

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

Polyphenole als Lipoxxygenaseinhibitoren

Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsmechanismus

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Christian David Sadik

2005

**„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“**

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Sies
Korreferent: Prof. Dr. Hengge

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Arteriosklerose	5
1.1.1 Arteriosklerose und Gesundheitsrisiken.....	5
1.1.2 Die Oxidationshypothese der Atherogenese	6
1.1.3 Biologische Effekte des oxidierten LDL.....	10
1.1.4 Entzündungsreaktionen in der Atherogenese	12
1.2 Die Stoffklasse der Polyphenole	15
1.2.1 Vorkommen der Polyphenole	15
1.2.2 Die Flavonoide.....	15
1.2.3 Die Phenolcarbonsäuren	16
1.2.4 Polyphenole in der Nahrung des Menschen	16
1.2.5 Resorption und Metabolismus der Polyphenole	17
1.2.6 Mögliche Wirkungen der Flavonoide beim Menschen.....	21
1.2.7 Flavonoide als Antioxidanzien.....	24
1.3 Oxidativer Stress	26
1.4 Lipoxygenasen und ihre Produkte.....	28
1.4.1 Definition und Vorkommen der Lipoxygenasen.....	28
1.4.2 Einteilung der Lipoxygenasen	28
1.4.3 Struktur der Lipoxygenasen	29
1.4.4 Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen	29
1.4.5 Produkte der Lipoxygenasen	30
1.4.6 15-Lipoxygenasen.....	30
1.5 Ziele der Doktorarbeit	32
2. Materialien und Methoden.....	33
2.1 Enzyme und Chemikalien.....	33
2.2 Messung der Lipoxygenaseaktivität	34
2.2.1 Verfahren.....	34
2.2.2 Lösungen.....	34
2.2.3 Durchführung.....	35
2.3 Beschreibung der Kinetik der Lipoxygenasen durch die Michaelis-Menten- Gleichung	36
2.4 Aktivitätsbestimmung der zytosolischen Glutathionperoxidase (GPx)	36
2.5 Versuche mit Polyphenol-Eisen-Komplexen	37
2.6 Wirkung von oxidierten Polyphenolen auf Lipoxygenasen	37
2.6.1 Synthese von Peroxynitrit	38
2.6.2 Wirkung von mit Peroxynitrit behandelten Polyphenolen auf Lipoxygenasen....	38
2.7 Wirkung von Peroxynitrit auf die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase bei An- und Abwesenheit von Epicatechin	38
2.8 LDL als Substrat der 15-Lipoxygenase-1	39
2.8.1 Isolation von LDL	39
2.8.2 Untersuchung des Einflusses von Polyphenolen auf die kupferionen- und 15-LOX-1-induzierte LDL-Oxidation	40
2.9 Angewendete statistische Verfahren	40

3. Ergebnisse	42
3.1 (-)-Epicatechin ist ein Inhibitor der 15-LOX-1	42
3.2 Wirkung weiterer Flavanole auf Lipoxygenasen.....	42
3.3 Hemmung der Lipoxygenasen durch Procyanidin-Oligomere	44
3.4 Wirkung von Procyanidinen auf die 12-Lipoxygenase der Thrombozyten..	47
3.5 Wirkungen des Flavonols Quercetin auf die Reaktionskinetik der Lipoxygenasen	48
3.6 Modulation der Lipoxygenasen-Hemmung durch GPx.....	58
3.7 Wirkung von Polyphenolen auf Lipoxygenasen nach Komplexierung mit Fe ³⁺	61
3.8 Struktur-Wirkungsbeziehung der Flavonoide.....	63
3.9 Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch weitere Subklassen der Polyphenole	72
3.10 Wirkungsveränderungen der Polyphenole nach Behandlung mit Peroxynitrit	74
3.10.1 Wirkung der Zersetzungsprodukte des Peroxynitrit auf Lipoxygenasen	74
3.10.2 Wirkung von Zimtsäurederivaten auf 15-LOX-1 vor und nach Reaktion mit Peroxynitrit	74
3.10.3 Wirkung von Epicatechin auf Lipoxygenasen nach Reaktion mit Peroxynitrit L- 1 und Einfluss von (-)-Epicatechin hierauf	77
3.12 Wirkung von Flavonolen auf die LDL-Oxidation	79
4. Diskussion.....	82
4.1 Direkte Inhibition von Lipoxygenasen durch Flavonoide	82
4.2 Zum Mechanismus der Hemmung von Lipoxygenasen durch Flavonoide...	84
4.3 Multimodale Wirkungen der Flavonoide beim oxidativen Stress	86
4.4 Physiologische Relevanz der Lipoxygenasenhemmung durch Polyphenole der Nahrung.....	88
4.5 Lipoxygenasen und Atherosklerose	90
4.6 Schlussfolgerungen	94
5. Zusammenfassung.....	96
6. Literaturverzeichnis.....	96
7. Abkürzungen	117
8. Danksagung.....	118
9. Lebenslauf	1181

1. Einleitung

1.1 Arteriosklerose

1.1.1 Arteriosklerose und Gesundheitsrisiken

In den meisten Industrieländern sind Herz-Kreislauf-erkrankungen die häufigste Todesursache des Menschen (Berliner und Heinecke, 1996). Von zentraler Bedeutung in ihrer Genese ist die sogenannte Arteriosklerose. „Arteriosklerose“ ist ein Sammelbegriff für primär nichtentzündliche Arterienerkrankungen, bei denen ein fibröser Umbau zu einer Verdickung und zu einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt. Eine dieser Arterienerkrankungen ist die Atherosklerose. Sie wird von der WHO als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia, definiert. Der Begriff „Atherosklerose“ nennt zwei typische Aspekte dieser Veränderung: „Atherom“ und „Sklerose“. „Atherom“ bezeichnet das Auftreten von beetartigen Gefäßwandschwellungen durch die Ansammlung breiartigen Fettmaterials. „Sklerose“ beschreibt eine Vermehrung von Kollagenfasern in der Gefäßwand.

Die Entwicklung einer Atherosklerose bis zur klinischen Manifestation vollzieht sich beim Menschen über mehrere Jahrzehnte (Upston *et al.*, 2002; Ross, 1995) und über mehrere Stadien, die mit Lipidplaques beginnen und über die fibröse Plaque und das Atherom bis hin zum atherosklerotischen Ulkus fortschreiten können.

Ätiologisch wird die Atherosklerose in eine primäre und in sekundäre Formen unterteilt. Bei den sekundären Formen stellt die Atherosklerose eine Folgeerkrankung einer bekannten Grunderkrankung dar. Die Ursache der primären Form der Atherosklerose ist dagegen nicht hinreichend geklärt. In ihrer Ätiologie scheint es zwei wichtige Teilaspekte zu geben: Zum einen eine Hyperlipoproteinämie, verbunden mit einer Oxidation von LDL, durch die die Pathogenese angestoßen wird, und zum anderen eine Entzündungsreaktion als Antwort auf die durch die Hyperlipoproteinämie verursachten Läsionen (Steinberg, 2002).

Für die Entwicklung einer Atherosklerose sind mehrere Risikofaktoren bekannt. Zu diesen Risikofaktoren gehören: Hypertonie, Adipositas, Bewegungsmangel, Nikotinkonsum, Stress, fettreiche Ernährung (Cohn, 2002), Hyperlipoproteinämie und Dyslipoproteinämie (Steinberg und Witztum, 1999) sowie bestimmte genotypische Polymorphismen des LDL-receptor-related proteins (Pocathikorn *et al.*, 2003). Bei der Hyperlipoproteinämie und Dyslipoproteinämie scheint der Quotient aus LDL-/HDL-Cholesterol eine besondere Bedeutung als Risikoindikator zu haben. Werte dieses Quotienten über fünf sind mit einer erhöhten

Erkrankungshäufigkeit assoziiert. Der für das Atheroskleroserisiko entscheidende Anteil am Gesamtcholesterol ist das LDL-Cholesterol.

1.1.2 Die Oxidationshypothese der Atherogenese

Die formale Pathogenese der Atherosklerose beginnt mit einer Anlagerung von CD⁴⁺- und CD⁸⁺-T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen an das Gefäßendothel (Cybulsky und Gimbrone, 1991). Die angelagerten T-Lymphozyten führen über Ausschüttung von Zytokinen zu einer verminderten Zelladhäsion zwischen den Zellen der Intima, sodass es zu einer Akkumulation von Plasma-LDL zwischen Intima und Media kommt (Ross, 1995). Akkumuliertes LDL wird oxidiert. Dabei scheinen LDL-Partikel mit einem hohen Anteil an Triacylglycerolen besonders leicht oxidabel zu sein (Junjun *et al.*, 2000). Laut Oxidationshypothese (Steinberg *et al.*, 1989; Witztum, 1994) ist oxidiertes LDL wesentlich an der weiteren Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Für die Oxidation des LDL werden mehrere Mechanismen diskutiert:

- a) Oxidation von LDL durch komplexierte Metallionen, vornehmlich durch Kupfer- und Eisenionen, findet sowohl in Zellsystemen, als auch in zellfreien Systemen statt (Heinecke *et al.*, 1984; Steinbrecher *et al.*, 1984). Die metallioneninduzierte LDL-Oxidation korreliert dabei mit der Bildung von Superoxid (Heinecke *et al.*, 1986; Heinecke *et al.*, 1987). Dieser Mechanismus der LDL-Oxidation kann durch Glukose gefördert werden, da glykosylierte Formen des Apoproteins des LDL leichter oxidierbar sein sollen (Kawamura *et al.*, 1994).

Auch Coeruloplasmin und Hämin können LDL oxidieren (Balla *et al.*, 1991).

Die Bedeutung der LDL-Oxidation durch Metallionen *in vivo* ist unklar. Im Plasma kommen sowohl Eisen-, als auch Kupferionen in freier Form nur in sehr niedriger Konzentration vor. Der größte Teil der Eisenionen ist an Transferrin gebunden und der größte Teil der Kupferionen an Coeruloplasmin. Außerdem können beide Ionen auch von Albumin gebunden werden, wodurch die LDL-Oxidation gehemmt wird (Thomas, 1992).

- b) ROS können ebenfalls LDL oxidieren. Superoxid z.B. kann im Bereich der Gefäßwände bei Aktivität einer Vielzahl von Enzymen entstehen. Zu diesen Enzymen gehören die Xanthinoxidase (Houston *et al.*, 1999), Cyclooxygenasen, NAD(P)H-Oxidasen (Rajagopalan *et al.*, 1996; Guzik *et al.*, 2000) und unter bestimmten Bedingungen die NO-Synthase (Carr und Frei, 2000). Außerdem können Mitochondrien (Ballinger *et al.*, 2002) sowie die Autoxidation von Thiolen (Heinecke *et al.*, 1993) Quelle für Superoxid sein.

- c) Möglicherweise sind ebenso RNS an der Oxidation des LDL beteiligt. So könnte das chemisch nicht sehr reaktive Stickstoffmonoxid mit Superoxid über die Bildung von Peroxynitrit (Wink und Mitchell, 1998) zur LDL-Oxidation führen (Leeuwenburgh *et al.*, 1997). Peroxynitrit oxidiert *in vitro* LDL (Darley *et al.*, 1992). Des weiteren konnten in atherosklerotischen Läsionen im LDL 3-Nitrotyrosylreste immunhistochemisch nachgewiesen werden (Leeuwenburgh *et al.*, 1997), ein Aminosäurerest, der typischerweise durch Reaktion von Peroxynitrit oder Stickstoffdioxid mit Tyrosylresten, aber auch durch Reaktion der Myeloperoxidase mit Wasserstoffperoxid und Nitrit entsteht (Kostyuk *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 1999). Der systemische 3-Nitrotyrosinspiegel zeigt eine positive Korrelation mit dem Risiko für koronare Herzerkrankungen (Shishehbor *et al.*, 2003). Andererseits gibt es auch Hinweise auf antiatherogene Wirkungen des Stickstoffmonoxids. So konnte in zellulären und in azellulären Systemen gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid die LDL-Oxidation hemmt (Yates *et al.*, 1992). Mögliche Mechanismen hierbei sind die Hemmung hämhaltiger Enzyme, das Abfangen von Superoxid und Lipidradikalen sowie die Nitrierung von für die LDL-Oxidation wichtigen Enzymen mit nachfolgender Inaktivierung (Hogg *et al.*, 1993 und 1995; Rubbo *et al.*, 1995; Goss *et al.*, 1997; Yates *et al.*, 1992).

Tab. 1.1: Veränderungen im LDL durch RNS

OXIDANS	ZIELSTRUKTUR	PRODUKT
Peroxynitrit (ONOO ⁻)	ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide
	Antioxidanzien	Oxidationsprodukte
	Tryptophanreste	Oxidationsprodukte
aus Lipiden entstandene Aldehyde	Lysylreste	Schiff'sche Base
Lipidradikale	Cysteinylreste	Oxidationsprodukte
ONOO ⁻ + CO ₂	ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide
	Tyrosylreste	3-Nitrotyrosin
	Antioxidanzien	Oxidationsprodukte
Nitrylchlorid (NO ₂ Cl)	Tyrosylreste	3-Nitrotyrosin
		3-Chlortyrosin
	ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide
	Antioxidanzien	Oxidationsprodukte
Stickstoffdioxid (NO ₂)	ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide
	Tyrosylreste	3-Nitrotyrosin
	Tryptophanreste	Oxidationsprodukte

Quelle: Carr *et al.*, 2000

- d) Die Myeloperoxidase ist ein hämhaltiges Enzym, das von Phagozyten ausgeschüttet wird und sich an LDL binden kann (Carr *et al.*, 2000). Sie konnte in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Daugherty *et al.*, 1994). Der Gehalt an Myeloperoxidase pro Leukozyt sowie pro Milliliter Blut korreliert positiv mit dem Risiko für koronare Herzerkrankungen (Zhang *et al.*, 2001). Das Enzym katalysiert Halogenierungen und Peroxidationen wie die Reaktionen von Wasserstoffperoxid und Chlorid zu unterchloriger Säure und von freiem und proteingebundenem Tyrosin zu Tyrosylradikalen (Heinecke *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 2000). Beide Produkte können LDL oxidieren (Savenkova *et al.*, 1994; Hazell *et al.*, 1993). Dabei entsteht aus Tyrosin unter anderem *O,O'*-Dityrosin (Heinecke *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 1993). Dieses ist fluoreszierend und stabil gegenüber saurer Hydrolyse und kann als spezifischer Marker für durch Myeloperoxidase verändertes LDL dienen (Savenkova *et al.*, 1994; Heinecke *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 1993). Es ist in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar und somit ein Indiz für eine Beteiligung der Myeloperoxidase an der Atherosklerose (Upston *et al.*, 2002; Heinecke *et al.*, 1998). Unterchlorige Säure führt im LDL zur Bildung von N-Chloraminen (Hazell und Stocker, 1993), wodurch sich die negative Ladung im LDL er-

höht und es in eine Form umgewandelt wird, die die Aufnahme von Cholesterylethern durch Makrophagen induziert (Hazell *et al.*, 1999). Als Substrat der unterchlorigen Säure dienen vor allem reaktive Aminogruppen des Apolipoproteins B₁₀₀ (Hazell *et al.*, 1993; Hazell *et al.*, 1994). Über die Bildung elementaren Chlors chloriert unterchlorige Säure auch Tyrosylreste des LDL zu 3-Chlortyrosin. Derart verändertes LDL konnte in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden und ist relativ spezifisch für die Aktivität der Myeloperoxidase (Podrez *et al.*, 2000).

Tab. 1.2: Veränderungen im LDL durch Myeloperoxidase

OXIDANS	ZIELSTRUKTUR	PRODUKT
unterchlorige Säure	Lysylreste	Lysylchloramine
	Cysteinylreste	Oxidationsprodukte
	Tryptophanreste	Oxidationsprodukte
	Tyrosylreste	3-Chlortyrosin
		<i>O,O'</i> -Dityrosin
	Methioninreste	Methioninsulfoxid
Chloramine	Cysteinylreste	Oxidationsprodukte
Aldehyde	Lysylreste	Schiff'sche Basen
LDL-Radikale	Ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide
Tyrosylradikale	Tyrosylreste	Dityrosin
	Ungesättigte Fette	Lipidhydroperoxide

Quelle: Carr *et al.*, 2000

Die Myeloperoxidase katalysiert auch die Reaktion von Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid, einem RNS (Byun *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1999; Ischiropoulos, 1998). Stickstoffdioxid führt zur Peroxidation von Lipiden im LDL (Byun *et al.*, 1999; Kostyuk *et al.*, 2003). Des Weiteren könnte die Myeloperoxidase durch Absenkung des NO-Spiegels zur endothelialen Dysfunktion beitragen (Abu-Soud und Hazen, 2000a und b; Zhang *et al.*, 2001). Die Myeloperoxidase scheint auch, atherosklerotische Plaques zu destabilisieren. Verantwortlich hierfür könnte die Aktivierung von Metalloproteinasen durch unterchlorige Säure sein (Sugiyama *et al.*, 2001).

Andere Forschungsergebnisse deuten jedoch auf eine zytoprotektive Rolle der Myeloperoxidase und damit verbunden auch auf eine antiatherogene Wirkung hin (Ichimori *et al.*, 2003). Diesen Ergebnissen zufolge ist die Myeloperoxidase für Nitrierungen von Proteinen bedeutungslos. Diese würden in erster Linie durch Peroxynitrit erfolgen (Ichimori *et al.*, 2003). In Myeloperoxidase-Knock-out-Mäusen konnte sogar ein höherer Gehalt an Nitrotyrosin festge-

stellt werden sowie ein Anstieg an atherosklerotischen Läsionen um 50 % im Vergleich zu Myeloperoxidase-positiven Mäusen (Brennan *et al.*, 2001; Ichimori *et al.*, 2003). Erklärung hierfür könnte ein Abbau des zytotoxischen Nitrotyrosins durch die Myeloperoxidase sein (Ichimori *et al.*, 2003). Ein weiterer Erklärungsansatz für eine protektive Wirkung der Myeloperoxidase ergibt sich aus der Beobachtung, dass HDL, nachdem es in einem Tyrosylradikal generierendem System tyrosyliert wurde und Quervernetzungen innerhalb seiner Apolipoproteine entstanden sind, Cholesterol aus Schaumzellen schneller aufnimmt als natives HDL (Francis *et al.*, 1993). Somit könnte die Myeloperoxidase auch für die Entstehung einer stärker antiatherogen wirksamen Form des HDL verantwortlich sein.

- e) Seit 1989 wird auch eine mögliche Rolle der Lipoxygenasen, insbesondere der 15-LOX-1, bei der LDL-Oxidation diskutiert (Parthasarathy *et al.*, 1989; Ylä-Herttuala *et al.*, 1990). Dabei finden sich sowohl Hinweise für eine proatherogene, als auch für eine antiatherogene Wirkung der 15-LOX-1 (Shen *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 1997; Kühn und Chan, 1997).

1.1.3 Biologische Effekte des oxidierten LDL

Oxidiertes LDL wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten und Makrophagen (Rajavashisth *et al.*, 1990). Es verstärkt ihre Adhäsion an Endothelzellen (Berliner *et al.*, 1990). Dadurch wandern Monozyten verstärkt in die Gefäßwandläsion ein. Verantwortlich für diese Effekte sind vermutlich oxygenierte Linoleyl- und Arachidonoylreste in *sn*-2-Position der Phospholipide des oxidierten LDL (Watson *et al.*, 1995).

Die Oxidation des LDL ist mit dem Verlust von Lysinresten im Apolipoprotein B₁₀₀ assoziiert (Steinbrecher, 1987). Außerdem entstehen durch Lipidperoxidation Carbonylgruppen, die mit den Aminogruppen der Lysinreste zu Schiff'schen Basen reagieren (Zhang *et al.*, 1993). Auf diese Weise entsteht ein Ligand der sogenannten Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen. Unverändertes LDL wird von Makrophagen normalerweise über einen LDL-Rezeptor aufgenommen, dessen Expression bei zu viel Cholesterol im Zytoplasma des Makrophagen herunterreguliert wird (Steinberg, 2002; Goldstein *et al.*, 1979). Acetyliertes oder oxidiertes LDL hingegen wird über Rezeptoren der Makrophagen aufgenommen, welche als Scavenger-Rezeptoren bezeichnet werden und auch bei einer Überladung des Makrophagen mit Cholesterol nicht herunterreguliert werden (Steinberg, 2002; Kodama *et al.*, 1988). Zwei dieser Rezeptoren sind der Scavenger-Rezeptor A (SR-A) und der Scavenger-Rezeptor B (SR-B oder CD₃₆) (Kodama *et al.*, 1988; Podrez *et al.*, 2000; Podrez *et al.*, 2002). Beide Rezeptoren werden von zirkulierenden Monozyten nur in geringem Ausmaß exprimiert. Die Expression steigt jedoch deutlich an, sobald die Monozyten in die arterielle Gefäßwand einwandern (Steinberg,

2002). Essenziell für die Struktur der Liganden der Scavenger-Rezeptoren ist die Oxidation von polyenen Fettsäuren in sn-2-Position von Phospholipiden des LDL (Steinberg, 2002; Podrez *et al.*, 2002). Durch die ungehemmte Aufnahme von oxidiertem LDL über die Scavenger-Rezeptoren bilden sich Lipidtröpfchen im Zytoplasma der Makrophagen, die dadurch ein schaumiges Aussehen erhalten und dann als Schaumzellen bezeichnet werden (Krieger *et al.*, 1993). Die Schaumzellen sammeln sich in der Gefäßwand herdförmig an und bilden so Lipidplaques. Sie können das Cholesterol des LDL nicht abbauen, sodass dieses in ihnen akkumuliert. Bei Erreichen seines Kristallisationspunktes kristallisiert das Cholesterol aus und zerreißt die Zellmembran der Makrophagen (Reid *et al.*, 1993). Durch die Zerstörung der Makrophagen entsteht innerhalb der Lipidplaques eine zentrale Nekrosezone mit fettigem Detritus und Kalzifikationen. Derart veränderte Plaques werden als „Atherom“ oder „atherosklerotisches Plaque“ bezeichnet.

Des Weiteren werden Makrophagen durch oxidiertes LDL zur Ausschüttung von Mediatoren angeregt (Tabelle 1.3). Dies führt zur weiteren Proliferation von Monozyten, zur Aktivierung von Thrombozyten, zur Induktion einer Myofibroblasten-Proliferation mit Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima sowie zur Vasokonstriktion (Ross, 1995). Diese Vorgänge wirken wiederum prokoagulatorisch und sklerogen.

Im weiteren Verlauf der Atherogenese kommt es zur Apoptose von Myozyten der Plaquedecke. Damit geht ihre Festigkeit verloren, und eine instabile Plaque entsteht. Diese kann einreißen (Plaquesfissur), woraufhin es zur Einblutung in die Plaque kommt. Dadurch wird die Sklerosierung der Gefäßwand beschleunigt und ein Abscheidungsthrombus gebildet, der das Gefäßlumen einengt (Fuster *et al.*, 1992). Durch die Einengung des Gefäßlumens können Durchblutungsstörungen bis hin zum Myokardinfarkt oder Apoplex entstehen (Fuster *et al.*, 1992).

Tab. 1.3: Weitere Wirkungen von oxidiertem LDL

WIRKUNG VON OXIDIERTEM LDL	REFERENZ
Induktion der Monozytenbindung an Endothelzellen	Watson <i>et al.</i> , 1997
Erhöhung von M-CSF und MCP-1	Navab <i>et al.</i> , 1991
Erhöhung von VCAM-1	Cybulsky und Gimbrone, 1991
Induktion der FAS-vermittelten Apoptose	Sata und Walsh, 1998
Induktion der Expression von IL-1, IL-6 und IL-8	Seino <i>et al.</i> , 1994
Hemmung der NO-Freisetzung und der NO-Wirkung	Murohara <i>et al.</i> , 1994
Erhöhung der Kollagensynthese durch glatte Muskelzellen	Jimi <i>et al.</i> , 1995
Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration	Thorin <i>et al.</i> , 1995
Aktivierung von NF- κ B	Brand <i>et al.</i> , 1997
Induktion der Metalloproteinase Typ 1	Rajavashisth <i>et al.</i> , 1999
Erhöhung von PDGF	Ross <i>et al.</i> , 1990
Erhöhung von TNF- α	Tipping <i>et al.</i> , 1993
Erhöhung von Endothelin-1	Boulanger <i>et al.</i> , 1993
Erhöhung von PAF	Ross, 1995; Marathe <i>et al.</i> , 1999

1.1.4 Entzündungsreaktionen in der Atherogenese

Durch die Beteiligung von T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen hat die Atherosklerose den Charakter einer entzündlichen Erkrankung. Bereits die ersten Lipidansammlungen in der Gefäßwand gehen mit Entzündungsreaktionen einher. Deshalb ist das Immunsystem wahrscheinlich an ihrer Pathogenese wesentlich beteiligt (Lind, 2003; Ross, 1999; Blake und Ridker, 2002; Libby, 2002).

Daher scheint auch Entzündungsparametern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) große Bedeutung als Risikoindikator für vaskuläre Erkrankungen zuzukommen (Blake und Ridker, 2002). So korreliert ein hoher basaler CRP-Plasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis, einen Apoplex oder eine periphere vaskuläre Erkrankung zu erleiden (Lowe *et al.*, 2001; Ridker *et al.*, 2001).

Ein erhöhtes CRP scheint dabei eher mit einem erhöhten Risiko einer Plaqueruptur und damit mit der Feinstruktur der Plaque als mit dem Ausmaß der Atherosklerose zu korrelieren (Folsom *et al.*, 2001; Blake und Ridker, 2002). Die Feinstruktur der Plaque beeinflusst die Gefahr eines Infarktes stärker als die Menge der Fettansammlung im Gefäß und dem hieraus resultierendem Stenosegrad (Libby, 1995; Lind, 2003).

Kausalkette zur Bildung von Fatty streaks

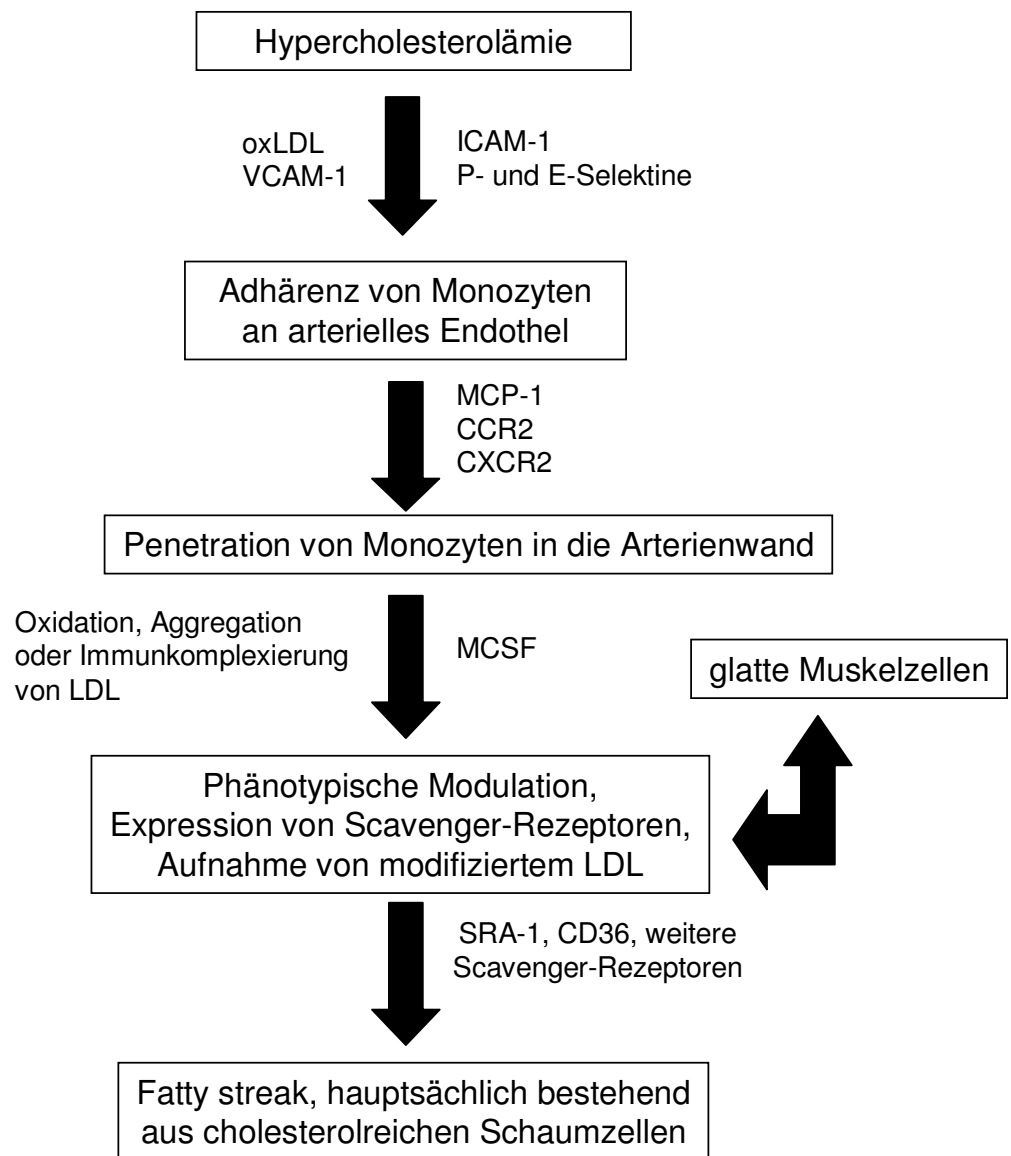


Abb. 1.1: Kausalkette der Bildung von „Fatty streaks“ nach Steinberg (2002). ICAM-1, intracellular adhesion molecule; VCAM-1, vascular cell-adhesion molecule 1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; CCR2, CC chemokine receptor 2; CXCR2, CX chemokine receptor 2; VLDL, very-low-density lipoprotein; MCSF, monocyte colony stimulating factor.

1.1.5 Möglichkeiten der Prävention gegen Atherosklerose

Ein hohes HDL-Cholesterol hat protektive Wirkungen gegen die Entwicklung einer Atherosklerose (Barter *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 1992). Daher sollte bei manifester koronarer Herzkrankheit ein HDL-Wert von über 40 mg/dl angestrebt werden.

HDL transportiert Cholesterol aus den Geweben zur Leber (Barter, 2003). Des Weiteren bindet es Lipopolysaccharide (Levine *et al.*, 1993), stimuliert die Migration von Endothelzellen (Murugesan *et al.*, 1994) und hemmt die Synthese von PAF (Sugatani *et al.*, 1996). Es stimuliert die Synthese von Prostazyklin und verlängert außerdem dessen Halbwertszeit (Tamagaki *et al.*, 1996). Es wirkt antioxidativ (Mackness *et al.*, 1993; Parthasarathy *et al.*, 1990), antithrombotisch und inhibiert die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Wahrscheinlich durch Stimulation der endothelialen NO-Synthese bewirkt es auch eine Modulation der Endothelfunktion (O'Connell und Genest, 2001).

Wesentlich für die Wirkungen des HDL ist das Enzym Paraoxonase mit seinen antioxidativen Eigenschaften (Aviram *et al.*, 1999). Ein weiteres HDL-assoziiertes Enzym ist die platelet activating factor (PAF-) Acetylhydrolase vom Typ II (Furlong *et al.*, 1991). Diese katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden mit kurzem oder oxidiertem Acylrest in sn-2-Position (Steinbrecher und Prichard, 1989; Nigam und Schewe, 2000). Dadurch kann HDL oxidierte Lipide in Plasmalipoproteinen beseitigen (Bowry *et al.*, 1992).

In den letzten Jahren wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Atherogenese durch Hemmung der LDL-Oxidation zu unterbinden. Dabei wurde vor allem die Wirkung antioxidativer Vitamine wie Vitamin C, E und A sowie die Wirkung von Lycopin und der sogenannten Polyphenole untersucht. Hierzu wurden zum Teil bereits große klinische Studien durchgeführt. Der größte Teil dieser Studien konnte jedoch keinen positiven Effekt der Vitamine auf die Entwicklung der Atherosklerose nachweisen (Steinberg und Witztum, 2002). Hingegen deutet eine finnische Querschnittsstudie auf positive Effekte der Flavonoide, einer Untergruppe der Polyphenole, auf die Entwicklung der Atherosklerose hin (Knekt *et al.*, 2002).

1.2 Die Stoffklasse der Polyphenole

1.2.1 Vorkommen der Polyphenole

Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mindestens zwei Hydroxylgruppen. Sie lassen sich in verschiedene Untergruppen, darunter die Flavonoide, die Phenolcarbonsäuren, die Cumarine, die Lignane sowie die Anthranoide, unterteilen. Sie kommen in allen höheren Pflanzen vor. Strukturell sind sie sehr heterogen. Häufig ist ein Polyphenol für eine einzige Pflanzenart charakteristisch. Zu den physiologischen Funktionen der Polyphenole in Pflanzen gehören Signalfunktionen für Insekten basierend auf ihren schillernden Farben oder Verteidigungsfunktionen gegen Insekten (Pietta, 2000). Sie sind an der Photosynthese und an der Regulation von Eisenkanälen beteiligt (Pietta, 2000). Sie fungieren in Pflanzen als Radikalfänger oder als UV-Absorbens und verhindern damit oxidativen Stress (Pietta, 2000).

1.2.2 Die Flavonoide

Über 4000 Flavonoide mit großer struktureller Vielfalt werden in der Literatur beschrieben (Middleton *et al.*, 2000). Sie sind O-Heterozyklen aus 15 Kohlenstoffatomen. Sie haben zwei, über eine C₃-Brücke miteinander verbundene aromatische Ringe (Abb. 1.2). Die Substituenten der Flavonoide differieren stark. So weist Ring A häufig das Substitutionsmuster der Phloroglucins oder des Resorcins auf. Ring B ist meist in 4'-Stellung, in 3',4'-Stellung oder in 3',4',5'-Stellung hydroxyliert. Die Hydroxylgruppen der Flavonoide können mit weiteren Komponenten wie beispielsweise Zuckerresten, Isopren, Methyl- oder Sulfatgruppen verknüpft sein.

Die Form der C₃-Kette der Flavonoide kann unterschiedlich sein und bestimmt das analytische Verhalten eines Flavonoids. Durch sie können Flavonoide in Subklassen eingeteilt werden. So werden Flavonoide ohne Doppelbindung zwischen dem C₂- und dem C₃-Atom als Flavanon bzw. Flavanol bezeichnet, während bei Vorhandensein der entsprechenden Doppelbindung von einem Flavon bzw. bei zusätzlichem Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am C₃-Atom von einem Flavonol gesprochen wird. Des Weiteren wird zwischen Flavonen und Isoflavonen unterschieden. Während Flavone die Arylgruppe am C₂-Atom tragen, ist sie bei den Isoflavonen am C₃-Atom.

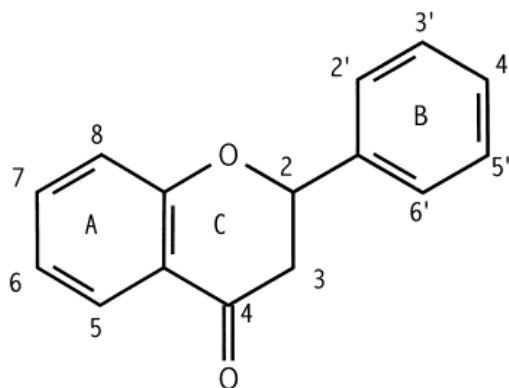


Abb. 1.2: Kohlenstoffgerüst der Flavonoide

Flavanole kommen vor allem im Tee (Scalbert und Williamson, 2000), im Rotwein (Frankel *et al.*, 1995) und im Kakao (Arts *et al.*, 1999) vor. Eine Unterklasse innerhalb der Flavanole bilden die Proanthocyanidine. Sie sind Polymere der Flavan-3-ole mit Catechin/Gallocatechin oder Epicatechin/Epigallocatechin als monomere Untereinheiten. Sofern die Polymere nur aus Catechin oder Epicatechin bestehen, werden sie auch als Procyanidine bezeichnet. Procyanidine entstehen durch dehydrierende Polymerisation (Hänsel *et al.*, 1999). Wenn ein Dimer aus zwei identischen monomeren Untereinheiten besteht, sind je nach Ort der dehydrierenden Polymerisation innerhalb der Moleküle bereits acht isomere Formen möglich. Daher kann eine Procyanidin-Fraktion eine Vielzahl von Isomeren enthalten.

1.2.3 Die Phenolcarbonsäuren

Zwei der wichtigsten Phenolcarbonsäuren sind die Kaffeesäure und die Ferulasäure. Beide Verbindungen sind Derivate der Zimtsäure (3-Arylpropensäure). Die Ferulasäure ist in der Natur meist mit Hemicellulose verestert. Die Kaffeesäure ist ebenfalls häufig verestert. Ihr häufigster Bindungspartner ist dabei die Chinasäure. Der Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure wird als Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) bezeichnet. Die Chlorogensäure findet sich im Kaffee, in vielen Früchten und Gemüse. In einem Liter Instantkaffee sind 250-750 mg Chlorogensäure enthalten (Clifford, 1999).

1.2.4 Polyphenole in der Nahrung des Menschen

Die Menge der täglich mit der Nahrung zugeführten Polyphenole ist abhängig von kulturellen und individuellen Ernährungsgewohnheiten sowie der Zubereitung der Speisen. Daher variiert sie stark.

Durch Gemüse sollen mit der durchschnittlichen US-Nahrung täglich 218 mg Polyphenol zugeführt werden (Vinson *et al.*, 1998). Die tägliche Zufuhr an Polyphenolen durch Verzehr von Früchten scheint noch höher als die durch Gemüse zu sein (Scalbert und Williamson, 2000). Auch einige Getränke haben einen hohen Gehalt an Polyphenolen. So nimmt laut einer niederländischen Studie der durchschnittliche Niederländer insgesamt täglich etwa 50 mg Flavanole, insbesondere Epicatechin, auf. Im Durchschnitt stammen 20 % dieser 50 mg aus Schokolade (Arts *et al.*, 2001).

Tab. 1.4: Gehalt an Polyphenolen ausgewählter Nahrungsmittel in mg

NAHRUNGSMITTEL	PHENOLCAR- BONSÄUREN	FLAVONOLE	CATECHIN- MONOMERE	PROANTHOCYANIDINE
Kartoffeln, 200 g	28	-	-	-
Tomaten, 100 g	8	0,5	-	-
Kopfsalat, 100 g	8	1	-	-
Zwiebeln, 20 g	-	7	-	-
Äpfel, 200 g	11	7	21	200
Kirschen, 50 g	37	1	3	35
Weizen, 10 g	50			
Schwarze Schokolade, 20 g	-	-	16	86
Rotwein, 125 ml	12	2	34	45
Kaffee, 200 ml	150	-	-	-
Schwarzer Tee	-	8	130	-

Quelle: Scalbert und Williamson (2000)

1.2.5 Resorption und Metabolismus der Polyphenole

Von zentraler Bedeutung bei der Bewertung biologischer Effekte der Polyphenole ist ihre Resorbierbarkeit. Aufgrund der Unterschiede hinsichtlich Molekülgröße und Polarität zwischen den einzelnen Polyphenolen zeigen sich auch hierbei Unterschiede (Scalbert und Williamson, 2000).

Als indirekter Beweis der Resorption von Polyphenolen kann der Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas nach Verzehr polyphenolreicher Nahrung gelten. Dieser wurde für Tee (van het Hof *et al.*, 1997), Rotwein (Fuhrman *et al.*, 1995), Apfelsaft (Young *et al.*, 1999), schwarze Johannisbeeren (Young *et al.*, 1999) und Cacao-Schokolade (Rein *et al.*, 2000) nachgewiesen. Hierbei scheinen sich dunkle Schokolade und Milkschokolade sowohl hinsichtlich der Resorbierbarkeit, als auch der antioxidativen Kapazität zu unterscheiden. So sind Polyphenole aus dunkler Schokolade besser resorbierbar und stärker antioxidativ wirksam als solche aus Milkschokolade. Dies könnte auf Bindungen zwischen Milchproteinen und (-)-

Epicatechin in der Milkschokolade zurückzuführen sein, die die Resorption und die antioxidative Wirkung des Epicatechins hemmen könnten (Serafini *et al.*, 2003).

Flavonoide liegen in Pflanzen meist in glykosidischer Form vor. Der gebundene Zucker ist meistens Glucose oder Rhamnose. Glucuronide der Flavanoide wie die des (–)-Epicatechins können auch in konjugierter Form gut durch Biomembranen permeieren. Auch Gallussäurereste scheinen keine schwerwiegenden Veränderungen hinsichtlich der Resorbierbarkeit zu verursachen (Scalbert *et al.*, 2000).

Aufgrund seiner Hydrophilie kann der Glykosylrest eine passive Diffusion des Flavonoids durch Biomembranen allerdings in vielen Fällen verhindern. Für die meisten Konjugate besteht daher der erste Metabolisierungsschritt in der Spaltung der glykosidischen Bindung im Dünndarm. An ihr sind die β -Glucosidase (Day *et al.*, 1998) und die Laktase-Phlorizin-Hydrolase beteiligt (Day *et al.*, 2000). Als zweiter

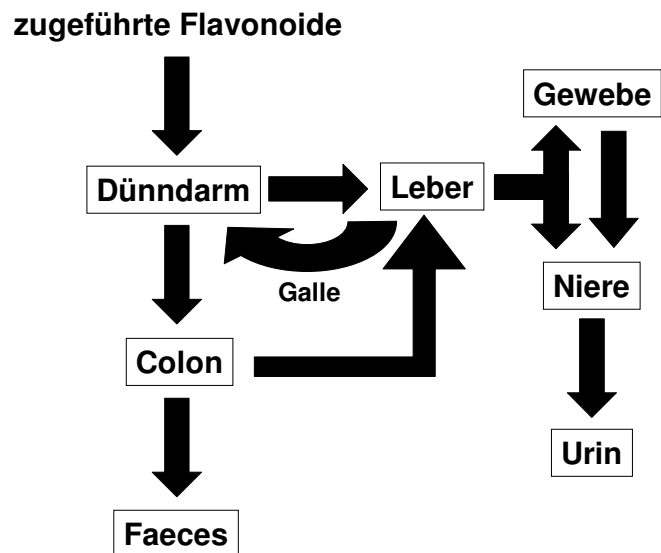


Abb. 1.3: Möglicher Weg der Flavonoide im Menschen. Modifiziert nach Scalbert und Williamson (2000).

Metabolisierungsschritt erfolgt in den Epithelzellen der Dünndarmmukosa eine Konjugation des Flavonoids mit Glukuronsäure (Gee *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2001). Bei Versuchen mit Rattendünndarm und Quercetin waren die Hauptkonjugate das 3- und das 7-Glukuronid des Quercetins (Gee *et al.*, 2000). Dieselben Glukuronide scheinen auch in der menschlichen Darmmukosa zu entstehen (Boersma *et al.*, 2002). Aus dem Dünndarm der Ratte erreichten sie die Serosaseite und könnten somit über die Pfortader die Leber erreichen. Versuche mit menschlichen Leberzellen deuten auf eine Aufnahme der beiden Konjugate in die Zellen und einer Metabolisierung hin (O’Leary *et al.*, 2003). Die Konjugate können durch die Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT) methyliert oder durch die β -Glukuronidase der Leberzellen dekonjugiert und durch die Arylsulfatase sulfatiert werden. Die bevorzugte Metabolisierung ist die Methylierung durch COMT. Der Efflux der Metabolisierungsprodukte aus den Leberzellen könnte durch die ATP-abhängige Konjugatpumpe MRP2 erfolgen. Die Konjugate könnten so in die Galle sezerniert werden und ins Colon gelangen. Dort könnten die Flavonoide nach Hydrolyse der Konjugate durch Darmbakterien wieder resorbiert werden und im Sinne eines enterohepatischen Kreislaufs zirkulieren (Donovan *et al.*, 2001; O’Leary *et al.*,

2003; Walle *et al.*, 2001). Nach oraler Zufuhr von ^{14}C -Quercetin durch Menschen wurde eine Resorption von 36,4 bis 53 % nachgewiesen (Walle *et al.*, 2001). Nur 3,5 bis 8,3 % der Radioaktivität des resorbierten Quercetins wurden in den Faeces und im Urin wiedergefunden. Der Hauptteil der Radioaktivität (bis zu 81,1 %) wurde im Atem in Form von $^{14}\text{CO}_2$ wiedergefunden. Die Halbwertszeit des Quercetins variierte zwischen 20 und 72 Stunden. Die Länge der Halbwertszeit ist vermutlich unter anderem auf die hohe Affinität des Quercetins zu Albumin zurückzuführen (Zsila *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen deuten auf eine gute Resorbierbarkeit des Quercetins sowie auf eine Metabolisierung im menschlichen Körper unter Spaltung des C-Rings hin.

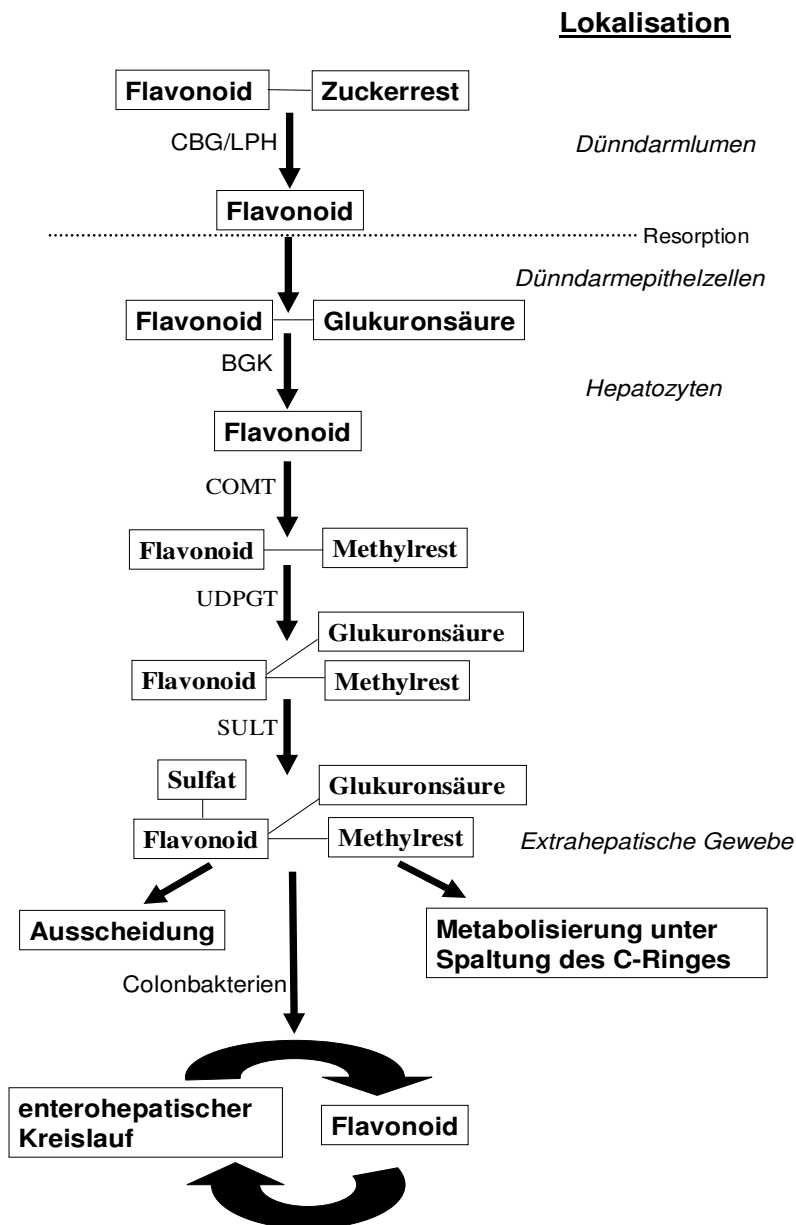


Abb. 1.4: Möglicher Metabolismus der Flavonoide im menschlichen Körper. Modifiziert nach Scalbert und Williamson (2000). Abkürzungen: LPH, Laktase-Phlorizin-Hydrolase; CBG, β-Glucosidase; BGK, β-Glucuronidase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; SULT, Phenol-Sulfotransferase; UDPGT, UDP-Glucuronosyltransferase.

1.2.6 Mögliche Wirkungen der Flavonoide beim Menschen

Den Flavonoiden wird eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Wirkungen zugeschrieben. So sollen Flavanoide antiallergische, antiphlogistische, antivirale, antimikrobielle, antioxidative, antiproliferative, antikarzinogene, analgetische, spasmolytische, hepatoprotektive, antiulzerogene, antihypertensive, hypoglykämische, neuroprotektive und mutagene Wirkungen haben (Middleton *et al.*, 2000). Die Hemmung von etwa 40 Enzymen unterschiedlichster Klassen und Funktionen durch Flavonoide konnte bisher *in vitro* nachgewiesen werden (Tab. 1.5). Hingegen gibt es kaum Untersuchungen zur Hemmung von Enzymen durch Flavonoide *in vivo*. Hinweise für eine physiologisch relevante Hemmung eines Enzyms durch Flavonoide gibt es beispielsweise für die 5-Lipoxygenase (Schramm *et al.*, 2001).

Therapeutisch genutzt werden flavonoidhaltige Arzneidrogen und einige Reinstoffe als Venenmittel (gefäßschützende, ödemprotektive Wirkung), Herzkreislaufmittel (positiv-inotrope, antihypertensive Wirkung), Diuretika, Spasmolytika bei Magen-Darm-Beschwerden und Lebertherapeutika (hepatoprotektive Wirkung) (Hänsel *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 2000). In mehreren epidemiologischen Studien konnte eine negative Korrelation zwischen der Höhe der Flavonoidzufuhr und der Inzidenz kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Erkrankungen aufgezeigt werden (Tab. 1.6).

In einer finnischen Studie mit über 10.000 Probanden konnte außerdem eine Assoziation zwischen einer hohen Flavonidaufnahme und einer erniedrigten Inzidenz weiterer chronischer Erkrankungen aufgezeigt werden. Darunter waren Lungenkarzinome, Prostatakarzinome und Asthma (Knekt *et al.*, 2002). Tendenziell zeigte sich in dieser Studie auch eine erniedrigte Inzidenz des Diabetes mellitus Typ II. Die Gesamtmortalität war deutlich erniedrigt. Das relative Risiko (RR) der Mortalität zwischen der Quantile mit der höchsten Flavonidaufnahme und der mit der niedrigsten betrug 0,95. Unter den einzelnen Flavonoiden war dabei die Assoziation zwischen der Senkung der Mortalität und Flavonidaufnahme für Quercetin am stärksten, und unter den einzelnen Lebensmittels für Äpfel, Zwiebeln und Orangen.

Tab. 1.5: Hemmung von Enzymen durch Flavonoide modifiziert nach Middleton *et al.* (2000)

ENZYM	FLAVONOID*
Proteintyrosinkinase	Genistein, Quercetin
Proteinkinase C	Fisetin, Quercetin, Luteolin
Phosphorylase-Kinase	-
Phospholipase A ₂	Quercetin
Phospholipase C	-
Lipoxygenasen	siehe Tabelle 3.9a und b
Cyclooxygenasen	-
Xanthinoxidase	Quercetin
Topoisomerasen	Genistein, Fisetin, Quercetin
DNA-Ligase-1	-
RNA- und DNA-Polymerasen	Quercetin, Kaempferol, Fisetin, Flavon, Chrysin
Ribonukleasen	-
Amylasen	Quercetin
Malatdehydrogenase	Quercetin
Aldose-Reduktase	-
Lactatdehydrogenase	Quercetin
Pyruvatkinase	Quercetin
Alkohol- und Aldehyddehydrogenase	Daidzein
Ornithindecaboxylase	Quercetin
Histidin- und DOPA-Decarboxylase	Quercetin, (+)-Catechin
Reverse Transkriptasen	Quercetin, Baicalein, Myricetin
HIV-1-Proteinase	Myricetin, Morin, Quercetin, Fisetin
HIV-1-Integrase	Quercetin
Aromatase	-
11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	-
Hyaluronidase	Kaempferol
Sialidase	-
Elastase	-
H ⁺ -K ⁺ -ATPase	Quercetin
Phosphodiesterasen	-
Adenylatzyklase	Flavon, Chrysin, Apigenin
Glutathion-S-Transferase	Quercetin

**) nur für diese Doktorarbeit getestete Flavonoide aufgeführt.*

Tab. 1.6: Ergebnisse epidemiologischer Studien zur Aufnahme von Flavonoiden und der Inzidenz kardio- und cerebrovaskulärer Erkrankungen

<i>TEILNEHMER</i>	<i>BEOBACH- TUNGSZEIT RAUM IN JAHREN</i>	<i>END- PUNKT</i>	<i>RELATIVES RISIKO (HOHE VS. NIEDRIGE ZUFUHR)</i>	<i>95%-KI</i>	<i>MITTLERE FLAVO- NOIDZUFUHR (HOHE VS. NIED- RIGE) (MG/D)</i>
804 M	10	KHK-Tod	0,47	0,27-0,82	>29,9 vs. <9,0
1900 M	14	KHK-Tod	1,6	0,90-2,90	>34,0 vs. <19,0
552 M	15	Apoplex	0,27	0,11-0,70	>28,6 vs. <18,3
2748 M	26	KHK-Tod	0,67M	0,44-1,00	>4,8 vs. <2,1
2385 F			0,73W	0,41-1,32	>5,5 vs. <2,4
34789 M	6	Überlebter MI	1,08	0,81-1,43	40 vs. 7,1
34492 F	10	KHK-Tod	0,62	0,44-0,87	32,2 vs. 4,3
34492 F	10	Apoplex	1,18	0,7-2,0	32,2 vs. 4,3
26593 M	6,1	Zerebraler Infarkt	0,98	0,80-1,21	16,4 vs. 4,2
		SAB	0,75	0,40-1,41	
		IZB	0,88	0,50-1,57	
25372 M	6,1	Überlebter MI	0,77	0,64-0,93	17,8 vs. 3,9
10054 (52,8 % M)	28	KHK-Tod	0,79	0,63-0,99	>3,9 vs. <1,5 M [†]
					>4,7 vs. <1,8 W [†]
10054 (52,8 % M)	28	CVD	0,7	0,56-0,86	>0,8 vs. <0,1 M [‡]
4807 (1836 M, 2971 F)	5,6	Tödlicher MI	0,35	0,13-0,98	>32,9 vs. <22,8
		Überlebter MI	0,93	0,57-1,52	
		Tödlicher + überlebter MI	0,76	0,49-1,18	
38445	6,9	CVD, CHD	0,88	0,68-1,14	47,4 vs. 8,9

Männer M, Frauen F, Myokardinfarkt MI, cerebrovaskuläre Erkrankung CVD, kardiovaskuläre Erkrankung CHD

[†]nur Quercetin, [‡]nur Kaempferol

Modifiziert nach Maron, 2004

1.2.7 Flavonoide als Antioxidanzien

Flavonoide sind eine der größten Gruppen von Antioxidanzien in der menschlichen Nahrung (Scalbert und Williamson, 2000). Sie haben daher vermutlich wesentlichen Einfluss auf oxidativen Stress. Ihre antioxidative Wirkung beruht auf mehreren Mechanismen. Einer dieser Mechanismen ist das direkte Abfangen von ROS und RNS (Middleton *et al.*, 2000; Kostyuk *et al.*, 2003; Arteel und Sies, 1999). Unter den ROS, die von Flavonoiden abgefangen werden oder deren Bildung verhindert wird, sind beispielsweise Superoxid, Wasserstoffperoxid, unterchlorige Säure, Perhydroxyl-, Hydroxyl-, Alkoxyl- und Peroxylradikale (Middleton *et al.*, 2000).

Voraussetzung für die Radikalfängereigenschaft der Flavonoide ist das Vorhandensein von Hydroxylgruppen im Molekül. Die Stärke der Radikalfängereigenschaften korreliert positiv mit der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül (Cao *et al.*, 1997). Wesentlich ist auch die Position der Hydroxylgruppen im Molekül (Butković *et al.*, 2004).

Beim Abfangen von ROS reagiert eine Hydroxylgruppe unter Abgabe ihres Wasserstoffatoms mit dem Radikal, wodurch intermediär ein Aroxyradikal entsteht (Abb. 1.5) (Rice-Evans *et al.*, 1996).

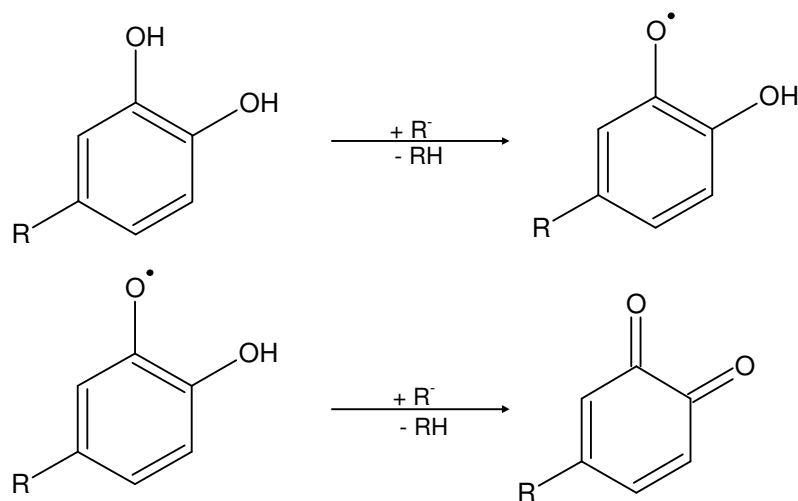


Abb. 1.5: Reaktionen zum Abfangen von ROS durch Flavonoide. „R-“ steht für Rest, „•“ für ein ungepaartes Elektron.

Wenn eine Catecholgruppierung im B-Ring vorhanden ist, können ihre Hydroxylgruppen beide mit jeweils einem Radikal reagieren und somit ein stabiles Semichinon bilden (Abb. 1.5) (Rice-Evans *et al.*, 1996; van Acker *et al.*, 1996; Butković *et al.*, 2004). Daher verstärken insbesondere Catecholgruppierungen im Molekül die Radikalfängereigenschaften. Eine einzelne Hydroxylgruppe oder zwei meta-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring hingegen verstärken die Radikalfängereigenschaften kaum (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Vor allem bei Vorhandensein einer Catecholgruppierung im B-Ring werden die Radikalfängereigenschaften auch durch eine 2,3-Doppelbindung verstärkt. Durch sie bildet das Flavonoid ein vollkommen durchkonjugiertes System und kann intermediär entstehende Aroxyldikale durch Delokalisation stabilisieren (Rice-Evans *et al.*, 1996). Eine 4-Ketogruppe kann nur gemeinsam mit einer 2,3-Doppelbindung die Radikalfängereigenschaften verstärken (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Maximal Stärke erreichen die Radikalfängereigenschaften, wenn zusätzlich eine Hydroxylgruppe in C₃-Position vorhanden ist. So sind Flavone, die keine Hydroxylgruppe in C₃-Position haben, wie beispielsweise Luteolin, schwächere Radikalfänger als vergleichbare Flavonole, welche über eine Hydroxylgruppe in C₃-Position verfügen.

Hydroxylgruppen am A-Ring verstärken die Radikalfängereigenschaften insbesondere dann, wenn keine Catecholgruppierung am B-Ring vorhanden ist (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Ein Flavonoid mit allen geforderten Strukturmerkmalen ist das Flavonol Quercetin. Dieses gilt als der beste Radikalfänger unter den Flavonoiden (Rice-Evans *et al.*, 1996; van Acker *et al.*, 1996). Im Vergleich zu Quercetin sind z.B. Catechine, die zwar über eine Catecholgruppe am B-Ring und einer Hydroxylgruppe in C₃-Position, nicht aber über die 4-Oxogruppe und die 2,3-Doppelbindung im C-Ring verfügen, deutlich schwächere Radikalfänger (Rice-Evans *et al.*, 1996). Die Radikalfängereigenschaften der Catechine verstärken sich aber deutlich bei Vorhandensein einer Pyrogallolstruktur im B-Ring oder einer Veresterung mit Gallussäure. So ist die Stärke der Radikalfängereigenschaften von Epicatechingallat, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat in der Größenordnung der des Quercetins (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Bei Procyanidinen steigt die antioxidative Kapazität nicht nur mit der Zahl der Hydroxylgruppen, sondern auch mit wachsender Kettenlänge (Verstraeten *et al.*, 2003).

Flavonoide komplexieren über Catecholgruppierungen und Oxogruppen auch Übergangsmetallionen (Abb. 1.6) (Brown *et al.*, 1998; van Acker *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996; Moridani *et al.*, 2003). Die Komplexierung von Übergangsmetallionen ist insbesondere für die antioxidative Wirkung der Flavonoide mit schwächeren antioxidativen Eigenschaften von zentraler Bedeutung (van Acker *et al.*, 1996).

Nach Komplexierung mit Fe²⁺, Fe³⁺ oder Cu²⁺ fangen einige Flavonoide wie z.B. Quercetin oder Fisetin Superoxid effektiver ab (Moridani *et al.*, 2003). Die Komplexe mit Fe³⁺ haben auch eine stärkere protektive Wirkung gegen die Schädigung isolierter Rattenhepatozyten durch Hypoxie und Reperfusion (Moridani *et al.*, 2003). Flavonoide verlieren somit im Gegensatz zur Ascorbinsäure nicht ihre antioxidative Aktivität bei Anwesenheit von Übergangsmetallionen (Halliwell, 1991a).

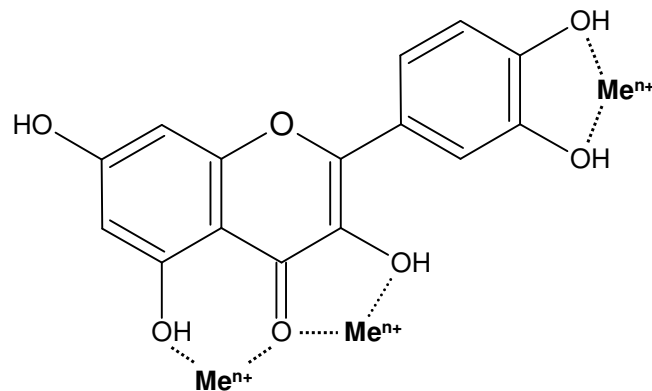


Abb. 1.6: Häufige Bindungsstellen zur Komplexierung von Übergangsmetallionen durch Flavonoide

Weitere Mechanismen der antioxidativen Wirkung von Flavonoiden sind ihre Wirkung als Reduktionsmittel und die direkte Inhibition prooxidativer Enzyme wie der Xanthinoxidase (Moini *et al.*, 2000) und der NADPH-Oxidase (Tauber *et al.*, 1984).

Flavonoide haben allerdings auch prooxidative Eigenschaften (van Acker *et al.*, 1996; Heijnen *et al.*, 2002). So geht die langsame Autooxidation von Flavonoiden mit Catechol- oder Pyrogallolgruppierung im B-Ring wie beispielsweise bei Quercetin und Myricetin in wässrigem Medium bei pH 7,5 mit der Bildung von Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen einher (Canada *et al.*, 1990).

1.3 Oxidativer Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde von H. Sies als eine Stoffwechselsituation definiert, in der innerhalb eines biologischen Systems das Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Verbindungen zugunsten der prooxidativen verschoben ist (Sies, 1985, 1991 und 1993). Teil der prooxidativen Verbindungen sind dabei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS), welche im Körper ständig beispielsweise durch Schwermetallionenkatalyse oder bei der durch die Xanthinoxidase katalysierten Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin entstehen. Vermehrt entstehen sie auch bei den meisten Formen von Gewebeschädigungen. Es ist jedoch zumeist unklar, ob dies eine Ursache oder eine Folge der Gewebeschädigung ist (Halliwell und Gutteridge, 1990; Halliwell, 1991a und b).

Zu den ROS und RNS gehören Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, Hydroperoxyfettsäuren, Peroxynitrit, Superoxid oder Stickstoffmonoxid und -dioxid sowie Radikale wie Perhydroxyl-, Hydroxyl-, Alkoxyl- oder Peroxylradikale. Sie können durch

Oxidationsprozesse, bei denen zum Teil ähnlich einer Lawine weitere Radikale entstehen, zur chemischen Veränderung von Biomolekülen wie z.B. der Peroxidation von Membranproteinen, der oxidativen Schädigung von Kohlenhydraten und Nukleinsäuren sowie von Thiolgruppen und anderen Komponenten von Proteinen führen (Sies, 1985 und 1991; Halliwell, 1991a und b). Die hierbei entstehenden Zellschäden können so weitreichend sein, dass es zum Zelluntergang kommen kann. Auf diese Weise induzierte Zelluntergänge sollen an der Pathogenese des Morbus Alzheimer und des Morbus Parkinson sowie am physiologischen Alterungsprozess beteiligt sein (Behl *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Des weiteren scheint oxidativer Stress in der Pathogenese der Atherosklerose, der Arthritiden und der Reoxygenierungsschäden beteiligt zu sein (Halliwell und Gutteridge, 1990; Weinbrenner *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Gravierende Konsequenzen können sich auch durch Schäden an der DNA ergeben. Hier kann es durch Mutation zur Entstehung von Erbschäden oder Neoplasien kommen (Halliwell und Gutteridge, 1990).

Die Wirkungen des oxidativen Stresses beschränken sich allerdings nicht nur auf die Zerstörung von Zellbestandteilen. ROS und RNS sind auch wichtige Mediatoren der Signaltransduktion. Die Pathologie mehrerer Erkrankungen wie der Atherosklerose, der Hypertonie und des Diabetes mellitus könnte zumindest in Teilen ihre Ursache auch in Störungen dieses komplizierten Netzwerkes aus Mediatoren durch oxidativen Stress haben (Chen *et al.*, 2003)

Im Laufe der Evolution haben sich Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress entwickelt. Dies sind entweder Enzyme zum Abbau reaktiver Verbindungen wie beispielsweise die Katalase zum Wasserstoffperoxidabbau, die Superoxiddismutase zum Superoxidabbau, die Glutathionperoxidasen, die unter anderem Hydroperoxylgruppen reduzieren können (Sies, 1985, 1991 und 1993), oder Verbindungen mit Radikalfängerwirkung, also der Fähigkeit, Radikale durch direkte chemische Reaktion in weniger reaktive Verbindungen umzuwandeln, ohne dabei selbst zu reaktiven Verbindungen zu werden. Radikalfänger sind z.B. Ascorbinsäure, Tocopherol, β -Carotin, Urat, Ubichinon, Retinoide, Lycopin, Glutathion, Bilirubin oder Polyphenole (Sies und Krinsky, 1995; Krinsky, 1998).

Besonderes Interesse in der Erforschung des oxidativen Stresses kommt seit einigen Jahren der Verbindung Peroxynitrit, dem Salz der peroxysalpetrigen Säure, zu. Es entsteht im Organismus durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid, die beide z.B. beim oxidativen „Burst“ der unspezifischen Immunabwehr entstehen können. Peroxynitrit ist im physiologischen Milieu äußerst instabil und lagert sich daher zu Salpetersäure um oder zerfällt in ein Stickstoffdioxid- und ein Hydroxylradikal. Es kann auch mit CO_2 reagieren. Dabei entsteht als kurzlebiges Intermediat ONOOCO_2^- , welches schnell zu den Radikalen $\text{CO}_3^{\cdot-}$ und $\cdot\text{NO}_2$ zerfällt. $\cdot\text{NO}_2$ kann danach zum sehr reaktiven N_2O_4 dimerisieren.

Peroxynitrit und seine reaktiven Umwandlungsprodukte können sowohl zu Oxidations- als auch Nitrierungsreaktionen von Biomolekülen führen. So kommt es beispielsweise zur Nitrierung von Tyrosylresten in ortho-Stellung.

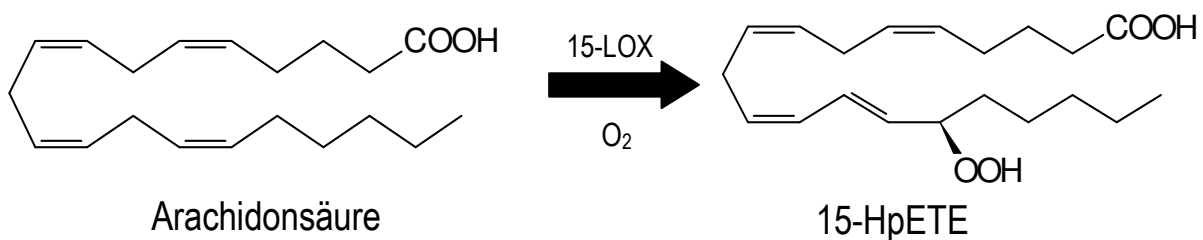
Auch Lipoxygenasen, insbesondere die 15-Lipoxygenase-1, fördern möglicherweise oxidativen Stress (Schewe, 2002). Sie synthetisieren Hydroperoxide, die in Alkoxy- und Hydroxylradikalen zerfallen können. Des Weiteren ist unter bestimmten Bedingungen auch möglich, dass Radikale des katalytischen Zyklus der Lipoxygenasen vom Enzym abdissoziieren und somit Ausgangspunkt radikalischer Kettenreaktionen werden.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von LDL mit 15-LOX-1 die lag-Phase der Cu^{2+} -induzierten LDL-Oxidation dramatisch verkürzt. Diese Modellreaktion deutet auf eine synergistische Wirkung der 15-LOX-1 beim oxidativem Stress hin (Lass *et al.*, 1996).

1.4 Lipoxygenasen und ihre Produkte

1.4.1 Definition und Vorkommen der Lipoxygenasen

Die Enzymfamilie der Lipoxygenasen (EC1.13.11.12) besteht aus nichthämeisen-haltigen Dioxygenasen. Diese intrazellulären Enzyme katalysieren die Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit 1,4-(Z,Z)-Pentadienstruktur und molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren mit 1(S)-Hydroperoxy-2,4(Z,E)-pentadienstruktur, wie nachfolgend am Beispiel der Arachidonsäure als Substrat der 15-LOX-1 dargestellt.



Lipoxygenasen sind eine phylogenetisch alte Enzymfamilie. Ihre Mitglieder sind in Pflanzen, Tieren und dem Menschen weit verbreitet (Kühn und Thiele, 1999). So konnten bis 2002 zwanzig Gene für Lipoxygenasen der Säugetiere sequenziert werden (Schewe, 2002). Fünf davon finden sich im Menschen (Schewe, 2002).

1.4.2 Einteilung der Lipoxygenasen

Die Lipoxygenasen des Säugerorganismus wurden ursprünglich nach der Positionsspezifität der einzelnen Isoenzyme bei der Dioxygenierung von Arachidonsäure klassifiziert (Kühn und

Thiele, 1999). Dabei wird die Nummer des dioxygenierten Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure zur Benennung herangezogen. So wird zwischen 5-, 8-, 12- und 15-Lipoxygenasen unterschieden. Später zeigte sich jedoch, dass es mehrere Vertreter mit gleicher Positionsspezifität jedoch deutlichen Unterschieden in ihrer Primärstruktur sowie in den enzymologischen Eigenschaften gibt (Kühn und Thiele, 1999; Brash, 1999). Zur Unterscheidung wird heute in der Regel der Zelltyp der Entdeckung der jeweiligen Lipoxygenase herangezogen (Brash, 1999). Daher wird z.B. zwischen einer 12-Lipoxygenase des Plättchentyps und einer 12-Lipoxygenase des Leukozytentyps unterschieden.

1.4.3 Struktur der Lipoxygenasen

Trotz Unterschieden in ihrer Primärstruktur weisen alle Lipoxygenasen einige gemeinsame Strukturmerkmale auf: Sie bestehen alle aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 75-80 kDa im Falle der tierischen Lipoxygenasen und ca. 94-104 kDa im Falle der pflanzlichen Lipoxygenasen (Brash, 1999). Die katalytische Domäne der Lipoxygenasen besitzt ein nicht-häm-komplexiertes Eisenatom (Brash, 1999). Dieses wird durch vier Histidylreste und der Carboxylgruppe eines Isoleucinrestes komplexiert (Schewe, 2002; Brash, 1999). Seine Oxidationsform ist in der inaktiven Form des Enzyms +II und in der aktiven Form +III (Schewe, 2002; Brash, 1999).

1.4.4 Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen

Alle Lipoxygenasen zeigen eine komplexe Reaktionskinetik. Diese besteht aus drei Phasen: einer lag-Phase, einer Prolongationsphase und einer Inaktivierungsphase. Die lag-Phase wird durch Aktivierung des Enzyms durch Hydroperoxide, den Produkten der Lipoxygenasen überwunden (Ludwig *et al.*, 1987), indem die zweiwertige Oxidationsform des Enzymeisens zur dreiwertigen oxidiert wird. Die Inaktivierung des Enzyms wird ebenfalls durch Hydroperoxide verursacht (Wiesner *et al.*, 1987).

Lipoxygenasen können durch Hydroperoxide aktiviert werden (Ludwig *et al.*, 1987).

Der Katalysezyklus der Lipoxygenasen beginnt mit dem aktiven Zentrum des aktiven Enzyms, in dem ein Eisenatom der dreiwertigen Oxidationsform vorliegt. In diesem Zustand wird ein apolares Kohlenstoffatom der doppelt allylständigen Substratsäure oxidiert, wodurch ein Alkylradikal entsteht. Dieses wird durch Reduktion des dreiwertigen Eisens zu einem Alkylperoxyradikal oxidiert. Im nächsten Schritt greift ein weiteres Molekül Sauerstoff an, was zu einem Alkylperoxyradikal führt, das dann zu einem Alkylperoxyanion oxidiert wird. Dieses Alkylperoxyanion wird durch Reduktion des Eisens zu einem Alkylperoxyradikal oxidiert, welches dann zu einem Alkylperoxyanion oxidiert wird. Im nächsten Schritt greift ein weiteres Molekül Sauerstoff an, was zu einem Alkylperoxyradikal führt, das dann zu einem Alkylperoxyanion oxidiert wird.

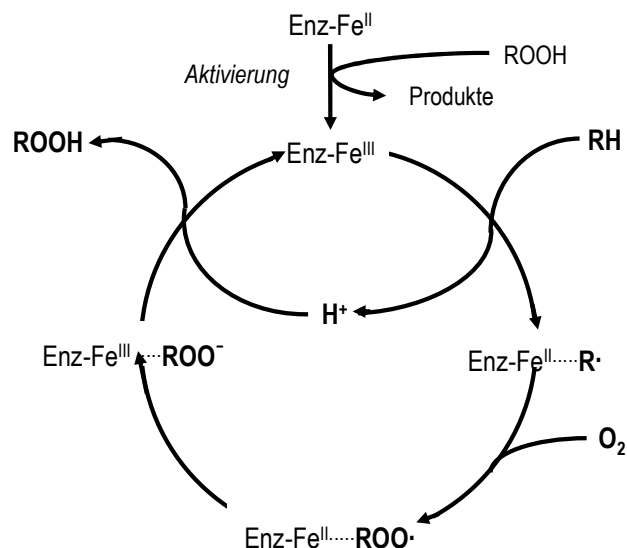


Abb. 1.7: Katalysezyklus der Lipoxygenasen. Modifiziert nach Schewe (2002). „R“ steht für apolare Kohlenstoffketten von Polyenfettsäuren. Für Einzelheiten des Katalysezyklus siehe Text.

bundenes Peroxylradikal entsteht. Dieses wird durch das Enzymeisen reduziert, sodass das entsprechende Peroxid anion entsteht und das Enzymeisen wieder in seine dreiwertige Form übergeht. Durch Anlagerung eines Protons an das Anion wird dann die korrespondierende Hydroperoxyfettsäure gebildet, die vom Enzym schließlich abdissoziiert.

1.4.5 Produkte der Lipoxygenasen

Biologisch relevante Mediatoren, die unter Mitwirkung von Lipoxygenasen gebildet werden, sind die Leukotriene, die 5-, 12- und 15-Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE), die Hepoxiline sowie die Lipoxine. Leukotriene werden über den 5-Lipoxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade synthetisiert. Sie stellen eine Gruppe von Entzündungsmediatoren dar, welche zum Teil chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten wirken und diese aktivieren (z.B. Leukotrien B₄). Sie erhöhen die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Neutrophile und induzieren die Synthese von IL-2 und seinem Rezeptor, sodass sie sowohl in der spezifischen als auch in der unspezifischen Immunabwehr eine Rolle spielen. Cysteinyl-Leukotriene lösen eine lang anhaltende Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege aus und spielen daher eine Rolle bei asthmatischen Erkrankungen.

1.4.6 15-Lipoxygenasen

15-Lipoxygenasen kommen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen vor. Bei letzteren wurden sie bisher in Retikulozyten (Schewe *et al.*, 1975), Makrophagen (Levy *et al.*, 1993), Gefäßendothelzellen (Kühn *et al.*, 1984), Prostataepithelzellen (Kelavkar *et al.*, 2000), Neuronen und Gliazellen (Praticò *et al.*, 2004) sowie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Izumi *et al.*, 1991) nachgewiesen.

Die Primärstrukturen der 15-Lipoxygenasen weisen große Unterschiede auf. So zeigen die Primärstrukturen der 15-LOX aus Retikulozyten (15-LOX-1; EC 1.13.11.33) und der 15-LOX-2 aus Keratinozyten nur eine Homologie von 35 %. Die Homologie zwischen der 15-LOX aus Retikulozyten und der 15-LOX der Sojabohne (Sojabohnen-Lipoxygenase L-1) beträgt 25 % (Brash, 1999).

Die 15-LOX-1 kann im Gegensatz zu anderen Lipoxygenasen nicht nur freie Polyenfettsäuren, sondern auch komplexere Strukturen wie veresterte Polyenfettsäuren, Phospholipide, Cholesterolester, Biomembranen und Plasmalipoproteine (LDL) dioxygenieren. Ihr werden daher universelle prooxidative Eigenschaften zugeschrieben (Schewe, 2002).

Die physiologischen Funktionen der 15-LOX-1 sind nicht vollständig geklärt. In Retikulozyten scheint sie durch Oxidation der Mitochondrienmembranen für den Mitochondrienabbau im Verlauf der Erythrozytenreifung verantwortlich zu sein (Rapoport *et al.*, 1990). Des weite-

ren gibt es Hinweise, dass sie am gesteuerten Abbau von Membranproteinen durch Proteasomen beteiligt ist (Nigam und Schewe, 2000; Dubiel und Rapoport, 1989; Grune *et al.*, 2001).

Die Hauptprodukte der 15-LOX-1 sind die 15(S)-Hydroperoxy-5,8,11,13-(Z,Z,Z,E)-eicosatetraensäure (15(S)-HpETE), aus Arachidonat, und die 13(S)-Hydroperoxy-9,11-(Z,E)-octadecadiensäure (13(S)-HpETE), aus Linoleat. Beide Hauptprodukte können durch Glutathionperoxidasen oder andere Enzyme zum korrespondierenden Alkohol reduziert werden, sodass 15(S)-HETE bzw. 13(S)-HODE entsteht.

1.5 Ziele der Doktorarbeit

Im Januar 2001 veröffentlichte „The American Journal of Clinical Nutrition“ einen Artikel, in dem eine Modulation des menschlichen Eicosanoidstoffwechsels durch Gabe procyanidinreicher Schokolade beschrieben wurde (Schramm *et al.*, 2001). 10 Testpersonen war zuerst procyanidinarme Schokolade oral gegeben worden und eine Woche später handelsübliche procyanidinreiche. Blutproben der Testpersonen zeigten zwei Stunden nach Verzehr der Schokolade einen zwanzigfach höheren Epicatechinplasmaspiegel bei Verzehr procyanidinreicher Schokolade als bei Verzehr procyanidinarmer Schokolade ($21,2 \pm 8,3$ nM vs. $1,1 \pm 1,3$ nM). Die Erhöhung des Epicatechinplasmaspiegels ging mit Veränderungen des Eicosanoidstoffwechsels einher: Im Plasma war die Konzentration an stabilen Prostazyklinmetaboliten im Vergleich zur Konzentration nach Verzehr procyanidinarmer Schokolade um 32 % erhöht ($p < 0,05$). Gleichzeitig sank die Plasmakonzentration der Cysteinyl-Leukotriene um 29 % ($p < 0,04$). Der Quotient der Leukotrien/Prostazyklinkonzentration sank dementsprechend hoch signifikant ($p < 0,01$).

Die Autoren vermuteten, die Modulation könnte auf einer Aktivitätserhöhung der Prostaglandinendoperoxid-Synthase, einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Prostaglandinsynthese, und auf eine Inhibition von Lipoxxygenasen durch Procyanidine beruhen. Die Autoren spekulierten weiter, die Modulation des Eicosanoidstoffwechsel könne Ursache der kardioprotektiven Wirkung der Polyphenole sein, denn Prostazykline wirken kardioprotektiv und vasodilatatorisch (Jones *et al.*, 1997). Des Weiteren hemmen sie die Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel sowie die Thrombozytenaggregation (LaRosa *et al.*, 1994). Damit wird die für die Pathogenese des Herzinfarktes zentrale Mikrothrombenbildung unterdrückt.

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse sollten die Wirkungen von Polyphenolen, insbesondere Flavonoiden, auf Lipoxxygenasen untersucht werden. Versuchsobjekt hierzu sollte zunächst die 15-LOX-1 sein, da sich ihre Aktivität leichter messen lässt als die der 5-LOX. Des Weiteren bildet sie aus Linolsäure nur ein Produkt (13-HpODE), sodass Sauerstoff und Linolsäure immer im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 verbraucht werden. Außerdem ist sie möglicherweise an der Atherogenese beteiligt und wäre damit von medizinischem Interesse.

Ziel dieser Doktorarbeit ist, zu bewerten, ob Flavonoide potenziell durch eine Lipoxxygenase-Hemmung Funktionen des menschlichen Körpers modulieren könnten. Zwecks dieser Bewertung sollen die Wirkungen von Polyphenolen auf Lipoxxygenasen untersucht und miteinander verglichen werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Enzyme und Chemikalien

Für die Versuche wurden drei Lipoxygenasen verwendet: Ein Rohpräparat der 15-LOX-1, isoliert aus Kaninchenretikulozyten, wurde von Oxford Biomedical Research bezogen. Das Enzym hatte einen Turnover von $2,2/s^*$. Ein hochreines Präparat der 15-LOX-1 wurde freundlicherweise von Professor H. Kühn (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Es war nach Belkner *et al.* (1993) isoliert worden und hatte laut Mitteilung Professor H. Kühns einen Turnover von 38/s.

Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (L-1) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen und rekombinante 12-Lipoxygenase (12-LOX) aus Thrombozyten des Menschen von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

Glutathion-Peroxidase (GPx) aus Rindererythrozyten sowie Glutathion-Reduktase waren von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland).

Die Mehrzahl der Polyphenole wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Sie wurden als 0,1 M Stammlösungen in 2-Methoxyethanol verwendet. Pycnogenol wurde freundlicherweise von Dr. L. Packer (Los Angeles, CA, USA) bereitgestellt. Fraktionen isolierter Procyanidin-Oligomere aus Samen des Kakaobaumes wurden freundlicherweise von der Firma Mars Incorporated (Hackettstown, NJ, USA) zur Verfügung gestellt. Ihre Gewinnung erfolgte nach Adamson *et al.* (1999) und Hammerstone *et al.* (1999). Die Fraktionen der Procyanidin-Oligomere wurden als Stammlösungen von 29,0 mg/ml in 2-Methoxyethanol verwendet. Dies entsprach einer Konzentration an Procyanidin-Monomer von 100 meq/l.

Die Stammlösungen wurden zwischen den Versuchen im Dunkeln bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und befanden sich während der Versuche ebenso wie die Enzymlösungen in einer Eis/Wasser-Mischung.

Die übrigen Chemikalien wurden käuflich erworben und entsprachen höchstmöglichem Reinheitsgrad.

**Der Hersteller gab für das Präparat eine Aktivität von $5000\text{ }\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{ml}$ und eine Proteinkonzentration von $2\text{ mg}/\text{ml}$ an. Reine Lipoxygenase hat einen Turnover von ca. 40 s^{-1} . Die eigenen Messungen der Kontrollaktivität unter vergleichbaren Bedingungen ergaben jedoch nur Werte um $2,2\text{ s}^{-1}$, sodass von einem Anteil an nicht aktivem Protein von ca. 90% im Präparat auszugehen ist.*

2.2 Messung der Lipoxygenaseaktivität

2.2.1 Verfahren

Die Reaktion der Lipoxygenasen wurde bei 20 °C durch folgende Methoden aufgezeichnet:

1. Oxygrafisch mit dem „Oxygenmeter 781“ der Firma Strathkelvin Instruments (Glasgow, UK) ausgestattet mit einer Mikro-Clark-Elektrode. Das Gerät wurde durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze Dithionit in den luftäquilibrierten Messpuffer (siehe 2.2.2.3) geeicht. Die thermostatierte Messkammer hatte ein Volumen von 400 µl und enthielt einen Magnetrührfisch
2. Photometrisch mit dem „UV/VIS-Spektrometer Lambda 2“ des Herstellers Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) und dem Computerprogramm „PE Applications“ desselben Herstellers.

2.2.2 Lösungen

2.2.2.1 Enzyme

Die bei der Firma Oxford Biomedical Research erworbene 15-LOX-1 wurde vor Versuchsbeginn 1:10 in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 6 verdünnt. Die freundlicherweise von Professor H. Kühn zur Verfügung gestellte 15-LOX-1 wurde vor Versuchsbeginn 1:100 in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 6 verdünnt. Die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurde vor Versuchsbeginn 1:400 in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt.

Bei den Lösungen der 15-LOX-1-Präparate war meist nach etwa zwei Stunden ein Aktivitätsabfall des Enzyms zu beobachten. Bei der Lösung der Sojabohnen-Lipoxygenase kam es meist erst nach etwa drei Stunden zum Aktivitätsabfall des Enzyms.

2.2.2.2 Substratlösungen

Als Substrat der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und der 15-LOX-1 wurde 5,3 mM Kaliumlinoleatlösung (Endkonzentration im Reaktionsansatz 0,27 mM) verwendet. Die Substratlösung wurde frisch aus einer 0,535 M methanolischen Stammlösung der Linolsäure hergestellt. Die Stammlösung wurde unter Stickstoffatmosphäre im Dunkeln bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Substratlösung wurde jeweils ein Aliquot der Stammlösung mit 0,53 M KOH gleichen Volumens gemischt. Dieses Gemisch wurde dann im Verhältnis 1:50 mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Bei Messungen der Aktivität der 15-LOX-1 enthielt der 0,1 M Kaliumphosphatpuffer zusätzlich 4 % Natriumcholat, sodass der Reaktionsansatz 0,2 % Cholat enthielt.

Linoleat wurde gegenüber Arachidonat als Substrat bevorzugt, da bei diesem Substrat keine Mehrfachoxygenierungen möglich sind. Außerdem kommt es mit Arachidonat als Substrat schneller zur Autoinaktivierung des Enzyms. Daher wäre es bei den Messungen der Aktivität der 15-LOX-1 schwieriger gewesen, lineare Kurvenverläufe zu erhalten.

Als Substrat der 12-Lipoxygenase wurde Kaliumarachidonat (Endkonzentration bei Testung 50 μM) verwendet.

2.2.2.3 Messpuffer

Als Messpuffer wurde 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1 mM DTPA verwendet. Durch Luftäquilibration bei 20 °C hatte der Messpuffer eine Konzentration an molekularem Sauerstoff von 287 μM . Zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration wurde eine Sättigungskonzentration des molekularen Sauerstoffs in Wasser von 9,17 mg/l bei 1013 mbar zugrunde gelegt (American Public Health Association, 1971). Damit waren in 400 μl Messpuffer, dem Volumen der oxygrafischen Messkammer, 114,6 nmol molekularer Sauerstoff.

2.2.3 Durchführung

2.2.3.1 Oxygrafie

Folgende Volumina wurden in angegebener Reihenfolge in die oxygrafische Messkammer gegeben:

- 380 μl Messpuffer (siehe 2.2.2.3)
- 20 μl Enzymlösung (siehe 2.2.2.1)
- 4 μl 2-Methoxyethanol (bei Kontrollansätzen) bzw. 4 μl Lösung eines Polyphenols in 2-Methoxyethanol variierender Konzentration (Endkonzentration der Polyphenole in den Testansätzen jedoch nie größer als 1000 μM)
- 20 μl Substratlösung (siehe 2.2.2.2), zügig zugegeben mittels einer Mikroliterspritze mit aufgestecktem Teflonschlauch zwei Minuten nach Schließung der Messkammer durch Einführung der Clark-Elektrode.

2.2.3.2 Photometrie

Bei photometrischen Messungen entsprachen die verwendeten Lösungen sowie die Reihenfolge ihre Zugabe den Angaben in 2.2.3.1. Es wurde jedoch von jeder Lösung jeweils das doppelte Volumen wie im oxygraphischen Tests zugegeben. Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug demzufolge 800 µl. Die Messung erfolgte bei 234 nm. Hier haben konjugierte Diene, wie sie bei der Reaktion der Lipoxygenasen entstehen, ein Absorptionsmaximum.

Die photometrische Messung hatte gegenüber der oxygraphischen Messung den Nachteil, dass sie durch Trübungen und die hohe Eigenabsorption der Polyphenole gestört wurde. Daher war sie nicht bei beliebig hoher Konzentration an Polyphenol durchführbar. Durch parallele Anwendung beider Messmethoden wurde sichergestellt, dass wirklich die Reaktion der Lipoxygenase erfasst wurde.

2.2.3.3 Auswertung

Zur der Auswertung der Aktivität der Lipoxygenase wurde die Geschwindigkeit im nahezu linearen Bereich nach Überwindung der lag-Phase (der Zeitraum zwischen etwa 15 Sekunden und 2 Minuten nach Reaktionsstart) der Kontrollansätze als hundertprozentige Enzymaktivität definiert. Die Enzymaktivität in den Testansätzen wurde auf die Aktivität der Kontrollansätze bezogen und als „Restaktivität in Prozent“ angegeben.

2.3 Beschreibung der Kinetik der Lipoxygenasen durch die

Michaelis-Menten-Gleichung

Zur Erstellung von Lineweaver-Burk-Plots der Kinetik der 15-LOX-1 und der Sojabohnen Lipoxygenase L-1 wurden photometrisch bei 234 nm Progresskurven der Entstehung konjugierter Diene und damit der Lipoxygenaseaktivität aufgezeichnet. Diese zeigten nicht nur den zeitlichen Reaktionsverlauf, sondern auch die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der jeweils verbliebenen Substratkonzentration bis zum Reaktionsende. Über den molaren Extinktionskoeffizienten konjugierter Diene ($\epsilon_{234} = 25,000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Egmond *et al.*, 1976) konnte die aktuelle Substratkonzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Reaktion errechnet werden und der entsprechenden Enzymaktivität zugeordnet werden. Diese Datenpaare wurden zur Erstellung der Lineweaver-Burk-Plots verwendet.

2.4 Aktivitätsbestimmung der zytosolischen Glutathionperoxidase (GPx)

Vor oxygraphischen Versuchen mit GPx-kontrolliertem Peroxidtonus wurde die GPx-Aktivität photometrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Modifikation des 1997 von Sies *et al.*

beschriebenen Testsystem zur Aktivitätsbestimmung der GPx angewandt. Dabei wurden folgende Lösungen in angegebener Reihenfolge in eine Messküvette gegeben:

- 700 µl 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1 mM DTPA
- 5 – 20 µl lyophilisierte Glutathionperoxidase, die in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst worden war und in variierender Verdünnung zugegeben wurde
- 65 µl 12,3 mM GSH (Endkonzentration 1 mM) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst
- 5 µl Glutathionreduktase unverdünnt (Aktivität 0,12 U/µl)
- 5 µl 16 mM NADPH (Endkonzentration 0,1 mM) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
- 5 µl 19,2 mM *tert.*-Butylhydroperoxid (Endkonzentration 0,12 mM)

Die Reaktion wurde bei 20 °C durch Abnahme der Absorption bei 340 nm aufgrund des NADPH-Verbrauchs verfolgt. Die lineare Reaktionsgeschwindigkeit (ca. 1-2 min nach Reaktionsstart) wurde durch das Computerprogramm „PE Applications“ errechnet.

2.5 Versuche mit Polyphenol-Eisen-Komplexen

Die Versuche zur Komplexierung von Polyphenolen mit Eisenionen wurden aufgrund der Empfindlichkeit einiger Polyphenol-Eisen-Komplexe gegenüber molekularem Sauerstoff (Moridani *et al.*, 2003) unter weitgehend anaeroben Bedingungen durchgeführt. Daher wurde zur Lösung von Eisen(-III)-ammoniumsulfat verwendetes destilliertes Wasser vor Zugabe des Salzes direkt aus der Milliporanlage entnommen und bis zum Kochen erhitzt, um es von molekularem Sauerstoff zu befreien. Sobald das Wasser kochte, wurde ein laminarer Stickstoffstrom eingeleitet, damit sich nicht erneut Luftsauerstoff lösen konnte.

Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 2.2.3.1 beschriebenen mit dem Unterschied, dass als Messpuffer bei 20 °C luftäquilibrierter 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4 verwendet wurde. Zur Testung wurde ein Aliquot Eisen(-III)-ammoniumsulfatlösung mit Polyphenollösung in variierenden ganzen stöchiometrischen Mengenverhältnissen gemischt. Dieses Gemisch wurde zügig in die Messkammer des Oxygraphen gegeben, um die Einwirkzeit des Luftsauerstoffs zu minimieren. Die Reaktion wurde bereits vor Ablauf der zweiminütigen Vorinkubationszeit gestartet, sobald eine konstante Basislinie erreicht worden war. Eine Vehikelkontrolle des 2-Methoxyethanols sowie jeweils einer Kontrolle mit Polyphenol bzw. Eisen(-III)-ammoniumsulfat in der Konzentration des Testansatzes wurden mitgeführt.

2.6 Wirkung von oxidierten Polyphenolen auf Lipoxygenasen

2.6.1 Synthese von Peroxynitrit

Peroxynitrit wurde nach Koppenol *et al.* (1996) aus 50 ml 50 mM Natriumnitrit und 50 ml 50 mM Wasserstoffperoxid synthetisiert. Die Edukte wurden zeitgleich mit derselben Geschwindigkeit, angetrieben durch Peristaltikpumpen, über ein Y-förmiges Schlauchsystem im Verhältnis 1:1 zusammengegeben. Dabei befand sich jeweils ein Gefäß mit einem der beiden Edukte an jeweils einem Schenkel des „Ypsilons“ und wurde mit Hilfe der Peristaltikpumpe langsam in das Reaktionsgefäß gepumpt. Die Edukte reagierten an der Vereinigung der beiden „Ypsilonschenkel“ miteinander zu Peroxynitrit. Das Peroxynitrit wurde in einem eiskühlten Becherglas aufgefangen, in dem sich 25 ml 1,5 M Natronlauge befanden. In der Peroxynitritlösung noch vorhandenes Wasserstoffperoxid wurde durch Zugabe von Braunstein (MnO_2) entfernt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und in 1 ml-Portionen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Konzentration an Peroxynitrit wurde photometrisch durch Absorption bei 302 nm ($\epsilon = 1,67\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt und lag in der Regel bei etwa 50 mM. Verdünnungen dieser Stammlösung erfolgten in frisch präparierter 0,2 % KOH.

2.6.2 Wirkung von mit Peroxynitrit behandelten Polyphenolen auf Lipoxygenasen

Zu 4 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit 0,1 mM DTPA und 0,2 mM Polyphenol wurde unter permanenter Vortexbehandlung ein 40 μl Bolus von 50 mM Peroxynitrit (Endkonzentration anfangs 500 μM) zugegeben.

Es wurden drei Kontrollen mitgeführt:

- Eine enthielt nur 2-Methoxyethanol und wurde nicht mit Peroxynitrit behandelt (Enzymkontrolle).
- Eine enthielt unbehandeltes Polyphenol („Polyphenolkontrolle“).
- Eine enthielt kein 2-Methoxyethanol, wurde aber mit Peroxynitrit behandelt (Zersetzungskontrolle).

Das Vorgehen bei der Testung entsprach 2.2.3.1 mit der Modifikation, dass jeweils ein 380 μl großes Aliquot der 4 ml Reaktionsansätze als Messpuffer verwendet wurde und kein weiteres 2-Methoxyethanol bzw. Polyphenol zugegeben wurde.

2.7 Wirkung von Peroxynitrit auf die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase bei An- und Abwesenheit von Epicatechin

Einem 100 µl Aliquot einer 240 nM Lösung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (1:200 Verdünnung des Präparates der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1) in 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1 mM DTPA wurde unter permanenter Vortexbehandlung 10 µl Peroxynitrit variierender Konzentration hinzugegeben. In den Vehikelkontrollen wurden anstelle des Peroxynitrits 10 µl reine 0,2 % KOH zugegeben. In den Zersetzungskontrollen wurden zu 100 µl des Kaliumphosphatpuffers 10 µl Peroxynitrit-Stammlösung gegeben, und nach zehnminütigem Stehenlassen wurden dann 0,5 µl des unverdünnten Präparates der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 hinzugegeben.

Jeweils 20 µl aus den Ansätzen wurden zur oxygrafischen Messung zu 380 µl 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1 mM DTPA gegeben. Somit betrug die Endkonzentration der Lipoxygenase in der Messkammer 6 nM. Abweichend von 2.2.2.2 wurde die Substratlösung mit 0,1 M Boratpuffer pH 9 anstelle des 0,1 M Kaliumphosphatpuffers pH 7,4 hergestellt.

Zur Untersuchung der Wirkung von Epicatechin auf dieses System wurden einem 100 µl Aliquot der Enzymlösung 2 µl Epicatechin variierender Konzentration (in den Kontrollen stattdessen 2 µl 2-Methoxyethanol) zugegeben. Dann wurden diesem Gemisch unter Vortexbehandlung 10 µl 1,68 mM Peroxynitrit (in den Kontrollen stattdessen 10 µl 0,2%ige KOH) zugegeben. Damit war die Endkonzentration des Peroxynitrits anfangs mit 150 µM fünfhundertfach höher als die Konzentration der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1.

2.8 LDL als Substrat der 15-Lipoxygenase-1

2.8.1 Isolation von LDL

LDL wurde nach Kleinveld *et al.* (1992) aus Cubitalvenenblut zweier männlicher, gesunder Probanden im Alter von 21 bzw. 30 Jahren isoliert. Hierzu wurde durch Venenpunktion Blut in ein Serumröhrchen abgenommen und 10 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Danach wurde das Serum abpipettiert. Jeweils 0,9 ml des Serums wurden in ein Reagenzglas gegeben und mit 1,87 ml „Heavy solution“ (Lösung mit 153 g NaCl/l, 354 g KBr/l und 100 µg EDTA/l) gemischt. Die Reagenzgläser wurden mittels einer Spritze mit im 90° Winkel gebogener Nadel vorsichtig mit isotoner Kochsalzlösung bis zum Rand gefüllt. Dabei wurde aufgrund der geringeren mittleren Dichte der isotonen Kochsalzlösung im Vergleich zur „Heavy solution“ ein Dichtesprung aufgebaut.

Die Reagenzgläser wurden bei 15 °C in der Ultrazentrifuge 130 Minuten lang mit 28000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde nach 130 Minuten ohne Einsatz der Zentrifugenbremse beendet. Danach wurde die oberste, trübe, aus Chylomikronen bestehende Schicht in den Reagenzgläsern mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Die LDL-

Fraktion, die sich in einer schmalen, orangefarbenen Schicht in der Mitte der Reagenzgläser befand, wurde mit einer weiteren Pasteur-Pipette abgesaugt. Dann wurde sie in der Gelfiltrationssäule „Sephadex G-25“ der Firma Pharmacia Biotech zur Entfernung des Kaliumbromids und des EDTA filtriert. Die Säule war vor der Gelfiltration mit 20 ml PBS pH 7,4 konditioniert worden. Dann wurden auf sie 400 µl der LDL-Fraktion und 600 µl PBS aufgetragen. Das LDL wurde dann mit weiteren 4,5 ml PBS eluiert. Von diesem Eluat wurden die ersten 2 ml verworfen und mit den zweiten 2,5 ml das entsalzte LDL erhalten.

Die Konzentration an LDL wurde mit dem Cholesterolbestimmungsset „Chol“ der Firma Roche indirekt über die Cholesterolkonzentration der Lösung bestimmt. Dabei wurde ein Cholesterolgehalt des LDL von durchschnittlich 31,6 % und eine Molmasse von $2,5 \times 10^6$ Da zugrundegelegt (Angaben der Firma Roche im Beipackzettel des Cholesterolbestimmungsset „Chol“).

2.8.2 Untersuchung des Einflusses von Polyphenolen auf die kupferionen- und

15-LOX-1-induzierte LDL-Oxidation

Die oxidative Modifikation von LDL, induziert durch zweiwertige Kupferionen oder die 15-LOX-1, wurde bei 20 °C photometrisch durch Absorption bei 234 nm über einen Zeitraum von bis zu 12 Stunden untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 0,1 µM LDL in PBS sowie 2-Methoxyethanol bzw. Polyphenol variierender Konzentration. Die Reaktionen wurden mit 1 µM 15-LOX-1 oder 10 µM Kupferchlorid gestartet. Es wurde die Vehikelkontrolle des 2-Methoxyethanols und ein Leerwert, ein Ansatz ohne Polyphenol und ohne zweiwertige Kupferionen bzw. 15-LOX-1, mitgeführt.

Zur Bestimmung der Dauer der lag-Phase der LDL-Oxidation wurde der Schnittpunkt der Tangenten bei $V_{\max}$ mit der Abszisse herangezogen.

2.9 Angewendete statistische Verfahren

Die Errechnung deskriptiver statistischer Daten sowie die Durchführung statistischer Signifikanztests erfolgte mit den Computerprogrammen „Sigma Plot 7.0“, „Excel 10.0“ oder „Graphpad Prism 4.0“.

Deskriptive statistische Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Gruppenmittelwerte wurden mit dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede geprüft. Dabei wurde jeweils ein Signifikanzniveau α von 0,05 gefordert. Die Fragestellung war immer beidseitig. Vor Durchführung der Tests waren Normalverteilung sowie gleiche Varianz der zu verglei-

chenden Stichproben mittels χ^2 -Anpassungstest bzw. F-Test sichergestellt worden. Die Ergebnisse der Signifikanztests werden jeweils als Fehlerwahrscheinlichkeit p angegeben.

Regressionskurven wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Sigma Plot 7.0“ der Firma SPSS Inc. errechnet. Bei linearer Regression wurde immer der Pearsonsche Korrelationskoeffizient r sowie das Bestimmtheitsmass R angegeben.

Dosis-Wirkungskurven wurden mit Hilfe von „Graphpad Prism 4.0“ errechnet und bei Bedarf auf signifikante Unterschiede in ihren IC₅₀-Werten mittels F-Test geprüft. Die IC₅₀-Werte wurden nach Möglichkeit mit ihrem 95% -Konfidenzintervall angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 (-)-Epicatechin ist ein Inhibitor der 15-LOX-1

Der Einfluss von (-)-Epicatechin auf die 15-LOX-1 und die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 bei physiologischem pH wurde untersucht. Als Substrat wurde dabei Kaliumlinoleat verwendet. Die Messungen erfolgten sowohl oxygrafisch als auch photometrisch und ergaben übereinstimmende Ergebnisse. (-)-Epicatechin hemmte die 15-LOX-1 dosisabhängig mit einem IC_{50} von 59 μM (Abb. 3.1). An der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 hingegen war diese Verbindung bis zu einer Endkonzentration von 1 mM ohne erkennbaren Einfluss auf die Enzymaktivität.

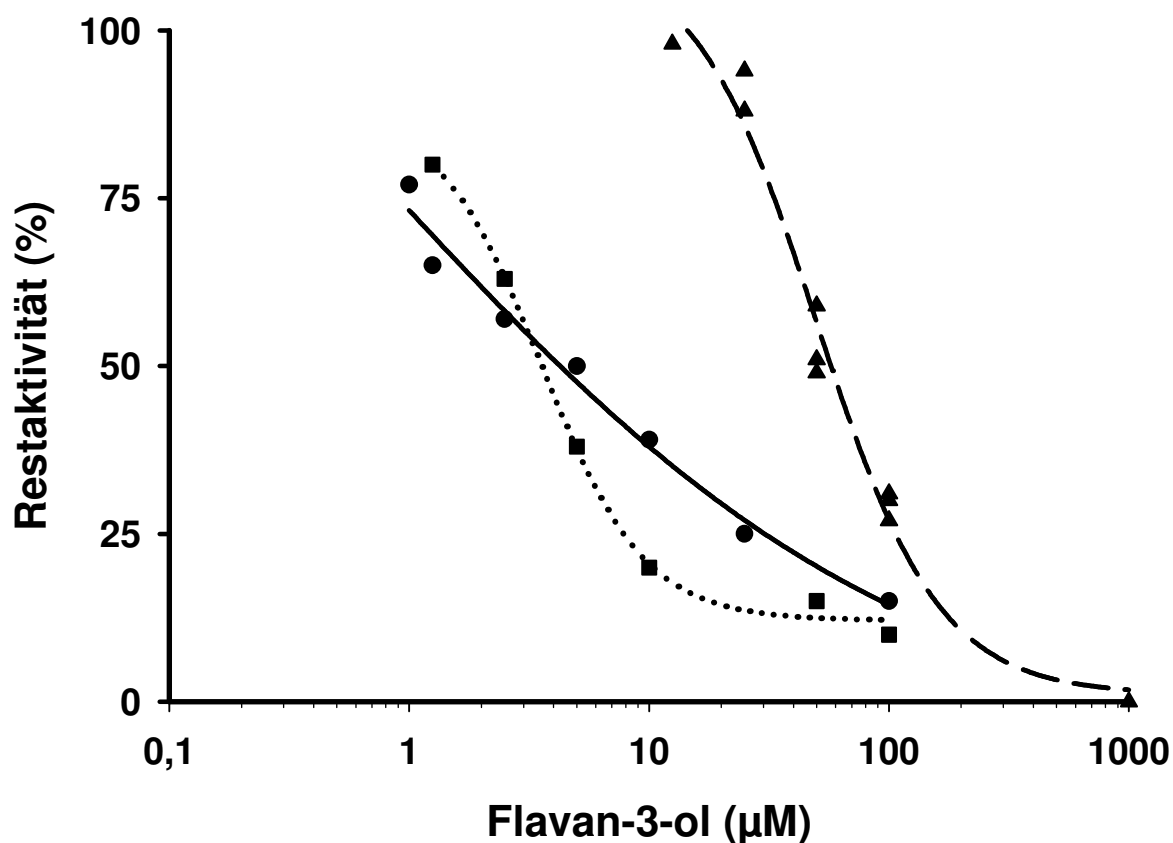


Abb. 3.1: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung der Flavan-3-ole (-)-Epicatechin (Dreiecke, gestrichelte Linie), (-)-Epicatechingallat (Punkte, durchgezogene Linie) und Epigallocatechingallat (Quadrate, gepunktete Linie) auf die Aktivität der 15-LOX-1.

3.2 Wirkung weiterer Flavanole auf Lipoxygenasen

Auch alle weiteren getesteten Flavanole hemmten dosisabhängig die 15-LOX-1 (Tab. 3.1). Der Maximaleffekt entsprach dabei fast einer Totalhemmung. An der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 waren die Flavanole bis auf Epigallocatechingallat wirkungslos. Allerdings

war auch dieses mit einem IC_{50} von 1 mM nur schwach wirksam. Um einen möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die Lipoxygenasehemmung durch Flavonoide auszuschalten, wurde das Sojabohnenenzym nicht – wie sonst häufig üblich – beim pH-Optimum von 9.0 sondern wie die 15-LOX-1 bei pH 7.4 gemessen. Dadurch war weitgehende Vergleichbarkeit des pflanzlichen Enzyms und der 15-LOX-1 gegeben.

Tab. 3.1: Wirkung der Flavanole auf die 15-LOX-1 und die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 bei pH 7.4

Verbindung	IC_{50} (μ M)	
	15-LOX-1	Sojabonen-LOX L1
(-)-Epicatechin	59 (52-66)	Inaktiv
(+)-Catechin	60*	nicht getestet
3'-O-Methyl(-)-epicatechin	1000	Inaktiv
(-)-Epigallocatechin	100	Inaktiv
(-)-Epicatechingallat	4,7 (3,6 – 5,9)	nicht getestet
(-)-Epigallocatechingallat	3,7 (2.4 – 5.6)	1000
Procyanidindekamer	0.8 [#]	stark wirksam

*Daten von R. Hansen (Davis, CA, USA)

[#]entsprechen 8 μ eq/l

In Klammern jeweils die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle

Gallussäureester der Flavanole wie Epigallocatechingallat waren an der 15-LOX-1 um eine Größenordnung wirksamer als (-)-Epicatechin ($p < 0,0001$) (Abb. 3.1). Die Veresterung von Flavanolen mit Gallussäure führte somit zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung. Auffällig war die vergleichsweise schwache inhibitorische Wirkung des Epigallocatechins. Diese könnte mit einer erhöhten Tendenz der Substanz zur Autoxidation in Verbindung stehen. Dafür spricht die Beobachtung, dass im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden bereits vor Reaktionsstart mit Substrat ein Sauerstoffverbrauch auftrat.

Mit 3`-Methyl(-)-epicatechin wurde ein Lebermetabolit des (-)-Epicatechins getestet. Dieser war mit einem IC₅₀ von 1 mM an der 15-LOX-1 deutlich schwächer wirksam als (-)-Epicatechin selbst.

3.3 Hemmung der Lipoxygenasen durch Procyanidin-Oligomere

Als nächstes wurde die Wirkung von Procyanidinfraktionen des Kakaos auf Lipoxygenasen untersucht. Die Procyanidine hemmten sowohl die 15-LOX-1, als auch die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Die Stärke der Hemmung variierte sowohl im Vergleich zwischen den einzelnen Procyanidinfraktionen untereinander, als auch im Hinblick auf die verschiedenen Lipoxygenasen (Abb. 3.2).

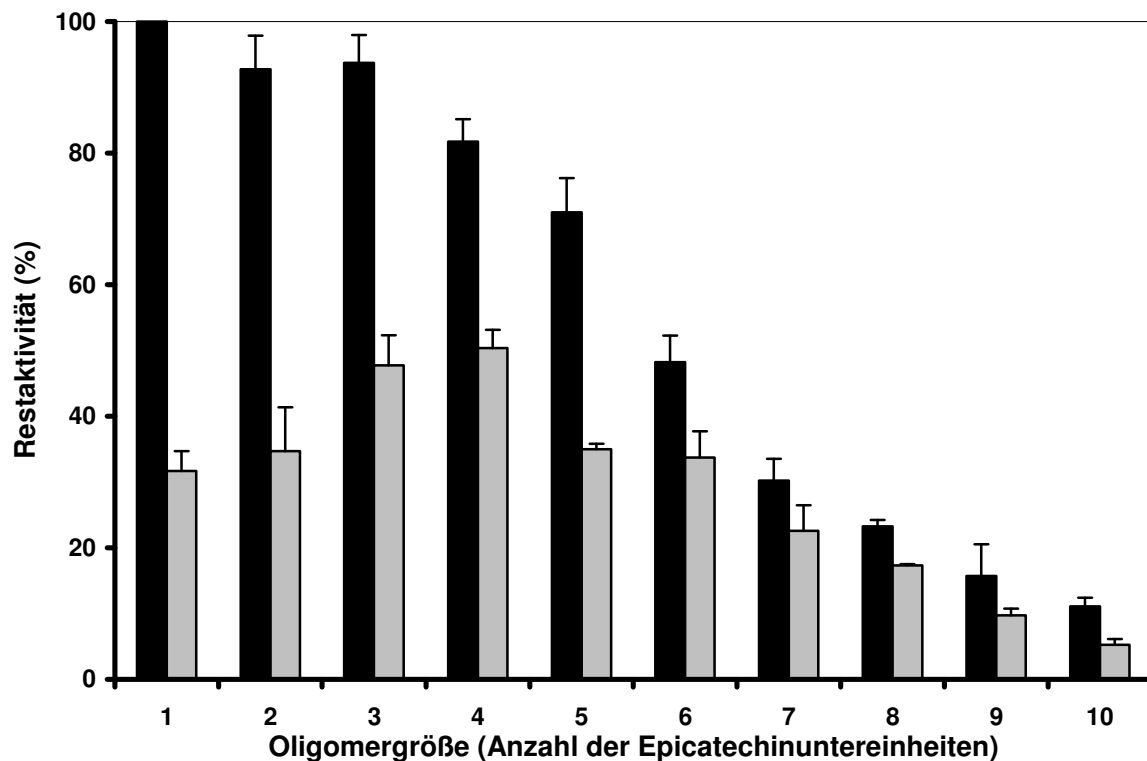


Abb. 3.2: Modifiziert nach Schewe et al. (2001). Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch einzelne Procyanidinfraktionen. Die Fraktionen wurden aus Samen des Kakaobaumes „Theobroma cacao“ isoliert. Sie wurden in 2-Methoxyethanol gelöst. Die Lösungen hatten eine Konzentration von 2,9 mg/ml (entspricht 10 mM (-)-Epicatechin). Aus diesen Lösungen wurden 4 µl zu 400 µl Meßpuffer (siehe Kapitel 2) gegeben. In der Messkammer befanden sich somit 100 µeq Procyanidinfraktion/l. Die Aktivität der Lipoxygenasen wurde nach Zugabe von Kaliumlinoleat oxygrafisch gemessen. Die Aktivität der Kontrolle der 15-LOX-1 betrug 0,12 nkat, die der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 0,15 nkat. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der Restaktivität der Lipoxygenase aus 4-6 Messungen mit Standardabweichung. Die grauen Säulen zeigen Ergebnisse an der 15-LOX-1, die schwarzen Säulen die an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1.

Die inhibitorische Wirkung auf die 15-LOX-1 nahm vom Monomer bis zur Tetramer-Fraktion, bei der ein Minimum erreicht wurde, stetig ab und nahm dann bis zur Dekamer-Fraktion wieder kontinuierlich zu.

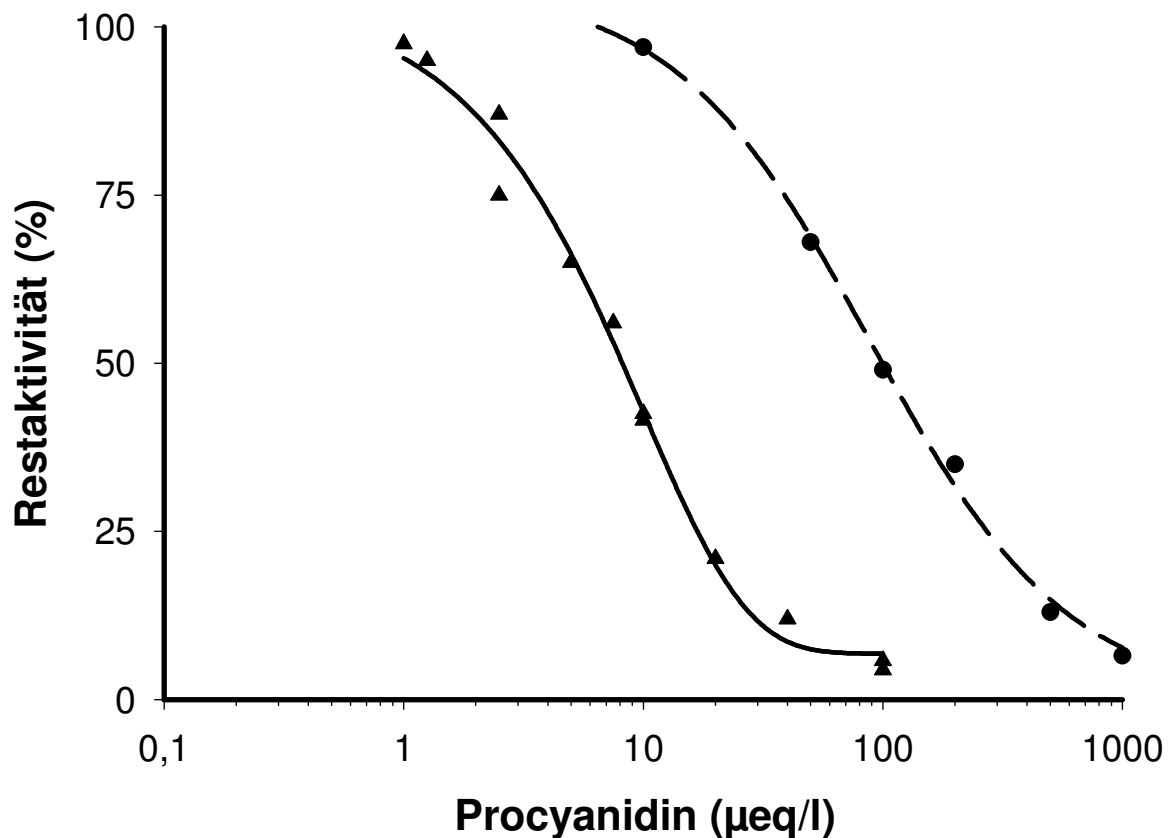


Abb. 3.3: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung der Tetramer-Fraktion der Procyanidine (Punkte, gestrichelte Linie) und der Dekamer-Fraktion der Procyanidine (Dreiecke, durchgezogene Linie) auf die Aktivität der 15-LOX-1. Der IC_{50} der Dekamer-Fraktion betrug 8 µeq/l, der IC_{50} der Tetramer-Fraktion etwa 100 µeq/l ($p < 0,0001$).

An der Sojabohnen-Lipoxygenase hingegen trat erst ab der Tetramer-Fraktion eine deutliche Hemmung auf, die kontinuierlich bis zur Dekamer-Fraktion zunahm. Dabei ergab sich bemerkenswerterweise zwischen dem Ausmaß der Hemmung und dem Logarithmus der Oligomergröße eine fast lineare Beziehung (Abb. 3.4). Somit waren die langkettigen Oligomere für beide 15-Lipoxygenasen die wirksamsten Hemmstoffe. Eine positive Korrelation zwischen der Oligomergröße der Procyanidine und ihrer biologischen Aktivität wurde auch für die antioxidative Kapazität von Procyanidinen, ihrer Hemmung der 2,2'-Azobis-2,4-dimethylvaleronitril-induzierten Liposomen-Oxidation, ihrer Fähigkeit zur Erniedrigung des Membranpotenzials und der Blockierung des Zugangs von ROS zu Zellmembranen durch Procyanidine nachgewiesen (Verstraeten *et al.*, 2003).

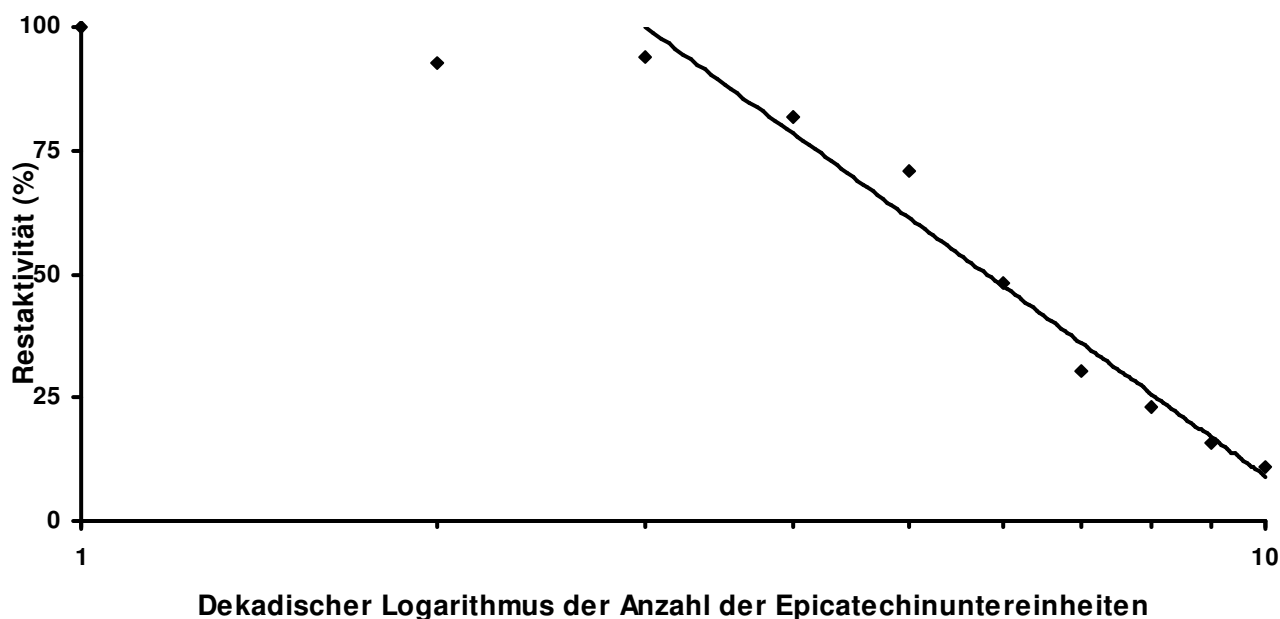


Abb. 3.4: Halblogarithmische Darstellung der Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch 100 µeq/l Procyanidinfraktion. Die Beziehung zwischen dem dekadischen Logarithmus der Anzahl der Epicatechinuntereinheiten und der Restaktivität in % war zwischen der Trimer- und der Dekamer-Fraktion linear.

Pycnogenol, ein procyanidinreicher Extrakt aus der Rinde des Baumes *Pinus maritima*, hemmte sowohl die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1, als auch die 15-LOX-1 dosisabhängig in vergleichbarem Ausmaß ($p > 0,05$) (Abb. 3.5). Hierbei war die inhibitorische Wirkung auf die 15-LOX-1 bezogen auf das Gewicht vergleichbar mit der des (-)-Epicatechins und der der Procyanidin-Fractionen mittlerer Größe. Sie war um eine Größenordnung schwächer als die der Dekamer-Fraktion aus dem Samen des Kakaobaums.

An der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 war der IC_{50} bei pH 7,4 mit 10 µg/ml niedriger als der von Moini *et al.* (2000) angegebene IC_{50} von 40 µg/ml bei pH 9. Ursache für diese Diskrepanz könnten unterschiedliche Ladungen der Procyanidine bei den beiden pH-Werten sein. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Testung der Flavonoide bei unphysiologischem pH nur begrenzt Informationen zur Aktivität der Verbindungen *in vivo* liefern kann.

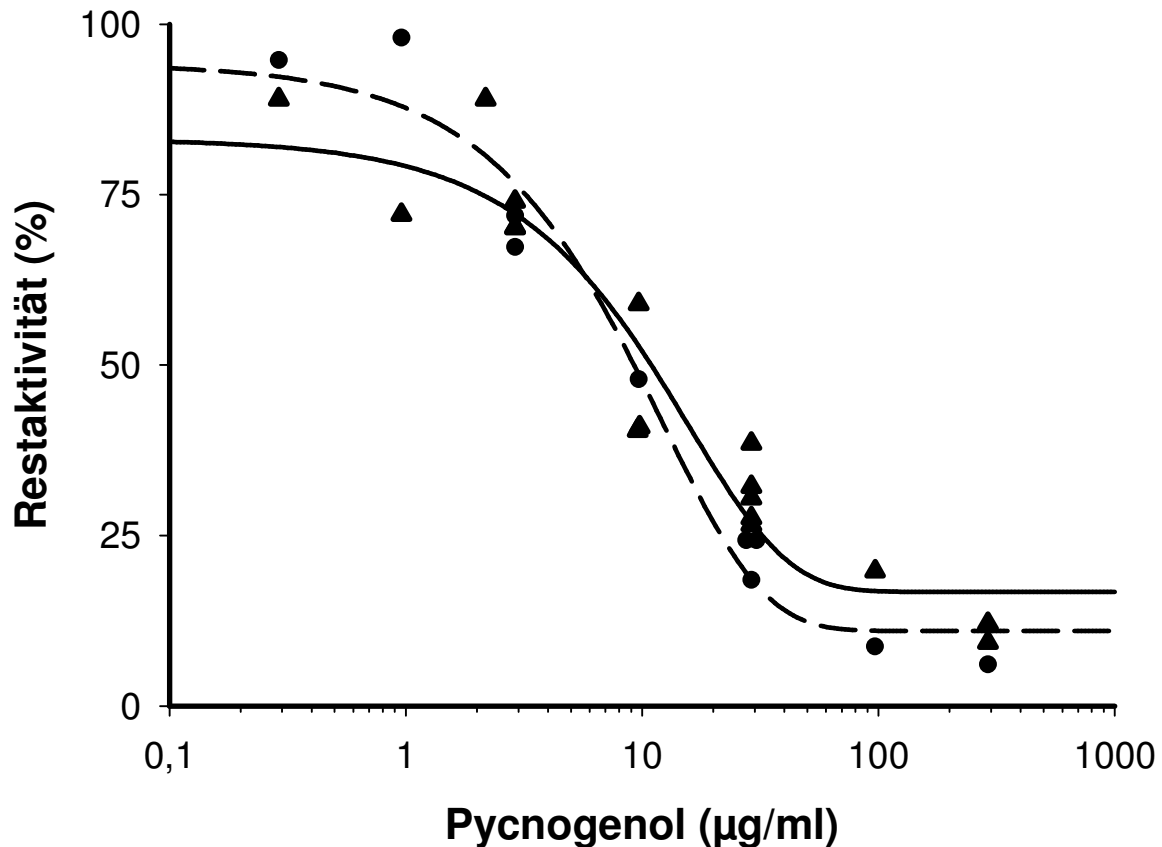


Abb. 3.5: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Pycnogenol auf die Aktivität der 15-LOX-1 (Dreiecke, durchgezogene Linie) und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (Punkte, gestrichelte Linie).

3.4 Wirkung von Procyanidinen auf die 12-Lipoxygenase der Thrombozyten

(-)-Epicatechin und die Dekamer-Fraktion der Procyanidine wurden auch an rekombinanter 12-Lipoxygenase aus Thrombozyten des Menschen getestet. Dabei wurde das Enzym durch (-)-Epicatechin mit einem IC_{50} von 15 µM gehemmt. 10 µM Dekamer verursachte eine Hemmung von 54 %. Ein Mol Dekamer besteht aus zehn Untereinheiten Epicatechin. Unter Berücksichtigung dessen war Epicatechin an der 12-LOX wirksamer als die Dekamer-Fraktion. Dies ist ein Unterschied zum Ergebnis an der 15-LOX-1, an der die Dekamer-Fraktion der Procyanidine deutlich wirksamer war als (-)-Epicatechin.

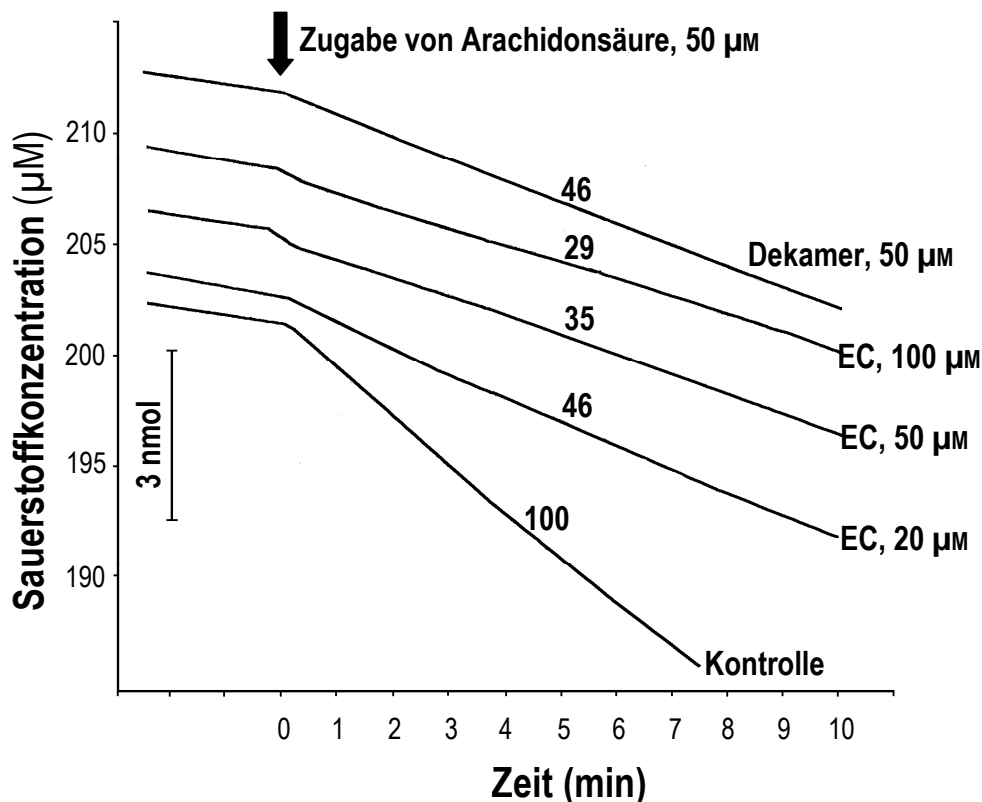


Abb. 3.6: Wirkung von (-)-Epicatechin (EC) und Procyanidin-Dekamer auf rekombinante 12-LOX aus Thrombozyten des Menschen. Die Reaktionen wurden oxygrafisch aufgezeichnet. Substrat dabei war Kaliumarachidonat. Die Werte an den Kurven geben die Restaktivität in % wieder.

3.5 Wirkungen des Flavonols Quercetin auf die Reaktionskinetik der Lipoxygenasen

Die Menge an Quercetin und verwandten Flavonolen im Kakao beträgt nur ein Zehntel derer der Flavan-3-ole (Schewe *et al.*, 2002). Jedoch hemmte Quercetin die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 mit einem IC_{50} von $4,1 \mu M$ und die 15-LOX-1 mit einem IC_{50} von $3,8 \mu M$ sehr viel stärker als (-)-Epicatechin ($p < 0,0001$), sodass es trotz seiner geringen Menge wesentlich für die pharmakologischen Wirkungen des Kakaos sein könnte.

Quercetin modifizierte den zeitlichen Verlauf der Reaktion beider Enzyme in mehrfacher Weise (Abb. 3.7).

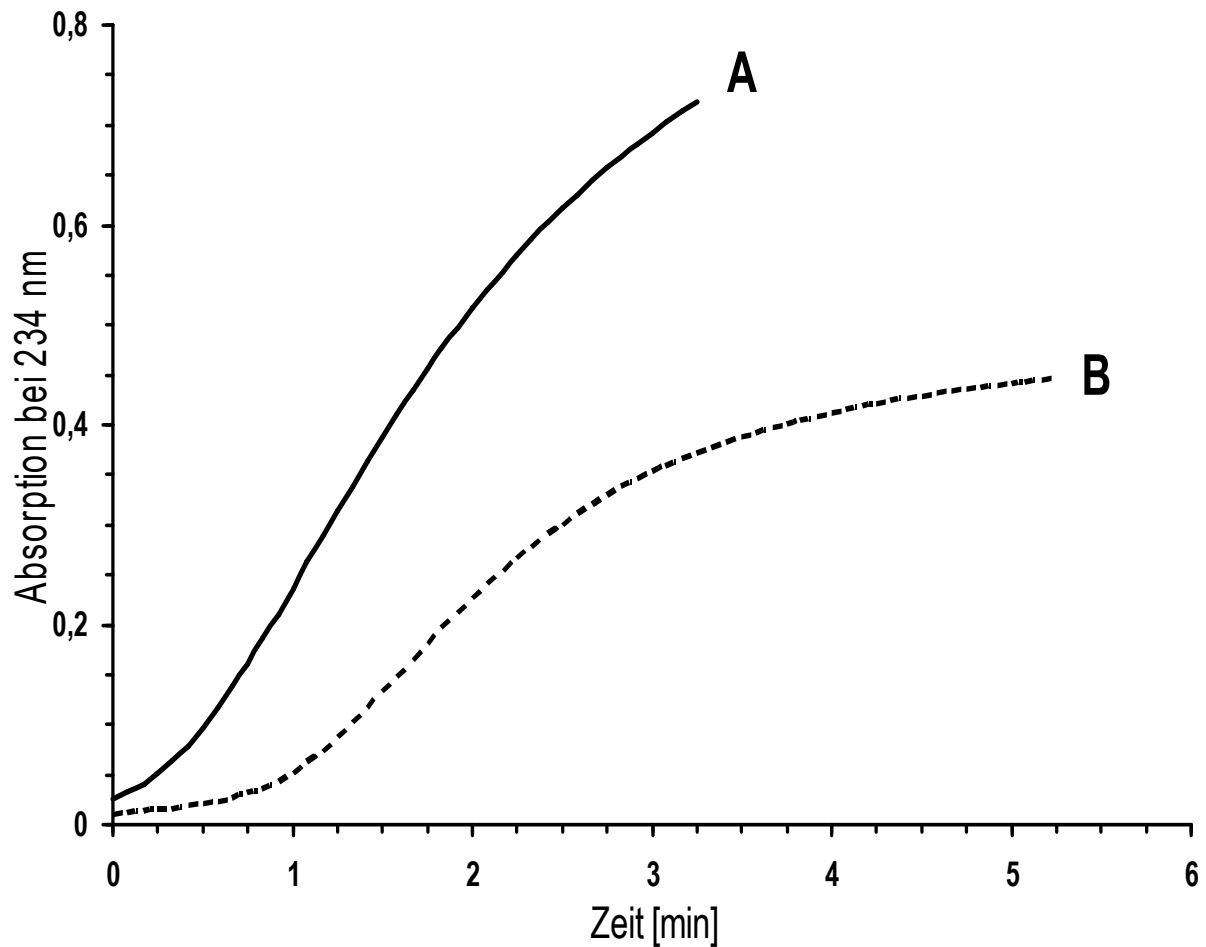


Abb. 3.7: Aktivität der 15-LOX-1 ohne (Kurve A) und mit 10 μM Quercetin (Kurve B) nach zweiminütiger Vorinkubation. Die Aktivität wurde photometrisch bei 234 nm über die Entstehung konjugierter Diene mit 240 μM Kaliumlinoleat als Substrat bei 20°C ermittelt.

Kurve A zeigt den typischen sigmoiden zeitlichen Verlauf einer Lipoxxygenasereaktion (Ludwig *et al.* 1987). Dieser lässt sich in drei Abschnitte gliedern:

1. Einer kurzen lag-Phase, die auf die notwendige Aktivierung des Enzyms durch Oxidation seines zweiwertigen zu dreiwertigem Eisen zurückzuführen ist.
2. Einer linearen Phase, in der die Reaktion ihre maximale Geschwindigkeit (V_{max}) erreicht.
3. Einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Selbstinaktivierung des Enzyms.

Dieser typische sigmoide Reaktionsverlauf wurde wie in Kurve B gezeigt durch 10 μM Quercetin in folgenden drei Elementen modifiziert:

1. Einer Verlängerung der lag-Phase

2. Einer Verringerung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (im weiteren Text als „Soforthemmung“ bezeichnet)
3. Eine verstärkte zeitabhängige Enzyminaktivierung

Die Verstärkung der Enzyminaktivierung könnte entweder auf einer Steigerung der dem Enzym innewohnenden Selbstinaktivierung beruhen, oder es handelt sich um eine davon unabhängige, flavonoid-vermittelte Form der Inaktivierung. Für die letzte Möglichkeit spricht, dass die zeitabhängige Inaktivierung in Gegenwart von Quercetin auch bei der Sojabohnen-Lipoxygenase zu beobachten war, die unter den angewendeten Reaktionsbedingungen keine nennenswerte Selbstinaktivierung in Abwesenheit von Quercetin zeigte (Abb. 3.8).

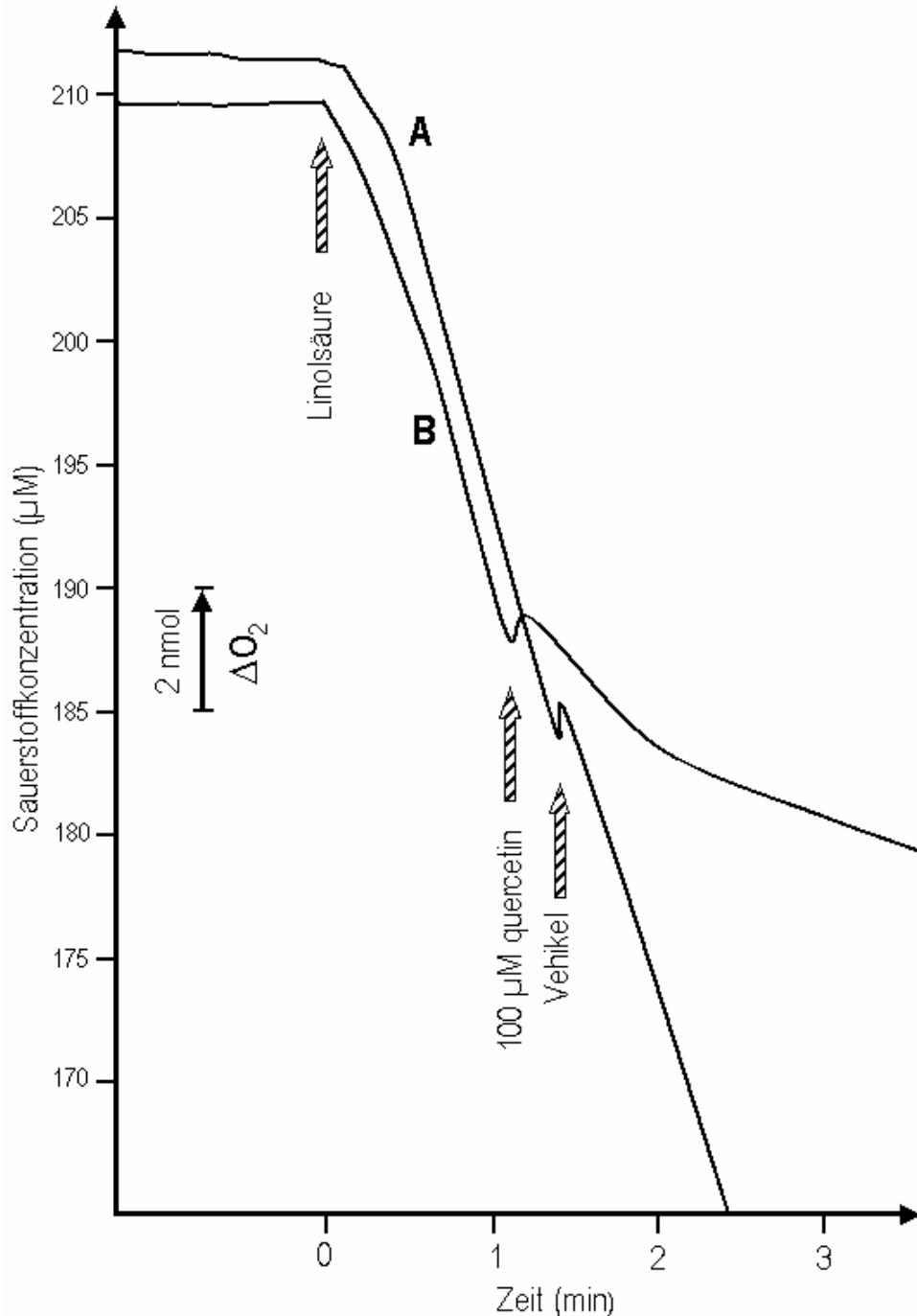


Abb. 3.8: Wirkung von 100 μM Quercetin auf die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Die Aktivität der Lipoxygenase wurde oxygrafisch gemessen. Die gestreiften Pfeile zeigen die Zugabe der jeweils nebenstehenden Substanz in die oxygrafische Messkammer mittels eines Teflon-Schlauches an. (A) zeigt die Kontrolle, (B) den Reaktionsverlauf bei Anwesenheit von 100 μM Quercetin.

Die zeitabhängige Inaktivierung der Sojabohnen-LOX fand nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Quercetin, Linoleat und Sauerstoff statt. Bei Inkubation der Lipoxygenasen mit Quercetin ohne Substrat wurde sie nicht beobachtet (Abb. 3.9). Daher könnte dieser Effekt auf einer kombinierten Wirkung von Quercetin und Intermediaten des katalytischen Zyklus auf das aktive Zentrum des Enzyms beruhen.

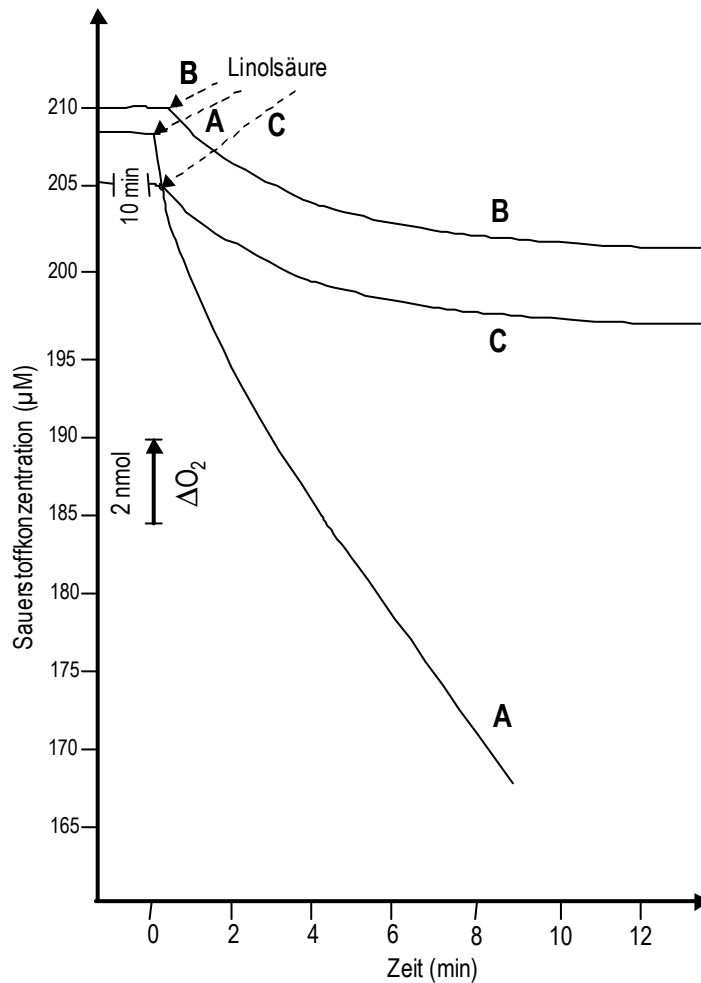


Abbildung 3.9: Die 15-LOX-1 wurde 1,5 min lang ohne (A) und mit 10 μM Quercetin (B) in der oxygrafischen Messkammer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kaliumlinoleat gestartet (siehe gestrichelte Pfeile). Kurve C zeigt einen Reaktionsansatz mit 10 μM Quercetin, bei dem die Vorinkubationszeit um 10 Minuten verlängert wurde (der Schreiber zwischenzeitlich für 10 Minuten abgestellt wurde). Der Verlauf der Kurven B und C ist identisch. Die Vorinkubationszeit der 15-LOX-1 mit Quercetin hatte daher keinen Einfluss auf die Hemmung.

Der Effekt hätte auch auf eine Bildung von Wasserstoffperoxid oder/und Superoxid bei Anwesenheit von Quercetin zurückzuführen sein können. Daher wurden zum photometrischen Ansatz der 15-LOX-1 Katalase (8,3 $\mu\text{kat/mL}$) und Superoxid-Dismutase (100 U/ml) zusammen mit 10 μM Quercetin gegeben. Dies hatte keinen Effekt auf die Hemmung der 15-LOX-1. Somit wurde eine Vermittlung der Hemmung durch Superoxid oder Wasserstoffperoxid weitestgehend ausgeschlossen.

Die Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin war sowohl nach einer zweiminütigen, als auch nach einer zehnminütigen Inkubationszeit hinsichtlich ihres Verlaufs und ihrer Stärke identisch. Die Dauer der Inkubationszeit hat somit keinen Einfluss auf die Hemmung. Die Interaktionen zwischen Quercetin und 15-LOX-1, die zur sofortigen Hemmung des Enzyms

führen, müssen daher bereits nach zwei Minuten abgeschlossen sein; sie treten vermutlich augenblicklich ein (Abb. 3.9).

Mithilfe von Lineweaver-Burk-Plots wurde der Hemmtyp des Quercetins an der 15-LOX-1 und der Sojabohnenlipoxygenase L-1 untersucht. Walther *et al.* (1999) hatten anhand von Lineweaver-Burk-Plots gezeigt, dass Ebselen, der bislang wirksamste bekannte 15-LOX-1-Hemmer, bei Vorinkubation mit dem Substrat die 15-LOX-1 kompetitiv hemmt, wohingegen diese Verbindung bei Vorinkubation mit dem Enzym ohne Substrat dieses irreversibel, nicht-kompetitiv hemmt. Die Autoren deuteten diese Befunde wie folgt: Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bindet Ebselen kovalent an Thiolgruppen des inaktiven Enzyms und verändert die Ligandensphäre seiner Eisenkomponente. Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert Ebselen mit Linolsäure um das aktive Zentrum des aktiven Enzyms. Demnach sind diese alternativen Hemmmechanismen auf die Änderung der Oxidationsstufe des Enzymeisens von der zweiwertigen zur dreiwertigen Form zurückzuführen. Dadurch scheint die Ligandensphäre des Enzymeisens ihre Bindungsfähigkeit gegenüber Ebselen zu verlieren. Ausgehend von den Untersuchungen von Walther *et al.* (1999) sollte geprüft werden, ob bei der Wechselwirkung von Quercetin mit der Lipoxygenase ähnliche Verhältnisse wie beim Ebselen vorliegen.

Die Versuche zum Hemmmechanismus des Quercetins wurden in bei 20 °C luftäquilibriertem Puffer durchgeführt. Dies garantierte einen Sauerstoffüberschuss gegenüber der Linolsäure (siehe Kapitel 2). Dadurch wurde die bimolekulare Dioxygenasereaktion zu einer Reaktion pseudoerster Ordnung, wodurch die Anwendung der auf der Michaelis-Menten-Gleichung beruhenden Auftragungen gerechtfertigt erschien.

Tab. 3.2: K_m - und V_{max} -Werte der Kinetik der 15-LOX-1 bei Reaktionsstart durch Zugabe von Enzym.

ANSATZ	K_M (μM)	V_{MAX} (E/MIN)
Kontrolle	16,3	0,61
10 μM Quercetin	51,1	0,71

Bei Enzymstart ging die Hemmung der 15-LOX-1 durch 10 μM Quercetin mit einer deutlichen Erhöhung des K_m -Wertes einher, während sich V_{max} nur geringfügig veränderte (Tab. 3.2). Die Hemmung der 15-LOX-1 bei Enzymstart entsprach daher eher dem kompetitiven Typ. Ab einer Linolsäurekonzentration von etwa 50 μM war die Hemmung stärker als es nach der Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten gewesen wäre (Abb. 3.10). Dies könnte auf eine Verstärkung der Substrathemmung durch Quercetin zurückzuführen sein.

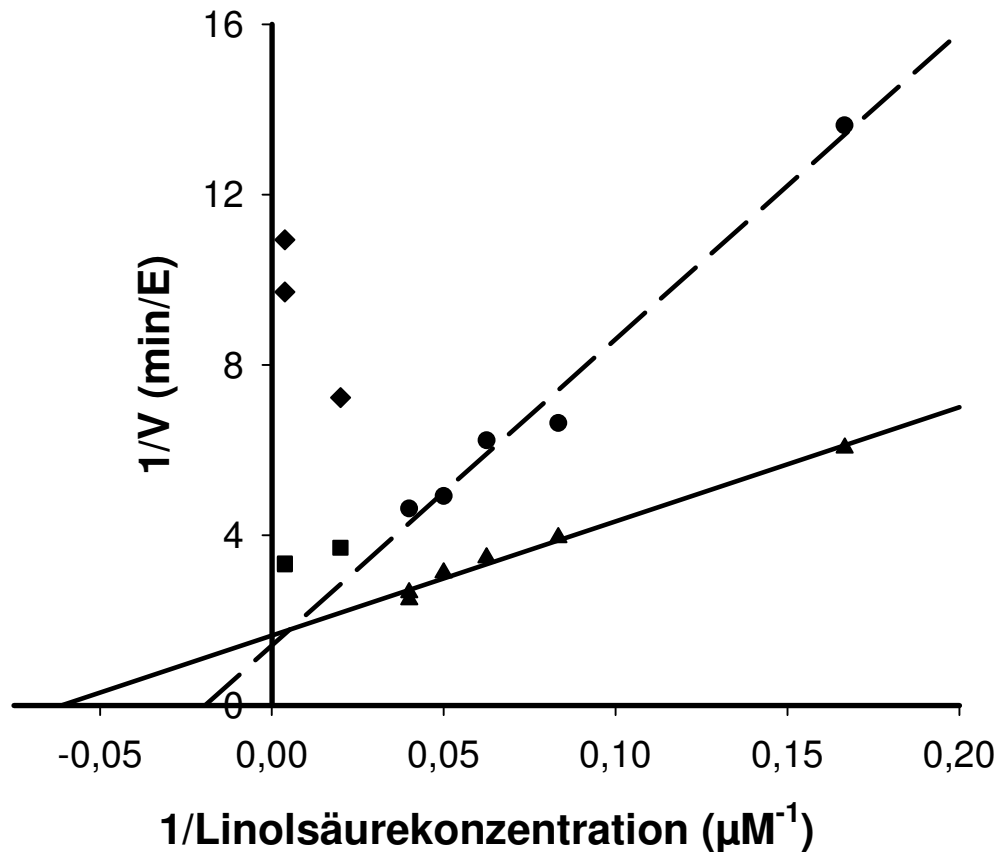


Abb. 3.10: Lineweaver-Burk-Plot der Aktivität der 15-LOX-1 mit und ohne 10 μM Quercetin. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Enzym gestartet und photometrisch aufgezeichnet. Die Dreiecke zeigen die Aktivität der Kontrolle. Die Quadrate zeigen Werte der Kontrolle, die für die Berechnung der Regressionsgeraden nicht berücksichtigt wurden, da bei diesen Konzentrationen Substrathemmung bemerkbar war. Die Punkte zeigen die Aktivität der 15-LOX-1 bei Anwesenheit von 10 μM Quercetin. Die Rauten zeigen Werte bei Anwesenheit von 10 μM Quercetin, die aufgrund deutlicher Substrathemmung bei Berechnung der Regressionsgeraden unberücksichtigt blieben. Es zeigen sich die Charakteristika einer kompetitiven Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin sowie eine Verstärkung der Substrathemmung der 15-LOX-1 bei Linolsäurekonzentrationen ab 50 μM .

Bei Start der Reaktion mit Linoleat waren die Plots für die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und die 15-LOX-1 mit Ausnahme der Kontrolle für die 15-LOX-1 irregulär. Die Irregularität zeigte sich im Lineweaver-Burk-Plot darin, dass die Geraden die Abszisse im positiven Bereich schnitten (Abb. 3.11 und Abb. 3.12).

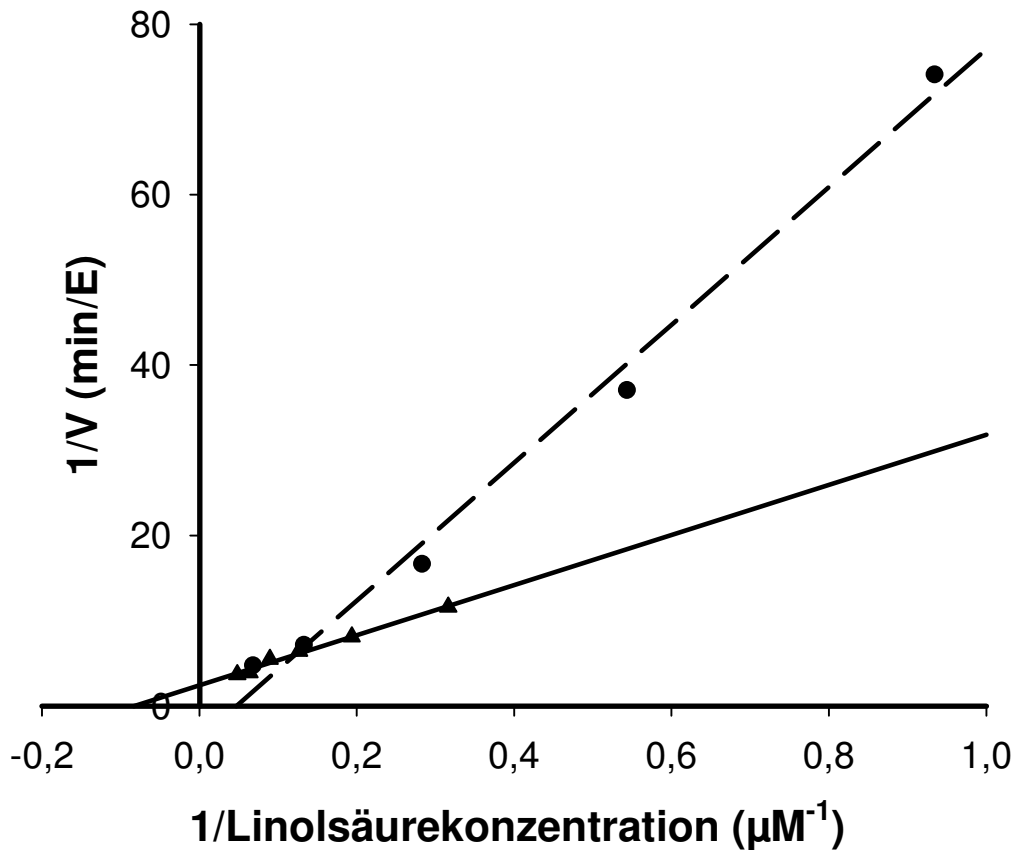


Abb. 3.11: Lineweaver-Burk-Plot der Aktivität der 15-LOX-1 bei Reaktionsstart durch Zugabe von Linolsäure. Die Dreiecke zeigen die Aktivität der Kontrolle, die Punkte die Aktivität bei Anwesenheit von 10 μM Quercetin. Bei Anwesenheit von 10 μM Quercetin schneidet die Gerade die Abszisse im positiven Bereich. Damit ist der Lineweaver-Burk-Plot irregulär.

Die Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch Quercetin bei Linolsäurestart konnte daher keinem der bekannten Hemmtypen zugeordnet werden. Für diese Irregularität könnte es mehrere Gründe geben, wie beispielsweise die Zunahme der Hemmung beider Enzyme durch Quercetin mit fortschreitender Reaktionszeit, die zuvor tatsächlich gezeigt wurde.

Bei den Versuchen mit der Sojabohnen-LOX enthielt die Linolsäurelösung 0,1 % Cholat, da die bei oxygraphischen Untersuchungen verwendete cholatfreie Substratlösung für photometrische Messungen nicht stabil genug war (Auftreten von Trübungen). Dies könnte an der Sojabohnen-LOX eine weitere Ursache der Irregularität gewesen sein, da Cholat die Sojabohnen-LOX hemmt. An der 15-LOX-1 könnte ein weiterer Grund die paradoxe Abnahme der Hemmung bei fallender Substratkonzentration gewesen sein (Tab. 3.4).

Tab. 3.3: K_m - und V_{max} -Werte der Kinetiken der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 mit und ohne 10 μ M Quercetin bei Linolsäure- oder Enzymstart ermittelt mittels Lineweaver-Burk-Plots.

	ANSATZ	K_M (μ M)	V_{MAX} (E/MIN)
I	Kontrolle	-36,5	-0,12
	10 μ M Quercetin	-34,4	-0,03
II	Kontrolle	6,8	0,31
	10 μ M Quercetin	-21,2	-0,26
III	Kontrolle	16,3*	0,61
	10 μ M Quercetin	51,1	0,71

*I, Sojabohnenlipoxygenase L-1 bei Linolsäurestart; II, 15-LOX-1 bei Linolsäurestart; III, 15-LOX-1 bei Enzymstart. *Ludwig et al. (1987) gaben den K_m -Wert der 15-LOX-1 mit Linoleat als Substrat mit $(8,8 \pm 0,2) \mu$ M an.*

Tab. 3.4: Abhängigkeit der Quercetinhemmung der 15-LOX-1 von der Substratkonzentration.

Quercetin (μ M)	Linolsäure (μ M)	Aktivität (μ kat) ²	Restaktivität (%)
0	13.4 ± 0.4 ¹	0.127 ± 0.010	100
10	11.7 ± 0.4 ¹	0.119 ± 0.014	93.7 ± 11.0
100	14.4 ± 0.8 ¹	0.021 ± 0.002	16.4 ± 1.4
0	139	0.229 ± 0.033	100
10	139	0.092 ± 0.007	40.2 ± 2.9
100	139	0.027 ± 0.001	11.6 ± 0.5

¹ verfügbare Konzentration enzymatisch durch die Menge der gebildeten konjugierten Diene bei Reaktionsende abgeschätzt mit der Angabe $\epsilon_{234\text{ nm}} = 25,000\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; ² geschätzt aus dem Progresskurvenverlauf nach Überwindung der lag-Phase. Arithmetischer Mittelwert $\pm$ SD nach drei Messungen. Die Mittelwerte unterschieden sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse signifikant mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,01$.

Trotz dieser Irregularitäten kann an beiden Enzymen ein kompetitiver Hemmtyp für Quercetin weitgehend ausgeschlossen werden. Denn die beiden Geraden der Aktivität der Sojabohnenlipoxygenase schnitten im Lineweaver-Burk-Plot die Abszisse zwar an der gleichen Stelle hatten aber unterschiedliche Steigungen, und an der 15-LOX-1 nahm die Hemmung durch Quer-

cetin mit fallender Linolsäurekonzentration ab, während sie bei einem kompetitiven Hemmtyp der sofort-einsetzenden Hemmung durch Quercetin hätte zunehmen müssen.

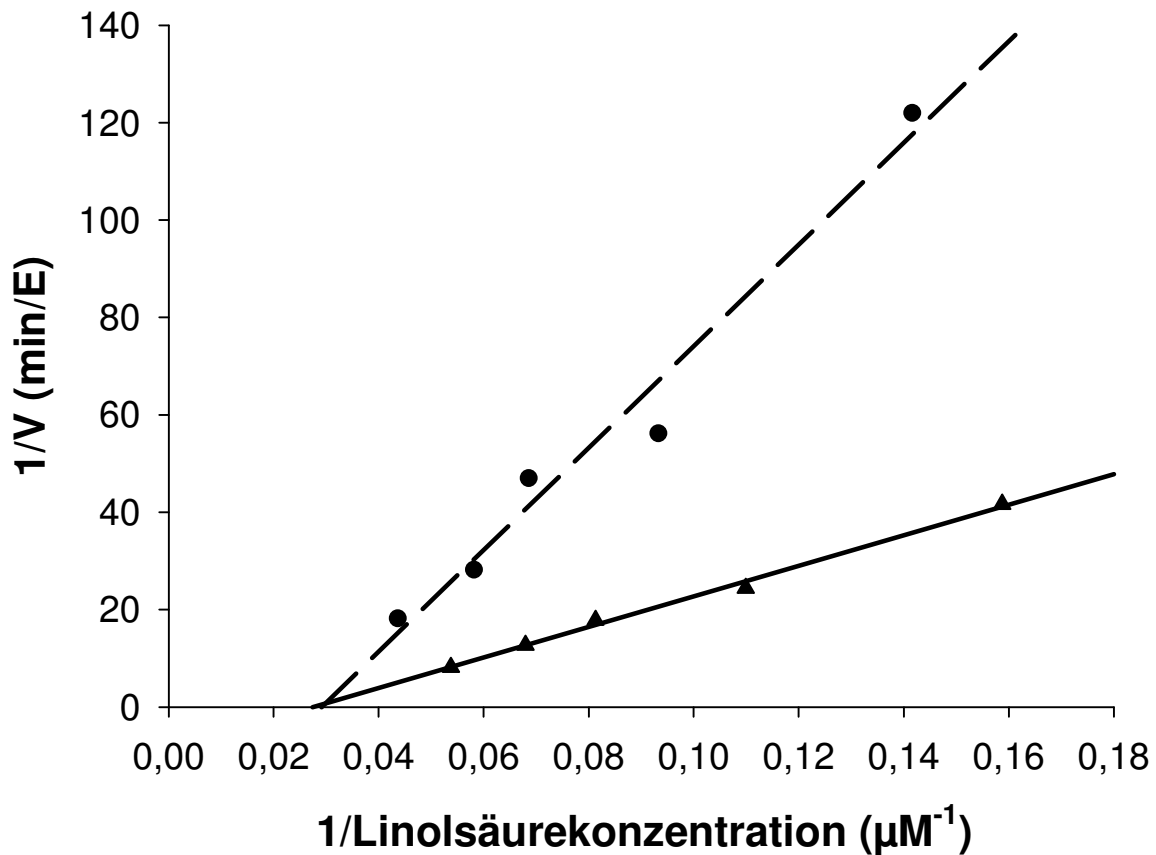


Abb. 3.12: Lineweaver-Burk-Plot der Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 bei Reaktionsstart durch Zugabe von Linolsäure. Die Dreiecke zeigen die Aktivität der Sojabohne-Lipoxygenase in der Kontrolle, die Kreise die Aktivität bei Anwesenheit von 10 μM Quercetin. Beide Geraden schneiden die Abszisse an derselben Stelle. Dies schließt einen kompetitiven Hemmtyp der Soforthemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch Quercetin aus.

Dieses paradoxe Verhalten der Hemmung durch Quercetin bei fallender Linolsäurekonzentration könnte die Erklärung für die tendenzielle Erniedrigung des scheinbaren K_m -Wertes bei Anwesenheit von Quercetin sein. So könnte es sich beispielsweise um einen kooperativen Effekt handeln, bei dem Linoleat bei hohen Konzentrationen durch Bindung außerhalb des aktiven Zentrums zu einer Konformationsänderung des Enzyms führt. Dadurch könnte sich der Affinität des Quercetins zum aktiven Zentrum erhöhen.

Hohe Linolsäurekonzentrationen könnten auch die Hemmung durch Verbesserung der Löslichkeit des Quercetins im System verstärken. Auch die Veränderung des Linolsäure/Cholat-Verhältnisses bei Variation der Linolsäurekonzentration könnte über die Beeinflussung der Mizellenbildung Ursache der stärkeren Hemmung bei höherer Linolsäurekonzentration sein.

Die paradoxe Zunahme der Hemmung mit steigender Linolsäurekonzentration kann nicht durch das gleichzeitig steigende Angebot an HpODE verursacht worden sein, denn die Hemmung durch Quercetin war unabhängig davon, ob das Enzym mit ihm vorinkubiert oder es erst während der Lipoxxygenasereaktion zugegeben worden war. Lipoxxygenasen synthetisieren HpODE. Würde Quercetin HpODE zur Hemmung benötigen, hätte die Hemmung bei Zugabe in den Lauf stärker sein müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die Charakteristika der Hemmung durch Quercetin bei Linolsäure- und Enzymstart zeigen gewisse Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zur Hemmung der 15-LOX-1 durch Ebselen (Walther *et al.*, 1999): Sowohl Quercetin als auch Ebselen hemmten bei Enzymstart die 15-LOX-1 kompetitiv. Bei Linolsäurestart hemmte Ebselen die 15-LOX-1 nicht-kompetitiv. Für die Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin bei Linolsäurestart konnte der kompetitive Typ zumindest ausgeschlossen werden. Der Hemmtyp hier ist wahrscheinlich nicht-kompetitiver Natur. Ein Unterschied zwischen der Hemmung der 15-LOX-1 durch Ebselen und der durch Quercetin bei Linolsäurestart war, dass Ebselen das Enzym bereits vor der Linolsäurezugabe inaktivierte, während Quercetin erst nach Zugabe der Linolsäure eine Inaktivierung des Enzyms bewirkte. Dies weist darauf hin, dass im Hemmmechanismus des Quercetins im Gegensatz zu dem des Ebselens die Linolsäure als aerobes Substrat eine Voraussetzung sein muss.

3.6 Modulation der Lipoxxygenasen-Hemmung durch GPx

Für die Aktivierung der Lipoxxygenase sind niedrige Konzentrationen an Hydroperoxiden nötig. Die Konzentration der Hydroperoxide wird in der Zelle unter anderem durch Glutathion-Peroxidasen reguliert. Diese können den Hydroperoxidtonus und damit die Lipoxxygenaseaktivität in biologischen Systemen senken (Weitzel *et al.*, 1993; Schewe, 2002). Daher wurde der Einfluss von Glutathion (GSH) und GSH plus Glutathionperoxidase (GPx-1) auf die Aktivität der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxxygenase L-1 sowie ihrer Hemmung durch NDGA, Epicatechin, der Tetramer-Fraktion der Procyanidine und Quercetin untersucht. Die Aktivität beider Enzyme wurde durch den Zusatz von GPx zum System dosisabhängig bis zur Vollständigkeit gehemmt. Dabei erwies sich die 15-LOX-1 als deutlich empfindlicher gegenüber der Wirkung der GPx als die Sojabohnen-Lipoxxygenase L-1.

Bei diesen Versuchen wurde die Reaktion entweder mit Linolsäure gestartet, oder mit Lipoxxygenase und dann die Linolsäure entsprechend mit der GPx vorinkubiert. Der IC_{50} für die Hemmung Sojabohnen-Lipoxxygenase L-1 durch GPx sank bei Vorinkubation mit Linolsäure von 0,46 nkat auf 0,23 nkat (Abb. 3.13). Dieser verhältnismäßig geringfügige Effekt könnte auf die vorherige Reduktion der durch Autoxidation entstandenen Hydroperoxyfettsäuren in der Linoleatlösung zurückzuführen sein.

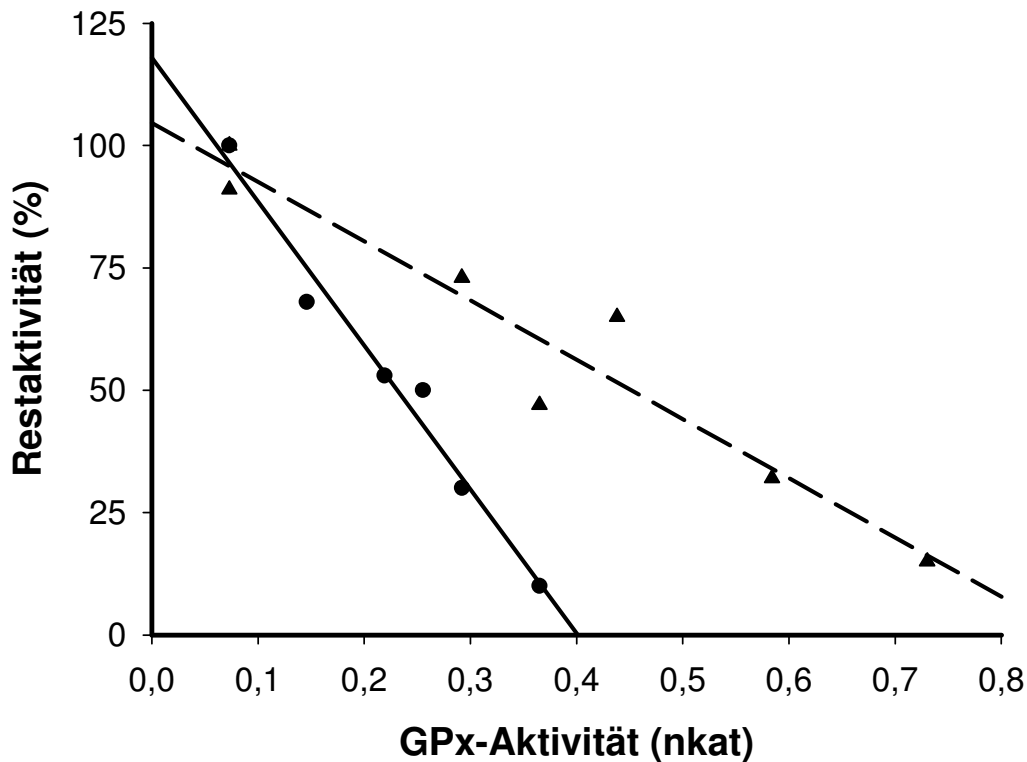


Abb. 3.13: Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch GPx verschiedener Aktivität bei Reaktionsstart mit Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (Punkte) und Linolsäure (Dreiecke). Bei Enzymstart betrug der Korrelationskoeffizient r 0,988 und das Bestimmtheitsmaß R 0,975. Bei Linolsäurestart betrug der Korrelationskoeffizient r 0,963 und das Bestimmtheitsmaß R 0,927.

Die Hemmung der Lipoxygenase über GPx-Kontrolle des Hydroperoxidtonus wurde durch Zugabe von 10 μM Quercetin aufgehoben (Tab. 3.6). Eine direkte Hemmung der GPx durch Quercetins als Erklärung dieses Phänomens konnte jedoch ausgeschlossen werden (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Wirkung von Quercetin auf die Aktivität der GPx

Quercetinkonzentration (μM)	GPx-Aktivität ($\mu\text{kat/L}$)
0	0,435
5	0,554
10	0,549
33	0,435
100	0,565

Die Aktivitätsbestimmung der GPx erfolgte photometrisch wie in Kapitel 2 beschrieben. Korrelationskoeffizient r 0,769, Bestimmtheitsmaß R 0,592.

Die Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L1 durch Quercetin blieb sowohl bei alleiniger Zugabe von GSH, als auch im GSH-GPx-System unbeeinflusst. Dagegen wurde die Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin bei Anwesenheit von GSH fast vollständig aufgehoben

(Tab. 3.6). Dies könnte als Hinweis auf die Beteiligung oxidativer Prozesse oder intermediärer Oxidationsprodukte an der Hemmung der 15-LOX-1 gewertet werden.

Tab. 3.6: Wirkung von Glutathion (GSH) und der Glutathionperoxidase (GPx-1) auf die 15-LOX-1-Aktivität und ihrer Hemmung durch Quercetin

			15-Lipoxygenase-1		Sojabohnen-Lipoxygenase L-1	
GSH (1 mM)	GPx-1 ¹	Quercetin (10 µM)	Aktivität (µkat)	Restaktivität (%)	Aktivität (µkat)	Restaktivität (%)
–	–	–	0.213 ± 0.008		0.321 ± 0.006	
+	–	–	0.155 ± 0.005		0.306 ± 0.006	
+	+	–	0.094 ± 0.006		0.168 ± 0.006	
–	–	+	0.119 ± 0.010	56	0.144 ± 0.010	45
+	–	+	0.144 ± 0.006	93	0.125 ± 0.007	41
+	+	+	0.140 ± 0.007	149	0.075 ± 0.008	45

¹ 0.425 µkat/L im Falle der 15-LOX-1, 5.67 µkat/L im Falle der Sojabohnen-Lipoxygenase; Diese Konzentrationen wurden so gewählt, dass in etwa 50 % der Aktivität ohne GPx-1 und GSH erreicht wurde. Die Mittelwerte ± SD wurden aus mindestens drei Einzelwerten errechnet. Sie unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

Der IC₅₀ des NDGA an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 betrug im GPx-/GSH-System 0,125 µM. Damit war er deutlich niedriger als der IC₅₀ von 3 µM ohne GPx-/GSH-Anwesenheit.

Die Ergebnisse im GPx-/GSH-System weisen daraufhin, dass Quercetin und NDGA die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 über unterschiedliche Mechanismen hemmen, obwohl beide Substanzen über Catecholgruppierungen verfügen.

3.7 Wirkung von Polyphenolen auf Lipoxygenasen nach Komplexierung mit Fe³⁺

Lipoxygenasen verfügen in ihrem aktiven Zentrum über komplexiertes Eisen (Brash, 1999). Dieses ist für ihren katalytischen Zyklus essenziell und stellt somit einen potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt für eisenkomplexierende Verbindungen dar. Ein derartiger Hemmmechanismus wurde bereits für 4-Nitrocatechol und NDGA an der Sojabohnen-Lipoxygenase L1 aufgezeigt (Spaapen *et al.*, 1980). Die beiden Verbindungen verloren jedoch ihre inhibitorische Wirkung bei Komplexierung ihrer Catecholgruppierungen mit äquimolaren Mengen dreiwertiger Eisenionen. Auch für Quercetin ist eine Komplexbildung mit Eisenionen bekannt (Morel *et al.*, 1997; Moridani *et al.*, 2003). Daher wurde die Wirksamkeit des Quercetins nach Komplexierung mit Fe³⁺ untersucht. Dabei wurde weder an der 15-LOX-1, noch an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 eine Verringerung der Hemmung, stattdessen sogar eine Verstärkung derselben beobachtet (Tab. 3.7 und 3.8). Deshalb scheinen Flavonoide über einen anderen Mechanismus als 4-Nitrocatechol und NDGA zu wirken, obwohl ihre wirksamsten Vertreter ebenfalls über Catecholgruppierungen verfügen.

Tab. 3.7: Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin und 4-Nitrocatechol vor und nach Komplexierung mit Fe³⁺

Ansatz	Aktivität (μkat)	Restaktivität (%)
Kontrolle	0,162 ± 0,006	100
10 μM Fe ³⁺	0,077 ± 0,008	47,4
30 μM Fe ³⁺	0,071 ± 0,002	43,9
10 μM Quercetin	0,103 ± 0,005	63,6
10 μM Quercetin + 30 μM Fe ³⁺	0,008 ± 0,001	10,9
10 μM 4-Nitrocatechol	0,006 ± 0,000	3,5
10 μM 4-Nitrocatechol + 10 μM Fe ³⁺	0,020 ± 0,001	26,3

Versuche wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Alle Mittelwerte ± SD errechneten sich aus mindestens drei Einzelwerten und unterschieden sich signifikant ($p < 0,01$).

Die Wirkungsverstärkung des Quercetins durch Eisenkomplexierung könnte mit einer Polymerisation desselben, gestartet durch eine eisenkatalysierte Autoxidation, erklärt werden. Eine Wirkungsverstärkung einiger Polyphenole durch oxidative Polymerisation gegenüber Lipoxygenasen wurde bereits beschrieben (Schewe *et al.*, 1991) und könnte auch die stärkere Wirksamkeit der höheren Procyanidin-Oligomer-Fractionen erklären.

Tab. 3.8: Wirkung von Fe^{3+} auf die Hemmung der Sojabohnenlipoxygenase L-1 durch 4-Nitrocatechol und Quercetin

Experiment	Probe	Aktivität	
		μkat	Restaktivität (%)
I	Ohne Zusatz	$0,232 \pm 0,013$	
	$100 \mu\text{M Fe}^{3+}$	$0,178 \pm 0,014$	
	$100 \mu\text{M 4-Nitrocatechol}$	$0,035 \pm 0,004$	15,1
	$100 \mu\text{M 4-Nitrocatechol} + 100 \mu\text{M Fe}^{3+}$	$0,125 \pm 0,003$	70,3
II	Ohne Zusatz	$0,108 \pm 0,008$	
	$30 \mu\text{M Fe}^{3+}$	$0,144 \pm 0,011$	
	$10 \mu\text{M Quercetin}$	$0,046 \pm 0,001$	42,4
	$10 \mu\text{M Quercetin} + 30 \mu\text{M Fe}^{3+}$	$0,039 \pm 0,010$	27,3

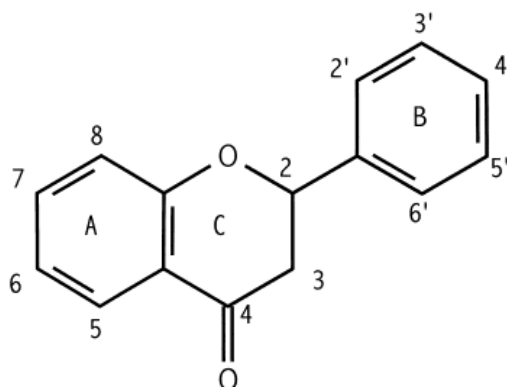
Versuche wie in Kapitel 2.5 beschrieben durchgeführt. Alle Mittelwerte $\pm$ SD errechneten sich aus mindestens drei Einzelwerten. Die Mittelwerte $\pm$ SD in I und II unterschieden sich jeweils signifikant ($p < 0,01$).

Die Aktivität der 15-LOX-1 wurde bereits durch Fe^{3+} allein gehemmt. Diese Hemmung war ab 10^{-4} M unabhängig von der Konzentration des Fe^{3+} und betrug ca. 50 %. Erklärung hierfür könnte eine Komplexierung des Fe^{3+} durch das 10^{-4} M DTPA im Messmedium sein. Durch die Zugabe äquimolarer Mengen an Fe^{3+} könnte das DTPA durch die Komplexierung seine Fähigkeit zur Maskierung von Spuren von Übergangsmetall (Cu, Mn unter anderem) verloren haben. Diese Spuren von Übergangsmetallen könnten bei Vorhandensein von Luftsauerstoff zur Inaktivierung der hochverdünnten Enzymlösung geführt haben.

In Versuchen zur Komplexierung von (-)-Epicatechin und Procyanidinen mit Fe^{3+} blieb selbst bei zehnfachem Überschuss die Hemmung der Lipoxygenasen durch diese Substanzen unbeeinflusst.

3.8 Struktur-Wirkungsbeziehung der Flavonoide

Zur Ermittlung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden über zwanzig ausgewählte Flavonoide auf ihre Wirksamkeit gegenüber der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und der 15-LOX-1 getestet. Die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 erwies sich dabei als generell unempfindlicher gegenüber Flavonoiden als die 15-LOX-1. Bei ihr ergaben sich höhere IC₅₀-Werte, und einige Flavonoide waren sogar völlig wirkungslos. An der 15-LOX-1 hingegen waren alle Flavonoide wirksam (Tab. 3.9a und b).



Flavonoid	Substituenten								Besonderheiten		
	3	5	6	7	2'	3'	4'	5'	Anzahl der OH-Gruppen	Catechol	2,3-C=C
Flavon	H	H	H	H	H	H	H	H	0	–	+
Chrysin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	2	–	+
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	3	–	+
Daidzein	R	H	H	OH	H	H	OH	H	2	–	+
Genistein	R	OH	H	OH	H	H	OH	H	3	–	+
Baicalein	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	3	+	+
Luteolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	4	+	+
Fisetin	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	4	+	+
Quercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	5	+	+
Myricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH	6	+	+
Morin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H	5	–	+

Kaempherol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H	4	–	+
Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	3	–	+
Rutin	ORu	OH	H	OH	H	OH	OH	H	5	+	+
Taxifolin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	5	+	–
Naringenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	3	–	–
Hesperetin	H	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	3	–	–
Epicatechin**	-OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	5	+	–

„R“, Aryl-Gruppe (B) in 3-Position (Isoflavon); Ru, Rutinose; ** CH₂ –Gruppe in 4-Position (Flavanol)

Substanz	15-LOX-1		Sojabohnen-Lipoxygenase L-1	
	IC ₅₀ (µM)	95%-Konfidenzintervall	IC ₅₀ (µM)	95%-Konfidenzintervall
Flavon	230	153 – 345	700	–
Chrysin	1000	–	> 1000	–
Apigenin	355	213 – 590	500	–
Daidzein	464	363 – 594	430	–
Genistein	11,2	3,5 – 35	1000	–
Baicalein	1,6	0,9 – 2,8	35	30 – 41
Luteolin	0,5	0,2 – 1,3	2,1	1,0 – 4,5
Fisetin	1,9	0,9 – 3,9	1,9	0,8 – 4,5
Quercetin	3,8	2,9 – 5,0	4,1	2,5 – 6,8
Myricetin	14	8,1 – 24	50	42 – 58
Morin	5,3	4,0 – 7,0	15	11 – 20
Kaempherol	18	8,9 – 36	29	22 – 39
Galangin	40	29 – 55	200	–
Rutin	1000	–	Unwirksam	–
Taxifolin	24	13 – 44	1000	–
Naringenin	242	167 – 350	Unwirksam	–
Hesperetin	114	44 – 294	Unwirksam	–
Epicatechin	59	52 – 67	Unwirksam	–

Tabelle 3.9a und b: Struktur der Flavonoide und ihre IC₅₀-Werte an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und der 15-LOX-1. Die Werte stammen aus Dosis-Wirkungskurven, die durch „Graphpad Prism 4.0“ errechnet wurden.

Die an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wirkungslosen Flavonoide hatten alle keine 2,3-Doppelbindung. Es handelte sich somit um Flavانونe oder Flavانونole. Mit Epigallocatechingallat und Taxifolin und ihrem IC₅₀ von 1000 µM waren lediglich zwei Ver-

bindungen ohne 2,3-Doppelbindung an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 zumindest schwach wirksam. Dies deutet auf eine wesentlich größere Bedeutung der 2,3-Doppelbindung für die Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 als für die Hemmung der 15-LOX-1. Nichtsdestotrotz verstärkte eine 2,3-Doppelbindung auch die Hemmung der 15-LOX-1 deutlich. So war beispielsweise der IC_{50} des Taxifolins an der 15-LOX-1 etwa sechsmal höher als der des Quercetins ($p < 0,05$). Der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden Flavonoiden ist das Vorhandensein der 2,3-Doppelbindung im Quercetin. Das Fehlen der 2,3-Doppelbindung dürfte daher auch die wesentliche Ursache für die im allgemeinen deutlich geringere Wirksamkeit von Flavanonen (Naringenin, Hesperetin), Flavanolen (Epicatechin) und 2,3-Dihydroflavanolen (Taxifolin) im Vergleich zu Flavonolen (Fisetin, Quercetin, Morin, Kaempferol, Myricetin) und Flavonen (Luteolin, Baicalein) sein.

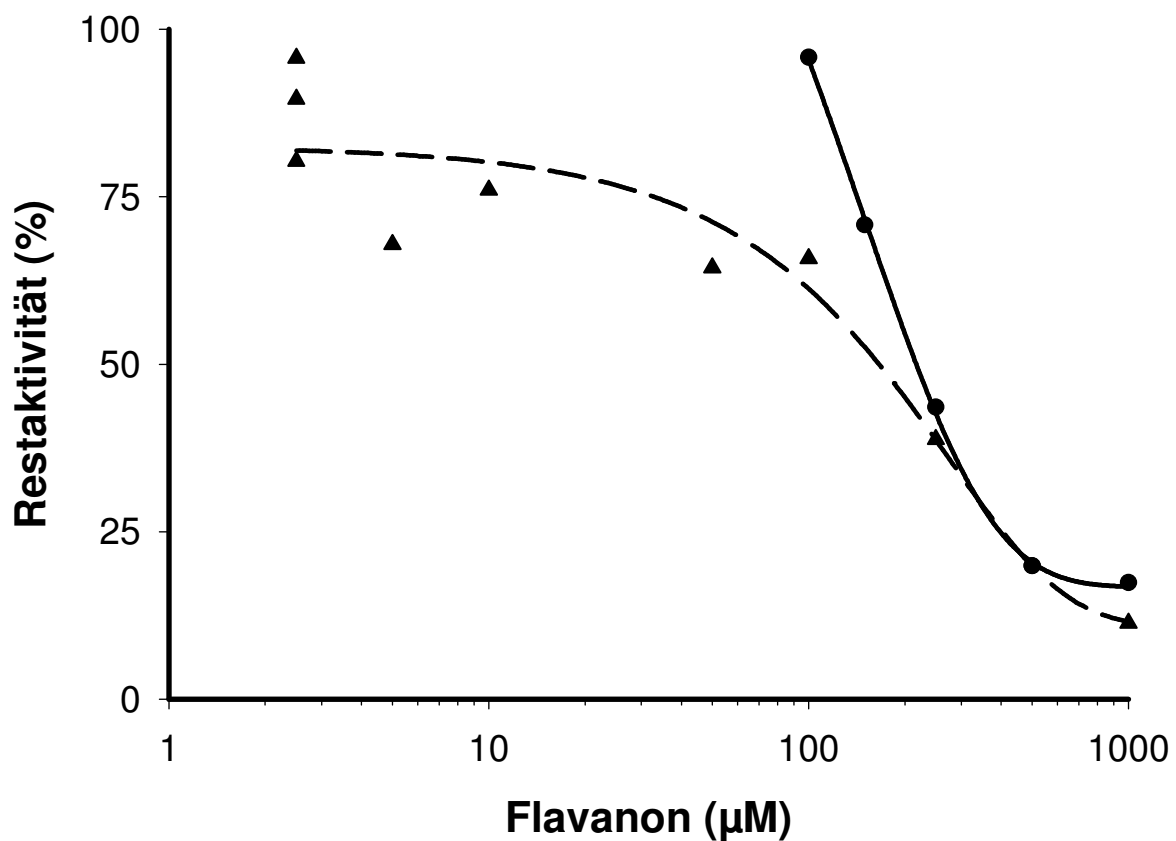


Abb. 3.15: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung der Flavanone Naringenin (Punkte, durchgezogene Linie) und Hesperetin (Dreiecke, gestrichelte Linie) auf die Aktivität der 15-LOX-1.

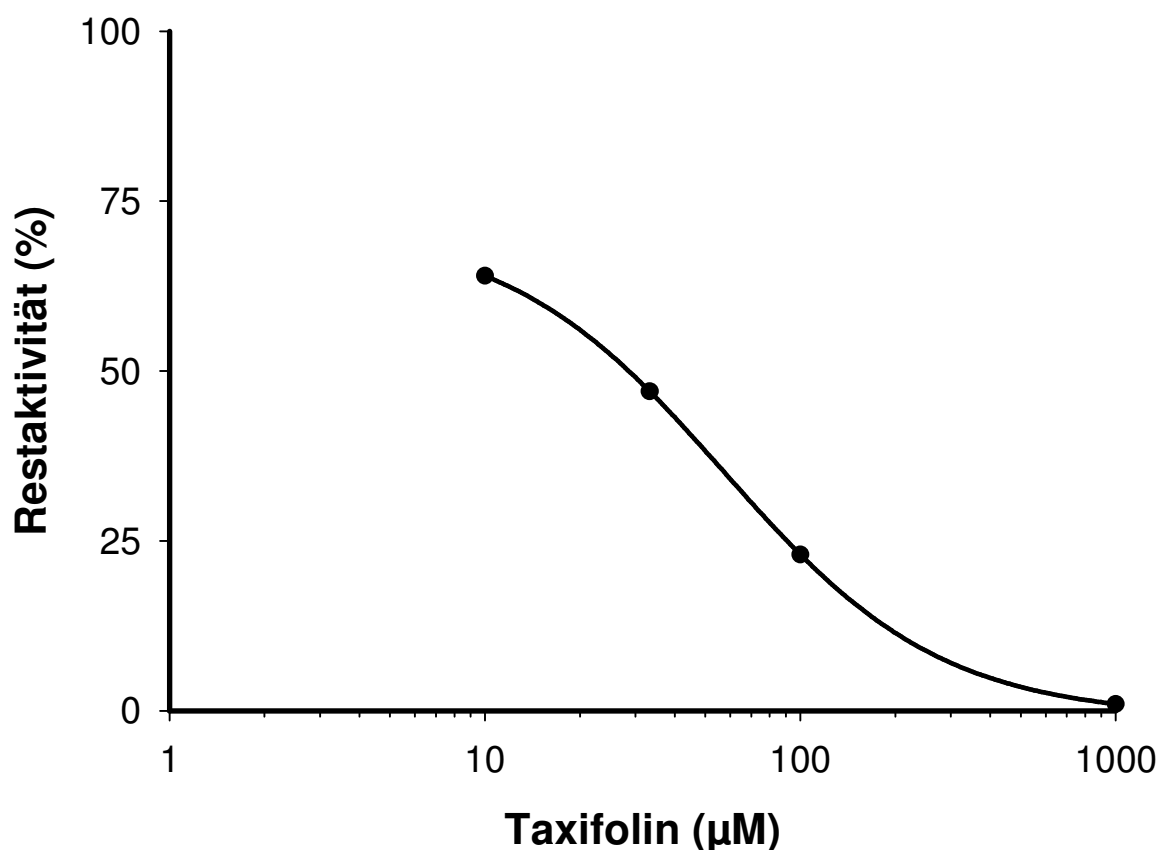


Abb. 3.16: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Taxifolin auf die Aktivität der 15-LOX-1.

Flavonoide mit 2,3-Doppelbindung haben ein vollkommen durchkonjugiertes System aus allen drei Ringen des Moleküls. Dieses System müsste durch seine Mesomeriefähigkeit einen stabilisierenden Effekt auf Radikale haben, die bei der Hemmung der Lipoxygenasen intermediär entstehen könnten. Des Weiteren erhält das Molekül durch die 2,3-Doppelbindung sterisch eine weitgehend planare Anordnung. Dies könnte eine Interkalation mit aromatischen oder heteroaromatischen Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Enzyms erleichtern.

Die höhere Wirksamkeit des Taxifolins im Vergleich zum Epicatechin ($p < 0,0001$) deutet auf einen Beitrag der 4-Ketogruppe zur Verstärkung der Hemmung hin. Ihr Vorhandensein verstärkte die Hemmung jedoch nur um den Faktor 2. Die zusätzliche 2,3-Doppelbindung des Quercetins im Vergleich zum Taxifolin führte jedoch zu einer Wirkungsverstärkung um den Faktor 6, sodass die 2,3-Doppelbindung das wichtigere Strukturelement für die Lipoxygenasehemmung zu sein scheint.

Sowohl die 15-LOX-1, als auch die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurden durch unsubstituiertes Flavon gehemmt. Daher sind Hydroxylgruppen keine Voraussetzung für ihre Hemmung. Allerdings konnte die Wirksamkeit durch Hydroxylgruppen in bestimmten Positionen am A-Ring oder B-Ring sowohl erhöht, als auch abgeschwächt werden. So war beispielsweise

Baicalein mit seiner Pyrogallolgruppierung am A-Ring stärker wirksam als Flavon ($p < 0,0001$), wohingegen Chrysin mit seinen zwei meta-ständigen Hydroxylgruppen am A-Ring schwächer wirksam war. Zur Verstärkung der Lipoxygenasenhemmung durch Hydroxylgruppen am A-Ring müssen diese daher scheinbar zueinander ortho-ständig sein.

Die Hemmung konnte auch durch Hydroxylgruppen am B-Ring verstärkt werden. So waren beispielsweise bereits Kaempferol und Apigenin mit jeweils einer einzelnen Hydroxylgruppe am B-Ring stärker wirksam als Galangin ($p < 0,05$) bzw. Chrysin, den vergleichbaren Flavonoiden mit unsubstituiertem B-Ring. Die Hemmung war allerdings noch stärker, wenn zwei Hydroxylgruppen am B-Ring vorhanden waren, wie im Morin mit zwei meta-ständigen Hydroxylgruppen oder im Quercetin mit zwei ortho-ständigen Hydroxylgruppen. Beide Substanzen waren wirksamer als Kaempferol ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,0001$). Dabei war der IC_{50} des Quercetins etwas niedriger als der des Morins ($3,8 \mu M$ vs. $5,3 \mu M$). Jedoch konnte für diesen Unterschied keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p > 0,05$), sodass sich in bezug auf die Flavonole nicht entscheiden lässt, ob Verbindungen mit Catecholstruktur am B-Ring wirksamer sind als solche mit Resorcinstruktur.

Durch eine Pyrogallolstruktur im B-Ring wurde die Hemmung wiederum abgeschwächt. Daher war Myricetin schwächer wirksam als Quercetin ($p < 0,05$). Grund hierfür könnten die zunehmenden prooxidativen Eigenschaften des Flavonoids durch die Pyrogallolstruktur im B-Ring sein (Rice-Evans *et al.*, 1996). Diese könnten beispielsweise zu einer raschen Autoxidation des Myricetins oder einer beschleunigten Aktivierung der Lipoxygenasen geführt haben.

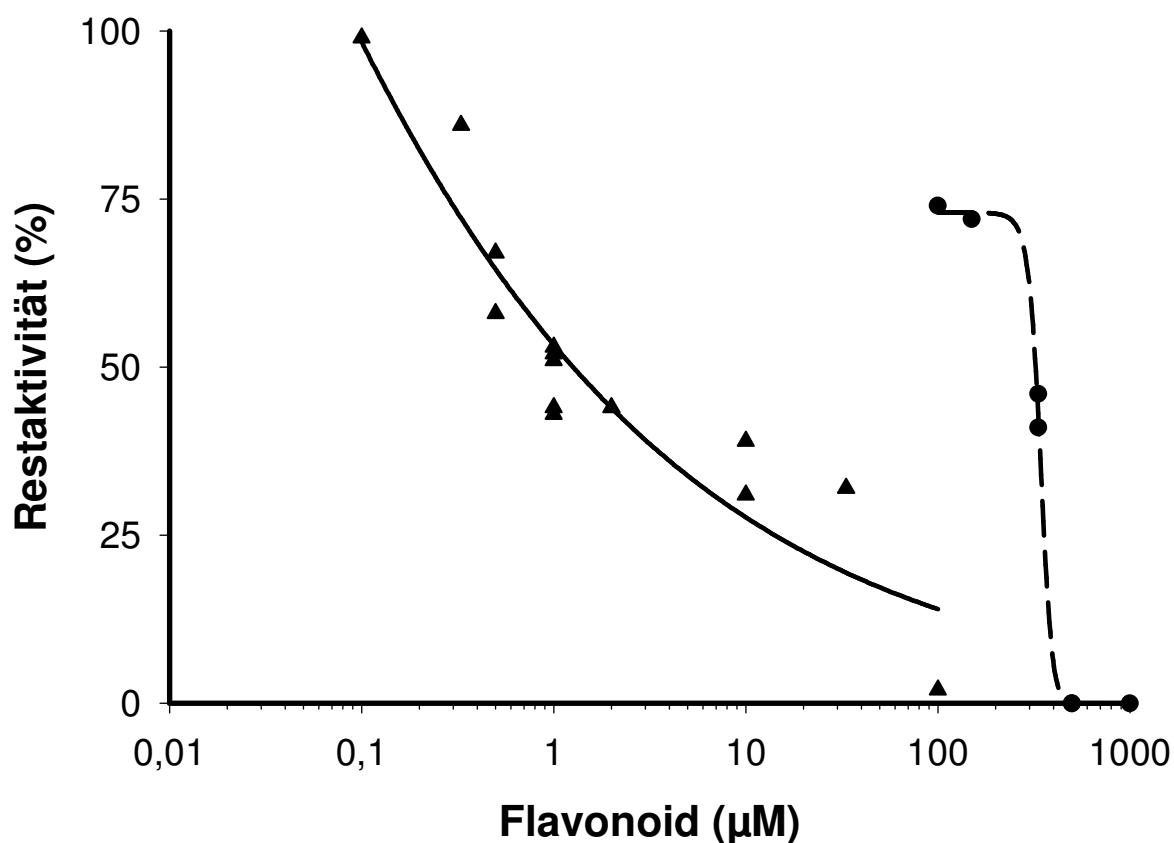


Abb. 3.17: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Baicalein (Dreiecke, durchgezogene Linie) und Flavon (Punkte, gestrichelte Linie) auf die Aktivität der 15-LOX-1.

Das Flavon Luteolin und das Flavonol Quercetin unterscheiden sich strukturell nur durch die Hydroxylgruppe in C₃-Position. Luteolin ist signifikant wirksamer als Quercetin ($p < 0,0001$). Folglich scheint die Hydroxylgruppe in C₃-Position die Hemmung zu behindern. Das Fehlen der Hydroxylgruppe in C₃-Position geht mit einem Torsionswinkel von 16° zwischen dem B-Ring und dem AC-Ringsystem einher (van Acker *et al.*, 1997). Daher hat Luteolin im Gegensatz zum fast völlig planaren Quercetin eine leicht vertwistete räumliche Struktur, die gemeinsam mit der Catecholgruppe des B-Ringes Grund für die hohe Wirksamkeit des Luteolins sein könnte. Der Unterschied in der räumlichen Struktur zwischen Quercetin und Luteolin könnte auch Ursache des unterschiedlichen Verlaufs der Dosis-Wirkungskurven beider Substanzen sein, der auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen hindeuten könnte.

Allerdings deutet die höhere Wirksamkeit von Galangin im Vergleich zum Chrysin darauf hin, dass die Hydroxylgruppe in C₃-Position bei Fehlen einer Catecholgruppierung im A- oder B-Ring doch verstärkend wirkt. Insgesamt bedeutet dies, dass die Grundstruktur der Flavone die optimale Struktur zur Hemmung der 15-LOX-1 ist, sofern dieses über eine Catecholgruppierung verfügt wie etwa im Luteolin oder Baicalein. Falls das Flavonoid hingegen

über keine Catecholgruppierung verfügt, so scheint die Grundstruktur der Flavonole günstiger für die 15-LOX-1-Hemmung zu sein.

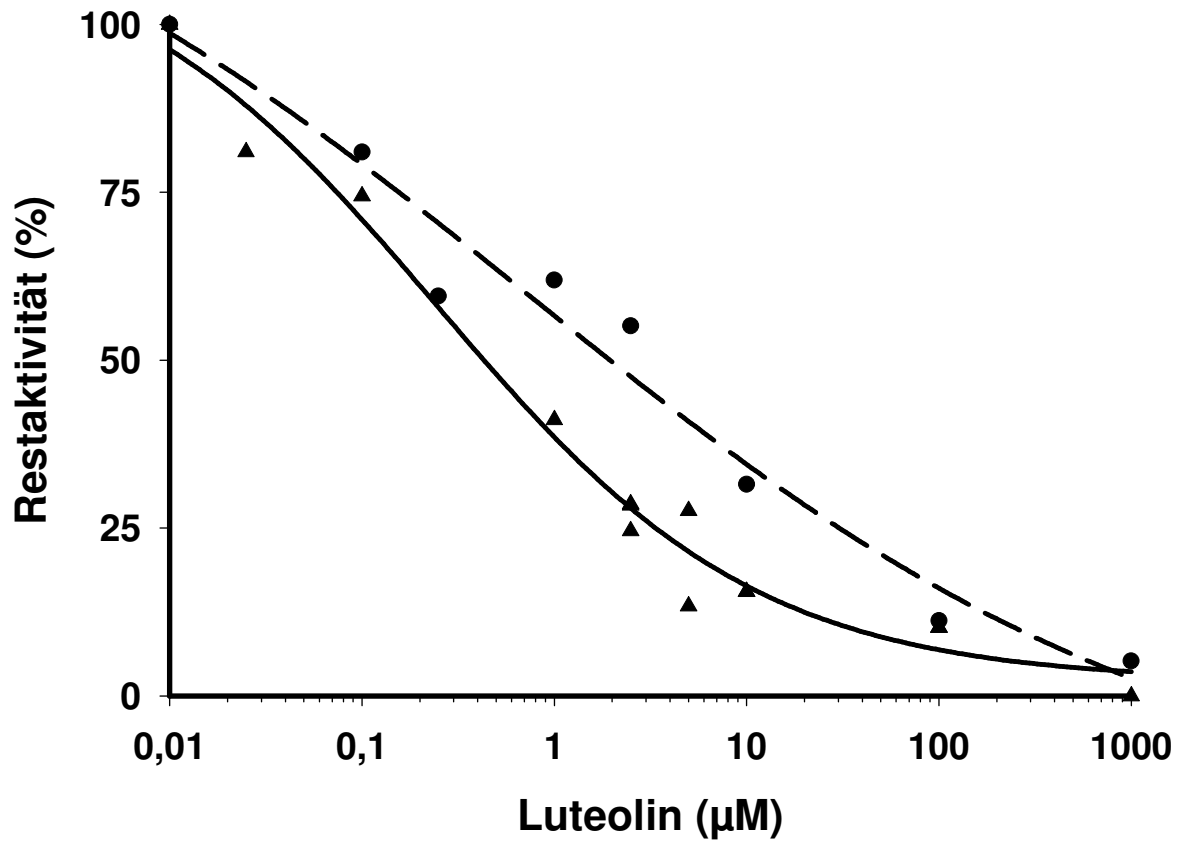


Abb. 3.18: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Luteolin auf die Aktivität der 15-LOX-1 (Dreiecke, durchgezogene Linie) und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (Punkte, gestrichelte Linie).

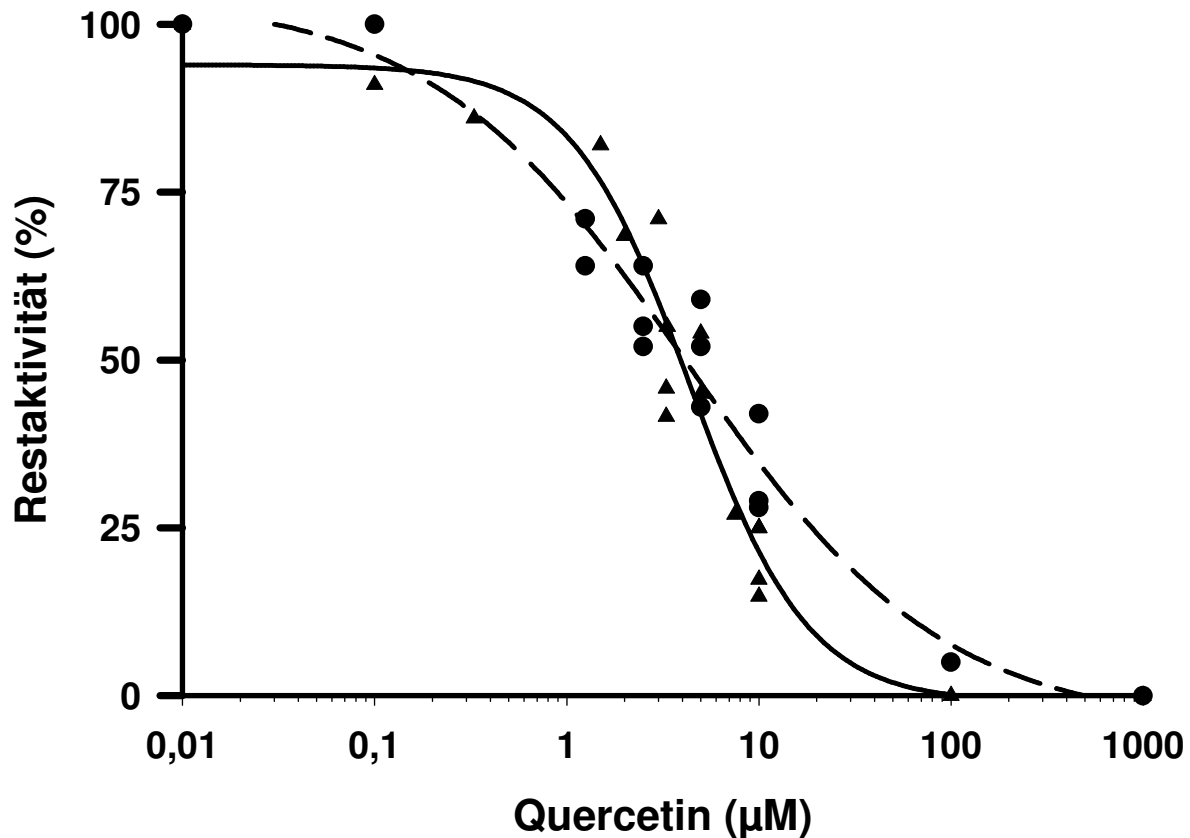


Abb. 3.19: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Quercetin auf die Aktivität der 15-LOX-1 (Dreiecke, durchgezogene Linie) und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1.

Die 15-LOX-1 und die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurden auch durch die Isoflavone Genistein und Daidzein dosisabhängig gehemmt. Hierbei war die Hemmung der 15-LOX-1 durch Genistein stärker als durch Daidzein ($p < 0,05$) oder durch das analoge Flavon Apigenin ($p < 0,001$). Genistein wird häufig als selektiver Proteintyrosinkinasehemmer (Akiyama *et al.*, 1987) bei Untersuchungen zur Signaltransduktion in Zellen verwendet. Die Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen Lipoxygenase L-1 durch Genistein widerlegt jedoch die bisher angenommene hohe Selektivität des Genisteins bei der Hemmung von Proteintyrosinkinasen.

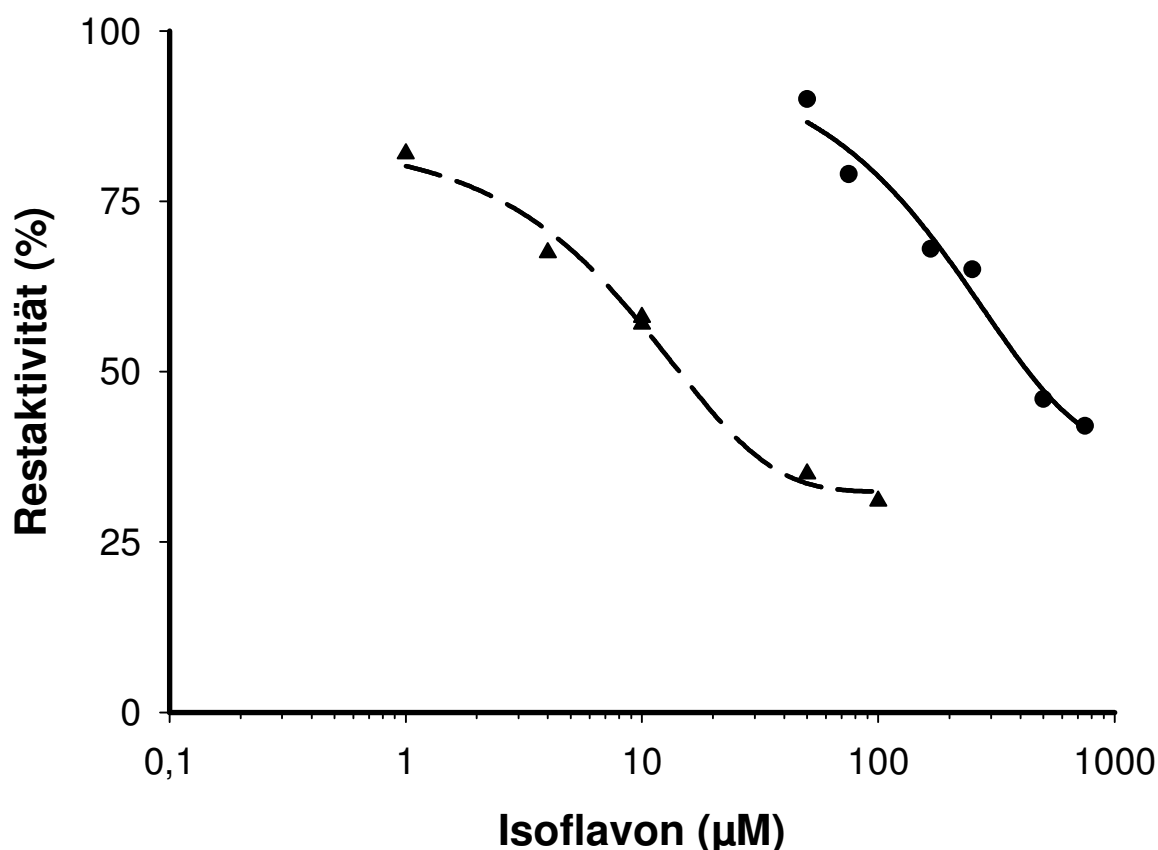


Abb. 3.20: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung der Isoflavone Genistein (Dreiecke, gestrichelte Linie) und Daidzein (Punkte, durchgezogene Linie) auf die 15-LOX-1-Aktivität.

Die Wirksamkeit der Flavonoide an den Lipoxygenasen zeigte keine signifikante Korrelation mit der globalen Anzahl ihrer Hydroxylgruppen ($p > 0,05$). Dies erklärt sich mit der größeren Bedeutung den Positionen der Hydroxylgruppen an den drei Ringen sowie zueinander (siehe oben).

Die Stärke der 15-LOX-1-Hemmung durch die einzelnen Flavonoide zeigte nur schwache Korrelationen zur Stärke der Radikalfängereigenschaften der entsprechenden Flavonoide. So betrug der Pearson-Korrelationskoeffizient r für die Beziehung zwischen dem IC_{50} des Flavonoids zur 15-LOX-1-Hemmung und den Radikalfängereigenschaft gemessen im „Trolox equivalent antioxidant capacity-assay“ (TEAC-Assay) (Rice-Evans *et al.*, 1996) lediglich 0,54 und gemessen am IC_{50} zur Hemmung der doxorubicin-induzierten enzymatischen NADPH-abhängigen Lipidoxidation (Heijnen *et al.*, 2002) nur 0,65. Zwischen 15-LOX-1-Hemmung und Hemmung der nicht-enzymatischen Lipidoxidation (Heijnen *et al.*, 2002) fand sich keine signifikante Korrelation. Zwischen der Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und den Radikalfängereigenschaften der Flavonoide ergab sich überhaupt keine Korrelation. Die Hemmung der Lipoxygenasen durch Flavonoide scheint somit primär von direkten Interaktio-

nen zwischen Flavonoiden und Lipoxygenasen herzurühren und nicht von sekundärer, durch die Radikalfängereigenschaften der Flavonoide vermittelter Natur zu sein.

3.9 Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch weitere Subklassen der Polyphenole

Die Hemmaktivität der Polyphenole gegenüber Lipoxygenasen beschränkte sich nicht auf die Untergruppe der Flavonoide und ist nicht an deren C₆-C₃-C₆-Grundgerüst gebunden. So hemmten auch Polyphenole anderer Strukturen dosisabhängig die 15-LOX-1 und die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (Tab. 3.10).

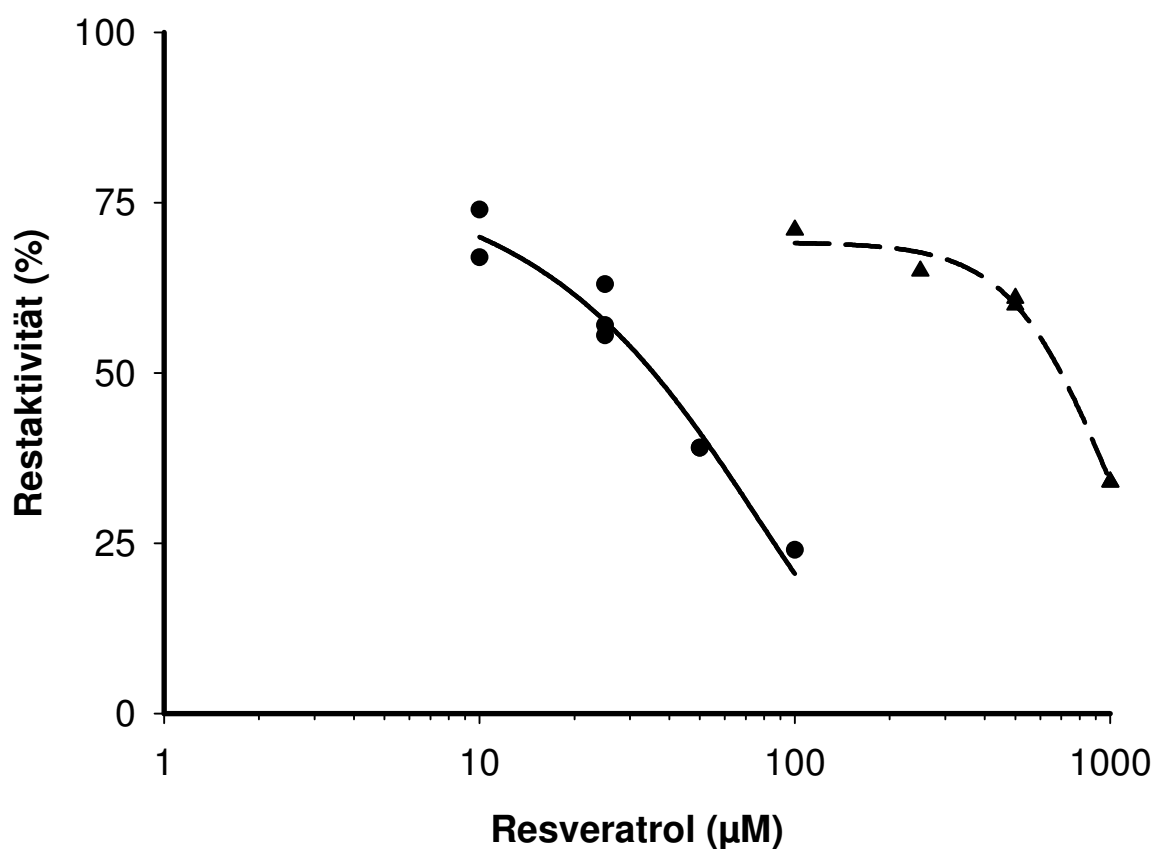


Abb. 3.21: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Resveratrol auf die Aktivität der 15-LOX-1 (durchgezogene Linie) und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (gestrichelte Linie).

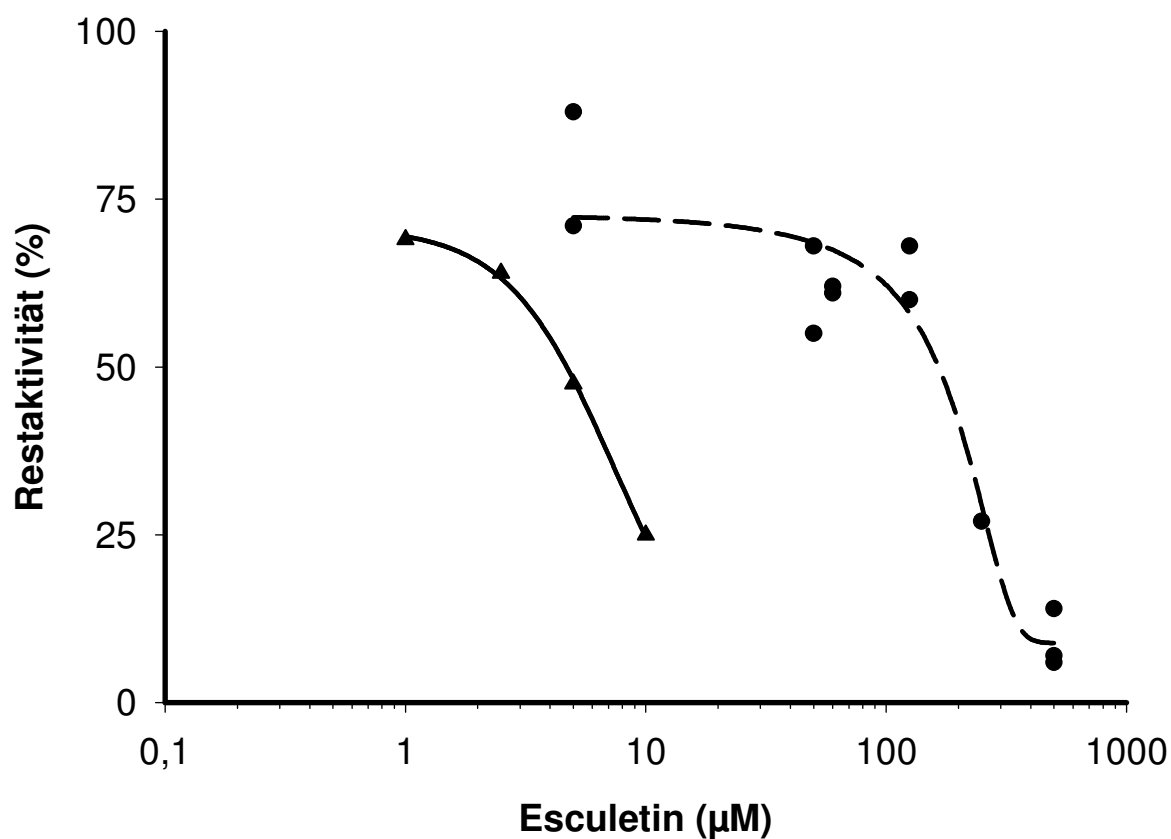


Abb. 3.22: Wirkung von Esculetin auf die Aktivität der 15-LOX-1 (durchgezogene Linie) und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (gestrichelte Linie).

Tab. 3.10: IC₅₀-Werte der Hemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch Polyphenole

SUBSTANZ	SUBSTANZKLASSE	IC ₅₀ (µM) AN 15-LOX-1	IC ₅₀ (µM) AN SOJABOHNEN-LOX
NDGA	Lignane	0,5	3
Esculetin	Cumarine	5,1	79
Resveratrol	Stilbene	41	853
Kaffeensäure	Phenolcarbonsäuren	431	inaktiv

3.10 Wirkungsveränderungen der Polyphenole nach Behandlung mit Peroxynitrit

3.10.1 Wirkung der Zersetzungsprodukte des Peroxynitrit auf Lipoxygenasen

Die Zersetzungsprodukte des Peroxynitrits hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Die 15-LOX-1 wurde jedoch durch die Zersetzungsprodukte des Peroxynitrits kurzzeitig leicht gehemmt. Dieser Effekt war jedoch ca. 10 Minuten nach Zugabe von Peroxynitrit nicht mehr zu beobachten und beeinflusste daher die Versuche nicht wesentlich.

3.10.2 Wirkung von Zimtsäurederivaten auf 15-LOX-1 vor und nach Reaktion mit Peroxynitrit

Zimtsäurederivate zeigten nur eine schwache, dosisabhängige Hemmung der 15-LOX-1 (Tab. 3.11), obwohl sie ein lipophiles Grundgerüst in Form einer Phenylgruppe mit Alkenylrest und zum Teil auch eine Catecholgruppierung haben. Der Grund für die schwache Hemmwirkung könnte in der polaren Carboxylgruppe zu suchen sein. Sie könnte die Wechselwirkung mit dem lipophilen aktiven Zentrum des Enzyms behindern.

Tab. 3.11: IC₅₀-Werte (µM) der Zimtsäurederivate an der 15-LOX-1 vor und nach Peroxynitrit-Reaktion

Verbindung	vor PN-Reaktion	nach PN-Reaktion
Kaffeesäure	1000	7,8
Dihydrokaffeesäure	> 1000	110
Chlorogensäure	100	20
Ferularsäure	>1000*	80

**bei 1 mM durchschnittliche Restaktivität 91,3%*

Nach Reaktion mit Peroxynitrit, bei der die zunächst farblosen Ansätze einen gelbbraunen Farbton annahmen, war die inhibitorische Wirkung der Zimtsäurederivate gegenüber der 15-LOX-1 erheblich verstärkt (Tab. 3.11). Die Wirkungsverstärkung war bei der Kaffeesäure mit einem Faktor von 128 am deutlichsten ausgeprägt.

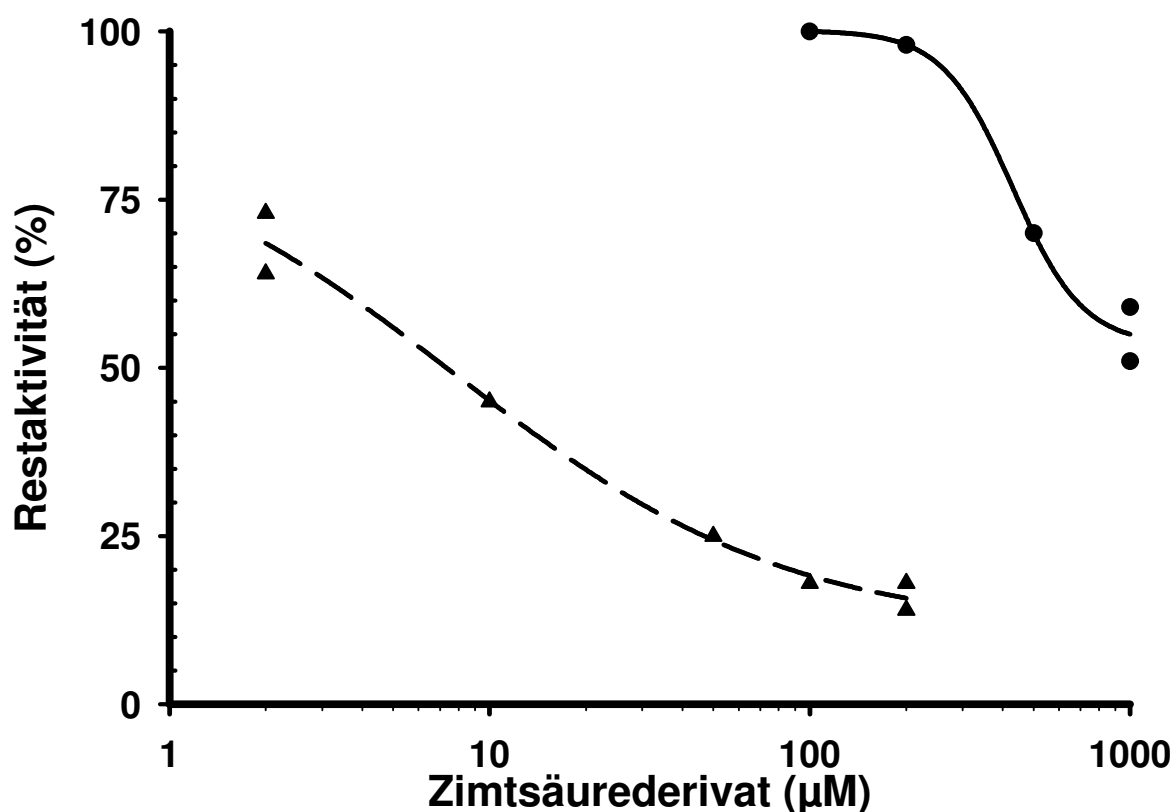


Abb. 3.23: Dosis-Wirkungskurve der Wirkung von Kaffeesäure (Punkte, durchgezogene Linie) und ihres Oxidationsproduktes (Dreiecke, gestrichelte Linie) auf die Aktivität der 15-LOX-1. Die IC_{50} -Werte (1000 μM bzw. 7,8 μM) unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Ergebnissen von C. Schewe *et al.* (1991). Diese Autoren testeten Zimtsäurederivate sowie Handelspräparate ihrer polymeren Oxidationsprodukte unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen (oxygrafisch bei 20 °C in 0,1 M Phosphatpuffer mit 100 nM reinem Enzym und Kaliumlinoleat als Substrat) ebenfalls an der 15-LOX-1. Dabei erwiesen sich die meisten Polymere als wirksamer als ihre monomeren Ausgangssubstanzen. Der Unterschied in der Wirkung von Monomer und Polymer war bei der Kaffeesäure mit einem Faktor von 200 am stärksten ausgeprägt. Ihr Polymer hatte mit 5 $\mu g/ml$ den niedrigsten IC_{50} aller getesteten Zimtsäurederivate.

Die damals verwendeten Polymere der Firma SERVA waren durch Perjodat-Oxidation hergestellt worden. Über die Struktur dieser oxidativen Polymere waren keine Informationen verfügbar.

Die Wirkungsverstärkung der Zimtsäurederivate nach Reaktion mit Peroxynitrit könnte somit ebenfalls auf eine oxidative Polymerisierung zurückzuführen sein. Damit wären auch Parallelen zwischen der Wirkung der Zimtsäurederivate und der Wirkung der Procyanidine auf Lip-

oxygenasen erkennbar. Wie zuvor beschrieben, war die Hemmung der 15-LOX-1 durch Pro-cyanidin-Oligomere stärker als durch das entsprechende Monomer.

3.10.3 Wirkung von Epicatechin auf Lipoxygenasen nach Reaktion mit Peroxynitrit

Der Reaktionsansatz mit Epicatechin zeigte bei der ersten Bolusgabe von Peroxynitrit eine Farbveränderung von farblos zu schwach gelbbraunlich. Bei Zugabe eines zweiten Bolus Peroxynitrits intensivierte sich die gelbbraune Farbe der Lösung, und bei Zugabe eines dritten Bolus zeigte die Lösung eine intensiv orangebraune Farbe.

An der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 war Epicatechin auch nach Behandlung mit Peroxynitrit unwirksam. An der 15-LOX-1 war die Hemmung durch (-)-Epicatechin nach Behandlung mit Peroxynitrit schwächer. Der IC_{50} betrug nur noch etwa 100 μ M. Diese Abschwächung der Hemmung könnte auf der Entstehung eines Stoffgemisches beruhen. Dieses Stoffgemisch wurde durch Ausschütteln mit Diethylether in hydrophile und hydrophobe Bestandteile aufgetrennt. Anschließend wurde durch Verblasen des Diethylethers mit elementarem Stickstoff, die in der hydrophoben Phase enthaltenen Bestandteile bis zur Trockensubstanz eingegrenzt. Die Trockensubstanz wurde dann in 36 μ l 2-Methoxyethanol wieder aufgelöst und 4 μ l davon im Standardassay getestet.

Die Aktivität der wässrigen Phase wurde getestet, indem 400 μ l von ihr zum oxygrafischen Assay gegeben wurden. Das gelbbraune, während der Reaktion mit Peroxynitrit entstandene Pigment fand sich gemeinsam mit dem Hauptteil der Hemmaktivität in der wässrigen Phase wieder. In einer Konzentration von 100 μ M hemmte es die 15-LOX-1 bis zu einer Restaktivität von durchschnittlich 21,5 %. Ein Teil der Hemmaktivität war allerdings in der hydrophoben Phase zu finden. Bei einer Konzentration von 100 μ M wurde die 15-LOX-1 bis zu einer durchschnittlichen Restaktivität von 50 % gehemmt. Diese Verteilung der Hemmaktivität zwischen wässriger und hydrophober Phase könnte Hinweis auf die Entstehung einer Carboxylgruppe im Epicatechinmolekül bei Reaktion mit Peroxynitrit sein. Bei pH 7,4 läge das Reaktionsprodukt dann wahrscheinlich in dissoziierter Form vor und damit hauptsächlich in der hydrophilen Phase.

Das Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe von Dr. P. Schröder durch HPLC aufgetrennt. Weitere Forschung zur Identifizierung und strukturellen Aufklärung des Inhibitors muss noch erfolgen.

Im Gegensatz zum Epicatechin war im GPx/GSH-kontrollierten System das Reaktionsprodukt des (-)-Epicatechins etwa dreifach stärker wirksam als unter den vorausgegangenen Bedingungen. Dieses Verhalten spricht dafür, dass die LOX-hemmende Verbindung im Reaktionsansatz mit Peroxynitrit nicht mit der Muttersubstanz (-)-Epicatechin identisch ist. Stattdessen

scheint ein neuer Lipoxygenasehemmer entstanden zu sein, dessen Lipoxygenasehemmung entweder aufgrund seines Hemmmechanismus, oder einer chemischen Umwandlung in einen weiteren, potenteren Lipoxygenasehemmer bei Anwesenheit von GPx verstärkt wird. Bei Testung der Octamer-Fraktion der Procyanidine und ihres Reaktionsproduktes mit Peroxynitrit in diesem System ergaben sich qualitativ die gleichen Ergebnisse. Die Ergebnisse mit den Flavan-3-olen stehen somit im Einklang mit den Befunden der entsprechenden Experimente mit Zimtsäurederivaten. Auch dort gab es Hinweise auf die Entstehung neuer Lipoxygenaseinhibitoren bei Reaktion mit Peroxynitrit.

3.11 Wirkung von Peroxynitrit auf die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase

L-1 und Einfluss von (-)-Epicatechin hierauf

Die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurde bei Zugabe eines Peroxynitrit-Bolus durch Oxidation inaktiviert. Allerdings war die Lipoxygenase relativ unempfindlich, sodass eine fünfzigprozentige Inaktivierung erst bei einem fünfhundertfachen Überschuss an Peroxynitrit erzielt wurde.

Die zweite Wirkung des Peroxynitrits auf die Lipoxygenase bestand in einer Nitrierung von Tyrosylresten des Enzyms. Dies wurde mit Hilfe von Dr. P. Schröder durch Nitrotyrosylantikörper im Dotblot nachgewiesen (Abb. 3.24).

(-)-Epicatechin schützte kaum vor Inaktivierung des Enzyms durch Oxidation. Allerdings konnte die Nitrierung der Tyrosylreste des Enzyms effektiv unterbunden werden, sodass bei Epicatechinkonzentrationen über 10 μM keine Nitrierung der Tyrosylreste mehr stattfand (Schröder *et al.*, 2001).

Zur Quantifizierung der protektiven Wirkungen des Epicatechins wurde der Quotient der Epicatechinkonzentration am ED_{50} und der verwendeten Peroxynitritkonzentration benutzt. Dieser Quotient hatte für den Schutz vor Nitrierung von Tyrosylresten der Lipoxygenase durch (-)-Epicatechin einen Wert von 0,02 und für die Inaktivierung des Enzyms durch Oxidation einen Wert von über 21. Bei Einzelbetrachtung des Schutzes vor Oxidation und Nitrierung wird deutlich, dass Epicatechin effektiv Nitrierungen verhindert, jedoch gegen Oxidationen nur wenig schützt (Schröder *et al.*, 2001). Der Schutz vor Nitrierung von Zellproteinen könnte auch Grundlage der zytoprotektiven Wirkungen von (-)-Epicatechin gegenüber Peroxynitrit sein (Schröder *et al.*, 2003).

Diese Resultate stehen im Einklang mit entsprechenden Befunden bei Versuchen mit Glyceralaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Auch hier zeigte (-)-Epicatechin eine analoge Selektivität seiner protektiven Wirkung (Schröder *et al.*, 2001). Des Weiteren hemmen Polyphenole verschiedener Subklassen ebenso im LDL die Nitrierung von Tyrosylresten

durch Peroxynitrit stärker als die Oxidation von Aminosäureresten des LDL (Ferroni *et al.*, 2004).

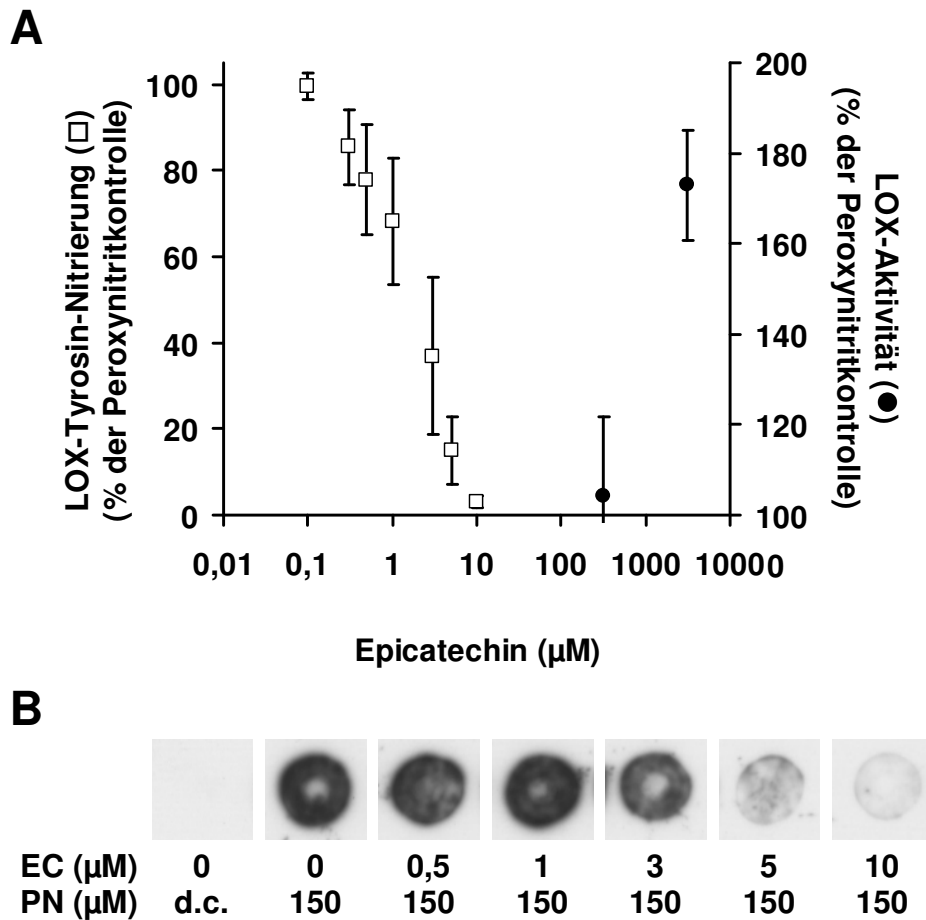


Abb. 3.24: Nach Schröder *et al.*, 2001. Schutzeffekt variierender Epicatechinkonzentrationen auf die Inaktivierung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 (A, ausgefüllte Kreise) und der Nitrierung ihrer Tyrosylreste (A, leere Quadrate; B). 240 nM Lipoxygenase wurden mit einem 150 μM Peroxynitritbolus behandelt. In den Ansätzen war Epicatechin variierender Konzentration anwesend. Die Lipoxygenasenaktivität und die Nitrierung des Enzyms wurden oxygrafisch (A), durch Anfertigung von Dotblots und durch densitometrische Analyse ermittelt (A, B). Die gezeigten Daten entsprechen Mittelwerten aus 3-5 Einzelmessungen $\pm$ SD (A) oder 5 unabhängigen Experimenten (B). „d.c.“ steht für die Zersetzungskontrolle des Peroxynitrits.

3.12 Wirkung von Flavonolen auf die LDL-Oxidation

Eine mögliche Beteiligung von Lipoxygenasen an der Atherogenese sowie die Möglichkeiten ihrer Unterdrückung sind derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen. Da Silva *et al.* zeigten *in vitro* eine starke Hemmung der 15-LOX-1-induzierten LDL-Oxidation durch Quercetin und seiner Glykoside sowie durch (-)-Epicatechin in Konzentrationen von weniger als 1 μM (da Silva *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2000). Des Weiteren beobachteten Mazur *et al.* (1999) eine Verlängerung der lag-Phase der Cu^{2+} -induzierten LDL-Oxidation durch procyanidinreiche Extrakte aus Traubensamen und aus *Pinus maritimus*. Diese führten sie auf die Radikalfängereigenschaften dieser Verbindungen zurück. Daher wurden die Wirkungen von Epicatechin und seinem Dimer sowie seinem Nonamer auf die Cu^{2+} - und die 15-LOX-1-induzierte LDL-Oxidation untersucht.

Bei der Cu^{2+} -induzierten LDL-Oxidation kam es in den Kontrollen nach einer neunzigminütigen lag-Phase zur Bildung konjugierter Diene (Abb. 3.25). Die Flavonole bewirkten in submikromolarer Konzentration (0,33 μM) eine Verlängerung der lag-Phase. Diese Verlängerung entsprach beim Nonamer dem 1,5-fachen und beim Epicatechin und seinem Dimer dem 1,75-fachen der Kontrolle. Ursache der Verlängerung dürften die Radikalfängereigenschaften der Flavonole sein. An der sigmoidalen Form der Kurve sowie der Höhe des Absorptionmaximums mit 0,8 änderte sich nichts. Somit ließen sich die Ergebnisse Mazurs *et al.* (1999), die diese mit einem procyanidinreichen Extrakt gemacht hatten, mit einzeln isolierten Flavanolen bestätigen.

Im Gegensatz zur Cu^{2+} -katalysierten LDL-Oxidation zeigte die 15-LOX-1-katalysierte Reaktion einen fast linearen zeitlichen Verlauf ohne lag-Phase. Während der lag-Phase der Cu^{2+} -induzierten LDL-Oxidation werden wahrscheinlich Antioxidantien im LDL wie beispielsweise Tocopherol oxidiert. Erst wenn diese oxidiert worden sind, werden auch Polyenfettsäurereste des LDL oxidiert. Die 15-LOX-1 hingegen beginnt sofort mit der Oxidation von Polyenfettsäureresten des LDL, ohne vorher die Antioxidanzien im LDL zu oxidieren (Lass *et al.*, 1996).

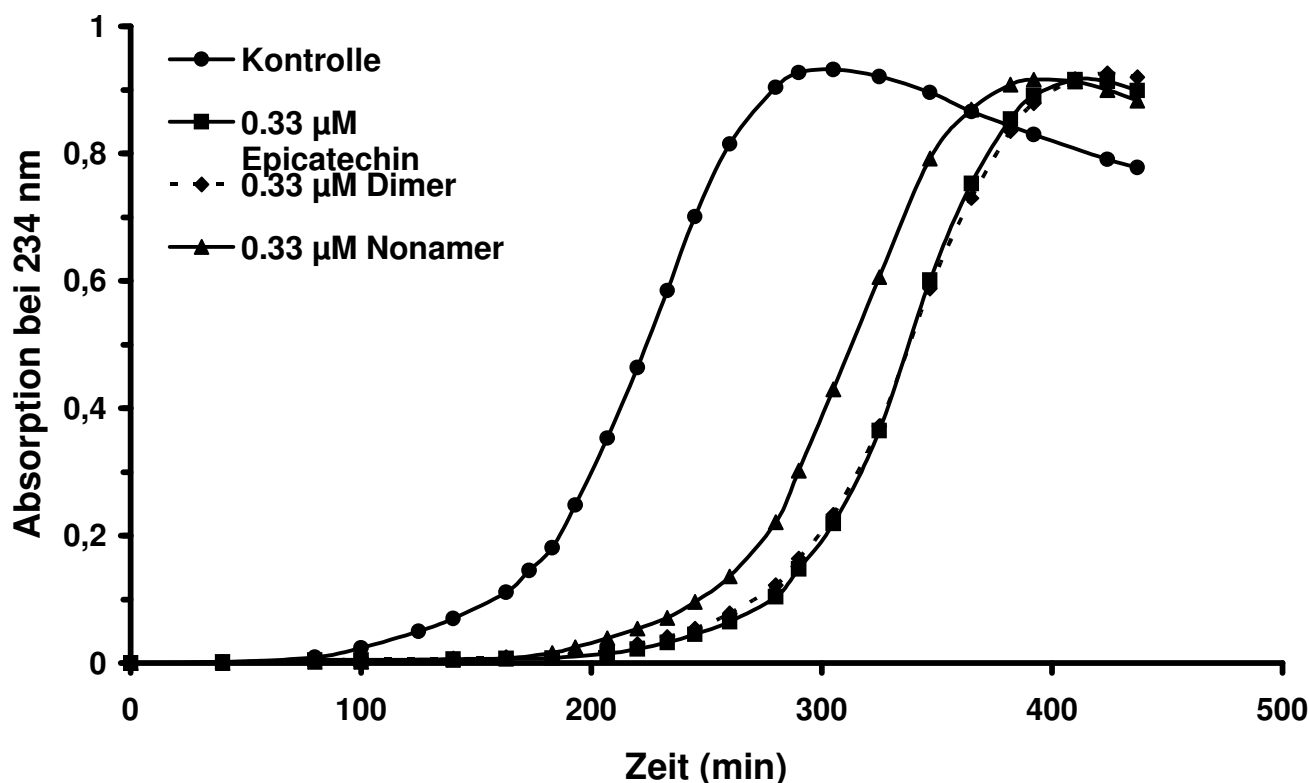


Abb. 3.25 : Kupferionen-induzierte Oxidation von LDL bei 20 °C. Die Reaktion wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 234 nm über acht Stunden verfolgt. Nach einer lag-Phase kam es zu einem Anstieg der Absorption bei 234 nm durch Cu^{2+} -induzierte Oxidation mehrfachungesättigter Fettsäurereste. Bei Anwesenheit von Flavonoiden in submikromolaren Konzentrationen zeigte sich eine Verlängerung der lag-Phase.

1 μM (-)-Epicatechin und 1 μM Dimer hemmten nicht die 15-LOX-1-induzierten LDL-Oxidation. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem IC_{50} -Wert von 59 μM für Epicatechin an der 15-LOX-1 mit Linolsäure als Substrat (Tab. 3.1). Epicatechin und vor allem sein Dimer schienen sogar stimulierende Wirkungen auf die 15-LOX-1 auszuüben. Bei ihrer Anwesenheit war die Bildung konjugierter Diene während der ersten 150 Minuten höher als in den Kontrollen (Abb. 3.26). 0,33 μM Nonamer hingegen hemmte die LDL-Oxidation. Dieses Verhalten steht im Einklang mit dem IC_{50} von 0,8 μM der Dekamer-Fraktion an der 15-LOX-1 mit Linolsäure als Substrat (Tab. 3.1).

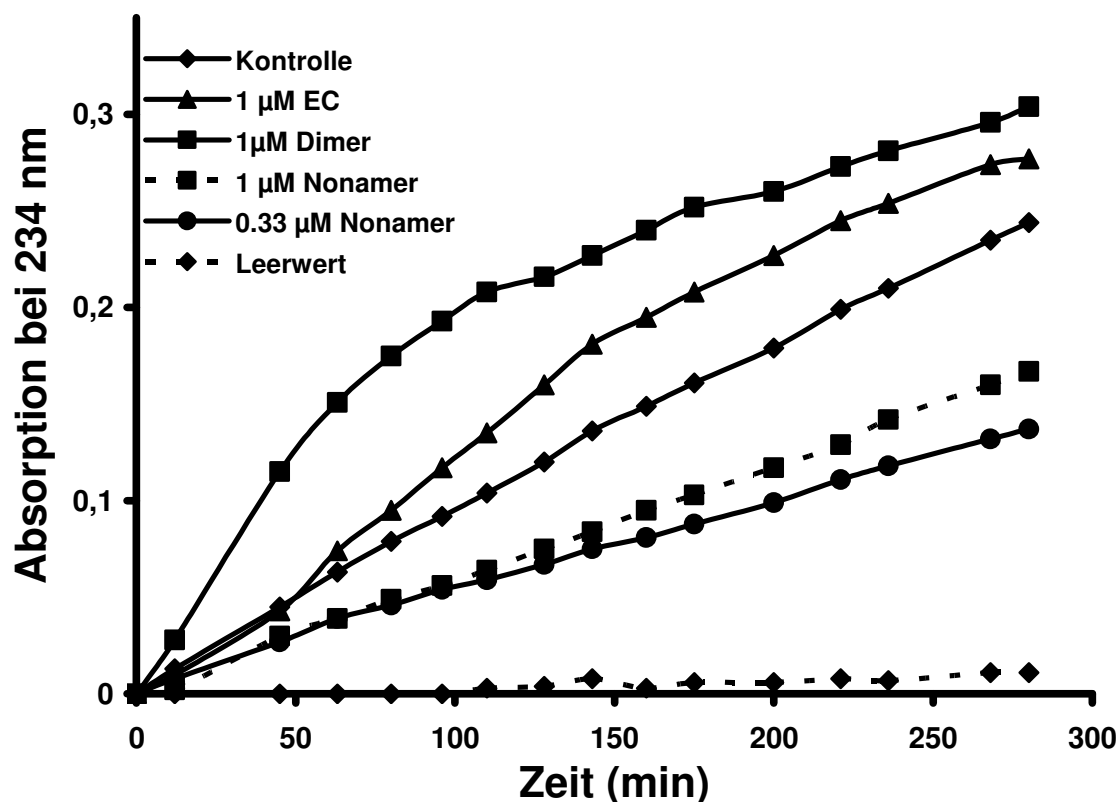


Abb. 3.26: 15-LOX-1-induzierte Oxidation von LDL bei 20 °C. Die Reaktion wurde über sechs Stunden durch photometrische Messung der Absorption bei 234 nm verfolgt. Durch Oxidation mehrfachungesättigter Fettsäurereste kam es zum Anstieg der Absorption bei 234 nm. Der Anstieg der Absorption erfolgte ohne vorhergegangene lag-Phase.

Insgesamt konnten die Ergebnisse da Silvas nicht bestätigt werden. Dieser hatte mit 1 µM Epicatechin eine Hemmung der 15-LOX-1-induzierten LDL-Oxidation von über 80 % erreicht. Ursache diese Diskrepanz könnte die Verwendung eines 15-LOX-1-Präparates mit hohem Hämoproteinanteil durch da Silva sein. Hämoproteine wie Hämoglobin verfügen über eine Quasi-Lipoxygenaseaktivität sowie Pseudoperoxidaseaktivitäten. Diese werden auch durch Lipoxygenasehemmer mit Radikalfängereigenschaften wie Propylgallat oder Salicylhydroxamsäure stärker gehemmt als die Aktivität der Lipoxygenasen selbst (Kühn *et al.*, 1981). Die verringerte Rate der LDL-Oxidation bei da Silva könnte daher zwar zum Teil auf einer direkten Inhibition der 15-LOX-1 beruhen, aber auch auf einer Inhibition hämoprotein-vermittelter katalytischer Aktivitäten.

Unterschiedliche Literaturangaben bezüglich einer möglichen Tocopherolabhängigkeit der LDL-Oxidation durch die 15-LOX-1 beruhen wahrscheinlich ebenfalls auf der unterschiedlichen Verwendung hochreiner 15-LOX-1-Präparate und hämoproteinhaltiger 15-LOX-1-Präparate (Upston *et al.*, 1996; Upston *et al.*, 1997; Belkner *et al.*, 1998).

4. Diskussion

4.1 Direkte Inhibition von Lipoxygenasen durch Flavonoide

Flavonoide sind universelle Inhibitoren von Lipoxygenasen des Säugetierorganismus. So verursachen sie bei physiologischem pH-Wert eine direkte Hemmung der 15-LOX-1, der 12-LOX und der 5-LOX (Schewe *et al.*, 2001 und 2002; Sadik *et al.*, 2003). Bereits seit langem ist die Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 bei pH 9 durch Flavonoide bekannt (Robak *et al.*, 1988). Diese Hemmung findet sich zwar auch bei physiologischem pH, allerdings ist die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 deutlich unempfindlicher gegenüber Flavonoiden als die Lipoxygenasen des Säugetierorganismus (Sadik *et al.*, 2003), sodass an ihr im Gegensatz zu den Säugetier-Lipoxygenasen nicht alle Flavonoide wirksam sind und die IC₅₀-Werte in der Regel höher sind. Die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 ist daher nur begrenzt als Modell für die inhibitorische Wirkung der Flavonoide auf Lipoxygenasen des Säugetierorganismus geeignet. Grund hierfür könnte die geringe Homologie der Primärstrukturen zwischen pflanzlichen Lipoxygenasen und Lipoxygenasen des Säugetierorganismus sein. So entsprechen sich beispielsweise die Primärstrukturen der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 und der 15-LOX-1 nur zu etwa 25 % (Brash, 1999).

Besonders deutlich zeigte sich die unterschiedliche Empfindlichkeit der Säugetier-Lipoxygenasen und der pflanzlichen Lipoxygenasen gegenüber Polyphenolen bei den Flavanolon. Hier waren die monomeren Formen der Flavanoole an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 meist völlig wirkungslos, während sie die Säugetier-Lipoxygenasen hemmten.

Sowohl das Sojabohnen-Enzym als auch die Säugetier-Lipoxygenasen wurden durch die oligomeren Flavanoole, die Procyanidine, gehemmt. Diese zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Wirkungsstärke auf die einzelnen Lipoxygenasen. So waren sie an der 15-LOX-1 wirksamer als das Monomer, wohingegen sie an der 5-LOX schwächer wirksam waren als das Monomer (Schewe *et al.*, 2002). Die höheren Procyanidine zeigen daher anscheinend eine gewisse Selektivität gegenüber verschiedenen Lipoxygenasen des Säugerorganismus.

Obwohl an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 einige Verbindungen im Gegensatz zur 15-LOX-1 unwirksam waren und sich bei anderen Verbindungen überwiegend höhere IC₅₀-Werte ergaben, waren die Beziehungen zwischen der Struktur des Flavonoids und der Soforthemmung der Lipoxygenase für das pflanzliche Enzym und die 15-LOX-1 aus Kaninchen-Retikulozyten sehr ähnlich. Eine Ausnahme bildete allerdings Baicalein. Dieses war an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 vergleichsweise schwach wirksam. Baicalein hat als einziges getestetes Flavonoid eine Catecholgruppe am A-Ring. Alle anderen getesteten Flavonoide mit Catecholgruppe hatten diese immer am B-Ring. Dieser Unterschied könnte somit Ursache der

vergleichsweise schwachen Wirksamkeit des Baicaleins an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 sein.

Insgesamt sind aber somit die strukturellen Voraussetzungen der Flavonoide für die Soforthemmung an beiden Enzyme anscheinend weitgehend gleich. Diese sind im nachfolgenden Schema zusammengefasst:

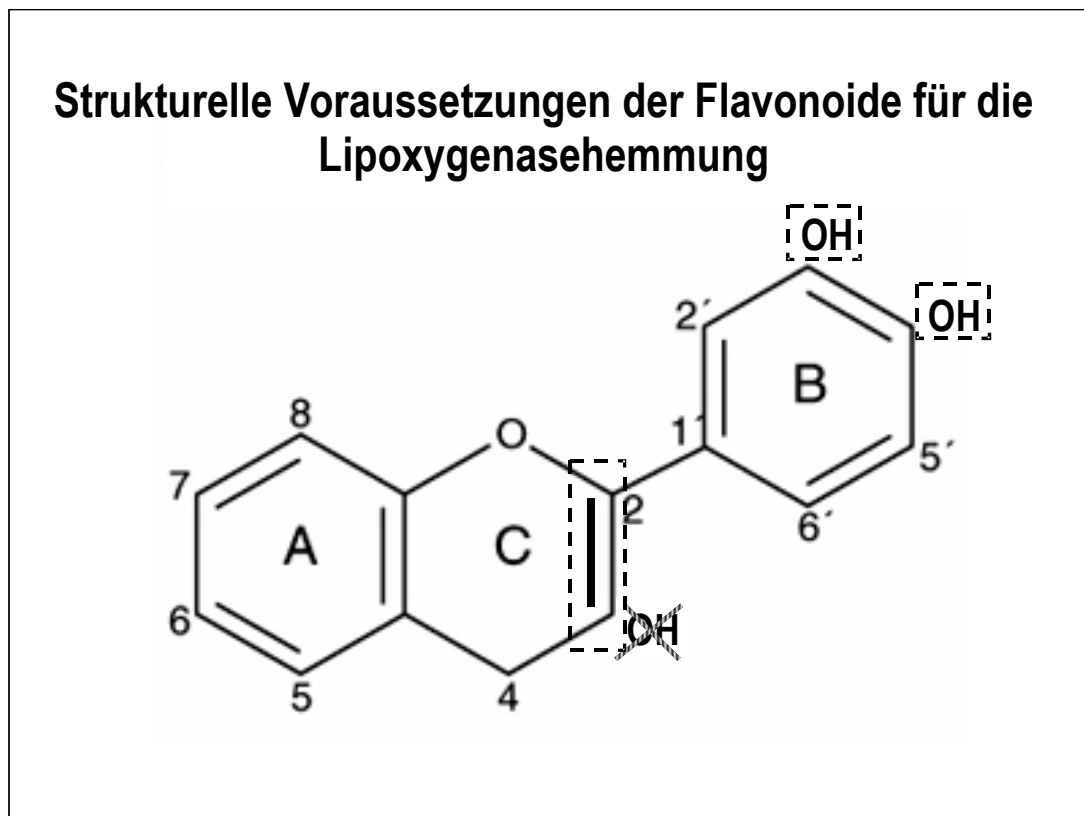


Abb. 4.1: Strukturvoraussetzung der Flavonoide zur Soforthemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Die mit den gestrichelten Kästchen gekennzeichneten Gruppierungen begünstigen die Lipoxygenasehemmung. Es sind dies die 2,3-Doppelbindung im C-Ring sowie die Catecholgruppierung am B-Ring. Dagegen ist die OH-Gruppe am C-3 eher störend.

Die geforderten Strukturvoraussetzungen sind am besten im Luteolin realisiert. In Übereinstimmung hiermit war Luteolin der stärkste getestete Lipoxygenase-Hemmer unter den Flavonoiden. In der Literatur wird Luteolin als potentes Antiphlogistikum beschrieben. Es habe unter den Flavonoiden die optimale Struktur, um durch mehrere Mechanismen antiphlogistisch zu wirken (Ueda *et al.*, 2004). So hemmt es beispielsweise *in vivo* die Produktion von TNF- α (Ueda *et al.*, 2004) sowie die Entwicklung von Ohrödemen induziert durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (Ueda *et al.*, 2004), Arachidonsäure oder Oxazolone (Ueda *et al.*, 2002).

Trotz der großen Ähnlichkeit in den Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Soforthemmung der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 deutet der unterschiedliche Einfluss von GSH auf die Hemmung der beiden Enzyme durch Quercetin auf Unterschiede im Mechanismus der Hemmung der beiden Enzyme hin. So könnten sich die Mechanismen der zeitabhängigen Inaktivierung der 15-LOX-1 durch Quercetin und der zeitabhängigen Inaktivierung der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 durch Quercetin unterscheiden. Die Strukturvoraussetzungen der Polyphenole für die zeitabhängige Inaktivierung der Lipoxygenasen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Daher könnten sie sich von den Strukturvoraussetzungen der Polyphenole zur Soforthemmung der Lipoxygenasen unterscheiden.

4.2 Zum Mechanismus der Hemmung von Lipoxygenasen durch Flavonoide

Flavonoide sind seit langem als Radikalfänger bekannt (Middleton *et al.*, 2000). Die inhibitorische Wirkung der Flavonoide auf Lipoxygenasen ist allerdings nicht auf diese Eigenschaft zurückzuführen, wie unter anderem durch die schlechten oder fehlenden Korrelationen zwischen Lipoxygenasehemmung und Literaturdaten zur Radikalfängereffektivität belegt ist. Im katalytischen Zyklus der Lipoxygenasen werden zwar freie Radikale gebildet, diese bleiben aber fest an das aktive Zentrum der Lipoxygenasen gebunden und sind damit für Radikalfänger unzugänglich (Schewe, 2002). Deshalb hemmen einige sehr gute Radikalfänger, wie beispielsweise 2,6-Ditertiärbutyl-4-hydroxytoluen (BHT) und Probucol (Schnurr *et al.*, 1995) oder α -Tocopherol, Trolox und Ascorbat (Noguchi *et al.*, 2002) die Lipoxygenasen nicht.

Ein denkbarer Mechanismus der Hemmung durch Flavonoide wäre beispielsweise die direkte Komplexierung des Enzymeisens in seiner dreiwertigen Oxidationsstufe. Dieser Mechanismus wurde für die Hemmung der Sojabohnen-Lipoxygenase L1 durch 4-Nitrocatechol wahrscheinlich gemacht (Spaapen *et al.*, 1980). Jedoch verloren Flavonoide in den vorliegenden Untersuchungen nicht ihre Hemmaktivität nach Komplexierung mit Eisenionen. Daher kann ein solcher Mechanismus zumindest nicht allein für die Wirkung der Flavonoide auf Lipoxygenasen verantwortlich sein.

Hinweise zum Hemmmechanismus ergeben sich auch aus der Untersuchung der Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin. Ungeachtet der Soforthemmung inaktivierte Quercetin die 15-LOX-1 zusätzlich zeitabhängig. Ähnliches wurde für die Hemmung der DOPA-Decarboxylase (Bertoldi *et al.*, 2001) und der Fettsäuresynthase (Wang und Tian, 2001) durch Epigallocatechingallat beschrieben. Dort wurde dieser Effekt auf eine kovalente Modifizierung der beiden Enzyme zurückgeführt. Eine kovalente Modifizierung der 15-LOX-1 durch Quercetin könnte durch enzymgebundene prooxidative Intermediate wie beispielsweise Fettsäureperoxyradikale während des Katalysezyklus der Lipoxygenase ausgelöst werden

(Schewe, 2002). Flavonoide könnten in diesem System zu Semichinonen, Chinonen (bei Flavonoiden mit einer Catecholgruppe im B-Ring) oder Phenoxyradikalen (bei Flavonoiden ohne Catecholgruppe) kooxydiert werden. Diese könnten dann kovalente Bindungen mit Sulfhydryl- oder Aminogruppen der Lipoxygenase eingehen und damit eine irreversible Hemmung des Enzyms verursachen. Im Falle des Quercetins und anderer Flavonole könnte auch die intermediäre Bildung korrespondierender Chinonmethide beteiligt sein. Diese werden von Flavonoiden z.B. in zellulären oder zellfreien Reaktionssystem mit Tyrosinase- oder Peroxidase-Aktivität gebildet und reagieren mit GSH oder anderen Thiolen zu Thioetherkonjugaten (Awad *et al.*, 2001 und 2002; Bolton *et al.*, 2000; Galati *et al.*, 2002). Falls kein GSH im System vorhanden ist, könnten die Oxidationsprodukte von Flavonoiden vom Catecholtyp mit Sulfhydrylgruppen in der Nähe des aktiven Zentrums der Lipoxygenase reagieren und so den Substratbindungsort im aktiven Zentrum blockieren. Ein solcher Chemismus wird durch die Beobachtung gestützt, dass Quercetin gegenüber der 15-LOX-1 in Gegenwart von GSH unwirksam war. Er entspräche zudem dem Mechanismus der Hemmung der 15-LOX-1 durch Ebselen (Walther *et al.*, 1999). Beide Verbindungen zeigen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede hinsichtlich der Komplexität ihres Hemmtyps an der 15-LOX-1. Für Ebselen wurde eine kovalente Bindung mit SH-Gruppen der Lipoxygenase mit Folge einer Änderung der Eisenligandensphäre des Enzyms nachgewiesen (Walther *et al.*, 1999). Eine analoge kovalente Bindung zwischen Quercetin und einer Lipoxygenase könnte experimentell mit radioaktiv markiertem Quercetin nachgewiesen werden.

Die Unwirksamkeit des Quercetins bei Anwesenheit von GSH scheint somit eine intrazelluläre Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin zu verhindern, da GSH ein in erster Linie intrazelluläres Tripeptid ist. Die 15-LOX-1 ist ein intrazelluläres Enzym. Intrazellulär erfüllt sie physiologische Funktionen. Pathologische Wirkungen der 15-LOX-1 entstehen vielleicht erst nach Freisetzung des Enzyms in den Extrazellularraum nach Zellschädigungen oder Zelluntergängen (Walther *et al.*, 1999). So könnten z.B. die Voraussetzungen für eine direkte Oxidation von LDL durch die 15-LOX-1 erst nach Freisetzung des Enzyms in den Extrazellularraum gegeben sein. Extrazellulär ist die Konzentration von GSH sehr viel niedriger als intrazellulär. Daher könnte Quercetin die 15-LOX-1 selektiv im Extrazellularraum hemmen und ihre Aktivität im Intrazellularraum unbeeinflusst lassen. Dann würde Quercetin nur pathologische Wirkungen der 15-LOX-1 hemmen und ihre physiologischen Funktionen unbeeinflusst lassen.

Die für Quercetin vorgeschlagenen Hemmmechanismen sind wahrscheinlich nicht allgemein gültig für alle Flavonoide. So ist es schwer vorstellbar, dass die längerkettigen Procyanidine mit ihrem großen Volumen dauerhafte Bindungen mit der 15-LOX-1 eingehen. Für ihre Wir-

kung könnten daher eher ihre reduzierenden Eigenschaften eine primäre Rolle spielen, die wie die Hemmungen der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-LOX mit steigender Molekülgröße zunehmen (Verstraeten *et al.*, 2003).

4.3 Multimodale Wirkungen der Flavonoide beim oxidativen Stress

Flavonoide sind seit langem als Radikalfänger, als Reduktionsmittel und als Komplexbildner für Übergangsmetalle bekannt (Rice-Evans *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 2000; Pietta, 2000). Eigenschaften durch die sie antioxidativ wirken können. Nun zeigt sich, dass sie auch prooxidative Enzyme wie z.B. die 15-LOX-1 direkt hemmen. Damit wirken sie auf mehreren Ebenen antioxidativ.

Die strukturellen Voraussetzungen der Flavonoide zur Hemmung der 15-LOX-1 sind aber nicht mit jenen für die Radikalfängereigenschaften identisch, sondern unterscheiden in wesentlichen Punkten. Daher gibt es auch keine signifikante Korrelation zwischen der Stärke der Radikalfängereigenschaften und der 15-LOX-1-Hemmung.

Ein Unterschied zwischen den Struktur-Wirkungsbeziehungen von Radikalfängereigenschaften und 15-LOX-1-Hemmung ist beispielsweise, dass das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe keine unabdingbare Voraussetzung für die Hemmung der Lipoxygenasen durch Flavonoide ist, wie dies für die Radikalfängereigenschaft der Fall ist. Des Weiteren besteht nicht wie bei den Radikalfängereigenschaften eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Hydroxylgruppen und der Wirksamkeit der Verbindung (Middleton *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 1997). Es findet sich stattdessen zeitweilig sogar eine reziproke Korrelation dieser beiden Parameter (Vergleich Myricetin, Quercetin, Baicalein). Außerdem wird die Wirksamkeit der Flavonoide gegenüber den Lipoxygenasen bei Vorhandensein einer Hydroxylgruppe in Position 3 abgeschwächt. Die Radikalfängereigenschaften der Flavonoide hingegen werden durch eine Hydroxylgruppe am C₃-Atom gefördert. Erklärung für die schwächere Hemmung der Lipoxygenasen durch Flavonoide bei einer höheren Zahl an Hydroxylgruppen könnte die zunehmende Hydrophilie des Moleküls sein, die ihm eine Interaktion mit dem hydrophoben aktiven Zentrum des Enzyms erschwert. Daher sind die effektivsten Radikalfänger unter den Flavonoiden keineswegs auch die effektivsten Inhibitoren der Lipoxygenasen. Es finden sich aber auch einige Gemeinsamkeiten zwischen den strukturellen Voraussetzungen zur Hemmung der Lipoxygenase und der Radikalfängereigenschaft: Beide zeigen eine Wirkungsverstärkung bei Vorhandensein einer Catecholgruppierung im Ring B oder einer 2,3-Doppelbindung. Des Weiteren werden beide durch glykosidische Kohlenhydratanteile abgeschwächt und beide in bezug auf die Flavanoide durch Veresterung mit Gallussäure verstärkt.

Auffällige Gemeinsamkeiten finden sich auch zwischen den Struktur-Wirkungsbeziehungen der Hemmung der 15-LOX-1 und den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion der einzelnen Flavonoide mit 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl- (DPPH) und α,γ -Bisdiphenylene- β -phenylallyl- (BDPA) Radikalen (Butković *et al.*, 2004). Diese Geschwindigkeitskonstanten korrelieren unter anderem gut mit dem Reduktionspotenzial der Flavonoide und ihren Radikalfängereigenschaften (Butković *et al.*, 2004). Genau wie die Hemmung der 15-LOX-1 nehmen diese Geschwindigkeitskonstanten nicht nur bei Vorhandensein einer Catecholstruktur im B-Ring, sondern auch bei Vorhandensein einer Pyrogallolstruktur im A-Ring wie im Baicalein deutlich zu (Butković *et al.*, 2004). So hat Quercetagenin, ein Flavonol mit Catecholstruktur im B-Ring und Pyrogallolstruktur im A-Ring, die höchste Geschwindigkeitskonstante. Bisher fanden andere Flavonoide mit ortho-ständigen Hydroxylgruppen im A-Ring in Untersuchungen zur Radikalfängereigenschaft keine Beachtung. Die Substituenten am A-Ring wurden letztlich ohne vorherige adäquate Testung von Substanzen wie Baicalein und Quercetagenin als von minderer Bedeutung für die Radikalfängereigenschaften angesehen. Die Geschwindigkeitskonstanten nehmen auch wie die Lipoxigenasehemmung bei Vorhandensein einer 2,3-Doppelbindung zu. Und abweichend von den bisher postulierten Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Radikalfängereigenschaften der Flavonoide ist die Geschwindigkeitskonstante für Luteolin höher als die des Quercetins. Damit scheint auch hier genauso wie bei der Hemmung der Lipoxigenasen ein Fehlen der Hydroxylgruppe in C₃-Position mit einer Verstärkung der Hemmung einherzugehen. Auch Myricetin mit seiner Pyrogallolstruktur im B-Ring war wie bei der Lipoxigenasehemmung weniger reaktiv als vergleichbare, im B-Ring nur mono- oder disubstituierte Flavonole. Insgesamt gibt es somit mehr Gemeinsamkeiten zwischen der 15-LOX-1-Hemmung durch Flavonoide und ihrer Reaktivität gegenüber DPPH- und BDPA-Radikalen als zwischen der 15-LOX-1-Hemmung und ihren Radikalfängereigenschaften, die zumeist im TEAC-Assay gemessen wurden.

Die antioxidative Wirkung der Polyphenole durch Hemmung der 15-LOX-1 zeigt eine Besonderheit gegenüber anderen Antioxidanzien: In der Regel verlieren Antioxidanzien ihre antioxidativen Eigenschaften nach Reaktion mit Oxidanzien wie beispielsweise Peroxynitrit. Zimtsäurederivate hingegen hemmten nach Reaktion mit Peroxynitrit die 15-LOX-1 sogar deutlich stärker als zuvor, und Epicatechin büßte nur einen Teil seiner inhibitorischen Aktivität gegenüber der 15-LOX-1 ein. Somit scheinen einige Polyphenole auch noch nach Reaktion mit Oxidanzien im erweiterten Sinne antioxidativ zu wirken, indem sie das prooxidative Enzym 15-LOX-1 hemmen. Diese Besonderheit verdeutlicht die multimodale Schutzwirkung der Polyphenole gegenüber oxidativem Stress. *In vivo* könnte es auch Wechselwirkungen zwischen der 15-LOX-1 und Stickstoffmonoxid bzw. Peroxynitrit geben. So könnte Stick-

stoffmonoxid, evtl. peroxynitrit-vermittelt, zur Aktivierung der 15-LOX-1 führen (Kühn und Borngräber, 1999; Coffey *et al.*, 2001; Schewe, 2002). Dabei könnte quasi lawinenartig das Gleichgewicht zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien zugunsten der Oxidanzien verschoben werden. In einem solchen System wären Zimtsäurederivate sehr effektive Regulatoren. Sie würden, solange nicht vermehrt Peroxynitrit in der Zelle entsteht, die physiologischen Aktivitäten der 15-LOX-1 innerhalb der Zelle nicht stören, würden aber beim oxidativem Stress durch vermehrte Produktion von Peroxynitrit dieses nicht nur abfangen, sondern auch gleichzeitig die unter diesen Bedingungen stimulierte prooxidative 15-LOX-1 hemmen.

4.4 Physiologische Relevanz der Lipoxygenasenhemmung durch Polyphenole der Nahrung

Nach dem Nachweis der Hemmung von Säugetier-Lipoxygenasen durch Polyphenole *in vitro* stellt sich die Frage nach ihrer physiologischen Relevanz. Diese ist unter anderem von der Bioverfügbarkeit der Polyphenole der Nahrung im Vergleich zu den IC₅₀-Werten der Polyphenole an den Lipoxygenasen abhängig.

Bei durchschnittlichen US-amerikanischen Ernährungsgewohnheiten scheint die Plasmakonzentration des einzelnen Flavonoids nicht höher als 1 µM zu sein (Scalbert *et al.*, 2000). Die Maximalkonzentration des Flavonoids wird 1-2 Stunden nach dem Verzehr erreicht (Aziz *et al.*, 1998; Hollman *et al.*, 1996; Rein *et al.*, 2000; Schramm *et al.*, 2001). Für die meisten Flavonoide fand sich eine Plasmahalbwertszeit von 1-2 Stunden. Werden bewusst polyphenolreiche Nahrungsmittel zugeführt, so kann die Konzentration des Flavonoids und seiner Konjugate aber auch deutlich höher als 1 µM sein. So wurde in mehreren klinischen Studien eine Plasmakonzentration eines ausgewählten Flavonoids und seiner Konjugate von etwa 5 µM beobachtet (Holt *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2000). Nach fünftägiger, täglicher oraler Gabe von 100 mg (-)-Epicatechin pro kg Körpergewicht an Ratten wurde sogar eine Plasmakonzentration an Epicatechin und seinen Metaboliten von 76 µM gefunden (Abd El Mohsen *et al.*, 2002). Diese Konzentrationen sind zum Teil deutlich höher als die IC₅₀-Werte vieler Flavonoide an der 15-LOX-1. Der IC₅₀ lag bei den wirksamsten Flavonoiden im submikromolaren Bereich. Daher scheint die enterale Resorption kein Hindernis einer möglichen Hemmung der Lipoxygenasen durch Polyphenole zu sein.

Epicatechin kann von Endothelzellen aufgenommen werden, was wahrscheinlich mit intrazellulären Proteinbindungen des Flavonoids einhergeht. Es ist dabei gegenüber oxidativen Stress durch Peroxynitrit stark zytoprotektiv wirksam (Schröder *et al.*, 2003). Kürzlich konnte auch eine Anreicherung von Quercetin in Erythrozyten nachgewiesen werden (Fiorani *et al.*, 2003). Die Quercetinkonzentration innerhalb der Erythrozyten lag dabei nach fünf-minütiger Inkuba-

tion in PBS mit 50 μM Quercetin bei $(410 \pm 18) \mu\text{M}$. Die Aufnahme des Quercetins in die Erythrozyten erfolgt wahrscheinlich durch passive Diffusion. Bei der Anreicherung in den Erythrozyten bindet der größte Teil des intrazellulär aufgenommenen Quercetins an Hämoglobin. Ein anderer Teil des Quercetins lagert sich an der Zellmembran der Erythrozyten an. Das in den Erythrozyten akkumulierte Quercetin bleibt biologisch aktiv und kann auch extrazelluläre Oxidationen transmembranös mittels einer Oxidoreduktase reduzieren (Fiorani *et al.*, 2002; Fiorani *et al.*, 2003). Erythrozyten könnten somit als Transportsystem für Quercetin und andere Flavonoide innerhalb des Körpers fungieren.

In situ und *in vivo* konnten mehrere Flavonoide wie Naringenin, Quercetin, (-)-Epicatechin und (-)-Epigallocatechingallat auch in Hirngewebe nachgewiesen werden (Suganuma *et al.*, 1998; Abd El Mohsen *et al.*, 2002; Youdim *et al.*, 2004).

Alle diese Ergebnisse machen eine Anreicherung von Flavonoiden in Zellen *in vivo* wahrscheinlich. Somit könnte die Bioverfügbarkeit der Flavonoide bisher unterschätzt worden sein, da ihre Bestimmung bisher nur auf Messung des Blutplasmaspiegels und der Urinkonzentration des Flavonoids beruht hat. Durch zelluläre Anreicherung könnten intrazelluläre Flavonoidkonzentrationen erreicht werden, die die 15-LOX-1 hemmen und somit intrazelluläre Lipidoxidationen verhindern oder intrazelluläre Regulationsmechanismen modulieren könnten. So wurde bereits gezeigt, dass der Schutz von dermalen Fibroblasten gegen oxidativen Stress durch Flavonoide *in vitro* in erster Linie von intrazellulären Metaboliten der Flavonoide abhängt (Spencer *et al.*, 2003).

Nach oraler Gabe von Kakao werden innerhalb von 24 Stunden $25,3 \pm 8,1 \%$ des insgesamt zugeführten Epicatechins im Urin wiedergefunden. Dabei finden sich außer Epicatechin auch Metabolite wie Glucuronide, Sulfoglucuronide und Sulfate des Epicatechins sowie Methyl-epicatechin (Baba *et al.*, 2000; Natsume *et al.*, 2003). Die schwache Wirksamkeit von 3'-Methyl(-)-epicatechin und Rutin ist ein Indiz dafür, dass diese Metabolite nicht wesentlich zur Hemmung der Lipoxygenasen im Organismus beitragen können. So könnten Flavonoide durch Glucuronidierung zu hydrophil für eine Interaktion mit dem hydrophoben aktiven Zentrum der Lipoxygenase werden oder durch Maskierung mittels Methylierung die Catecholgruppe verlieren, die die Hemmung der Lipoxygenase stark fördert.

Mit Kakao aufgenommene Procyanidindi- und -trimere sind im menschlichen Magen chemisch stabil und werden nicht depolymerisiert (Rios *et al.*, 2002). Die Procyanidin-Dimere können bereits 30 Minuten nach oraler Zufuhr in nanomolaren Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden, wohingegen höhere Procyanidine nicht resorbiert werden (Holt *et al.*, 2002; Gonthier *et al.*, 2003). Ein Teil der Procyanidin-Dimere scheint im Dünndarm zu Epicatechin hydrolysiert und dann resorbiert zu werden (Gonthier *et al.*, 2003). Damit erscheint

eine direkte physiologisch relevante Wirkung insbesondere der langkettigen Procyanidine, die *in vitro* hochpotente Hemmer der 15-LOX-1 sind, wenig wahrscheinlich.

Im Colon werden Flavonoide, auch die Procyanidine, durch die Darmflora zu Phenolcarbonsäuren metabolisiert (Rechner *et al.*, 2004). Diese Phenolcarbonsäuren werden im Colon resorbiert und finden sich dann im Urin wieder. So steigt nach oraler Gabe von procyanidinreicher Schokolade oder Quercetin der Gehalt des Urins an Phenolcarbonsäuren an (Rios *et al.*, 2003; Gonthier *et al.*, 2003). Die Hemmung der Lipoxygenasen durch Phenolcarbonsäuren muss daher bei Bewertung der Wirkungen von Flavonoiden bedacht werden.

4.5 Lipoxygenasen und Atherosklerose

Da Lipoxygenasen an der Pathogenese mehrerer weitverbreiteter Erkrankungen beteiligt zu sein scheinen, könnte ihre Hemmung medizinisch-therapeutisch genutzt werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Rolle von Lipoxygenasen in der Atherogenese. Möglicherweise gibt die 15-LOX-1 durch Oxidation von LDL den Anstoß zur Entwicklung der Atherosklerose und damit der häufigsten Todesursache in den meisten Industrieländern. Diese mögliche Rolle der 15-LOX-1 wird seit 1989 diskutiert (Parthasarathy *et al.*, 1989; Ylä-Herttuala *et al.*, 1990). Dabei finden sich sowohl Hinweise auf eine proatherogene, als auch auf eine antiatherogene Wirkung der 15-LOX-1 (Shen *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 1997; Kühn und Chan, 1997). Die wichtigsten Hinweise für eine proatherogene Wirkung der 15-LOX-1 sind:

1. Die 15-LOX-1 oxidiert Cholesteryllinoleat im LDL zu Cholesteryl-HpODE (Belkner *et al.*, 1993; Lass *et al.*, 1996; Belkner *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1997). In atherosklerotischen Läsionen des Menschen finden sich im Gegensatz zu unveränderten Gefäßabschnitten peroxidierte Lipide (Glavind *et al.*, 1952), vor allem Cholesteryl-HpODE (Kühn *et al.*, 1992). Hierbei überwiegt insbesondere im Frühstadium das S-Enantiomer der Cholesteryl-HpODE (Kühn *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1997). Die Stereoselektivität spricht für eine Beteiligung der 15-LOX-1 an der Atherogenese. Bei ausschließlich nicht-enzymatischer Lipidoxidation entstände ein Razemat.
2. In Aorten von Kaninchen mit Hypercholesterolämie ließ sich im Gegensatz zu Kontrolltieren 15-LOX-1-Aktivität nachweisen (Henriksson *et al.*, 1985; Simon *et al.*, 1989). Des Weiteren ließen sich bei Kaninchen *in vivo* in Gefäßabschnitten, in die 15-LOX-1-DNA transferiert worden war, Epitope oxidierten LDL's nachweisen, falls gleichzeitig eine leichte Hypercholesterolämie bestand (Ylä-Herttuala *et al.*, 1995).
3. In atherosklerotischen Läsionen des Menschen wurde über das Vorkommen der 15-LOX-1 und ihrer mRNA berichtet, wohingegen diese in nicht betroffenen Gefäßabschnitten nicht vorkommt (Ylä-Herttuala *et al.*, 1990).

4. Mit IL-4 und IL-13 behandelte Makrophagen oxidieren mehr LDL als mit INF- γ behandelte Makrophagen. IL-4 und IL-13 induzieren die 15-LOX-1-Synthese in Makrophagen. INF- γ hingegen supprimiert die 15-LOX-1 (Folcik *et al.*, 1997). In diesen Versuchen wurde auch gezeigt, dass die 15-LOX-1-Expression in Makrophagen allein nicht zur LDL-Oxidation ausreicht, sondern gleichzeitig mit einer Aktivierung der Makrophagen einhergehen muss.
5. Doppel-Knock-out-Mäuse, denen die 12/15-LOX und das ApoE fehlen, entwickeln weniger atherosklerotische Läsionen (Cyrus *et al.*, 1999).
6. LDL-Rezeptor-Knock-out-Mäuse mit Überexpression der 15-LOX-1 in Endothelzellen zeigen ein schnelleres Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion als Artgenossen ohne Überexpression (Harats *et al.*, 2000), wohingegen die Entwicklung der Atherosklerose bei LDL-Rezeptor-/15-LOX-1-Doppel-Knock-out-Mäusen verlangsamt ist (George *et al.*, 2001).
7. PD 146176, ein selektiver 15-LOX-1-Inhibitor ohne offensichtliche antioxidative Wirkung in Lipidperoxidationssystemen, verhinderte in Tierversuchen die Atherogenese (Sendobry *et al.*, 1997).
8. Durch Produktion von 12-HETE kann die 12/15-LOX die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen erhöhen. Verbunden hiermit ist eine Verstärkung der Monozytenadhäsion an das Endothel sowie die spontane Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Reilly *et al.*, 2004). Des Weiteren induziert 13-HpODE die Ausschüttung von MCP-1 durch glatte Gefäßmuskelzellen *via* NF- κ B (Dwarakanath *et al.*, 2004).

Der Mechanismus der möglichen Beteiligung der 15-LOX-1 an der Atherogenese ist unklar. Die 15-LOX-1 ist ein intrazelluläres Enzym. Daher würde eine direkte extrazelluläre Interaktion zwischen LDL und 15-LOX-1 eine Freisetzung des Enzyms aus zerstörten Zellen voraussetzen (Kühn *et al.*, 1997; Cathcart *et al.*, 2000). Eine Aufnahme von LDL in Makrophagen als Voraussetzung seiner Oxidation kann ausgeschlossen werden (Cathcart *et al.*, 1995; Tangirala *et al.*, 1996). Denkbare Mechanismen der LDL-Oxidation durch 15-LOX-1 wären daher:

1. Direkte Oxidation des LDL: Diese Möglichkeit erscheint unwahrscheinlich, da die 15-LOX-1 in der Regel intrazellulär vorkommt (Brinckmann *et al.*, 1998) und die LDL-Oxidation durch Makrophagen auch nicht die Aufnahme des LDL in die Makrophagen voraussetzt (Cathcart *et al.*, 1995; Tangirala *et al.*, 1996). Des Weiteren benötigt die *in vitro* LDL-Oxidation durch die 15-LOX-1 unphysiologisch hohe Enzymmengen (Kühn *et al.*, 1994).

2. Transfer von innerhalb der Zelle entstandenen Produkten an LDL: 15-LOX-1-Produkte extrazellulärer Linol- und Arachidonsäure finden sich nach Inkubation mit 15-LOX-1⁺-Makrophagen ebenfalls extrazellulär (Kühn und Chan, 1997). Dies bedeutet, dass die 15-LOX-1 ihre Katalyse entweder auch transmembranös durchführen kann, oder Makrophagen die 15-LOX-1-Produkte freisetzen können. Die Produkte könnten sich dann mit extrazellulärem LDL assoziieren.
3. Produkte der 15-LOX-1 könnten als intrazelluläre Mediatoren wirken und z.B. Makrophagen aktivieren oder die Produktion von freien Radikalen fördern (Schewe *et al.*, 1986; Yamashita *et al.*, 1999; Lass *et al.*, 1996). Es gibt Hinweise, dass auch andere 15-LOX-1-Produkte außer oxidiertem LDL die Schaumzellbildung fördern (Tontonoz *et al.*, 1998; Febbraio *et al.*, 1999).
4. Durch Konkurrenz um Substrat mit anderen Enzymen wie z.B. Cyclooxygenasen oder anderen Lipxygenasen könnte die 15-LOX-1 indirekt Regulationsmechanismen so verschieben, dass es zu einer verstärkten LDL-Oxidation kommt.
5. Die 15-LOX-1 könnte direkt die Membran der Makrophagen oxidieren und damit deren Eigenschaften verändern.
6. Die Lipxygenaseprodukte 12- und 15-HETE könnten als Liganden an PPAR- γ wirken und somit zur verstärkten Expression von CD₃₆ führen (Tontonoz *et al.*, 1998; George *et al.*, 2001). CD₃₆ ist ein wichtiger Rezeptor auf Makrophagen zur Aufnahme von oxidiertem LDL (Podrez *et al.*, 2000).

Diese Überlegungen sprechen für eine Beteiligung der 15-LOX an der Atherogenese. Sie deuten allerdings auch darauf hin, dass die Expression des Enzyms allein das Krankheitsgeschehen nicht induzieren kann. So scheint eine Hypercholesterolämie Voraussetzung für die Wirkung der Lipxygenase zu sein. Des Weiteren sind Interaktionen mit anderen Radikalbildnern in Betracht zu ziehen. Ein Modell für eine solche Interaktion *in vitro* ist die Verkürzung der lag-Phase der Cu²⁺-induzierten LDL-Oxidation nach Vorbehandlung mit 15-LOX-1 (Lass *et al.*, 1996).

Einige Forschungsgruppen zweifeln die proatherogene Rolle des oxidierten LDL und damit auch indirekt der 15-LOX-1 gänzlich an (Shen *et al.*, 1996; Cathcart *et al.*, 2000). Es bestehe die Möglichkeit, dass bisher Ursache und Wirkung vertauscht worden seien und die LDL-Oxidation ein Zeichen einer sich vollziehenden Immunabwehr und metabolischer Prozesse sei. Dann könnte die Expression der 15-LOX-1 ein Abwehrmechanismus gegen Atherosklerose sein (Kühn *et al.*, 1997; Kühn und Chan, 1997). Diese These wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

1. Cholesteryl-HpODE inaktiviert den platelet-derived growth factor (PDGF), den transforming growth factor und den fibroblast growth factor (van Heek *et al.*, 1998). Die Inaktivierung von PDGF könnte eine Protektion vor Atherosklerose bedeuten.
2. 13-HpODE inhibiert die Cyclooxygenase der Thrombozyten (Fujimoto *et al.* 1994) und erschwert somit die Thrombozytenaggregation (Coene *et al.*, 1986) sowie die Thrombozyten-Adhäsion an Endothelzellen (Simon *et al.*, 1989).
3. In Tierversuchen konnte bei Überexpression der 15-LOX-1 eine protektive Wirkung gegen Atherosklerose festgestellt werden (Shen *et al.*, 1996). Ihr könnte beispielsweise ein Entgegenwirken der 15-LOX-1 gegen die Fettablagerungen in Schaumzellen (Kühn *et al.*, 1997) oder eine erhöhte Synthese der antiphlogistisch wirkenden Lipoxine (Serhan *et al.*, 2003) zugrunde liegen.
4. In glatten Muskelzellen der Kaninchen-Aorta hemmt die 15-LOX-1 sowohl die basale als auch die IL-1-induzierte Expression von VCAM-1 (Banning *et al.*, 2004).
5. Nach Induktion der 15-LOX-1 mit IL-13 in Endothelzellen von Kaninchen-Aorten kommt es durch Synthese der Arachidonsäurederivate 11,12,15-Trihydroxyeicosatriensäure (THETA) und 15-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure (HEETA) zur Vasodilatation (Tang *et al.*, 2003).

Die zunächst unvereinbar erscheinenden Hinweise sowohl auf eine proatherogene als auch auf eine antiatherogene Wirkung der Lipoxxygenase könnten aus gegensätzlichen Wirkungen des Enzyms in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose herrühren. Die Lipoxxygenase könnte beispielsweise in frühen Stadien proatherogen und in späteren Stadien antiatherogen wirken (Kühn und Chan, 1997).

In jüngerer Zeit fanden sich auch Hinweise auf eine Beteiligung der 5-LOX an der Atherogenese. Denn die Ergebnisse Ylä-Herttuala *et al.* (1990), die Anfang der 90er Jahre den Anstoß zur intensiven Erforschung der zur Rolle der 15-LOX-1 in der Atherogenese gegeben hatten, konnten 2003 durch Spanbroek *et al.* nicht bestätigt werden. Diese fanden im Gegensatz zu Ylä-Herttuala *et al.* (1990) weder in unveränderten, noch in atherosklerotisch veränderten menschlichen Gefäßen 15-LOX-1-mRNA oder -Protein in signifikanter Menge. Stattdessen fanden sie jedoch 5-LOX-mRNA und -Protein sowie FLAP, das Aktivatorprotein der 5-LOX, in atherosklerotisch Läsionen in signifikant erhöhter Menge sowie eine positive Korrelation zwischen der nachgewiesenen Menge dieser Faktoren und dem Schweregrad der Läsion. Die 5-LOX fand sich in den atherosklerotischen Läsionen in Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Schaumzellen und neutrophilen Granulozyten. In frühen Stadien fanden sich diese Zellen in der Adventitia, beim Übergang in klinisch bemerkbare Stadien wanderten sie in

die Intima ein. Des Weiteren zeigen atherosklerose-resistente Mäusestämme eine deutlich verringerte Aktivität der 5-LOX (Kühn *et al.*, 2003).

Die 5-LOX könnte an der Regulation der Entzündungsprozesse im Rahmen der Atherosklerose unter anderem durch Synthese von Leukotrien B₄ wesentlich beteiligt sein (Aiello *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2003; Mehrabian und Allayee, 2003). Leukotrien B₄ konnte in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (De Caterian *et al.*, 1988). Es wird dabei unter anderem in Monozyten synthetisiert, die sich der Gefäßwand angelagert haben, und wirkt chemotaktisch auf Monozyten und Leukozyten, fördert ihre Adhäsion an Gefäßendothel und stimuliert die Superoxid-Produktion (Aiello *et al.*, 2002). Zur verstärkten Adhäsion an das Gefäßendothel kommt es dabei wahrscheinlich aufgrund einer Steigerung der Affinität der Monozyten-Oberfläche zu den Zelladhäsionsmolekülen VCAM-1/ β_1 -Integrin und ICAM-1/ β_2 -Integrin (Friedrich *et al.*, 2003). Folge dieser Veränderungen ist eine verstärkte Ansammlung von Makrophagen im subendothelialen Raum und damit letzten Endes verbunden eine vermehrte Schaumzellbildung mit Vergrößerung der atherosklerotischen Läsion (Mehrabian und Allayee, 2003).

Obwohl die Ergebnisse Ylä-Herttuala *et al.* (1990) nicht bestätigt werden konnten, lässt sich eine Beteiligung der 15-LOX-1 an der Atherogenese weiterhin nicht ausschließen. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen Ylä-Herttuala und Spanbroeks könnten z.B. folgende Punkte sein:

1. Eine Atherosklerose entwickelt sich über viele Jahre, unter Umständen schon seit der Geburt des Individuums, bevor sie klinisch in Erscheinung tritt. Spanbroek *et al.* könnten das Stadium, in dem die 15-LOX-1 für die Pathogenese relevant ist, verpasst haben.
2. 15-LOX-mRNA in atherosklerotischen Läsionen könnte vor der Testung bereits abgebaut worden sein oder durch mRNA aus 15-LOX-1-negativen Zellen zu stark verdünnt worden sein.
3. Die Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen stellen eine heterogene Gruppe von Subtypen dar. Die 15-LOX-1 könnte evtl. in nur einem dieser Subtypen vorhanden sein.
4. „Atherosklerose“ ist ein Oberbegriff für mehrere, bisher nur schwer zu differenzierende Formen chronischer Gefäßentzündungen. Es ist nicht auszuschließen, dass an der Pathogenese der einzelnen Formen unterschiedliche Lipoxygenasen in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt sind.

4.6 Schlussfolgerungen

Die *in vitro* nachgewiesene Hemmung der Säugetier-Lipoxygenasen durch Polyphenole könnte einer der molekularen Mechanismen der in vielen epidemiologischen Studien glaub-

haft gemachten gesundheitsförderlichen Wirkung von polyphenolreichen Nahrungsmitteln wie beispielsweise des Kakaos sein. So könnte die Senkung des Leukotrien/Prostazyklin-Verhältnisses nach Einnahme von Flavanolen des Kakaos (Schramm *et al.*, 2001) unter anderem durch eine Hemmung der 5-LOX verursacht werden.

Polyphenole können *in vitro* viele derzeit diskutierte Mechanismen der Atherogenese hemmen. So können sie *in vitro* einen großen Teil der Mechanismen der LDL-Oxidation hemmen, sie können aber auch durch Hemmung der 5-LOX entzündungshemmend wirken. Damit werden die klinischen Studien, in denen günstige Effekte der Polyphenole bei kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden konnten, durch eine große Zahl von *in vitro* Ergebnissen gestützt, die potenziell eine mechanistische Erklärung für diese klinischen Befunde geben könnten. Solange jedoch die zellulären und molekularen Mechanismen der Atherogenese nicht sicher geklärt worden sind, bleibt auch ungewiss, welchen Anteil die Hemmung von Lipxygenasen an der kardiovaskulär-protectiven Wirkung der Polyphenole hat.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Atherosklerose und dadurch bedingte Gefäßerkrankungen sind die häufigste Todesursache in Industrieländern. An der Genese der Atherosklerose könnte die Oxidation von Low-Density-Lipoprotein (LDL) durch prooxidative Enzyme, darunter die 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1), beteiligt sein. Lipoxygenasen sind nichthämeisen-haltige Dioxygenasen, die die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch molekularen Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen katalysieren. Das Risiko, an durch Atherosklerose verursachten kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken, scheint laut epidemiologischer Studien bei hoher Nahrungszufuhr von Polyphenolen, insbesondere Flavonoiden, vermindert zu sein. Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mindestens zwei Hydroxylgruppen und antioxidativen Eigenschaften. Die große und heterogene Subklasse der Flavonoide, einer Gruppe von O-Heterozyklen mit drei Ringsystemen, ist im Pflanzenreich und in der Nahrung ubiquitär.

Fragestellungen: 1. Können Polyphenole im physiologischen Milieu Säugetier-Lipoxygenasen hemmen? 2. Mit welchen Strukturvoraussetzungen und über welche Mechanismen wirken Polyphenole auf Lipoxygenasen?

Methodik: Die Aktivitäten der 15-Lipoxygenase aus Kaninchenretikulozyten und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurden oxygraphisch anhand des Sauerstoffverbrauchs und photometrisch bei 234 nm über die Entstehung konjugierter Diene gemessen. Die Messungen erfolgten mit und ohne Vorinkubation der Lipoxygenasen mit Polyphenolen variierender Konzentration in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,27 mM Kaliumlinoleat gestartet.

Ergebnisse: 1. Alle getesteten Flavonoide waren bei pH 7,4 Inhibitoren der 15-LOX-1, isoliert aus Kaninchen-Retikulozyten, wobei die Wirksamkeit stark variierte. Nur ein Teil der Flavonoide hemmte bei pH 7,4 auch die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. An der 15-LOX-1 waren die IC_{50} -Werte zumeist deutlich niedriger als an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Das Flavanol (-)-Epicatechin z.B. hemmte die 15-LOX-1 mit einem IC_{50} von 59 μM , war aber an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 unwirksam. Das Flavon Luteolin (IC_{50} 0,5 μM) war der wirksamste Inhibitor dieses Enzyms, gefolgt von Baicalein (1,6 μM), Fisetin (1,9 μM) und dem Flavonol Quercetin (3,8 μM).

2. Vergleichende Testung von 18 ausgewählten Flavonoiden ergab folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen der Flavonoide zur Hemmung der 15-LOX-1: (a) Eine Catecholgruppierung im Molekül verstärkt die Hemmung, ist aber für sie keine Voraussetzung. (b) Bei Vorhandensein einer Catecholgruppierung nimmt die Wirksamkeit mit der Anzahl der Hy-

droxylgruppen im Molekül ab. (c) Eine 2,3-Doppelbindung im C-Ring verstärkt die Wirkung der Flavonoide auf Lipoxygenasen.

3. Unter den Oligomeren der Flavanoide, den Procyanidinen, waren die langkettigen Vertreter (Hexamer bis Dekamer) sowohl an der 15-LOX-1, als auch an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 überraschenderweise wirksamer als (-)-Epicatechin und die kurz- und mittelkettigen Procyanidine. Die Dekamer-Fraktion der Procyanidine aus Kakaobohnen hemmte die 15-LOX-1 dosisabhängig mit einem IC_{50} von 0,8 μM .

4. Andere Polyphenole, darunter Phenolcarbonsäuren (z.B. Kaffeesäure), Stilbene (z.B. Resveratrol), Lignane (z.B. NDGA) und Cumarine (z.B. Esculetin) erwiesen sich ebenfalls als Lipoxygenasehemmer.

5. Das Flavonol Quercetin modifizierte die Aktivität der 15-LOX-1 in drei Charakteristika: (a) Verlängerung der lag-Phase. (b) Verringerung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit („Soforthemmung“). (c) Verstärkung der zeitabhängigen Enzyminaktivierung.

6. Aufgrund der Komplexität der Lipoxygenase-Hemmung gehorchte die Wirkung des Quercetins weder einer kompetitiven noch einer nicht-kompetitiven Hemmung.

7. Die zeitabhängige Enzyminaktivierung durch Quercetin fand nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Quercetin, Linoleat und Sauerstoff statt. Daher könnte sie mit einer kombinierten Wirkung von Quercetin und Intermediaten des katalytischen Zyklus auf das aktive Zentrum des Enzyms im Zusammenhang stehen.

8. Bei Senkung des Hydroperoxidtonus durch Glutathion-Peroxidase und Glutathion wurden nicht nur erwartungsgemäß die Lipoxygenaseaktivitäten partiell gehemmt, sondern zugleich auch die Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin aufgehoben. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung oxidativer Prozesse oder intermediärer Oxidationsprodukte an der Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin sein.

9. Komplexierung der Catecholgruppierung des Quercetins mit Fe^{3+} führte zu einer leichten Wirkungsverstärkung des Quercetins. Dies spricht gegen eine Komplexierung des Enzymeisens im aktiven Zentrum als primäre Ursache der Enzymhemmung, wie sie bei anderen Polyphenolen (4-Nitrocatechol) bekannt ist und in vergleichenden Untersuchungen auch bestätigt wurde.

10. Durch Umsetzung mit Peroxynitrit wurde die Hemmwirkung von Zimtsäurederivaten auf die 15-LOX-1 dramatisch verstärkt. So sank der IC_{50} der Kaffeesäure an der 15-LOX-1 nach Reaktion mit Peroxynitrit von 1000 μM auf 7,8 μM . Dagegen verlor (-)-Epicatechin durch Umsetzung mit Peroxynitrit einen Teil seiner inhibitorischen Wirkung auf die 15-LOX-1 (IC_{50} vor Reaktion 59 μM , danach formaler IC_{50} 100 μM).

11. (-)-Epicatechin schützte die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 effektiv vor Nitrierungen ihrer Tyrosylreste durch Peroxynitrit. Es schützte das Enzym hingegen kaum vor Inaktivierung durch Peroxynitrit, die anscheinend oxidativ und nicht nitrierend erfolgt.

12. 0,33 μM (-)-Epicatechin, Procyanidin-Dimer oder Procyanidin-Nonamer verlängerten die lag-Phase der kupferioneninduzierten LDL-Oxidation. 0,33 μM Procyanidin-Nonamer, nicht jedoch 1 μM Epicatechin oder Procyanidin-Dimer hemmten die 15-LOX-1-katalysierte LDL-Oxidation.

Schlussfolgerungen:

1. Die Hemmung von Lipoxygenasen könnte zur kardiovaskulär-protectiven Wirkung von Nahrungs-Polyphenolen beitragen.
2. Die Hemmung der Lipoxygenasen durch Polyphenole erfolgt durch direkte Wechselwirkung des Wirkstoffs mit dem Enzym. Sie ist nicht auf die Radikalfängereigenschaften zurückzuführen und nicht allein mit einer Komplexierung des Enzym-Eisens umfassend erklärbar.

6. Literaturverzeichnis

- 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.
- Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J. Biol. Chem.* 2000a; 275:37524-37532.
- Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2000b; 275:5425-5430.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone J F, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. 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.
- Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B₄ receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443-449.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 1987; 262:5592–5595.
- American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 13. Ed., New York, USA, 1971.
- Arteel GE, Sies H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett* 1999; 462:167-170.
- Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno des 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.
- Arts ICW, Hollman PCH, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 1999; 354:488.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:892-904.
- Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van der Woude H, van Zanden J, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett* 2002; 520:30-34.
- Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. Structure–activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:398-408.

- Aziz AA, Edwards CA, Lean MEJ, Crozier A. Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 1998; 29:257-269.
- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Rad Res* 2000; 33:635-641.
- Balla G, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: A possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:1700-1711.
- Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002; 106:544-549.
- Banning A, Schnurr K, Böhl GF, Kupper D, Müller-Schmehl K, Vita H, Ylä-Herttuala S, Brigelius-Flohé R. Inhibition of basal and IL-1 induced VCAM-1 expression by phospholipid hydroxide glutathione peroxidase and 15-lipoxygenase in rabbit aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:135-144.
- Barter PJ, Brewer Jr HB, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:160-167.
- Behl C, Holsboer F. Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1998; 66:113-121.
- Belkner J, Stender H, Kühn H. The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E. *J Biol Chem* 1998; 273:23225-23232.
- Belkner J, Wiesner R, Rathman J, Barnett J, Sigal E, Kühn H. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. *Eur J Biochem* 1993; 213:251-261.
- Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:707-727.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85:1260-1266.
- Bertoldi M, Gonsalvi M, Voltattorni CB. Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of Dopa decarboxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:90-93.
- Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002; 252:283-294.
- Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NHP, van Iersel MLPS, van Bladeren PJ, Rietjens IMCM. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol* 2002; 15:662-670.

- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 2000; 13:135-160.
- Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70:1191-1197.
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10316-10320.
- Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1901-1909.
- Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999; 274:23679-23682.
- Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, Lim LL, Shi W, Hazen SL, Jacob JS, Crowley JR, Heinecke JW, Lusis AJ. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest* 2001; 107:419-430.
- Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kühn H. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* 1998; 91:64-74.
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 1998; 330:1173-1178.
- Butković V, Klasinc L, Bors W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *J Agric Food Chem* 2004; 52:2816-2820.
- Byun J, Mueller DM, Fabjan JS, Heinecke JW. Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1999; 455:243-246.
- Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:441-449.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity-relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:749-760.
- Carr AC, Frei B. Human neutrophils oxidize low-density lipoprotein by a hypochlorous acid-dependent mechanism: the role of vitamin C. *Biol Chem* 2002; 383:627-636.
- Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1716-1723.
- Cathcart MK, Folcik VA. Lipoxygenases and atherosclerosis: protection versus pathogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1726-1734.

- Cathcart MK, Li Q, Chisolm GM III. Lipoprotein receptor interactions are not required for monocyte oxidation of LDL. *J Lipid Res* 1995; 36:1857-1865.
- Chen K, Shane R, Keaney Jr JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2003; 35:117-132.
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999; 79:362-372.
- Coene MC, Bult H, Claeys M, Laekeman GM, Herman AG. Inhibition of rabbit platelet activation by lipoxygenase products of arachidonic and linoleic acid. *Thromb Res* 1986; 42:205-214.
- Coffey MJ, Natarajan R, Chumley PH, Coles B, Thimmalapura PR, Nowell M, Kühn H, Lewis MJ, Freeman BA, O'Donnell VB. Catalytic consumption of nitric oxide by 12/15-lipoxygenase: Inhibition of monocyte soluble guanylate cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8006-8011.
- Cohn J. Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:19-24
- Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791.
- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 1999; 103:1597-1604.
- da Silva EL, Tsushida T, Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch Biochem Biophys* 1998; 349:313-20.
- da Silva EL, Abdallah DSP, Terao J. Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *IUBMB Life* 2000; 49:289-295.
- Darley VS, Mar, VM, Hogg H, O'Leary VJ, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human LDL. *Free Radic Res Commun* 1992; 17:19-26.
- 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.
- Day AJ, Cañada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MRA, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000; 468:166-170.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998; 436:71-75.
- Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Rémésy C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr* 2001; 131:1753-1757.
- Dubiel W, Rapoport SM. ATP-dependent proteolysis of mitochondria in reticulocytes. *Revis Biol Cellular* 1989; 21:505-521.

- Dwarakanath RS, Sahar S, Reddy MA, Castanotto D, Rossi JJ, Natarajan R. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor- κ B (NF- κ B). *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:585-595.
- Egmond MR, Brunori M, Fasella PM. The steady-state kinetics of the oxygenation of linoleic acid catalysed by soybean lipoxygenase. *Eur J Biochem* 1976; 61:93-100.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, Silverstein RL. A null mutation in murine CD₃₆ reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 1999; 274:19055-19062.
- Ferroni F, Maccaglia A, Pietraforte D, Turco L, Minetti M. Phenolic antioxidants and the protection of low density lipoprotein from peroxynitrite-mediated oxidations at physiologic CO₂. *J Agric Food Chem* 2004; 52:2866-2874.
- Fiorani M, Accorsi A, Cantoni O. Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free Rad Res* 2003; 37:1331-1338.
- Fiorani M, De Sanctis R, De Bellis R, Dachà M. Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:64-72.
- Folcik VA, Aamir R, Cathcart MK. Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1954-1961.
- Folsom AR, Pankow JS, Tracy RP, Arnett DK, Peacock JM, Hong Y, Djousse L, Eckfeldt JH; Investigators of the NHBLI Family Heart Study. Association of C-reactive protein with markers of prevalent atherosclerotic disease. *Am J Cardiol* 2001; 88:112-117.
- Francis GA, Mendez AJ, Bierman EL, Heinecke JW. Oxidative tyrosylation of high density lipoprotein by peroxidase enhances cholesterol removal from cultured fibroblasts and macrophage foam cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6631-6635.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem* 1995; 43:890-894.
- Friedrich EB, Tager AM, Liu E, Pettersson A, Owman C, Munn L, Luster AD, Gerszten RE. Mechanisms of leukotriene B₄-triggered monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1761-1767.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:549-554.
- Fujimoto Y, Sumiya T, Tsunomori M, Nishida H, Sakuma S, Fujita T. Effect of 13-hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid (13-HPODE) on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets. *Int J Biochem* 1994; 26:127-131.
- Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb JW. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry* 1991; 30:10133-10140.

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:242-250.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002; 177:91-104.
- Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000; 130:2765-2771.
- George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2001; 104:1646-1650.
- Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE, Dam H. Role of lipoperoxidases in human pathology, Part 2: The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1952; 30:1-6.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:333-337.
- Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, Scalbert A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radic Biol Med* 2003; 35:837-844.
- Goss SPA, Hogg N, Kalyanaraman B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1997; 272:21647-21653.
- Grune T, Klotz LO, Gieche J, Rudeck M, Sies H. Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1243-1253.
- Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase. Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ. Res.* 2000; 86:e85-e90.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.
- Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 1991a; 42:569-605.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991b; 91:14S-22S.
- Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47:490-496.
- Hänsel R, Stichler O, Steinegger E. Flavonoide. In: *Pharmakognosie – Phytopharmazie* (Hänsel R, Stichler O, Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Deutschland, 1999; 818-841.
- Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2100-2105.

- Hazell LJ, Davies MJ, Stocker R. Secondary radicals derived from chloramines of apolipoprotein B-100 contribute to HOCl-induced lipid peroxidation of low-density lipoproteins. *Biochem J* 1999; 339:489-495.
- Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 1993; 290:165-172.
- Hazell LJ, VanDenBerg JJM, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than by lipid oxidation. *Biochem J* 1994; 302:293-304.
- Heijnen CGM, Haenen GRMM, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res* 2002; 36:575-581.
- Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986; 77:757-761.
- Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* 1993; 34:2051-2061.
- Heinecke JW, Li W, Daehnke III HL, Goldstein JA. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268:4069-4077.
- Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 1993; 91:2866-2872.
- Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74:1890-1894.
- Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulphur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:10098-10103.
- Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998; 141:1-15.
- Henriksson P, Hamberg M, Diczfalussy U. Formation of 15-HETE as a major hydroxyeicosatetraenoic acid in the atherosclerotic vessel wall. *Biochim Biophys Acta* 1985; 834: 272-274.
- Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 1993; 334:170-174.
- Hogg N, Struck A, Goss SPA, Santanam N, Joseph J, Parthasarathy S, Kalyanaraman B. Inhibition of macrophage-dependent low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. *J Lipid Res* 1995; 36:1756-1762.
- Hollman PCH, v. d. Gaag M, Mengelers MJB, van Trijp JMP, de Vries JHM, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:703-707.

- Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B₂ [epicatechin-(4β-8-)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:798-804.
- Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, Freeman BA. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem* 1999; 274:4985-4994.
- Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction – study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radic Res* 2003; 37:481-489.
- Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356:1-11.
- Izumi T, Rådmark O, Samuelsson B. Purification of 15-lipoxygenase from human leukocytes, evidence for the presence of isozymes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991; 21A:101-104.
- Jimi S, Saku K, Uesugi N, Sakata N, Takebayashi S. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995; 116:15-26.
- Jones RL, Qian YM, Wise H, Wong HN, Lam WL, Chan HW, Yim AP, Ho JK. Relaxant actions of nonprostanoid prostacyclin mimetics on human pulmonary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29:525-535.
- Junjun W, Yiyi Z, Xiaozhuan L, Daning C. The in vivo oxidized LDL to LDL-cholesterol ratio is correlated with lipid content of LDL. *Atherosclerosis* 2000; 149:217-218.
- Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94:771-778.
- Kelavkar UP, Cohen C, Kamitani H, Eling TE, Badr KF. Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis* 2000; 21:1777-1787.
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1992; 38:2066-2072.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:560-568.
- Kodama T, Reddy P, Kishimoto C, Krieger M. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988; 85:9238-9242.
- Koppenol WH, Kissner R, Beckman JS. Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol* 1996; 269:296-302.

- 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.
- Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Pennan M, Resnick D. Molecular flypaper, host defence, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 1993; 268:3546-3554.
- Krinsky NI. Overview of lycopene, carotenoids and disease prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 218:95-97.
- Kühn H, Anton M, Gerth C, Habenicht A. Amino acid differences in the deduced 5-lipoxygenase sequence of CAST atherosclerosis-resistance mice confer impaired activity when introduced into the human ortholog. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1072-1076.
- Kühn H, Belkner J, Wiesner R, Schewe T, Lankin VZ, Tikhaze AK. Structure elucidation of oxygenated lipids in human atherosclerotic lesions. *Eicosanoids* 1992; 5:17-22.
- Kühn H, Belkner J, Zaiss S, Fahrenklemper T, Wohlfeil S. Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J Exp Med* 1994; 179:1903-1911.
- Kühn H, Borngräber S. Mammalian 15-lipoxygenases: enzymatic properties and biological implications. *Adv Exp Med Biol* 1999; 447:5-28.
- Kühn H, Chan L. The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis. Pro- and/or antiatherogenic action. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8:111-117.
- Kühn H, Götze R, Schewe T, Rapoport SM. Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin. A model for lipoxygenases. *Eur J Biochem* 1981; 120:161-168.
- Kühn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C. In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99:888-893.
- Kühn H, Pönicke K, Schewe T, Förster W. The possible biological importance of lipoxygenase pathway in aorta endothelial cells. *Biomed Biochim Acta* 1984; 43:S304-306.
- Kühn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999; 449:7-11.
- Kühn H. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog Lipid Res* 1996; 35:203-226.
- LaRosa CA, Rohrer MJ, Benoit SE, Rodino LJ, Barnard MR, Michelson AD. Human neutrophil cathepsin G is a potent platelet activator. *J Vasc Surg* 1994; 19:306-319.
- Lass A, Belkner J, Esterbauer H, Kühn H. Lipoxygenase treatment renders low-density lipoprotein susceptible to Cu²⁺-catalysed oxidation. *Biochem J* 1996; 314:577-585.
- Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP, Heinecke JW. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* 1997; 272:1433-1436.
- Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:12040-12044.

- Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(*S*)-hydroxy-5,8,11-*cis-trans*-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 1993; 92:1572-1579.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.
- Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850.
- Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 169:203-214.
- Lowe GDO, Yarnell JWG, Rumley A, Bainton D, Sweetnam PM. C-reactive protein, fibrin D-dimer, and incident ischemic heart disease in the Speedwell study. Are inflammation and fibrin turnover linked in pathogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:603-610.
- Ludwig P, Holzhütter HG, Colosimo A, Silvestrini MC, Schewe T, Rapoport SM. A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur J Biochem* 1987; 168:325-337.
- Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294:829-834.
- Marathe GK, Davies SS, Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, Prescott SM, Zimmermann GA, McIntyre TM. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999; 274: 28395-28404.
- Maron DJ. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Current Atherosclerosis Reports* 2004; 6:73-78
- Mazur A, Bayle D, Lab C, Rock E, Rayssiguier Y. Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1999; 145:421-422.
- Mehrabian M, Allayee H. 5-Lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:447-457.
- Middleton Jr E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751.
- Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. *Circulation* 1992; 86:1165-1170.
- Moini H, Guo Q, Packer L. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich French maritime pine bark extract pycnogenol: effect on xanthine oxidase. *J Agric Food Chem* 2000; 48:5630-5639.
- Morel I, Cillard P, Cillard J. Flavonoid-metal interactions in biological systems. In: *Flavonoids in health and disease* (Rice-Evans CA, Packer L, Ed.), Marcel Dekker, New York, USA, 1997; 163-177.
- Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:243-253.

- Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994; 267:H2441-H2449.
- Murugesan G, Sa G, Fox PL. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1994; 74:1149-1156.
- Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakumura Y, Osawa T, Terao J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:840-849.
- Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88:2039-2046.
- Nigam S, Schewe T. Phospholipase A₂s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488:167-181.
- Noguchi N, Yamashita H, Hamahara J, Nakamura A, Kühn H, Niki E. The specificity of lipoxygenase-catalyzed lipid peroxidation and the effects of radical-scavenging antioxidants. *Biol Chem* 2002; 383:619-626.
- O'Connell BJ, Genest J. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001; 104:1978-1983.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:479-491.
- Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044:275-283.
- Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoproteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86:1046-1050.
- Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants *J Nat Prod* 2000; 63:1035-1042.
- Pocathikorn A, Granath B, Thiry E, Van Leuven F, Taylor R, Mamotte C. Influence of exonic polymorphisms in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003; 168:115-121.
- Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein R, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000; 105:1095-1108.
- Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that

- serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002; 277: 38503-38516.
- Praticò D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, Trapjanowski JQ, Lee VMY. 12/15-Lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease. Possible involvement in brain oxidative stress. *Am J Pathol* 2004; 164:1655-1662.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/HADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.
- Rajavashisth TB, Andallibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344:254-257.
- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999; 274:11924-11929.
- Rapoport SM, Schewe T, Thiele BJ. Maturation breakdown of mitochondria and other organelles in reticulocytes. In: *Blood Cell Biochemistry*; Vol. 1: *Erythroid Cells* (Harris JR, Ed.), Plenum Press, New York 1990; 151–194.
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SKS, Moore KP, Rice-Evans CA. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:212-225.
- Reid VC, Mitchinson MJ. Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis* 1993; 98:17-24.
- Reilly KK, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, Vandenhoff G, Pei H, Natarajan K, Nadler JL, Hedrick CC. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis *in vivo*. *J Biol Chem* 2004; 279:9440-9450.
- 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 antioxidant capacity. *J Nutr* 2000; 130:2109S-2114S.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure–antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:933-956.
- Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation* 2001; 103:491-495.
- Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Rémésy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:1106-1110.

- 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.
- Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. Screenig of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm* 1988; 40:451-458.
- Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 1990; 248:1009-1012.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
- Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:791-804.
- Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys* 1995; 324:15-25.
- 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.
- Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 102:1682-1689.
- Savenkova MI, Mueller DM, Heinecke JW. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1994; 269:20394-20400.
- Scalbert A, Deprez S, Mila I, Albrecht AM, Huneau JF, Rabot S. Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors* 2000; 13:115-120.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130:2073S-2085S.
- Schewe C, Klöcking R, Helbig B, Schewe T. Lipoxygenase-inhibitory action of antiviral polymeric oxidation products of polyphenols. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50:299-305.
- Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett* 1975; 60:149-152.
- Schewe T, Kühn H, Sies H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J Nutr* 2002; 132:1825-1829.
- Schewe T, Rapoport SM, Kühn H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1986; 58:191-272.
- Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001; 382:1687-1696.
- Schewe T. 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol Chem* 2002; 383:365-374.
- Schmitt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu W, Salomon RG, Chen Y, Chisolm, GM, Hazen, SL. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological cata-

- lysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry* 1999; 38:16904-16915.
- Schnurr K, Kühn H, Rapoport SM, Schewe T. 3,5-Di-t-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) and probucol stimulate selectively the reaction of mammalian 15-lipoxygenase with biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1254:66–72.
- Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German J B, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:36-40.
- 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.
- 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.
- Seino Y, Ikeda U, Yamamoto k, Misawa Y, Hasegawa T, Kano S, Shimada K. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 1994; 6:87-91.
- Sendobry SM, Corcinelli JA, Welch K, Bocan T, Tait B, Trivedi BK, Colbry N, Dyer RD, Feinmark SJ, Daugherty A. Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol* 1997; 120:1199-1206.
- Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. Dark chocolate may offer its consumers health benefits the milk variety cannot match. *Nature* 2003; 424:1013.
- Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, Colgan SP, Stahl GL, Merched A, Petasis NA, Chan L, Van Dyke TE. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. *J Immunol* 2003; 171:6856-6865.
- Shen J, Henderick E, Cornhill JF, Zsigmond E, Kim HS, Kühn H, Guevara NV, Chan L. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest* 1996; 98:2201-2208.
- Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, Gokce N, Keaney JF, Penn MS, Sprecher DL, Vita JA, Hazen SL. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003; 289:1675-1680.
- Sies H, Krinsky NI. The present status of antioxidant vitamins and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1229S-1300S.
- Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 1997; 272:27812-27817.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91:31S-38S.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993 215:213-219.

- Sies, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: *Oxidative Stress* (H. Sies, Ed.), Academic Press, London, UK, 1985; 1–8.
- Simon TC, Makheja AN, Bailey JM. The induced lipoxygenase in atherosclerotic aorta converts linoleic acid to the platelet chemorepellant factor 13-HODE. *Thromb Res* 1989; 55:171-178.
- Spaapen LJM, Verhagen J, Veldink GA, Vliegenthart JFG. Properties of a complex of Fe(III)-soybean lipoxygenase-1 and 4-nitrocatechol. *Biochim Biophys Acta* 1980; 617:132-140.
- Spanbroek R, Gräbner R, Lötzer K, Hildner M, Urbach A, Rühling K, Moos MPW, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kühn H, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJR. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:1238-1243.
- Spencer JPE, Kuhnle GGC, Williams RJ, Rice-Evans CA. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. *Biochem J* 2003; 372:173-181.
- Steinberg D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine* 2002; 8:1211-1217.
- 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.
- Steinberg D, Witztum JL. In: *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (Chien KR, Ed.), W.B. Saunders, Philadelphia, USA, 1999; 458–475.
- Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002; 105:2107-2111.
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:3883-3887.
- Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989; 30:305-315.
- Steinbrecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem* 1987; 262:3603-3608.
- Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y, Ito H, Fujiki H. Wide distribution of [³H](–)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 1998; 19:1771-1776.
- Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1996; 13:73-88.
- Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158:879-891.

- Tamagaki T, Sawada S, Imamura H, Tada Y, Yamasaki S, Toratani A, Sato T, Komatsu S, Akamatsu N, Yamagami M, Kobayashi K, Kato K, Yamamoto K, Shirai K, Yamada K, Higaki T, Nakagawa K, Tsuji H, Nakagawa M. Effects of high-density lipoproteins intracellular pH and proliferation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 1996; 123:73-82.
- Tang X, Spitzbarth N, Kühn H, Chaitidis P, Campbell WB. Interleukin-13 Upregulates Vasodilatory 15-Lipoxygenase Eicosanoids in Rabbit Aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1768-1774.
- Tangirala RK, Mol MJ, Steinberg D. Macrophage oxidative modification of low density lipoprotein occurs independently of its binding to the low density lipoprotein receptor. *J Lipid Res* 1996; 37:835-843.
- Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:1367-1369.
- Thomas CE. The influence of medium components on Cu(2+)-dependent oxidation of low-density lipoproteins and its sensitivity to superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1128:50-57.
- Thorin E, Hamilton C, Dominiczak AF, Dominiczak MH, Reid JL. Oxidized-LDL induced changes in membrane physico-chemical properties and $[Ca^{2+}]_i$ of bovine aortic endothelial cells. Influence of vitamin E. *Atherosclerosis* 1995; 114:185-195.
- Tipping PG, Hancock WW. Production of TNF and IL-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* 1993; 142:1721-1728.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93:241-252.
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral antiinflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68:119-125.
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:1197-1202.
- Upston JM, Neuzil J, Stocker RJ. Oxidation of LDL by recombinant human 15-lipoxygenase: evidence for alpha-tocopherol-dependent oxidation of esterified core and surface lipids. *J Lipid Res* 1996; 37:2650-2661.
- Upston JM, Neuzil J, Witting PK, Alleva R, Stocker R. Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, α -tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters. *J Biol Chem* 1997; 272:30067-30074.
- Upston JM, Niu X, Brown AJ, Mashima R, Wang H, Senthilmohan R, Kettle AJ, Dean RT, Stocker R. Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 2002; 160:707-710.
- van Acker SABE, Bast A, van der Vijgh WJF. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In: *Flavonoids in health and disease* (Rice-Evans CA, Packer L, Eds.). Marcel Dekker, New York, USA, 1997; 221-251.

- van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:331–342.
- van het Hof KH, de Boer HS, Wiseman SA, Lien N, Weststrate JA, Tijburg LB. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:1125–1132.
- Verstraeten SV, Kenn CL, Schmitz HH, Frage CG, Oteiza PI. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:84–92.
- Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 3630–3634.
- Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 2001; 131:2648-2652.
- Walther M, Holzhütter HG, Kuban RJ, Wiesner R, Rathmann J, Kühn H. The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *Mol Pharmacol* 1999; 56:196-203.
- Wang X, Tian W. Green tea epigallocatechin gallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:1200–1206.
- Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of HDL associated paraoxonase – Inhibition of the biological activity of minimally oxidized LDL. *J Clin Invest* 1995; 95:2882-2891.
- Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence *in vivo*. *J Biol Chem* 1997; 272:13597–13607.
- Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, La Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized LDL. *J Clin Invest* 1995; 95:774-782.
- Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fitó M, Tomas M, Senti M, Bruguera J, Marrugat J, the SOLOS Study Investigators. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 168:99-106
- Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem* 1993; 268:6288-6292.
- Wiesner R, Suzuki H, Walther M, Yamamoto S, Kühn H. Suicidal inactivation of the rabbit 15-lipoxygenase by 15S-HpETE is paralleled by covalent modification of active site peptides. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:304-315.

- Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:434-456.
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344:793-795.
- Yamashita H, Nakamura A, Noguchi N, Niki E, Kühn H. Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals. *FEBS Lett* 1999; 445:287-290.
- Yates MT, Lambert LE, Whitten JP, McDonald I, Mano M, Ku G, Mao SJ. A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS Lett* 1992; 309:135-138.
- Ylä-Herttuala S, Luoma J, Viita H, Hiltunen T, Sisto T, Nikkari T. Transfer of 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95:2692-2698.
- Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum JL, Steinberg D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6959-6963.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:592-604.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdottir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandstrom B, Dragsted LO. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:87-94.
- Zhang HF, Yang YH, Steinbrecher UP. Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268:5535-5542.
- Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286:2136-2142.
- Zhang Y, Dawson VL, Dawson TM. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2000; 7:240-250.
- Zsila F, Bikádi Z, Simonyi M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and the molecular modeling methods. *Biochem Pharmacol* 2003; 65:447-456.

7. Abkürzungen

DTPA	Diethylentriaminopentaessigsäure
EC	(-)-Epicatechin
GPx	Glutathionperoxidase
LOX	Lipoxygenase
15-LOX-1	15-Lipoxygenase-1
Sojabohnen-LOX	Sojabohnen-Lipoxygenase L-1
NDGA	Nordihydroguajaretsäure
PBS	phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung
PN	Peroxynitrit
RNS	reaktive Stickstoff-Spezies
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies

8. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität meinen Dank aussprechen. Ich konnte mich bei Problemen jederzeit an alle wenden und erhielt immer Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt hier meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Sies und natürlich meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Schewe. Sie nahmen mich als Doktoranden an und gaben mir immer wieder Hilfestellung. Mit ihrer eigenen Leidenschaft für die Forschung verstanden sie es immer wieder, mich neu zu motivieren.

9. Lebenslauf

Name:	Christian David Sadik
Geburtsdatum/-ort:	6. Juli 1979, Mönchengladbach
Familienstand:	ledig
<u>Schulbildung:</u>	
1986-1990	Grundschulbesuch
1990-1998	Gymnasialbesuch; Abiturnote: 1,1
<u>Studium der Medizin:</u>	
1998-2004	Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
08/2000	Ärztliche Vorprüfung, Note: sehr gut
03/2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut
09/2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut
12/2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: sehr gut; Approbation als Arzt
<u>Anstellung:</u>	
Seit 01/2005	Wissenschaftlicher Assistent am Pharmazentrum Frankfurt

Düsseldorf, den 25.01.2005

Zusammenfassung: „Polyphenole als Lipoxxygenaseinhibitoren: Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsmechanismus“

Hintergrund: Atherosklerose ist die häufigste Todesursache in Industrieländern. An der Genese der Atherosklerose könnte die Oxidation von LDL durch prooxidative Enzyme, wie die 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1), beteiligt sein. Lipoxygenasen sind nichthämeisen-haltige Dioxygenasen, die die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch molekularen Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen katalysieren. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, verursacht durch Atherosklerose, scheint aufgrund epidemiologischer Studien bei hoher Zufuhr von Polyphenolen mit der Nahrung, vor allem Flavonoiden, vermindert zu sein.

Fragestellungen: 1. Können Polyphenole im physiologischen Milieu Lipoxygenasen hemmen? 2. Welche Strukturvoraussetzungen hat die Lipoxygenasenhemmung durch Polyphenole, und über welche Mechanismen erfolgt sie.

Methodik: Die Aktivitäten der 15-LOX-1, isoliert aus Kaninchen-Retikulozyten, und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wurden oxygraphisch anhand des O_2 -Verbrauchs oder photometrisch über die Entstehung konjugierter Diene gemessen. Die Messungen erfolgten mit und ohne Vorinkubation der Lipoxygenasen mit Polyphenolen variierender Konzentration in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,27 mM Kaliumlinoleat gestartet.

Ergebnisse:

1. Alle getesteten Flavonoide hemmten bei pH 7,4 die 15-LOX-1. Die Mehrzahl von ihnen hemmte auch die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Die Wirksamkeit der einzelnen Flavonoide variierte stark und war an der 15-LOX-1 meist höher als an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1. Das Flavanol (–)-Epicatechin z.B. hemmte die 15-LOX-1 mit einem IC_{50} von 59 μM , war aber an der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 unwirksam. Der wirksamste Inhibitor der 15-LOX-1 war Luteolin (IC_{50} = 0,5 μM), gefolgt von Baicalein (1,6 μM), Fisetin (1,9 μM) und Quercetin (3,8 μM).
2. Testung von 18 Flavonoiden ergab folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen der Flavonoide hinsichtlich der Hemmung der 15-LOX-1: (a) Eine Catecholgruppierung im Molekül verstärkt die Hemmung. (b) Bei Vorhandensein einer Catecholgruppierung nimmt die Wirksamkeit mit der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül ab. (c) Eine 2,3-Doppelbindung im C-Ring verstärkt die Hemmung. Damit unterscheiden sich die Struktur-Wirkungsbeziehungen der 15-LOX-1-Hemmung durch Flavonoide von den Struktur-Wirkungsbeziehungen der Radikalfängereigenschaften der Flavonoide.
3. Unter den Procyanidinen, den Oligomeren der Flavanole, waren die langkettigen Vertreter (Hexamer bis Dekamer) an der 15-LOX-1 und der Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 wirksamer als die kurz- und mittelkettigen und (–)-Epicatechin. Die Dekamer-Fraktion der Procyanidine hemmte die 15-LOX-1 mit einem IC_{50} von 0,8 μM .
4. Andere Polyphenole, wie Phenolkarbonsäuren (z.B. Kaffeesäure), Stilbene (Resveratrol), Lignane (NDGA) und Cumarine (Esculetin) waren ebenfalls Lipoxygenasehemmer.
5. Das Flavonol Quercetin modifizierte die Aktivität der 15-LOX-1 auf dreierlei Weise: (a) Verlängerung der lag-Phase. (b) Verringerung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit („Soforthemmung“). (c) Verstärkung der zeitabhängigen Enzyminaktivierung.
6. Eine zeitabhängige Enzyminaktivierung durch Quercetin fand nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Quercetin, Linoleat und Sauerstoff statt. Daher könnte sie durch eine kombinierte Wirkung von Quercetin und Zwischenprodukten des katalytischen Zyklus verursacht sein.
7. Bei Senkung des Hydroperoxidtonus durch Glutathion-Peroxidase plus Glutathion wurden nicht nur erwartungsgemäß die Aktivitäten der Lipoxygenasen partiell gehemmt, sondern zugleich auch die Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin aufgehoben. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung oxidativer Prozesse oder intermediärer Oxidationsprodukte an der Hemmung der 15-LOX-1 durch Quercetin sein.
8. Quercetin hemmte auch nach Komplexierung seiner Catecholgruppierung mit Fe^{3+} die Lipoxygenasen. Dies spricht gegen eine Komplexierung des Enzymsens im aktiven Zentrum als primäre Ursache der Enzymhemmung.

Schlussfolgerungen:

1. Die Hemmung von Lipoxygenasen könnte zur kardiovaskulär-protectiven Wirkung von Nahrungs-Polyphenolen beitragen.
2. Die Hemmung der Lipoxygenasen durch Polyphenole erfolgt durch direkte Wechselwirkung mit dem Enzym. Sie ist nicht auf die Radikalfängereigenschaften der Polyphenole zurückzuführen.

