifikante Verringerung der Δa -Werte auf $2,3 \pm 1,86$ im Vergleich zum Beginn der Studie ($4,8 \pm 1,45$) erzielt werden konnte ($p < 0,06$). Nach 12 Wochen waren die Δa -Werte weiter auf $1,5 \pm 0,68$ gesunken ($p < 0,008$). Dies entspricht einer Abnahme der Erythemintensität nach Bestrahlung mit 1,25 MED um 69 % (siehe **Abb. 3.17**). Der Rotanteil im Kontrollfeld (unbestrahltes Gewebe) änderte sich dabei nicht, woraus hervorgeht, dass die Supplemente selbst keine Veränderungen der Hautröte verursachen.

Mittels Chromametrie können auch der Gelbanteil (b -Wert) und die Helligkeit der Haut (L -Wert) bestimmt werden. Beide Parameter blieben während der Studie in der HP-Gruppe unverändert.

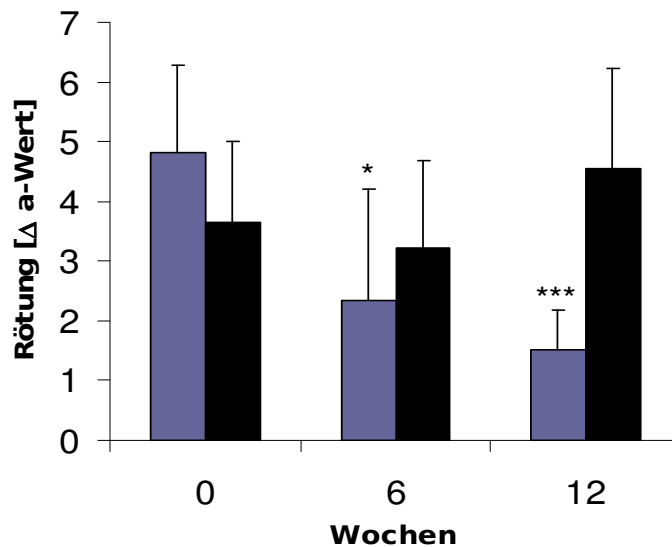


Abb. 3.17: Änderung der Hautröte (Δa -Werte) im UV-induzierten Erythem nach täglichem Konsum von HP-Pulver (blau) und LP-Pulver (schwarz)

n der LP-Gruppe ist ein leichter Anstieg der Δa -Werte im induzierten Erythem von $3,7 \pm 1,35$ zu Beginn der Studie auf $4,6 \pm 1,67$ nach 12 Wochen beobachtet worden (statistisch nicht signifikant). Es wurden weder Veränderungen der Helligkeit, noch der Hautröte im Verlauf der 12 Wochen gemessen. Auffällig war jedoch eine leichte Abnahme des b -Wertes von $17,7 \pm 2,6$ auf $15,4 \pm 2,3$ ($p < 0,04$) nach 6 Wochen und $15,5 \pm 2,04$ ($p < 0,08$) nach 12 Wochen. In **Tab. 3.12** sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss auf die Photoprotektion und Hautfarbe zusammengefasst.

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.12: Photoprotektion nach täglicher Einnahme einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver(\pm SD)

Wochen	0	6	12
HP-Kakaopulver (n=12)			
vor Bestrahlung			
<i>L</i> -Wert	66,8 \pm 33,8	66,5 \pm 63,4	66,5 \pm 52,8
<i>b</i> -Wert	17,4 \pm 3,16	16,7 \pm 2,92	16,5 \pm 3,22
<i>a</i> -Wert	7,7 \pm 2,2	8,2 \pm 2,0	7,9 \pm 1,9
nach Bestrahlung (1,25 MED)			
<i>L</i> -Wert	63,7 \pm 3,6	64,5 \pm 3	63,9 \pm 2,4
<i>b</i> -Wert	16,7 \pm 62,76	16,3 \pm 22,7	16,2 \pm 2,99
<i>a</i> -Wert	12,5 \pm 1,8	10,5 \pm 2,1*	9,4 \pm 1,8***
Δa-Wert	4,8 \pm 1,45	2,3 \pm 1,86*	1,5 \pm 0,68***
LP-Kakaopulver (n=12)			
vor Bestrahlung			
<i>L</i> -Wert	66,4 \pm 3,7	66,5 \pm 2,7	67,2 \pm 2,85
<i>b</i> -Wert	17,7 \pm 2,6	15,4 \pm 2,34**	15,5 \pm 2,04*
<i>a</i> -Wert	7,4 \pm 1,9	8 \pm 1,6	7,4 \pm 2,2
nach Bestrahlung (1,25 MED)			
<i>L</i> -Wert	63,8 \pm 23,7	64,12 \pm 3,8	63 \pm 3
<i>b</i> -Wert	18,5 \pm 2,68	15,9 \pm 2,3	16 \pm 2,08
<i>a</i> -Wert	11,1 \pm 2,7	11,2 \pm 2,8	11,9 \pm 2,8
Δa-Wert	3,7 \pm 1,35	3,2 \pm 1,46	4,6 \pm 1,67

* statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,06

** statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,04

*** statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,008

Hautphysiologie

In der gleichen Studie wurden die Parameter Oberflächenstruktur und Textur, Hydratation, Elastizität und Haarqualität bestimmt; die Ergebnisse sind in **Tab. 3.13** gesondert zusammengestellt.

SELS – Oberflächenstruktur und Textur; Dichte und Dicke der Haut

Im SELS-Verfahren (*surface evaluation of living skin*, **Kapitel 2.4.3.2**) wird die Oberflächenstruktur mit vier verschiedenen Parametern beschrieben: Hautrauigkeit, -schuppigkeit, -glätte und -faltigkeit. Das Messprinzip des SELS-Verfahrens beruht auf der hochaufgelösten bildlichen Darstellung der lebenden Haut unter einer speziellen Beleuchtung und anschließender digitaler Bearbeitung und Auswertung der bildlichen Darstellung mit Hilfe einer speziellen Software. Die Methode ermöglicht es, standardisierte Bilder vor und nach einer Anwendungsphase zu erhalten, wie in **Abb. 3.18** exemplarisch dargestellt.

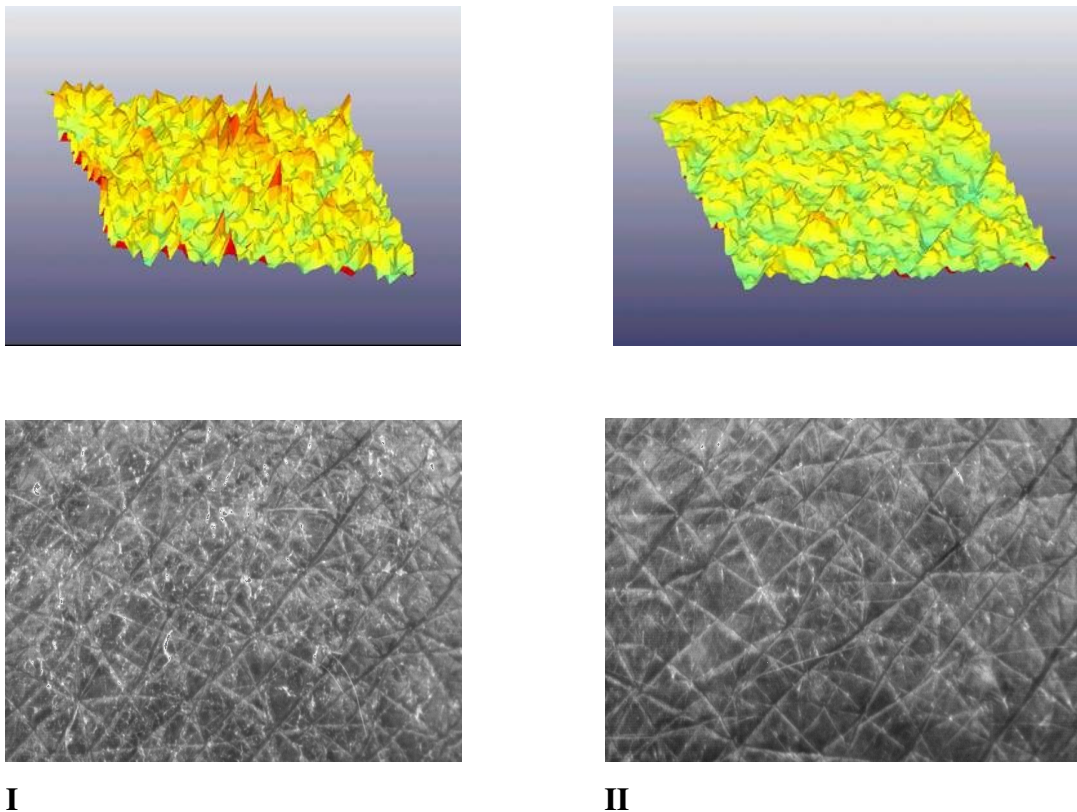


Abb. 3.18: Beispiel eines mit dem SELS-Verfahren ermittelten Oberflächenprofils der Haut (oben), sowie das reale Bild (unten)

(**I**) vor und (**II**) 12 Wochen nach täglicher Einnahme von HP-Pulver

Die Hautfeuchtigkeit wird mittels Corneometrie bestimmt; hierbei wird in relativen Messeinheiten mittels einer kapazitiven Methode die Hautfeuchtigkeit ermittelt. Die Qualität der Barrierefunktion wird über den Grad des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) gemessen. Bei der Messung wird die Wasserverdunstung direkt an der Hautoberfläche mittels einer Spezialsonde gemessen.

In der HP-Gruppe ergab die Messung der Hautfeuchtigkeit einen Anstieg von 39 ± 4 auf $44,2 \pm 8$. Dies entspricht einer Zunahme der Hautfeuchtigkeit von 13 %. Der transepidermale Wasserverlust konnte im Verlauf der Studie von $8,7 \pm 3,7$ auf $6,3 \pm 2,2$ g/h*m² ($p < 0,07$) vermindert werden, welches einer Verminderung von 28 % entspricht.

Zu einer Abnahme der Hautfeuchtigkeit um 5 % kam es bei den Probanden der LP-Gruppe, wobei jedoch auch der transepidermale Wasserverlust um 4 % verringert wurde. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant.

Messung der Elastizität der Haut

Elastizitätsmessungen werden mit dem Cutometer durchgeführt, das aus einer mikroprozessorgesteuerten Pneumatik mit elektronischer Messung, sowie einer Spezialmeßsonde besteht. Die Haut wird während der Messung durch Unterdruck in die Öffnung der Meßsonde eingesogen. Dabei wird die Eindringtiefe der Haut in die Öffnung durch ein optisches Meßsystem berührungslos erfasst. Die Ansaugphase wird durch den Parameter „viscoelastische Eigenschaft“, die Rückbildungsphase durch den Parameter „biologische Elastizität“ wiedergegeben.

Die viscoelastische Eigenschaft wies keine statistisch signifikante Änderung in der HP-Gruppe auf. Die maximale Amplitude sowie die biologische Elastizität zeigten ebenfalls keine nennenswerten Veränderungen. Für keinen der Elastizitätsparameter konnte in der LP-Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Haaranalyse: Trichoscan

Dieser Versuch liefert quantitative sowie qualitative Aussagen über die Haarbeschaffenheit. Die Probanden der HP-Gruppe zeigten im Testfeld ($0,65$ cm²) eine gesteigerte Haardichte von $153 \pm 50,1$ zu Beginn der Studie auf $171 \pm 49,2$ nach 12 Wochen. Gleichzeitig konnte ein erhöhter Anteil von Anagenhaaren (von $79 \pm 5,7$ auf $83 \pm 4,9$) beobachtet werden, während

sich der Telogenhaar-Anteil von $22 \pm 6,3$ auf $17 \pm 4,9$ verringerte. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. In der LP-Gruppe konnte kein Unterschied der Haarqualität oder –quantität festgestellt werden.

Tab. 3.13: Hautphysiologie nach täglichem Konsum von einer Dosis HP-Kakaopulver bzw. LP-Kakaopulver (\pm SD)

Wochen	0	6	12
HP-Kakaopulver (n=12)			
Morphologie			
Rauhigkeit (AU)	$0,27 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,17$	$0,19 \pm 0,18$
Schuppigkeit (AU)	$0,14 \pm 0,09$	$0,1 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,06^*$
Faltigkeit (AU)	$42,2 \pm 5,08$	$41,8 \pm 4,05$	$41,8 \pm 4,06$
Glätte (AU)	$20,3 \pm 1,89$	$20,9 \pm 1,9$	$21,2 \pm 2,54$
Dichte (Pixel)	$10,2 \pm 1,73$	$11,3 \pm 2,08$	$11,9 \pm 1,64$
Dicke (mm)	$1,11 \pm 0,11$	$1,2 \pm 0,14$	$1,24 \pm 0,13^{**}$
Hydrationsparameter			
Feuchtigkeit (AU)	39 ± 4	$40,1 \pm 6$	$44,2 \pm 8$
TEWL (g/h*m ²)	$8,7 \pm 3,7$	$7,8 \pm 3,5$	$6,3 \pm 2,2^*$
Elastizität (AU)			
maximale Amplitude	$0,25 \pm 40,03$	$0,23 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,04$
biologische Elastizität	$0,72 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,08$
Viscoelastizität	$0,13 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,04$
Haarqualität und –quantität			
Summe aller Haare	$153 \pm 50,1$	$165 \pm 52,7$	$171 \pm 49,2$
Summe Anagenhaare	$79 \pm 5,7$	$81 \pm 4,0$	$83 \pm 4,9$
Summe Telogenhaare	$22 \pm 6,3$	$19 \pm 4,0$	$17 \pm 4,3$

* statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,06

** statistisch signifikante Abweichung von t=0; p<0,04

Fortsetzung Tab. 3.13

Wochen	0	6	12
LP-Kakaopulver (n=12)			
Morphologie			
Rauhigkeit (AU)	0,13 ± 0,2	0,17 ± 0,17	0,15 ± 0,13
Schuppigkeit (AU)	0,18 ± 0,22	0,11 ± 0,08	0,13 ± 0,11
Faltigkeit (AU)	44,4 ± 5,39	44 ± 5,09	43,7 ± 4,37
Glätte (AU)	19,6 ± 3,05	20,7 ± 2,13	20,5 ± 1,85
Dichte (Pixel)	12,5 ± 1,18	12,3 ± 1,37	12,4 ± 1,23
Dicke (mm)	1,05 ± 0,1	1,05 ± 0,1	1,04 ± 0,11
Hydrationsparameter			
Feuchtigkeit (AU)	38,2 ± 5	36,2 ± 4	36,3 ± 6
TEWL (g/h*m ²)	7,2 ± 4,2	7,4 ± 3,2	6,9 ± 2
Elastizität (AU)			
maximale Amplitude	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,03
biologische Elastizität	0,81 ± 0,07	0,81 ± 0,07	0,82 ± 0,06
Viscoelastizität	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,14 ± 0,04
Haarqualität und -quantität			
Summe aller Haare	185 ± 20,7	198 ± 31,7	193 ± 34,5
Summe Anagenhaare	73 ± 1,3	74 ± 1,8	73 ± 2,4
Summe Telogenhaare	27 ± 1,3	26 ± 1,8	27 ± 2,4

3.2.3 Interventionsstudie II: ω -3-Fettsäure-reiche vs. ω -3-Fettsäure- arme Nahrungsergänzung

In dieser Studie wurden die Effekte einer täglichen Zufuhr von Fettsäuren (FS) mit hohem bzw. geringem ω -3-FS-Anteil innerhalb eines Zeitraums von 12 Wochen untersucht. Es handelte sich um triglyceridisch gebundene FS aus pflanzlichem Material. Die Tagesdosis an α -Linolensäure (ALA) und Linolensäure (LA) (entsprechend 4 Kapseln) betrug in Gruppe A (Leinsamenöl) 1,05 g bzw. 0,33 g. Gruppe B (Distelöl) erhielt ein ALA-armes Produkt, die Tagesdosis betrug hier 14 mg ALA und 1,59 g LA. Die genaue Zusammensetzung der Kapseln ist in **Tab. 3.2** zusammengefasst. Gemessen wurde der Einfluss auf das FS-Muster in Plasma und Erythrozyten auf die Linol-/Linolensäure-Verteilung sowie das ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis. Des Weiteren wurden Änderungen der Sensitivität, Hydratation und Physiologie der Haut untersucht. In einem Vorversuch wurde die Bioverfügbarkeit der FS aus den Supplementen nach Einmalgabe bestimmt. Um einen Einblick in die Bioverfügbarkeit zu erlangen, wurde in einem Vorversuch über 8 h die Konzentration von ALA und LA im Plasma nach Einnahme von 3 Kapseln A bzw. B untersucht.

3.2.3.1 Gaschromatographische Analyse von Plasma und Erythrozyten

3.2.3.1.1 *Bioverfügbarkeit der FS nach Einmal-Dosis*

In diesem Vorversuch wurde die Bioverfügbarkeit von Linol (LA)- und α -Linolensäure (ALA) aus den Öl-Weichgelatine-kapseln in einem Zeitraum von 8 h untersucht. Des Weiteren wurde für jeden Zeitpunkt das Verhältnis des ω -6-FS-Anteils zum Anteil von ω -3-FS an den Gesamt-FS berechnet. Die Probanden erhielten nach einer Nüchternblut-Abnahme jeweils 3 Kapseln des Produktes A bzw. B. Die Studie wurde im Cross-over-Design durchgeführt. Zwischen den Studientagen lagen vier Wochen.

Interessanterweise konnte 4 h nach einer Supplementierung mit dem Produkt A ein Abfall des ALA-Anteils von $2,1 \% \pm 0,32 \%$ zum Zeitpunkt t_0 auf $1,5 \% \pm 0,23 \%$ beobachtet werden. Dieser Effekt war nach Einnahme der Kapsel B weniger stark ausgeprägt (s. **Tab. 3.14**).

Acht Stunden nach Einnahme beider Produkte konnte den ALA-Anteil betreffend ein Rückgang beobachtet werden, der nach Einnahme des Produktes A weniger ausgeprägt war. Der LA-Anteil wurde nicht beeinflusst. In **Abb. 3.20** ist eine graphische Darstellung der FS-

Anteile zu sehen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden Abweichungen der Anteile von LA- bzw. ALA an der Summe der ω -6- und ω -3-FS in relativen Einheiten (AU) ausgedrückt, wobei der Wert zum Zeitpunkt $t_0 = 1$ gesetzt wurde.

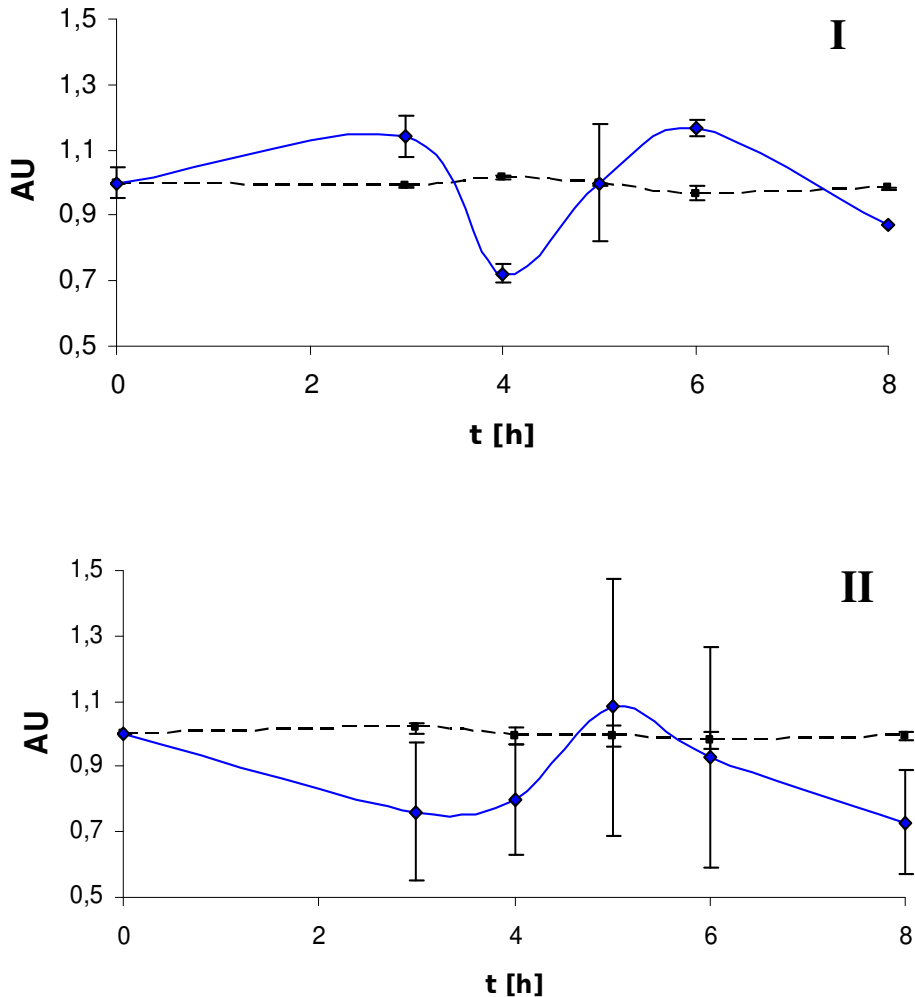


Abb. 3.20: Änderung des FS-Anteils von α -Linolensäure (—) und Linolsäure (---) nach Supplementierung mit 3 Kapseln (I) des Produktes A bzw. (II) des Produktes B

Weder nach Supplementierung mit Produkt A, noch mit Produkt B konnte eine Veränderung im ω -6/ ω -3-Verhältnis bestimmt werden.

Tab. 3.14: Anteile von α -Linolen (ALA) - und Linolsäure(LA) an gesamt- ω -6- und ω -3-FS, sowie das ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis nach Einnahme von Produkt A bzw. B (\pm SEM; n=3)

t [h]	FS-Zusammensetzung in Plasma					
	0	3	4	5	6	8
Kapsel A (n=3)						
ω -6/ ω -3	12,7 \pm 1,76	12,2 \pm 1,58	14,1 \pm 1,18	12,3 \pm 1,14	10,3 \pm 0,61	12,8 \pm 1,11
LA (%)	69,4 \pm 1,52	68,7 \pm 1,85	70,8 \pm 1,34	69,1 \pm 1,3	67,1 \pm 2,72	68,2 \pm 1,32
ALA (%)	2,1 \pm 0,32	2,38 \pm 0,27	1,5 \pm 0,23	2,1 \pm 0,41	2,4 \pm 0,47	1,83 \pm 0,31
Kapsel B (n=3)						
ω -6/ ω -3	10,5 \pm 2,98	13,5 \pm 7,04	12,4 \pm 6,71	12,3 \pm 5,63	10,6 \pm 1,57	11,7 \pm 3,78
LA (%)	70,1 \pm 3,03	71,3 \pm 4,05	69,7 \pm 3,48	69,7 \pm 3,48	68,7 \pm 1,27	69,6 \pm 2,18
ALA (%)	2,36 \pm 0,29	1,79 \pm 0,51	1,86 \pm 0,28	2,61 \pm 1,23	2,22 \pm 0,99	1,73 \pm 0,47

3.2.3.1.2 Beeinflussung des Fettsäure-Musters durch 3-monatige Supplementierung mit ω -3-FS-reichem bzw. -armen Öl

In dieser Interventionsstudie wurden von jeweils 13 Probanden über einen Zeitraum von 12 Wochen täglich 4 Kapseln des Produktes A bzw. B konsumiert; dies entspricht einer Menge von durchschnittlich 2,2 g triglyceridisch gebundenen Fettsäuren (FS). In einer Tagesdosis des Produktes A sind 1,05 g α -Linolensäure (ALA) bzw. 0,33 g Linolensäure (LA) enthalten; die Tagesdosis in Gruppe B betrug 14 mg ALA und 1,59 g LA (siehe **Kapitel 3.2.1.2**). Um eine Veränderung des Fettsäurespiegels nachzuweisen, wurde die FS-Zusammensetzung zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Wochen in Plasma und in Erythrozyten bestimmt. Der prozentuale Gesamtanteil von ω -6-FS wurde aus der Summe von Linolsäure, γ -Linolensäure, Homo- γ -linolensäure und Arachidonsäure gebildet, der der ω -3-FS aus der Summe von α -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, EPA, DPA und DHA errechnet.

Zu Beginn der Studie (t = 0) war kein statistisch signifikanter Unterschied in der FS-Zusammensetzung von Probanden der Gruppe A und Probanden der Gruppe B festzustellen. In Gruppe A wurde nach 6 Wochen ein Anstieg des prozentualen FS-Anteils der ω -3-FS von 9,51 \pm 0,94 % auf 10,1 \pm 0,98 % und nach 12 Wochen auf 10,2 \pm 0,55 % beobachtet. Die

ω -3-FS-Anteile in Gruppe A waren nach 6 bzw. 12 Wochen signifikant höher, als in Gruppe B ($p < 0,03$ bzw. $p < 0,02$). Der Gesamtanteil der ω -6-FS war in Gruppe A nach 6 Wochen von $92,2 \pm 1,12$ % auf $90,1 \pm 0,66$ % gefallen und damit statistisch signifikant geringer als in Gruppe B ($p < 0,03$). Daraus errechnet sich für Gruppe A ein günstigeres ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis als für Gruppe B nach 6 ($9,49 \pm 0,6$ % bzw. $14,7 \pm 1,86$ %; $p < 0,009$), sowie nach 12 Wochen ($9,19 \pm 0,66$ % bzw. $16,1 \pm 4,64$ %; $p < 0,009$); siehe **Abb. 3.21**.

Den Parameter α -Linolensäure betreffend konnte in Gruppe A ein signifikanter Anstieg des Anteils an gesamt- ω -6 und ω -3-FS von $1,6 \pm 0,15$ % auf $2,2 \pm 0,19$ % nach 6 Wochen und $2,3 \pm 0,17$ % nach 12 Wochen ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,04$) beobachtet werden. In der Gruppe B blieb der ALA-Anteil hingegen konstant (**Abb. 3.22**).

Im Gegensatz zu Gruppe A konnte in Gruppe B nach 6 Wochen ein signifikanter Anstieg des Linolsäureanteils von $68,9 \pm 1,2$ % zu Beginn der Studie auf $72,6 \pm 1,1$ % ($p < 0,04$) beobachtet werden, der nach 12 Wochen wieder vermindert war und sich nicht mehr vom Ausgangswert ($71,3 \pm 1,2$ %) unterschied (**Tab. 3.15**).

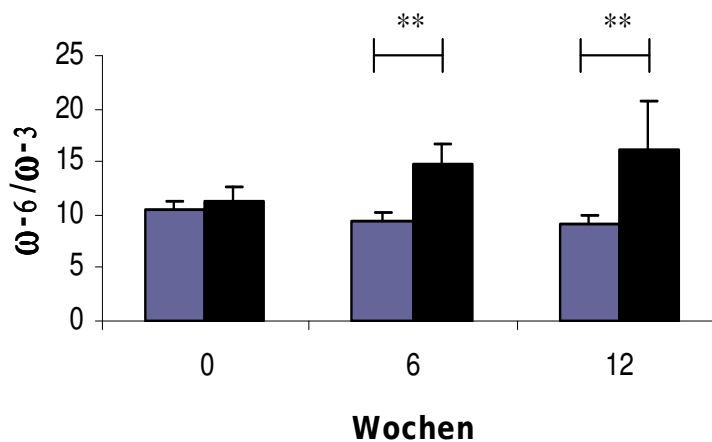


Abb. 3.21: Änderung des ω -6/ ω -3-FS-Verhältnisses nach Supplementierung mit ω -6/ ω -3FS-haltigen Kapseln: Produkt A, ω -3-reich (blau); Produkt B, ω -3-arm (schwarz)

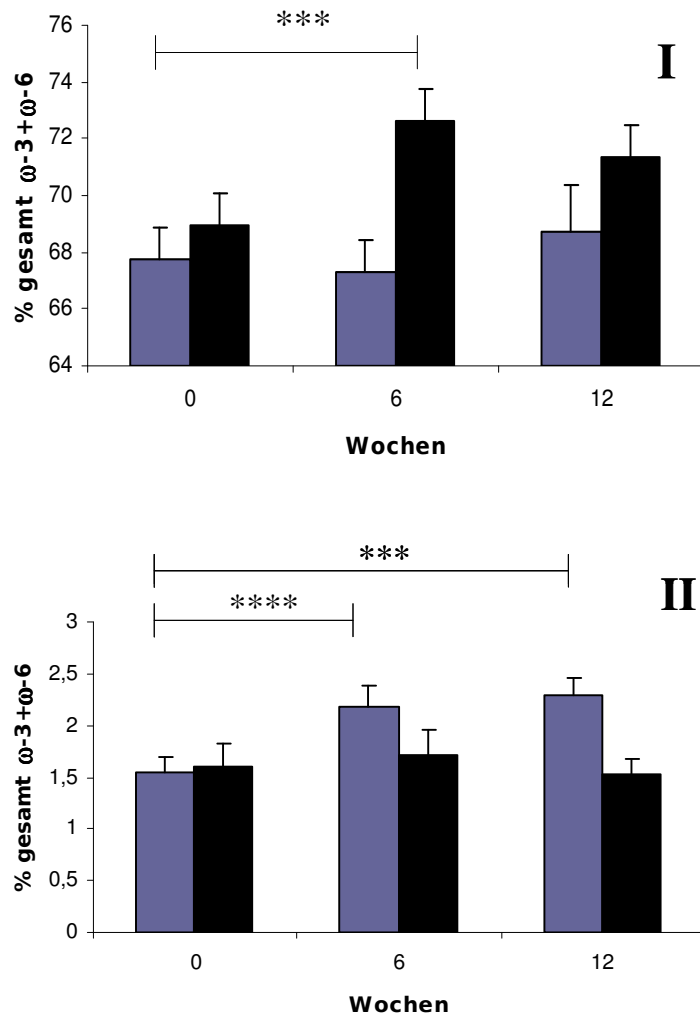


Abb. 3.22: Anteil von **(I)** Linolsäure und **(II)** Linolensäure an den gesamt- $\omega-6/\omega-3$ -FS nach Supplementierung mit $\omega-6/\omega-3$ -FS-haltigen Kapseln: Produkt A, $\omega-3$ -reich (blau); Produkt B, $\omega-3$ -arm (schwarz)

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.15: FS-Zusammensetzung im Plasma vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit ω -3-FS-reichen (Produkt A) bzw. ω -3-FS-armen (Produkt B) Kapseln (\pm SEM; n=13)

Wochen	FS-Zusammensetzung in Plasma		
	0	6	12
Kapsel A			
Summe ω -6-FS (%)	92,2 \pm 1,12	90,1 \pm 0,66*	91,4 \pm 1,16
Summe ω -3-FS (%)	9,5 \pm 0,94	10,1 \pm 0,98*	10,2 \pm 0,55*
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	10,5 \pm 0,98	9,5 \pm 0,6**	9,2 \pm 0,66**
Linolsäure (%)	67,7 \pm 1,1	67,3 \pm 1,1	68,8 \pm 1,6
α -Linolensäure (%)	1,6 \pm 0,15	2,2 \pm 0,19* ****	2,3 \pm 0,17* ***
Kapsel B			
Summe ω -6-FS (%)	90,8 \pm 0,98	92,7 \pm 0,81	92,4 \pm 0,76
Summe ω -3-FS (%)	9,2 \pm 0,98	7,3 \pm 0,81	7,6 \pm 0,76
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	11,3 \pm 1,29	14,7 \pm 1,86	16,1 \pm 4,64
Linolsäure (%)	68,9 \pm 1,2	72,6 \pm 1,1***	71,3 \pm 1,2
α -Linolensäure (%)	1,6 \pm 0,22	1,7 \pm 0,24	1,5 \pm 0,15

* statistisch signifikant zu Gruppe B p<0,04

*** statistisch signifikant zu t=0 p<0,04

** statistisch signifikant zu Gruppe B p<0,009

**** statistisch signifikant zu t=0 p<0,0001

In Erythrozyten stiegen die Anteile von α -Linolensäure und Linolsäure an der Summe aller ω -6- und ω -3-FS zwar tendenziell in beiden Gruppen, jedoch konnte aufgrund der hohen Streuung der Einzelwerte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Auch der Vergleich zwischen den Gruppen A und B zeigte keinen Unterschiede (siehe **Tab. 3.16**).

Es konnten keine Veränderungen des ω -6/ ω -3-FS-Verhältnisses in einer der beiden Gruppen festgestellt werden.

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.16: FS-Zusammensetzung in Erythrozyten vor, während und nach 3-monatiger Supplementierung mit ω -3-FS-reichen (Produkt A) bzw. ω -3-FS-armen (Produkt B) Kapseln (\pm SEM; n=13)

Wochen	FS-Zusammensetzung in Erythrozyten		
	0	6	12
Kapsel A			
Summe ω -6-FS (%)	83,37 \pm 0,93	83,46 \pm 0,7	83,78 \pm 1,24
Summe ω -3-FS (%)	16,43 \pm 1,10	16,43 \pm 0,77	16,43 \pm 1,43
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	5,48 \pm 0,62	5,24 \pm 0,34	5,47 \pm 0,488
Linolsäure (%)	40,3 \pm 0,9	42,6 \pm 1,3	44,3 \pm 1,9
α -Linolensäure (%)	0,9 \pm 0,14	1,0 \pm 0,16	1,2 \pm 0,14
Kapsel B			
Summe ω -6-FS (%)	85,24 \pm 0,89	86,36 \pm 0,57	85,25 \pm 0,54
Summe ω -3-FS (%)	14,76 \pm 0,89	13,64 \pm 0,57	14,75 \pm 0,54
ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis	6,08 \pm 0,47	6,48 \pm 0,33	5,89 \pm 0,28
Linolsäure (%)	42,1 \pm 1,0	46,4 \pm 1,4	44,4 \pm 0,8
α -Linolensäure (%)	0,5 \pm 0,14	0,5 \pm 0,18	0,8 \pm 0,15

3.2.3.2 Bestimmung von Sensitivität, Barrierefunktion und Physiologie der Haut vor und nach Supplementierung mit ω -3-FS-reichem und ω -3-FS-armen Öl

Hier sollte der Einfluß einer dreimonatigen Supplementierung mit ω -3-FS-reichen Kapseln (Produkt A) auf Sensitivität, Physiologie und Barrierefunktion der Haut untersucht werden. Als Vergleich diene das ω -3-arme Produkt B. Die Bestimmung der Oberflächenstruktur (SELS), der Hauthydratation (Corneometrie) und des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) erfolgen nach den **Kapitel 3.2.2.2.2** beschriebenen Methoden.

Die statistische Auswertung erfolgt über den Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon für jede Kombination zweier Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe. Hierbei wurden die Mittelwerte, deren prozentuale Veränderungen (PCM, *percentual changes of means*) nach 6 und 12 Wochen sowie das Signifikanzniveau p bestimmt (siehe **Tab. 3.17** und **Tab. 3.18**).

Sensitivität: Nicotinat-Test

Der Nicotinat-Test gibt Aufschluss über die Sensitivität der Haut. In diesem Test wird ein Erythem durch topische Applikation einer Nicotinatlösung induziert und die Differenz der Hautrötung (a -Wert) vor und nach der Erytheminduktion gebildet (Δa -Wert). Als weiterer Parameter der entzündlichen Reaktion wird der kapillare Blutfluss (BF) im Erythem gemessen. Eine Verminderung der Erythembildung und des BF kann als Indikator für verringerte Sensitivität der Haut angesehen werden [158].

Ein statistisch signifikanter Rückgang der Hautrötung um 48 % konnte in diesem Test nach 12-wöchiger Behandlung mit Produkt A beobachtet werden (von $\Delta a = 4,12$ auf $\Delta a = 2,13$; $p < 0,05$). Im Vergleich betrug die Verringerung nach Behandlung mit Produkt B nur 7 % und war statistisch nicht signifikant.

Auch der kapillare BF war in Gruppe A signifikant um 34 % (6 Wochen) um 66 % (12 Wochen) vermindert. Die Ergebnisse der Sensitivitäts-Untersuchungen sind in **Abb. 3.23** dargestellt.

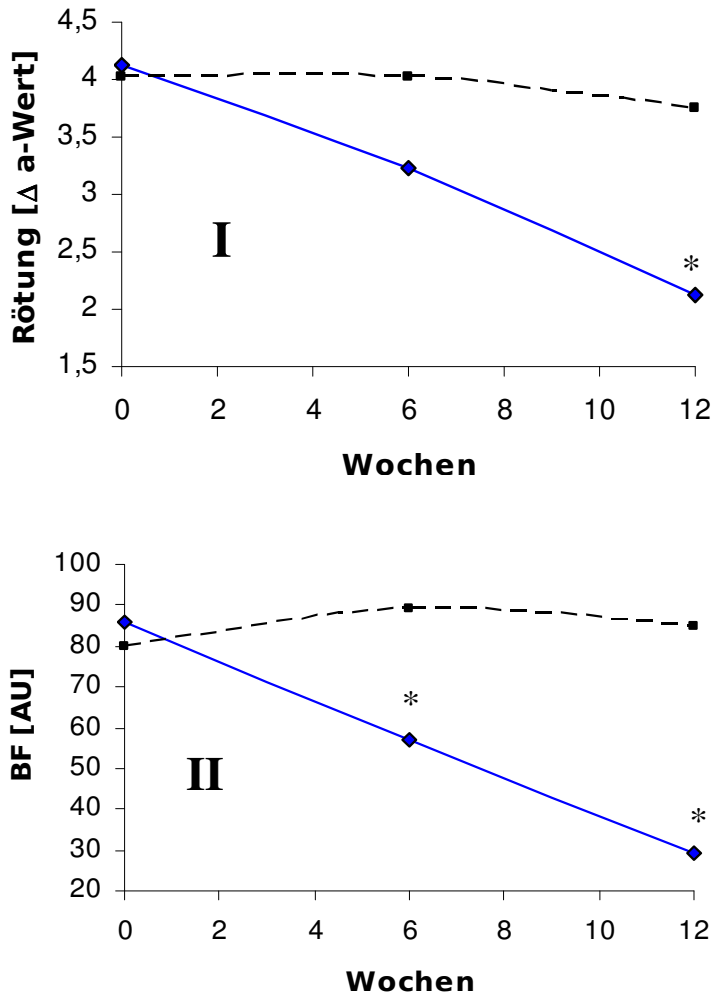


Abb. 3.23: Einfluß der Supplementierung mit Produkt A (—) und Produkt B (---) auf (I) die Hautrötung und (II) den Blutfluss im Nicotinat-induzierten Erythem

Barrierefunktion: Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Nach Supplementierung mit Produkt A wurde sowohl nach 6 Wochen (-21%; $p < 0,05$), als auch nach 12 Wochen (-31 %; $p < 0,05$) eine statistisch signifikante Verminderung des transepidermalen Wasserverlustes im Vergleich zu Beginn der Studie gemessen werden. Die Einnahme von Produkt B führte während des gesamten Zeitraumes zu keinen Veränderungen dieses Parameters.

Hydration:

In Gruppe A und in Gruppe B konnte ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Hauthydratation festgestellt werden; während der Anstieg in Gruppe B nur 13 % betrug, war in Gruppe A eine Erhöhung der Hydratation um 39 % zu beobachten.

Physiologie: Oberflächencharakterisierung lebender Haut (SELS)

In Gruppe A wurden folgende statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Studienbeginn beobachtet: Der Parameter Rauigkeit zeigte eine Verminderung nach 6 Wochen (-22 %; $p < 0,05$) und 12 Wochen (-30 %; $p < 0,05$), die Schuppigkeit hatte nach 12 Wochen um 31 % abgenommen.

In Gruppe B war lediglich der Parameter Rauigkeit vermindert werden (jeweils -10 % nach 6 und 12 Wochen; $p < 0,05$); Schuppigkeit, Faltigkeit und Glätte blieben unverändert.

Tab. 3.17: Sensitivität, Physiologie und Barrierefunktion der Haut nach täglichem Konsum von 4 Kapseln A (ω -3-reich) (\pm PCM; $n=13$)

Wochen	Kapsel A		
	0	6	12
Sensitivität: Nikotinat-Test			
Δa -Wert (AU)	4,12	3,23 - 22 %	2,13 - 48 %*
BF (AU)	86	57 - 34 %*	29 - 66 %*
Physiologie der Haut			
Rauigkeit (AU)	1,87	1,45 - 22 %*	1,31 - 30 %*
Schuppigkeit (AU)	0,97	0,83 - 15 %	0,66 - 31 %*
Faltigkeit (AU)	21,5	21,4 - 0,4 %	22 + 2%
Glätte (AU)	25,3	26 + 3 %	27,2 + 7 %*
Hydrationsparameter			
Feuchtigkeit (AU)	30	32 + 7 %	41 + 39 %*
TEWL (g/hm ²)	8,82	6,95 - 21 %*	6,05 - 31 %*

* $p < 0,05$; statistisch signifikante Abweichung von $t=0$ (Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon)

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.18: Sensitivität, Physiologie und Barrierefunktion der Haut nach täglichem Konsum von 4 Kapseln B (ω -3-arm) (\pm PCM; n=13)

Wochen	Kapsel B		
	0	6	12
⁶ Sensitivität: Nicotinat-Test			
Δa -Wert (AU)	4,03	4,02 - 0,2 %	3,76 - 7 %
BF (AU)	80	89 + 11 %	85 + 7 %
Physiologie der Haut			
Rauhigkeit (AU)	1,56	1,4 -10 %*	1,41 -10 %*
Schuppigkeit (AU)	0,95	0,89 - 6 %	0,82 - 14 %
Faltigkeit (AU)	22,3	22,9 + 2 %	23,1 + 4 %
Glätte (AU)	26,9	22,6 - 1 %	27,4 +2 %
Hydrationsparameter			
Feuchtigkeit (AU)	36	36 - 2 %	41 + 13 %*
TEWL (g/h*m ²)	6,95	6,54 - 6 %	6,13 - 12 %

* p<0,05 ; statistisch signifikante Abweichung von t=0 (Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon)

3.2.4 Interventionsstudie III – Einfluß von Flavonoiden auf den periphären arteriellen Tonus als Antwort auf reaktive Hyperämie (RH)

Ziel dieser Studie war es, den Einfluß einer Einmal-Dosis Flavanol, Flavanone und Procyanidine auf die durch Scherbeanspruchung induzierter Vasodilatation zu untersuchen. Gleichzeitig wurden die Plasmakonzentrationen der Testsubstanzen (siehe **Tab. 3.19**) und deren Metabolite bestimmt.

3.2.4.1 Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen

Die Blutabnahmen erfolgten unmittelbar vor, sowie 1, 2, 4, und 6 h nach Einnahme von 36 g Kakaopulver in 200 ml heißem Wasser, 5 Traubenkernextrakt (TKE)-Kapseln bzw. 5 Flavanon-Tabletten. In **Tab. 3.19** sind die an den Studientagen aufgenommenen Mengen an Polyphenolen aufgelistet. Nach Aliquotierung von Plasma und RBC wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Tab. 3.19: Auflistung der eingenommenen Menge an Polyphenolen (Einfachdosierung)

	HP-Kakao	TKE	Flavanone
Epicatechin (mg)	79,2	12,4	-
Catechin (mg)	37,8	12,4	-
Dimere (mg)	322,6		
Di- und Trimere (mg)		48,6	-
> Trimere (mg)	106,2	1551	-
Naringenin (mg)	-	-	102,2
Hesperetin (mg)	-	-	49,8

3.2.4.1.1 Flavanole

Nach Supplementierung mit 36 g HP-Kakaopulver (siehe **Tab. 3.19**) wurden die Konzentrationen von Epicatechin (Summe von freiem, glucuronidierten und sulfatierten Epicatechin), 3'-*O*-Methylepicatechin und 4'-*O*-Methyl-Epicatechin in Plasma und RBC bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.24** graphisch dargestellt. Der in Interventionsstudie I ermittelte Plasmakonzentrations-Verlauf von Epicatechin konnte hier bestätigt werden; nach bereits einer Stunde wurde eine maximale Konzentration (c_{\max}) von $166,2 \pm 47,9$ nM ($p < 0,05$) erreicht. Danach nahm die Konzentration wieder ab; nach 4 h konnte keine signifikante Differenz zu $t = 0$ h festgestellt werden, nach 6 h war der Basalwert wieder erreicht.

Eine ähnlicher Konzentrationsverlauf wurde für 3'-*O*-Methyl-Epicatechin beobachtet. Hier betrug bei der gleichen t_{\max} von 1 h die c_{\max} $492,5 \pm 111,2$ nM ($p < 0,003$). Auch hier konnte eine stetige Abnahme der Plasmakonzentration festgestellt werden. Im Gegensatz zum 3'-*O*-methylierten Metaboliten änderte sich die Konzentration an 4'-*O*-Methyl-Epicatechin nicht. In **Tab. 3.20** sind die jeweiligen Konzentrationen in Plasma und RBC zusammengestellt.

Die Analyse der Erythrozyten (RBC) ergab keinen Anstieg der Epicatechin-Konzentration bei einem der gewählten Messzeitpunkte. Die 3'-*O*-Methyl-Epicatechin-Konzentration stieg simultan zur gemessenen Plasma-3'-*O*-Methyl-Epicatechin-Konzentrationen nach einer Stunde auf ein Maximum von $141,2 \pm 39,0$ nM. Dieser Wert, wie auch die Konzentration zum Zeitpunkt $t = 2$ h ($48,2 \pm 9$ nM), waren statistisch signifikant unterschiedlich zu $t = 0$ h ($p < 0,05$). Alle weiteren Konzentrationen, wie auch die 4'-*O*-Methyl-Epicatechin-Konzentrationen änderten sich im Vergleich zum Basalwert nicht.

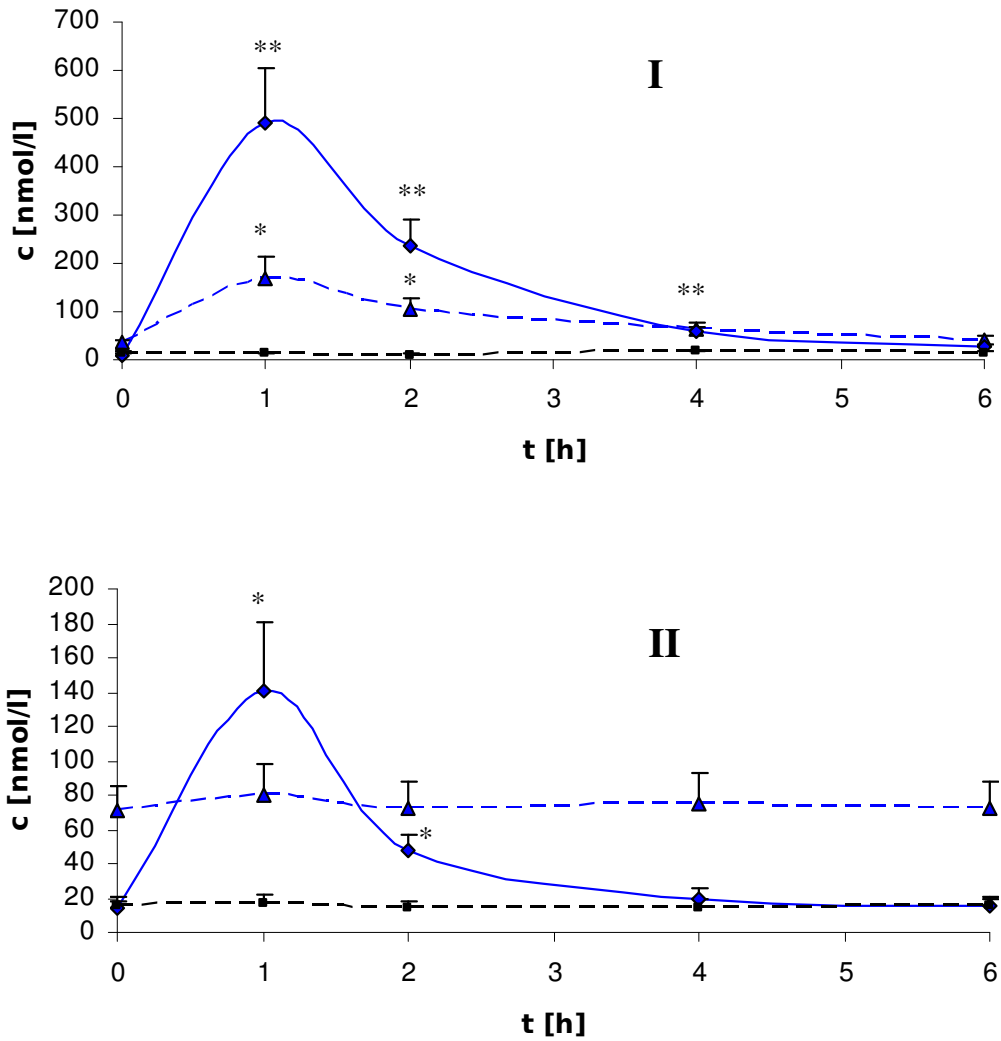


Abb. 3.24: Verläufe der Konzentrationen von gesamt-Epicatechin (-▲-), 3'-O-Methyl-Epicatechin (—) und 4'-O-Methyl-Epicatechin (-■-) in (I) Plasma und (II) Erythrozyten nach Einnahme von 36 g HP-Kakaopulver (entsprechend 117 mg Flavanol-Monomere)

Tab. 3.20: Flavanol-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 36 g HP-Kakaopulver (entsprechend 117 mg Flavanol-Monomere); 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl- Epicatechin

t [h]	Konzentration [nM ± SEM (n=4)]				
	0	1	2	4	6
Plasma					
Epicatechin	38,3 ± 3,29	166,2 ± 47,9*	104,4 ± 22,5*	65,8 ± 12,3	42,3 ± 7,9
3'-O-MetEC	10,4 ± 6,0	492,5 ± 111,2**	238,4 ± 50,6**	60,4 ± 8,1**	29,2 ± 4,1*
4'-O-MetEC	14,6 ± 1,3	14,2 ± 1,1	10,6 ± 3,8	17,8 ± 1,6	15,0 ± 1,9
RBC					
Epicatechin	70,5 ± 15,1	79,4 ± 18,2	72,1 ± 15,5	74,4 ± 19,0	72,4 ± 15,5
3'-O-MetEC	13,6 ± 4,3	141,2 ± 38,9*	48,2 ± 9,0*	19,7 ± 6,1	15,0 ± 4,2
4'-O-MetEC	15,6 ± 4,7	16,3 ± 5,3	14,0 ± 3,7	14,4 ± 5,0	15,7 ± 4,7

*signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,05

**signifikant unterschiedlich zu t=0 h p<0,005

3.2.4.1.2 Flavanone

Die Einnahme von 151,9 mg Flavanonen (siehe **Tab. 3.19**) führte zu unterschiedlichen Plasmakonzentrations-Verläufen für Hesperetin und Naringenin.

Hesperetin zeigte keine Änderung der Plasmakonzentration in den ersten 3 Stunden nach Einnahme der 5 Flavanon-Tabletten; zu den Zeitpunkten 4 und 6 h ist eine tendenzielle, jedoch statistisch nicht signifikante Zunahme der Hesperetin-Konzentration zu beobachten. Dagegen erreicht die Naringenin-Konzentration nach bereits einer Stunde ein c_{\max} von $171,5 \pm 2$ nM, welche sich signifikant von c_0 ($25,5 \pm 5,63$ nM) unterscheidet ($p < 0,02$). Danach fällt die Konzentration stetig ab, wobei der Kurvenverlauf dem des Epicatechins gleicht (siehe **Abb. 3.25**). Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.21** dargestellt.

In Erythrozyten konnte zu keinem Zeitpunkt Hesperetin oder Naringenin nachgewiesen werden.

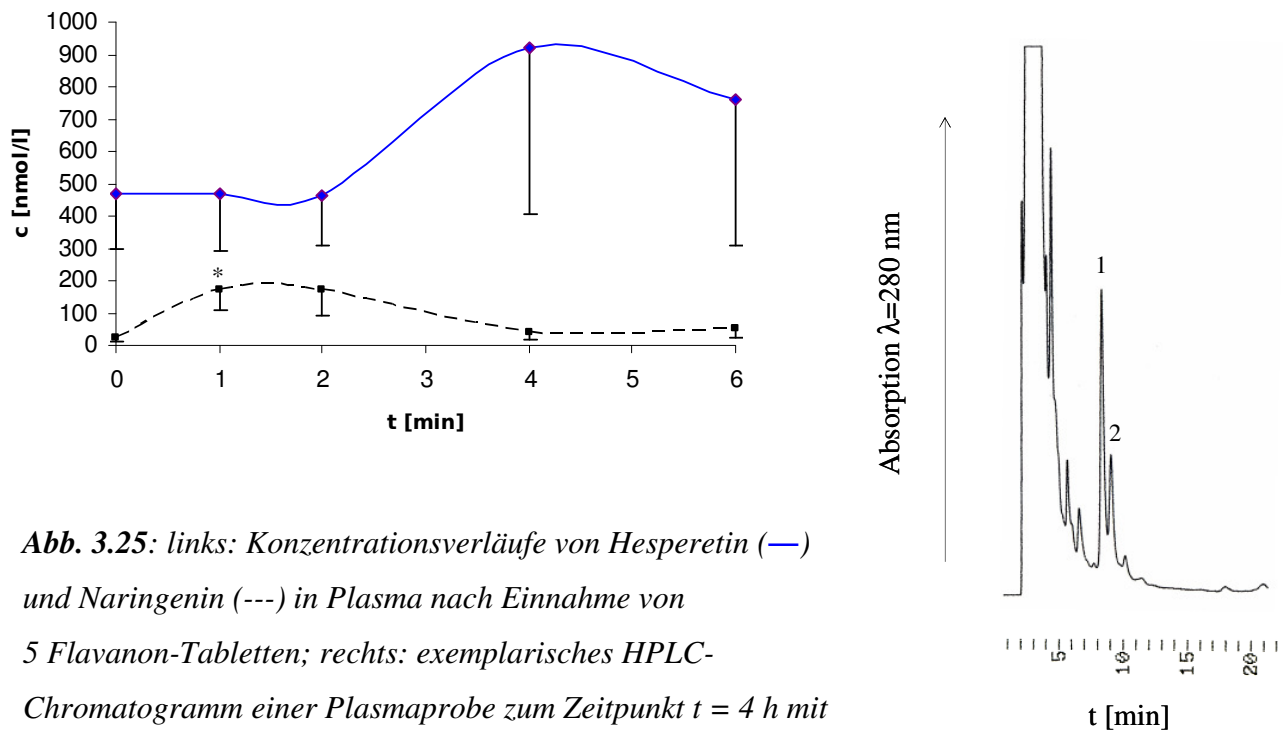


Abb. 3.25: links: Konzentrationsverläufe von Hesperetin (—) und Naringenin (---) in Plasma nach Einnahme von 5 Flavanon-Tabletten; rechts: exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Plasmaprobe zum Zeitpunkt $t = 4$ h mit 1: Naringenin und 2: Hesperetin; Detektion: UV = 280 nm

Tab. 3.21: Flavanon-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 151,9 mg Flavanonen

t [h]	Konzentration [nM ± SEM (n=4)]				
	0	1	2	4	6
Plasma					
Hesperetin	466,7 ± 71,3	467,5 ± 78,1	460,4 ± 50,6	922,9 ± 17,4	760,7 ± 52,9
Naringenin	25,5 ± 5,6	171,5 ± 2,0*	170,3 ± 0,5	38,6 ± 1,8	50,2 ± 5,7
RBC					
Hesperetin	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.
Naringenin	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.	N.N.

*Signifikant unterschiedlich zu $t=0$ h; $p < 0,02$

N.N.: nicht nachweisbar

3.2.4.1.3 Oligomere Procyanidine (OPC) aus Traubenkernextrakt (TKE)

Die an einem Tag eingenommene Menge an OPC betrug 1,6 g (siehe **Tab. 3.19**). Es konnte zu keinem Zeitpunkt in Plasma oder Erythrozyten Procyanidin B2 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Plasmakonzentrations-Verläufen, die nach Kakaoeinnahme zu beobachten waren, führte die Einnahme der OPC zu keinem Anstieg der monomeren Untereinheiten Catechin (N.N.) und Epicatechin (keine Abweichung vom Basalwert) oder deren Metabolite (**Tab. 3.22, Abb. 3.26**).

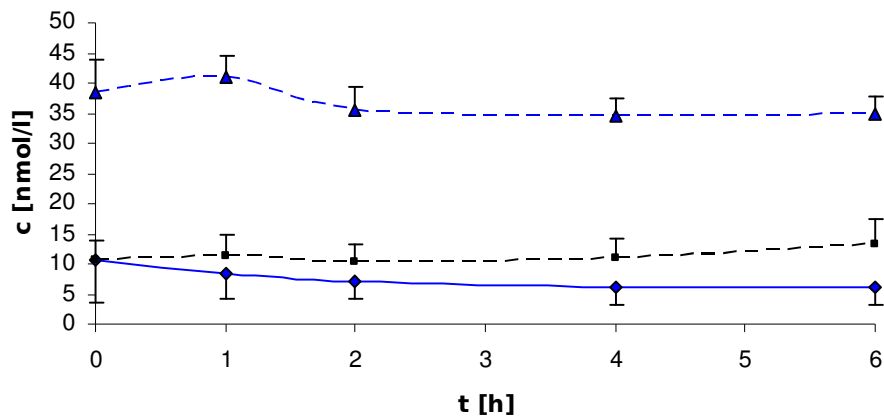


Abb. 3.26: Konzentrationen Epicatechin (-▲-), 3'-O-Methyl-Epicatechin (—) und 4'-O-Methyl-Epicatechin (-■-) in Plasma nach Einnahme von 1,6 g oligomerer Procyanidine

Tab. 3.22: Flavanol-Gehalte in Plasma und RBC nach Einnahme von 1,62 g TKE; 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl- Epicatechin

t [h]	Konzentration [nM ± SEM (n=4)]				
	0	1	2	4	6
Plasma					
Epicatechin	38,3 ± 5,64	40,8 ± 3,64	35,5 ± 3,69	34,5 ± 3,04	35 ± 2,85
3'-O-MetEC	10,5 ± 6,96	8,4 ± 4,35	7,2 ± 3,21	6,3 ± 3,05	6,04 ± 2,90
4'-O-MetEC	10,8 ± 3,15	11,3 ± 3,55	10,4 ± 2,90	11 ± 3,11	13,3 ± 3,93
RBC					
Epicatechin	67,3 ± 16,4	71,1 ± 7,63	71,5 ± 12,1	86,5 ± 25,2	59,8 ± 13,95
3'-O-MetEC	1,43 ± 0,46	2,19 ± 0,73	1,84 ± 0,81	2,42 ± 0,99	1,33 ± 0,57
4'-O-MetEC	17,2 ± 3,05	39,8 ± 21,75	18,8 ± 3,46	19,7 ± 3,03	18,4 ± 1,02

3.2.4.1.3 Kontrolle

Diese Studie wurde aufgrund der starken intraindividuellen Schwankungen des PAT-Index (siehe **Kapitel 4.1.4**) im cross-over-Design durchgeführt. Dazu wurde ein Testtag durchgeführt, an dem die Probanden anstelle des polyphenolhaltigen Supplementes ausschließlich Wasser zu sich nahmen; die Messung des peripheren arteriellen Tonus erfolgte wie an den anderen Studientagen. Aus Gründen der Compliance wurde zu den Zeitpunkten 0, 1 und 6 h eine Blutprobe entnommen.

In **Tab. 3.23** sind die Flavanol-, Flavanon- und Metabolit-Konzentrationen in Plasma bzw. RBC angegeben. Es konnte in keinem Fall ein signifikant erhöhter oder erniedrigter Wert festgestellt werden.

Tab. 3.23: Flavanol -, Flavanon- und Metabolit-Konzentrationen in Plasma bzw. RBC an den Kontrolltagen (keine Supplementierung); 3'-O-MetEC: 3'-O-Methyl-Epicatechin; 4'-O-MetEC: 4'-O-Methyl- Epicatechin

t [h]	Konzentration [nM ± SEM (n=4)]		
	0	1	2
Plasma			
Epicatechin	25,9 ± 12,6	19 ± 9,43	21,6 ± 11,3
3'-O-MetEC	0,83 ± 0,83	2,73 ± 0,92	4,33 ± 3,77
4'-O-MetEC	8,28 ± 3,43	6,26 ± 1,78	13,9 ± 6,2
Hesperetin	195,4 ± 54,2	240,6 ± 28,9	280,4 ± 81,8
Naringenin	68,8 ± 8,07	53,3 ± 16,4	25,6 ± 25,7
RBC			
Epicatechin	49,6 ± 19	67,1 ± 14	66,1 ± 17,3
3'-O-MetEC	0,82 ± 0,54	1,35 ± 0,43	1,7 ± 0,8
4'-O-MetEC	7,30 ± 2,42	8,80 ± 1,90	11,8 ± 4,7
Hesperetin	N.N.	N.N.	N.N.
Naringenin	N.N.	N.N.	N.N.

3.2.4.2 Bestimmung des peripheren arteriellen Tonus als Antwort auf Reaktive Hyperämie

Ziel dieser Studie war es, den Einfluß einer Einmal-Dosis Flavonoide auf das Ausmaß shear-stress induzierter Vasodilatation zu untersuchen. Bei dem dafür verwendeten Endo-PAT-Verfahren wird der periphäre arterielle Tonus (PAT) nicht-invasiv über pulsatile Volumenänderungen (PWA) in der Fingerbeere gemessen. Durch 5-minütige Okklusion des Testarmes wird Hypoxie hervorgerufen; anschließendes Lösen führt zu reaktiver Hyperämie, die mit einer Scherbeanspruchung der arteriellen Gefäße einhergeht. Dadurch kommt es zu einer sympathikus-unabhängigen Vasodilatation und einem damit verbundenen Anstieg der PWA. Der Endo-PAT-Index wird als Wert (Endo-PAT-Index zum Zeitpunkt x nach Supplementierung – Endo-PAT-Index zum Zeitpunkt t = 0 h) angegeben. In **Abb. 3.27** sind repräsentative Bestimmungen des Endo-PAT-Index vor und nach Supplementierung mit Kakaoflavanolen dargestellt.

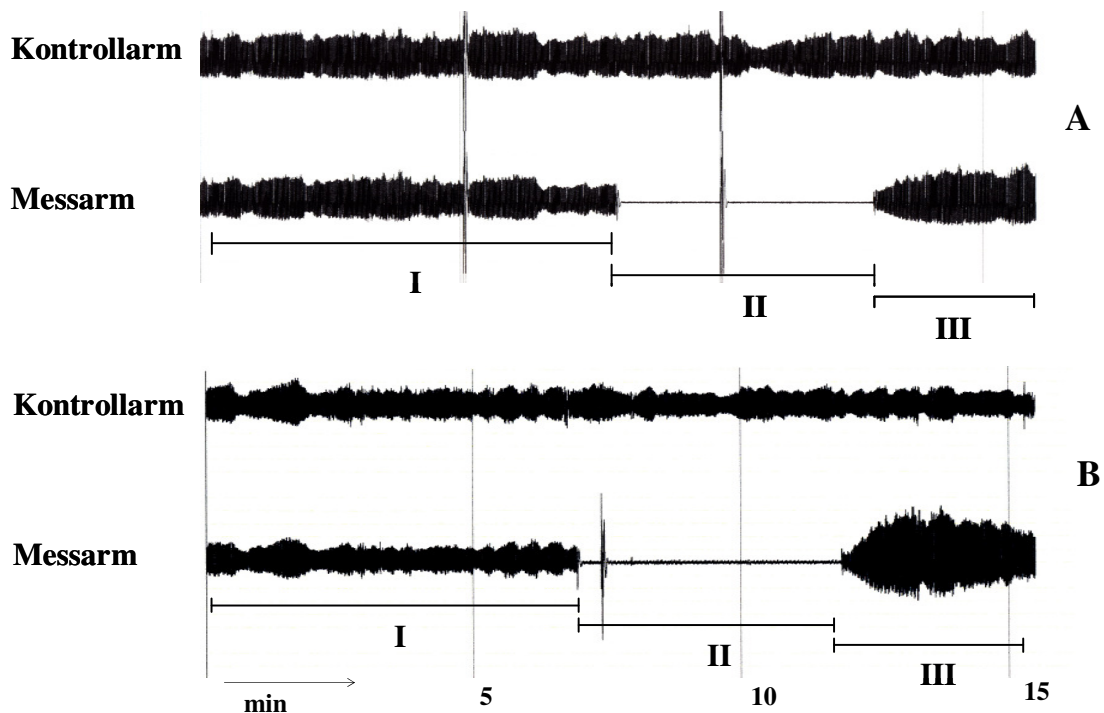


Abb. 3.27: Darstellung der Bestimmung des Endo-PAT-Index vor (A) und nach (B) Supplementierung mit Kakaoflavanolen (siehe Text); Strecke I: PWA im Grundzustand; Strecke II: PWA während der Okklusion; Strecke III: PWA während reaktiver Hyperämie: die erhöhte Amplitude stellt einen Indikator für erhöhte endotheliale Aktivität dar

In **Tab. 3.24** sind die Mittelwerte der Messungen aufgelistet; im Laufe der Studie wurde die Anzahl der Messzeitpunkte von 5 auf 6 erhöht, wodurch das Fehlen des 3 h-Wertes für Flavanon-Supplementierung zu erklären ist.

Als Flavanol-Quelle wurden 2 Dosen HP-Kakaopulver in 200 ml Wasser eingenommen (entsprechend 117 mg Flavanole und 428,8 mg oligomere Procyanidine). Nach bereits einer Stunde konnte ein erhöhter PAT-Index gemessen werden, aufgrund der anfänglich hohen Standardabweichungen wurde eine statistisch signifikante Erhöhung erst nach 3 Stunden gemessen ($0,69 \pm 0,14$; $p < 0,005$). Auch nach 6 Stunden war der Effekt noch zu beobachten ($0,44 \pm 0,1$; $p < 0,01$); siehe **Abb. 3.28**.

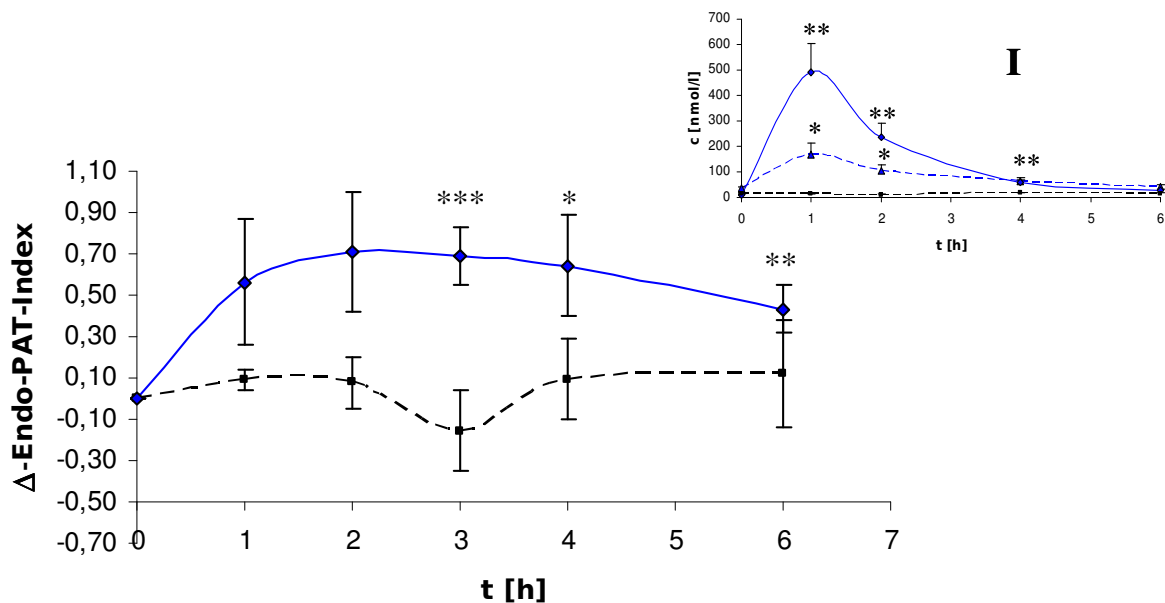


Abb. 3.28: PAT-Index nach Einnahme von zwei Dosen (36 g) HP-Kakao (—) im Vergleich zur Kontrolle (---); zum Vergleich (I): Flavanol-Konzentration in Plasma: gesamt-Epicatechin (-▲-), 3'-O-Methyl-Epicatechin (—) und 4'-O-Methyl-Epicatechin (-■-); $n = 4$ (vgl. **Abb. 3.24**)

Die Einnahme von 5 Flavanon-Tabletten (entsprechend 102,2 mg Naringenin und 49,8 mg Hesperetin) führte zu keinem Zeitpunkt zu einer verstärkten Dilatation während reaktiver Hyperämie (siehe **Abb. 3.29**)

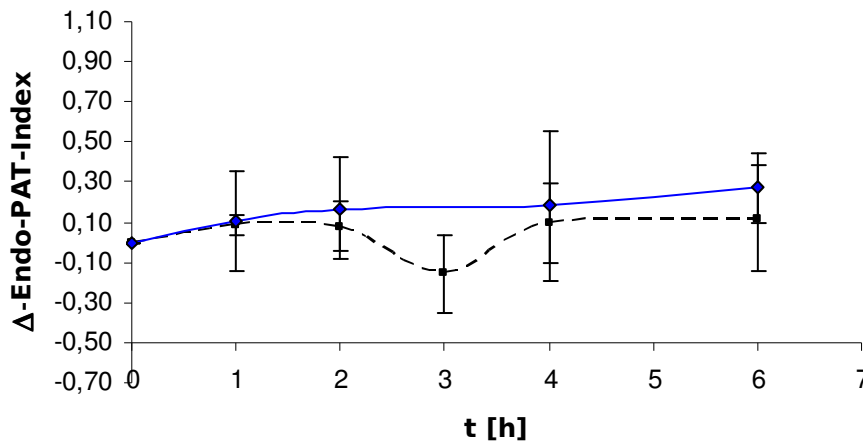


Abb. 3.29: PAT-Index nach Einnahme von 5 Tabletten (2,43 g) Flavanon-Konzentrat (—) im Vergleich zur Kontrolle (---) $n = 4$

Auch nach Supplementierung mit 5 Traubenkernextrakt-Kapseln (entsprechend 24,8 mg Flavanol-Monomere und 1,60 g oligomere Procyanidine) konnte keine Veränderung des PAT-Index festgestellt werden (siehe **Abb. 3.30**).

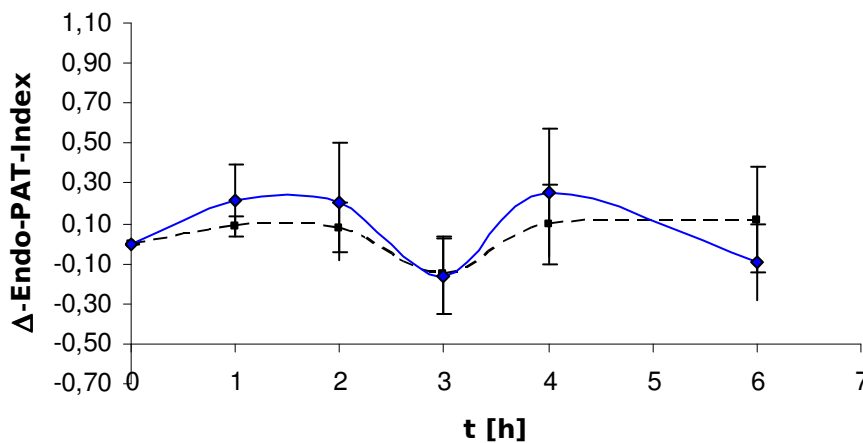


Abb. 3.30: PAT-Index nach Einnahme von 5 Kapseln (1,62 g) TKE (—) im Vergleich zur Kontrolle (---) $n = 4$

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.24: Δ PAT-Indices nach Supplementierung mit HP-Kakao, Flavanon-Tabletten oder OPC-Kapseln

t [h]	Δ PAT-Index (\pm SEM; n=4)					
	0	1	2	3	4	6
Supplementierung:						
HP-Kakao	0	0,56 \pm 0,30	0,71 \pm 0,29	0,69 \pm 0,14 ^{***}	0,65 \pm 0,24 [*]	0,44 \pm 0,1 ^{**}
Flavanon-Tabl.	0	0,11 \pm 0,25	0,17 \pm 0,25	-	0,18 \pm 0,37	0,27 \pm 0,17
OPC-Kapseln	0	0,22 \pm 0,18	0,21 \pm 0,29	-0,17 \pm 0,19	-0,26 \pm 0,32	-0,09 \pm 0,19
Kontrolle	0	0,09 \pm 0,05	0,08 \pm 0,13	-0,16 \pm 0,19	0,10 \pm 0,2	0,12 \pm 0,26

* signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,05

** signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,01

*** signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,005

3.3 Zellkultur

Die *in-vivo* beobachteten Effekte der eingesetzten bzw. detektierten Flavonoid-Gruppen wurden auf zellulärer Ebene untersucht. Dazu wurden murine Aorten-Endothelzellen kultiviert und mit Epicatechin, dem Dimer Procyanidin B2, dem Metaboliten 3'-O-Methyl-Epicatechin und Hesperetin behandelt. Nach Inkubationen für 3, 12 und 24 h wurde die Zellviabilität, die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions und die Lokalisation des Connexin43-Proteins in der Zelle gemessen. Als Kontrolle wurde Genistein, ein Isoflavon, verwendet.

3.3.1 Zellviabilität

Um toxische Effekte der Testsubstanzen in den verwendeten Konzentrationen auszuschließen, wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Inkubationsbedingungen, wie bei den späteren Versuchen eingehalten; die Auswertung erfolgt über die Abweichung der Viabilität in % von Zellen, die mit 0,1 % DMSO (Lösungsmittel-Kontrolle) behandelt wurden (100%). Für keine der Testsubstanzen konnte in den eingesetzten Konzentrationen ein Rückgang der Zellviabilität um mehr als 25 % festgestellt werden (siehe **Abb. 3.31**).

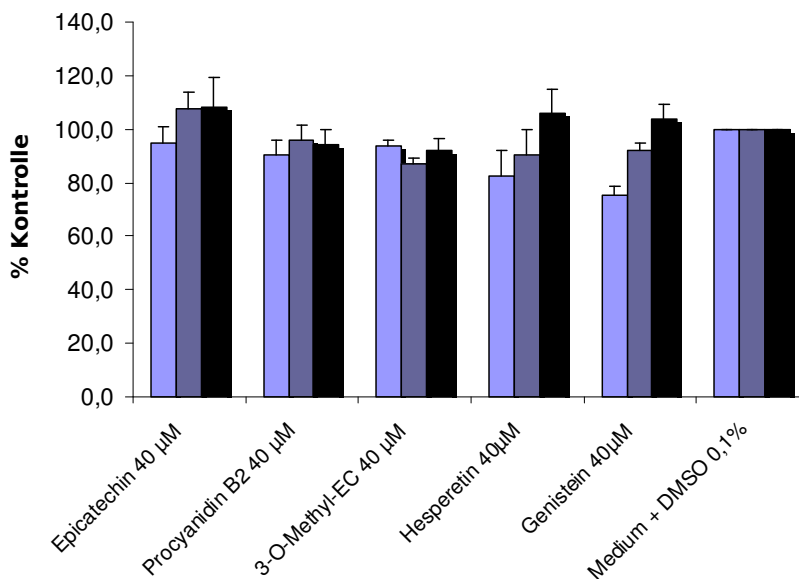


Abb. 3.31: Ermittlung der Zellviabilität mittels MTT-Test; als Kontrolle wurde Medium mit 0,1% DMSO eingesetzt; hellblau: 3h; dunkelblau: 12h; schwarz: 24 h Inkubation;

3.3.2 Farbstoff-Transfer-Assay

Die Zahl der kommunizierenden Zellen wurde mit Hilfe der in **Kapitel 2.5.5** beschriebenen Farbstoff-Transfer-Methode ermittelt. In jeder Versuchsreihe wurde aus jeweils 10 getesteten Zellen der Mittelwert der benachbarten Zellen bestimmt, die den Farbstoff aufgenommen haben. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt. Für die Berechnung wurden die Kontrollen (mit DMSO behandelte Zellen) 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3.25** und **Tab. 3.26**, sowie **Abb. 3.32** dargestellt.

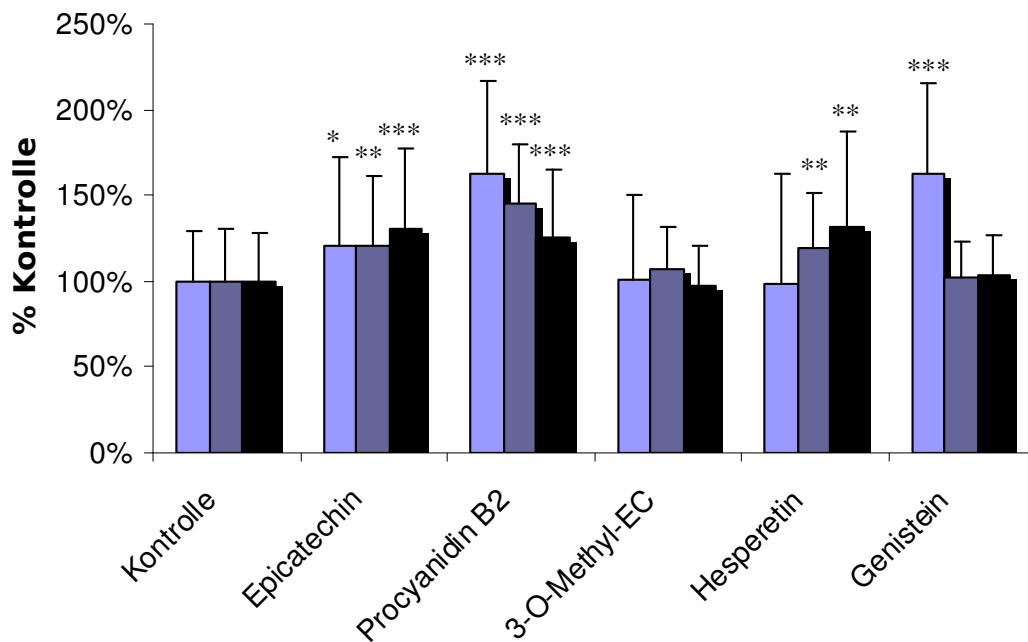


Abb. 3.32: Änderung der ZZK (% Kontrolle) nach 3-stündiger (hellblau), 12-stündiger (dunkelblau) und 24-stündiger (schwarz) Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin und Genistein; Kontrolle: DMSO

Kapitel 3 - Ergebnisse

Tab. 3.25: Zahl kommunizierender Zellen (\pm SD) nach Behandlung mit den Testsubstanzen für 3, 12 und 24 h

t [h]	Zahl kommunizierender Zellen (n=4)		
	3	12	24
Behandlung:			
Epicatechin	13,1 \pm 5,61 *	15,4 \pm 5,28 **	9,8 \pm 3,55 ***
Procyanidin B2	13 \pm 4,30 ****	16 \pm 3,68 ****	9,5 \pm 2,96 ***
3'-O-Methyl-Epicatechin	8,1 \pm 3,86	11,8 \pm 2,71	16 \pm 3,83
Hesperetin	10,6 \pm 37,01	15,3 \pm 4,16 **	16,1 \pm 6,75 **
Genistein	17,7 \pm 5,69 ****	16,8 \pm 3,33	17 \pm 3,78
Kontrolle	9,4 \pm 2,03	13,4 \pm 2,76	12,1 \pm 4,45

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,04

** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,008

*** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,002

**** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,0005

Tab. 3.26: Abweichung der Zahl kommunizierender Zellen (\pm SD) von der Kontrolle nach Behandlung mit den Testsubstanzen für 3, 12 und 24 h

t [h]	% kommunizierende Zellen (Kontrolle = 100 %; n=4)		
	3	12	24
Behandlung:			
Epicatechin	121 \pm 52 *	121 \pm 41 **	130 \pm 47 ***
Procyanidin B2	163 \pm 54 ****	146 \pm 34 ****	126 \pm 39 ***
3'-O-Methyl-Epicatechin	101 \pm 48	107 \pm 25	97 \pm 23
Hesperetin	98 \pm 65	120 \pm 33 **	131 \pm 55 **
Genistein	163 \pm 52 ****	102 \pm 20	104 \pm 23
Kontrolle	100 \pm 29	100 \pm 31	100 \pm 28

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,04

** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,008

*** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,002

**** signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; p<0,0005

Eine deutlich erhöhte ZZK konnte durch die Behandlung mit Procyanidin B2 erreicht werden. Hier wurde bereits nach 3 h ein Anstieg auf $163 \pm 54 \%$ der Kontrolle beobachtet. Auch nach 12 und 24 h unterschied sich die Zahl kommunizierender Zellen noch deutlich von der Kontrolle ($146 \pm 34 \%$ bzw. $126 \pm 39 \%$, $p < 0,0005$). Ähnliche Ergebnisse konnten mit Epicatechin erzielt werden, insgesamt war aber nur ein geringerer Anstieg zu verzeichnen; die höchste Kommunikationsrate wurde nach 24 h beobachtet ($130 \pm 47 \%$ im Vergleich zur Kontrolle, $p < 0,0005$). Die Behandlung mit Hesperetin führte erst nach 12 h zu einer Erhöhung der ZZK, der Maximalwert wurde nach 24 h mit $131 \pm 55 \%$ ($p < 0,008$) beobachtet. Im Gegensatz dazu stieg die ZZK nach Behandlung mit Genistein nach bereits 3 h auf $163 \pm 52 \%$ ($p < 0,0005$), nach 12 und 24 h konnte jedoch keine statistisch signifikante Abweichung von der Kontrolle gemessen werden.

Der Metabolit 3'-O-Methyl-Epicatechin wies zu keinem der Messzeitpunkte einen Einfluß auf die ZZK auf.

3.3.2 Western-Blot Analyse

Die Ergebnisse des Farbstoff-Transfer-Assay zeigten unterschiedliche Effekte der Testsubstanzen auf die ZZK. Um diese Effekte genauer zu untersuchen, wurde die Western-Blot-Analyse auf Connexin43-Protein durchgeführt.

Für diese Analyse wurden die MAEC 3 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Herstellung der Zellextrakte und der Nachweis des Connexin43-Proteins erfolgten wie in **Kapitel 2.5.6.1** beschrieben. In **Abb. 3.33** ist die durch Chemilumineszenz sichtbar gemachte Proteinfraction der unterschiedlich phosphorylierten Connexin43-Proteine nach elektrophoretischer Trennung dargestellt. Die drei Banden zeigen die 3 Phosphorylierungsgrade des Connexin43-Proteins. Dabei stellt P0 die unphosphorylierte, P1 und P2 phosphorylierte Formen des Proteins dar.

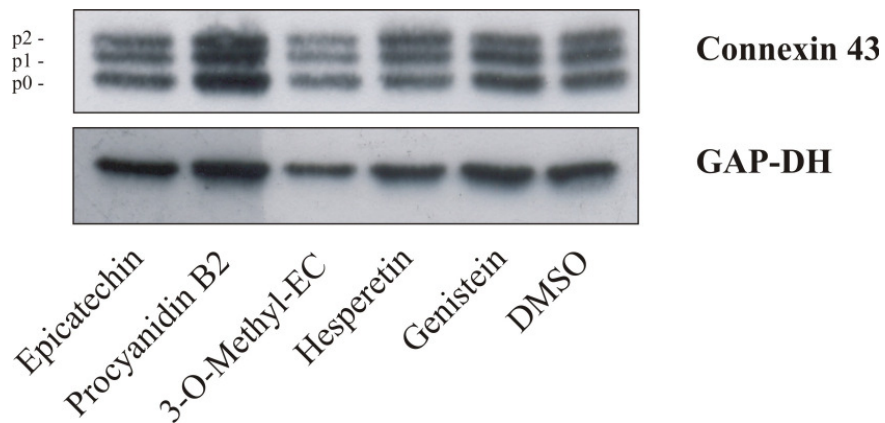


Abb. 3.33: Nachweis des Gap junction-Proteins Connexin43 aus MAEC-Zellextrakt nach 3 stündiger Inkubation mit Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin und Genistein für 3 h; Kontrolle: DMSO

Deutlich zu erkennen ist eine erhöhte Proteinmenge des Connexin43 nach Inkubation mit Procyanidin B2 im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Auch die Inkubation mit Hesperetin führte zu einer leichten Erhöhung des Connexin43-Proteins.

Der Nachweis von eNOS-Protein führte in keiner der Proben zu einem Signal.

3.3.3 Immunocytochemie

Nachdem festgestellt wurde, dass einige der Testsubstanzen in der Lage sind, die ZZK zu stimulieren, sollte der Einfluss der Substanzen auf die subzelluläre Lokalisation der Proteine untersucht werden.

Um die Lokalisation des Connexin43-Proteins in der Zelle zu bestimmen, wurde das Protein mittels einer immunocytochemischen Methode nachgewiesen und photographisch erfaßt (siehe **Kapitel 2.5.7**) Die Immunfärbung erfolgte nach einer 3-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen.

Nach der 3-stündigen Inkubation mit 40 µM Epicatechin, Procyanidin B2, 3'-O-Methyl-Epicatechin, Hesperetin und Genistein konnte ein erhöhter Einbau des Connexin43-Proteins in die Zellmembranen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Im Falle des Epicatechins wurde auch eine Erhöhung der Connexin43-Menge im Bereich um den Zellkern beobachtet. Dies deutet auf eine vermehrte Expression des Proteins hin (siehe **Abb. 3.34**).

Nach der 12-stündigen Inkubation mit 40 µM Epicatechin, Procyanidin B2, Hesperetin und Genistein konnte im Vergleich zu Kontrolle auch eine erhöhte Akkumulation von Connexin43 in der Membran beobachtet werden. Im Falle des Procyanidin B2 und Hesperetin war deutlich eine erhöhte Dichte des Connexin43-Proteins um den Zellkern und die Membran festzustellen, welche auf eine erhöhte Proteinexpression deutet. Dieser Effekt war auch nach Inkubation mit Epicatechin und Genistein zu beobachten, jedoch hier weniger ausgeprägt (siehe **Abb. 3.35**).

Eine vermehrte Proteinmenge in der Membran war nach 24-stündiger Inkubation nur im Falle des Procyanidin B2 zu beobachten. Hier fand sich auch eine stark erhöhte Expression von Connexin43. Eine Erhöhung der Proteinmenge war auch im Falle des Hesperetins und 3'-O-Methyl-Epicatechin zu sehen. (**Abb. 3.36**)

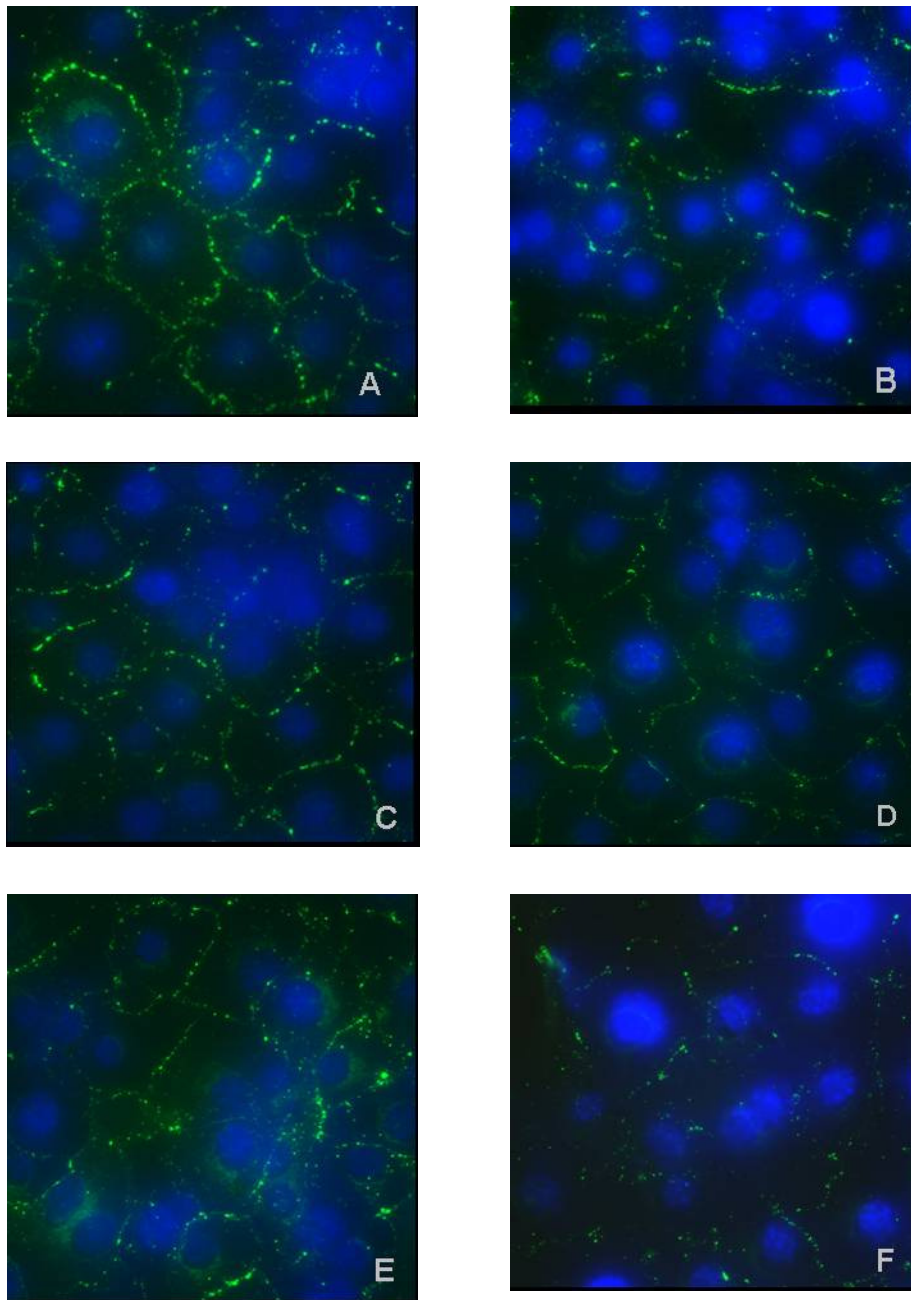


Abb. 3.34: Immunocytochemische Färbung von Connexin43 (grün) und Zellkernen (blau) in MAEC nach Inkubation mit

A: Epicatechin (40 μ M)

B: Procyanidin B2 (40 μ M)

C: 3'-O-Methyl-Epicatechin (40 μ M)

D: Hesperetin (40 μ M)

E: Genistein (40 μ M)

F: 0,1 % DMSO (Kontrolle);

Inkubationsdauer: 3 h

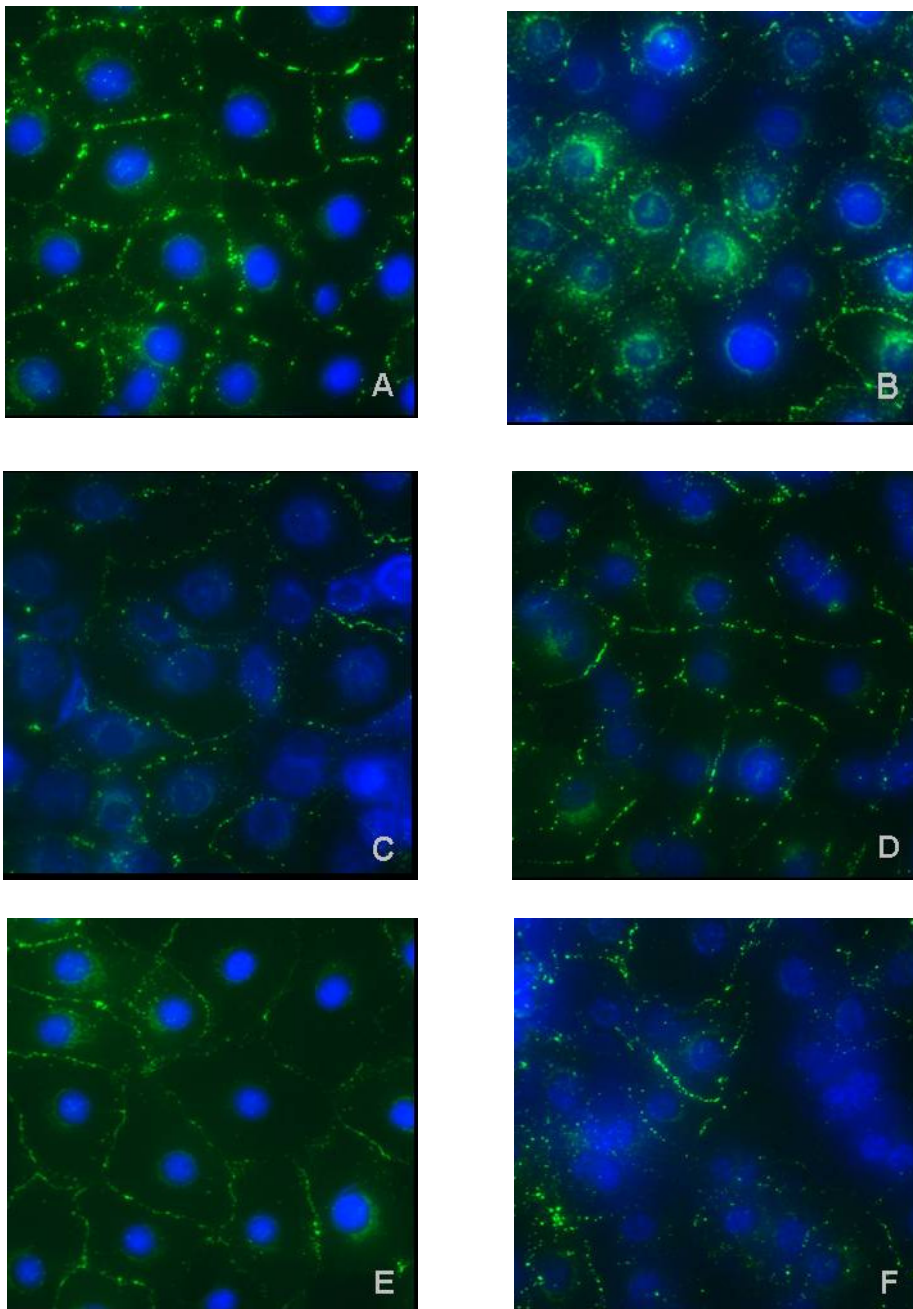


Abb. 3.36: Immunocytochemische Färbung von Connexin43 (grün) und Zellkernen (blau) in MAEC nach Inkubation mit

A: Epicatechin (40 μ M)

B: Procyanidin B2 (40 μ M)

C: 3'-O-Methyl-Epicatechin (40 μ M)

D: Hesperetin (40 μ M)

E: Genistein (40 μ M)

F: 0,1 % DMSO (Kontrolle);

Inkubationsdauer: 12 h

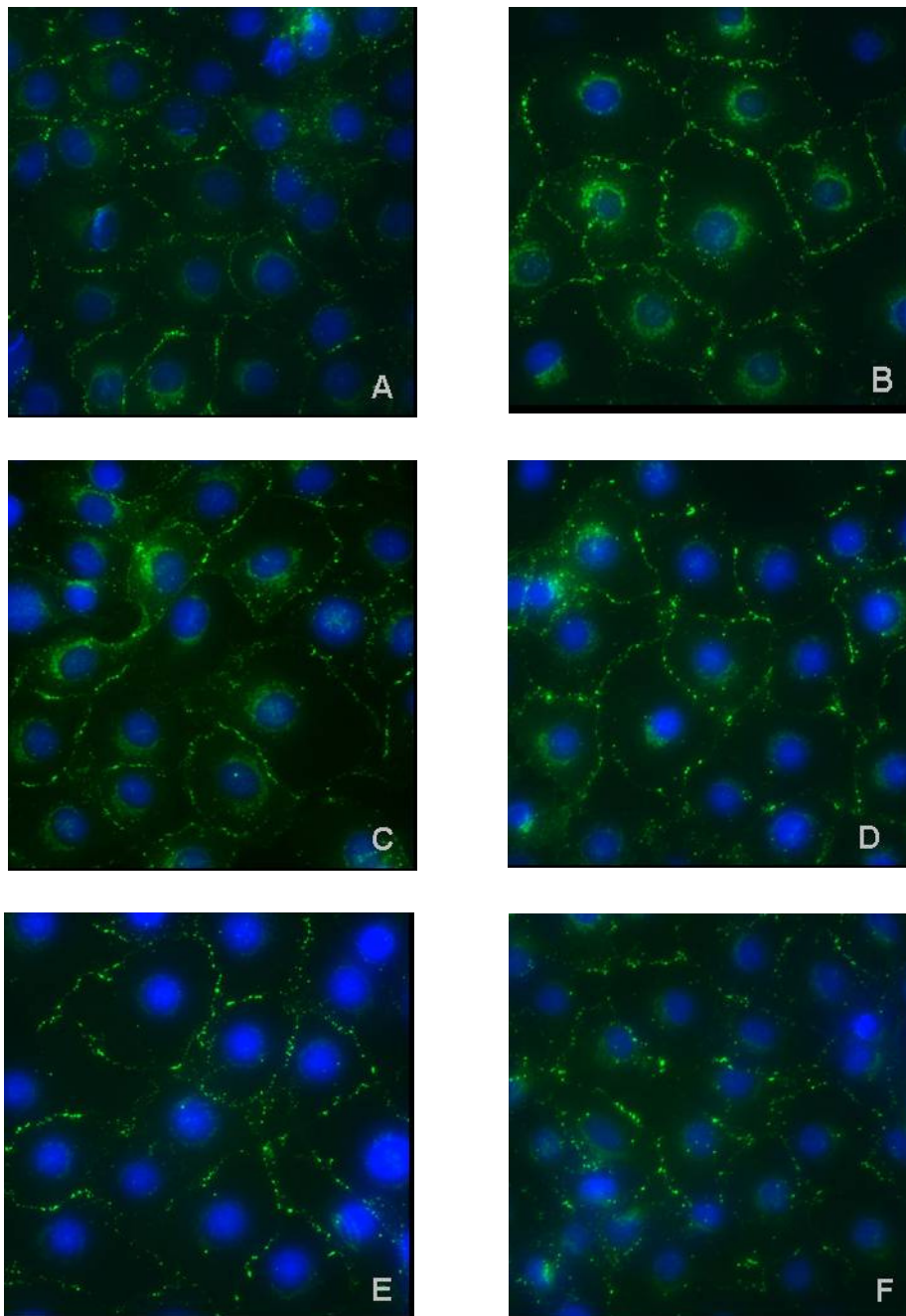


Abb. 3.37: Immunocytochemische Färbung von Connexin43 (grün) und Zellkernen (blau) in MAEC nach Inkubation mit

A: *Epicatechin* (40 μ M)

B: *Procyanidin B2* (40 μ M)

C: *3'-O-Methyl-Epicatechin* (40 μ M)

D: *Hesperetin* (40 μ M)

E: *Genistein* (40 μ M)

F: 0,1 % DMSO (Kontrolle);

Inkubationsdauer: 24 h

3.3 Einfluss von Epicatechin auf die Stabilität von S-Nitrosoglutathion

In diesem Versuch soll der Einfluß von Epicatechin auf die Stabilität von S-Nitrosoglutathion (GSNO) untersucht werden. Aus der HPLC-Analyse ging hervor, dass GSNO in Pufferlösung unter den Versuchsbedingungen stabil ist. In **Abb. 3.38** ist ein Chromatogramm der Standards [Glutathion in reduzierter Form (GSH), in oxidierten Form (GSSG) und S-nitrosiert (GSNO)] dargestellt.

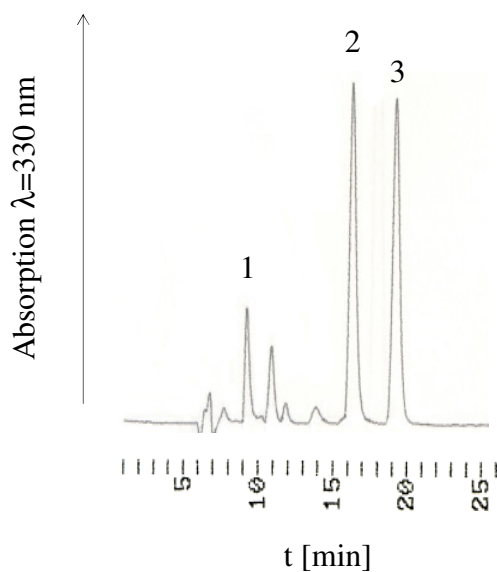


Abb. 3.38: HPLC- Chromatogramm

1: oxidiertes Glutathion (GSSG);

2: reduziertes Glutathion (GSH);

3: GSNO

Die Anwesenheit von Epicatechin führte zu keinem Konzentrationsabfall von GSNO. Bei der Inkubation mit 50 μM $\text{Fe}^{2+/3+}$ bzw. 114 μM Ascorbat konnte bereits nach 17 min ein Beginn des Abbaus von GSNO beobachtet werden ($75 \pm 1,7 \%$ bzw. $50 \pm 2,36 \%$), der sich weiterhin fortsetzte ($72 \pm 3,1 \%$ bzw. $29 \pm 2,24 \%$, nach 34 min). Im Falle des $\text{Fe}^{2+/3+}$ konnte dieser Abbau vollständig durch die Anwesenheit von 170 μM Epicatechin inhibiert werden ($101 \pm 0,6 \%$ nach 34 min). Die Inkubation von $\text{Fe}^{2+/3+}$ in Anwesenheit von 151 μM DFOA führte ebenfalls zu einer Stabilisierung von GSNO: nach 34 min konnten noch $101 \pm 0,23 \%$ von der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Der degradierende Effekt von Ascorbat konnte jedoch durch Koinkubation mit Epicatechin nicht vermindert werden ($23 \pm 3,78 \%$). Die einzelnen Ergebnisse sind in **Tab. 3.27** zusammengestellt.

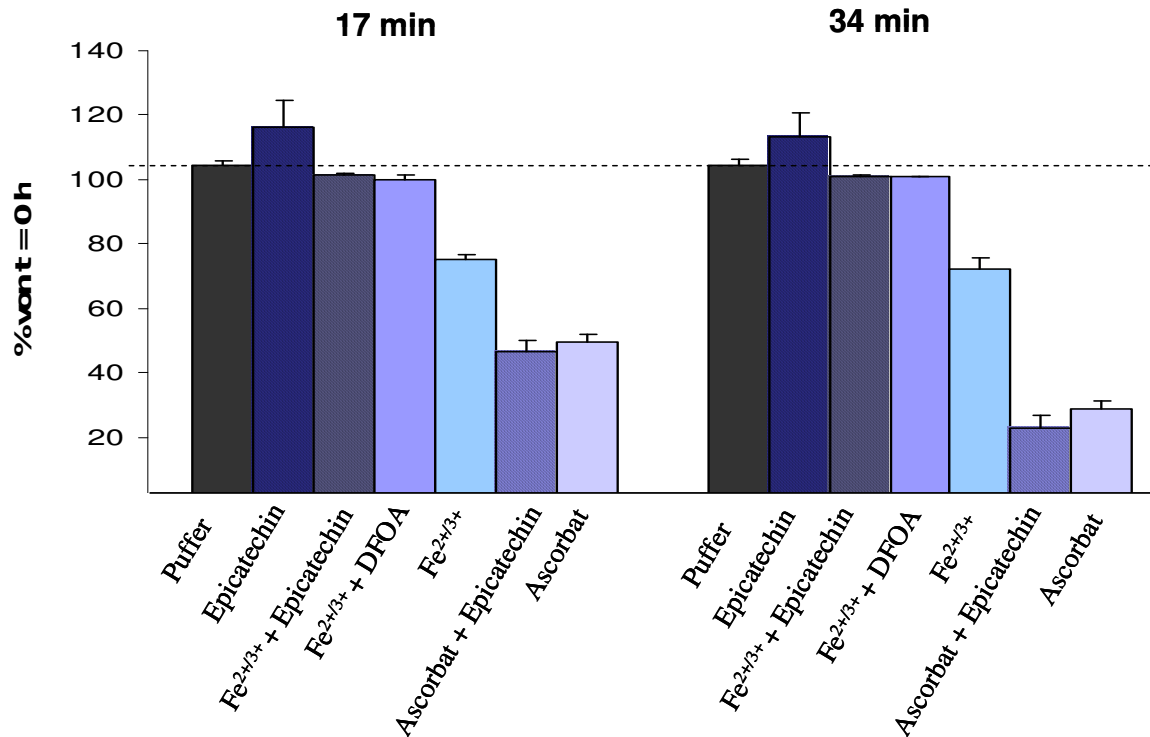


Abb. 3.39: Stabilität von GSNO in Puffer in Anwesenheit von Epicatechin, Fe^{2+/3+}, DFOA und/oder Ascorbat

Tab. 3.27: Stabilität von GSNO in Anwesenheit von Epicatechin, Fe^{2+/3+}, DFOA und/oder Ascorbat; Angaben in % der Konzentration zu Inkubationsbeginn

Konzentration im Inkubationsansatz					% von t = 0 min [± SED (n=3)]		
10 µM	170 µM	50 µM	114 µM	151 µM	0	t [min]	
						17	34
GSNO / Puffer					100	104 ± 1,62	104 ± 2,1
+ Epicatechin					100	116 ± 8,72	113 ± 7,53
+ Epicatechin + Fe ^{2+/3+}					100	101 ± 0,3	101 ± 0,6
+ Epicatechin + Ascorbat					100	46 ± 3,56**	23 ± 3,78**
+ Fe ^{2+/3+}					100	75 ± 1,7**	72 ± 3,1*
+ Ascorbat					100	50 ± 2,36**	29 ± 2,24**
+ Fe ^{2+/3+} + DFOA					100	100 ± 1,1	101 ± 0,23

* signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,02

** signifikant unterschiedlich zu t=0 h; p<0,005

4 Diskussion

4.1 Interventionsstudien: Effekte auf das Endothel und die Haut

Die tägliche Supplementierung mit Kakao-Polyphenolen und mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren (ω -3-PUFA) über einen Zeitraum von 12 Wochen führte zu einer positiven Beeinflussung der Physiologie und Morphologie der Haut. Des Weiteren konnten nach Supplementierung mit Kakao-Polyphenolen photoprotektive Effekte und ein Anstieg der kutanen Mikrozirkulation nachgewiesen werden; Supplementierung mit ω -3-PUFA führte zu einer verminderten Hautsensitivität. Die Untersuchungen des Einflusses einer Einzeldosis von Polyphenolen aus verschiedenen Nahrungsquellen auf den peripheren arteriellen Tonus zeigten, dass Kakao-Polyphenole, nicht aber Procyanidine aus Traubenkernextrakt oder Flavanone aus Zitrusfrüchten einen positiven Effekt auf die endotheliale Funktion ausüben. Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Detail diskutiert.

4.1.1 Einfluß einer Einzeldosis Kakaopolyphenole auf die kutane Mikrozirkulation

Nach der Einnahme des Kakaopulvers mit dem hohen Flavanol-Gehalt (HP) konnte ein Anstieg des Blutflusses um 63,3 % und der Sauerstoffsättigung um 80 % in 1 mm Hauttiefe verzeichnet werden. Diese Maximalwerte traten nach 2 h auf, nach 6 h war der Ausgangswert wieder erreicht. Simultan stieg die gesamt-Epicatechin-Konzentration im Plasma von 11,6 nmol/l vor der Einnahme auf 63,0 nmol/l 1 h nach Supplementierung.

Die Einnahme des Kakaopulvers mit geringem Polyphenolgehalt (LP) führte zu keinem dieser Effekte.

Zurzeit sind in der Literatur keine Daten über die Effekte von Flavanolen auf den Blutfluss oder die Sauerstoffsättigung der Mikrozirkulation verfügbar. Hinweise auf die Wirkung von Kakao-Polyphenolen auf Zellen der mikrozirkulatorischen Gefäße liefern Studien von Kenny et al [159,160]. Hier wurde in *in-vitro*-Untersuchungen in aortischen und mikrovaskulären Endothelzellen festgestellt, dass Kakao-Procyanidine in der Lage sind, die Expression des Tyrosin-Kinase-Gens ErbB2 zu vermindern, sowie Unterschiede im Phosphorylierungsmuster von Protein-Tyrosin-Kinasen während der Stimulation mit Wasserstoffperoxid hervorzurufen.

Eine Inhibierung dieser Signalwege führt zu einer verminderten Entstehung angiogener Stimuli. Auch der Transport von Flavonoiden in die Haut nach systemischer Gabe ist noch unerforscht. Hinweise zur perkutanen Absorption von Epicatechin in humane Haut geben Studien von Alonso et al. [109], die nach topischer Applikation eine Penetration und Akkumulation von Epicatechin nachweisen konnten; dabei wurden allerdings weniger als 16 % des applizierten Epicatechins absorbiert, 12 % waren im Stratum corneum nachweisbar. Die wenigen Daten aus Humanstudien zu den Effekten von Flavonoiden auf die Mikrozirkulation beziehen sich auf die Therapie chronischer venöser Insuffizienz, wobei die Leitsubstanzen das Aescin (ein Saponin), sowie native und halbsynthetische Flavonole sind. Nach Gabe dieser Substanzen konnte eine verbesserte Sauerstoffversorgung und Durchblutung der Haut nachgewiesen werden [161]. Die Flavanone Diosmin und Hesperetin zeigen zudem eine Ödem- und Ulzer-protective Wirkung. Als Mechanismus für diese Effekte wird in erster Linie die antiinflammatorische Wirkung der Flavonoide diskutiert.

Eine gleichmäßige, ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff, Nährstoffen und Metaboliten ist Grundvoraussetzung für ein gesundes Gewebe. Im Gegensatz zur arteriellen Sauerstoffsättigung zeigt die kapillar-venöse Sättigung das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffanlieferung und -verbrauch. Die lokale Messung der Sauerstoffsättigung ist somit ein Maß zur Bestimmung des Zustandes einer lokalen Gewebhypoxie. Hypoxie kann zu verschiedenen vaskulären Krankheiten führen; in endothelialen Zellen kommt es als erste Reaktion auf die Sauerstoffunterversorgung zu der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und Wachstumsfaktoren; dies führt zur Adhäsion von Neutrophilen an die Gefäßwand und deren Aktivierung. Chronische Hypoxie führt zur Expression spezifischer Gene, die Cytokine und Wachstumsfaktoren exprimieren [162]. Zu den Krankheitsbildern hypoxischer Haut gehören akrozyanotische Zustände, auf längere Sicht kann es auch zu Nekrosen kommen. Das Raynaud-Syndrom, auch als akrales Ischämiesyndrom oder vasospastisches Syndrom bezeichnet, sowie die verminderte Gewebedurchblutung bei Diabetes mellitus basieren auf einer eingeschränkten Funktion der Mikrozirkulation [30,163]. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Einnahme von Kakaoflavanolen durch eine Erhöhung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zur Prophylaxe oder Verbesserung der hier aufgeführten Krankheiten beitragen.

Zur weiteren Untersuchung dieser Effekte, wurde in einem 12-wöchigen Versuch die Wirkung von Kakao-Polyphenolen auf die Mikrozirkulation der Haut untersucht. Im folgenden Abschnitt werden diese Ergebnisse zusammenfassend diskutiert.

4.1.2 12-Wochen-Supplementierung mit Kakao-Polyphenolen

Mikrozirkulation

In der vorliegenden Studie wurden die kutane (1 mm Hauttiefe) und die subkutane (6-8 mm Hauttiefe) Mikrozirkulation vor, während und nach 12-wöchiger Supplementierung mit 326 mg Kakaopolyphenolen/Tag bestimmt.

Nach bereits 6 Wochen konnte ein deutlich erhöhter Blutfluss festgestellt werden. Nach 12 Wochen war der kutane Blutfluss auf das Doppelte, der subkutane Blutfluss um das 1,4-fache des Ausgangswertes angestiegen. Auch die Sauerstoffsättigung stieg kontinuierlich und war 12 Wochen nach Studienbeginn um das 1,6-fache in kutanem Gewebe und um das 1,3-fache in subkutanem Gewebe gestiegen.

Nach Supplementierung mit Kakao-Polyphenolen konnte in dieser Studie jedoch kein Anstieg der Flavanol-Konzentrationen in Plasma oder Erythrozyten nachgewiesen werden. Dass der Effekt auf den Blutfluss und die Sauerstoffsättigung dennoch auf die Supplementierung zurückzuführen ist, wird durch die LP-Gruppe deutlich. Diese erhielt ein Kakaopulver, das sich im Polyphenolgehalt von der HP-Gruppe unterschied. In der LP-Gruppe konnten keine Effekte auf die Endothel- oder Hautfunktion festgestellt werden. Der Versuch zum Einfluss auf die Mikrozirkulation nach Einmal-Dosis von Kakao-Flavanolen unterstützt diese These. Nach der Gabe der Einmal-Dosis konnte durch die Korrelation der Plasmakonzentrationen von gesamt-Epicatechin und dem Anstieg des relativen Blutflusses und der Sauerstoffsättigung eine Beziehung zwischen der Polyphenol-Einnahme und den genannten Effekten hergestellt werden (siehe **Kapitel 4.2.1** zur Bioverfügbarkeit der Flavane). Durch Kontrolle mit dem LP-Kakaopulver kann auch ein eventueller Effekt weiterer Inhaltsstoffe wie z.B. der Xanthinderivate ausgeschlossen werden.

Wie die in **Kapitel 4.1.1** diskutierte Studie gezeigt hat, tritt ein maximaler Effekt 2 h nach Einmal-Gabe von Kakao-Polyphenolen auf der im weiteren Verlauf abnimmt. Damit gleicht der Verlauf des biologischen Effektes dem der Flavanol-Konzentrationen im Plasma nach einer Einmaldosis. Um in der Langzeitstudie sicher zu stellen, dass die Beobachtungen nicht auf denselben Kurzzeit-Effekt beruhen, fanden die Blutentnahmen in der Langzeitstudie 12 h nach der letzten Einnahme des Kakao-Supplementes statt.

Die Mikrozirkulation im subkutanen Gewebe wurde nur nach Dauersupplementierung beeinflusst. Dies deutet auf einen Effekt auf die endotheliale Funktion durch Flavane hin,

der über das kapillare System hinaus geht und damit auf größere Gefäße wie Arteriolen und kleine Arterien wirkt.

Da weder Epicatechin noch dessen Metabolite in Plasma und Erythrozyten vorhanden waren, kann spekuliert werden, dass Flavanole in einem tieferen Kompartiment wie z.B. der Haut gespeichert werden. Auch könnten sie in einer anderen, metabolisierten Form vorliegen, die analytisch nicht erfasst wird. Die Effekte könnten auch durch die in Kakaopulver enthaltenen Procyanidine erklärt werden, für die antiarteriosklerotische Wirkungen Entstehung als Langzeiteffekte nachgewiesen wurden (siehe **Kapitel 4.1.1**). Möglicherweise stellen Polymere die langwirksame Komponente für die endothelialen Effekte dar, während Monomere rasch aus dem Blut eliminiert werden und dem Endothel nicht über einen längeren Zeitraum als 4-6 h zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kakao-Flavanole sowohl nach Einmal-Dosierung, als bei Dauersupplementierung zu einem erhöhten Blutfluss und einer erhöhten Sauerstoffsättigung in der Mikrozirkulation führen.

Photoprotektion:

Neben den Verbesserungen der Mikrozirkulation konnte erstmalig und bereits nach 6 Wochen ein photoprotektiver Effekt auf die Haut unter Supplementierung mit Kakao-Polyphenolen in einer Humanstudie beobachtet werden.

Zur ersten Antwort der Haut auf einen inflammatorischen Reiz gehört eine Dilatation der Kapillaren und eine sichtbare Rötung (gemessen durch den a -Wert). Diese wurde zur Bestimmung der Photoprotektion in bestrahltem Gewebe genutzt. Die Differenz des a -Wertes vor und 24 Stunden nach Bestrahlung (Δa -Wert) mit 1,25 MED (minimale erythembildende Dosis) dient als Maß für die Erythemintensität. Verringerte Δa -Werte zeigen einen photoprotektiven Effekt. Nach bereits sechs Wochen konnte in der HP-Gruppe eine statistisch signifikante Abnahme des Δa -Wertes von 4,8 zu Beginn der Studie auf 2,3 beobachtet werden, was einer Verminderung der Sonnenbrand-Reaktion um 52 % entspricht. 12 Wochen nach Beginn der Studie betrug der Δa -Wert 1,5 (69 % verminderte Sonnenbrand-Reaktion). In der LP-Gruppe konnte keine Veränderung festgestellt werden.

Obwohl eine Vielzahl an Daten zur photoprotektiven Wirkung von Flavonoiden in Zellkultur, Tiermodellen oder nach topischer Applikation verfügbar ist, sind in der Literatur keine Studien beschrieben, die über Sonnenschutz nach systemischer Gabe von Flavonoiden im Menschen berichten. Greul et al. [164] konnten zwar in einer Humanstudie eine

Verminderung eines UV-induzierten Erythems durch die Kombination von fettlöslichen Vitaminen, Selen und Procyanidin feststellen; in welchem Ausmaß die einzelnen Komponenten photoprotektiv wirksam sind, konnte nicht zugeordnet werden.

Der Großteil der bislang durchgeführten Studien zur Photoprotektion von Flavanolen beschäftigt sich mit Epigallocatechingallat. Zellkultur-Versuche mit Hautfibroblasten und Keratinozyten zeigten photoprotektive und antikarzinogene Effekte von Epigallocatechingallat auf. Dabei werden verschiedene Mechanismen diskutiert, eine Schlüsselrolle spielt die Inhibierung der UV-induzierten Apoptose. [165-167]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl Epicatechin, als auch 3'-O-Methyl-Epicatechin Fibroblasten vor UV-A-Strahlung schützen [168].

Auch nach topischer Applikation von Flavanolen im Tierversuch wurde ein Schutz vor UV-Strahlung beobachtet, der mit einer verminderten Photokarzinogenese, Photoalterung und UV-induzierten Immunsuppression, sowie einer erhöhten Apoptoserate von Tumorzellen einherging. Die antioxidativen Eigenschaften der Flavanole scheinen hier eine Schlüsselrolle zu spielen [169-171]. Die topische Applikation von Epigallocatechingallat auf humane Haut und anschließende Bestrahlung mit UV-Licht zeigt Schutzeffekte des Flavonoids vor oxidativen Schädigungen und inflammatorischen Reaktionen [172]. Mittal et al. [173] konnten an der Maus zeigen, dass die systemische Gabe von Procyanidinen vor Photokarzinogenese schützt, Jeon et al. [174] erzielten UV-Schutz durch die Gabe von Catechin. Die Modulierung der Aktivität bzw. Expression antioxidativer Enzyme wird dabei als Mechanismus der Photoprotektion diskutiert.

Ist die Haut UV-Strahlen ausgesetzt, kann es lichtinduziert zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Radikal-Anionen oder Peroxyl-Radikalen kommen; dies wird als photooxidativer Stress bezeichnet [175]. ROS können mit Zellbestandteilen wie Lipiden, Proteinen und DNA reagieren und zu irreparablen Schädigungen führen. Als Mechanismen photoprotektiver Effekte werden die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole, sowie Reaktionen auf enzymatischer Ebene diskutiert, wobei die Hemmung prooxidativer Enzyme [167,174,176] und die Induktion antioxidativer Enzyme (SOD, CAT) von Bedeutung sind [174].

Photoprotektion durch Nahrung oder Nahrungssupplemente konnte auch für andere Mikronährstoffe beobachtet werden. Stahl et al. und Heinrich et al. beschrieben einen photoprotektiven Effekt nach täglicher Supplementierung mit Carotinoiden und einer Kombination aus Carotinoiden und α -Tocopherol (Vitamin E) [36,177]. Ähnliche Effekte konnten mit Tomatenpaste erzielt werden. Die photoprotektive Wirkung wurde hier dem

Carotinoid Lycopin zugeschrieben und trat nach 10 Wochen auf [35]. In diesen Studien war ein Anstieg der Carotinoid-Konzentrationen sowohl im Serum, als auch in der Haut messbar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die systemische Gabe von Flavanolen zu einer Verminderung des UV-induzierten Erythems führt. Diese photoprotektive Eigenschaft war bereits nach 6 Wochen zu beobachten. Dies stellt einen Vorteil gegenüber anderen systemischen Sonnenschutzmitteln wie den Carotinoiden dar. In der Effektivität sind die beiden Substanzklassen vergleichbar. In Anlehnung an die *in-vitro*-Daten könnte der Mechanismus zumindest teilweise auf der Fähigkeit von Flavanolen beruhen, Radikale abzufangen sowie UV-Strahlen zu absorbieren und damit Phototoxizität entgegen zu wirken. Die Studie zeigt, dass durch die Einnahme von Flavanolen ein permanenter Sonnenschutz erzielt werden kann, der den Einsatz topischer Sonnenschutzmittel ergänzen könnte.

Einfluss der Flavanole auf die Physiologie und Morphologie der Haut

In der hier beschriebenen Studie konnte durch Supplementierung mit Kakaopolyphenolen eine Verbesserung der Oberflächenstruktur der Haut erzielt werden. Nach einer Behandlungsdauer von 12 Wochen war in der HP-Gruppe eine Verminderung der Rauigkeit und Schuppigkeit um 30 % bzw. 43 % festzustellen. Der transepidermale Wasserverlust sank (-27 %), gleichzeitig nahmen die Hautdicke und -dicke um 17 % bzw. 12 % zu. In der LP-Gruppe konnte keine Veränderung dieser Parameter festgestellt werden. Die physiologischen und morphologischen Parameter wurden mit einer objektiven Methode bestimmt. Damit konnte erstmals und mit unabhängigen Daten eine Verbesserung der Hautstruktur durch systemische Gabe von Kakao-Polyphenolen am Menschen gezeigt werden.

Daten zum Einfluß von Flavonoiden auf die Beschaffenheit der Haut lieferten Matsumoto et al. am Tiermodell. Sie konnten eine Verringerung des transepidermalen Wasserverlustes nach Behandlung mit aus der Dattelpflaume stammenden Astragalin feststellen. Als Modell dienten Mäuse mit atopischer Dermatitis [178].

Die Gesundheit der Haut wird durch Parameter der Oberflächentextur, Farbe und physiologischen Eigenschaften bestimmt, die abhängig von Gesundheit und Alter verändert sind. Purba et al. stellten eine direkte Verbindung zwischen Faltenbildung und dem biologischen Altern her [179] und postulieren eine Korrelation zwischen Faltenbildung und Ernährungsmustern [180]. Das Erscheinungsbild einer weichen und glatten Haut wird in erster Linie vom Hydrationszustand des Stratum corneums bestimmt. Sebum und andere epidermale Lipide wirken dem Flüssigkeitsverlust durch die Epidermis entgegen [181]. Die

Beschaffenheit der Haut unterscheidet sich von Mann zu Frau; bei Frauen ist allgemein eine geringere Hauthydratation sowie ein höherer pH-Wert zu beobachten.

Generell ist der Einfluss von Mikronährstoffen auf die Hautqualität nur wenig untersucht. Boelsma et al. konnten in einer Humanstudie nur geringe Effekte durch ernährungsbedingte Erhöhung der Zufuhr von Carotinoiden, Vitamin A, Calcium und Fettsäuren in der Hautbeschaffenheit erzielen [181].

In der Literatur liegen keine Befunde über den Mechanismus der Wirkung von Flavonoiden auf die Haut vor. Eine verbesserte Mikrozirkulation (siehe **Kapitel 4.1.2**) der Haut trägt zu einer optimalen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bei. Zusammen mit einer erhöhten Speicherkapazität von Wasser könnte es zu einem verbesserten Gesundheitszustand der Haut kommen, der sich optisch durch eine verminderte Schuppenbildung und Weichheit bemerkbar macht. Auch der verminderte transepidermale Wasserverlust und die erhöhte Hauthydratation können dabei eine Rolle spielen.

Fettsäureverteilung

Nach 3-monatigem Verzehr von Kakao konnte in der HP-Gruppe eine Abnahme des ω -6/ ω -3-Verhältnisses beobachtet werden: während zu Beginn und 6 Wochen nach Beginn der Studie kein Unterschied des ω -6/ ω -3-Verhältnisses zwischen beiden Gruppen festgestellt werden konnte, war nach 12 Wochen ein signifikanter Unterschied sowohl zum Ausgangswert, als auch zur LP-Gruppe zu beobachten. Dabei blieben die DHA-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure-Anteile unverändert.

Kakaolipide sind in erster Linie triglyceridisch gebundene Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Der Einnahme dieser gesättigten, bzw. einfach ungesättigten, kurzkettigen FS wird ein erhöhtes Allergie-Risiko und ein erhöhtes Auftreten von IgE, Prostaglandinen und Thromboxanen zugeordnet [182-184].

Die Literatur liefert Hinweise auf die Beeinflussung des FS-Metabolismus durch Kakao-Flavanole. Matsui et al. stellten fest, dass fettreiche Nahrung in Kombination mit Polyphenolhaltigem Kakao im Gegensatz zu Polyphenol-freiem Kakao der Fettsäure-induzierten Adipositas entgegenwirkt [185]. Mursu et al. vertreten die Hypothese, dass Kakao-Flavanole einen Anstieg von HDL-Cholesterol positiv beeinflussen und LDL vor Lipidperoxidation schützt. Informationen über die Änderungen des Fettsäuremusters sind in der Literatur nicht zu finden [186].

Die Veränderung des FS-Musters könnte auf die unterschiedliche FS-Zusammensetzung der beiden Chargen (HP-/LP-Pulver) zurückzuführen sein. Im LP-Kakao ist Ölsäure (ω -9-FS) die einzige ungesättigte FS, während HP-Kakao zusätzlich Docosapentaensäure (DPA), sowie geringe Mengen Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure (DHA) enthält.

Trotz dieser unterschiedlichen ω -3-FS-Anteile im Kakaopulver war die tägliche Dosis der ω -3-FS in der HP-Gruppe äußerst gering. Die physiologischen Effekte auf die Mikrozirkulation und die Hautphysiologie traten bereits nach 6 Wochen auf. Da sich das ω -6/ ω -3-FS-Verhältnis erst nach 12 Wochen ändert, kann nicht angenommen werden, dass Effekte auf die Mikrozirkulation der Fettsäureverteilung zuzuweisen sind.

Ob die hier beobachtete Veränderung des FS-Musters zugunsten des ω -3-Anteils mit der Zusammensetzung der FS in den Supplementen oder einem Einfluß der Polyphenole auf den FS-Metabolismus zusammenhängt, ist unklar.

4.1.3 Einfluß von Linol- und α -Linolensäure auf Physiologie, Morphologie und Sensitivität der Haut

Physiologie und Morphologie

Weitere Erkenntnisse über den Einfluss von Nahrungssupplementen auf die Hautbeschaffenheit lieferte die Studie, in der Linolensäure (ALA)- reiche bzw. -arme Supplemente (A bzw. B) eingenommen wurden. Der Linolensäure (LA)-Gehalt in den Produkten war vergleichbar. In dieser Studie konnte bereits nach 6 Wochen eine statistisch signifikante Verminderung der Rauigkeit der Haut um 22 % sowie ein um 21 % verminderter transepidermaler Wasserverlust festgestellt werden. Nach 12 Wochen waren diese Parameter um 30 % bzw. 31 % vermindert; zusätzlich konnte eine signifikante Zunahme der Hauthydratation von 39 % sowie der Glätte um 7 % gemessen werden.

Die Ergebnisse decken sich mit Tierstudien. Am Tiermodell konnte festgestellt werden, dass ALA-Mangel zu Alopezie, schuppiger Dermatitis, kognitiven und visuellen Wahrnehmungsstörungen führt [187]. Fettsäuren sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut [188]. Diese Barriere ist im Stratum corneum lokalisiert und besteht aus Lipid-angereicherten, mehrschichtigen Membranen im zellulären Zwischenraum. Sie schützt den Organismus vor dem Austrocknen und sorgt zusammen mit Aminosäuren für

einen niedrigen pH-Wert, und somit dem Schutz vor pathogenen Organismen. LA und ALA sind essentielle Fettsäuren, die im Körper zu langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LCPUFA) umgewandelt werden. Eine Unterversorgung dieser Vorstufen führt zu verschiedenen Krankheitsbildern; ein Mangel an LA führt zu der Bildung eines atopischen Ekzems, das mit trockener, schuppiger und entzündlicher Haut einhergeht und auf dem Mangel von γ -Linolensäure (GLA) basiert. Eine verminderte Δ^6 -Desaturase-Aktivität kann dies ebenfalls auslösen, da die Umwandlung von LA zu GLA nicht stattfindet. ALA stellt die Vorstufe von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) dar. In der Dermatologie werden verschiedene Formulierungen mit PUFA verwendet, die LA als Bestandteil enthalten – meist aus Nachtkerzenöl und zur topischen Applikation. Die vorliegenden Daten zu Hautstruktur und Hydratation zeigen, dass eine systemische Gabe von ALA eine Verbesserung der Hautfunktion bewirken kann. Als wahrscheinlichen Mechanismus für die oben beschriebenen Ergebnisse kann ein erhöhter Einbau von PUFA in die Membranen der Haut angesehen werden. Die Folgen sind eine erhöhte Membranfluidität, eine erhöhte Barrierefunktion und ein verringerter pH-Wert [189].

Sensitivität

Nicotinat löst auf der Haut einen inflammatorischen Reiz aus. Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt es zu einer Dilatation der Kapillaren, wodurch Lymphozyten und Makrophagen besser zum Entzündungsherd gelangen, was sich durch eine Rötung bemerkbar macht. Ein verminderter Blutfluss bzw. eine verminderte Rötung deutet auf eine verminderte Sensitivität auf einen inflammatorischen Reiz. In der mit ALA supplementierten Gruppe konnte nach bereits 6 Wochen ein um 34 % verminderter Blutfluss im Nicotinat-induzierten Erythem gemessen werden, nach 12 Wochen war eine Verringerung von 66 % zu sehen. Auch eine verminderte Rötung konnte festgestellt werden; der Δa -Wert war am Ende der Studie auf die Hälfte gesunken.

PUFA sind am Arachidonsäurestoffwechsel beteiligt, der die Bildung von Entzündungsmediatoren moduliert (siehe **Kapitel 1.2.3**). Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass eine erhöhte Einnahme von ω -3-PUFA zu einer verminderten Bildung von inflammatorischen Mediatoren führt [190]. Daten über eine verminderte inflammatorische Reaktion auf einen Nicotinat-induzierten Reiz sind in der Literatur nicht beschrieben.

Im Plasma konnte nach Supplementierung mit ω -3-reichem Öl ein Anstieg des gesamt- ω -3-FS-Anteils gemessen werden; gleichzeitig stieg der ALA-Gehalt, während das Verhältnis ω -

6/ ω -3 geringer wurde. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass aufgrund der Supplementierung ein erhöhtes ALA-Angebot vorherrschte, gefolgt von einer erhöhten ALA-Speicherung im Plasma. Analog zu den Daten von Harris et al. wurde nach 6 Wochen ein Plateau erreicht. Burdge et al. beschreiben eine erhöhte DHA-Konzentration nach ALA-Einnahme [191]. Dieser Anstieg konnte auch in der hier vorliegenden Studie beobachtet werden, war jedoch statistisch nicht signifikant. Humanstudien lassen den Schluss zu, dass die Biosynthese von langkettigen PUFA, besonders DHA, aus ALA limitiert ist. Interessanterweise ist diese Kapazität geschlechtsabhängig, wobei Frauen in höherem Maße EPA und DHA aus ALA generieren können. Dieses Phänomen tritt verstärkt bei Frauen in Schwangerschaft und Laktationsphase auf [191]. Die hier beschriebene Studie wurde ausschließlich mit Frauen durchgeführt, Schwangerschaft und Laktation waren jedoch Ausschlusskriterien. Eine einzige Dosis ALA führte wie erwartet zu keiner signifikanten Änderung des ω -6/ ω -3-Verhältnisses. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien berichtet [192].

Es konnte in dieser Studie weder ein Anstieg einer ω -3-FS noch einer ω -6-FS in Erythrozyten beobachtet werden. Erythrozyten werden als Biomarker für die FS-Zusammensetzung im Gewebe verwendet; der Gehalt an EPA und DHA wird auch als „Omega-3-Index“ bezeichnet und dient als klinischer Marker das Risiko für KHK, da er als Spiegel für den Gehalt an langkettigen PUFA im Myokardgewebe gesehen wird [193]. In der Literatur wird ein signifikanter Anstieg des ALA-Anteils in Erythrozyten 12 Wochen nach täglicher Supplementierung mit 8 g Leinsamenöl beschrieben. Die Supplementierung einer vergleichbaren Menge LA-reichen Öls führte zu einem Anstieg von LA [194]. In Anbetracht der hier beschriebenen hohen täglichen Einnahme scheint die Supplementierung in der in dieser Arbeit vorliegenden Studie mit ca. 1 g ALA/Tag bzw. 1,6 g LA/Tag nicht auszureichend, um eine Änderung des FS-Musters in Erythrozyten hervorzurufen.

4.1.4 Einfluß der Testsubstanzen auf den peripheren arteriellen Tonus

Endotheliale Dysfunktion ist reversibel - somit sind Früherkennung und rechtzeitige Behandlung von großer Bedeutung. In dieser Studie wurden Messungen des peripheren arteriellen Tonus (PAT) mit einem neuartigen Verfahren bestimmt, das den PAT mittels der pulsatilen Änderungen (PWA: *pulse wave amplitude*) während reaktiver Hyperämie in der Fingerbeere misst. Die Bestimmung der endothelialen Funktion in den Gefäßen der peripheren Durchblutung mittels PWA stellt einen diagnostischen Vorteil gegenüber der invasiven ACh-Methode (siehe **Kapitel 1.2.1**) dar. Sowohl das PAT- als auch das BAUS-Verfahren basiert auf der Erzeugung reaktiver Hyperämie [195]. Durch Okklusion der Gefäße wird eine temporäre Ischämie erzeugt, nach Lösen der Okklusion kommt es zu einem erhöhten Blutfluss. Die so entstandene Schubspannung (*shear stress*) führt zu einer endothelabhängigen Vasodilatation. Der Vorteil der Messung in den Akren besteht darin, dass die sympathische Aktivität sehr gering ist und die Vasomotion der kleinen Arterien und Arteriolen nicht mehr lokal-chemisch (metabolische Dilatation) geregelt wird [30]. Auch Nahrung und psychischer Stress beeinflussen die endotheliale Funktion. Besonders die Einnahme fett- bzw. triglycerid-reicher Nahrung kann die postprandiale Gefäßaktivität um bis zu 50 % verringern, was mit der Konzentration an Lipoproteinen im Blut korreliert. Die Beeinflussung durch mentalen Stress ist auf eine erhöhte Konzentration endogener Catecholamine zurückzuführen, worauf das vermehrte Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Stresspatienten beruht [196-199]. Eine Studie an KHK-Patienten zeigte sowohl Verringerung als auch eine Erhöhung der PWA unter mentalem Stress. Es ist demnach nicht vorhersehbar, inwiefern sympathische Aktivität das Messergebnis beeinflusst, weswegen sie minimal gehalten werden sollte [200]. Um Sympathikus-Aktivität, diurnale Schwankungen und Nahrungseinflüsse zu vermeiden, wurden alle Messungen zu der gleichen Tageszeit im nüchternen Zustand durchgeführt. Die Probanden wurden überwacht, während der Studie eine liegende Position beizubehalten.

Der PAT-Index wird aus dem Bruch der durchschnittlichen Amplitude des PAT-Signals über ein Zeitintervall von 1 Minute, beginnend eine Minute nach Deflation, durch die durchschnittliche Amplitude des PAT-Signals über ein 3,5-Minuten-Intervall vor Okklusion (Basislinie) geteilt. Der Wert ist dimensionslos und liegt in einem Bereich von ca. 1 (pathologisch) bis 3 (gesund); in dieser Arbeit werden die PAT-Indices aufgrund hoher inter-

und intra-individueller Schwankungen als Abweichungen zum Nullwert (Zeitpunkt $t = 0$ h) angegeben (Δ PAT-Index).

Nach Einnahme des HP-Kakaopulvers (entsprechend 117 mg Flavanole) wurde nach einer Stunde bereits ein Anstieg des Δ PAT-Index von 0,56 beobachtet, der im weiteren Verlauf auf 0,71 stieg. Nach 3 h war die Differenz des PAT-Index zu $t = 0$ statistisch signifikant und blieb bis zum Ende des Versuches erhöht ($t = 6$ h), wo der Δ PAT-Index noch 0,44 betrug. Diese Werte korrelierten mit einem Anstieg der gesamt-Epicatechin-Konzentration von 38,3 nmol/l auf 166,2 nmol/l und der 3'-O-Methyl-Epicatechin-Konzentration von 10,4 nmol/l auf 492,5 nmol/l Plasma. Damit konnte in dieser Studie erstmalig ein Effekt auf den peripheren, arteriellen Tonus durch eine Einfach-Dosierung mit Kakao-Polyphenolen nachgewiesen werden.

In der Kontrollgruppe wurde keine signifikante Änderung der endothelialen Antwort auf reaktive Hyperämie festgestellt, die ermittelten Δ PAT-Indices lagen zwischen 0,12 und -0,16. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Heiss et al., die FMD-Messungen nach Einnahme 70 mg Flavanolen in einem Kakaogetränk an Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren durchführten und eine Verdopplung der FMD nach 2 h beobachteten. Weiterhin konnte ein Anstieg nitrosierter Thiole und Proteine im Plasma festgestellt werden [201]. Engler et al. fanden in einer Studie an gesunden Probanden, dass eine Einfach-Supplementierung mit Kakao-Flavanolen zu einer Erhöhung der FMD in der Brachialarterie führt [202]. Da es sich bei dieser erhöhten Dilatation um einen unmittelbaren Effekt einer Supplementierung handelt, kann eine durch die Schubspannung hervorgerufene Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) angenommen werden; ein Einfluss auf Expressionsebene ist in diesem kurzen Zeitraum nicht zu erwarten. Eine eNOS-Induktion durch Epicatechin konnte bereits in in-vitro [203] gezeigt werden und Untersuchungen an der proinflammatorischen eNOS-2 zeigten eine Inhibierung des Enzyms durch Flavanole [204]. Bestätigend konnten Fisher et al. zeigen, dass nach täglichem Konsum von Kakao (821 mg gesamt-Polyphenole) über einen Zeitraum von 5 Tagen sowohl die PWA im Ruhezustand, als auch unter reaktiver Hyperämie erhöht werden kann. Dieser Effekt konnte mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (N^G -Nitro-L-argininmethylester) inhibiert werden [205]. Weiterhin ist bekannt, dass Flavanole und Procyanidine die Aktivität des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE) hemmen [206]. ACE katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II, einem potenten Vasokonstriktor.

Die Supplementierung mit Traubenkernextrakt (entsprechend 1,6 g oligomerer Proanthocyanidine, OPC) führte erst zu einem Anstieg, nach 3 h zu einer Verminderung des Δ PAT-Index, es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Änderung festgestellt werden. OPC konnten im Blut nicht nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 4.2.3**). Ursache für das Ausbleiben eines Effektes kann die unzureichende Bioverfügbarkeit sein. Es ist jedoch auch möglich, dass OPC nicht wie die Flavanole schnellwirksam eine Enzyminduktion (eNOS) hervorrufen, sondern einen Effekt auf Expressionsebene haben. Die Versuchsdauer von 6 h würde für eine Detektion dieser Wirkung nicht ausreichen. Wallerath et al und Leikert et al beschreiben eine Modulation der eNOS-Expression auf Transkriptionsebene durch Ethanol-freien Rotweineextrakt; neben erhöhter NO-Freisetzung waren auch erhöhte eNOS-Proteinlevel und eNOS-Promotor-Aktivität zu beobachten [207,208]. Erhöhte eNOS-Level können die Entwicklung endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose antagonisieren.

Auch die Einnahme der Flavanone Naringenin und Hesperetin (152 mg Aglykone) führte zu keiner Beeinflussung der endothelialen Antwort auf reaktive Hyperämie. 1 h nach Studienbeginn wurde ein statistisch nicht signifikanter Anstieg des Δ PAT-Index auf 0,27 beobachtet. Die Plasmakonzentration des Aglykons Naringenin betrug zu t_{\max} 171,5 nmol/l und unterschied sich signifikant von t_0 (25,2 nmol/l). Die Plasmakonzentration von Hesperetin blieb über die ersten 2 h der Studie konstant ($c_0 = 466,7$ nmol/l), nach 4 h war sie auf 922,9 nmol/l (= c_{\max}) gestiegen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Naringenin bzw. Naringeninsulfat und Naringenin-Glucuronid zur Aufnahme in das Endothel der peripheren Gefäße zur Verfügung stehen. Spencer et al. berichteten, dass Flavanone in humanen Fibroblasten akkumulieren, wo sie von UDP-Glucuronosyl-Transferase metabolisiert werden [77]. Jedoch gibt es keine Hinweise auf die zelluläre Aufnahme von Flavanonen in humane endotheliale Zellen. Es bleibt demnach Spekulation, ob das Ausbleiben eines physiologischen Effektes von Flavanonen mit einer fehlenden Bioaktivität zu begründen ist, oder ob Flavanone aufgrund eines hohen first-pass-Effektes von Zellen des Endothels nicht aufgenommen werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Inaktivierung durch die Konjugation an Glucuronsäure in den Zellen; weitere Studien an Hautfibroblasten zeigten im Falle des Epicatechins, dass die Zellen Epicatechin und deren *O*-Methyl-Metabolite akkumulierten, die Glucuronidierungsreaktion jedoch im Gegensatz zu Naringenin ausblieb [209]. Die Flavanone werden also möglicherweise zwar aufgenommen, dann aber durch eine Glucuronidierung in eine inaktive Form überführt.

4.2 *In-vitro*-Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen

Die biologische Aktivität der Polyphenole ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden wurden Mechanismen untersucht, die sich auf den Einfluss von Epicatechin auf die Stabilität von *S*-Nitrosoglutathion und die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions beziehen.

4.2.1 Einfluß von Epicatechin auf die Stabilität von *S*-Nitrosoglutathion

S-Nitrosoglutathion (GSNO) dient als Transport und Speicherform von NO. Es wurde vermutet, dass Epicatechin die Aktivität von NO durch Interaktion mit GSNO moduliert. Daher wurden Untersuchungen zur Stabilität von GSNO in Anwesenheit von Epicatechin und/oder Eisenionen und Ascorbinsäure durchgeführt.

Epicatechin alleine hat keinen Effekt auf die Stabilität von GSNO, verhindert aber den Eisenionen-induzierten GSNO-Abbau. Auch der Eisenchelator Deferoxamin konnte dem Zerfall von GSNO entgegenwirken. Der Ascorbinsäure-induzierte Abbau wurde durch Epicatechin nicht beeinflusst. Diese Daten deuten darauf hin, dass Epicatechin Eisen chelatiert und so den Eisen-induzierten Zerfall von GSNO verhindert.

Die chelatierenden Eigenschaften von Epicatechin sind in der Literatur bereits beschrieben und werden als ein Mechanismus der antioxidativen Eigenschaften gesehen [210,211]. Heiss et al. konnten bereits einen Zusammenhang zwischen Flavanol-Einnahme und Erhöhung der NO-Verfügbarkeit herstellen, der zugrunde liegende Mechanismus bleibt jedoch ungeklärt [201]. Ob der hier beobachtete Effekt *in-vivo* zum Tragen kommt, ist unklar.

Eine erhöhte Eisen-Speicherung wird in Verbindung mit dem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Krankheiten gebracht [212,213]. Duffy et al. konnten durch Infusion von Deferoxamin (Desferal®) eine verbesserte NO-vermittelte, endothel-abhängige Vasodilatation in KHK-Patienten erzielen, die mit verminderten Serum-Eisen-Konzentrationen einhergingen [214]. Eine Beeinflussung der endogenen Eisen-Verfügbarkeit ist möglicherweise ein weiterer Faktor der komplexen Wirkung der Flavanole auf das Endothel und der kardioprotektiven Eigenschaften.

4.2.2 Interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von Vertretern verschiedener Flavonoidklassen auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) in murinen Aorten-Endothelzellen diskutiert. Die Zellen wurden mit dem Flavanol Epicatechin, dessen Hauptmetabolit 3'-*O*-Methyl-Epicatechin, dem Dimer Procyanidin B2, dem Flavanon Hesperetin und dem Isoflavon Genistein behandelt. Zu den Zeitpunkten 3, 12 und 24 h wurde die GJIC, sowie die Verteilung von Connexin43-Protein in der Zelle bestimmt. Hier zeigte das Procyanidin B2 den stärksten Effekt: zu allen drei Zeitpunkten konnte eine erhöhte GJIC beobachtet werden. Des Weiteren konnte nach 3 h ein erhöhter Einbau von Connexin43 in die Zellmembran beobachtet werden, nach 12 h und 24 h war zusätzlich eine stark erhöhte Expression des Proteins zu sehen. Im Gegensatz zu den anderen Testsubstanzen konnte nach Inkubation mit Procyanidin B2 eine erhöhte Proteinmenge nach 3 h im Western Blot nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 3.3.2**). Eine Erhöhung der Proteinmenge in der Membran deutet auf einen verminderten Abbau oder einen erhöhten Einbau und damit auf eine stabilisierende Wirkung hin. Nach Inkubation mit Epicatechin konnte nach 3 h, sowie nach 12 h und 24 h ein Anstieg der GJIC beobachtet werden. Die Auswertung der Verteilung von Connexin43 in der Zelle zeigte nach 3 h einen erhöhten Einbau des Proteins in die Membran und eine erhöhte Expression des Proteins nach 12 h. Die Inkubation von 3'-*O*-Methyl-Epicatechin führte zwar zu einer erhöhten Proteinmenge in der Membran, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung der GJIC festgestellt werden. Nach Behandlung mit Hesperetin konnte zu allen Zeitpunkten eine Erhöhung der Connexin43-Proteinmenge in der Membran und um den Zellkern festgestellt werden, was mit einer erhöhten GJIC nach 12 h und 24 h einherging. Genistein konnte die GJIC in MAEC nach 3 h erhöhen.

Andere Untersuchungen zum Einfluss von Flavanolen auf die GJIC wurden in Leber- bzw. Nierenendothelzellen durchgeführt und befassen sich mit protektiven Effekten vor Tumorpromoter-induzierter Inhibierung der GJIC. Tumorpromotoren wie 12-*O*-Tetradecanolyphosphol-13-acetat (TPA) sowie Wachstumsfaktoren sind Inhibitoren der GJIC. Die Regulierung der GJIC ist komplex und beruht mitunter auf einer Connexin43-Hyperphosphorylierung [140,215]. Sigler et al. zeigten erstmals einen protektiven Effekt von galloylierten Flavanolen auf Tumorpromoter-induzierte Herab-Regulierung der GJIC [216]. Ale-Agha et al. beschrieben diesen protektiven Effekt für Epicatechin und Genistein, der vermutlich auf einer Hemmung von TPA-induzierter Hyperphosphorylierung beruht. Die Inkubation mit Epicatechin und Genistein alleine führt zu einer Erhöhung der GJIC [217].

Über den Einfluss von Hesperetin und 3'-*O*-Methyl-Epicatechin auf die GJIC gibt es bisher keine Studien.

Eine gestörte Sauerstoffversorgung kann zu vaskulärer endothelialer Dysfunktion führen [218]. In-vitro-Untersuchungen in vaskulären Endothelzellen haben gezeigt, dass hypoxische Zustände mit anschließender Reoxygenierung zu einer verminderten GJIC führen. Dies beruht auf einer Aktivierung von Proteinkinasen (PKC), die zu einer Hyperphosphorylierung des Connexin43 und damit zu der Unterbrechung des Transports von Connexin43 in die Membranen führt [219]. Genistein kann als Tyrosin-Kinase-Inhibitor diesen Effekt entgegenzuwirken. GJIC spielt eine essentielle Rolle in der Morphogenese vieler Gewebe wie den Gefäßen und wird in Verbindung mit der Regulation des Gefäßtonus [220] und vaskulärer Reaktivität [221] gebracht.

Eine Erhöhung der GJIC durch Epicatechin konnte in der vorliegenden Arbeit für vaskuläre Endothelzellen bestätigt werden. Wie in **Kapitel 4.1.4** beschrieben, konnte für Epicatechin auch *in-vivo* ein protektiver Einfluß auf die Gefäßfunktion nachgewiesen werden. Das Procyanidin B2 zeigte in dieser Studie den größten Effekt auf die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation; in der Literatur sind derzeit keine Daten über den Einfluss von Procyanidin B2 auf die GJIC verfügbar. Erstmals wurde in dieser Arbeit auch durch Hesperetin eine Stimulation der GJIC nachgewiesen. Die hier beschriebenen Ergebnisse können zur Aufklärung des Mechanismus der gefäßprotektiven Wirkung der Flavonoide beitragen.

4.2 Analytik und Bioverfügbarkeit der Polyphenole

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen Wirksamkeitsnachweis für Polyphenole und Fettsäuren aus Nahrungs(ergänzungs)mitteln zu erbringen. Aus diesem Grund nimmt die Analytik der potentiellen Wirkstoffe und deren Metabolite im Blut einen hohen Stellenwert ein („proof of absorption“). Die Analytik der Flavanol-Monomere und Procyanidine basiert auf einer HPLC-Methode von Warden et al. und Lee et al. [97,151] mit elektrochemischer Detektion. Handelt es sich bei dem Probenmaterial um biologische Matrices wie Plasma oder Erythrozyten, findet vor HPLC-Analyse ein enzymatischer Verdau mit Glucuronidase und Sulfatase statt, um die Flavanol-Glucuronide und –Sulfate als freie Flavane der Analyse zugänglich zu machen. Im Fall von pflanzlichem Material ist eine Behandlung mit Glykosidase nicht erforderlich, da Flavane im Gegensatz zu den meisten anderen Flavonoiden nicht glykosidisch gebunden vorliegen.

Die für die in den vorliegenden Studien verwendeten Kakaopulver ermittelten Monomer-Gehalte (3,25 mg/g in HP-Pulver, 0,37 mg/g in LP-Pulver) sind vergleichbar mit den von Adamson et al. beschriebenen durchschnittlichen Monomer-Gehalten von 0,2 – 4,9 mg/g [61]. Die unterschiedlichen Gehalte sind auf den Herstellungsprozess zurückzuführen, in dem die Produktion zweier Chargen mit unterschiedlichen Polyphenol-Gehalten (HP: hoher Polyphenolgehalt; LP: geringer Polyphenolgehalt) für Studienzwecke beabsichtigt war. Rios et al. beschreiben gesamt-Polyphenol-Gehalte in Kakaopulver von 20 bis zu 70 mg/g, wobei ca. 10 % monomere Anteile darstellen. Die hier durchgeführte Analyse bestätigt zwar einen verhältnismäßig höheren Anteil an Dimeren (8,96 mg/g für das HP-, 0,58 mg/g für das LP-Produkt), jedoch kann keine endgültige Aussage über die gesamt-Proanthocyanidine gemacht werden, da höhere Polymere in dem hier verwendeten HPLC-System nicht detektierbar sind. Die Polyphenolgehalte der in dieser Studie verwendeten Chargen liegen in den Konzentrationsbereichen der im Handel üblichen Produkte.

Um schließlich eine Quantifizierung aller oligomeren Proanthocyanidine gewährleisten zu können, bedarf es weiteren Modifikationen des HPLC-Systems, da besonders im Bereich des für das Procyanidin B2 zu erwartenden Retentionszeitraums von 3 bis 5 min Störsignale der biologischen Matrices auftreten. Weiterhin muss ein Abgleich gegen isolierte Standardsubstanzen erfolgen. Da diese kommerziell nicht erhältlich sind, wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Dimergemisch zur Quantifizierung verwendet.

4.2.1 Bioverfügbarkeit der Flavanole

In den in dieser Arbeit durchgeführten Studien wurden Epicatechin-Mengen von 4,2 mg (eine Dosis LP-Kakao) bis 79,2 mg (2 Dosen HP-Kakao) verabreicht. Die maximale Plasmakonzentration von gesamt-Epicatechin (freies, glucuronidiertes und sulfatiertes) betrug 166 nmol/l.

Die Plasmakonzentrations-Verläufe der Methyl-Metabolite von Epicatechin waren unterschiedlich. Auffallend ist der deutlich höhere Anteil von 3'-O-Methyl-Epicatechin; hier wurden Maximalkonzentrationen von 493 nmol/l erreicht. Im Gegensatz dazu waren die Änderungen der Plasmakonzentration von 4'-O-Methyl-Epicatechin gering. Nielsen et al. [85] beschrieben eine spezifische Demethylierung catecholischer Hydroxygruppen durch Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen an der 4'-Position. Es ist anzunehmen, dass weniger eine geringere Methylierung an der 4'-Position, sondern diese Demethylierungsreaktion Ursache für die geringen Plasmakonzentrationen von 4'-O-Methyl-Epicatechin ist.

Der Verlauf der Plasmakonzentrationen war für gesamt-Epicatechin und 3'-O-Methyl-Epicatechin vergleichbar, die t_{max} betrug 1 h. Die maximal erreichte gesamt-Flavanol-Konzentration (= glucuronidiertes, sulfatiertes, methyliertes und freies Epicatechin sowie Catechin und dessen Metabolite) berechnet sich demzufolge aus der Plasmakonzentration von glucuronidiertem und sulfatierten Epicatechin sowie der des 3'-O-Methyl-Epicatechins und beträgt 659 nmol/l (1 h).

Weder in den Untersuchungen nach Einfachdosierung, noch nach 3-monatiger Supplementierung konnte freies Epicatechin in Plasma oder Erythrozyten nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass in keiner der Plasmaproben Catechin oder dessen Metabolite nachweisbar waren. Dies ist vermutlich durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu begründen: die Konzentration des Catechins in den Präparaten war um die Hälfte geringer, als die des Epicatechins; des weiteren ist die Bioverfügbarkeit von Catechin um 50% geringer, als die des Epicatechins [90]. Auch eine kompetitive Absorption im GI-Trakt könnte das Fehlen von Catechin und dessen Metabolite erklären. Des weiteren können unterschiedliche Löslichkeiten der Metabolite in biologischen Flüssigkeiten und Eliminierungswege (biliär oder renal) eine Rolle spielen; im Falle des Quercetins wurden diese Unterschiede im Vergleich zu Catechin bereits nachgewiesen [82].

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Plasmakonzentrationen von gesamt-Epicatechin stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werte aus Humanstudien (30 nmol/l bis 700

nmol/l Plasma) überein [80,222]. Oft sind in Tierstudien an Tiermodellen höhere Flavanol-Konzentrationen im Plasma zu finden, jedoch muss beachtet werden, dass in diesen Studien meist hohe Dosierungen verabreicht wurden. So konnten Okushio et al. nach Gabe von 364 μmol Epicatechin-Reinsubstanz/kg Körpergewicht im Tierversuch gesamt-Flavanol-Konzentrationen von 210 $\mu\text{mol/l}$ Plasma messen [89]. Im Vergleich dazu enthält eine Dosis HP-Kakaopulver mit 39,6 mg lediglich 136,5 μmol Epicatechin, was bei einem durchschnittlichen Probandengewicht von 65 kg einer Dosierung von 2,1 μmol Epicatechin/kg Körpergewicht entspricht, die zu einer maximalen Plasmakonzentration von 63,0 nmol/l gesamt-Epicatechin (ohne Methyl-Metabolite) führten.

4.2.2 Flavanol-Konzentrationen nach Supplementierung über 12 Wochen

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Akkumulation von Epicatechin oder dessen Metaboliten in Plasma oder Erythrozyten als Folge täglicher Einnahme von Kakao-Polyphenolen.

Nachdem der Bioverfügbarkeits-Nachweis (*proof of absorption*) für Epicatechin nach einer Einmaldosis erbracht wurde, konnte in der Langzeitstudie weder eine Akkumulation von freiem Epicatechin, noch von einem mit dieser Analysenmethode erfassbaren Metaboliten nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit derzeit verfügbaren Daten zur Akkumulation von Flavanolen *in-vivo*. Van Het Hof et al. konnten eine konstant erhöhte Plasmakonzentration von Tee-Flavanolen nur durch kontinuierliche Gabe von Tee in 2-stündigen Intervallen erzielen [223], eine tägliche Supplementierung mit schwarzem Tee führte in einer Studie von Duffy et al. zu keiner Akkumulation von Flavanolen im Blut [224]. In verschiedenen *in-vitro*-Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass Epicatechin die Zellwand penetrieren kann, wie am Beispiel von Fibroblasten und Endothelzellen gezeigt wurde [76,77]. Auch die perkutane Penetration von Epicatechin wurde nachgewiesen. Ob eine Akkumulation in Zellen der Haut nach systemischer Gabe stattfindet, ist jedoch noch ungeklärt. Basierend auf den hier erhobenen Daten gibt es Grund zur Annahme, dass Epicatechin in tieferen Kompartimenten wie Geweben gespeichert wird, wobei die Haut ein potentiell Speicherorgan darstellt.

4.2.3 Bioverfügbarkeit oligomerer Procyanidine

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob eine orale Gabe von oligomeren Procyanidinen aus Traubenkernextrakt zu erhöhten Plasmakonzentrationen der monomeren Untereinheiten bzw. deren Metabolite führt.

Nach einer Dosis von 1,6 g oligomerer Procyanidine aus Traubenkernextrakt konnte in einem Zeitraum von 6 h kein Anstieg an Catechin, Epicatechin oder deren Metabolite festgestellt werden. Daten der Literatur liefern widersprüchliche Informationen bezüglich der Bioverfügbarkeit der oligomeren Procyanidine.

Sano et al. beschreiben in einer Humanstudie eine Procyanidin B1 Plasmakonzentration von lediglich 10 nmol/l nach Verzehr von 2 g procyanidinreichen Traubenkernextraktes [91]. Nach Konsum von 0,375 g Kakao/kg Körpergewicht wurden nur 41 nmol/l Procyanidin B2 gefunden [92]. Dagegen zeigen jedoch Donovan et al., dass die Gabe einer hohen Dosis Traubenkernextraktes zwar zu leicht erhöhten Plasma-Monomer-Gehalten in der Ratte führte, jedoch weder Procyanidin B1, noch B2 oder B3 nachzuweisen sind. Nach Applikation von reinem Procyanidin B3 waren kein Epicatechin oder Metabolite im Plasma nachweisbar. Donovan et al. vertreten die Hypothese, dass sich mögliche Effekte der Procyanidine auf das Darmlumen beschränken [93]. Gonthier et al. vermuten eine verringerte Absorptionsrate der Proanthocyanidine im Vergleich zu Catechin und Epicatechin [225].

Die in der hier vorliegenden Studie beobachteten Ergebnisse lassen nicht auf eine prä- oder postabsorptionale Spaltung der Proanthocyanidine schließen. Unter der Annahme, dass eine Depolymerisierung stattgefunden hätte, sollten aufgrund der hohen Dosierung von 1,6 g Procyanidinen im Vergleich zu 117 mg Monomeren aus dem Kakaopulver eine für die Detektion im Plasma ausreichende Menge an Monomer verfügbar sein.

In der Literatur werden verschiedene Ursachen für die geringe Bioverfügbarkeit der Proanthocyanidine diskutiert, wobei präabsorptionale Effekte im Vordergrund stehen. Spencer et al. zeigten, dass Procyanidine bei Inkubation mit humanem Speichel stabil sind [80]. Auch ein Zerfall der Proanthocyanidine im sauren Milieu des Magens wurde vermutet. *In-vitro* Untersuchungen zeigen eine starke pH-Abhängigkeit der Depolymerisierung; bei einem pH-Wert > 4 ist diese jedoch gering [226,227]. Da nach der Einnahme von Procyanidinen mit der Mahlzeit eine Anhebung des pH-Wert im Magen zu erwarten ist, führten Rios et al. eine *in-vivo*-Studie durch, in der gesunden Probanden alle zehn Minuten nach Konsum von 500 ml eines Kakaogetränkes eine Mageninhalts-Probe entnommen und

analysiert wurde. Hier zeigte sich, dass während der 50-60 min Verweildauer im Magen der saure pH-Wert nicht zu einer Veränderung des Procyanidinprofils führt. Ein Großteil der eingenommenen Procyanidine erreicht den intestinalen Trakt intakt [228]. Eine präabsorptionale Veränderung könnte somit nur im Darmlumen stattfinden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nicht angenommen werden, dass der durch das HP-Kakaopulver erzielte Effekt auf den PAT-Index auf Procyanidine zurückzuführen ist, da ansonsten eine vergleichbare Wirkung des Traubenkernextraktes zu erwarten gewesen wäre. Neben der Monomer-Menge von 117 mg wurde durch das HP-Kakaopulver eine Procyanidinmenge von 535 mg eingenommen, was weniger als ein Drittel der mit dem Traubenkernextrakt insgesamt eingenommenen Proanthocyanidinmenge von 1,6 g darstellt. Die Ergebnisse mit Traubenkernextrakt lassen vermuten, dass Epicatechin für die endotheliale Antwort auf reaktive Hyperämie verantwortlich ist.

4.2.4 Bioverfügbarkeit der Flavanone

Diese Untersuchung sollte Aufschluss über die Bioverfügbarkeit der Rhamnoglucoside Naringin und Hesperidin, bzw. deren Aglykone Naringenin und Hesperetin geben.

Die Plasmakonzentration von Naringenin betrug zu t_{\max} 172 nmol/l und unterschied sich signifikant von t_0 (25,2 nmol/l). Die Plasmakonzentration von Hesperetin blieb über die ersten 2 h der Studie konstant ($c_0 = 467$ nmol/l), nach 4 h war sie auf 923 nmol/l (= c_{\max}) gestiegen; dieser Anstieg war statistisch nicht signifikant. Naringenin und Hesperetin weisen demnach unterschiedliche t_{\max} -Werte auf (1 h bzw. 4-6 h). Ein Effekt auf die endotheliale Antwort auf reaktive Hyperämie (PAT-Studie) konnte nicht festgestellt werden.

Ein dem hier gefundenen entsprechender Verlauf der Plasmakonzentration von Naringenin und dessen Metabolite (Glucuronide und Sulfate) wird in der Literatur beschrieben [229,230].

Die Analyse der eingesetzten Flavanon-Supplemente erfolgte nach Enzymverdau mit den kommerziell erhältlichen α -L-Rhamnosidasen Naringinase und Hesperidinase. Die Kontrolle ohne Zusatz der Enzyme ergab, dass in dem Supplement < 5 % der Flavanone als Aglykon vorlagen. Da die Enzyme auch in geringem Maße β -D-Glucosidase-Aktivität besitzen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Glucoside wie z.B. Naringenin-7-O-glucosid vorlagen, die eine andere Bioverfügbarkeit als Naringenin-7-O-rhamnoglucosid aufweisen, wie eine Studie von Felgines am Tiermodell ergab [230].

In der Literatur werden entsprechende t_{\max} -Werte von Hesperetin und dessen Glucuronide und Sulfate nach einer Einmal-Dosis von Hesperidin beschrieben [229]. Erlund et al. beschrieben große interindividuelle Schwankungen in der Bioverfügbarkeit der Flavanone, wie sie auch für Quercetin-3-rhamnoglucosid und Isoflavone bekannt sind [229].

Es wurde ursprünglich angenommen, dass Flavonoide vor der Absorption quantitativ in ihre Aglykone überführt werden müssen [218]; im Falle rhamnoglucosidisch gebundener Flavonoide erfolgt dies durch die nur im Colon vorliegenden α -Rhamnosidasen bakteriellen Ursprungs. Hollmann et al. konnten diese Hypothese jedoch erstmals am Beispiel des Quercetins widerlegen. Dies wurde auch für andere Flavonoide wie Naringin und Hesperidin bestätigt [69,73,144,231].

In Anbetracht der komplexen Zusammenhänge der Pharmakokinetik von Flavanonen ist es nicht möglich, anhand der vorliegenden Daten eine Aussage über die unterschiedliche Bioverfügbarkeit von Naringenin und Hesperetin oder das darauf zurück zu führende Ausbleiben eines physiologischen Effektes zu treffen.

4.2.5 Erythrozyten

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein Epicatechin-Metabolit in Erythrozyten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Epicatechin in seiner methylierten, jedoch nicht in seiner glucuronidierten oder sulfatierten Form in Erythrozyten eindringt (siehe **Tab. 3.18, Abb. 3.22**).

Während im Plasma die Summe der nicht-methylierten Epicatechin-Metabolite nach Einnahme von HP-Pulver auf ein Vierfaches des Basalwertes stieg, konnte in RBC lediglich eine statistisch nicht signifikante Erhöhung an nicht-methylierten Metaboliten um ca. 10 % beobachtet werden.

Unter der Annahme, dass das Verteilungsmuster der methylierten und nicht-methylierten Formen in Plasma und in Erythrozyten gleich ist, sollte die Konzentration der nicht-methylierten Epicatechin-Metaboliten deutlich über der Detektionsgrenze (0,35 nmol/l) des hier verwendeten Systems liegen. Da Epicatechin nicht nachweisbar war, ist anzunehmen, dass eine Aufnahme in Erythrozyten nicht stattgefunden hat. In der Literatur wird eine Akkumulation von Quercetin in Erythrozyten nach passiver Diffusion durch die Zellmembran beschrieben. Quercetin bindet hier an Hämoglobin, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen Plasmaalbumin-Quercetin einstellt. Fiorani et al. schlagen Erythrozyten als generelles Flavonoid-Reservoir vor [232]. Diese Hypothese kann aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse zumindest für Epicatechin und dessen Glucuronide, Sulfate oder methylierten Formen nicht gestützt werden.

Zusammenfassung:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, pharmakologische Wirkungen von Mikronährstoffen (Flavonoiden, Lipide) aus Nahrungsmitteln und/oder Nahrungsergänzungsmitteln mit unabhängigen Messmethoden zu erfassen. Untersucht wurden Parameter der Photoprotektion, sowie Effekte von Mikronährstoffen auf die Hautstruktur und Endothelfunktion. Parallel sollte ein Nachweis der Bioverfügbarkeit („proof of absorption“) für die einzelnen Substanzen erbracht werden.

Nach Einmalgabe eines mit Polyphenolen angereicherten Kakaogetränkes wurde eine Verbesserung der kutanen Mikrozirkulation beobachtet. Dies zeigte sich in einem Anstieg des Blutflusses und der Sauerstoffsättigung. Parallel zu beiden Effekten stieg die Konzentration von gesamt-Epicatechin (freies, glucuronidiertes und sulfatiertes Flavanol) sowie die des Metaboliten 3'-O-Methyl-Epicatechin an. Epicatechin ist ein Hauptflavanoid in Kakao.

Auch unter Langzeit-Supplementierung mit dem polyphenolreichen Kakaogetränk über einen Zeitraum von 12 Wochen wurde eine Erhöhung des kutanen und subkutanen Blutflusses sowie der Sauerstoffsättigung beobachtet. Des Weiteren wurde eine Verbesserung der Hautqualität in Hinblick auf Rauigkeit, Schuppigkeit, Dichte, Dicke, Hydratation und transepidermale Wasserverlust erzielt. Die Gabe von Kakaopolyphenolen war zudem mit einer photoprotektiven Wirkung assoziiert, wobei die Empfindlichkeit der Haut gegenüber UV-Strahlung abnahm, was anhand der UV-induzierten Erythembildung gezeigt werden konnte. Eine Akkumulation von Flavanolen oder deren Metabolite im Blut wurde nicht festgestellt. In der Kontrollgruppe, die Polyphenol-armen Kakao erhalten hatte, trat keiner der o.g. Effekte auf.

Physiologische und kosmetische Hautparameter reagierten auch auf die Supplementierung mit α -Linolensäure reichen Pflanzenprodukten. Über einen Zeitraum von 12 Wochen führte die Gabe des ω -3-Fettsäure-reichen Produktes zu einer Änderung der Hautqualität, was sich in verminderter Rauigkeit, Schuppigkeit und Glätte, einem geringeren transepidermalen Wasserverlust sowie einer verbesserten Hydratation der Haut äußerte. Des Weiteren wurde eine verminderte Sensitivität gegenüber Nicotinat-induzierten Entzündungsreaktionen festgestellt. Im Verlauf der Studie änderte sich das Verhältnis von ω -6- zu ω -3-Fettsäuren zugunsten der ω -3-Fettsäuren.

Zusammenfassung

Untersuchungen zum Einfluss von Flavonoiden auf die Endothelfunktion zeigten, dass schon nach Einmalgabe von Kakao-Polyphenolen der periphere arterielle Tonus verbessert ist. Der Effekt war mit den Plasmakonzentrationen an gesamt-Epicatechin und 3'-O-Methyl-Epicatechin korreliert; in Erythrozyten wurde ein Konzentrationsanstieg von 3'-O-Methyl-Epicatechin gemessen. Für Flavanone und oligomere Procyanidine konnte in diesem System kein Effekt nachgewiesen werden.

Begleitend wurden *in-vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Epicatechin den Eisenionen-induzierten Zerfall von S-Nitrosoglutathion verhindert, was vermutlich auf chelatierenden Eigenschaften des Flavonoids beruht. Weiter wurde nachgewiesen, dass Epicatechin, Procyanidin B2 und Hesperetin die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in murinen Aortenendothel-Zellen stimulieren.

Summary

The aim of this study was to detect pharmacological effects of micronutrients (flavonoids, lipids) from foods or food supplementation with independent methods. Therefore, effects of micronutrients on endothelial function, skin physiology and parameters of photoprotection were analysed. Simultaneously the bioavailability of the tested compounds was to be determined to prove that they had been absorbed.

After a single dose of a cocoa drink rich in polyphenols an improvement of the cutaneous microcirculation was observed as shown by augmented relative blood flow and oxygen saturation. At the same time, total plasma epicatechin levels (measured as sum of free, glucuronidated and sulfated epicatechin) increased. Epicatechin is one of the main cocoa flavonoids.

According to these findings, increases in cutaneous and subcutaneous blood flow and oxygen saturation were observed after long-term supplementation with the polyphenol-rich cocoa drink for 12 weeks. Additionally, improvement of skin quality concerning roughness, scaling, density, thickness, hydration and transepidermal water loss were observed. The supplementation also associated with photoprotective effects as measured by a decreased sensitivity to UV-irradiation, which was expressed as decreased erythema formation. An accumulation of flavanols or their metabolites in plasma or erythrocytes could not be detected. However, a decrease in the ω -6/ ω -3-fatty acid ratio was observed. None of these effects was observed in the group consuming the low polyphenol cocoa.

Physiological and cosmetical skin parameters could also be influenced by supplementation with plant-derived oils rich in α -linolenic acid. 12 weeks of daily supplementation with an ω -3-fatty acid product lead to a decrease in roughness, scaling and transepidermal water loss, as well as to an increased smoothness and hydration of the skin. Furthermore, the sensitivity towards nicotinate-induced inflammatory reactions improved. During the study, the ω -6/ ω -3-fatty acid ratio changed in favor of the sum of ω -3-fatty acids.

Investigations on the effect of flavonoids on the endothelial function revealed that an improvement of the peripheral arterial tone can be achieved after a single dose of polyphenol-rich cocoa. These findings correlated with enhanced plasma concentrations of total

epicatechin and the metabolite 3'-*O*-methyl-epicatechin. For the first time 3'-*O*-methyl-epicatechin was detected in erythrocytes. No beneficial effect of flavanones and procyanidines were observed in this system.

Concomitantly *in-vitro*-studies were conducted in order to further elucidate the mechanism responsible for the effects observed in this study. It was shown that epicatechin prevents the iron-induced depletion of *S*-nitrosoglutathione which is probably due to the chelating properties of the flavanol. Studies conducted in murine aortic endothelial cells revealed that epicatechin, procyanidin B2 and hesperetin stimulates the intercellular communication via gap junctions. Procyanidin B2 was the most potent compound in this system.

Lebenslauf

01/2003 -	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
02/2003	Drittes Staatsexamen , Erlangen der Approbation als Apothekerin
06 – 10/2002	Pharmaziepraktikantin in der Sonnenapotheke in Dormagen
01 - 06/2002	Pharmaziepraktikantin an der University of Florida in Gainesville, USA
11 – 12/2001	Pharmaziepraktikantin in der Sonnenapotheke in Dormagen
10/2001	Zweites Staatsexamen
08 – 10/2000	8-wöchiges Praktikum bei SmithklineBeecham, Microbiological Plant in Bristol, Tennessee, USA
11/1999 - 10/2002	Hauptstudium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/1999	Erstes Staatsexamen
10/1997 - 09/1999	Grundstudium der Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald
06/1997	Abitur
09 - 12/1994	3-monatiger Sprachaufenthalt in Chambéry, Frankreich
1988 – 1997	Bettina-von-Arnim-Gymnasium in Dormagen
1984 – 1988	Erich-Kästner-Grundschule in Dormagen
16.05.1978	geboren in Neuss, als Tochter von Dr. Theodor Siegfried Neukam, Diplom-Chemiker, und Renate Luise Neukam, Oberstudienrätin

Literatur

1. Colquhoun DM: **Nutraceuticals: vitamins and other nutrients in coronary heart disease.** *Curr Opin Lipidol* 2001, **12**:639-646.
2. Villasenor IM, Simon MK, Villanueva AM: **Comparative potencies of nutraceuticals in chemically induced skin tumor prevention.** *Nutr Cancer* 2002, **44**:66-70.
3. Grande F, Anderson JT, Chlouverakis C, Proja M, Keys A: **Effect of dietary cholesterol on man's serum lipids.** *J Nutr* 1965, **87**:52-62.
4. Simopoulos AP, Norman HA, Gillaspay JE, Duke JA: **Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants.** *J Am Coll Nutr* 1992, **11**:374-382.
5. Hardy G, Hardy I, Ball PA: **Nutraceuticals--a pharmaceutical viewpoint: part II.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003, **6**:661-671.
6. Kilbourne EM, Philen RM, Kamb ML, Falk H: **Tryptophan produced by Showa Denko and epidemic eosinophilia-myalgia syndrome.** *J Rheumatol Suppl* 1996, **46**:81-88; discussion 89-91.
7. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 1980, **288**:373-376.
8. Kelm M, Feelisch M, Deussen A, Strauer BE, Schrader J: **Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow.** *Cardiovasc Res* 1991, **25**:831-836.
9. Vanderkooi JM, Wright WW, Erecinska M: **Nitric oxide diffusion coefficients in solutions, proteins and membranes determined by phosphorescence.** *Biochim Biophys Acta* 1994, **1207**:249-254.
10. Mitsumoto A, Kim KR, Oshima G, Nakagawa Y: **Chelation of cellular Cu(I) raised the degree of glyoxalase I inactivation in human endothelial cells upon exposure to S-nitrosoglutathione through stabilization of S-nitrosothiols.** *Biol Pharm Bull* 2001, **24**:336-341.
11. Mathews WR, Kerr SW: **Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide.** *J Pharmacol Exp Ther* 1993, **267**:1529-1537.
12. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA: **Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient.** *Science* 1997, **276**:2034-2037.

13. Davies PF: **Flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Physiol Rev* 1995, **75**:519-560.
14. Michiels C: **Physiological and pathological responses to hypoxia.** *Am J Pathol* 2004, **164**:1875-1882.
15. Kuvin JT, Patel AR, Karas RH: **Need for standardization of noninvasive assessment of vascular endothelial function.** *Am Heart J* 2001, **141**:327-328.
16. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM: **Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease.** *Circulation* 2000, **101**:1899-1906.
17. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, Karas RH: **Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease.** *J Am Coll Cardiol* 2001, **38**:1843-1849.
18. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A: **Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **44**:2137-2141.
19. Celermajer DS: **Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?** *J Am Coll Cardiol* 1997, **30**:325-333.
20. Chenzbraun A, Levin G, Scheffy J, Keren A, Stern S, Goor D: **The peripheral vascular response to exercise is impaired in patients with risk factors for coronary artery disease.** *Cardiology* 2001, **95**:126-130.
21. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P: **Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.** *N Engl J Med* 1986, **315**:1046-1051.
22. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE: **Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.** *Lancet* 1992, **340**:1111-1115.
23. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F: **Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease.** *Atherosclerosis* 1997, **129**:111-118.
24. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al.: **Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations.** *J Am Coll Cardiol* 1995, **26**:1235-1241.

25. Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, Schnell TI, Pumper GM, Kuvin JT, Schnall RP, Holmes DR, Higano ST, Lerman A: **Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease.** *J Am Coll Cardiol* 2003, **41**:1761-1768.
26. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE: **Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude.** *Am Heart J* 2003, **146**:168-174.
27. Fukuda T, Wang H, Nakanishi H, Yamamoto K, Kosaka T: **Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia.** *Neurosci Res* 1999, **33**:49-55.
28. Trump BF, Berezesky IK, Smith MW, Phelps PC: **The role of ionized cytosolic calcium ([Ca²⁺]_i) in injury and recovery from anoxia and ischemia.** *Md Med J* 1992, **41**:505-508.
29. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: **Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.** *N Engl J Med* 1989, **320**:915-924.
30. Thews GM, E.; Vaupel, P.: **Anatomie Physiologie Pathophysiologie.** 1999.
31. Schwegler S: **Der Mensch- Anatomie und Physiologie.** 1998.
32. Diffey BL, Farr PM, Oakley AM: **Quantitative studies on UVA-induced erythema in human skin.** *Br J Dermatol* 1987, **117**:57-66.
33. Gray J: **Skin Care.** http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_16.htm, 1997.
34. Stahl W, Sies H: **Carotenoids and protection against solar UV radiation.** *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002, **15**:291-296.
35. Stahl W, Heinrich U, Wiseman S, Eichler O, Sies H, Tronnier H: **Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans.** *J Nutr* 2001, **131**:1449-1451.
36. Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W: **Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema.** *J Nutr* 2003, **133**:98-101.
37. Haag M: **Poly-Unsaturated Fatty Acids: Cellular Role and Clinical Applications.** *The Medicine Journal* 2001, **43**.
38. Nakamura MT, Nara TY: **Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003, **68**:145-150.

39. Horrocks LA, Yeo YK: **Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA).** *Pharmacol Res* 1999, **40**:211-225.
40. Stryer L: **Biochemie.** 1999.
41. Litman BJ, Niu SL, Polozova A, Mitchell DC: **The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction.** *J Mol Neurosci* 2001, **16**:237-242; discussion 279-284.
42. Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L, Jr., Barcelo-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T: **The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:2619-2624.
43. Barcelo-Coblijn G, Kitajka K, Puskas LG, Hogyes E, Zvara A, Hackler L, Jr., Farkas T: **Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1632**:72-79.
44. Owen AJ, Peter-Przyborowska BA, Hoy AJ, McLennan PL: **Dietary fish oil dose- and time-response effects on cardiac phospholipid fatty acid composition.** *Lipids* 2004, **39**:955-961.
45. Harper CR, Jacobson TA: **The fats of life: the role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease.** *Arch Intern Med* 2001, **161**:2185-2192.
46. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ: **Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease.** *Circulation* 2002, **106**:2747-2757.
47. Wainwright P: **Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function.** *Br J Nutr* 2000, **83**:337-339.
48. Harris JJ, Hibbeln JR, Mackey RH, Muldoon MF: **Statin treatment alters serum n-3 and n-6 fatty acids in hypercholesterolemic patients.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004, **71**:263-269.
49. Hibbeln JR, Salem N, Jr.: **Risks of cholesterol-lowering therapies.** *Biol Psychiatry* 1996, **40**:686-687.
50. Simopoulos AP: **Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases.** *J Am Coll Nutr* 2002, **21**:495-505.
51. Connor WE: **Importance of n-3 fatty acids in health and disease.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:171S-175S.
52. Harris WS: **Extending the cardiovascular benefits of omega-3 Fatty acids.** *Curr Atheroscler Rep* 2005, **7**:375-380.

53. Teuscher EM, M.; Lindequist, U.: **Biogene Arzneistoffe**. 1997, **5. Auflage**.
54. Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C: **Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health**. *Biomed Pharmacother* 2002, **56**:276-282.
55. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Zhang Z, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL: **Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods**. *J Mass Spectrom* 2003, **38**:1272-1280.
56. Scalbert A, Williamson G: **Dietary intake and bioavailability of polyphenols**. *J Nutr* 2000, **130**:2073S-2085S.
57. Lee MJ, Wang ZY, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS: **Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995, **4**:393-399.
58. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL: **Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation**. *J Agric Food Chem* 2003, **51**:7513-7521.
59. Williamson G, Manach C: **Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies**. *Am J Clin Nutr* 2005, **81**:243S-255S.
60. Weisburger JH: **Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001, **226**:891-897.
61. Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, et al.: **HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity**. *J Agric Food Chem* 1999, **47**:4184-4188.
62. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL: **Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption**. *J Nutr* 2004, **134**:613-617.
63. Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL: **Antioxidants in chocolate**. *Lancet* 1996, **348**:834.
64. Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, Permanyer J, Izquierdo-Pulido M: **More antioxidants in cocoa**. *J Nutr* 2001, **131**:834-835.
65. Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D: **Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women**. *Eur J Clin Nutr* 2001, **55**:76-81.

66. Rios LY, Gonthier MP, Remesy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA, Williamson G, Scalbert A: **Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects.** *Am J Clin Nutr* 2003, **77**:912-918.
67. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D: **Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands.** *Nutr Cancer* 1993, **20**:21-29.
68. Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesaniemi YA, Aro A: **Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables.** *Eur J Clin Nutr* 2002, **56**:891-898.
69. Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C: **Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice.** *Eur J Clin Nutr* 2003, **57**:235-242.
70. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gartner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, et al.: **Bioavailability and metabolism.** *Mol Aspects Med* 2002, **23**:39-100.
71. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E: **The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones.** *J Nutr* 2002, **132**:3577-3584.
72. Deprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A: **Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids.** *J Nutr* 2000, **130**:2733-2738.
73. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB: **Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers.** *Am J Clin Nutr* 1995, **62**:1276-1282.
74. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB: **Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans.** *J Nutr* 2001, **131**:66-71.
75. Shimo K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, Kinoshita N: **Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**:1521-1524.
76. Schroeder P, Klotz LO, Sies H: **Amphiphilic properties of (-)-epicatechin and their significance for protection of cells against peroxynitrite.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **307**:69-73.
77. Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C: **Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.** *Arch Biochem Biophys* 2004, **423**:148-161.

78. Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M: **Cocoa polyphenols and inflammatory mediators.** *Am J Clin Nutr* 2005, **81**:304S-312S.
79. O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, Williamson G: **Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase.** *FEBS Lett* 2001, **503**:103-106.
80. Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C: **Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo.** *Antioxid Redox Signal* 2001, **3**:1023-1039.
81. Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE: **(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:103-108.
82. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, Remesy C: **Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties.** *FEBS Lett* 1998, **426**:331-336.
83. Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C: **The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids.** *FEBS Lett* 1999, **458**:224-230.
84. Mauri PL, Iemoli L, Gardana C, Riso P, Simonetti P, Porrini M, Pietta PG: **Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, **13**:924-931.
85. Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO: **In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes.** *Xenobiotica* 1998, **28**:389-401.
86. Piskula MK, Terao J: **Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues.** *J Nutr* 1998, **128**:1172-1178.
87. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP: **Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998, **7**:351-354.
88. Walle T, Eaton EA, Walle UK: **Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenosulfotransferase.** *Biochem Pharmacol* 1995, **50**:731-734.
89. Okushio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F, Hara Y: **Identification of (-)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat.** *Drug Metab Dispos* 1999, **27**:309-316.

90. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J: **In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats.** *J Nutr* 2001, **131**:2885-2891.
91. Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M: **Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2003, **67**:1140-1143.
92. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL: **Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa.** *Am J Clin Nutr* 2002, **76**:798-804.
93. Donovan JL, Manach C, Rios L, Morand C, Scalbert A, Remesy C: **Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3.** *Br J Nutr* 2002, **87**:299-306.
94. Deprez S, Mila I, Huneau JF, Tome D, Scalbert A: **Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells.** *Antioxid Redox Signal* 2001, **3**:957-967.
95. Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Srail SK, Debnam ES, Rice-Evans C: **Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**:588-593.
96. Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Remesy C: **Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats.** *J Nutr* 2001, **131**:1753-1757.
97. Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA: **Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day.** *J Nutr* 2001, **131**:1731-1737.
98. Li C, Lee MJ, Sheng S, Meng X, Prabhu S, Winnik B, Huang B, Chung JY, Yan S, Ho CT, et al.: **Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion.** *Chem Res Toxicol* 2000, **13**:177-184.
99. Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Helleovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A: **Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms.** *Am J Epidemiol* 1997, **146**:223-230.
100. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D: **Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study.** *Arch Intern Med* 1996, **156**:637-642.

101. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al.: **Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study.** *Arch Intern Med* 1995, **155**:381-386.
102. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J: **Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study.** *Bmj* 1996, **312**:478-481.
103. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC: **Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals.** *Ann Intern Med* 1996, **125**:384-389.
104. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D: **Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study.** *Am J Clin Nutr* 1997, **65**:1489-1494.
105. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL: **Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes.** *J Nutr Biochem* 2003, **14**:104-110.
106. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM: **Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans.** *Am J Clin Nutr* 2001, **74**:596-602.
107. Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, Coehlo D, Gosse F, Raul F: **Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells.** *Cancer Lett* 2002, **175**:147-155.
108. Arts IC, Hollman PC, Bueno De Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D: **Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study.** *Int J Cancer* 2001, **92**:298-302.
109. Alonso C, Ramon E, Lozano C, Parra JL, Torres JL, Coderch L: **Percutaneous absorption of flavan-3-ol conjugates from plant procyanidins.** *Drugs Exp Clin Res* 2004, **30**:1-10.
110. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radic Biol Med* 1996, **20**:933-956.
111. Lotito SB, Fraga CG: **(+)-Catechin prevents human plasma oxidation.** *Free Radic Biol Med* 1998, **24**:435-441.
112. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG: **Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status.** *J Nutr* 2000, **130**:2109S-2114S.

113. Zhu QY, Schramm DD, Gross HB, Holt RR, Kim SH, Yamaguchi T, Kwik-Uribe CL, Keen CL: **Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis.** *Clin Dev Immunol* 2005, **12**:27-34.
114. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Takizawa T, Nakamura T, Terao J: **Cocoa powder enhances the level of antioxidative activity in rat plasma.** *Br J Nutr* 2000, **84**:673-680.
115. Lotito SB, Fraga CG: **Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma.** *Proc Soc Exp Biol Med* 2000, **225**:32-38.
116. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T: **Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice.** *J Nutr* 2001, **131**:27-32.
117. Kraemer T, Prakosay I, Date RA, Sies H, Schewe T: **Oxidative modification of low-density lipoprotein: lipid peroxidation by myeloperoxidase in the presence of nitrite.** *Biol Chem* 2004, **385**:809-818.
118. Schroeder P, Klotz LO, Buchczyk DP, Sadik CD, Schewe T, Sies H: **Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**:782-787.
119. Cornicelli JA, Trivedi BK: **15-Lipoxygenase and its inhibition: a novel therapeutic target for vascular disease.** *Curr Pharm Des* 1999, **5**:11-20.
120. Sadik CD, Sies H, Schewe T: **Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action.** *Biochem Pharmacol* 2003, **65**:773-781.
121. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H: **Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase.** *Biol Chem* 2001, **382**:1687-1696.
122. Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL: **Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells.** *Am J Clin Nutr* 2001, **73**:36-40.
123. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ: **Myeloperoxidase.** *Curr Opin Hematol* 2000, **7**:53-58.
124. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW: **Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions.** *J Clin Invest* 1994, **94**:437-444.

125. Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T: **Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids.** *FEBS Lett* 2003, **537**:146-150.
126. Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL: **Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function.** *J Nutr* 2000, **130**:2120S-2126S.
127. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL: **Cocoa inhibits platelet activation and function.** *Am J Clin Nutr* 2000, **72**:30-35.
128. Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA: **Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion.** *Free Radic Biol Med* 2002, **33**:1693-1702.
129. Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH: **Chocolate consumption and platelet function.** *Jama* 2002, **287**:2212-2213.
130. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ: **Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function.** *Am J Clin Nutr* 2003, **77**:1466-1473.
131. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL: **The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function.** *Thromb Res* 2002, **106**:191-197.
132. Evans WH, Martin PE: **Gap junctions: structure and function (Review).** *Mol Membr Biol* 2002, **19**:121-136.
133. Jiang JX, Goodenough DA: **Heteromeric connexons in lens gap junction channels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:1287-1291.
134. Trosko JE, Ruch RJ: **Cell-cell communication in carcinogenesis.** *Front Biosci* 1998, **3**:d208-236.
135. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G: **Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome.** *Biol Chem* 2002, **383**:725-737.
136. Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG: **Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking.** *J Cell Sci* 2000, **113 (Pt 17)**:3037-3049.
137. Laird DW: **The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation.** *J Bioenerg Biomembr* 1996, **28**:311-318.

138. Diez JA, Ahmad S, Evans WH: **Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions.** *Eur J Biochem* 1999, **262**:142-148.
139. Kiehn O, Tresch MC: **Gap junctions and motor behavior.** *Trends Neurosci* 2002, **25**:108-115.
140. Hu J, Speisky H, Cotgreave IA: **The inhibitory effects of boldine, glaucine, and probucol on TPA-induced down regulation of gap junction function. Relationships to intracellular peroxides, protein kinase C translocation, and connexin 43 phosphorylation.** *Biochem Pharmacol* 1995, **50**:1635-1643.
141. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA: **Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines.** *J Cell Biol* 1990, **111**:2077-2088.
142. Clairmont A, Tessmann D, Sies H: **Analysis of connexin43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells.** *FEBS Lett* 1996, **397**:22-24.
143. Bex V, Mercier T, Chaumontet C, Gaillard-Sanchez I, Flechon B, Mazet F, Traub O, Martel P: **Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells.** *Cell Biochem Funct* 1995, **13**:69-77.
144. Matsumoto H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M, Hasegawa Y: **Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma.** *J Agric Food Chem* 2004, **52**:6653-6659.
145. Folch J, Lees M: **Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain.** *J Biol Chem* 1951, **191**:807-817.
146. Eder K, Reichlmayr-Lais AM, Kirchgessner M: **Studies on the methanolysis of small amounts of purified phospholipids for gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters.** *J Chromatogr* 1992, **607**:55-67.
147. Pathak MA: **Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation.** *J Am Acad Dermatol* 1982, **7**:285-312.
148. Tronnier H, Wiebusch M, Heinrich U, Stute R: **Surface evaluation of living skin.** *Adv Exp Med Biol* 1999, **455**:507-516.
149. Rodrigues LM, Pinto PC, Magro JM, Fernandes M, Alves J: **Exploring the influence of skin perfusion on transepidermal water loss.** *Skin Res Technol* 2004, **10**:257-262.

150. Bertram JS, Zhang LX: **Assays for regulation of gap junctional communication and connexin expression by carotenoids.** *Methods Enzymol* 1994, **234**:235-244.
151. Lee MJ, Prabhu S, Meng X, Li C, Yang CS: **An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection.** *Anal Biochem* 2000, **279**:164-169.
152. Arts IC, van De Putte B, Hollman PC: **Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk.** *J Agric Food Chem* 2000, **48**:1752-1757.
153. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA: **Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate.** *Eur J Clin Nutr* 1999, **53**:22-26.
154. Kromidas S: **Validierung in der Analytik.** 1999.
155. Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL: **A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage.** *J Nutr* 2000, **130**:2115S-2119S.
156. Bucheli P, Rousseau G, Alvarez M, Laloi M, McCarthy J: **Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of Theobroma cacao L. seeds.** *J Agric Food Chem* 2001, **49**:5046-5051.
157. Bruni R, Bianchini E, Bettarello L, Sacchetti G: **Lipid composition of wild ecuadorian Theobroma subincanum Mart. seeds and comparison with two varieties of Theobroma cacao L.** *J Agric Food Chem* 2000, **48**:691-694.
158. Primavera D., E. B: **Sensitive Skin: Mechanism and Diagnosis.** *Int J Cosmetic Science* 2005:1-10.
159. Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME: **Pentameric procyanidins isolated from Theobroma cacao seeds selectively downregulate ErbB2 in human aortic endothelial cells.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, **229**:255-263.
160. Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME: **Cocoa procyanidins inhibit proliferation and angiogenic signals in human dermal microvascular endothelial cells following stimulation by low-level H₂O₂.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, **229**:765-771.
161. Belcaro G, Rulo A, Candiani C: **Evaluation of the microcirculatory effects of Venoruton in patients with chronic venous hypertension by laserdoppler flowmetry, transcutaneous PO₂ and PCO₂ measurements, leg volumetry and ambulatory venous pressure measurements.** *Vasa* 1989, **18**:146-151.

162. Michiels C, Arnould T, Remacle J: **Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1497**:1-10.
163. Katsenis K: **Micronized purified flavonoid fraction (MPFF): a review of its pharmacological effects, therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency.** *Curr Vasc Pharmacol* 2005, **3**:1-9.
164. Greul AK, Grundmann JU, Heinrich F, Pfitzner I, Bernhardt J, Ambach A, Biesalski HK, Gollnick H: **Photoprotection of UV-irradiated human skin: an antioxidative combination of vitamins E and C, carotenoids, selenium and proanthocyanidins.** *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002, **15**:307-315.
165. Tobi SE, Gilbert M, Paul N, McMillan TJ: **The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation.** *Int J Cancer* 2002, **102**:439-444.
166. Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC: **Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes.** *Faseb J* 2003, **17**:1913-1915.
167. Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H: **Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, **176**:110-117.
168. Basu-Modak S, Gordon MJ, Dobson LH, Spencer JP, Rice-Evans C, Tyrrell RM: **Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts.** *Free Radic Biol Med* 2003, **35**:910-921.
169. Gensler HL, Timmermann BN, Valcic S, Wachter GA, Dorr R, Dvorakova K, Alberts DS: **Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea.** *Nutr Cancer* 1996, **26**:325-335.
170. Lu YP, Lou YR, Xie JG, Peng QY, Liao J, Yang CS, Huang MT, Conney AH: **Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:12455-12460.
171. Steerenberg PA, Garssen J, Dortant P, Hollman PC, Alink GM, Dekker M, Bueno-de-Mesquita HB, Van Loveren H: **Protection of UV-induced suppression of skin contact hypersensitivity: a common feature of flavonoids after oral administration?** *Photochem Photobiol* 1998, **67**:456-461.

172. Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H: **Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress.** *Carcinogenesis* 2001, **22**:287-294.
173. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK: **Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation.** *Carcinogenesis* 2003, **24**:1379-1388.
174. Jeon SE, Choi-Kwon S, Park KA, Lee HJ, Park MS, Lee JH, Kwon SB, Park KC: **Dietary supplementation of (+)-catechin protects against UVB-induced skin damage by modulating antioxidant enzyme activities.** *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003, **19**:235-241.
175. Darr D, Fridovich I: **Free radicals in cutaneous biology.** *J Invest Dermatol* 1994, **102**:671-675.
176. Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK: **Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin.** *Carcinogenesis* 2003, **24**:927-936.
177. Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H: **Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:795-798.
178. Matsumoto M, Kotani M, Fujita A, Higa S, Kishimoto T, Suemura M, Tanaka T: **Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model mice, NC/Nga.** *Br J Dermatol* 2002, **146**:221-227.
179. Purba MB, Kouris-Blazos A, Wattanapenpaiboon N, Lukito W, Rothenberg E, Steen B, Wahlqvist ML: **Can skin wrinkling in a site that has received limited sun exposure be used as a marker of health status and biological age?** *Age Ageing* 2001, **30**:227-234.
180. Purba MB, Kouris-Blazos A, Wattanapenpaiboon N, Lukito W, Rothenberg EM, Steen BC, Wahlqvist ML: **Skin wrinkling: can food make a difference?** *J Am Coll Nutr* 2001, **20**:71-80.
181. Boelsma E, van de Vijver LP, Goldbohm RA, Klopping-Ketelaars IA, Hendriks HF, Roza L: **Human skin condition and its associations with nutrient concentrations in serum and diet.** *Am J Clin Nutr* 2003, **77**:348-355.
182. Focke M, Sesztak-Greinecker G, Brannath W, Gotz M, Jarisch R, Hemmer W: **Plasma levels of polyunsaturated fatty acids in children with atopic dermatitis and in atopic and nonatopic controls.** *Wien Klin Wochenschr* 2005, **117**:485-491.

183. Batres-Cerezo R, Dupont J, Garcia PA, Kies C, Mathias MM: **Studies of women eating diets with different fatty acid composition. III. Fatty acids and prostaglandin synthesis by platelets and cultured human endothelial cells.** *J Am Coll Nutr* 1991, **10**:327-339.
184. Guivernau M, Meza N, Barja P, Roman O: **Clinical and experimental study on the long-term effect of dietary gamma-linolenic acid on plasma lipids, platelet aggregation, thromboxane formation, and prostacyclin production.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994, **51**:311-316.
185. Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamei M, Shibata H, Matsumoto I, Abe K, Hashizume S: **Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism.** *Nutrition* 2005, **21**:594-601.
186. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyyssonen K, Salonen JT: **Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans.** *Free Radic Biol Med* 2004, **37**:1351-1359.
187. Mueller RS, Fettman MJ, Richardson K, Hansen RA, Miller A, Magowitz J, Ogilvie GK: **Plasma and skin concentrations of polyunsaturated fatty acids before and after supplementation with n-3 fatty acids in dogs with atopic dermatitis.** *Am J Vet Res* 2005, **66**:868-873.
188. Mao-Qiang M, Elias PM, Feingold KR: **Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function.** *J Clin Invest* 1993, **92**:791-798.
189. Boelsma E, Hendriks HF, Roza L: **Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids.** *Am J Clin Nutr* 2001, **73**:853-864.
190. Hansen HS, Olsen SF: **Dietary (n-3)-fatty acids, prostaglandins, and prolonged gestation in humans.** *Prog Clin Biol Res* 1988, **282**:305-317.
191. Burdge GC, Wootton SA: **Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women.** *Br J Nutr* 2002, **88**:411-420.
192. Fokkema MR, Brouwer DA, Hasperhoven MB, Martini IA, Muskiet FA: **Short-term supplementation of low-dose gamma-linolenic acid (GLA), alpha-linolenic acid (ALA), or GLA plus ALA does not augment LCP omega 3 status of Dutch vegans to an appreciable extent.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000, **63**:287-292.
193. Harris WS, Von Schacky C: **The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?** *Prev Med* 2004, **39**:212-220.

194. Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ: **Long-chain conversion of [13C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men.** *J Lipid Res* 2005, **46**:269-280.
195. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA: **Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound.** *Am J Physiol* 1995, **268**:H1397-1404.
196. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD: **A comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation using upper and lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors.** *Clin Cardiol* 2000, **23**:571-575.
197. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD: **Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects.** *Am J Cardiol* 1997, **79**:350-354.
198. Harris CW, Edwards JL, Baruch A, Riley WA, Pusser BE, Rejeski WJ, Herrington DM: **Effects of mental stress on brachial artery flow-mediated vasodilation in healthy normal individuals.** *Am Heart J* 2000, **139**:405-411.
199. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, et al.: **Morning attenuation of endothelium-dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events?** *Clin Cardiol* 1999, **22**:417-421.
200. Goor DA, Sheffy J, Schnall RP, Arditti A, Caspi A, Bragdon EE, Sheps DS: **Peripheral arterial tonometry: a diagnostic method for detection of myocardial ischemia induced during mental stress tests: a pilot study.** *Clin Cardiol* 2004, **27**:137-141.
201. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M: **Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols.** *Jama* 2003, **290**:1030-1031.
202. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, et al.: **Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults.** *J Am Coll Nutr* 2004, **23**:197-204.
203. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT: **Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation.** *J Nutr* 2000, **130**:2105S-2108S.
204. Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ: **Flavonoids and nitric oxide synthase.** *J Physiol Pharmacol* 2002, **53**:571-584.
205. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK: **Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans.** *J Hypertens* 2003, **21**:2281-2286.

206. Actis-Goretta L, Ottaviani JJ, Keen CL, Fraga CG: **Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins.** *FEBS Lett* 2003, **555**:597-600.
207. Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U: **Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects.** *J Am Coll Cardiol* 2003, **41**:471-478.
208. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM: **Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells.** *Circulation* 2002, **106**:1614-1617.
209. Spencer JP, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C: **Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts.** *Free Radic Biol Med* 2001, **31**:1139-1146.
210. Mandel SA, Avramovich-Tirosh Y, Reznichenko L, Zheng H, Weinreb O, Amit T, Youdim MB: **Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway.** *Neurosignals* 2005, **14**:46-60.
211. Kostyuk VA, Potapovich AI, Strigunova EN, Kostyuk TV, Afanas'ev IB: **Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase.** *Arch Biochem Biophys* 2004, **428**:204-208.
212. Tuomainen TP, Punnonen K, Nyysönen K, Salonen JT: **Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men.** *Circulation* 1998, **97**:1461-1466.
213. de Valk B, Marx JJ: **Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease.** *Arch Intern Med* 1999, **159**:1542-1548.
214. Duffy SJ, Biegelsen ES, Holbrook M, Russell JD, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA: **Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease.** *Circulation* 2001, **103**:2799-2804.
215. Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF: **Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication.** *J Cell Biol* 2000, **149**:1503-1512.
216. Sigler K, Ruch RJ: **Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea.** *Cancer Lett* 1993, **69**:15-19.

217. Ale-Agha N, Stahl W, Sies H: **(-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.** *Biochem Pharmacol* 2002, **63**:2145-2149.
218. Verrier E: **The microvascular cell and ischemia-reperfusion injury.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1996, **27 Suppl 1**:S26-30.
219. Zhang YW, Morita I, Nishida M, Murota SI: **Involvement of tyrosine kinase in the hypoxia/reoxygenation-induced gap junctional intercellular communication abnormality in cultured human umbilical vein endothelial cells.** *J Cell Physiol* 1999, **180**:305-313.
220. Frame MD, Sarelius IH: **Endothelial cell dilatory pathways link flow and wall shear stress in an intact arteriolar network.** *J Appl Physiol* 1996, **81**:2105-2114.
221. Haefliger JA, Castillo E, Waeber G, Bergonzelli GE, Aubert JF, Sutter E, Nicod P, Waeber B, Meda P: **Hypertension increases connexin43 in a tissue-specific manner.** *Circulation* 1997, **95**:1007-1014.
222. Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H: **Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F(2)-isoprostane concentrations in humans.** *Free Radic Biol Med* 2004, **37**:411-421.
223. van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB: **Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1999, **220**:203-209.
224. Duffy SJ, Keaney JF, Jr., Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA: **Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease.** *Circulation* 2001, **104**:151-156.
225. Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, Morand C, Mila I, Lapierre 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* 2003, **133**:461-467.
226. Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srani SK, Debnam E, Rice-Evans C: **Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **272**:236-241.
227. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Ensunsa JL, Hammerstone JF, Schmitz HH, Keen CL: **Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa.** *J Agric Food Chem* 2002, **50**:1700-1705.

228. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G: **Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans.** *Am J Clin Nutr* 2002, **76**:1106-1110.
229. Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A: **Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice.** *J Nutr* 2001, **131**:235-241.
230. Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Regeat F, Remesy C: **Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, **279**:G1148-1154.
231. Hollman PC, Katan MB: **Health effects and bioavailability of dietary flavonols.** *Free Radic Res* 1999, **31 Suppl**:S75-80.
232. Fiorani M, Accorsi A, Cantoni O: **Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir.** *Free Radic Res* 2003, **37**:1331-1338.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas, seine Betreuung, Anregung und vor allem sein Vertrauen in mich.

Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies danke ich herzlich für seine vielfältigen Anregungen, seiner Unterstützung und natürlich der Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. Proksch möchte ich herzlich für die Übernahme des Koreferates und sein Interesse an meiner Arbeit danken.

Ich danke Frau Prof. Dr. Heinrich für die angenehme Zusammenarbeit in den drei Jahren.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Arbeitskreise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Klotz, Herrn Priv.-Doz. Dr. Brenneisen, Herrn Prof. Dr. Schewe und Herrn Dr. Schnorr für eine außergewöhnlich angenehme und kollegiale Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitskreis: Herrn Juan-Carlos Carrillo, Frau Silke De Spirt, Herrn Peter Graf, Frau Anne Kiene, Herrn Amir Roushan und natürlich Frau Heide Krahl, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundschaft in den letzten drei Jahren immer unterstützt hat. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Marlies Scholtes besonderen Dank für eine schöne Zeit und diverse Ausstaffierungen aussprechen. Herrn Thomas Becher danke ich für seine Geduld und Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Dr. Niloofar Ale-Agha und Frau Dr. Claudia von Montfort möchte ich mich einerseits für die intensive Betreuung während dieser Arbeit, aber vor allem für die gute Freundschaft und die vielen schönen, lustigen und chaotischen Momente bedanken, die längst weit über das Fachliche hinausgehen und hoffentlich noch lange bestehen bleiben. Die Musikwahl sei hiervon jedoch bitte ausgeschlossen. Auch Herrn *maestro español* Juan-Carlos Carrillo und Herrn Maximilian Schuier möchte ich für die sehr gute Freundschaft besonders danken.

Dem Team der Sonnen-Apotheke in Dormagen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre.

Danksagung

Frau Alexandra Raetz, Frau Maike Frese und Frau Katharina Weber danke ich für die langjährige Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Herrn Thomas Wojazek danke ich von Herzen, dass er immer für mich da ist und zu mir steht.

Ganz besonders und aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich besonders durch ihr Vertrauen und ihre Motivation immer unterstützt haben und ohne die mir diese Arbeit und vieles mehr nicht ermöglicht gewesen wäre.