

Technische Universität München
Department für Lebensmittel und Ernährung
Lehrstuhl für Ernährungslehre

**Einfluss von Antioxidantien auf die Oxidation
von Low Density Lipoproteinen (LDL)**

Vera Yeomans

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Cerny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. (komm.) Dr. med. Günther Wolfram, em.
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Erich F. Elstner

Die Dissertation wurde am 10.01.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.02.2002 angenommen.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Günther Wolfram, der mir die Anfertigung der vorliegenden Dissertation ermöglichte, danke ich herzlich für die wissenschaftliche Anleitung und freundliche Unterstützung. Durch seine wertvollen Anregungen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei allen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Ernährungslehre für ihre Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken. Danke auch an alle Freiwilligen, die mir immer wieder ihr Blut zur Verfügung stellten und so zahlreiche Versuchsreihen ermöglichten. Herrn Dr. Dr. habil. Jakob Linseisen danke ich für seinen Rat und seine konstruktive Kritik bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Erich F. Elstner für dessen Gastfreundschaft und stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen. Er ermöglichte mir die Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz in seinem Labor. Ich danke ihm und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Phytopathologie, ganz besonders auch Frau Dr. Johanna Grassmann, für ihre Hilfsbereitschaft.

Danke auch an die Mitarbeiter des 'Antioxidant Research Centre' des King's College London für die herzliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich mich auch noch bei meinem Freund Dirk Ott bedanken für die Hilfe bei computer- oder kopiertechnischen Problemen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Annemarie und Jürgen Yeomans, die mir durch ihre Unterstützung diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
<hr/>	
2 Material und Methoden	6
<hr/>	
2.1 Material	6
2.1.1 Reagenzien	6
2.1.2 Geräte	6
<hr/>	
2.2 Analytik	8
2.2.1 LDL-Isolierung und –Analyse	8
2.2.1.1 Plasmagewinnung	8
2.2.1.2 Präparation von Lipoproteinen durch Ultrazentrifugation	8
2.2.1.3 Proteinbestimmung	11
2.2.2 LDL-Oxidation in vitro	12
2.2.2.1 Bildung konjugierter Diene	12
2.2.2.2 Tryptophanfluoreszenz	14
2.2.2.3 Carbonylgruppenbildung	16
2.2.2.4 Zeitlicher Verlauf von Dienkonjugation, Tryptophanfluoreszenz und Carbonylgruppenbildung während kupfer-induzierter LDL-Oxidation	18
2.2.2.5 Einfluss verschiedener Parameter auf die Oxidationsresistenz von Low Density Lipoproteinen	20
2.2.3 Bestimmung der Antioxidantienkonzentrationen in den LDL-Präparationen mittels HPLC	24
2.2.3.1 Tocopherolbestimmung	24
2.2.3.2 Quercetin- und Kaffeesäurebestimmung	26
<hr/>	
2.3 Versuchsbeschreibungen	30
2.3.1 Studie 1: Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen Konzentration 31	30
2.3.2 Studie 2: Bestimmung des α -Tocopherol-, Quercetin- und Kaffeesäuregehalts der LDL- Präparationen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation	32

2.3.3 Studie 3: Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	33
2.3.4 Studie 4: Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate	35
2.3.5 Studie 5: Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	37
2.4 Statistische Auswertung	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Einfluss von α-Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	39
3.1.1 Dienkonjugation	39
3.1.2 Tryptophanfluoreszenz	46
3.1.3 Carbonylgruppenbildung	49
3.2 Bestimmung des α-Tocopherol-, Quercetin- und Kaffeesäuregehalts der LDL-Präparationen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation	53
3.2.1 α -Tocopherolgehalt in den LDL-Präparationen	53
3.2.2 Quercetiningehalt in den LDL-Präparationen	54
3.2.3 Kaffeesäuregehalt in den LDL-Präparationen	55
3.3 Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	57
3.4 Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate	63
3.5 Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	74

4 Diskussion	83
4.1 Studie 1: Einfluss von α-Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	83
4.2 Studie 2: Konzentrationen von α-Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure in den Low Density Lipoproteinen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation	96
4.3 Studie 3: Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	98
4.4 Studie 4: Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate	112
4.5 Studie 5: Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen	124
5 Zusammenfassung	129
6 Literaturverzeichnis	133
Anhang	A1

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
BSA	Rinderserumalbumin
CuCl ₂	Kupferchlorid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	Korrekturfaktor
GSH	Glutathion-Sulphydryl
GSSG	Oxidiertes Glutathion
HCL	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	Reinstwasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High performance liquid chromatographie
ISTD	Interner Standard
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteine geringer Dichte)
MEAN	Mittelwert
n	Anzahl
NaBr	Natriumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NAD(P)H	reduzierte Form von NAD(P)
NaOH	Natronlauge
p	Signifikanz-Niveau
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines LDL-Partikels (Voet and Voet, 1992).....	2
Abb. 2: Grundstruktur der Flavonoide.....	3
Abb. 3: Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide (Rechner et al., 2001).....	4
Abb. 4: Graphische Bestimmung der lag-phase humaner LDL während kupfer-induzierter Oxidation.....	13
Abb. 5: Verlust der Tryptophanfluoreszenz während kupfer-induzierter LDL-Oxidation	15
Abb. 6: Beispiel für den zeitlichen Verlauf von Dienkonjugation, Tryptophanfluoreszenz und Carbonylgruppenbildung während kupfer-induzierter Oxidation von LDL bei vorliegender Untersuchung.....	18
Abb. 7: Verlauf der Dienkonjugation von Kontroll-LDL (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation der fünf Versuchsteilnehmer	20
Abb. 8: Verlauf der Tryptophanfluoreszenz von Kontroll-LDL der beiden Versuchsteilnehmer (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation	23
Abb. 9: Verlauf der Carbonylgruppenbildung von Kontroll-LDL der fünf Versuchsteilnehmer (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation	23
Abb. 10: HPLC-Profil von α -Tocopherol bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 2).....	25
Abb. 11: Gradientenprofil zur Trennung von Quercetin und Kaffeesäure	27
Abb. 12: HPLC-Profil von Quercetin bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 3)	28
Abb. 13: HPLC-Profil von Kaffeesäure bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 3).....	28
Abb. 14: Versuchsablauf bei der Konzentrationsbestimmung von α -Tocopherol, Kaffeesäure und Quercetin	33
Abb. 15: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit unterschiedlichen Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)	39
Abb. 16: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	40

Abb. 17: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit einer Kombination eines Polyphenols mit α -Tocopherol oder Ascorbinsäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) (Kombinationen mit α -Tocopherol dunkelblaue Balken; Kombinationen mit Ascorbinsäure hellblaue Balken).....	41
Abb. 18: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit unterschiedlichen Kombinationen der Polyphenole, im Vergleich zur Kontrolle (100 %, LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	42
Abb. 19: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Vorinkubation von Plasma mit α -Tocopherol und/oder Inkubation der LDL mit Ascorbinsäure (Kupferkonzentration 5 oder 16,6 μ M).....	44
Abb. 20: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen während kupfer-induzierter Oxidation	46
Abb. 21: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen während kupfer-induzierter Oxidation	47
Abb. 22: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit α -Tocopherol und/oder Ascorbinsäure während Kupferoxidation	48
Abb. 23: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit Antioxidantien während kupfer-induzierter Oxidation.....	49
Abb. 24: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen während kupfer-induzierter Oxidation	50
Abb. 25: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit α -Tocopherol und/oder Ascorbinsäure während kupfer-induzierter Oxidation	51
Abb. 26: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation einer Kombination aus drei verschiedenen Antioxidantien während Kupferoxidation.....	52
Abb. 27: α -Tocopherolgehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen	53
Abb. 28: Quercetingehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen	54
Abb. 29: Kaffeesäuregehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen	55
Abb. 30: Antioxidantiengehalt (%) in den LDL während kupfer-induzierter Oxidation nach Inkubation mit einer Kombination von α -Tocopherol, Quercetin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure.....	56

Abb. 31: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; n=2), nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen (Endkonzentration 1 μ M), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	57
Abb. 32: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; n=2), nach Inkubation mit Quercetin und Kaffeesäure (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau; in unterschiedlichen Konzentrationen), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	58
Abb. 33: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; n=2), nach Inkubation mit Quercetin, p-Cumarsäure und Dopamin (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	59
Abb. 34: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; n=2), nach Inkubation mit Kaffeesäure und Kaempferol (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)	60
Abb. 35: Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle), nach Vorinkubation von Plasma (Person 1) mit Quercetin und/oder Kaffeesäure	61
Abb. 36: Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle), nach Vorinkubation von Plasma (Person 2) mit Quercetin und/oder Kaffeesäure	62
Abb. 37: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Ferulasäure.....	63
Abb. 38: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3), nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M).....	64
Abb. 39: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Dihydroferulasäure.....	65
Abb. 40: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dihydroferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M)	65
Abb. 41: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Isoferulasäure	66
Abb. 42: Veränderung der lag-phase von LDL (n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Isoferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M)	67
Abb. 43: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von o-Hydroxyhippursäure	68

Abb. 44: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von o-Hydroxyhippursäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M).....	68
Abb. 45: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Vanillinsäure.....	70
Abb. 46: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Hippursäure.....	71
Abb. 47: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von 3-Hydroxybenzoesäure	71
Abb. 48: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure	72
Abb. 49: Veränderung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen (Konzentration 1 μ M), im Vergleich zur Kontrolle (100%; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	73
Abb. 50: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Zinkhistidin) während kupfer-induzierter Oxidation	74
Abb. 51: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Histidin) während kupfer-induzierter Oxidation	75
Abb. 52: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Zinksulfat) während kupfer-induzierter Oxidation.....	75
Abb. 53: Beispielhafter Verlauf (n=2) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Zinkhistidin.....	77
Abb. 54: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=2) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zinkhistidin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M).....	77
Abb. 55: Beispielhafter Verlauf (n=2) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Histidin.....	78
Abb. 56: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=2) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Histidin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μ M).....	79
Abb. 57: Beispielhafter Verlauf (n=2) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Zinksulfat	80

Abb. 58: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit Histidin, Quercetin und Kaffeesäure (allein oder in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau) im Vergleich zur Kontrolle (100 %, ohne Zusatz von Antioxidantien)	82
Abb. 59: Chemische Struktur der in Studie 1 verwendeten Testsubstanzen	84
Abb. 60: Mögliche synergistische Wirkung von α -Tocopherol, Polyphenolen und Ascorbinsäure während LDL-Oxidation (nach Laranjinha und Cadenas (1999), Cossins et al. (1998), Vieira et al. (1998), Laranjinha et al. (1995), Fuhrman und Aviram (2001))	91
Abb. 61: Darstellung der chemischen Struktur der in Studie 3 getesteten Substanzen	98
Abb. 62: Stabilisierung des Phenoxyradikals durch die Delokalisierung des ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring (Shahidi und Wanasundara, 1992).....	101
Abb. 63: Bindungsstellen für Übergangsmetalle bei Flavonoiden (Pietta, 2000).....	104
Abb. 64: Allgemeines Schema der Oxidation von Kaffeesäure durch Kupferionen (Nardini et al., 1995).....	104
Abb. 65: Darstellung der chemischen Struktur von Quercetin und Kaffeesäure	108
Abb. 66: (A) Möglicher Biosyntheseweg von Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroferulasäure und Vanillinsäure aus Chlorogensäure. (B) Möglicher Biosyntheseweg von 3-Hydroxyhippursäure aus Polyphenolen (Rechner et al., 2001)	113
Abb. 67: Chemische Struktur der in Studie 4 getesteten Substanzen	115
Abb. 68 : Mechanismus der prooxidativen Wirkung von Ferulasäure während kupfer-induzierter Oxidation (Bourne und Rice-Evans, 1997)	119
Abb. 69: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Ferulasäure und Isoferulasäure durch die Delokalisierung des ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring	121

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräteparameter zur Messung der Tryptophanfluoreszenz während kupfer-induzierter LDL-Oxidation	15
Tab. 2: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von α -Tocopherol.....	25
Tab. 3: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Quercetin und Kaffeesäure.....	27
Tab. 4: Korrekturfaktoren für die Berechnung der Quercetin- und Kaffeesäurekonzentrationen	29
Tab. 5: Versuchsbedingungen (Studie 1).....	30
Tab. 6: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 1)	31
Tab. 7: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 2)	32
Tab. 8: Versuchsbedingungen für Studie 3.....	34
Tab. 9: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 3)	34
Tab. 10: Versuchsbedingungen für LDL-Oxidation nach Vorinkubation von Plasma.....	35
Tab. 11: Versuchsbedingungen für Studie 4.....	35
Tab. 12: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 4)	36
Tab. 13: Versuchsbedingungen für Studie 5.....	37
Tab. 14: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 5)	38
Tab. 15: Konzentration der Testsubstanzen (Studie 5).....	38
Tab. 16: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (in %; MEAN und SD; n=5) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....	43
Tab. 17: Konzentration von Quercetin und Kaffeesäure in den dialysierten LDL nach Inkubation von Plasma mit Quercetin und/oder Kaffeesäure (Endkonzentration im Plasma 100 μ M) .	61
Tab. 18: Veränderung der lag-phase von LDL (in Minuten; MEAN \pm SD), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusatz von Antioxidantien)	69

Tab. 19: Veränderung der lag-Phase von LDL (Minuten; MEAN \pm SD), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusatz von Antioxidantien)	80
---	-----------

Anhangstabellen

- Tab. A1:** Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 1; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....**A1**
- Tab. A2:** Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 2; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....**A3**
- Tab. A3:** Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 3; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....**A5**
- Tab. A4:** Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 4; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....**A7**
- Tab. A5:** Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 5; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien).....**A9**
- Tab. A6:** Fluoreszenzintensität (% des höchsten Wertes, MEAN \pm SD) von LDL (n = 2), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien, zu unterschiedlichen Zeitpunkten während kupfer-induzierter Oxidation.....**A11**
- Tab. A7:** Carbonylgehalt (nmol Carbonyl/mg Protein; MEAN \pm SD) humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit unterschiedlichen Antioxidantien**A12**
- Tab. A8:** Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle) nach Inkubation mit Quercetin, Kaffeesäure und strukturverwandten Substanzen.....**A13**
- Tab. A9:** Veränderung der lag-phase von LDL (%) inkubiert mit Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroferulasäure oder o-Hydroxyhippursäure (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (100 %).....**A13**
- Tab. A10:** Veränderung der lag-phase von LDL (% MEAN \pm SD) inkubiert mit Zinkhistidin, Zinksulfat oder Histidin (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (100 %).....**A13**

1 Einleitung

Freie Radikale werden definiert als Spezies, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (Aruoma, 1994). Freie Radikale sind äußerst reaktionsfähig, und ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und endogenen Antioxidantien führt zu oxidativem Stress. Als Schutz vor Radikalschädigung besitzt der Körper ein komplexes Abwehrsystem bestehend aus wasser- und fettlöslichen Antioxidantien und den Enzymen Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase. Bei der Entstehung einer Reihe von Erkrankungen wie Krebs, Katarakt oder auch Arteriosklerose scheinen freie Radikale beteiligt zu sein (Aruoma, 1994).

Radikale initiieren beim Zusammentreffen mit Nichtradikalen eine Kettenreaktion. Bekanntestes und wichtigstes Beispiel ist der Angriff von Hydroxylradikalen auf ungesättigte Fettsäuren. Geschieht dies in Membranen, wird von den ungesättigten Fettsäuren Wasserstoff abgespalten und es verbleibt ein Kohlenstoffradikal, das die Lipidperoxidation startet. Die Lipidperoxidation, wenn sie mit einem radikalischen Mechanismus in Blutgefäßen auftritt und fortschreitet, scheint mit großer Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung der Arteriosklerose und schließlich an Infarkt oder Schlaganfall beteiligt zu sein (Pfannhauser, 1997).

Obwohl die Übertragbarkeit der Ergebnisse von in vitro Untersuchungen auf den Menschen kritisch beurteilt werden muss, so können diese Modelle aber dennoch helfen, die Mechanismen in vivo besser zu verstehen. Das am häufigsten verwendete in vitro Modell ist die kupfer-induzierte Peroxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL) (Pinchuk et al., 2001). Dabei reagieren bereits existierende Peroxide mit Kupferionen unter Bildung von Peroxylradikalen, die dann wiederum die Oxidation der LDL initiieren (Parthasarathy et al., 1998). Normalerweise liegen Metallionen beim gesunden Menschen in Speicher- und Transportformen vor, in denen sie nicht in der Lage sind, Oxidationsreaktionen zu katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1990). Eine Gewebeschädigung kann aber zur Freisetzung von Eisen oder Kupfer führen (Croft, 1998) (Halliwell, 1996). So konnten Kupferionen in atherosklerotischen Läsionen beim Menschen nachgewiesen werden (Evans et al., 1995).

In diesem Zusammenhang darf auch eine mögliche prooxidative Wirkung von α -Tocopherol oder Flavonoiden nicht vernachlässigt werden (Yamanaka et al., 1997, Kontush et al., 1996, Fukumoto und Mazza, 2000). Sind freie Metallionen bei diesem Mechanismus beteiligt, könnte die prooxidative Wirkung auch in vivo eine Rolle spielen.

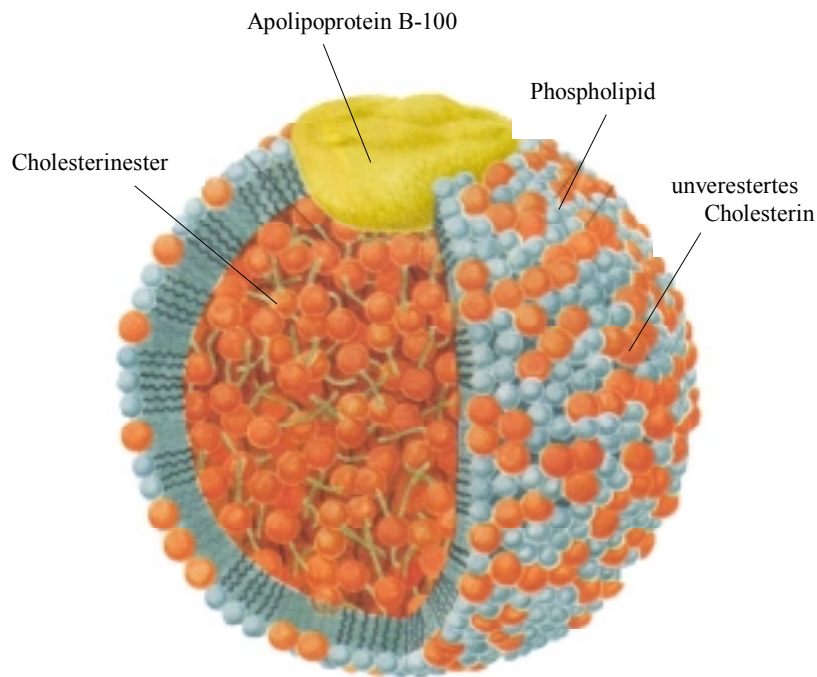


Abb. 1: Schematische Darstellung eines LDL-Partikels (Voet und Voet, 1992)

Menschliche LDL sind Plasmalipoproteine mit einer geringen Dichte ($d=1,019-1,063$) (Abb. 1) (Steinberg et al., 1989). Nach Esterbauer et al. (1992) bestehen die LDL aus etwa 22 % Phospholipiden, 6 % Triglyceriden, 10 % freiem Cholesterin und 42 % Cholesterolestern. Die Cholesterolester und die Triglyceride bilden den lipophilen Kern der LDL. Dieser Kern ist umgeben von Phospholipiden und freiem Cholesterol. Der polare Teil der Phospholipide befindet sich an der Oberfläche der LDL und trägt zur Löslichkeit im wässrigen Medium bei (Esterbauer et al., 1992). Die Hälfte der Fettsäuren sind mehrfach ungesättigt, davon etwa 86 % Linolsäure, 12 % Arachidonsäure und 2 % Docosahexaensäure (Esterbauer und Ramos, 1996). Das Apolipoprotein B stellt mit etwa 22 % den Proteinanteil der LDL dar und ist eingebettet in die äußere Schicht der LDL (Abb. 1) (Esterbauer et al., 1992, Esterbauer et al., 1993).

Bei der kupfer-induzierten LDL-Oxidation wird die Reaktion von Cu(II) mit LDL durch Antioxidantien verhindert, die in der Lage sind die Metallionen zu komplexieren oder eine Kettenreaktion abubrechen (Patel et al., 1997, Halliwell und Gutteridge, 1990). Um aber eine Kettenreaktion zu verhindern, muss das dabei entstehende Radikal reaktionsträge sein, wie beispielsweise das Tocopheryloxylradikal (Esterbauer und Ramos, 1996).

Allgemein werden Antioxidantien definiert als Substanzen, die verglichen mit dem zu oxidierenden Substrat in einer niedrigeren Konzentration vorhanden sind und die Oxidation dieses Substrats signifikant verzögern oder verhindern (Halliwell und Gutteridge, 1990).

Die Gruppe der phenolischen Antioxidantien umfasst einen großen Bereich pflanzlicher Inhaltstoffe, die alle einen aromatischen Ring mit einem oder mehreren Hydroxysubstituenten besitzen. Sie kommen überwiegend in Form von Glykosiden vor, also an einen Zuckerrest gebunden. Die Flavonoide sind die größte Gruppe der Phenole und bestehen aus zwei Phenolresten verbunden über einen heterozyklischen Ring (Abb. 2). Die wichtigsten Untergruppen stellen die Anthocyane, Flavone, Flavanone, Flavanole und Chalkone dar (Bors et al., 1990).

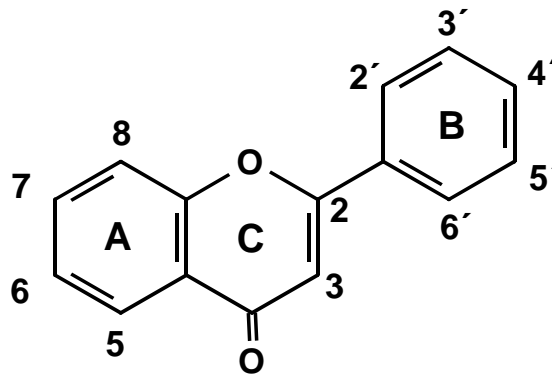


Abb. 2: Grundstruktur der Flavonoide

Bereits im Jahr 1936 beobachteten Rusznyak und Szent-Györgyi (1936) und Bentsath et al. (1936), dass einige Flavonoide in der Lage sind, die Gefäßpermeabilität zu beeinflussen und bezeichneten sie damals als Vitamin P. Diese Bezeichnung wurde allerdings im Jahre 1950 aufgehoben und durch Bioflavonoide ersetzt (Leibovitz und Mueller, 1993). Aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung haben die Flavonoide und Phenolsäuren aber gerade in den letzten Jahren immer größeres Interesse erlangt.

Die Hydroxyzimtsäuren sind zentrale Verbindungen der Biosynthese von Polyphenolen in der Pflanze (Abb. 3) und werden über den Shikimate-Pathway aus Phenylalanin oder Tyrosin gebildet (Rechner et al., 2001, Foley et al., 1999). Die einfachen Phenolsäuren, Zimtsäure und ihre Derivate sind weit verbreitet in der Pflanzenwelt, und wichtige Vertreter dieser Gruppe sind p-Cumar- oder Kaffeesäure (Foley et al., 1999). Durch eine Oxidation der Seitenkette entstehen Derivate der Benzoessäure (Croft, 1998).

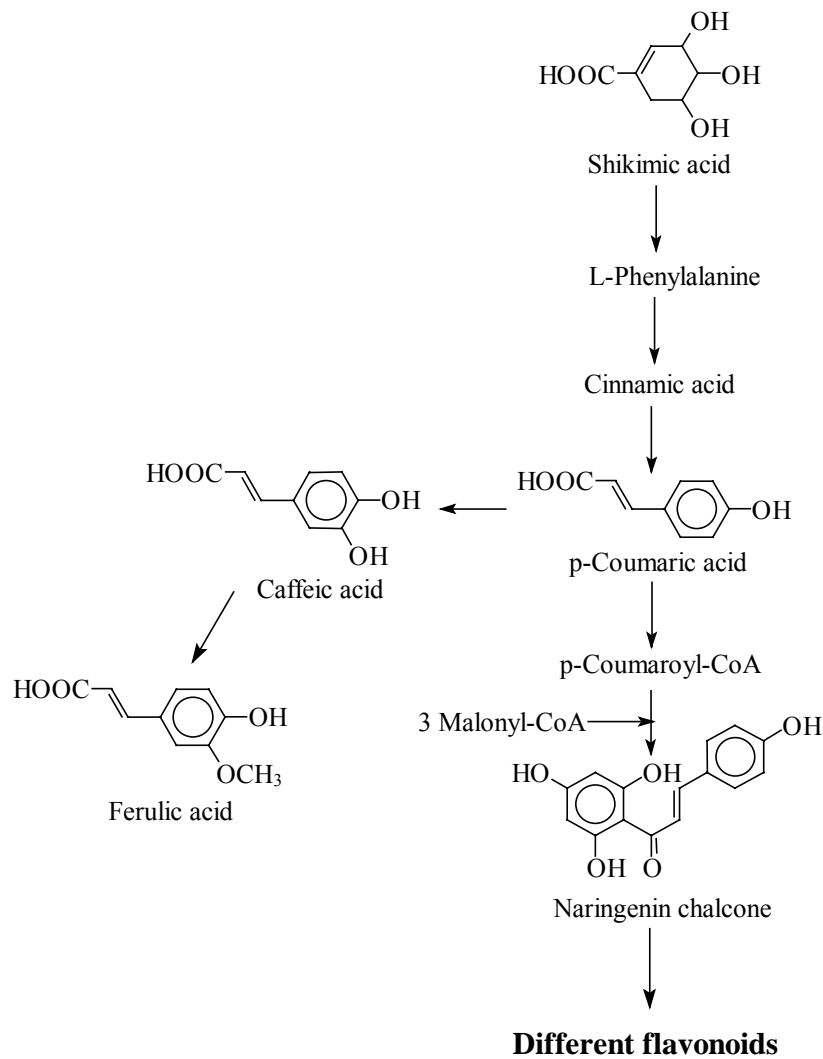


Abb. 3: Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide (Rechner et al., 2001)

Immer wieder werden anhand von in vitro Untersuchungen neue antioxidativ wirksame Substanzen in Lebensmitteln entdeckt. Diese werden mit der Nahrung zugeführt, mehr oder weniger gut absorbiert und verteilen sich entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften unterschiedlich in den hydrophilen, schwach hydrophoben und lipophilen Systemen.

Auch den Polyphenolen als sekundären Pflanzenstoffen werden antioxidative und antikanzerogene Wirkungen zugesprochen; dies konnte anhand zahlreicher in vitro Untersuchungen gezeigt werden (Carbonneau et al., 1997, Kerry und Abbey, 1997, Schroeter et al., 2000, Fito et al., 2000). Wenig ist dagegen über die antioxidative Wirkung von Phenolsäuren oder Flavonoiden in Kombination mit anderen antioxidativ wirksamen Substanzen, wie Vitamin E oder C bekannt.

In dem ersten Teil der vorliegenden Untersuchung (Studie 1) sollte der Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation untersucht werden. Die Antioxidantien wurden einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen auf ihre antioxidative Wirkung getestet. Die Kinetik der Lipidperoxidation wurde durch die Bildung konjugierter Diene verfolgt. Die Fragmentierung des Apolipoprotein B während LDL-Oxidation wurde durch den Verlauf der Tryptophanfluoreszenz und die Bildung von Carbonylgruppen gemessen.

In Studie 2 sollte der Konzentrationsverlauf von α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure während kupfer-induzierter Oxidation beobachtet werden. Die LDL wurden mit unterschiedlichen Kombinationen von α -Tocopherol, Quercetin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure inkubiert, anschließend wurden die Konzentrationen der einzelnen Antioxidantien zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

In Studie 3 wurde der in Studie 1 beobachtete Synergieeffekt von Quercetin und Kaffeesäure näher untersucht. Dazu wurden LDL mit Quercetin und Kaffeesäure und strukturverwandten Substanzen inkubiert und der Einfluss auf die kupfer-induzierte Dienkonjugation verglichen. Neben Quercetin und Kaffeesäure wurde die antioxidative Aktivität von Kaempferol, p-Cumarsäure und Dopamin untersucht.

In Studie 4 sollten verschiedene Kaffeesäurederivate auf ihre antioxidative Aktivität getestet werden. Diese Untersuchung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rechner et al. (2001) durchgeführt und es wurden Substanzen getestet, die von Rechner et al. (2001) nach Kaffeekonsum im Urin von Testpersonen identifiziert wurden.

Der Zink-Histidin-Komplex findet bei der Zinksubstitution eine immer größere Bedeutung (Schopf, 2000). In Studie 5 sollte nun untersucht werden, ob Zinkhistidin auch antioxidative Eigenschaften besitzt. Plasma, angereichert mit Zink und Histidin in der Form von Zinkhistidin, könnte so einen erhöhten Schutz für LDL vor Oxidation darstellen. Die Wirkung von Zinkhistidin, Zinksulfat und Histidin auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation wurde untersucht und miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Albumin, Bovine (Sigma A-4503, Lot 77H0701)

Chloramphenicol (Sigma C-0135)

2,4-Dinitrophenylhydrazin, p.A. (Merck 103081)

EDTA (Sigma ED4SS)

Ethanol, p.A. (Baker 8006)

Ethylacetat, Lichrosolv (Merck 100868)

Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma F-9252)

n-Heptan, p.A. (Merck 104379)

Kaliumnatriumtartrat, p.A. (Merck 108087)

Kupfer(II)-chlorid (Fluka 61173)

Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.A. (Merck 102790)

Lauryl Sulfate (Sigma L-4509)

Methanol, Lichrosolv (Merck 106007)

Natriumbromid, reinst (Merck 106360)

Natriumchlorid, p.A. (Fluka 71381)

Na_2CO_3 , p.A. (Merck 106392)

Natriumhydroxid, p.A. (Merck 106498)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.A. (Merck 106580)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, p.A. (Merck 106346)

Salzsäure, 32%ig p.A. (Merck 100319)

2.1.2 Geräte

Analysenwaage AT 261 DeltaRange (Mettler GmbH, Gießen)

Fluorescence Spectrophotometer Hitachi Modell F-4500

HPLC-Degasser Liliput (Gynkotek GmbH, Germering/München)

HPLC-Detektor UV/VIS UVD 170 S (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Detektor UV/VIS UVD 340 S (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Dilutor 401 C (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
HPLC-Probengeber Gina 50 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Pumpe M 480 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Pumpe P 580 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Sampling Injektor 231 XL (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
HPLC-Säulenthermostat STH 585 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
HPLC-Software Gynkosoftware Version 4.32 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
Kühlzentrifuge Sigma 2K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode)
Magnetrührer IKA-Combimag RET (Janke & Kunkel GmbH u. Co KG, Staufen)
Photometer UV/VIS Spektrometer Lambda 2S (Perkin Elmer GmbH, Bodenseewerk)
pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim i. OB)
Rotationsverdampfer Rotavapor-R114 (Büchi, Konstanz)
Schüttelwasserbad 3047 (Kottermann, Hänigsen)
Schüttler Vortex Genie 2TM (Bender & Hobein AG, Zürich/Schweiz)
Temperatur Regulator 832 (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
Thermostat Haake CH Fisons (Haake Mess-Technik GmbH & Co., Karlsruhe)
Tischzentrifuge Z 200 M/H (Hermle, Wehingen)
Tube Slicer (Beckman, Unterschleissheim-Lohhof)
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 510 H (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin)
Ultrazentrifuge TGA 50 14-1038 (Kontron Instruments)
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80 (Kendro Laboratory Products GmbH, München)

2.2 Analytik

2.2.1 LDL-Isolierung und –Analyse

2.2.1.1 Plasmagewinnung

Das für die folgenden Versuche verwendete Blut stammte von gesunden Versuchsteilnehmern (23-64 Jahre). Bei der Blutabnahme wurden den Versuchsteilnehmern etwa 60 – 80 ml Blut abgenommen.

Nach dem Einfüllen des Blutes in EDTA-Röhrchen (Monovette[®], Sarstedt) wurden diese vorsichtig gekippt, um das Blut vollständig mit dem an der Röhrchenwand haftenden Stabilisator (EDTA; 1,6 mg EDTA/ml Blut) zu vermischen. Danach wurde das Blut für 20 – 25 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt. Das Blut wurde anschließend für 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und das Plasma mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Plasmaproben wurden sofort für die Trennung der Lipoproteine verwendet.

2.2.1.2 Präparation von Lipoproteinen durch Ultrazentrifugation

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Isolation der LDL verwendet. Die Präparation der Lipoproteine nach der Methode von Havel et al. (1955) war am Institut etabliert. Hierbei trennt man die LDL in zwei Schritten; insgesamt dauert die Trennung der LDL 36 Stunden. Aufgrund dieses langen Zeitraums wurde eine weitere Methode eingeführt, bei der die LDL in nur insgesamt 16 Stunden präpariert werden. Die Methode nach Chung et al. (1980) ist also weniger zeitintensiv und somit auch schonender für die LDL. Dieses Verfahren wurde jedoch nur zur Durchführung von Studie 5 eingesetzt.

Präparation von Lipoproteinen nach der Methode von Havel

Die Low Density Lipoproteine wurden mit Hilfe präparativer Ultrazentrifugation nach der Methode von Havel et al. (1955) gewonnen. Dazu wurden 5 ml frisches Plasma in ein

Zentrifugenröhrchen (Beckmann, München, Nr. 342413) gefüllt, mit VLDL-Dichtelösung überschichtet und zur Gewinnung der LDL in einem Festwinkelrotor (TFT 65.13) zentrifugiert.

Dichteklassen:

Chylomykronen:	$d < 1,000 \text{ g/l}$
VLDL:	$d = 1,000 - 1,006 \text{ g/l}$
LDL:	$d = 1,006 - 1,063 \text{ g/l}$
HDL:	$d = 1,063 - 1,210 \text{ g/l}$

Dichtelösungen:

VLDL-Dichtelösung: $d = 1,006 \text{ g/l}$ (12,5 g NaCl + 950 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, bei +4°C aufbewahren)

LDL-Dichtelösung: $d = 1,120 \text{ g/l}$ (144 ml VLDL-Dichtelösung + 218 ml HDL-Dichtelösung)

HDL-Dichtelösung: $d = 1,346 \text{ g/l}$ (351,08 g NaBr + 153,3 g NaCl + 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$)

Auffülllösung LDL: $d = 1,063 \text{ g/l}$ (VLDL- und LDL-Dichtelösung 1:1)

Auffülllösung HDL: $d = 1,210 \text{ g/l}$ (HDL- und LDL-Dichtelösung 1:1)

Die Herstellung der Dichtelösungen erfolgte bei 20°C mit Hilfe eines Dichteärometers.

Trenn- und Ultrazentrifugationsbedingungen:

Chylomikronen: 5 ml Plasma in Zentrifugenröhrchen pipettieren und mit VLDL-Dichtelösung ($d = 1,006 \text{ g/l}$) auffüllen. Für 30 Minuten bei 20.000 U/min und 25°C zentrifugieren, Schmitthöhe: 1 cm

VLDL: 5 ml Plasma oder gesamter Chylomikronen-Unterstand in Zentrifugenröhrchen pipettieren und mit VLDL-Dichtelösung ($d = 1,006 \text{ g/l}$) auffüllen. 16 Stunden bei 40.000 U/min und 16°C zentrifugieren, Schmitthöhe: 1/3 Tube

LDL: 6 ml VLDL-Unterstand und 6 ml LDL-Dichtelösung ($d = 1,120 \text{ g/l}$) in Zentrifugenröhrchen pipettieren und mit Auffülllösung LDL ($d = 1,063 \text{ g/l}$) auffüllen. 20 Stunden bei 40.000 U/min und 16°C zentrifugieren, Schmitthöhe: 1/3 Tube

HDL: 6 ml LDL-Unterstand und 5,4 ml HDL-Dichtelösung ($d = 1,346 \text{ g/l}$) in Zentrifugenröhrchen pipettieren und mit Auffülllösung HDL ($d = 1,210 \text{ g/l}$) auffüllen. 40 Stunden bei 40.000 U/min und 16°C zentrifugieren, Schmitthöhe: 1/3 Tube

Die jeweilige Fraktion sammelte sich in der Spitze des Zentrifugenröhrchen und wurde durch Schneiden der Röhrchen („tube slicing“) gewonnen. Der Unterstand wurde zur Gewinnung der nächsten Fraktion weiterverwendet.

Präparation von Lipoproteinen nach der Methode von Chung et al. (1980)

Kochsalzlösung:

9 g NaCl in 1000 ml H₂O_{dest}

Natriumbromidlösung mit einer Dichte von 1,063 g/ml:

NaBr 80 g

EDTA 40 mg in 1000 ml H₂O_{dest}

Natriumbromidlösung mit einer Dichte von 1,151 g/ml:

NaBr 195 g

EDTA 40 mg in 1000 ml H₂O_{dest}

In Studie 5 wurden die Low Density Lipoproteine mit Hilfe von präparativer Ultrazentrifugation nach der Methode von Chung et al. (1980) gewonnen. Dazu wurde zu dem Plasma Natriumbromid gegeben um eine Dichte von 1,3 g/ml zu erreichen. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit 15 ml Kochsalzlösung gefüllt und mit höchstens 8 ml Plasma (Dichte 1,3 g/ml) unterschichtet. Aufgefüllt wurde das Röhrchen ebenfalls mit Kochsalzlösung und anschließend für zwei Stunden bei 45 000 U/min bei 10°C zentrifugiert.

Die Plasmalipoproteine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt. Dabei enthält die obere Schicht VLDL und Chylomicronen, die mittlere Schicht enthält die LDL und darunter befinden sich die HDL. Die LDL werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in neue Zentrifugenröhrchen, die 5 ml Dichtelösung 1,151 g/ml enthalten, überführt und mit der Dichtelösung 1,063 g/ml aufgefüllt. Anschließend wird für 14 Stunden bei 45 000 U/min bei 10°C zentrifugiert. Die LDL sammeln sich ganz oben im Zentrifugenröhrchen und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werden.

2.2.1.3 Proteinbestimmung

Auch für die Bestimmung der Proteinkonzentration der LDL wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei beiden Methoden findet die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Folin & Ciocalteu's Pholin Reagent statt. Die Färbung beruht hauptsächlich auf der Reduzierung des Reagens durch proteingebundenes Kupfer. Die Methode nach Lowry et al. (1951) war am Institut etabliert. Das Verfahren nach Markwell et al. (1981) ist etwas abgeänderte und wurde für Studie 5 verwendet.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration der LDL wurde mittels Folin & Ciocalteu's Phenol Reagens nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

Lösung A: 20 g Na_2CO_3 in 1000 ml 0,1 N NaOH

Lösung B: a) 500 mg CuSO_4 in 50 ml 0,1 N NaOH

b) 1 g Kaliumnatriumtartrat in 50 ml 0,1 N NaOH

a) und b) im Verhältnis 1:1 mischen und filtrieren

Lösung C: 50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B (nur einen Tag haltbar)

Lösung D: Folin & Ciocalteu's Pholin Reagent und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ im Verhältnis 1:1 mischen

Für die Proteinbestimmung wurden 200 μl LDL (dialysiert), mit 1 ml Lösung C gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 100 μl Lösung D gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Blindwert wurde Natriumphosphatpuffer verwendet, der behandelt wurde wie die Probe. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen den Blindwert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Rinderalbumin-Eichgeraden berechnet.

Proteinbestimmung nach Markwell

In Studie 5 wurde die Proteinkonzentration der LDL mittels Folin & Ciocalteu's Phenol Reagens nach der Methode von Markwell et al. (1981) bestimmt.

- Lösung A: 20 g Natriumcarbonat
4 g Natriumhydroxid
1,6 g Natriumtartrat
10 g Natriumdodezylsulfat in 1000 ml H₂O_{dest}
- Lösung B: 40 g Kupfersulfat in 1000 ml H₂O_{dest}
- Lösung C: Lösung A und B im Verhältnis 100:1 mischen
- Lösung D: Folin & Ciocalteu's Pholin Reagent und H₂O_{dest} im Verhältnis 1:1 mischen

Für die Proteinbestimmung wurden 500 µl LDL (dialysiert) mit 1,5 ml Lösung C gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 150 µl Lösung D gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Blindwert wurde Natriumphosphatpuffer verwendet, der behandelt wurde wie die Probe. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gegen den Blindwert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Rinderalbumin-Eichgeraden berechnet.

2.2.2 LDL-Oxidation in vitro

Während der Oxidation der LDL kommt es zu einer Reihe von Veränderungen. Im Lipidteil der LDL entstehen durch die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren konjugierte Diene (Dienkonjugation). Auch der Proteinteil der LDL wird während der Oxidation verändert. Die Auswirkungen der Proteinoxidation können durch die Messung der Tryptophanfluoreszenz und die Bildung von Carbonylgruppen verfolgt werden.

2.2.2.1 Bildung konjugierter Diene

Die in vitro Oxidation von LDL mit Kupferionen wurde nach der Methode von Esterbauer et al. (1989a) vorgenommen.

Dazu wurden LDL in einen Dialyseschlauch (MWCO 12-14000, 10mm, Roth E 672.1) gefüllt und in 0,01 M Natriumphosphatpuffer gegeben (pH 7,4; 6ml LDL auf 3 l Puffer) (Natriumphosphatpuffer: 262,2 mg NaH₂PO₄*H₂O, 1,44 g Na₂HPO₄*2H₂O und 9,35 g NaCl in

einem Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ lösen, 100 mg Chloramphenicol pro Liter zugeben, mit Stickstoff sättigen). Die LDL wurden für mindestens 16 Stunden bei $+4^\circ\text{C}$ im Dunkeln dialysiert. Die dialysierten LDL wurden mittels Proteinbestimmung auf eine Endkonzentration von 100 bzw. $62,5 \mu\text{g}$ Protein/ml LDL mit Natriumphosphatpuffer eingestellt. Genau 1 ml dieser LDL-Verdünnung (fallweise mit Antioxidantien inkubiert) wurde in eine Halbmikroquarzküvette pipettiert, als Blindwert wurde Natriumphosphatpuffer verwendet. Die gefüllten Küvetten wurden im temperierten Küvettenhalter des Photometers bei 30 bzw. 37°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Kupferionen die Messung gestartet. Die Extinktionen der Proben wurden bei 234 nm kontinuierlich gegen den Blindwert gemessen. Die Dauer der Messung richtete sich nach der Bildung konjugierter Diene. Nach Erreichen des Maximum wurde die Messung gestoppt. Die Bestimmung der Lag-phase erfolgte graphisch (Abb. 4) (Esterbauer et al., 1989a).

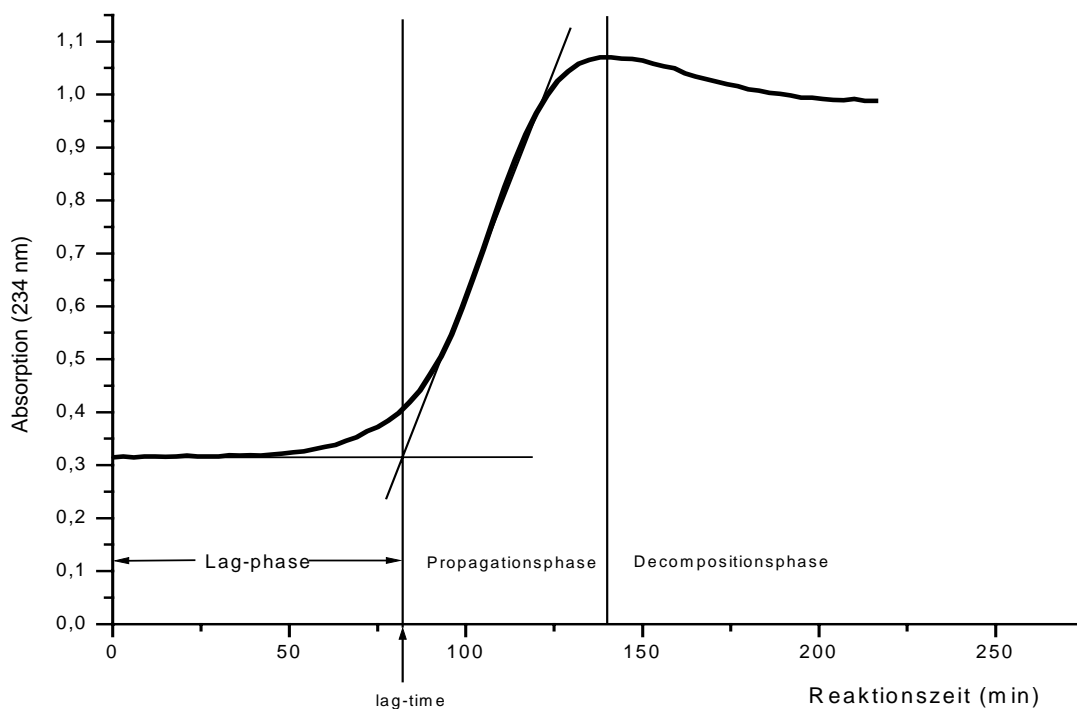


Abb. 4: Graphische Bestimmung der lag-phase humaner LDL während kupfer-induzierter Oxidation

In Abb. 4 ist der typische Kurvenverlauf einer kupfer-induzierten Dienkonjugation dargestellt. Die LDL-Oxidation beginnt mit der sogenannten lag-phase. Während der lag-phase werden endogene Antioxidantien verbraucht, nach Verbrauch aller Antioxidantien startet die Lipidperoxidation. Die sogenannte Propagationsphase ist eine Kettenreaktion, bei der die

ungesättigten Fettsäuren der LDL zu Lipidhydroperoxiden oxidiert werden. Während dieser Phase wird die maximale Dienbildungsrate erreicht. In der Dekompositionsphase zerfallen die gebildeten Lipidhydroperoxide in Aldehyde und andere Produkte wie Kohlenwasserstoffe, Epoxide und Alkohole. Dem Testsystem zugesetzte antioxidativ wirksame Substanzen führen zu einer Lagphasenverlängerung. Neben den endogenen Antioxidantien können so auch exogene Substanzen eine Verlängerung der lag-phase bewirken und ein Vergleich der verschiedenen Lag-phases beschreibt die unterschiedliche Oxidationsresistenz der Proben. Die Ergebnisse der Dienkonjugation sind angegeben als Veränderung der lag-phase in % der Kontrolle, LDL ohne Zusatz von Antioxidantien.

Bei der vorliegenden Untersuchung ergab sich mit einem Variationskoeffizient von $< 7\%$ für identische LDL-Präparationen eine gute Reproduzierbarkeit. Eine gute Reproduzierbarkeit der Dienkonjugation konnte auch bei Untersuchungen von Esterbauer und Ramos (1996), Kleinveld et al. (1992), und Puhl et al. (1994) beobachtet werden.

2.2.2.2 Tryptophanfluoreszenz

Während der kupfer-induzierten LDL-Oxidation kommt es neben der Lipidperoxidation auch zu einer oxidativen Modifikation des Apolipoprotein B 100 (Apo B). Die Oxidation beginnt mit den Lipidmolekülen und breitet sich dann weiter auf den Proteinteil des LDL aus (Giessauf et al., 1996). Die Messung der Tryptophanfluoreszenz kann als eine spezifische und sensitive Methode genutzt werden, um die Kinetik der kupfer-induzierten Oxidation im Proteinanteil der LDL zu verfolgen.

Die Messung der Tryptophanfluoreszenz wurde nach der Methode von Giessauf et al. (1995) durchgeführt. Dazu wurde 1ml LDL (dialysiert; fallweise mit Antioxidantien inkubiert) mit einer Proteinkonzentration von 100 μg Protein/ml LDL in Quarzglas-Küvetten pipettiert. Durch Zugabe von 10 μl CuCl_2 pro ml LDL wurde die Oxidationsreaktion gestartet.

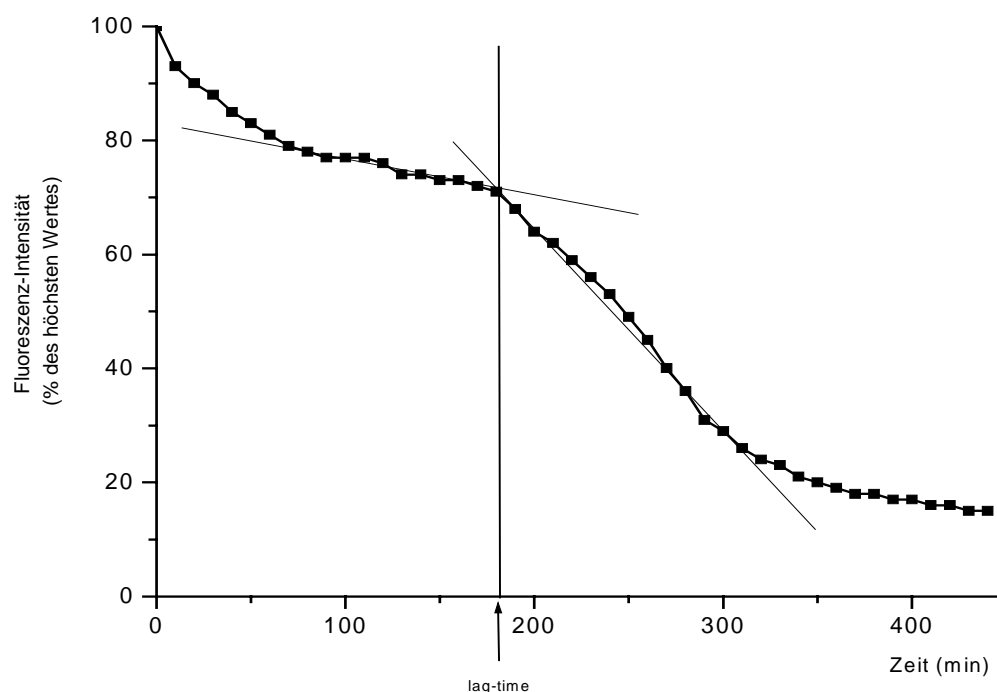
Die Messung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte mittels Fluoreszenzspektrophotometer bei einer Excitation von 282 nm und einer Emission von 331 nm (Tab. 1).

Tab. 1: Geräteparameter zur Messung der Tryptophanfluoreszenz während kupfer-induzierter LDL-Oxidation

Parameter	Bedingungen
Excitation	282 nm
Emission	331 nm
Slit	5,0 nm/5,0 nm
PMT Voltage	950 V
Delay Time	0 sec
Integration Time	2 sec

Gemessen wurde vor der Zugabe von Kupferionen und anschließend im Abstand von 10 Minuten, bis ungefähr 20 % des Ausgangswertes erreicht waren. Die Ergebnisse der Tryptophanfluoreszenz wurden angegeben als Fluoreszenzintensität in % des höchsten gemessenen Wertes. Eine erhöhte Resistenz gegenüber kupfer-induzierter Oxidation äußert sich in einer verminderten Abnahme der Tryptophanfluoreszenz.

Bei der Messung der Tryptophanfluoreszenz ist darauf zu achten, dass sich die Küvetten mit den LDL-Präparationen zwischen den Messungen nicht im Lichtweg befinden, da sonst eine Bleichung des LDL-Tryptophans stattfindet.

**Abb. 5:** Verlust der Tryptophanfluoreszenz während kupfer-induzierter LDL-Oxidation

Während kupfer-induzierter LDL-Oxidation kommt es zunächst zu einem Abfallen der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 5), was auf den Quenchingeffekt von Kupfer zurückzuführen ist (Horakova et al., 1996). Darauf folgt eine Phase, in der die Tryptophanfluoreszenz stetig abnimmt, bis zu einem Punkt, an dem es zu einem rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität kommt. Diese Beschleunigung wird auf die Zerstörung des Tryptophans durch Produkte der Lipidperoxidation zurückgeführt (Horakova et al., 1996, Giessauf et al., 1995).

Auch bei der Messung der Tryptophanfluoreszenz konnte eine gute Reproduzierbarkeit beobachtet werden. Der Variationskoeffizient lag bei $< 10\%$.

2.2.2.3 Carbonylgruppenbildung

Eine weitere Methode, die LDL-Oxidation auf Proteinebene zu verfolgen, ist die Bestimmung der Apo B Carbonylbildung. Die bei der Lipidperoxidation entstehenden Hydroperoxide steigern die Carbonylbildung, indem sie entweder direkt das Protein angreifen oder mit Kupferionen Radikale bilden, die dann wiederum das Apo B angreifen (Yan et al., 1997).

Material: HCl 2 M
2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) 10 mM in 2 M HCl
Natrium-Phosphat-Puffer 0,15 M, pH 6,8, mit 3% Natriumdodecylsulfat
Ethanol
Heptan
Ethanol-Ethylacetat (1:1, v:v)

Die Bestimmung des Carbonylgehalts in der Proteinfraction der LDL während Kupferoxidation wurde nach der Methode von Yan et al. (1995) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml LDL (dialysiert; fallweise mit Antioxidantien inkubiert), einer Proteinkonzentration von 300 μg Protein/ml LDL, mit 200 μl 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu dem Ansatz 600 μl Natrium-Phosphat-Puffer gegeben und gemischt. Es wurden dann jeweils 1,8 ml Ethanol und Heptan hinzugefügt, für eine Minute gemischt und für 10 Minuten bei einer Umdrehung von 4000 U/min zentrifugiert. Die Schicht zwischen den beiden Phasen wurde mit einer Pipette aufgenommen, in Eppendorfcups (2 ml) pipettiert und zweimal mit jeweils 1,5 ml Ethanol-Ethylacetat gewaschen (bei 12000 U/min für

5 Minuten zentrifugieren, den Überstand verwerfen). Der gewaschene Rückstand wurde in 1 ml Natrium-Phosphat-Puffer gelöst. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer gegen Natrium-Phosphat-Puffer bei einer Wellenlänge von 360 nm. Die Ergebnisse sind angegeben in nmol Carbonyl/mg Protein.

Berechnung des Carbonylgehalts in den LDL (Reznick und Packer, 1994) (Cao und Cutler, 1995):

$$\epsilon = 22.000/M = 22.000/10^6 \text{ nmol/ml (Absorptionskoeffizient)}$$

$$C_p = \text{Proteinkonzentration in den LDL}$$

$$C_{\text{DNPH}} = \text{Absorption (360 nm)}/\epsilon \text{ (Konzentration von Dinitrophenylhydrazin pro ml)}$$

$$C_{\text{DNPH}} = \text{Absorption (360 nm)} * 45,45 \text{ nmol/ml}$$

$$\text{Carbonylgehalt (nmol/mg Protein)} = C_{\text{DNPH}} / C_p$$

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Carbonylgruppenbildung konnte ein Variationskoeffizient von < 10 % bestimmt werden.

2.2.2.4 Zeitlicher Verlauf von Dienkonjugation, Tryptophanfluoreszenz und Carbonylgruppenbildung während kupfer-induzierter LDL-Oxidation

In Abb. 6 ist der zeitliche Verlauf von Dienkonjugation, Tryptophanfluoreszenz und Carbonylgruppenbildung, beispielhaft für die vorliegende Untersuchung, dargestellt. Während der Oxidation des Lipidteils von LDL kommt es zur Bildung konjugierter Diene. Während der lag-phase werden endogene Antioxidantien verbraucht und konjugierte Diene werden kaum gebildet. In der darauf folgenden Propagationsphase werden die mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Lipidhydroperoxiden oxidiert und es kommt zu einem raschen Anstieg der konjugierten Diene (Esterbauer und Ramos, 1996).

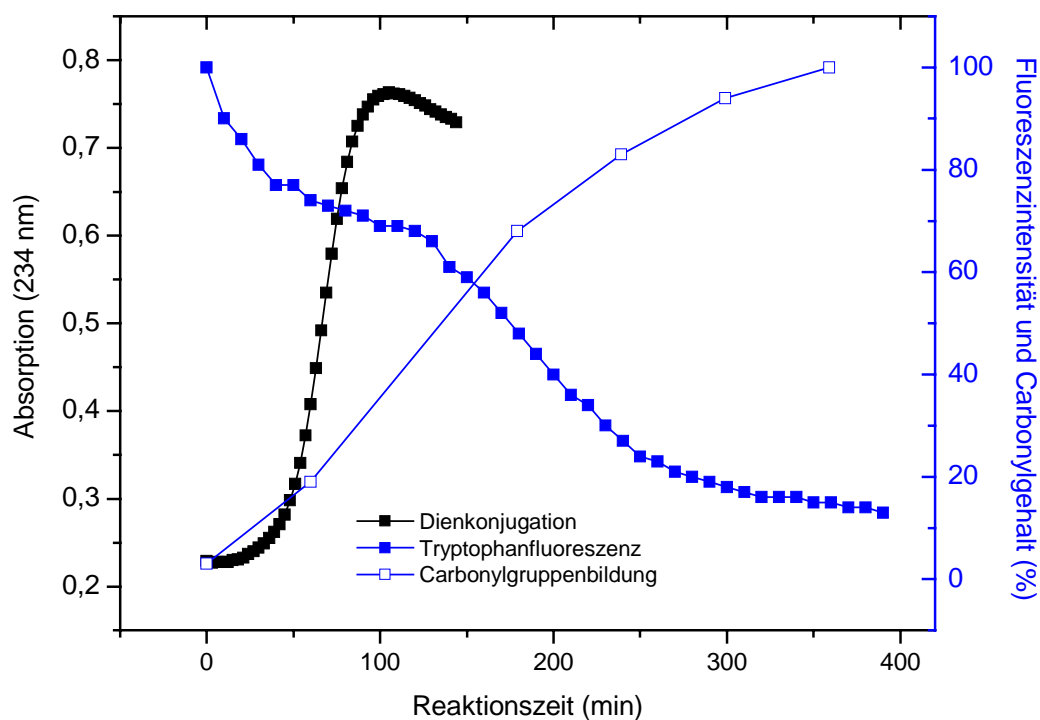


Abb. 6: Beispiel für den zeitlichen Verlauf von Dienkonjugation, Tryptophanfluoreszenz und Carbonylgruppenbildung während kupfer-induzierter Oxidation von LDL bei vorliegender Untersuchung

Während der LDL-Oxidation kommt es neben der Lipidperoxidation auch zu strukturellen Veränderungen des Apolipoprotein B. Dies äußert sich durch den Zerfall der Polypeptidkette, die Bildung kovalenter Bindungen mit Produkten, die bei der Lipidperoxidation entstehen und den

Verlust von Aminosäuren. Der Zerfall des Tryptophans und die Entstehung von Carbonylgruppen geben die Oxidation im Proteinteil des LDL wieder.

Die Tryptophanreste des Apolipoprotein B besitzen eine Schlüsselrolle bei der kupfer-induzierten Lipidperoxidation der LDL, da sich die Bindungsstelle der Kupferionen nahe der Tryptophanreste befindet. Deshalb beginnt die frühe Schädigung des Tryptophans sofort nach der Zugabe der Kupferionen. Doch erst die Produkte der Lipidperoxidation beschleunigen die Proteinoxidation und auch den Zerfall des Tryptophan (Giessauf et al., 1996). In Abb. 6 ist zu erkennen, dass es sofort nach Zugabe der Kupferionen zu einem Abfallen der Tryptophanfluoreszenz kommt. Doch erst nachdem das Maximum bei der Bildung der konjugierten Diene erreicht ist, kommt es zur Beschleunigung des Tryptophanzerfalls.

Die kupfer-induzierte Lipidperoxidation der LDL scheint auch die Carbonylbildung des Apolipoprotein B zu verstärken. Hydroperoxide reagieren mit Kupferionen und es entstehen dabei Radikale, die das Apo B angreifen. Es werden entweder die Aminosäuren direkt von oxidativen Spezies angegriffen oder es kommt zur Konjugation von Lipidperoxidationsprodukten mit den Proteinen des Apo B (Yan et al., 1997).

2.2.2.5 Einfluss verschiedener Parameter auf die Oxidationsresistenz von Low Density Lipoproteinen

Für die Untersuchungen wurden LDL-Präparationen von fünf verschiedenen Personen verwendet. Dabei handelte es sich um drei Männer und zwei Frauen im Alter zwischen 23 und 64 Jahren; bei den Versuchsteilnehmern lagen keine Erkrankungen oder Stoffwechselstörungen vor und es wurden keine Vitaminpräparate eingenommen.

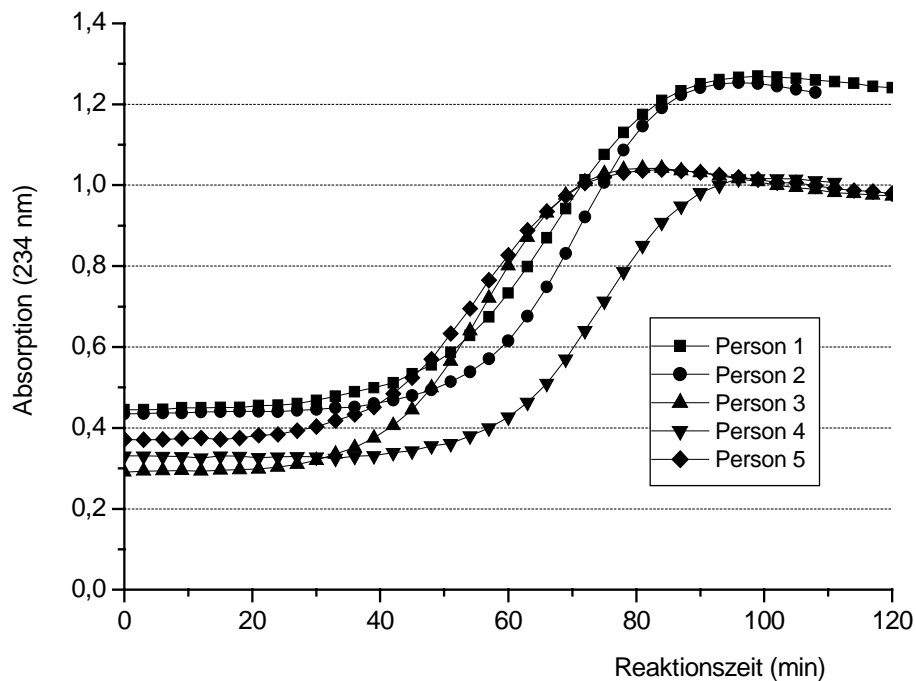


Abb. 7: Verlauf der Dienkonjugation von Kontroll-LDL (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation der fünf Versuchsteilnehmer

Aus Abb. 7 wird deutlich, dass die LDL-Präparationen der verschiedenen Personen unterschiedliche Oxidationsneigung besaßen. Die Dauer der lag-phase variierte zwischen 39 und 59 Minuten.

Die Hauptprodukte bei der Lipidperoxidation sind die Lipidhydroperoxide, die ihr Absorptionsmaximum bei etwa 234 nm besitzen. Die LDL-Präparationen der Personen 1-5 zum Zeitpunkt 0 Minuten unterschieden sich in der anfänglichen Absorption (234 nm), was sich durch einen unterschiedlichen Anteil der schon existierenden Peroxide erklären lässt.

Für die Unterschiede im Verlauf der Dienkonjugation der verschiedenen Personen sind mehrere Faktoren verantwortlich.

Während der lag-phase von LDL werden die endogenen Antioxidantien verbraucht, beginnend mit α - und γ -Tocopherol, danach kommt es zu einer Abnahme der Carotinoide, zuerst Cryptoxanthin und β -Carotin zum Schluss (Esterbauer et al., 1993, Esterbauer et al., 1992). In diesem Zeitraum findet eine Lipidperoxidation nur in geringem Ausmaß statt, konjugierte Diene werden nicht oder nur in geringem Umfang gebildet. Sind die endogenen Antioxidantien verbraucht, kommt es zu einer vermehrten Bildung konjugierter Diene.

Bei Untersuchungen von Esterbauer et al. (1992) konnte eine hohe Korrelation zwischen der Dauer der lag-phase und dem endogenen Antioxidantiengehalt der LDL von verschiedenen Personen bei der kupfer-induzierten LDL-Oxidation beobachtet werden. Dagegen zeigten die Ergebnisse von Kleinveld et al. (1993), dass ein niedriger Vitamin E Gehalt nicht unbedingt bedeutet, dass die LDL anfälliger gegenüber Oxidation waren. Auch Esterbauer et al. (1991) konnten bei mehreren Individuen eine hohe Variation der lag-phase von LDL (44-105 Minuten) beobachten, obwohl die Konzentration von α -Tocopherol in den LDL nahezu identisch war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Antioxidantien zwar zum Schutz von LDL vor Oxidation beitragen, aber andere Faktoren eventuell eine größere Bedeutung besitzen.

Spuren von Übergangsmetallen, in freier Form oder als redox-aktiver Komplex, spielen eine bedeutende Rolle bei der Oxidation von LDL. Es wird angenommen, dass die kupfer-induzierte LDL-Oxidation ein akzeptables Modell darstellt um die physiologischen Abläufe wiederzugeben (Esterbauer und Ramos, 1996). Bei der kupfer-induzierten LDL-Oxidation in vitro reagieren bereits existierende Peroxide mit Kupferionen, es werden Peroxidradikale gebildet, die eine LDL-Oxidation initiieren. So ist nicht nur der Antioxidantiengehalt der LDL, sondern auch die schon vorhandenen Lipidperoxide für die Oxidationsresistenz der LDL von Bedeutung. Je mehr Lipidperoxide bereits vorhanden sind umso größer ist die Anfälligkeit gegenüber Oxidation und um so kürzer die lag-phase (Parthasarathy et al., 1998).

Ein weiterer Parameter der zur Resistenz von LDL gegenüber oxidativen Veränderungen beiträgt, ist der Gehalt an Fettsäuren und die Fettsäurezusammensetzung (Holvoet und Collen, 1998). Während endogene Antioxidantien und Lipidperoxide einen Einfluss auf die Dauer der lag-phase haben, spielen die Fettsäuren selbst eine wichtige Rolle bei der Anfälligkeit von LDL gegenüber Oxidation.

Im Vergleich zu LDL mit einem hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist LDL mit einfach ungesättigten Fettsäuren oxidationsresistenter (Parthasarathy et al., 1998). Durch die Ergebnisse von Kleinveld et al. (1993) wurde gezeigt, dass ein niedriger Linolsäuregehalt und ein hoher Ölsäuregehalt die Oxidationsresistenz der LDL erhöhen. Der Fettsäuregehalt und das Fettsäuremuster der LDL können bei verschiedenen Personen stark variieren, abhängig von den Ernährungsgewohnheiten.

Auch Esterbauer et al. (1992) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass im Linolsäuregehalt der LDL von verschiedenen Personen große Unterschiede bestehen, die dann wiederum die Oxidationsresistenz der LDL-Präparationen beeinflussen. Die Untersuchungen von Kleinveld et al. (1993) und Frei und Gaziano (1993) zeigten, dass LDL eine erhöhte Oxidationsresistenz besitzt, wenn der Gehalt an Cholesterol bzw. Triglyceriden niedrig ist.

Die Variation im Gehalt der endogenen Antioxidantien und der Fettsäurezusammensetzung kann bei LDL-Präparationen verschiedener Individuen sehr hoch sein. Die LDL können sich also in ihrer Zusammensetzung stark unterscheiden und dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Oxidationsresistenz der LDL unterschiedlicher Individuen und damit auch unterschiedliche Lag-phasen der Kontroll-LDL. Werden die LDL, wie bei den vorliegenden Untersuchungen mit unterschiedlichen Antioxidantien inkubiert, können die Effekte und Auswirkungen auf die Verlängerung der lag-phase unterschiedlicher Präparationen stark voneinander abweichen. Die Variation der unterschiedlichen LDL-Präparationen bei gleicher Behandlung mit Antioxidantien dürfte auf der Zusammensetzung der LDL beruhen.

Unterschiede in der Oxidationsresistenz konnten auch bei dem Verlauf der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 8) und der Carbonylgruppenbildung (Abb. 9) während kupfer-induzierter LDL-Oxidation beobachtet werden.

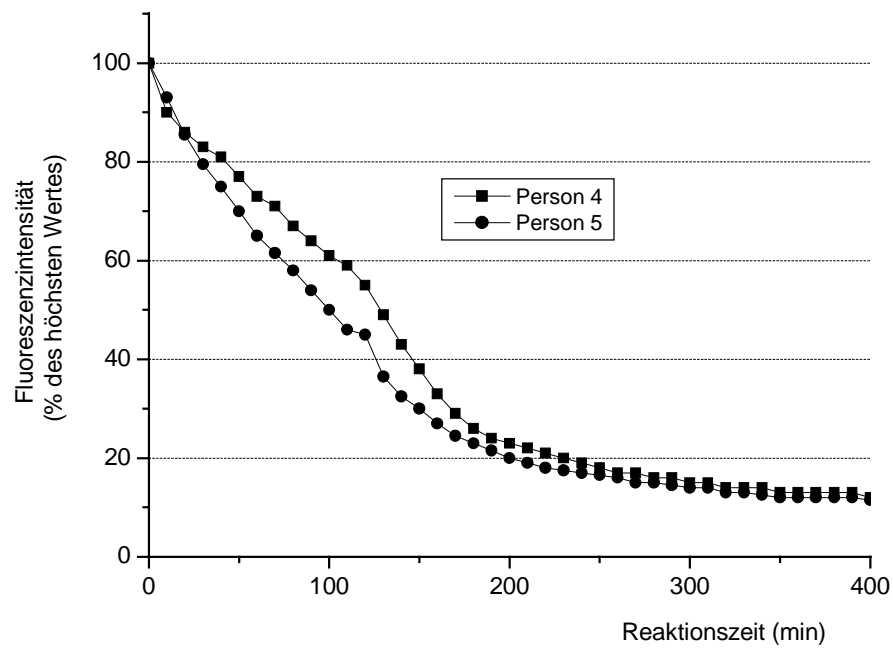


Abb. 8: Verlauf der Tryptophanfluoreszenz von Kontroll-LDL der beiden Versuchsteilnehmer (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation

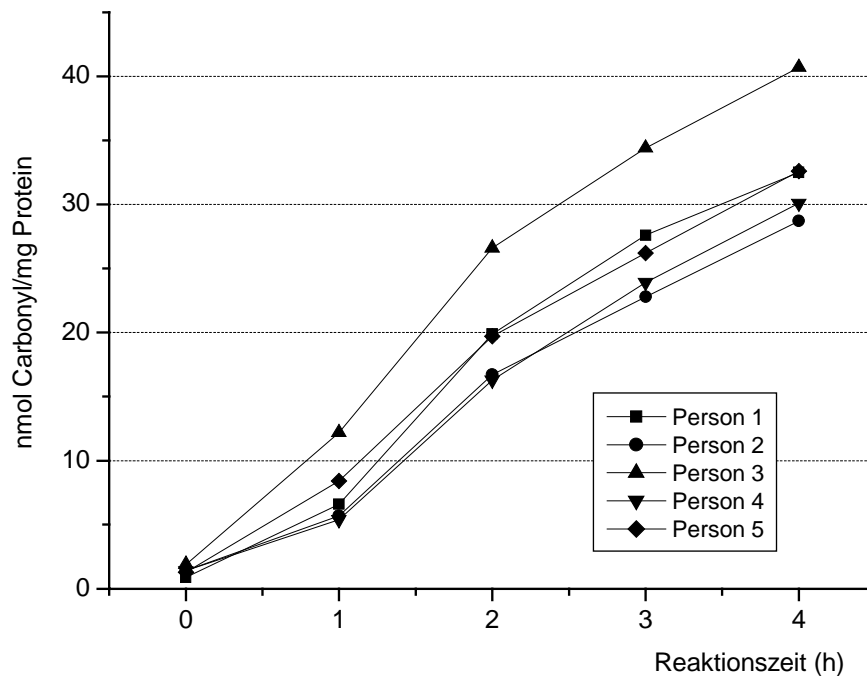


Abb. 9: Verlauf der Carbonylgruppenbildung von Kontroll-LDL der fünf Versuchsteilnehmer (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) während kupfer-induzierter Oxidation

2.2.3 Bestimmung der Antioxidantienkonzentrationen in den LDL-Präparationen mittels HPLC

Die reversed-phase Chromatographie stellt eine Form der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie dar und besteht aus einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase. Hierbei kommen chemisch modifizierte Kieselgele als Säulenfüllmaterialien zum Einsatz. An einem reversed-phase-Kieselgel werden die Substanzen mit zunehmendem hydrophoben Charakter verzögert.

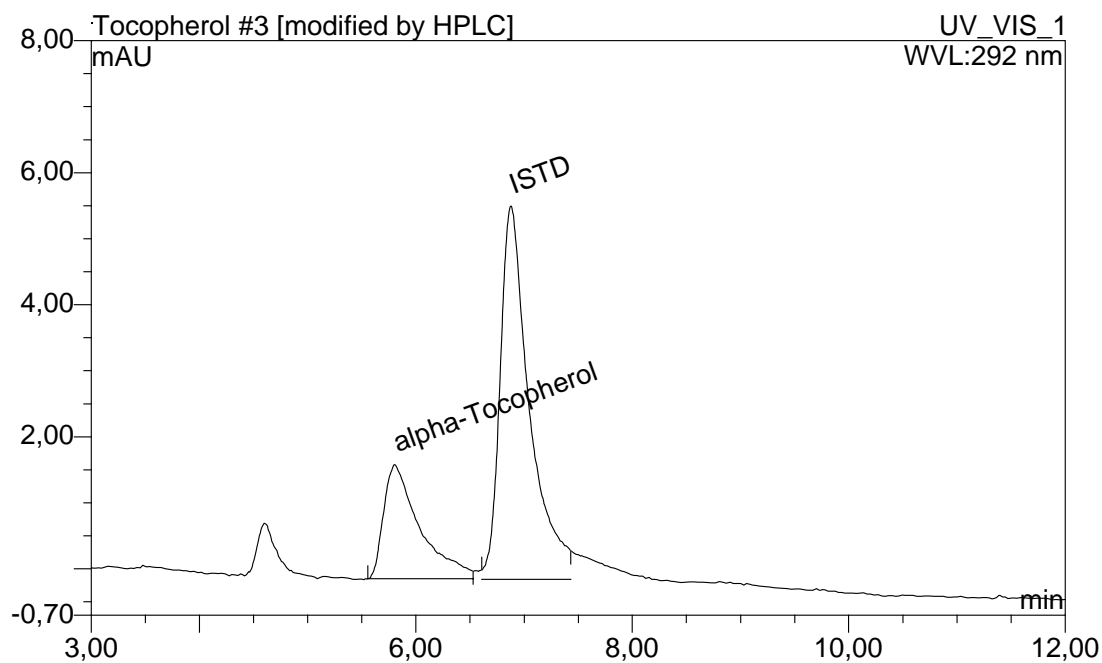
2.2.3.1 Tocopherolbestimmung

Die Aufarbeitung der LDL-Proben wurde in Anlehnung an die Methode von Hess et al. (1991) vorgenommen. Zur Quantifizierung von α -Tocopherol wurde 1 ml LDL mit 2 ml Ethanol (worin Tocopherylacetat als interner Standard enthalten war) gemischt und für eine Minute lang geschüttelt. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 1 ml Hexan für zwei Minuten lang geschüttelt und für fünf Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Von der Hexanphase wurden 700 μ l abgenommen, die restliche Lösung erneut mit 1 ml Hexan für zwei Minuten geschüttelt, für fünf Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und von der Hexanphase 1000 μ l abgenommen. Die beiden abgenommenen Überstände wurden vereinigt, mit Stickstoff vollständig eingeeengt und in 200 μ l Fließmittel aufgenommen. Davon wurden 20 μ l auf die Säule aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Acetonitril, Dichlormethan und Methanol (7/2/1, v/v/v) verwendet.

Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter den in Tab. 2 aufgeführten Bedingungen. Ein typisches Chromatogramm von α -Tocopherol ist in Abb. 10 dargestellt.

Tab. 2: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von α -Tocopherol

Parameter	Bedingungen
HPLC-Säule	Ultraspher ODS 4,6 mm \times 150 mm, Beckman Nr. 235330
HPLC-Vorsäule	Ultraspher ODS 4,6 mm \times 45 mm, Beckman Nr. 243533
Fließmittel	Acetonitril/Dichlormethan/Methanol 7/2/1 v/v/v
Fließgeschwindigkeit	1200 μ l/min
Säulentemperatur	18°C
Wellenlänge	292 nm
Laufzeit	19 Minuten

**Abb. 10:** HPLC-Profil von α -Tocopherol bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 2)

Berechnung

Die Berechnung der enthaltenen Mengen an α -Tocopherol erfolgte über die zugesetzte Stoffmenge an internem Standard, den ermittelten Flächen unter den Peaks sowie unter Einbezug des relativen Korrekturfaktors. Die Berechnung des relativen Korrekturfaktors f_x wurde mit Hilfe von Standardsubstanzen nach folgender Formel vorgenommen:

$$f_x = \frac{\text{Peakfläche}_{ISTD} \times \text{Stoffmenge}_x}{\text{Peakfläche}_x \times \text{Stoffmenge}_{ISTD}}$$

Der relative Korrekturfaktor für α -Tocopherol betrug 0,3616.

Die Integration der Peakflächen wurde mit Hilfe des Computerprogramms Software Chromeleon Version 4.32 (Gynkotek GmbH, Germering) vorgenommen. Die Berechnung der jeweiligen Stoffmenge x erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Stoffmenge}_x = \frac{\text{Peakfläche}_x \times \text{Stoffmenge}_{ISTD} \times \text{Korrekturfaktor } f_x}{\text{Peakfläche}_{ISTD}}$$

Jede Probe wurde doppelt eingespritzt. Von den ermittelten Konzentrationen wurde der Mittelwert verwendet. Die Linearität im gemessenen Bereich wurde anhand einer Eichkurve überprüft.

Die Wiederfindung von α -Tocopherol betrug 105,5 %. Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde im doppelten Ansatz der Probe ein Variationskoeffizient von 1 % ermittelt.

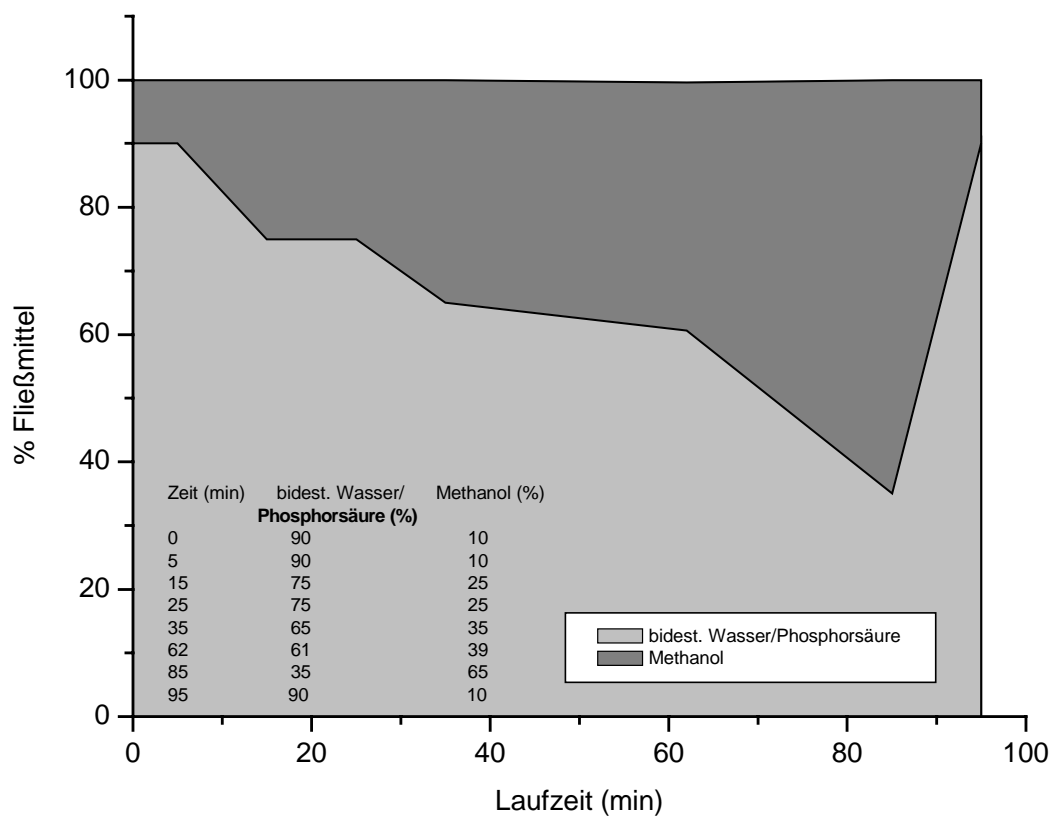
2.2.3.2 Quercetin- und Kaffeesäurebestimmung

Die Aufarbeitung der Proben wurde in Anlehnung an die Methode von Maiani et al. (1997) vorgenommen. Zur Quantifizierung von Quercetin und Kaffeesäure wurden 4 ml LDL mit 2 ml Salzsäure und 2 ml Methanol (Fisetin und 4-Methoxyzimtsäure als interner Standard enthalten) gemischt, für 1 Minute geschüttelt und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 ml Ethylacetat für drei Minuten geschüttelt und für fünf Minuten bei 2244 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, der Unterstand erneut mit 3 ml Ethylacetat für drei Minuten geschüttelt, für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Die beiden abgenommenen Überstände wurden vereinigt, mit Stickstoff vollständig eingengt und in 200 μ l Methanol aufgenommen. Davon wurden 20 μ l auf die Säule aufgetragen.

Als Fließmittel wurde eine Mischung aus $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, Methanol und Phosphorsäure (Abb. 11) verwendet. Die Analyse erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter den in Tab. 3 aufgeführten Bedingungen. Typische Chromatogramme von Quercetin und Kaffeesäure sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt.

Tab. 3: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von Quercetin und Kaffeesäure

Parameter	Bedingungen
HPLC-Säule	Hypersil ODS 4,6 mm × 150 mm, Knauer Nr. I118 Y165 mit integrierter Vorsäule
Fließmittel A	H ₂ O _{bidest} /Phosphorsäure (99,9/0,1; v/v)
Fließmittel B	Methanol
Fließgeschwindigkeit	800 µl/min
Säulentemperatur	30°C
Wellenlänge für Quercetin	370 nm
Wellenlänge für Kaffeesäure	287 nm
Laufzeit	95 Minuten

**Abb. 11:** Gradientenprofil zur Trennung von Quercetin und Kaffeesäure

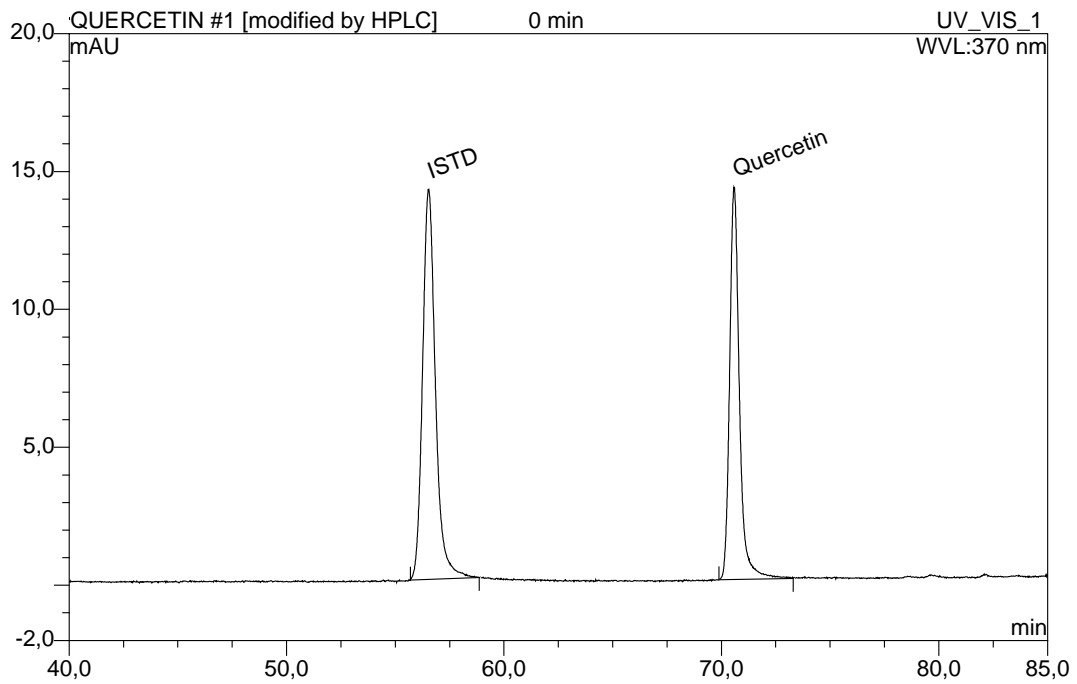


Abb. 12: HPLC-Profil von Quercetin bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 3)

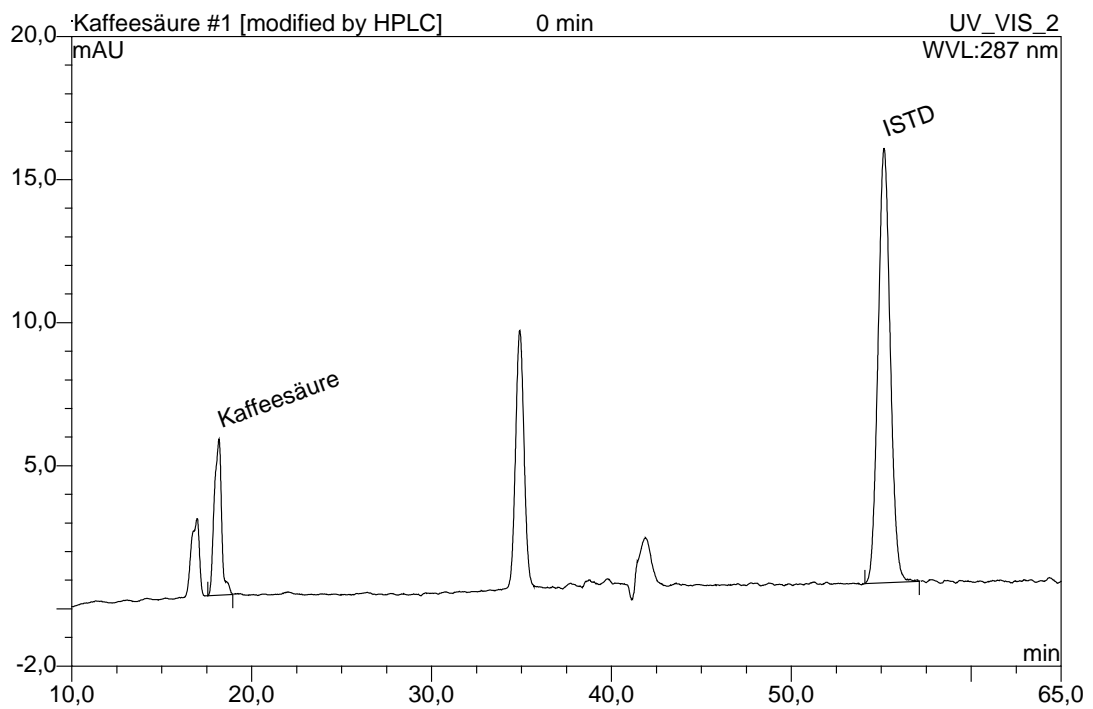


Abb. 13: HPLC-Profil von Kaffeesäure bei beschriebenen Geräteparametern (Tab. 3)

Berechnung

Die Berechnung der enthaltenen Mengen an Quercetin und Kaffeesäure erfolgte über die zugesetzte Stoffmenge an internem Standard, den ermittelten Peakflächen der Substanzen und des internen Standards, sowie unter Einbezug der relativen Korrekturfaktoren. Die Berechnung der relativen Korrekturfaktoren f_x wurde mit Hilfe von Standardsubstanzen nach folgender Formel vorgenommen:

$$f_x = \frac{\text{Peakfläche}_{ISTD} \times \text{Stoffmenge}_x}{\text{Peakfläche}_x \times \text{Stoffmenge}_{ISTD}}$$

Tab. 4: Korrekturfaktoren für die Berechnung der Quercetin- und Kaffeesäurekonzentrationen

Substanz	Korrekturfaktor
Quercetin	1,390
Kaffeesäure	2,119

Die Integration der Peakflächen wurde mit Hilfe der Software Chromeleon Version 4.32 (Gynkotec GmbH, Germering) vorgenommen. Die Berechnung der jeweiligen Stoffmenge x erfolgte nach der Formel:

$$\text{Stoffmenge}_x = \frac{\text{Peakfläche}_x \times \text{Stoffmenge}_{ISTD} \times \text{Korrekturfaktor } f_x}{\text{Peakfläche}_{ISTD}}$$

Jede Probe wurde doppelt eingespritzt und aus den errechneten Konzentrationen wurde der Mittelwert gebildet. Die Linearität im gemessenen Bereich wurde anhand einer Eichkurve überprüft.

Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Nach Zusatz der Standardsubstanzen zu den LDL wurde eine durchschnittliche Wiederfindungsrate für Quercetin und Kaffeesäure von jeweils 103 % bestimmt. Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurden im doppelten Ansatz einer Probe Variationskoeffizienten von 0,5 % für Quercetin und 1 % für Kaffeesäure ermittelt.

2.3 Versuchsbeschreibungen

2.3.1 Studie 1: Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Inkubation der LDL

Als Testsubstanzen wurden für diese Versuche α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure als ein Vertreter der Phenolsäuren und ausgewählte Flavonoide verwendet (Tab. 6). In diesem Versuchsansatz sollte die antioxidative Wirkung dieser Substanzen auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation getestet werden.

Als Testmodell wurde zum einen die Bildung der konjugierten Diene als Parameter für die Lipidperoxidation verwendet. Die Bestimmung der Carbonylgruppen und die Tryptophanfluoreszenz des Apolipoprotein B wurden als Marker für die Proteinoxidation verwendet. Die Oxidationsreaktion wurde durch die Zugabe von 16,6 μM CuCl_2 gestartet. Es wurde diese relativ hohe Kupferkonzentration für die Versuche gewählt, um die Reaktionszeit zu verkürzen. Dies spielte vor allem bei der Kombination von Antioxidantien bei der Bestimmung konjugierter Diene und der Tryptophanfluoreszenz eine Rolle. Für die Fluoreszenzmessung des Tryptophans wurden zusätzlich die Antioxidantienkonzentrationen reduziert um die Reaktionszeit zu verkürzen (Tab. 6).

Tab. 5: Versuchsbedingungen (Studie 1)

Parameter	Bedingungen
Präparation der LDL	Präparative Ultrazentrifugation nach Havel
Proteinbestimmung	nach Lowry
Proteinkonzentration	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Dienkonjugation und Tryptophanfluoreszenz) 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Carbonylgruppenbildung)
Oxidationsmittel	16,6 μM CuCl_2
Temperatur	37°C

Die Antioxidantien waren alle in Methanol gelöst und wurden entweder einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zugesetzt. Bei jedem Experiment wurde neben den verschiedenen

Versuchsansätzen auch eine Kontrolle verwendet. Die Kontrolle bestand aus LDL ohne Zusatz von Antioxidantien und wurde statt dessen, unter sonst gleichen Bedingungen, mit einer identischen Menge an Methanol inkubiert.

Tab. 6: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 1)

Testsubstanz	Beschreibung	Konzentration	Bezugsquelle
α-Tocopherol	Öl	Dienkonjugation:	5 µM
		Carbonylgehalt:	5 µM
		Tryptophanfluoreszenz:	2,5 µM
Ascorbinsäure	Pulver	Dienkonjugation:	3 µM
		Carbonylgehalt:	3 µM
		Tryptophanfluoreszenz:	1,5 µM
Kaffeesäure	Pulver	Dienkonjugation:	1 µM
		Carbonylgehalt:	1 µM
		Tryptophanfluoreszenz:	0,5 µM
Quercetin	Pulver	Dienkonjugation:	1 µM
		Carbonylgehalt:	1 µM
		Tryptophanfluoreszenz:	0,5 µM
Epicatechin	Pulver	Dienkonjugation:	1 µM
			ICN, Lot Nr.71958
Hesperetin	Pulver	Dienkonjugation:	1 µM
			Sigma, USA Lot Nr.76H0527
Phloretin	Pulver	Dienkonjugation:	1 µM
			ICN, Lot Nr.73085

Anreicherung von α -Tocopherol in den LDL

In einem weiteren Versuch wurde Plasma vor Isolation der LDL mit α -Tocopherol inkubiert. Dazu wurde Plasma mit α -Tocopherol, das in Ethanol gelöst war, mit einer Endkonzentration von 250 μ M versetzt. Außerdem wurde eine Kontrolle verwendet, dazu wurde zu dem Plasma eine identische Menge an Ethanol zugegeben. Das Plasma wurde für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend die LDL isoliert. Die vorbehandelten LDL-Präparationen wurden dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 100 μ g/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Anschließend wurden die LDL für 30 Minuten bei 37°C mit Ascorbinsäure (3 μ M) inkubiert. Die Oxidationsreaktion wurde dabei durch Zugabe von Kupferionen (5 oder 16,6 μ M) gestartet und die Bildung konjugierter Diene spektralphotometrisch verfolgt. Außerdem wurde der α -Tocopherolgehalt in den LDL mittels HPLC bestimmt.

2.3.2 Studie 2: Bestimmung des α -Tocopherol-, Quercetin- und Kaffeesäuregehalts der LDL-Präparationen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation

Ziel dieser Untersuchung war es, die Abnahme von α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure (Tab. 7) in wässrigen LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation zu verfolgen.

Dazu wurde LDL mit den Testsubstanzen, einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert; die Antioxidantien waren in Methanol gelöst. Durch Zugabe von Kupferchlorid (16,6 μ M) wurde die Oxidationsreaktion gestartet. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und die Oxidationsreaktion durch die Zugabe von EDTA (36 μ M) gestoppt. Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung von α -Tocopherol, Kaffeesäure und Quercetin mittels HPLC durchgeführt. Die LDL wurden auch teilweise mit Ascorbinsäure inkubiert, eine Bestimmung von Ascorbinsäure mittels HPLC war jedoch nicht möglich.

Tab. 7: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 2)

Testsubstanz	Beschreibung	Konzentration	Bezugsquelle
α -Tocopherol	Öl	5 μ M	Sigma, USA, Lot Nr.47H1006
Ascorbinsäure	Pulver	3 μ M	Merck, Lot Nr.F274927
Kaffeesäure	Pulver	1 μ M	Sigma, USA, Lot Nr.38H0639
Quercetin	Pulver	1 μ M	ICN, Lot Nr.5279A

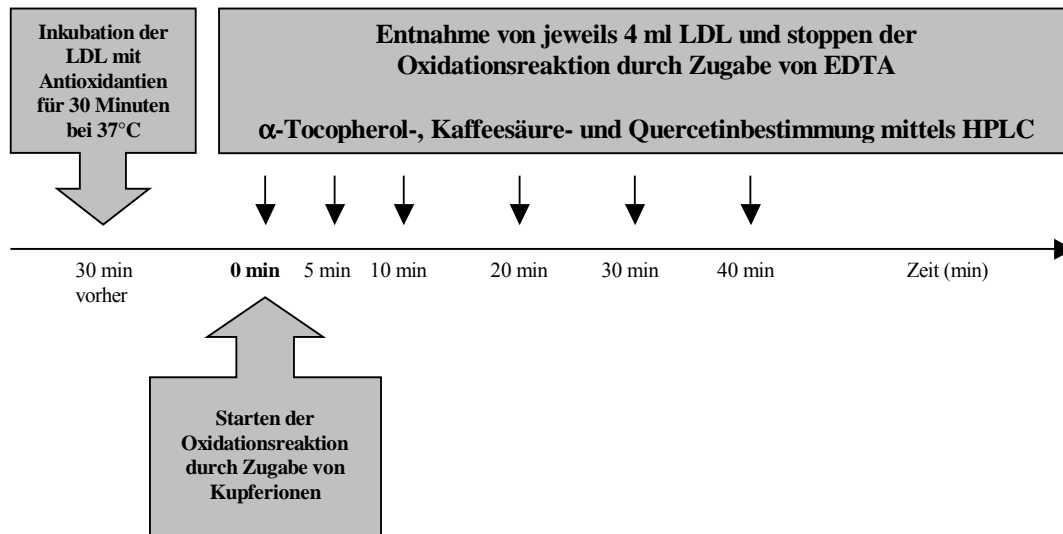


Abb. 14: Versuchsablauf bei der Konzentrationsbestimmung von α -Tocopherol, Kaffeesäure und Quercetin

2.3.3 Studie 3: Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Inkubation der LDL

In dem ersten Abschnitt dieser Studie wurden die LDL mit den Antioxidantien inkubiert. Der Synergieeffekt von Quercetin und Kaffeesäure während kupfer-induzierter LDL-Oxidation sollte untersucht werden. Als Testsubstanzen wurden neben Quercetin und Kaffeesäure auch diesen Substanzen strukturverwandte Stoffe eingesetzt. Dabei handelte es sich um Kaempferol, Dopamin und p-Cumarsäure. Die antioxidativen Effekte dieser Substanzen auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation sollten miteinander verglichen und der Einfluss der chemischen Struktur auf die antioxidative Aktivität untersucht werden. Als Testsystem wurde die Bildung der konjugierten Diene gewählt (Tab. 8).

Tab. 8: Versuchsbedingungen für Studie 3

Parameter	Bedingungen
Präparation der LDL	Präparative Ultrazentrifugation nach Havel
Proteinbestimmung	nach Lowry
Proteinkonzentration	100 µg/ml
Oxidationsmittel	16,6 µM CuCl ₂
Temperatur	37°C

Die LDL wurden mit den Testsubstanzen (Tab. 9), die in Methanol gelöst waren, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe von CuCl₂ gestartet und die Bildung konjugierter Diene spektralphotometrisch verfolgt.

Tab. 9: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 3)

Testsubstanz	Beschreibung	Konzentration	Bezugsquelle
Kaffeensäure	Pulver	0,5 / 1 / 2 µM	Sigma, Lot Nr.38H0639
Quercetin	Pulver	0,5 / 1 / 2 µM	ICN, Lot Nr.5279A
Kaempferol	Pulver	1 µM	ICN, Lot Nr. 6305A
Dopamin	Pulver	1 µM	Sigma, Lot Nr. 99H2513
p-Cumarsäure	Pulver	1 µM	Fluka, Lot Nr. GA10926

Vorinkubation von Plasma mit Quercetin und/oder Kaffeensäure

In dem zweiten Abschnitt dieser Untersuchung wurde zur Anreicherung von Quercetin und Kaffeensäure im LDL Humanserum von zwei verschiedenen Individuen mit den Antioxidantien für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Antioxidantien waren in Ethanol gelöst und wurden entweder einzeln oder in Kombination in einer Endkonzentration im Plasma von 100 µM zugesetzt. Anschließend wurden die LDL nach der Methode von Havel et al. (1955) isoliert. Die Konzentration der Substanzen wurde mittels HPLC nach der modifizierten Methode von Maiani et al. (1997) bestimmt (2.2.3.2). Außerdem wurde der Verlauf der Dienkonjugation der verschiedenen LDL-Präparationen verfolgt (Tab. 10).

Tab. 10: Versuchsbedingungen für LDL-Oxidation nach Vorinkubation von Plasma

Parameter	Bedingungen
Präparation der LDL	Präparative Ultrazentrifugation nach Havel
Proteinbestimmung	nach Lowry
Proteinkonzentration	100 µg/ml
Oxidationsmittel	5 µM CuCl ₂
Temperatur	37°C

2.3.4 Studie 4: Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate

Ziel dieser Studie war, die antioxidative Wirksamkeit unterschiedlicher Kaffeesäurederivate (Tab. 12) auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation zu untersuchen. Es sollte herausgefunden werden, ob diese Stoffwechselprodukte ebenfalls antioxidative Wirkung besitzen. Als Maß für die antioxidative Aktivität wurde die Bildung konjugierter Diene verwendet.

Tab. 11: Versuchsbedingungen für Studie 4

Parameter	Bedingungen
Präparation der LDL	Präparative Ultrazentrifugation nach Havel
Proteinbestimmung	nach Lowry
Proteinkonzentration	62,5 µg/ml
Oxidationsmittel	5 µM CuSO ₄
Temperatur	30°C

Die Antioxidantien waren alle in Methanol gelöst; die LDL wurden mit den einzelnen Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen (Tab. 12) inkubiert. Durch Zugabe von Kupfersulfat wurde die Oxidationsreaktion gestartet und die Bildung der konjugierten Diene spektralphotometrisch verfolgt. Bei dieser Studie wurde die Proteinkonzentration, die

Kupferkonzentration und auch die Messtemperatur im Vergleich zu den vorherigen Studien reduziert (Tab. 11) um den Ablauf der Oxidationsreaktion zu verzögern. Dieser veränderte Versuchsansatz erschien sinnvoll, da zu erwarten war, dass die Effekte der hier verwendeten Testsubstanzen weniger deutlich ausgeprägt sein werden.

Tab. 12: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 4)

Testsubstanz	Beschreibung	Konzentration	Bezugsquelle
Ferulasäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Sigma Lot Nr. 70K1615
Isoferulasäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Extrasynthese Lot Nr. 00050310
Dihydroferulasäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Lancaster Lot Nr. 00007008
Vanillinsäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Sigma Lot Nr. 128H2513
Hippursäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Sigma Lot Nr. 30K3472
o-Hydroxyhippursäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Sigma Lot Nr. 126H0785
3-Hydroxybenzoesäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Extrasynthese Lot Nr. 01042002
3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure	Pulver	1 / 2,5 / 5 / 7,5 μM	Aldrich Lot Nr. 24698-031

2.3.5 Studie 5: Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Das Ziel dieser Experimente war es, die antioxidativen Eigenschaften von Zinkhistidin in Bezug auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation mit denen von Histidin und Zinksulfat zu vergleichen. Es sollte untersucht werden, ob Zinkhistidin in der Lage ist, Peroxylradikale abzufangen und als Metallchelator zu wirken.

Es wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen gearbeitet. Zum einen wurde Plasma vor Isolation der LDL mit den Testsubstanzen inkubiert. Des weiteren wurde LDL direkt mit den Substanzen versetzt.

Tab. 13: Versuchsbedingungen für Studie 5

Parameter	Bedingungen
Präparation der LDL	Präparative Ultrazentrifugation nach Chung
Proteinbestimmung	nach Markwell
Proteinkonzentration	62,5 µg/ml
Oxidationsmittel	5 µM CuSO ₄
Temperatur	37°C

Inkubation von Plasma mit den Testsubstanzen vor Isolation der LDL

Durch Inkubation von Plasma vor Isolation der LDL sollte untersucht werden, ob sich diese Substanzen in den LDL anreichern ließen. Dazu wurde das Plasma mit einer wässrigen Lösung von Zinkhistidin, Zinksulfat oder Histidin mit einer Endkonzentration von 20 µM versetzt (Tab. 14). Für die Kontrolle wurde dem Plasma eine identische Menge an H₂O_{bidest} zugesetzt. Das Plasma wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die LDL nach der Methode von Chung et al. (1980) isoliert. Die unterschiedlichen LDL-Präparationen wurden dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 62,5 µg/ml mit Phosphatpuffer eingestellt. Die Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe von CuSO₄ gestartet und es die Bildung konjugierter Diene spektralphotometrisch verfolgt (Tab. 13).

Tab. 14: Beschreibung, Konzentration und Bezugsquelle der Testsubstanzen (Studie 5)

Testsubstanz	Beschreibung	Konzentration	Bezugsquelle
Zinkhistidin	Pulver	20 μM	Redinomedica AG
Zinksulfat	Pulver	20 μM	Sigma, Lot Nr. 21K0113
Histidin	Pulver	20 μM	Sigma, Lot Nr. 129H0334

Inkubation von LDL mit den Testsubstanzen

LDL wurden nach der Methode von Chung et al. (1980) isoliert. Zur Entfernung des Komplexbildners EDTA wurden die LDL dialysiert und anschließend auf eine Proteinkonzentration von 62,5 $\mu\text{g/ml}$ mit PBS eingestellt. Die LDL wurden mit den unterschiedlichen Substanzen in Form einer wässrigen Lösung, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Tab. 15). Die Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe von CuSO_4 gestartet und die Bildung konjugierter Diene spektralphotometrisch verfolgt.

Tab. 15: Konzentration der Testsubstanzen (Studie 5)

Testsubstanz	Konzentration
Zinkhistidin	2,5 / 5 / 7,5 / 10 μM
Zinksulfat	2,5 / 5 / 7,5 / 10 μM
Histidin	2,5 / 5 / 10 / 20 μM

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit den Computerprogrammen Microsoft Excel 2000 und SPSS 10,0 for Windows. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde Microcal Origin 6.0G Professional, Microsoft Excel 2000 und Microsoft Powerpoint 2000 verwendet. Alle Versuche wurden mit mindestens einer Wiederholung durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse dargestellt als Mittelwert und zugehörige Standardabweichung. Zur Überprüfung des Einflusses der Behandlung der LDL wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Als a-posteriori Test wurde der Student-Newman-Keuls-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

3.1.1 Dienkonjugation

Die Bildung konjugierter Diene im Lipidteil der LDL gibt Aufschluss über die Oxidierbarkeit verschiedener LDL-Proben. Eine verlängerte lag-phase bedeutet dabei eine erhöhte Resistenz der LDL gegenüber Oxidation. Es sollte geprüft werden, ob die Inkubation der LDL mit unterschiedlichen Antioxidantien vor Oxidation schützen kann. Zunächst wurden die Antioxidantien einzeln auf ihre antioxidative Aktivität getestet. Anschließend sollte untersucht werden, welchen Einfluss die gleichzeitige Inkubation von mehreren Substanzen auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation hat. Dazu wurden Kombinationen von zwei, drei oder vier unterschiedlichen Antioxidantien eingesetzt.

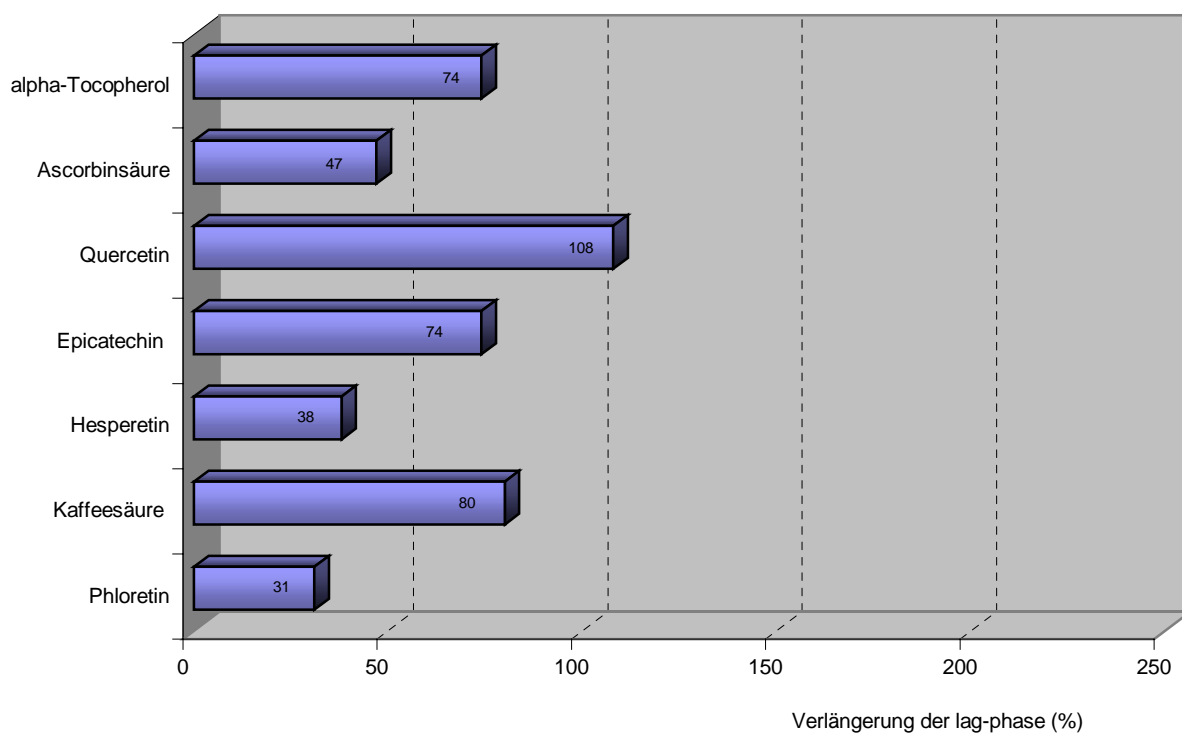


Abb. 15: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit unterschiedlichen Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von α -Tocopherol (5 μ M) oder Ascorbinsäure (3 μ M) auf die Oxidationsresistenz der LDL geringer war, im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen (jeweils 1 μ M) (Abb. 15). α -Tocopherol bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um $74 \pm 24,2$ % und Ascorbinsäure um $47 \pm 14,1$ %. Bei den Einzelsubstanzen hatte Quercetin den größten Effekt auf die Verlängerung der lag-phase mit durchschnittlich $108 \pm 15,5$ %. Durch Inkubation mit Kaffeesäure ($80 \pm 24,0$ %) oder Epicatechin ($74 \pm 20,9$ %) konnte ebenfalls eine deutliche Verlängerung der lag-phase erreicht werden. Hesperetin und Phloretin zeigten in dem hier verwendeten Versuchsansatz mit $38 \pm 14,2$ bzw. $31 \pm 14,7$ % nur geringe Wirkung auf die Oxidationsresistenz der LDL.

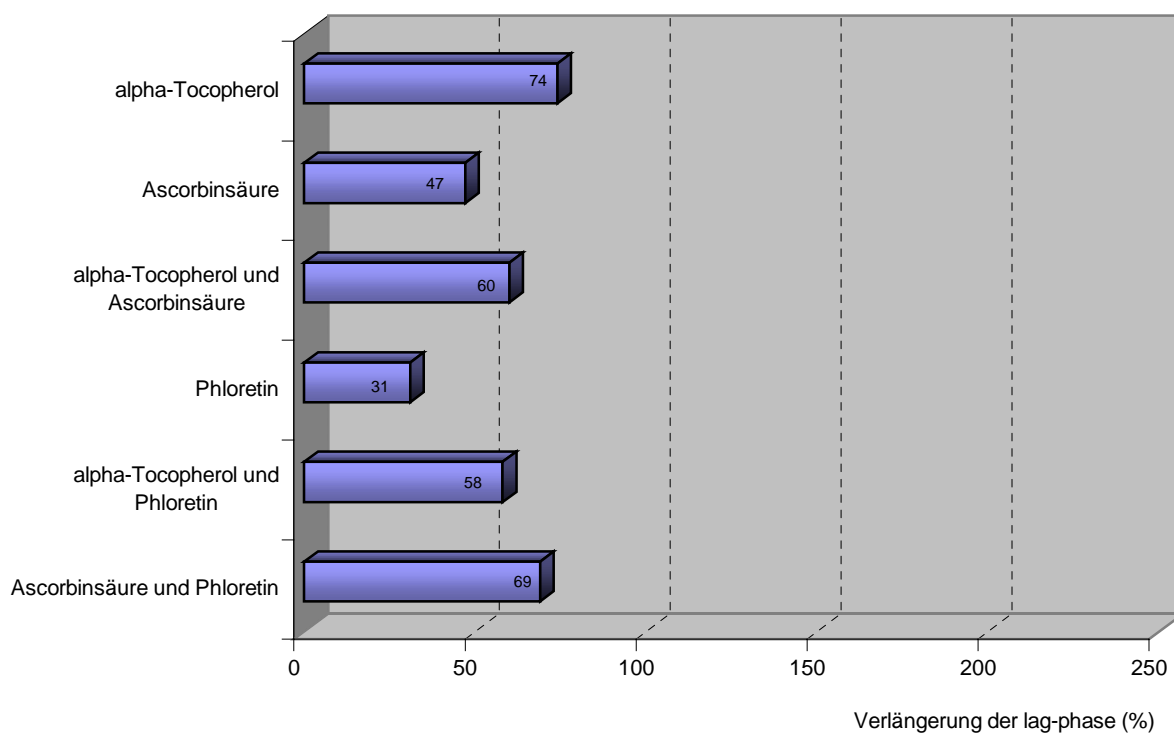


Abb. 16: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Bei vier von fünf Personen hatte die Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure oder α -Tocopherol und Phloretin, bezogen auf die Wirkung von α -Tocopherol allein, einen verkürzenden Effekt auf die lag-phase ($p < 0,05$) (Abb. 16); der antioxidative Effekt war hier niedriger als bei Inkubation mit α -Tocopherol allein. Die Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure bewirkte eine Verlängerung der lag-phase

um $60 \pm 16,1$ % und lag damit unter dem Effekt von α -Tocopherol ($74 \pm 24,2$ %). Die Kombination von α -Tocopherol und Phloretin verlängerte die lag-phase um $58 \pm 11,3$ %.

Bei Kombination der anderen Substanzen mit α -Tocopherol wurde eine Verlängerung der lag-phase beobachtet, die aber unter der Summe der Einzelsubstanzeffekte lag.

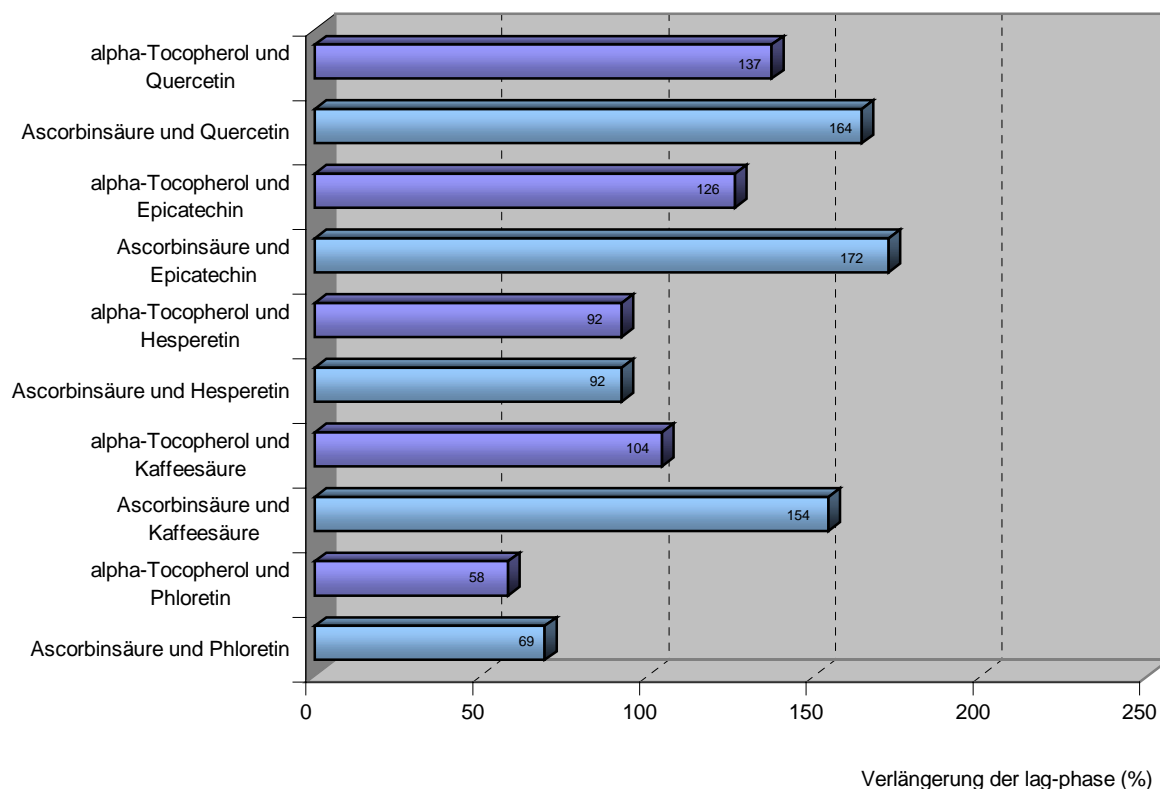


Abb. 17: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit einer Kombination eines Polyphenols mit α -Tocopherol oder Ascorbinsäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) (Kombinationen mit α -Tocopherol dunkelblaue Balken; Kombinationen mit Ascorbinsäure hellblaue Balken)

Dagegen zeigte Ascorbinsäure in Kombination mit einem Flavonoid oder einer Phenolsäure einen stärkeren LDL-protectiven Effekt als die entsprechenden Kombinationen mit α -Tocopherol (Abb. 17), obwohl der Einzelsubstanzeffekt von Ascorbinsäure niedriger war als der von α -Tocopherol. Die antioxidativen Aktivitäten übertrafen die Summe der Einzelsubstanzeffekte. Nur bei Inkubation der LDL mit Ascorbinsäure und Phloretin lag die Wirkung ($69 \pm 20,0$ %) unter der Summe der Einzelsubstanzeneffekte.

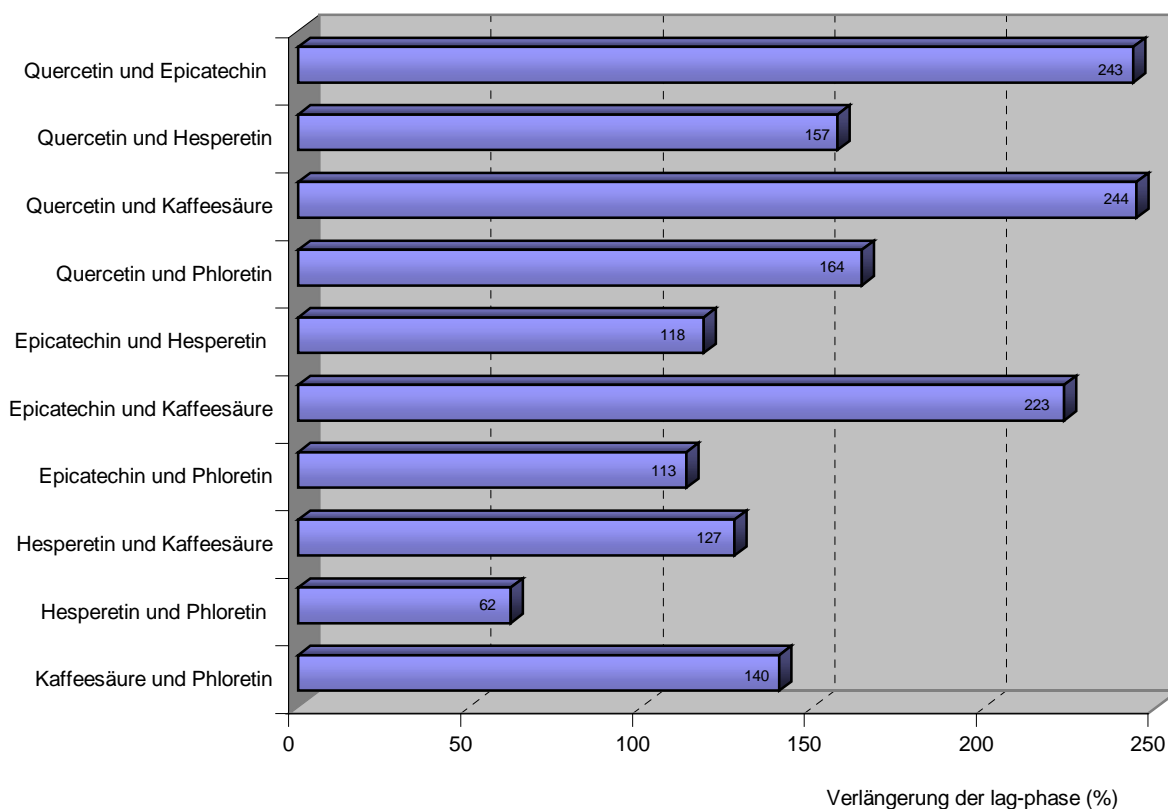


Abb. 18: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit unterschiedlichen Kombinationen der Polyphenole, im Vergleich zur Kontrolle (100 %, LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Die Kombinationen von Epicatechin und Hesperetin ($118 \pm 33,0$ %) bzw. Phloretin ($113 \pm 23,5$ %) oder Hesperetin und Kaffeesäure ($127 \pm 26,3$ %) bzw. Phloretin ($62 \pm 26,7$ %) hatten einen additiven Effekt bezogen auf die Einzelsubstanzeffekte (Abb. 18). Bei den Kombinationen von Quercetin mit Epicatechin ($243 \pm 122,3$ %), Hesperetin ($157 \pm 23,1$ %), Kaffeesäure ($244 \pm 111,3$ %) oder Phloretin ($164 \pm 61,5$ %) erhöhte sich der antioxidative Schutz, ebenso wie bei Epicatechin und Kaffeesäure ($223 \pm 51,8$ %) oder Kaffeesäure und Phloretin ($140 \pm 25,4$ %); die antioxidativen Effekte dieser Kombinationen waren höher als die Summe der Einzeleffekte.

Den stärksten Effekt auf die Verlängerung der lag-phase von LDL, bei Kombination von zwei verschiedenen Antioxidantien, hatte die Inkubation der LDL mit Quercetin und Kaffeesäure mit einer Verlängerung der lag-phase von $244 \pm 111,3$ %.

Gleichzeitige Inkubation der LDL mit α -Tocopherol, Ascorbinsäure und einem Flavonoid oder einer Phenolsäure bewirkte eine Verlängerung der lag-phase, die unter der Summe der

Einzelsubstanz-Effekte lag (Tab. 16). Der stärkste Effekt konnte beobachtet werden, wenn LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin ($222 \pm 127,3$ %) oder Kaffeesäure ($211 \pm 82,6$ %) inkubiert wurde. Schwache antioxidative Effekte wurden erzielt, wenn α -Tocopherol und Ascorbinsäure mit Hesperetin ($112 \pm 28,0$ %) oder Phloretin ($147 \pm 105,7$ %) kombiniert wurden.

Synergistische Wechselwirkungen konnten dagegen beobachtet werden, wenn Quercetin, Epicatechin und ein weiteres Antioxidans gleichzeitig zugesetzt wurden (Tab. 16). Die Verlängerung der lag-phase war höher als die Summe der Einzelsubstanzeffekte. So führte die Kombination von Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol zu einer Verlängerung der lag-phase von $314 \pm 131,6$ %. Eine Kombination mit Ascorbinsäure ($375 \pm 178,2$ %) hatte einen höheren Effekt als mit α -Tocopherol. Der höchste antioxidative Effekt bei Kombination von drei verschiedenen Antioxidantien konnte beobachtet werden, bei Kombination von Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure mit einer Verlängerung der lag-phase um $419 \pm 192,8$ %.

Wurden LDL mit vier oder sechs verschiedenen Antioxidantien gleichzeitig inkubiert, lag die Verlängerung der lag-phase über der Summe der Einzelsubstanzeffekte.

Tab. 16: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (in %; MEAN und SD; n=5) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Antioxidantien	MEAN	SD
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	222	127,3
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	172	98,4
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	112	28,0
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	211	82,6
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	147	105,7
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	314	131,6
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	375	178,2
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	283	92,0
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	419	192,8
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	297	94,0
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	468	203,5
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	638	198,8

Anreicherung von Plasma mit α -Tocopherol vor Isolation der LDL

In diesem Versuchsansatz wurde Plasma mit α -Tocopherol (Endkonzentration von 250 μM) vor Isolation der LDL inkubiert. Nach Inkubation des Plasma wurden die LDL isoliert, fallweise mit Ascorbinsäure inkubiert und der Verlauf der Dienkonjugation während kupfer-induzierter Oxidation bestimmt.

Der α -Tocopherolgehalt der LDL-Präparationen wurde mittels HPLC bestimmt und betrug für Kontroll-LDL $8,7 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ und für LDL, bei dem Plasma mit α -Tocopherol vorinkubiert war, $36,9 \pm 0,8 \mu\text{mol/l}$.

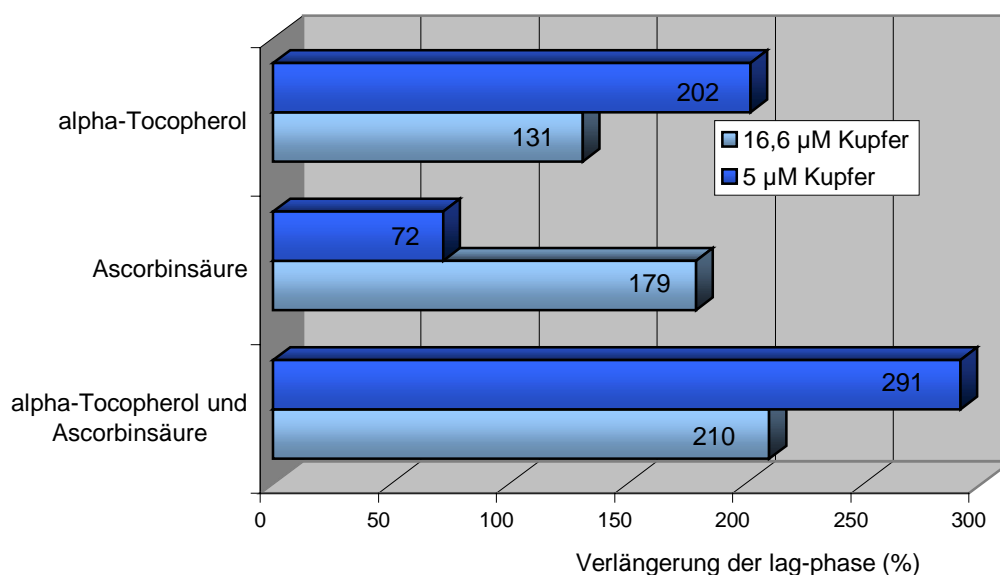


Abb. 19: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Vorinkubation von Plasma mit α -Tocopherol und/oder Inkubation der LDL mit Ascorbinsäure (Kupferkonzentration 5 oder 16,6 μM)

Bei einer Kupferkonzentration von 16,6 μM betrug die Verlängerung der lag-phase von LDL, bei dem Plasma mit α -Tocopherol vorinkubiert war, 131 % verglichen mit Kontroll-LDL. Wurde eine Kupferkonzentration von 5 μM verwendet konnte eine Verlängerung der lag-phase von 202 % beobachtet werden. Wurde LDL mit Ascorbinsäure inkubiert so verlängerte sich die lag-phase um 179 % (bei 16,6 μM Kupfer) oder 72 % (bei 5 μM Kupfer). LDL, das mit α -Tocopherol vorinkubiert war und zusätzlich mit Ascorbinsäure angereichert wurde, konnte bei einer Kupferkonzentration von 16,6 μM eine Verlängerung der lag-phase um 210 % festgestellt

werden. Bei einer Kupferkonzentration von 5 μM dagegen betrug die Verlängerung 291 % im Vergleich zur Kontrolle.

Wurde also eine Kupferkonzentration von 16,6 μM verwendet, so konnte bei Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure eine antioxidative Wirkung beobachtet werden, die unter der Summe der Einzeleffekte lag. Bei Verwendung einer Kupferkonzentration von nur 5 μM allerdings konnte ein additiver antioxidativer Effekt festgestellt werden.

3.1.2 Tryptophanfluoreszenz

Bei Kontroll-LDL (ohne Zusatz von Antioxidantien) war die Fluoreszenzintensität schon nach 120 Minuten auf $50 \pm 6,8$ % gesunken; nach 180 Minuten betrug sie nur noch $25 \pm 2,4$ %.

Inkubation der LDL mit Ascorbinsäure hatte keinen Einfluss auf den kupfer-induzierten Verlust der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 20) in Bezug auf die Kontrolle; der Verlauf der Tryptophanfluoreszenz unterschied sich nicht signifikant von dem Verlauf der Kontrolle. Die Inkubation der LDL mit α -Tocopherol dagegen beeinflusste den Fluoreszenzverlust der LDL während kupfer-induzierter Oxidation; die Fluoreszenzintensität von LDL, inkubiert mit α -Tocopherol, betrug nach 120 Minuten noch $67 \pm 9,2$ %. Nach 180 Minuten war die Fluoreszenzintensität auf $49 \pm 17,7$ % im Vergleich zu $25 \pm 2,4$ % der Kontrolle gesunken. Den stärksten Effekt der Einzelsubstanzen auf den Tryptophanverlust der LDL hatte die Inkubation mit Quercetin oder Kaffeesäure. So betrug die Fluoreszenzintensität nach 120 bzw. 180 Minuten noch $78 \pm 2,8$ bzw. $74 \pm 6,7$ % für Quercetin und $73 \pm 7,4$ % bzw. $70 \pm 9,9$ % für Kaffeesäure.

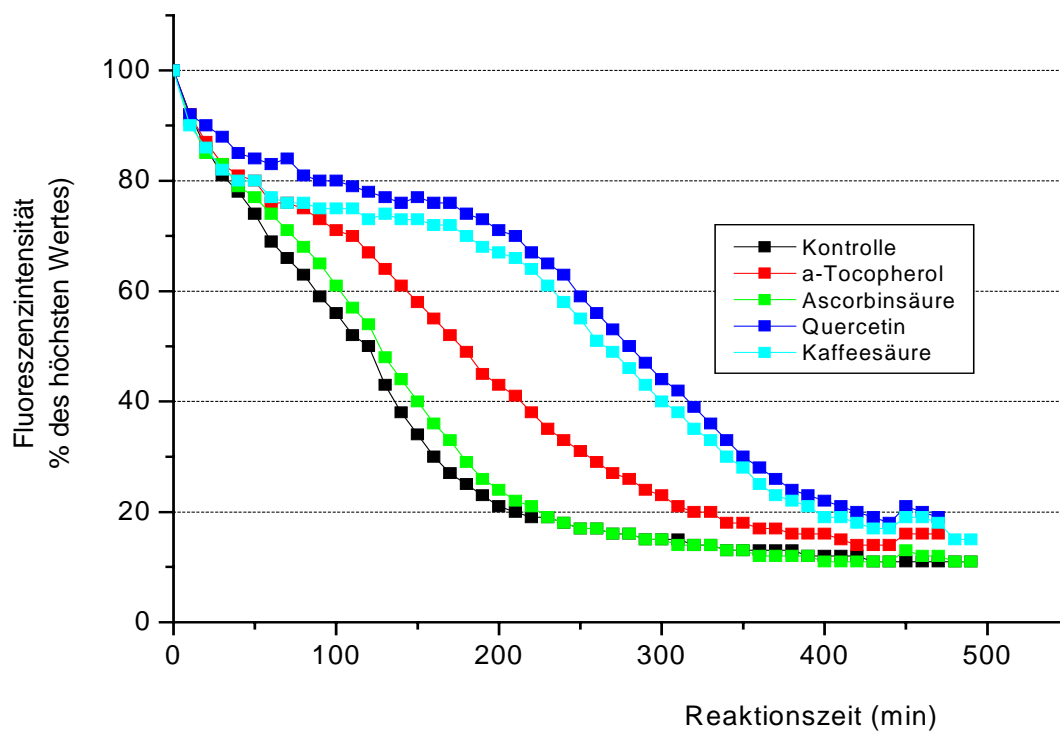


Abb. 20: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen während kupfer-induzierter Oxidation

Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Quercetin oder α -Tocopherol und Kaffeesäure betrug die Tryptophanfluoreszenz nach 120 Minuten $75 \pm 1,9$ bzw. $73 \pm 3,5$ % (Abb. 21). Nach 240 Minuten lagen die Werte immer noch bei durchschnittlich $64 \pm 11,2$ bzw. $67 \pm 8,2$ %. Einen stärkeren Einfluss auf die Schädigung der Tryptophanreste hatte die Kombination von Ascorbinsäure und Quercetin oder Ascorbinsäure und Kaffeesäure; die Fluoreszenzintensität der LDL betrug nach 120 Minuten noch $79 \pm 2,5$ bzw. $76 \pm 4,9$ %. Selbst nach 360 Minuten lagen die Werte noch bei $50 \pm 32,2$ bzw. $63 \pm 12,7$ %. Den stärksten Einfluss auf die Tryptophanfluoreszenz während kupfer-induzierter LDL-Oxidation hatte die Kombination von Quercetin und Kaffeesäure (Abb. 21); hier betrug die Fluoreszenzintensität selbst nach 420 Minuten noch $74 \pm 1,4$ %.

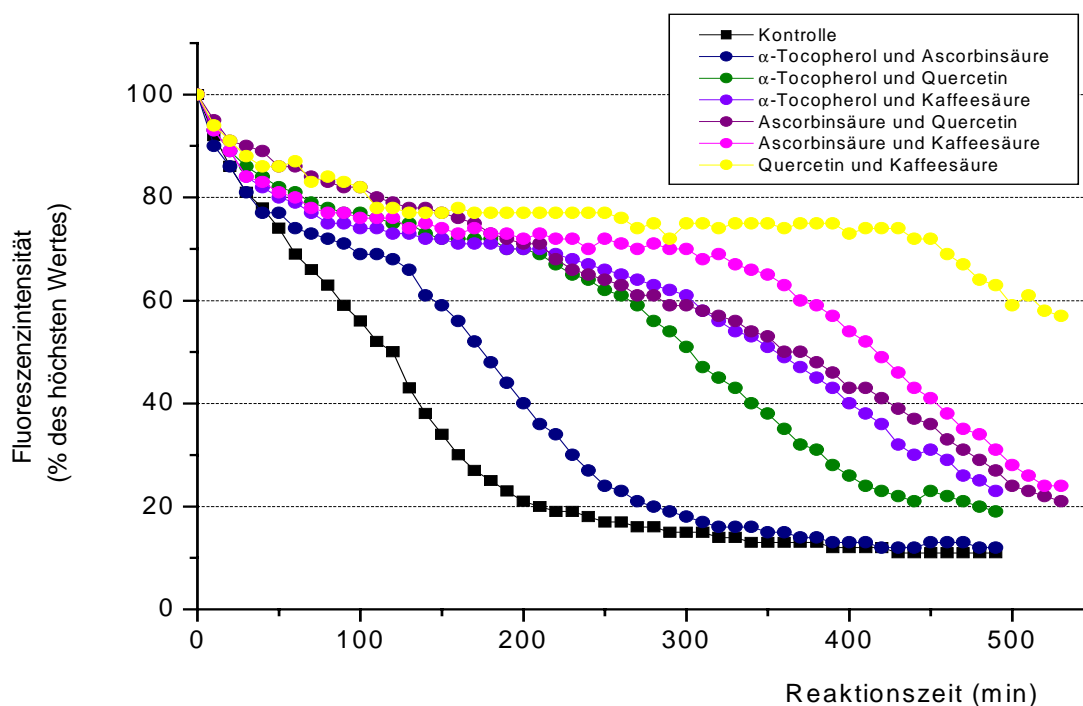


Abb. 21: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen während kupfer-induzierter Oxidation

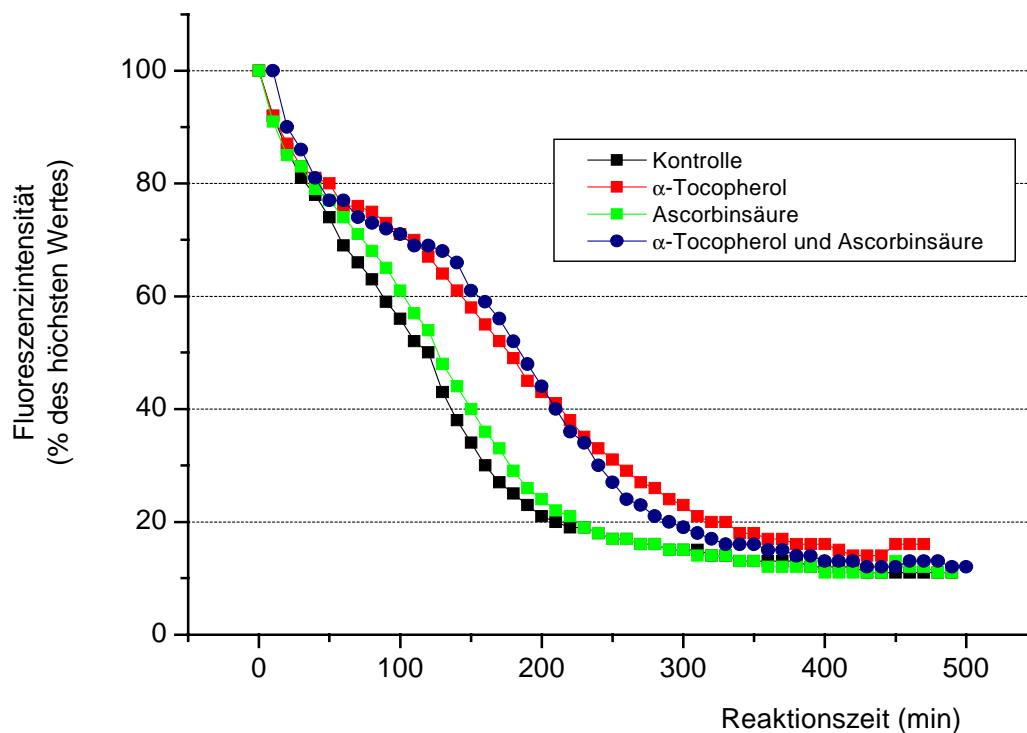


Abb. 22: Tryptophanfluoreszenz humaner LDL (n=2) nach Inkubation mit α -Tocopherol und/oder Ascorbinsäure während Kupferoxidation

In Abb. 22 sind noch einmal die Ergebnisse bei Inkubation der LDL mit α -Tocopherol und Ascorbinsäure zusammengefasst. Bei Inkubation der LDL mit α -Tocopherol und Ascorbinsäure konnte kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Tryptophanfluoreszenz, bezogen auf α -Tocopherol allein, beobachtet werden (Abb. 22). So lagen die Werte bei Kombination der beiden Antioxidantien nach 120 Minuten bei $68 \pm 3,7$ % im Vergleich zu $67 \pm 9,2$ bei Inkubation der LDL mit α -Tocopherol allein. Nach 180 Minuten war der Wert auf $48 \pm 10,5$ % im Vergleich zu α -Tocopherol mit $49 \pm 17,7$ % gesunken. In dem hier verwendeten Versuchsansatz konnte also keine synergistische Wirkung von α -Tocopherol und Ascorbinsäure beobachtet werden.

3.1.3 Carbonylgruppenbildung

In Abb. 23 und Abb. 24 ist die Bildung von Carbonylgruppen in den LDL (fallweise inkubiert mit Antioxidantien) zu unterschiedlichen Zeitpunkten während kupfer-induzierter Oxidation dargestellt. Der Carbonylgehalt der LDL ist dabei angegeben in nmol Carbonyl/mg Protein. In Abb. 23 ist die Entstehung von Carbonylgruppen in Kontroll-LDL (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien) und LDL inkubiert mit α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin oder Kaffeesäure während der Oxidationsreaktion dargestellt.

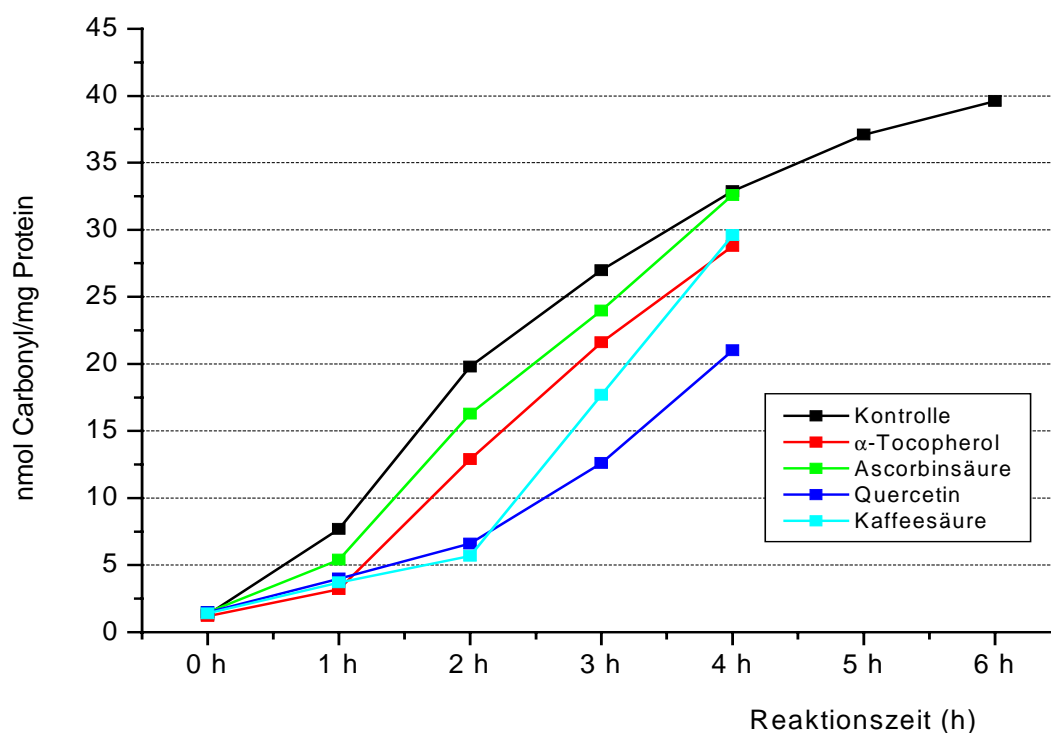


Abb. 23: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit Antioxidantien während kupfer-induzierter Oxidation

Der Einfluss von α -Tocopherol oder Ascorbinsäure auf die kupfer-induzierte Bildung von Carbonylgruppen ist gering (Abb. 23). Nach zwei Stunden beträgt der Carbonylgehalt bereits $12,9 \pm 6,7$ nmol Carbonyl/mg Protein für α -Tocopherol bzw. $16,3 \pm 6,2$ nmol Carbonyl/mg Protein für Ascorbinsäure im Vergleich zum Kontroll-LDL mit $19,8 \pm 4,1$. Eine stärkere Hemmung der Carbonylgruppenbildung bewirkte bei dieser Untersuchung, die Inkubation der LDL mit den Phenolsäuren, Quercetin oder Kaffeesäure. Die Werte lagen nach zwei Stunden erst bei $6,6 \pm 1,7$ bzw. $5,7 \pm 0,9$ nmol Carbonyl/mg Protein.

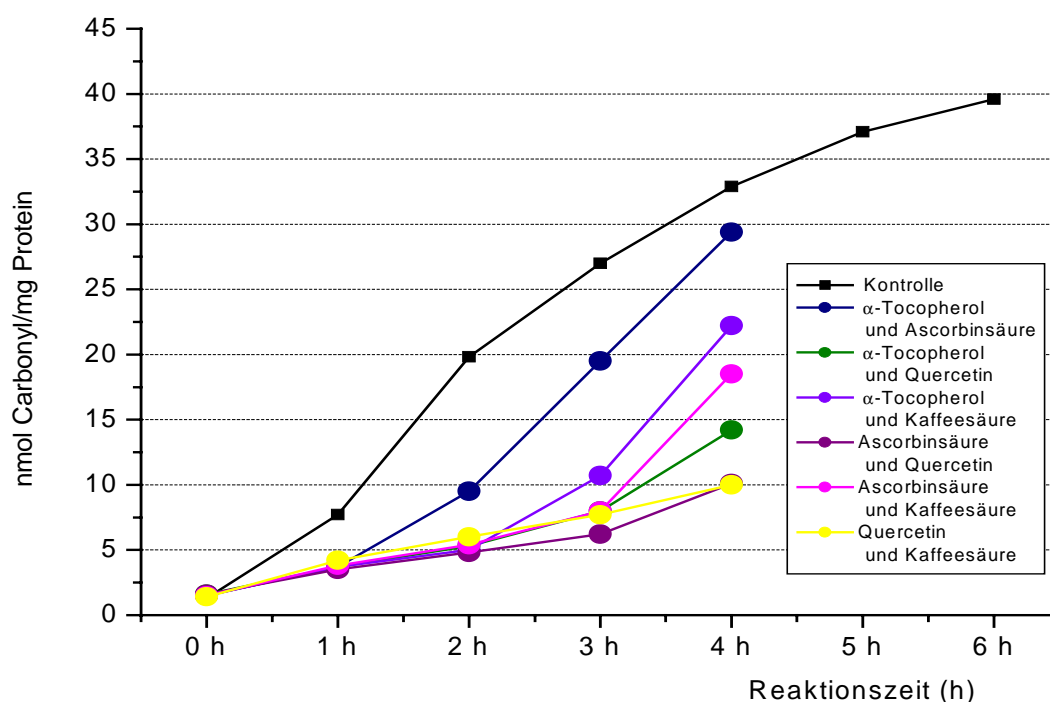


Abb. 24: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit Antioxidantienkombinationen während kupfer-induzierter Oxidation

Wurden Quercetin oder Kaffeesäure mit Ascorbinsäure kombiniert, so konnte eine höhere antioxidative Aktivität beobachtet werden, als bei Kombination von α -Tocopherol mit den Phenolsäuren (Abb. 24), obwohl der Einzelsubstanzeffekt von Ascorbinsäure niedriger war als der von α -Tocopherol (Abb. 23).

Den stärksten Effekt auf die kupfer-induzierte Bildung von Carbonylgruppen hatte die Inkubation von LDL mit einer Kombination von Ascorbinsäure und Quercetin oder Quercetin und Kaffeesäure (Abb. 24). Bei diesen LDL-Präparationen lagen die Carbonylgehalte nach vier Stunden bei $10,1 \pm 6,5$ bzw. $10,0 \pm 4,2$ nmol Carbonyl/mg Protein.

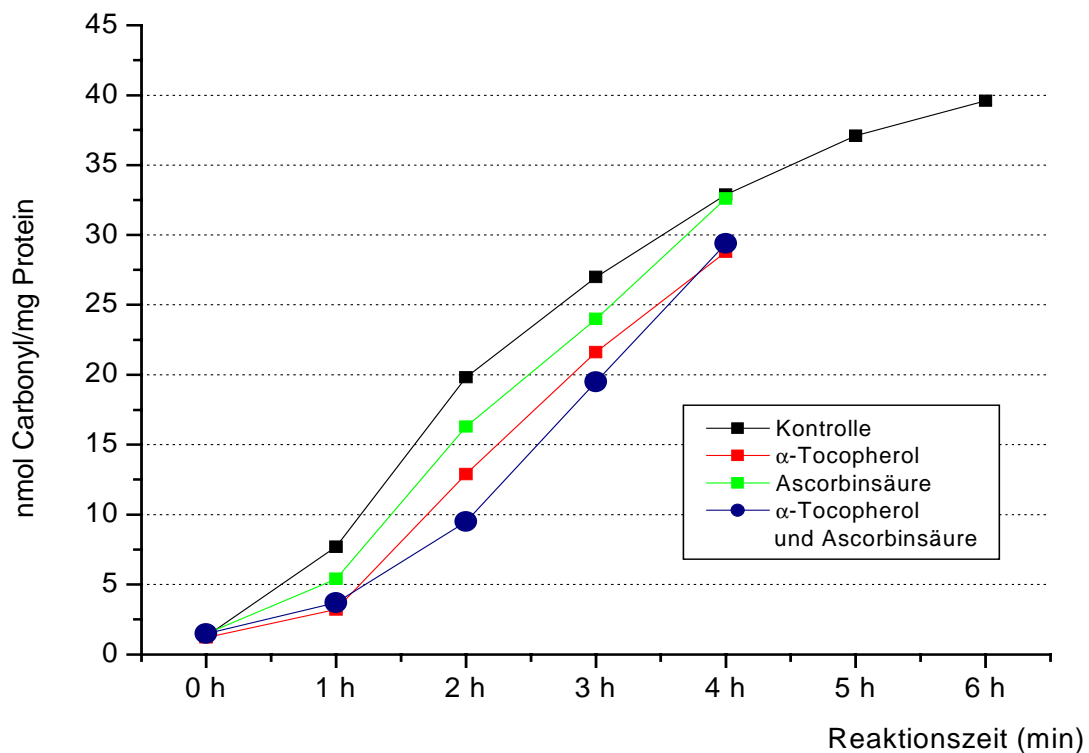


Abb. 25: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit α -Tocopherol und/oder Ascorbinsäure während kupfer-induzierter Oxidation

In Abb. 25 sind noch einmal die Ergebnisse bei Inkubation der LDL mit α -Tocopherol und Ascorbinsäure zusammengefasst. Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure konnte auch wie bei den vorherigen Versuchsansätzen kein synergistischer Effekt dieser beiden Antioxidantien während kupfer-induzierter LDL-Oxidation beobachtet werden. Vergleicht man die antioxidative Aktivität einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure mit der von α -Tocopherol, so konnte kein signifikanter Unterschied bei der Bildung von Carbonylgruppen (Abb. 25) festgestellt werden.

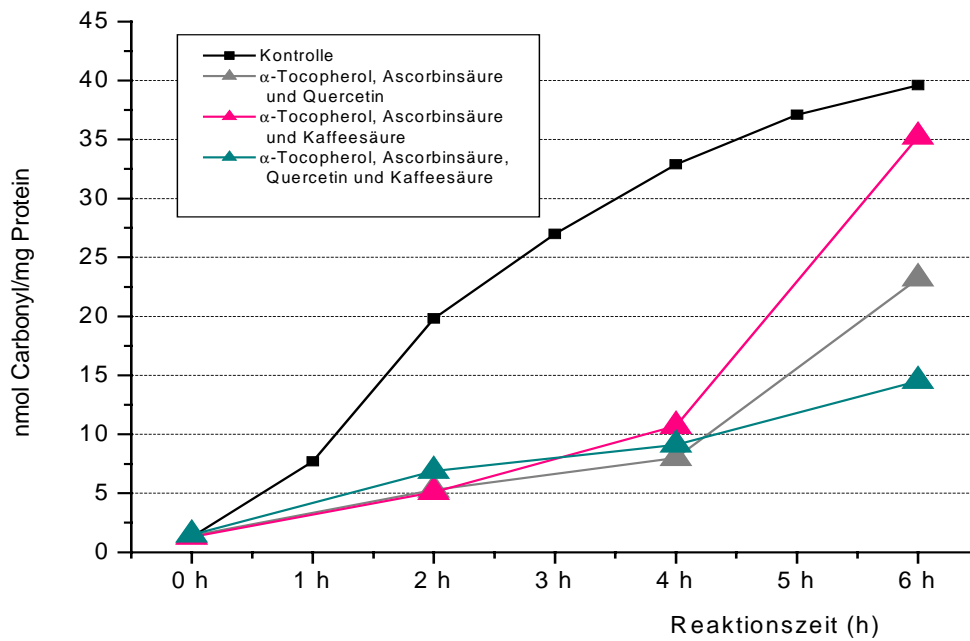


Abb. 26: Carbonylgehalt humaner LDL (n=5) nach Inkubation einer Kombination aus drei verschiedenen Antioxidantien während Kupferoxidation

Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von drei oder vier verschiedenen Antioxidantien konnte eine starke Hemmung der Carbonylgruppenbildung während kupfer-induzierter Oxidation beobachtet werden (Abb. 26). Nach vier Stunden lag hier der Carbonylgehalt zwischen 8 und 11 nmol Carbonyl/mg Protein.

3.2 Bestimmung des α -Tocopherol-, Quercetin- und Kaffeesäuregehalts der LDL-Präparationen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation

Anhand dieser Versuche sollte die Abnahme der antioxidativ wirksamen Substanzen α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure in unterschiedlichen LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation verfolgt werden.

3.2.1 α -Tocopherolgehalt in den LDL-Präparationen

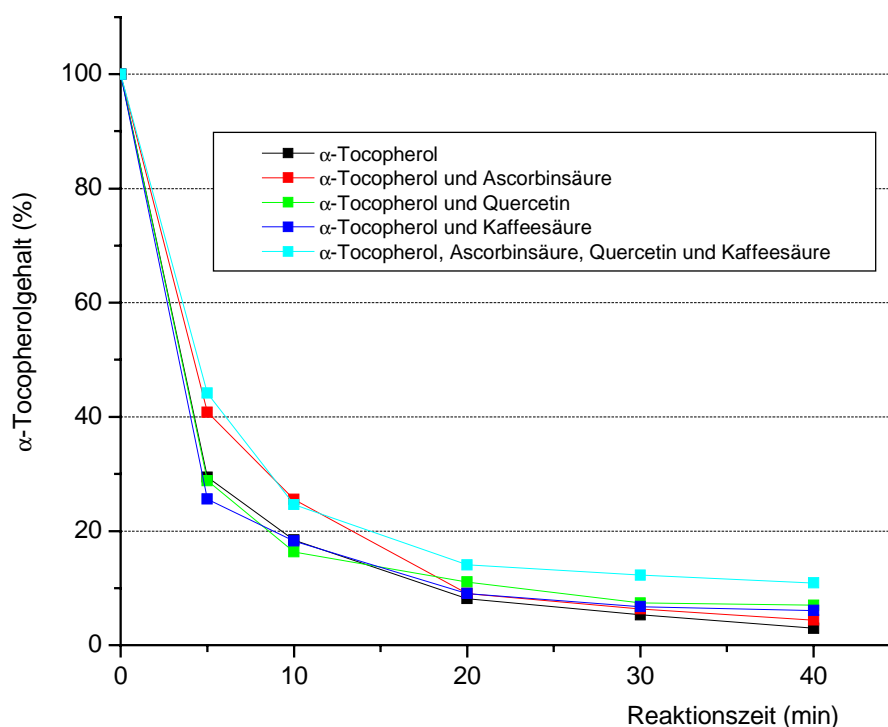


Abb. 27: α -Tocopherolgehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen

Der Verlauf des α -Tocopherolgehalts in den verschiedenen LDL-Präparationen ist sehr ähnlich (Abb. 27). Nur bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure oder α -Tocopherol, Ascorbinsäure und zusätzlich Quercetin und Kaffeesäure ist der Verbrauch von α -Tocopherol verzögert (Abb. 27). Bei diesen beiden Ansätzen lag der Gehalt

nach fünf Minuten noch bei 41 bzw. 44 % im Vergleich zu den anderen Ansätzen mit einem Gehalt von 26-30 %.

3.2.2 Quercetingehalt in den LDL-Präparationen

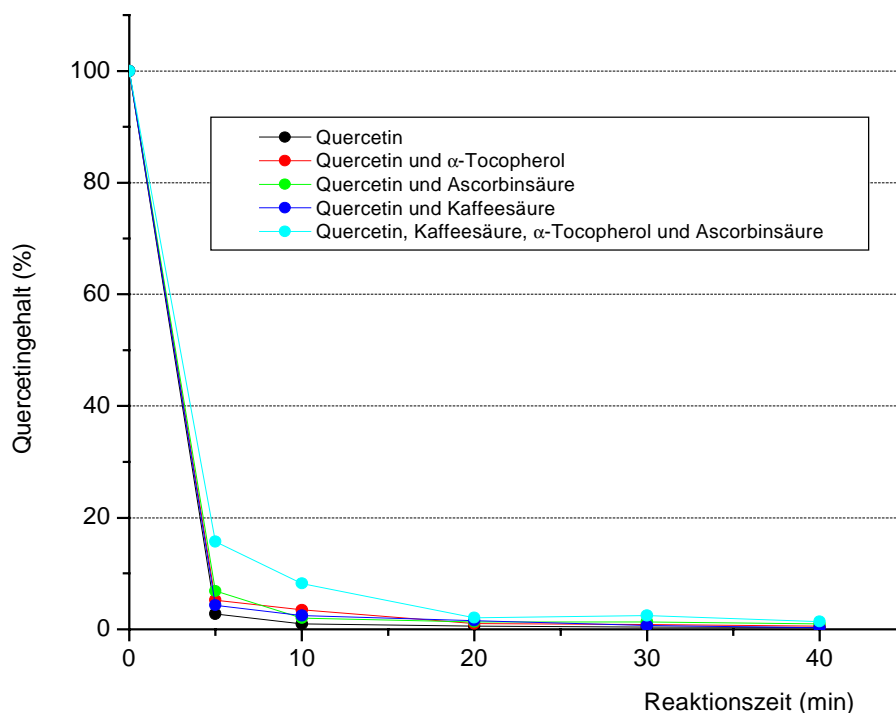


Abb. 28: Quercetingehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen

Quercetin wurde während der kupfer-induzierter Oxidation schneller verbraucht als α -Tocopherol. Es konnten keine signifikanten Unterschiede, bezogen auf den Verlauf des Quercetinverlusts der einzelnen Ansätze, beobachtet werden (Abb. 28). Lediglich bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure wurde das Quercetin langsamer verbraucht als bei den anderen Ansätzen. Bei dieser Kombination lag der Quercetingehalt nach fünf Minuten noch bei 16 % im Vergleich zu den anderen LDL-Präparationen mit einem Gehalt zwischen 3-7 %.

3.2.3 Kaffeesäuregehalt in den LDL-Präparationen

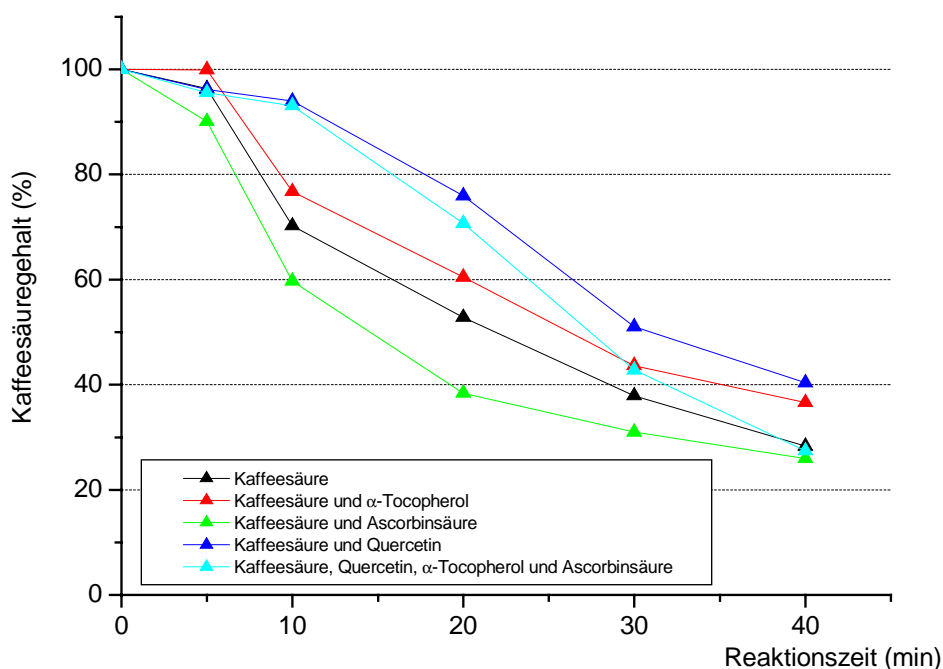


Abb. 29: Kaffeesäuregehalt (%) der LDL-Präparationen während kupfer-induzierter Oxidation bei unterschiedlichen Inkubationsansätzen

Wurde der Kaffeesäuregehalt in den LDL-Präparationen bestimmt, so konnte hier ein Einfluss der Kombinationen beobachtet werden (Abb. 29). Nach fünf Minuten waren noch zwischen 90 und 100 % der Kaffeesäure vorhanden. Bei Inkubation der LDL mit Kaffeesäure allein oder einer Kombination von Kaffeesäure und Ascorbinsäure sank der Kaffeesäuregehalt am schnellsten; nach 10 Minuten lag der Gehalt bei 70 bzw. 60 %. Wurde dagegen eine Kombination von Kaffeesäure und Quercetin oder α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure getestet, so lag der Kaffeesäuregehalt nach 10 Minuten noch bei 93 bzw. 94 %. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten lag der Kaffeesäuregehalt bei Inkubation der LDL mit Kaffeesäure allein oder Kaffeesäure und Ascorbinsäure bereits bei 38 bzw. 52 % und damit deutlich unter den Werten von Kaffeesäure und α -Tocopherol (61 %), Kaffeesäure und Quercetin (76 %) oder Kaffeesäure, Quercetin, α -Tocopherol und Ascorbinsäure (71 %).

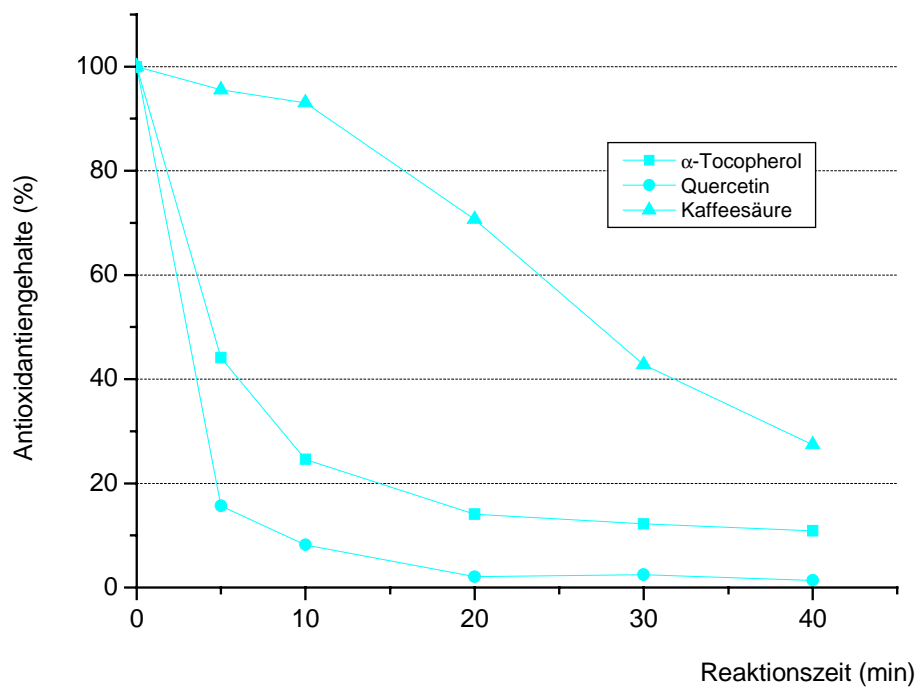


Abb. 30: Antioxidantiengehalt (%) in den LDL während kupfer-induzierter Oxidation nach Inkubation mit einer Kombination von α -Tocopherol, Quercetin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure

In Abb. 30 sind die Antioxidantiengehalte bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol, Quercetin, Kaffeesäure und Ascorbinsäure (wurde nicht bestimmt) noch einmal zusammengefasst. Es wird dabei deutlich, dass in dem hier verwendeten Versuchsansatz Quercetin am schnellsten verbraucht wurde. Der α -Tocopherolgehalt zeigte einen ähnlichen Verlauf; nur Kaffeesäure wurde deutlich langsamer verbraucht.

3.3 Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Inkubation von LDL

In diesem ersten Abschnitt sollte die synergistische Wirkung von Quercetin und Kaffeesäure auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation mit der Wirkung von strukturverwandten Substanzen verglichen werden. Neben Quercetin und Kaffeesäure zählten Kaempferol (strukturverwandt zu Quercetin), p-Cumarsäure und Dopamin (strukturverwandt zu Kaffeesäure) zu den Testsubstanzen. Die Substanzen wurden alle in einer Endkonzentration von 1 μM eingesetzt; nur Quercetin und Kaffeesäure wurden noch zusätzlich mit einer Endkonzentration von 0,5 oder 2 μM getestet.

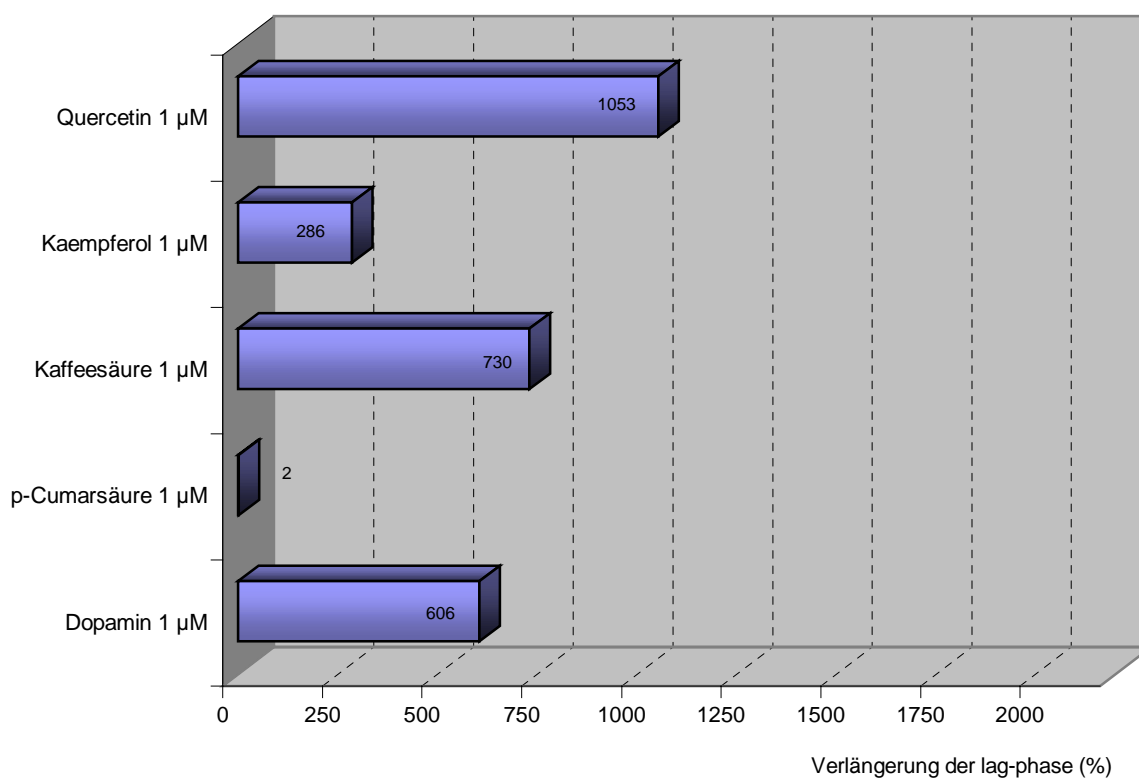


Abb. 31: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; $n=2$), nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen (Endkonzentration 1 μM), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Den stärksten Effekt auf die Oxidationsresistenz der LDL hatte die Inkubation der LDL mit Quercetin, gefolgt von Kaffeesäure (Abb. 31). Quercetin bewirkte eine Verlängerung der lag-

phase um $1053 \pm 4,2$ % bezogen auf die Kontrolle. Kaffeesäure verlängerte die lag-phase von LDL um $730 \pm 5,7$ %. Die beiden der Kaffeesäure strukturverwandten Stoffe p-Cumarsäure und Dopamin hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die LDL-Oxidation. Inkubation der LDL mit p-Cumarsäure hatte keinen Einfluß auf die lag-phase der LDL im Vergleich zu Kontroll-LDL. Wurde LDL aber mit Dopamin inkubiert, konnte eine signifikante Verlängerung ($p < 0,001$) der lag-phase um $606 \pm 3,5$ % beobachtet werden; die Wirkung war aber niedriger ($p < 0,001$) als der Effekt von Kaffeesäure ($730 \pm 5,7$ %).

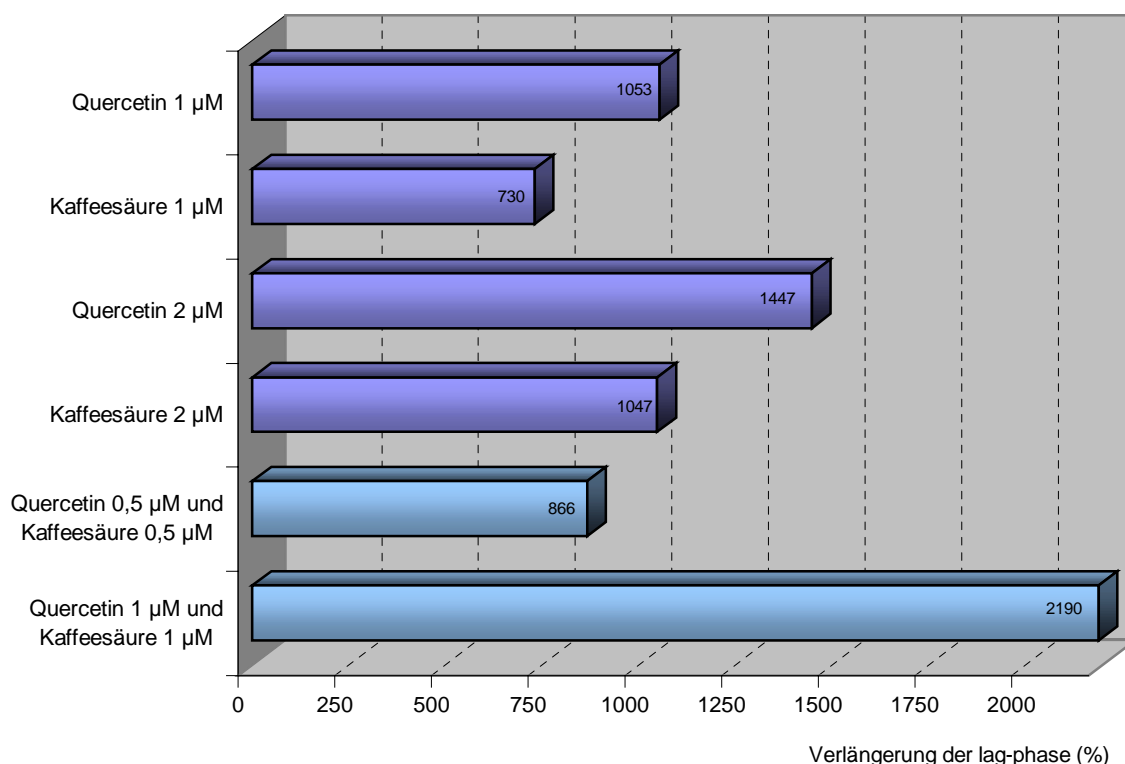


Abb. 32: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; $n=2$), nach Inkubation mit Quercetin und Kaffeesäure (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau; in unterschiedlichen Konzentrationen), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Eine synergistische Wirkung konnte nur bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von 1 μ M Quercetin und 1 μ M Kaffeesäure beobachtet werden (Abb. 32), die Verlängerung ($p < 0,001$) der lag-phase betrug $2190 \pm 8,5$ %. Die Kombination von Quercetin und Kaffeesäure führte zu einer antioxidativen Aktivität, die über der Summe der individuellen Effekte von Quercetin oder Kaffeesäure lag. Wurden die LDL mit Quercetin oder Kaffeesäure einer Endkonzentration von 2 μ M inkubiert, so konnte kein additiver Effekt, bezogen auf eine Endkonzentration von 1 μ M, beobachtet werden (Abb. 32).

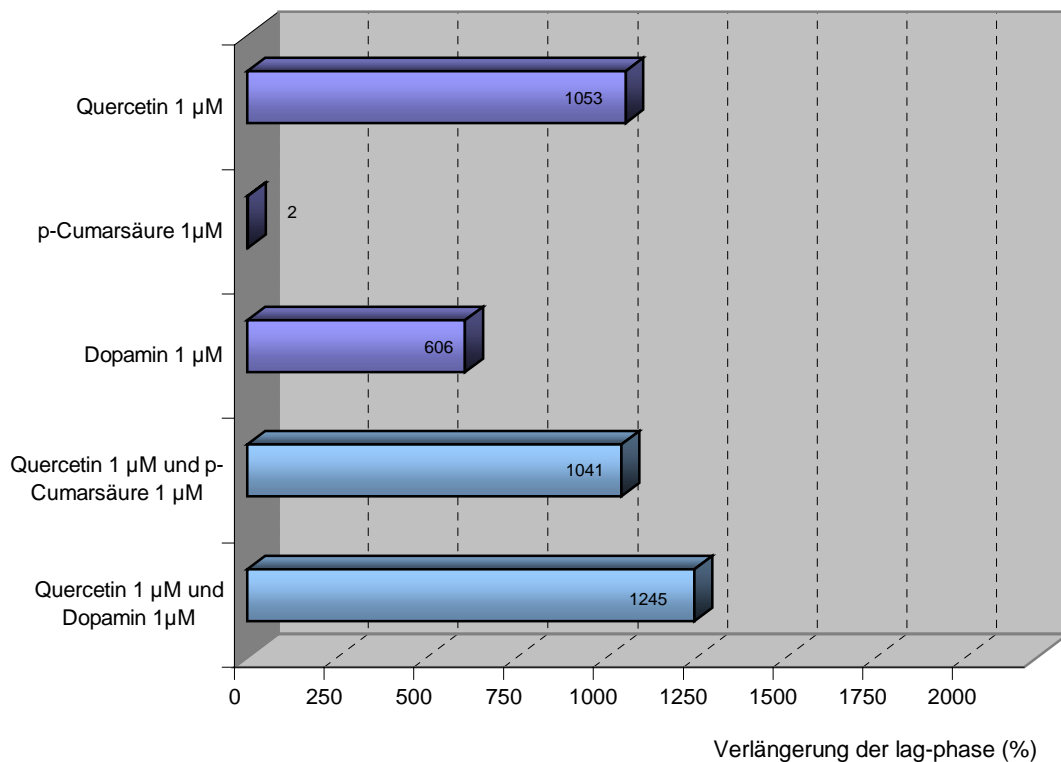


Abb. 33: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; n=2), nach Inkubation mit Quercetin, p-Cumarsäure und Dopamin (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Die Verlängerung der lag-phase von LDL, inkubiert mit einer Kombination von Quercetin und p-Cumarsäure ($1041 \pm 13,4$ %), unterschied sich nicht signifikant von dem Effekt von Quercetin allein. Es konnte gegenüber Quercetin keine Verlängerung erzielt werden.

Bei Kombination von Quercetin und Dopamin war die antioxidative Aktivität mit einer Verlängerung der lag-phase um $1245 \pm 8,5$ % geringer, als durch Addition der Einzeleffekte zu erwarten gewesen wäre (Abb. 33). Es konnte keine synergistische Wirkung, wie bei Kombination von Quercetin und Kaffeesäure, beobachtet werden.

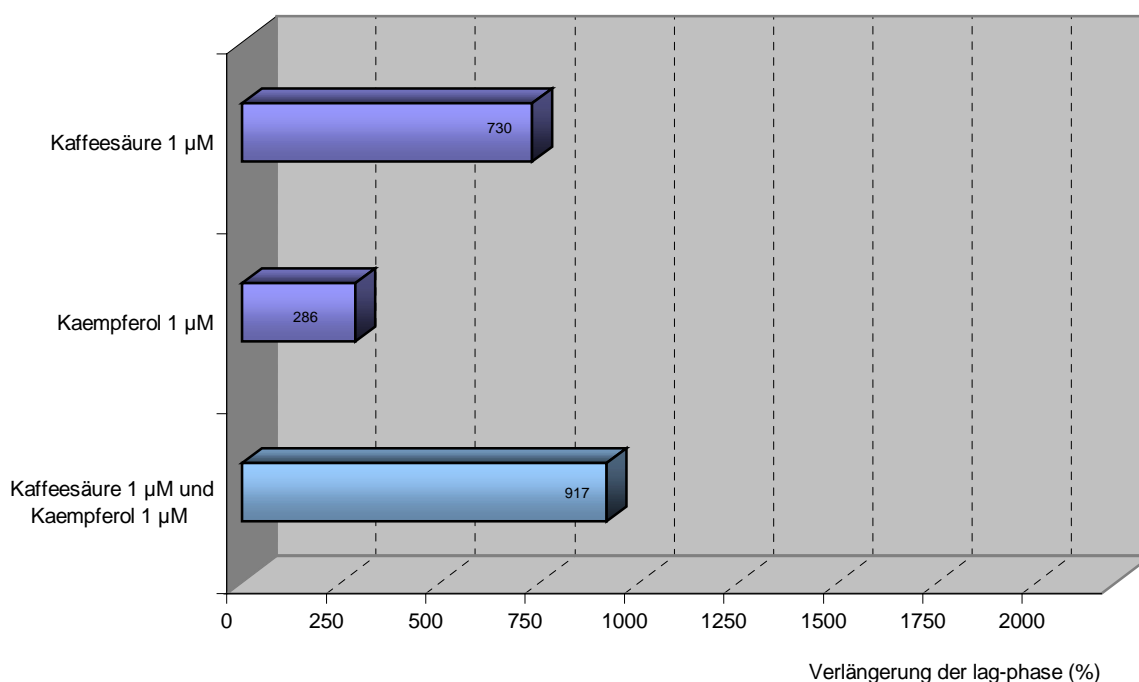


Abb. 34: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %; $n=2$), nach Inkubation mit Kaffeesäure und Kaempferol (allein und in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau), im Vergleich zur Kontrolle (100 %; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Bei Kaempferol, eine dem Quercetin strukturverwandte Substanz, wurde eine antioxidative Aktivität beobachtet, die signifikant ($p < 0,001$) unter der von Quercetin lag (Abb. 33, Abb. 34). Die Inkubation der LDL mit Kaempferol bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um $286 \pm 8,5$ %. Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von Kaffeesäure und Kaempferol lag die Verlängerung der lag-phase unter der Summe der Einzeleffekte. Bei Kombination von Kaffeesäure und Kaempferol konnte keine synergistische Wirkung beobachtet werden.

Die Kombination von Quercetin und Kaffeesäure wies die höchste antioxidative Aktivität während kupfer-induzierter LDL-Oxidation auf. Nimmt man die Verlängerung der lag-phase von Quercetin ($1053 \pm 4,2$ %) und Kaffeesäure ($730 \pm 5,7$ %) als Basis, so potenziert eine Kombination beider Antioxidantien den antioxidativen Schutz ($2190 \pm 8,5$ %). Nur bei diesem Ansatz konnte eine über die Summe der Einzelwirkungen hinausgehende synergistische Wirkung der Antioxidantien beobachtet werden.

Vorinkubation von Plasma mit Quercetin und/oder Kaffeesäure

In diesem zweiten Abschnitt sollte die Wirkung von Quercetin und Kaffeesäure bei Vorinkubation von Plasma auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation untersucht werden. Die Substanzen wurden alle in einer Endkonzentration von 100 μM im Plasma eingesetzt; die Antioxidantien wurden entweder einzeln oder in Kombination getestet.

In Tab. 17 sind die Konzentrationen der Antioxidantien in den unterschiedlichen LDL-Präparationen wiedergegeben. In Abb. 35 und Abb. 36 ist die Verlängerung der lag-phase in bezug auf die Kontrolle (Plasma ohne Antioxidantien) dargestellt.

Tab. 17: Konzentration von Quercetin und Kaffeesäure in den dialysierten LDL nach Inkubation von Plasma mit Quercetin und/oder Kaffeesäure (Endkonzentration im Plasma 100 μM)

Ansatz	Kaffeesäure (nmol/l)		Quercetin (nmol/l)	
	Person 1	Person 2	Person 1	Person 2
Quercetin	-	-	35,3	50,3
Kaffeesäure	90,5	101,4	-	-
Quercetin und Kaffeesäure	94,1	110,8	13,6	38,9

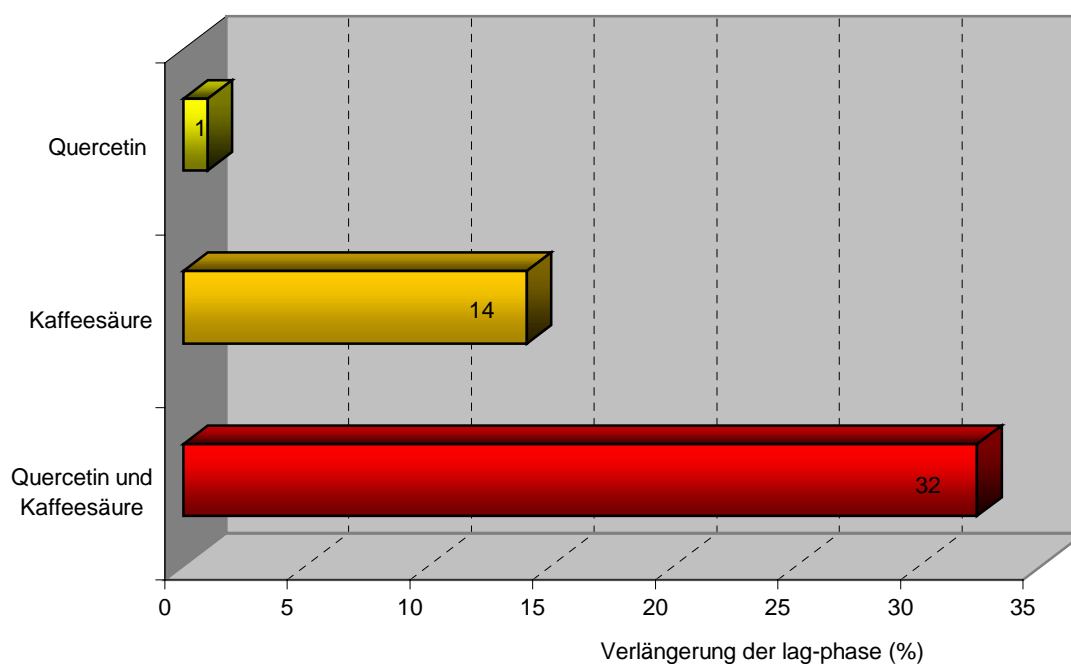


Abb. 35: Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle), nach Vorinkubation von Plasma (Person 1) mit Quercetin und/oder Kaffeesäure

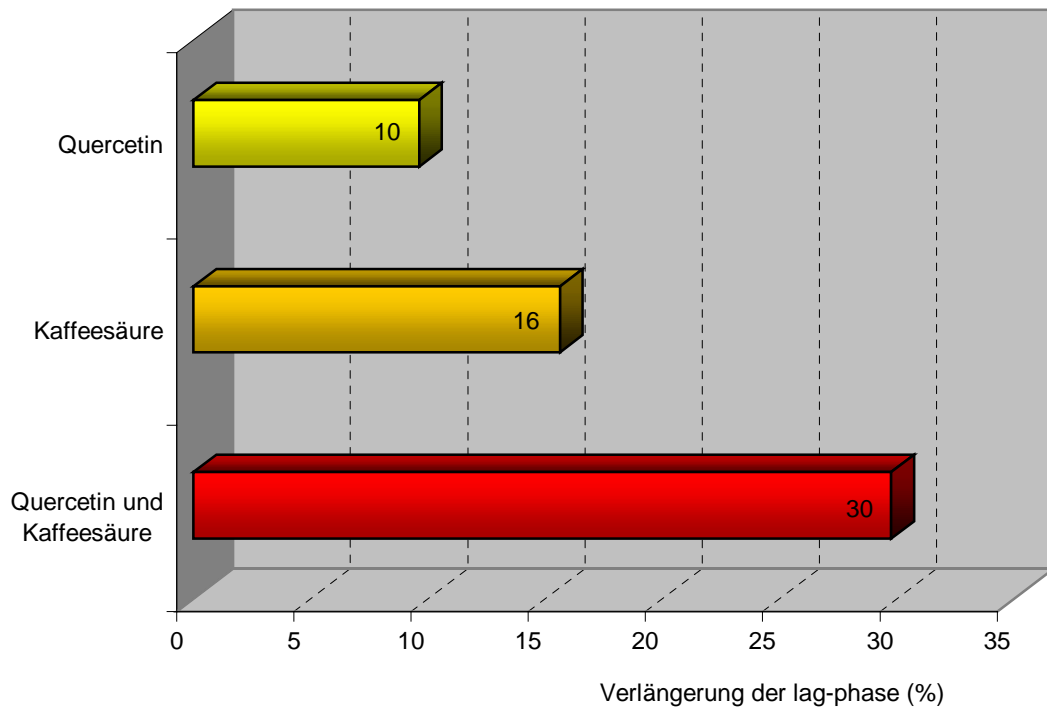


Abb. 36: Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle), nach Vorinkubation von Plasma (Person 2) mit Quercetin und/oder Kaffeensäure

Die Konzentration von Kaffeensäure war höher als die Quercetinkonzentration in den unterschiedlichen LDL-Präparationen (Tab. 17). Für die LDL-Präparationen mit Kaffeensäure konnte eine höhere antioxidative Kapazität beobachtet werden als mit Quercetin. So bewirkte die Inkubation von Plasma mit Quercetin bei Person 1 keine Verlängerung der lag-phase von LDL in bezug auf die Kontrolle. Bei Person 2 konnte eine Verlängerung von 10 % nach Inkubation mit Quercetin festgestellt werden. Wurde Plasma mit Kaffeensäure vorinkubiert, lag die Verlängerung der lag-phase bei 14 bzw. 16 %.

Wurden Quercetin und Kaffeensäure gemeinsam zugesetzt, betrug die Verlängerung 32 bzw. 30 %. Bei Person 1 bedeutete dies eine synergistische Wirkung dieser Antioxidantien, die Verlängerung war höher als die Summe der Einzeleffekte. Bei Person 2 konnte nur ein additiver Effekt beobachtet werden.

3.4 Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate

Die antioxidative Kapazität der verschiedenen Kaffeesäurederivate (0; 1; 2,5; 5 und 7,5 μM) auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation sollte untersucht werden. Nach Inkubation der LDL mit den verschiedenen Testsubstanzen wurde der Verlauf der Dienkonjugation bestimmt.

Ferulasäure

Bei Inkubation von LDL mit Ferulasäure, in einer Konzentration von 1 oder 2,5 μM , wurde eine prooxidative Wirkung beobachtet. Die lag-phase der LDL verringerte sich durch Inkubation mit 1 μM Ferulasäure signifikant ($p < 0,001$) um durchschnittlich $15 \pm 1,7 \%$ (Abb. 38) bezogen auf die Kontrolle (0 μM ; 100 %). Bei einer Konzentration von 2,5 μM wurde eine Abnahme ($p < 0,001$) der lag-phase um $22 \pm 5,2 \%$ beobachtet. Der Zusatz von 5 μM Ferulasäure hatte keinen Effekt auf die Oxidationsresistenz der LDL (Abb. 37, Abb. 38). Die Inkubation der LDL mit 7,5 μM Ferulasäure dagegen verlängerte die lag-phase von um $40 \pm 2,4 \%$ ($p < 0,001$) (Abb. 38).

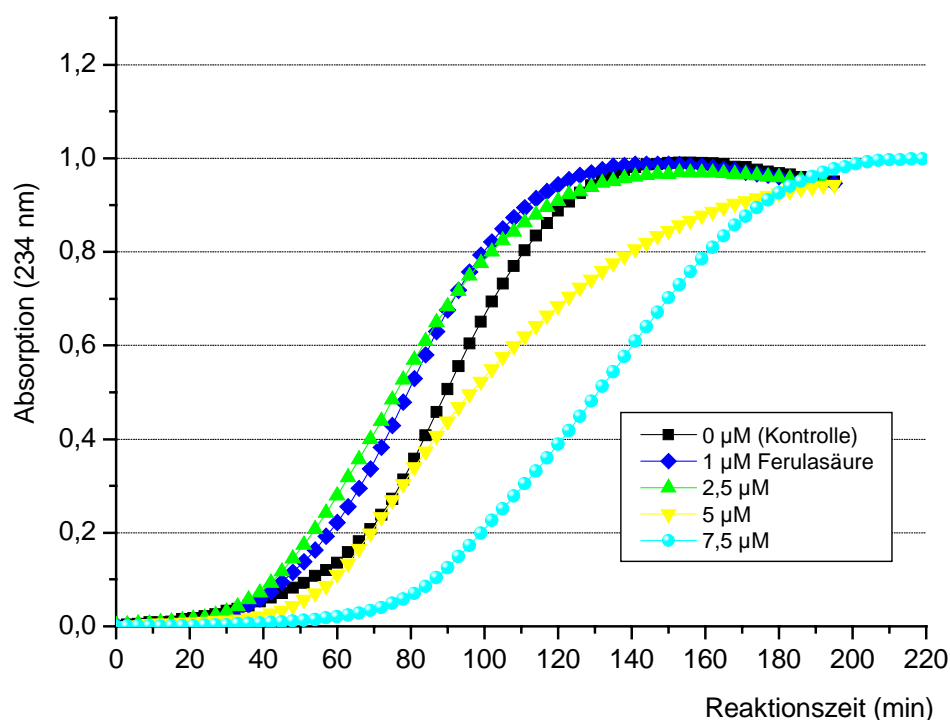


Abb. 37: Beispielhafter Verlauf ($n=3$) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Ferulasäure

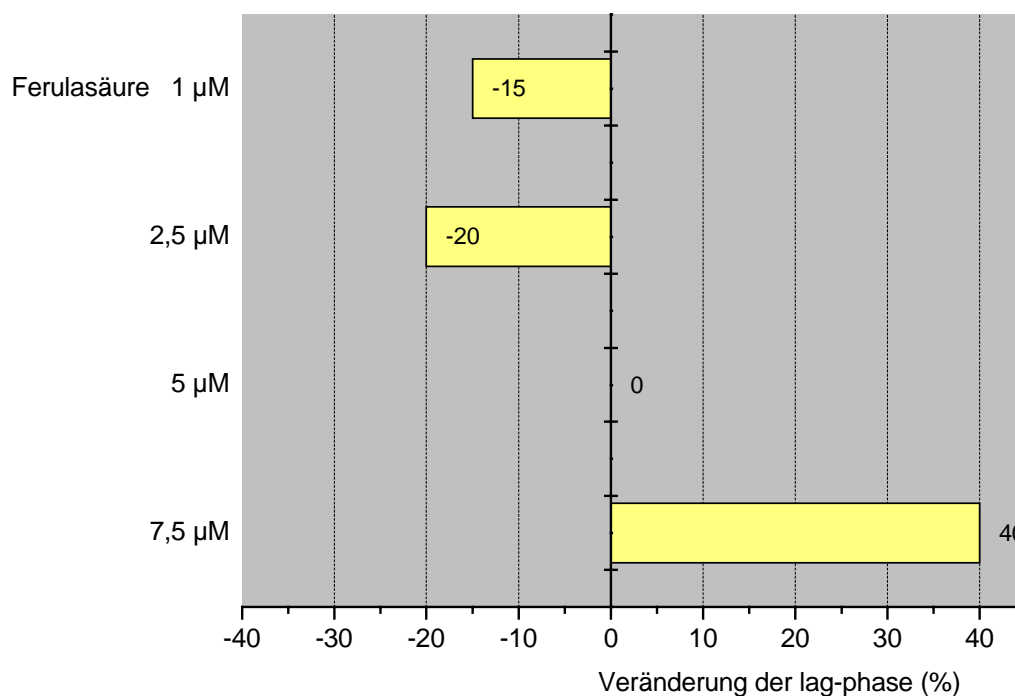


Abb. 38: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3), nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 µM)

Dihydroferulasäure

Unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen zeigte Dihydroferulasäure prooxidatives Verhalten gegenüber LDL-Oxidation. Mit steigender Konzentration, stieg die prooxidative Aktivität (Abb. 39, Abb. 40). Bei Inkubation der LDL mit 1 µM Dihydroferulasäure konnte eine Verkürzung ($p < 0,001$) der lag-phase um $24 \pm 5,7$ % (Abb. 40) bezogen auf die Kontrolle (0 µM; 100 %) beobachtet werden. Bei Zusatz von 2,5 µM war eine Abnahme ($p < 0,001$) der lag-phase um $34 \pm 1,5$ %. Inkubation der LDL mit höheren Konzentrationen (5 oder 7,5 µM) hatte keinen stärkeren prooxidativen Effekt als die Inkubation der LDL mit 2,5 µM Ferulasäure; die prozentuale Abnahme der lag-phase betrug $35 \pm 1,3$ bzw. $31 \pm 1,9$ % in Bezug auf die Kontrolle.

Nur der Einsatz einer Konzentration von 1 µM unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) von dem Effekt der anderen Konzentrationen; die antioxidativen Effekte bei 2,5, 5 oder 7,5 µM unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

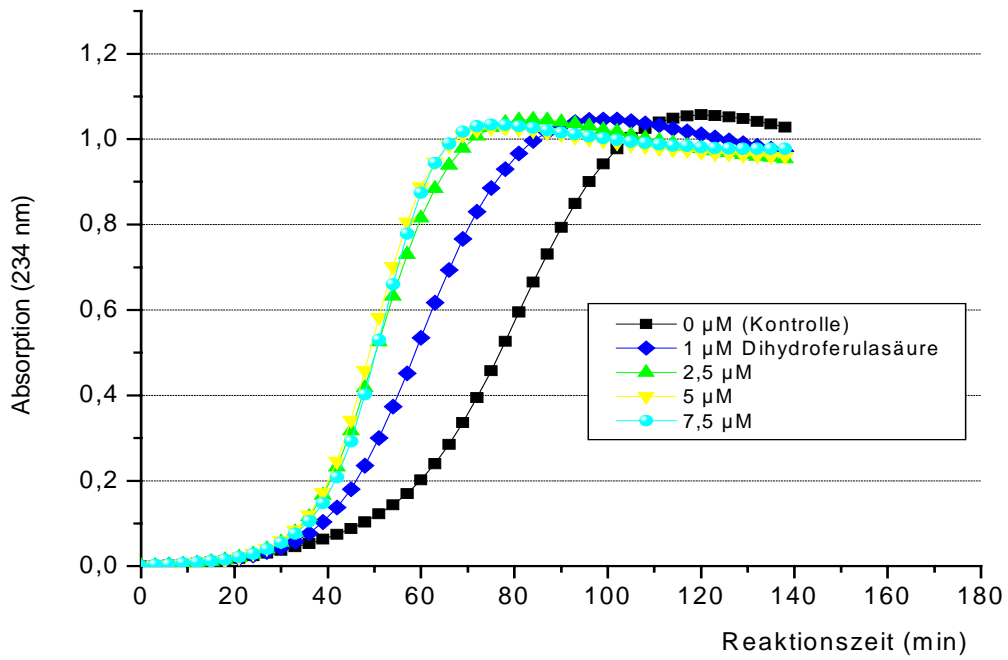


Abb. 39: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Dihydroferulasäure

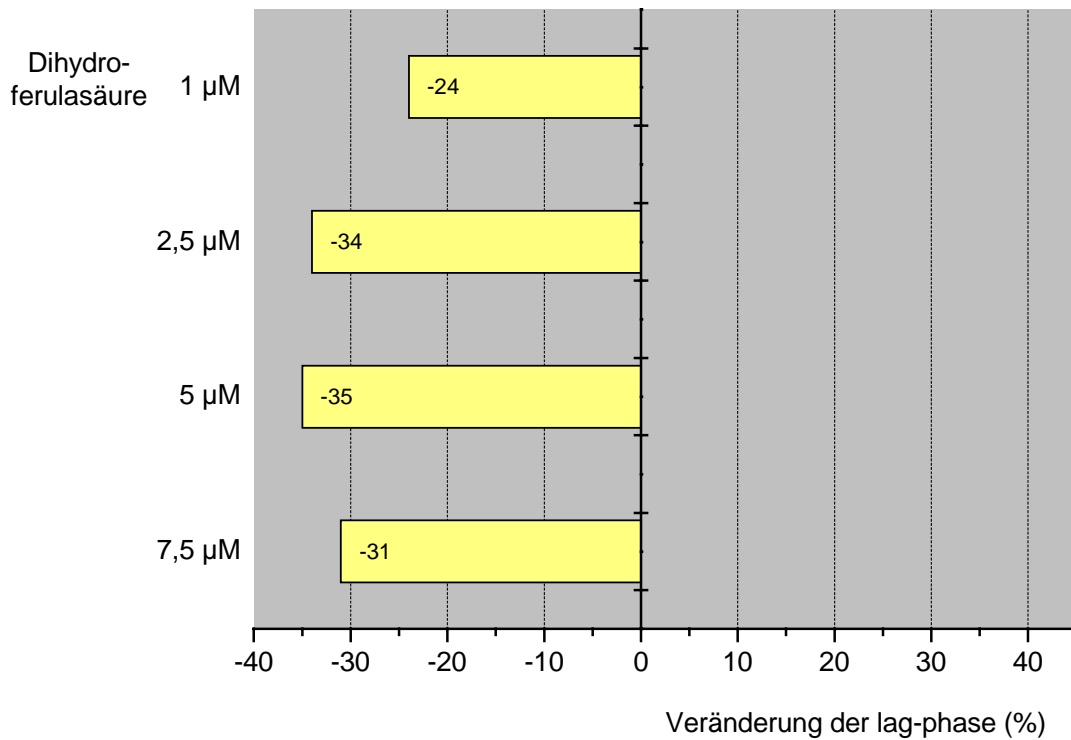


Abb. 40: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dihydroferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μM)

Isoferulasäure

Isoferulasäure wies ebenfalls prooxidatives Verhalten auf. Mit steigender Konzentration (0; 2,5; 5; 10 und 20 μM) konnte eine abnehmende Resistenz der LDL gegenüber Oxidation festgestellt werden (Abb. 41, Abb. 42). Inkubation der LDL mit 1 μM Isoferulasäure resultierte in einer Abnahme ($p < 0,05$) der lag-phase um durchschnittlich $6 \pm 2,2$ %. Bei Einsatz von 2,5 μM konnte ein Rückgang der lag-phase um $10 \pm 2,5$ % festgestellt werden. Wurden die LDL mit 5 μM Isoferulasäure inkubiert, verkürzte sich die lag-phase um durchschnittlich $12 \pm 1,8$ % bezogen auf die Kontrolle. Bei der höchsten Konzentration (7,5 μM) verkürzte sich die lag-phase um $18 \pm 4,2$ %. Alle Konzentrationen zeigten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Wirkung im Vergleich zur Kontrolle. Untereinander wick aber nur der Effekt der Konzentration von 7,5 μM signifikant ($p < 0,05$) von den anderen eingesetzten Konzentrationen ab.

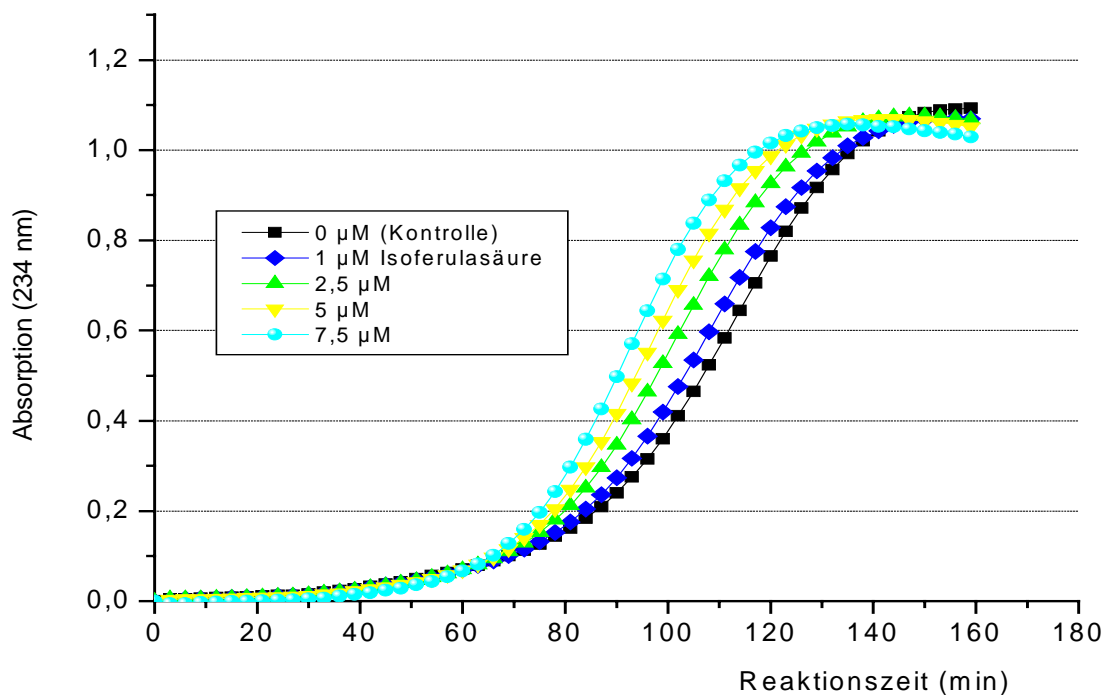


Abb. 41: Beispielhafter Verlauf ($n=3$) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Isoferulasäure

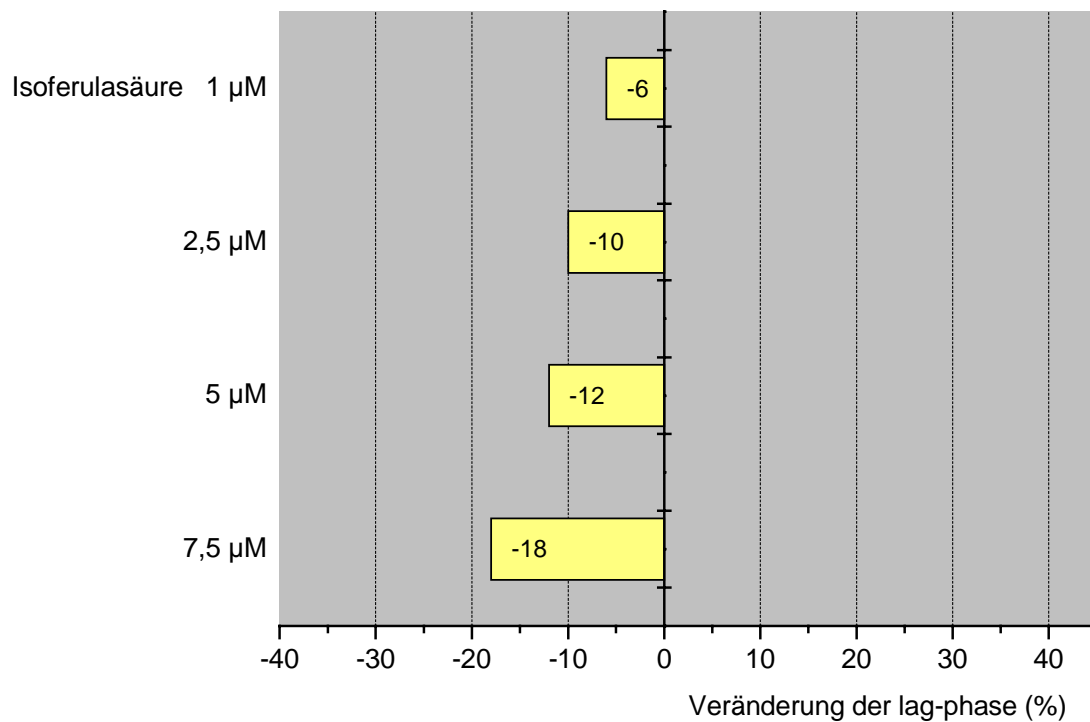


Abb. 42: Veränderung der lag-phase von LDL (n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Isoferulasäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 µM)

o-Hydroxyhippursäure

o-Hydroxyhippursäure wies in dem hier verwendeten Versuchsansatz antioxidatives Verhalten auf. Durch Inkubation der LDL mit o-Hydroxyhippursäure konnte in dem hier verwendeten Versuchsansatz eine Verlängerung der lag-phase beobachtet werden; mit steigender Konzentration (0; 1; 2,5; 5 und 7,5 µM) wurde eine erhöhte Oxidationsresistenz der LDL festgestellt. Schon die Inkubation der LDL mit 1 µM o-Hydroxyhippursäure zeigte eine signifikante Verlängerung ($p < 0,05$) der lag-phase um durchschnittlich $8 \pm 2,6$ % (Abb. 44) in Bezug auf die Kontrolle (0 µM; 100 %). Die höchste Wirksamkeit auf die Oxidationsresistenz der LDL hatte die Inkubation von o-Hydroxyhippursäure mit einer Endkonzentration von 7,5 µM, diese verlängerte die lag-phase um durchschnittlich $33 \pm 2,5$ %. In dem hier verwendeten Versuchsansatz konnte somit für o-Hydroxyhippursäure ein antioxidativer Effekt auf die Dienkonjugation von LDL beobachtet werden (Abb. 43, Abb. 44). Bei allen Konzentrationen konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der Wirkung im Vergleich zur Kontrolle, aber auch untereinander, registriert werden.

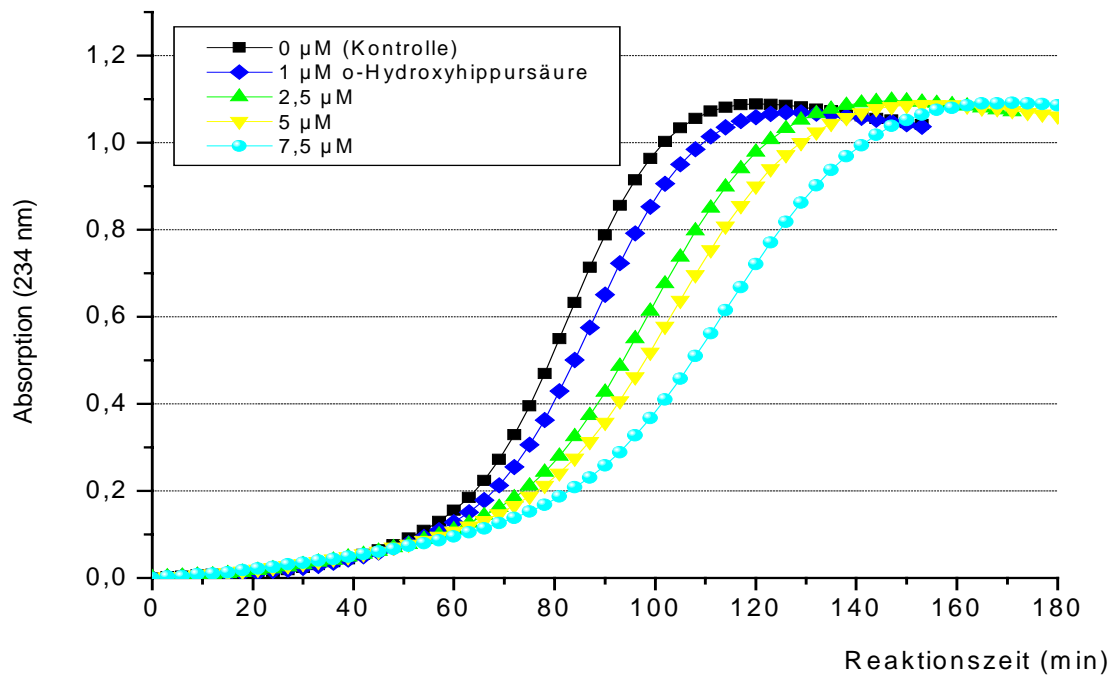


Abb. 43: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von o-Hydroxyhippursäure

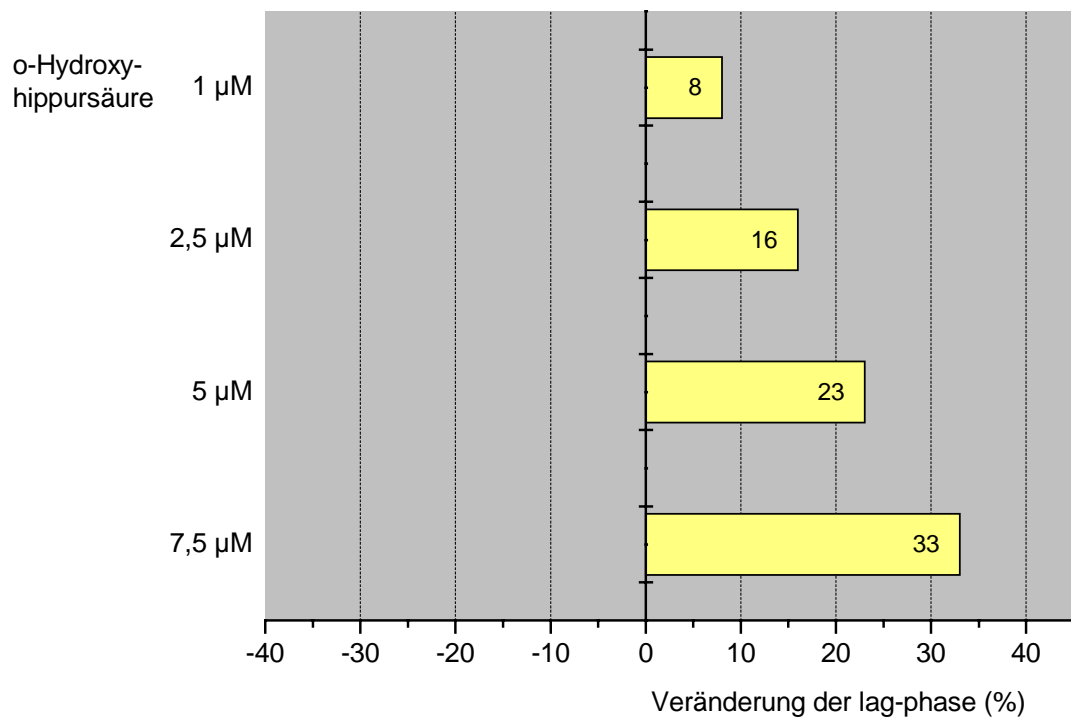


Abb. 44: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=3) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von o-Hydroxyhippursäure, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μM)

In Tab. 18 ist die Veränderung der lag-phase (in Minuten) der unterschiedlichen Ansätze im Vergleich zu Kontroll-LDL dargestellt. Ein positiver Wert bedeutet eine Verlängerung der lag-phase in bezug auf die Kontrolle und somit eine erhöhte Oxidationsresistenz. Ist der Wert negativ, so bedeutet dies eine Verkürzung der lag-phase im Vergleich zur Kontrolle, also eine prooxidative Wirkung der entsprechenden Substanz.

Tab. 18: Veränderung der lag-phase von LDL (in Minuten; MEAN \pm SD), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusatz von Antioxidantien)

	Veränderung der lag-phase (Minuten)			
	1 μ M	2,5 μ M	5 μ M	7,5 μ M
Ferulasäure	- 7,3 \pm 1,2*	- 12,3 \pm 3,2*	- 0,7 \pm 1,2*	+ 22,3 \pm 1,5*
Dihydroferulasäure	- 15,0 \pm 1,7	- 22,7 \pm 5,5	- 22,7 \pm 5,7	- 20,0 \pm 3,0
Isoferulasäure	- 4,7 \pm 1,2	- 7,0 \pm 1,7	- 8,7 \pm 1,5	- 13,0 \pm 2,6°
o-Hydroxyhippursäure	+ 6,3 \pm 3,1*	+ 11,7 \pm 2,3*	+ 16,3 \pm 5,1 [#]	+ 22,3 \pm 4,5 [#]

* signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Konzentrationen, $p < 0,05$, SNK

[#] signifikante Unterschiede im Vergleich zu 1 und 2,5 μ M, $p < 0,05$, SNK

° signifikante Unterschiede im Vergleich zur den anderen Konzentrationen, $p < 0,05$, SNK

Bei Inkubation der LDL mit Ferulasäure, in einer Konzentration von 1 oder 2,5 μ M, konnte eine Verkürzung der lag-phase um 7,3 \pm 1,2 bzw. 12,3 \pm 3,2 Minuten beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 5 μ M Ferulasäure konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Eine höhere Konzentration (7,5 μ M) dagegen resultierte in einer Verlängerung der lag-phase um 22,3 \pm 1,5 Minuten.

Wurden die LDL mit verschiedenen Konzentrationen von Dihydroferulasäure inkubiert, so konnte eine Abnahme ($p < 0,001$) der lag-phase im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Tab. 18). Die verschiedenen Konzentrationen unterschieden sich aber untereinander nicht signifikant in ihrer Wirkung.

Isoferulasäure hatte eine prooxidative Wirkung ($p < 0,05$) auf die kupfer-induzierte Oxidation der LDL. Die lag-phase war bei einer Konzentration von 7,5 μ M um 13,0 \pm 2,6 Minuten im Vergleich zur Kontrolle verkürzt.

Die Inkubation von LDL mit o-Hydroxyhippursäure hatte eine Verlängerung der lag-phase zur Folge ($p < 0,05$) und zwar bei einer Konzentration von 7,5 μ M um 22,3 \pm 4,5 Minuten.

Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure

Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure hatten bei dem hier verwendeten Versuchsansatz keinen Einfluss auf die Dienkonjugation. Wie aus Abb. 45, Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48 ersichtlich ist, hatte die Inkubation der LDL mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Testsubstanzen keine Veränderung der lag-phase zur Folge. Diese Substanzen wiesen weder pro- noch antioxidative Aktivität auf; bei den eingesetzten Konzentrationen konnte keine Veränderung der Dienkonjugation von LDL beobachtet werden.

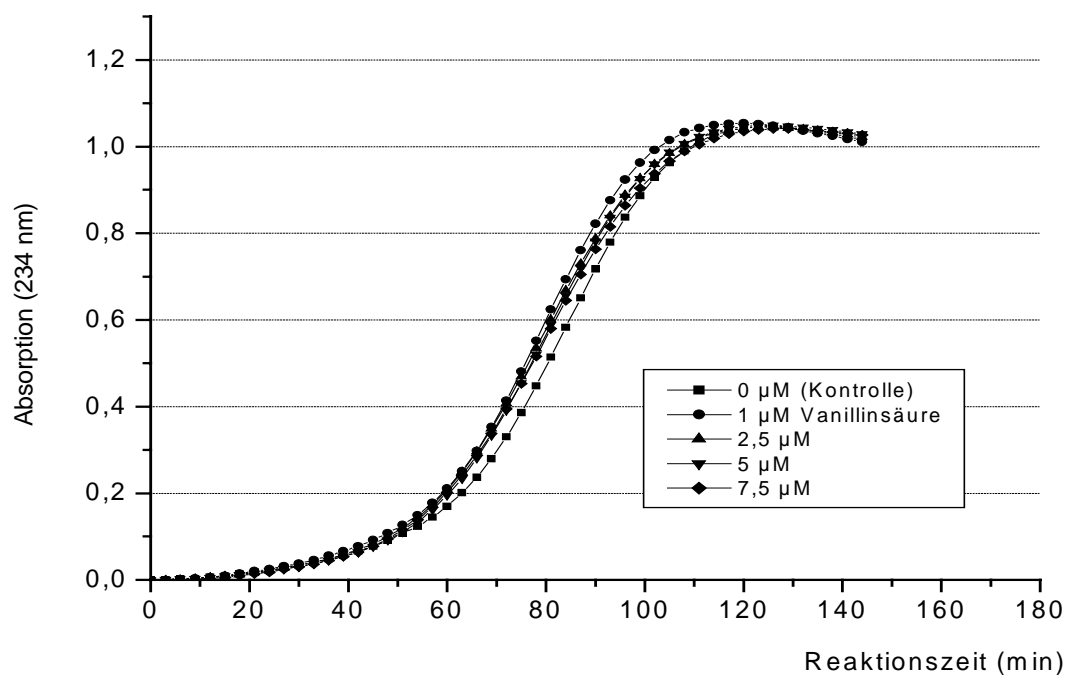


Abb. 45: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Vanillinsäure

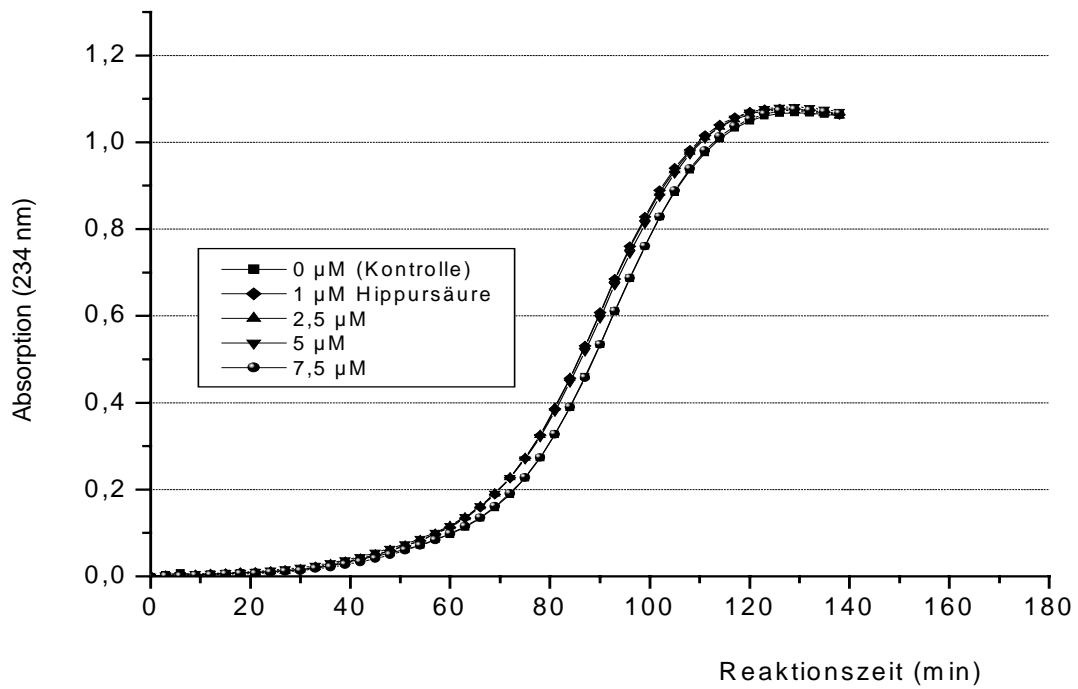


Abb. 46: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Hippursäure

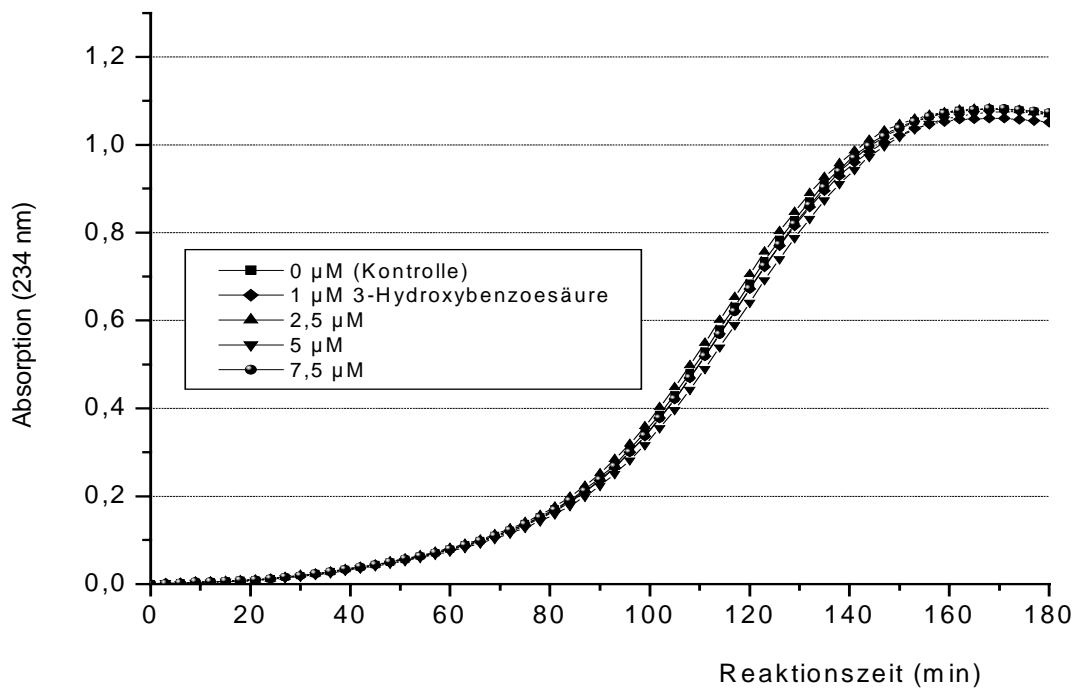


Abb. 47: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von 3-Hydroxybenzoesäure

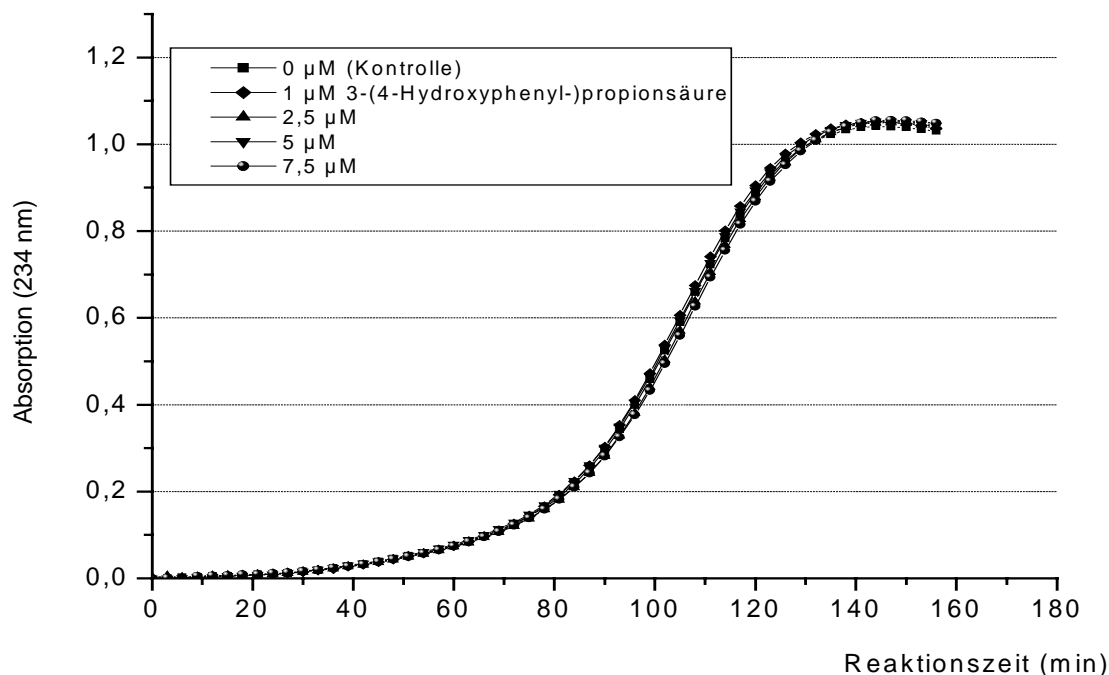


Abb. 48: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure

Wie zu erwarten war, ergaben sich für die getesteten Substanzen große Unterschiede in der antioxidativen Aktivität gegenüber kupfer-induzierter LDL-Oxidation. Nur o-Hydroxyhippursäure wies bei allen getesteten Konzentrationen antioxidatives Verhalten auf (Abb. 43, Abb. 44). Bei Inkubation der LDL mit Dihydroferulasäure oder Isoferulasäure dagegen konnten prooxidative Effekte beobachtet werden (Abb. 39, Abb. 40, Abb. 41, Abb. 42). Ferulasäure wies je nach eingesetzter Konzentration sowohl anti- als auch prooxidative Tendenzen auf (Abb. 37, Abb. 38).

Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure zeigten weder anti- noch prooxidatives Verhalten in dem hier verwendeten Versuchsansatz und den getesteten Konzentrationen (Abb. 45, Abb. 46, Abb. 47, Abb. 48).

In Abb. 49 ist noch einmal die Wirkung der einzelnen Substanzen bei einer Konzentration von 1 μM auf die Dienkonjugation der LDL während kupfer-induzierter Oxidation zusammengefasst. Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure haben bei einer Konzentration von 1 μM keinen Einfluss auf die lag-phase der LDL. Dagegen hat dieselbe Konzentration von o-Hydroxyhippursäure eine Verlängerung der lag-phase um

durchschnittlich 8 % zur Folge. Die Inkubation der LDL mit 1 μM Ferulasäure, Isoferulasäure oder Dihydroferulasäure bewirkte eine Verkürzung der lag-phase um 15, 6 oder 24 %.

Kaffeensäure hatte bei dem hier verwendeten Versuchsansatz eine antioxidative Wirkung und bewirkte eine Verlängerung der lag-phase von LDL um $232,5 \pm 4,5$ %. Die Aktivität der Kaffeensäure war damit deutlich höher als bei den getesteten Kaffeensäurederivaten.

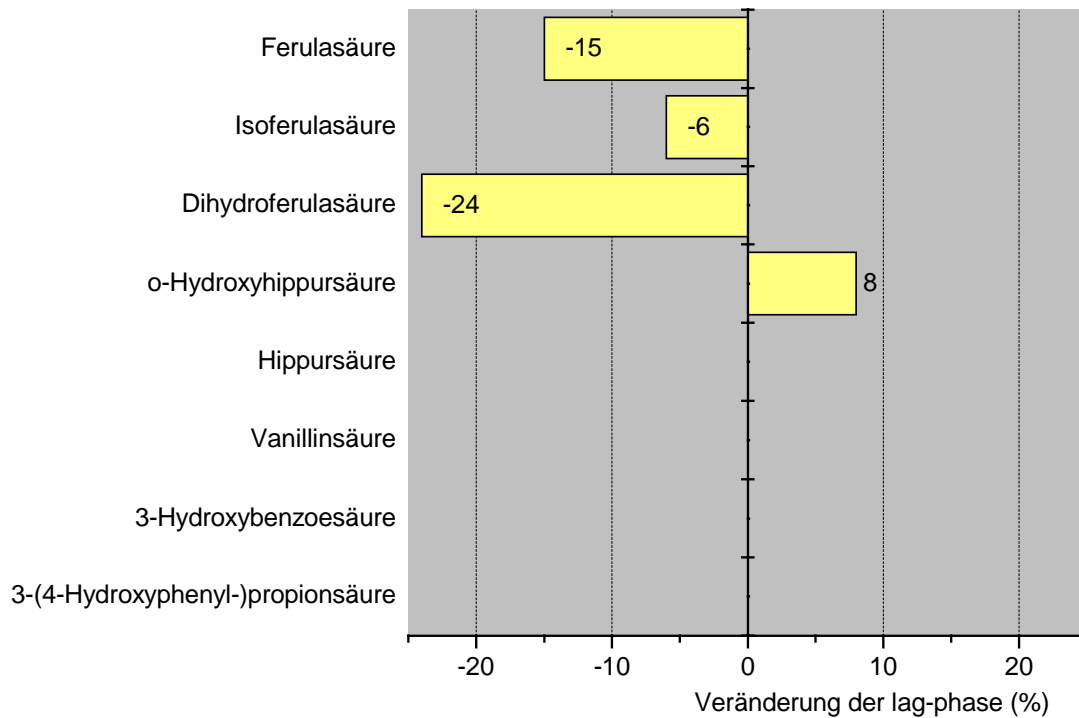


Abb. 49: Veränderung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen (Konzentration 1 μM), im Vergleich zur Kontrolle (100%; LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

3.5 Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Anreicherung von Plasma mit den Substanzen vor Isolation der LDL

In diesem Versuchsansatz wurde Plasma mit Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat vor Isolation der LDL inkubiert; die Substanzen wurden dabei mit einer Endkonzentration von 20 μM im Plasma eingesetzt. Nach Inkubation des Plasmas wurden die LDL isoliert und der Verlauf der Dienkonjugation während kupfer-induzierter Oxidation gemessen.

Ein beispielhafter Verlauf der Dienkonjugation von LDL während kupfer-induzierter Oxidation ist in Abb. 50, Abb. 51 und Abb. 52 dargestellt. Die Abbildungen stellen den Verlauf von Kontroll-LDL (LDL aus Plasma inkubiert mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) und LDL, bei denen Plasma vor Isolation mit Zinkhistidin, Histidin oder Zinksulfat inkubiert war, dar.

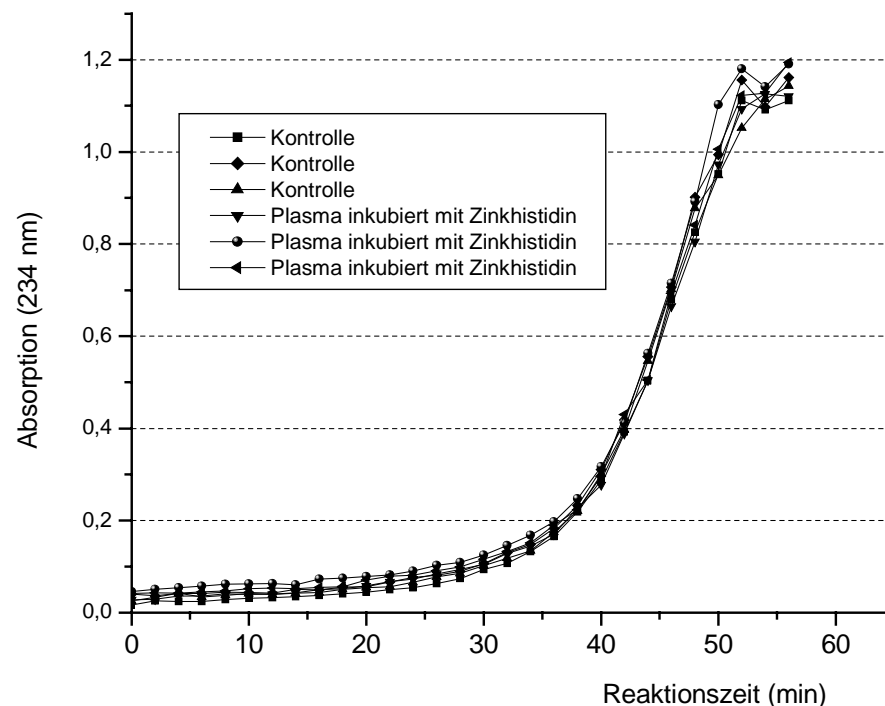


Abb. 50: Beispielhafter Verlauf ($n=3$) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Zinkhistidin) während kupfer-induzierter Oxidation

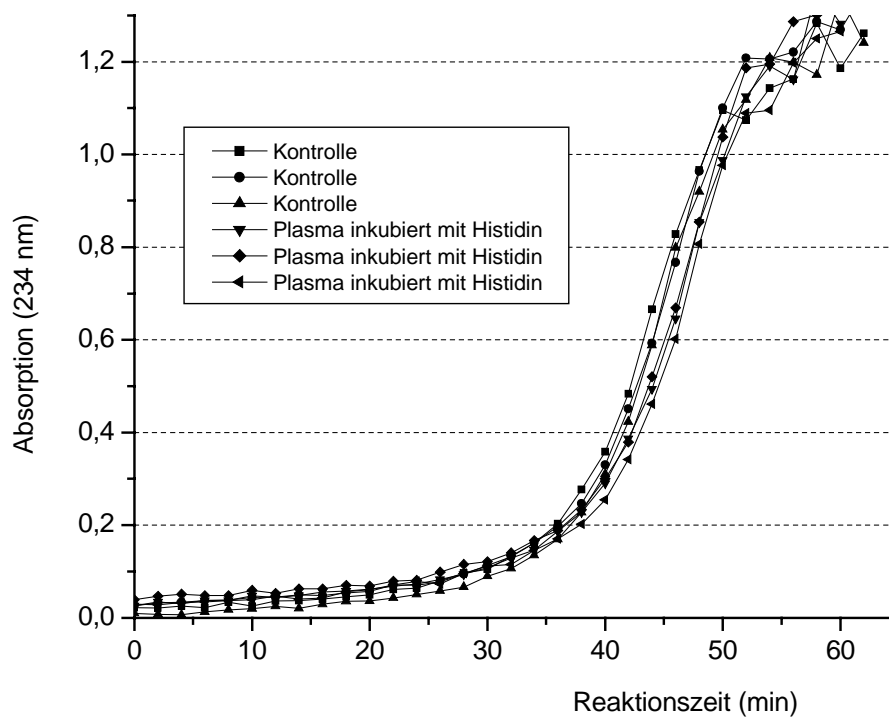


Abb. 51: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Histidin) während kupfer-induzierter Oxidation

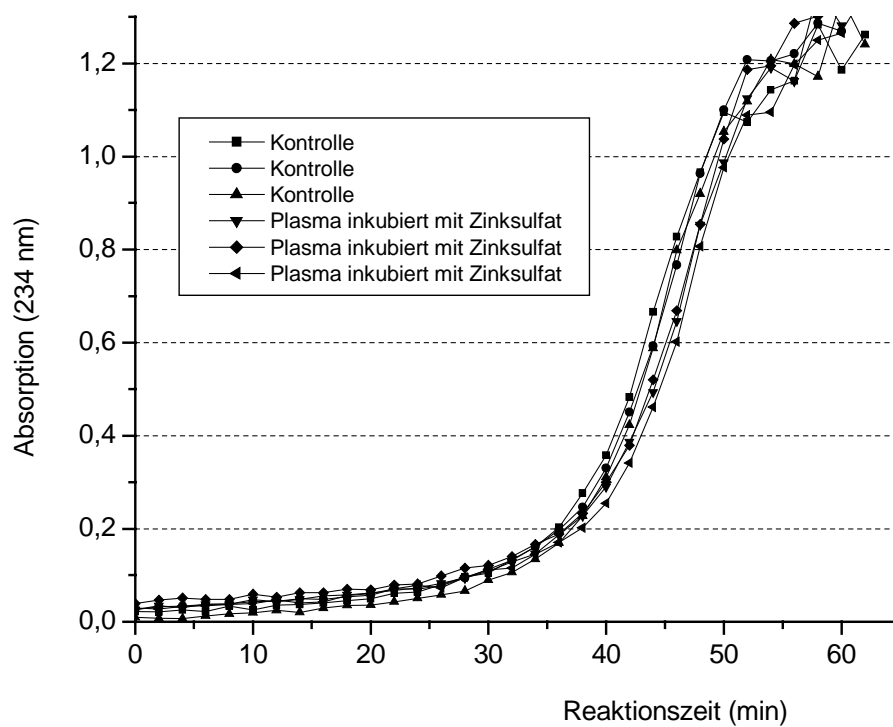


Abb. 52: Beispielhafter Verlauf (n=3) der Dienkonjugation von LDL (Kontrolle/Plasma inkubiert mit Zinksulfat) während kupfer-induzierter Oxidation

In dem hier verwendeten Versuchsansatz hatte die Inkubation von Plasma mit Zinkhistidin, Histidin oder Zinksulfat einer Konzentration von 20 μM , vor Isolation der LDL, keinen Einfluss auf die lag-phase der LDL, gegenüber der Kontrolle (Plasma vorinkubiert mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$). Es waren keine signifikanten Unterschiede der lag-phasen zu beobachten (Abb. 50, Abb. 51, Abb. 52).

Anreicherung von LDL mit den Substanzen

In diesem Versuchsansatz wurden LDL mit Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen verwendet; Zinkhistidin und Zinksulfat wurden mit einer Endkonzentration von 0; 2,5; 5; 7,5 und 10 μM zugesetzt, Histidin wurde mit einer Endkonzentration von 0; 2,5; 5; 10 und 20 μM eingesetzt. Nach Inkubation der LDL mit den verschiedenen Antioxidantien wurde der Verlauf der Dienkonjugation während kupfer-induzierter Oxidation gemessen. Jedes Experiment wurde einmal wiederholt.

Zinkhistidin

Durch Inkubation der LDL mit Zinkhistidin konnte in dem hier verwendeten Versuchsansatz eine Verlängerung der lag-phase (Abb. 53) beobachtet werden. Mit steigender Konzentration (0; 2,5; 5; 7,5 und 10 μM) wurde eine steigende prozentuale Verlängerung (Abb. 54) der lag-phase erreicht. Schon die Inkubation der LDL mit 2,5 μM Zinkhistidin führte zu einer signifikanten Verlängerung ($p < 0,05$) der lag-phase um durchschnittlich $21 \pm 4,0$ % in Bezug auf die Kontrolle (0 μM ; 100 %). Bei Inkubation mit 5 μM Zinkhistidin wurde ein Anstieg ($p < 0,001$) der lag-phase um $93 \pm 4,0$ % beobachtet. Eine Konzentration von 7,5 μM Zinkhistidin führte zu einer Verlängerung der lag-phase um $155 \pm 5,2$ % ($p < 0,001$). Die höchste Wirksamkeit auf die Oxidationsresistenz der LDL hatte die Inkubation von Zinkhistidin mit einer Endkonzentration von 10 μM und verlängerte die lag-phase ($p < 0,001$) um $205 \pm 13,2$ % gegenüber der lag-phase der Kontrolle (100 %). Für Zinkhistidin konnte somit in dem hier verwendeten Versuchsansatz eine antioxidative Wirkung beobachtet werden. Die eingesetzten Konzentrationen unterschieden sich in ihrem Einfluss auf die lag-phase signifikant voneinander ($p < 0,05$).

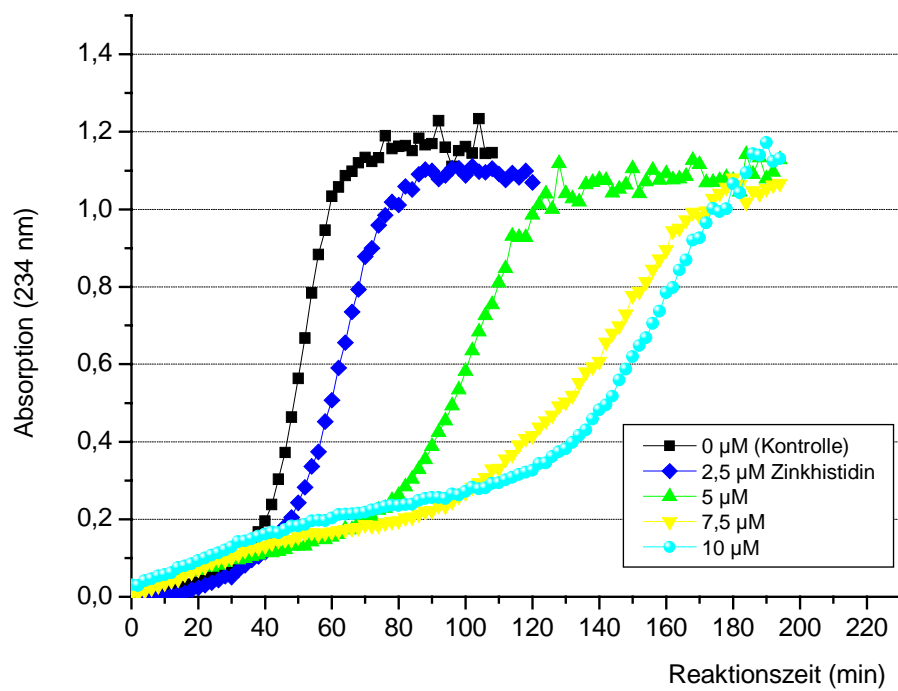


Abb. 53: Beispielhafter Verlauf (n=2) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Zinkhistidin

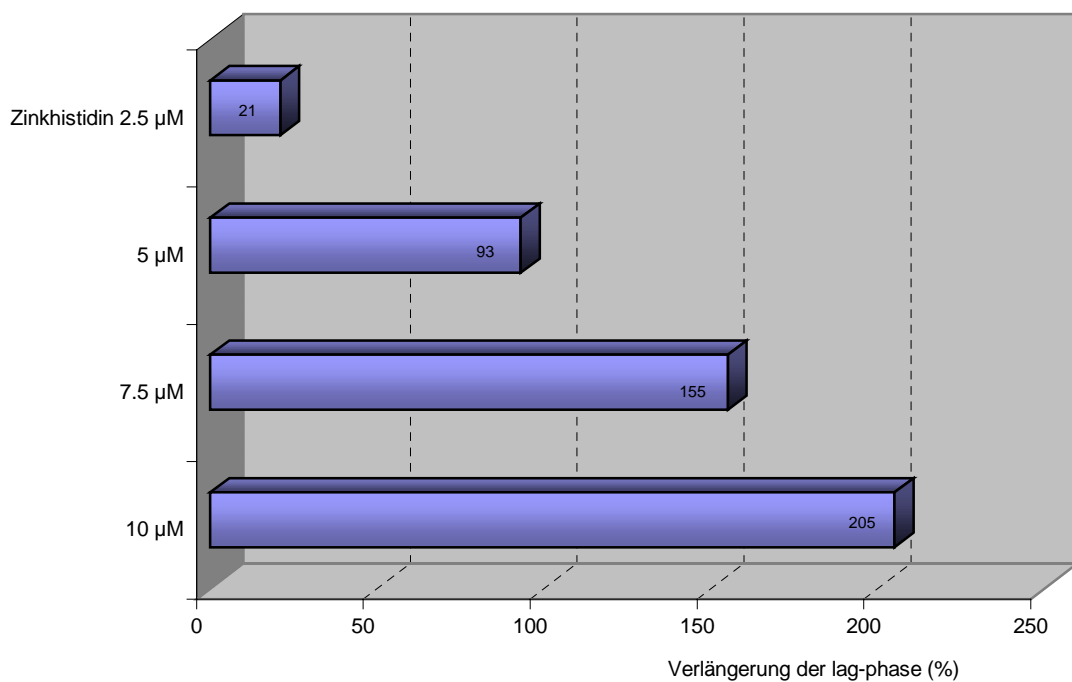


Abb. 54: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=2) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zinkhistidin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 μM)

Histidin

Bei Inkubation von LDL mit Histidin konnte ebenfalls ein antioxidativer Effekt auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation beobachtet werden. Mit steigender Konzentration (0; 2,5; 5; 10 und 20 μM) konnte eine zunehmende Resistenz der LDL gegenüber Oxidation festgestellt werden (Abb. 55). Bereits die Inkubation von LDL mit Histidin einer Endkonzentration von 2,5 μM führte zu einer signifikanten Verlängerung ($p < 0,001$) der lag-phase von $11 \pm 1,3$ % bezogen auf die Kontrolle (0 μM ; 100 %) (Abb. 56). Die doppelte Konzentration von Histidin (5 μM) zeigte ein Erhöhung der Oxidationsresistenz der LDL um $34 \pm 0,6$ %. Bei Zusatz von 10 μM Histidin war die lag-phase um $134 \pm 0,9$ % verlängert gegenüber der Kontrolle. Die höchste Konzentration von Histidin (20 μM) wies den stärksten protektiven Effekt gegenüber kupfer-induzierter LDL-Oxidation auf, und betrug $230 \pm 2,3$ %. Die unterschiedlichen Konzentrationen führten alle zu einer signifikanten Verlängerung ($p < 0,001$) der lag-phase gegenüber der Kontrolle (0 μM) und unterschieden sich auch signifikant ($p < 0,001$) untereinander.

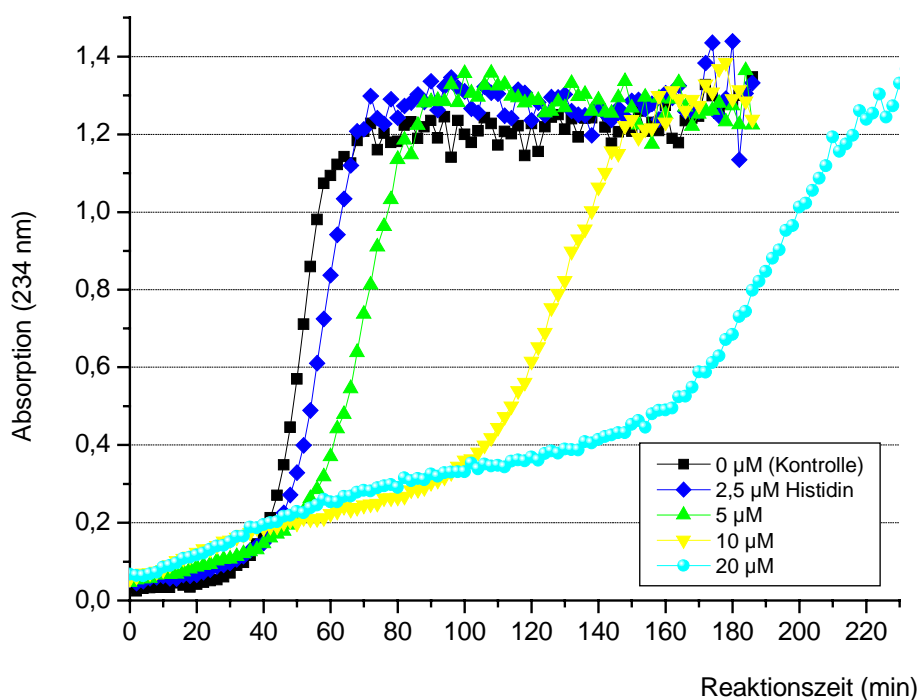


Abb. 55: Beispielhafter Verlauf ($n=2$) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Histidin

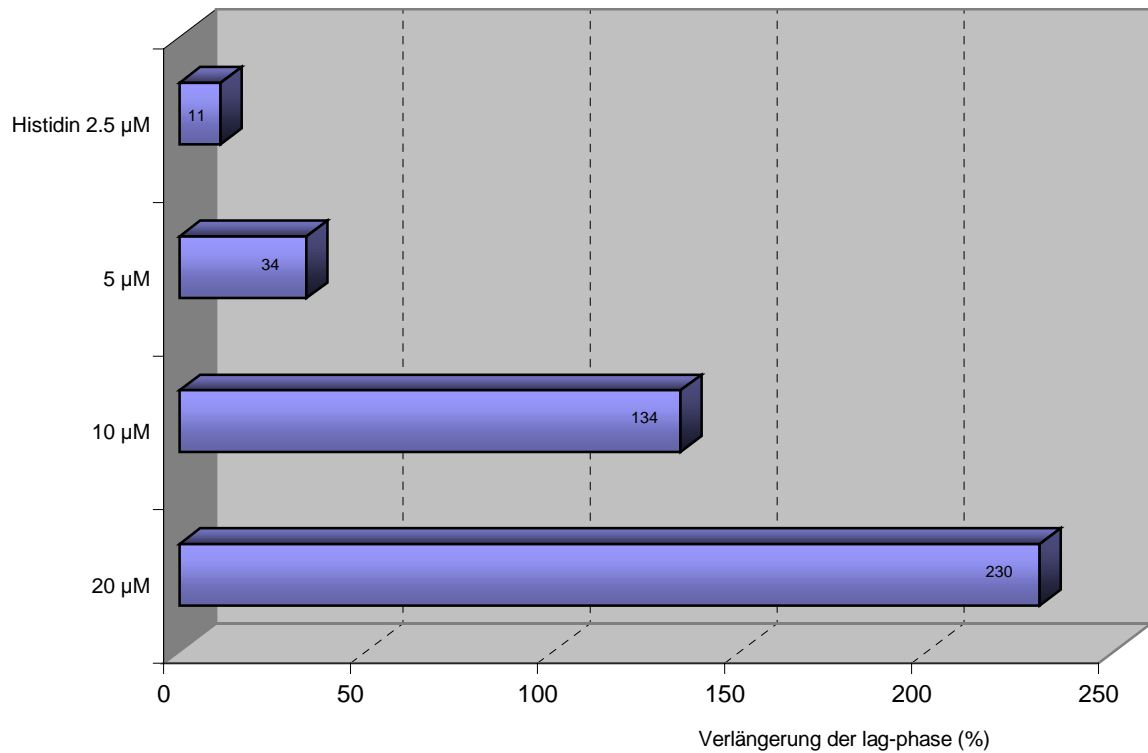


Abb. 56: Veränderung der lag-phase von LDL (in %; n=2) nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Histidin, im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 0 µM)

Zinksulfat

Bei Inkubation der LDL mit Zinksulfat in einer Endkonzentration von 0; 2,5; 5; 7,5 oder 10 µM konnte keine Veränderung der lag-phase (Abb. 57) in Bezug auf die Kontrolle (0 µM; 100 %) beobachtet werden. Inkubation der LDL mit Zinksulfat führte bei den hier verwendeten Versuchsbedingungen und den eingesetzten Konzentrationen nicht zu einer Veränderung der Resistenz der LDL gegenüber kupfer-induzierter Oxidation.

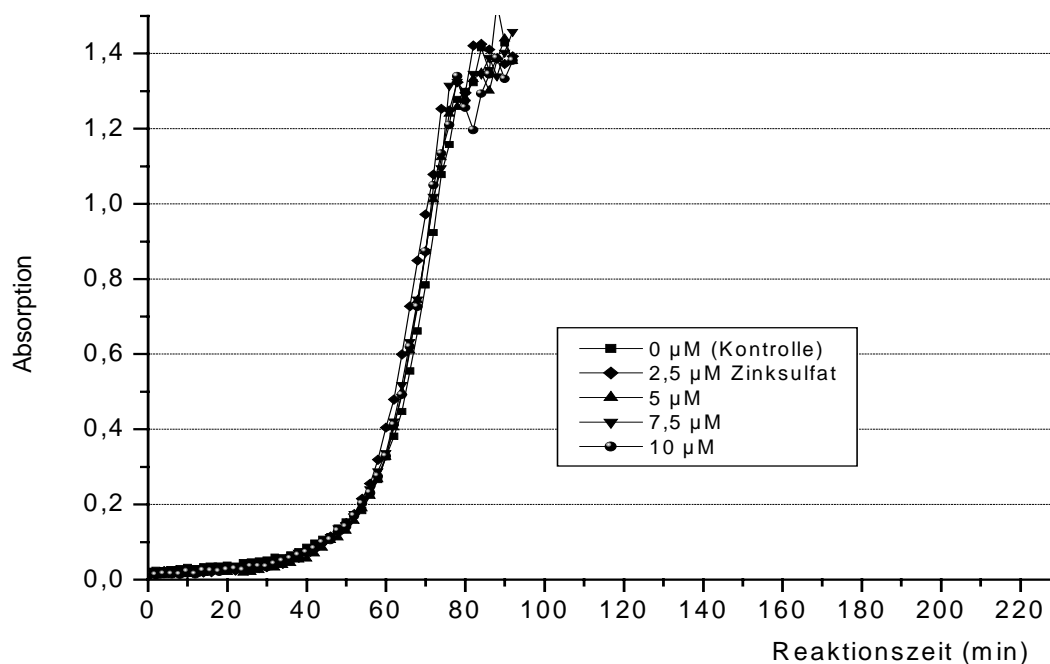


Abb. 57: Beispielhafter Verlauf (n=2) der Dienkonjugation humaner LDL, inkubiert mit verschiedenen Konzentrationen von Zinksulfat

In Tab. 19 ist die Veränderung der lag-phase der unterschiedlichen Ansätze im Vergleich zu Kontroll-LDL dargestellt. Die Ergebnisse sind in Minuten angegeben. Ein positiver Wert bedeutet eine Verlängerung der lag-phase um den entsprechenden Wert in bezug auf die Kontrolle und somit eine erhöhte Oxidationsresistenz. Ist der Wert negativ, so bedeutet dies eine Verkürzung der lag-phase im Vergleich zur Kontrolle, also eine prooxidative Wirkung der entsprechenden Substanz.

Tab. 19: Veränderung der lag-Phase von LDL (Minuten; MEAN \pm SD), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zusatz von Antioxidantien)

	Veränderung der lag-phase (Minuten)				
	2,5 μ M	5 μ M	7,5 μ M	10 μ M	20 μ M
Zinkhistidin	+ 9,3 \pm 1,8*	+ 40,3 \pm 1,8*	+ 56,8 \pm 1,1*	+ 73,3 \pm 1,8*	–
Histidin	+ 4,8 \pm 0,4*	+ 14,3 \pm 0,4*	–	+ 55,5 \pm 0,7*	+ 94,3 \pm 1,1*
Zinksulfat	- 1,3 \pm 1,8	- 1,5 \pm 0,7	- 1,5 \pm 0,7	- 2,8 \pm 1,8	–

* signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Konzentrationen, p < 0,001, SNK

Bei Inkubation der LDL mit Zinkhistidin konnte eine Verlängerung der lag-phase beobachtet werden. Bei steigender Konzentration konnte eine zunehmende Verlängerung der lag-phase beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10 μM betrug die Verlängerung in Bezug auf die Kontrolle durchschnittlich $73,3 \pm 1,8$ Minuten (Abb. 53).

Die Inkubation der LDL mit Histidin hatte ebenfalls eine Verlängerung der lag-phase zur Folge. Bei Einsatz der gleichen Konzentration wie Zinkhistidin fiel die Verlängerung aber niedriger aus als bei Zinkhistidin. So konnte bei einer Konzentration von 10 μM eine Verlängerung der lag-phase um $55,5 \pm 0,7$ Minuten beobachtet werden. Bei 20 μM war betrug sie $94,3 \pm 1,1$ Minuten im Vergleich zur Kontrolle.

Wurden die LDL mit verschiedenen Konzentrationen von Zinksulfat inkubiert, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung der lag-phase beobachtet werden (Tab. 19).

Die in diesem Versuchsansatz verwendeten Substanzen wurden auf ihre antioxidative Aktivität gegenüber der kupfer-induzierten LDL-Oxidation getestet. Die drei Substanzen zeigten, wie zu erwarten war, große Unterschiede in der antioxidativen Aktivität. Der höchste protektive Effekt gegenüber LDL-Oxidation wurde bei Inkubation der LDL mit Zinkhistidin beobachtet. Zinkhistidin zeigte eine stärkere antioxidative Aktivität gegenüber LDL-Oxidation als Histidin, bei Inkubation mit identischen Konzentrationen. Bei Inkubation der LDL mit Zinksulfat konnte keine signifikante Veränderung der Oxidationsresistenz der LDL beobachtet werden.

Kombination von Histidin mit Quercetin oder Kaffeesäure

Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von Histidin und Quercetin oder Histidin und Kaffeesäure konnte eine Verkürzung der lag-phase bezogen auf die Einzeleffekte von Quercetin oder Kaffeesäure beobachtet werden (Abb. 58). Der Zusatz von Histidin scheint also die antioxidative Wirkung von Quercetin oder Kaffeesäure zu hemmen. Im Hinblick auf die lag-phase von LDL inkubiert mit Histidin allein konnte allerdings durch Zusatz von Quercetin oder Kaffeesäure eine Verlängerung erzielt werden.

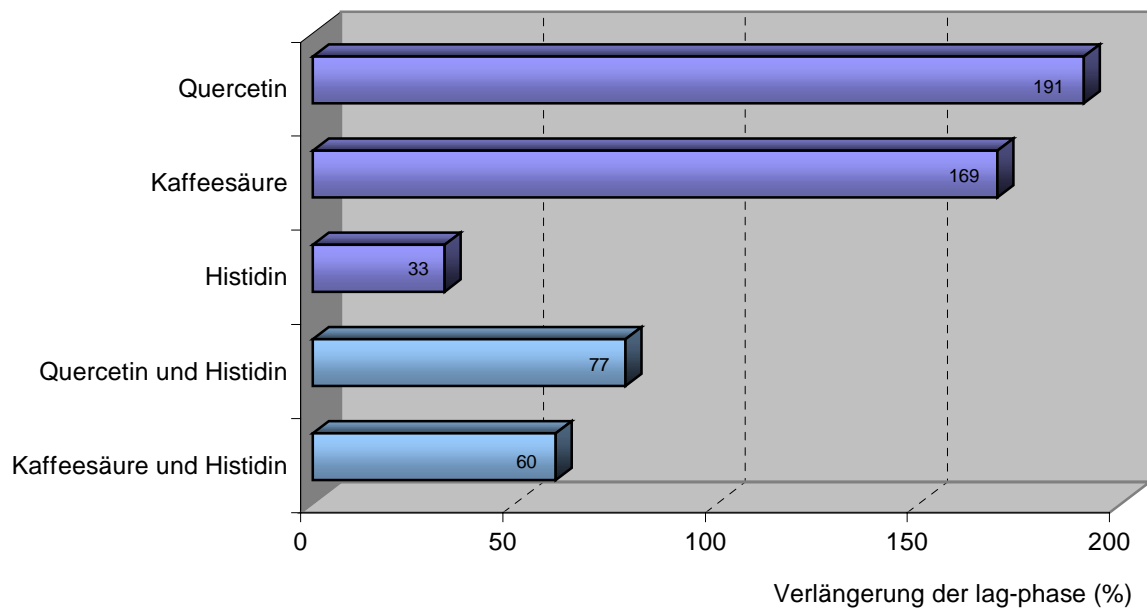


Abb. 58: Verlängerung der lag-phase von LDL (in %) nach Inkubation mit Histidin, Quercetin und Kaffeesäure (allein oder in Kombination, dunkelblau bzw. hellblau) im Vergleich zur Kontrolle (100 %, ohne Zusatz von Antioxidantien)

Bei Kombination von Zinksulfat mit Quercetin oder Kaffeesäure konnte keine Verlängerung der lag-phase bezogen auf die Einzeleffekte beobachtet werden (nicht dargestellt). Zinksulfat war weder allein noch in Kombination mit Quercetin oder Kaffeesäure in der Lage die antioxidative Kapazität von LDL zu erhöhen.

4 Diskussion

4.1 Studie 1: Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Anhand zahlreicher Studien konnte gezeigt werden, dass Anthocyane, Flavonoide und auch Phenolsäuren antioxidative Wirkung bei der Oxidation von LDL aufweisen (de Whalley et al., 1990, Laranjinha et al., 1994, Nardini et al., 1995, Vinson et al., 1995). Aber nur wenig Information ist verfügbar über die Wirkung von Kombinationen verschiedener antioxidativ wirksamer Substanzen auf die LDL-Oxidation. Kenntnisse über die Wirkungsweise von Antioxidantien würden es ermöglichen, die Zusammenhänge der antioxidativen Effekte in komplexen Gemischen, wie sie in Obst oder Gemüse vorliegen, besser zu verstehen. Anhand der vorliegenden Studie sollte der Einfluss verschiedener Antioxidantienkombinationen auf die Oxidation von LDL untersucht werden.

Um den Einfluss von verschiedenen Antioxidantienkombinationen untersuchen zu können, mussten zunächst die Effekte der Einzelsubstanzen ermittelt werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Einzelsubstanzen α -Tocopherol (5 μ M) und Ascorbinsäure (3 μ M) in dem hier verwendeten Versuchsansatz eine niedrigere antioxidative Aktivität besaßen (bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen) als die Polyphenole (1 μ M). Auch Sanchez-Moreno et al. (2000) haben gezeigt, dass Polyphenole, darunter auch Kaffeesäure, Quercetin, Rutin oder Ferulasäure, eine höhere antioxidative Wirkung auf die Hemmung der LDL-Oxidation hatten, als α -Tocopherol oder Ascorbinsäure. Cao et al. (1996) und Wang et al. (1996) vermuteten, dass Polyphenole allgemein weit wirksamere Antioxidantien darstellen als α -Tocopherol oder Ascorbinsäure. Sie zeigten, dass mehr als 80 % der antioxidativen Aktivität bei Obst und Gemüse auf andere Inhaltsstoffe als Vitamin E und C und β -Carotin zurückzuführen sind.

Die drei wirksamsten Antioxidantien bei der vorliegenden Versuchsanordnung waren Quercetin gefolgt von Epicatechin und Kaffeesäure. Für Quercetin konnte eine durchschnittliche Verlängerung der lag-phase um 108 % in bezug auf die Kontrolle beobachtet werden. Bei Epicatechin und Kaffeesäure betrug die Verlängerung der lag-phase 74 bzw. 80 %. Für

α -Tocopherol wurde zwar eine Verlängerung der lag-phase von ebenfalls 74 % gemessen, allerdings betrug die Konzentration von α -Tocopherol 5 μ M im Vergleich zu den Polyphenolen mit 1 μ M. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass bei der vorliegenden Untersuchung ein starker Einfluss der ortho-Dihydroxystruktur (Catecholstruktur) auf die antioxidative Aktivität beobachtet werden konnte. Hesperetin (38 %) und Phloretin (31 %) hatten eine geringe antioxidative Aktivität im Vergleich zu den Polyphenolen mit ortho-Dihydroxystruktur Quercetin, Kaffeesäure und Epicatechin (Abb. 59).

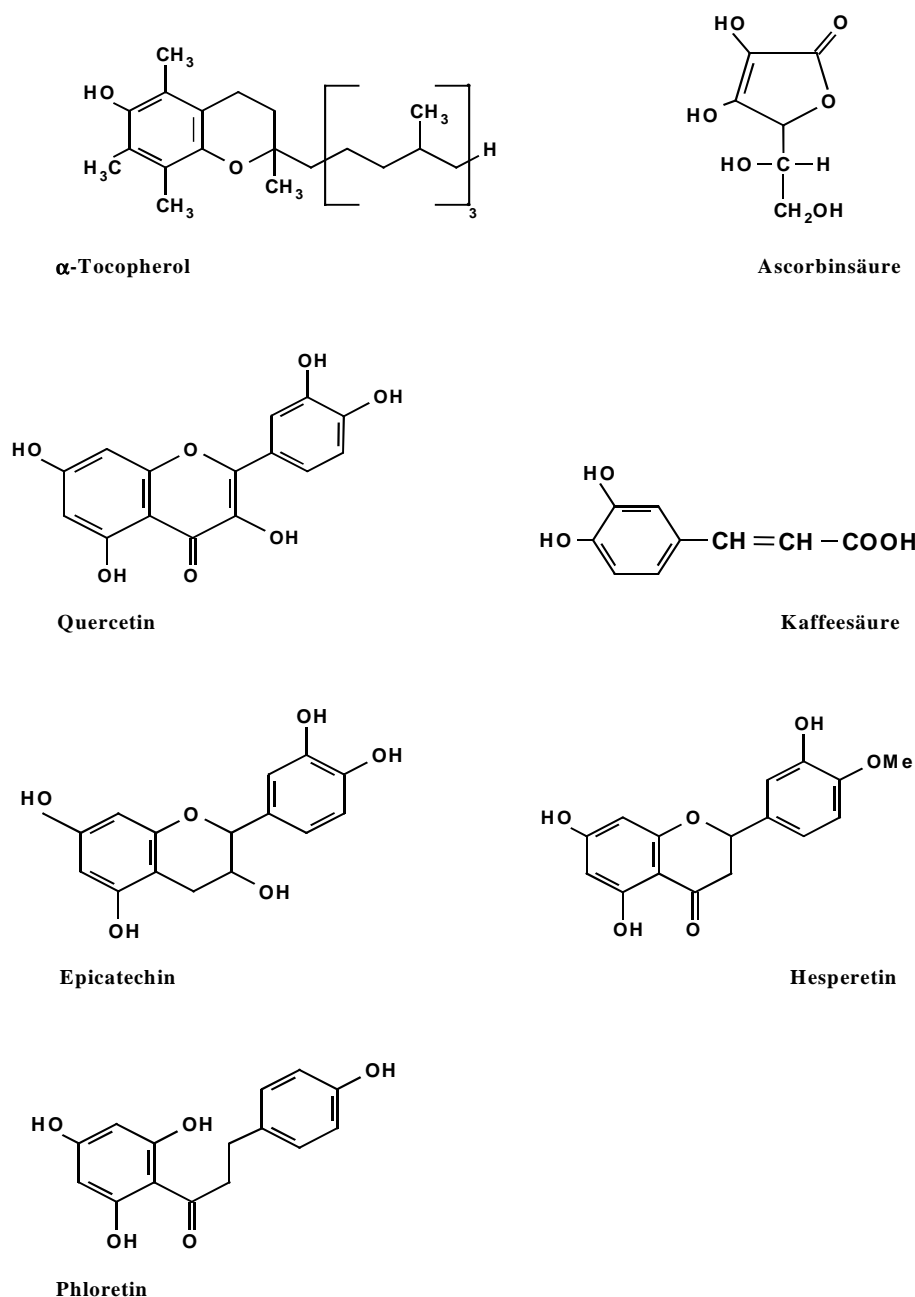


Abb. 59: Chemische Struktur der in Studie 1 verwendeten Testsubstanzen

α -Tocopherol

Tocopherole sind monophenolische Substanzen und tragen zur Stabilisierung von pflanzlichen Ölen bei. Besonders α -Tocopherol stellt ein wichtiges biologisches Antioxidans dar, da es in der Lage ist, die Oxidation von Lipiden beim Menschen zu verhindern.

Die Konzentration von α -Tocopherol in den LDL beträgt etwa 6 mol/mol LDL (Esterbauer et al., 1991) und ist damit das Antioxidans mit der höchsten Konzentration in den LDL. α -Tocopherol ist in der äußeren Schicht der LDL lokalisiert, der Chromanolring ist dabei zur wässrigen Phase hin ausgerichtet. Bei einer Untersuchung von Hoffmann (1998) konnte eine α -Tocopherolkonzentration von etwa 7 μ mol/l in den LDL nachgewiesen werden.

Grundlage für die antioxidative Aktivität von Tocopherol ist das Tocopherol/Tocopherylquinon-Redoxsystem. Tocopherole sind Radikalfänger und beseitigen Lipidradikale unter Bildung eines Tocopherylsemiquinons. Durch die Reaktion von zwei Semiquinonen entsteht ein Quinon und ein regeneriertes Tocopherol (Shahidi und Wanasundara, 1992).

Esterbauer et al. (1991) inkubierten LDL mit α -Tocopherol (10 μ M) und verfolgten den Verlauf der kupfer-induzierten Dienkonjugation (1,66 μ M CuCl₂). Es konnte eine Verlängerung der lag-phase von 47 Minuten (Kontroll-LDL) auf 76 Minuten (62 %) beobachtet werden. Dieser eher schwache protektive Effekt beruhte nach Esterbauer et al. (1991) auf einer geringen Inkorporation des zugesetzten α -Tocopherols in die LDL.

Ascorbinsäure

Vitamin C ist ein wasserlösliches Antioxidans und die Plasmakonzentration beträgt etwa 30-100 μ M (Frei et al., 1996). Ascorbinsäure kann die Lipide im Plasma vor oxidativen Veränderungen, ausgelöst durch Peroxylradikale, Makrophagen, Kupferionen oder das Xanthin/Xanthinoxidase-System, schützen (Frei et al., 1989, Retsky und Frei, 1995, Halliwell und Gutteridge, 1990). Durch in vitro Untersuchungen ließ sich zeigen, dass Ascorbinsäure die Oxidation humaner LDL durch hydrophile Radikale verhindert (Niki, 1991). Membranständige, lipophile Radikale wie Sauerstoffradikale können durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst werden, allerdings wurde beobachtet, dass Ascorbinsäure an der Regeneration des α -Tocopheroxylradikals beteiligt ist (Niki, 1991).

Retsky et al. (1993) und Stait und Leake (1996) zeigten durch ihre Untersuchung, dass Ascorbinsäure in der Lage ist, LDL vor kupfer-induzierter Oxidation zu schützen, indem es selbst zu Dehydroascorbinsäure oxidiert wird. Dadurch kommt es möglicherweise zu einer

Modifikation des Apolipoprotein B, Kupferionen können nicht mehr an die LDL binden und eine Oxidation der LDL wird so verhindert (Retsky et al., 1993, Esterbauer et al. 1991). Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bilden ein Redoxsystem mit Semihydroascorbinsäure als reaktionsfähiger Zwischenstufe. Durch Abgabe von 2 Elektronen entsteht aus Ascorbinsäure Dehydroascorbinsäure (Cossins et al., 1998).

Laranjinha und Cadenas (1999) konnten bei Inkubation von LDL mit Ascorbinsäure (2 μM) während Ferrylmyoglobin-induzierter LDL-Oxidation eine Verlängerung der lag-phase um 20-50 % bezogen auf die Kontrolle beobachten. Dabei war der α -Tocopherolgehalt der LDL nicht von Bedeutung. Esterbauer et al. (1989b) konnten bei Inkubation der LDL mit Ascorbinsäure (5 μM) eine Verlängerung der lag-phase von 72 auf 129 Minuten (79 %) während kupfer-induzierter LDL-Oxidation (1,66 μM CuCl_2) erreichen.

Neben der antioxidativen Wirkung konnten anhand zahlreicher Studien bei Ascorbinsäure und α -Tocopherol durch Übergangsmetalle ausgelöste prooxidative Aktivitäten beobachtet werden (Stait und Leake, 1994, Levine et al., 1998, Iwatsuki et al., 1995, Maiorino et al., 1993, Yoshida et al., 1994). Kontush et al. (1996) konnten bei α -Tocopherol eine prooxidative Wirkung bei der LDL-Oxidation feststellen, wenn die Kupferkonzentration (0,1 μM) niedrig war. Bei einer höheren Kupferkonzentration (3 μM) wirkte α -Tocopherol antioxidativ. Auch Flavonoide oder Phenolsäure können unter bestimmten Versuchsbedingungen eine prooxidative Aktivität aufweisen (Fukumoto und Mazza, 2000, Yamanaka et al., 1997) (vergleiche 4.4.).

Eine prooxidative Wirkung konnte bei vorliegender Untersuchung für keines der getesteten Antioxidantien während kupfer-induzierter LDL-Oxidation beobachtet werden. Ein Grund dafür könnten die stark oxidierenden Bedingungen (Kupferkonzentration 16,6 μM) bei diesem Versuchsansatz gewesen sein.

Unter physiologischen, schwach oxidierenden Bedingungen könnte aber die prooxidative Wirkung der Substanzen eine Rolle spielen, allerdings haben Kontush et al. (1996) festgestellt, dass Ascorbinsäure die prooxidativen Eigenschaften von α -Tocopherol aufheben kann.

Quercetin und Kaffeesäure

Bei einer Untersuchung von Manach et al. (1998) konnte Quercetin in einer Konzentration von 30-140 nmol/l im Nüchternplasma nachgewiesen werden. Nach einer Testmahlzeit betrug die

Quercetinkonzentration 370 nmol/l. In einer Studie von Hollman et al. (1996) konnte eine Quercetinkonzentration von 650 nmol/l nach einer Testmahlzeit bestimmt werden. Cremin et al. (2001) haben nach einer Testmahlzeit eine Kaffeesäurekonzentration im Plasma von etwa 90 nmol/l messen können.

Die wesentlichen strukturellen Voraussetzungen für die antioxidative Aktivität bei Flavonoiden sind die Catecholstruktur des B-Rings, die 2,3-Doppelbindung des C-Rings in Konjugation mit der Carbonylgruppe am C-Atom 4 und deren Wechselwirkung mit benachbarten Hydroxygruppen (Böhm et al., 1998, Croft, 1998). Diese funktionellen Gruppen ermöglichen eine hohe antioxidative Aktivität gegenüber kupfer-induzierter Oxidation. Bei der hier vorliegenden Untersuchung konnte für Quercetin, das die genannten Strukturen besitzt, die höchste antioxidative Aktivität der Testsubstanzen beobachtet werden (vergleiche 4.3).

Kaffeesäure ist eine Hydroxyzimtsäure und besitzt die funktionellen Gruppen, die für die antioxidative Wirkung bei Flavonoiden verantwortlich gemacht werden (Laranjinha und Cadenas, 1999). So ist auch bei der Kaffeesäure eine ortho-Dihydroxystruktur und eine laterale Doppelbindung in Konjugation mit einer Carbonylgruppe und dem Phenolrest zu finden. Dennoch besaß Quercetin bei der vorliegenden Untersuchung eine höhere antioxidative Aktivität als Kaffeesäure, aufgrund einer höheren Anzahl an Metallbindungsstellen. So stellen bei Quercetin neben der Catecholstruktur auch die 3- und 5-Hydroxygruppe in Verbindung mit der 4-oxo-Gruppe Metallbindungsstellen dar (vergleiche 4.3, Abb. 63, Abb. 64). Allerdings war die Wirkung von Kaffeesäure im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen sehr hoch.

Epicatechin

In einer Untersuchung von Rein et al. (2000) konnten 2 Stunden nach dem Verzehr von Schokolade eine Epicatechinkonzentration von 260 nmol/l nachgewiesen werden.

Epicatechin gehört zur Gruppe der Flavan-3-ole (Catechine), die einen gesättigten heterozyklischen Ring besitzen. Die dadurch fehlende Konjugation von A- und B-Ring, im Vergleich zu den Flavonolen (Quercetin) (Abb. 59), macht sich in einer niedrigeren antioxidativen Aktivität bemerkbar (Rice-Evans et al., 1996). Eine 4-oxo-Gruppe ist nur wirksam in Verbindung mit einer 2,3-Doppelbindung. Den größten Beitrag zur Komplexbildung mit Übergangsmetallen leistet die Catecholstruktur des B-Rings (Pietta, 2000). Bei der vorliegenden Untersuchung konnte zwar beobachtet werden, dass Epicatechin eine niedrigere antioxidative Aktivität als Quercetin besaß, jedoch war die antioxidative Aktivität verglichen mit den anderen

getesteten Substanzen relativ hoch. Dies dürfte vor allem an der Catecholstruktur des B-Rings bei Epicatechin liegen.

Hesperetin

In einer Untersuchung von Erlund et al. (2001) konnte nach einer Testmahlzeit eine Hesperetinkonzentration im Plasma von 0,5-5,5 $\mu\text{mol/l}$ gemessen werden.

Flavanone mit nur einer Hydroxygruppe am B-Ring wie Hesperetin besitzen nur geringe antioxidative Aktivität (Shahidi und Wanasundara, 1992). Jedoch scheinen bei einem Fehlen der Catecholstruktur die anderen Strukturen eine stärkere Bedeutung für die Aktivität als Radikalfänger zu bekommen. So kann eine Methylierung an Position 4' die 3'-Hydroxygruppe aktivieren und die antioxidative Aktivität erhöhen, wie im Fall von Hesperetin (van Acker et al., 1998). Die Hydroxygruppen des A-Rings leisten nur einen geringen Beitrag zur antioxidativen Aktivität bei Abwesenheit der Catecholstruktur (Rice-Evans et al., 1996). Aufgrund der fehlenden 2,3-Doppelbindung im heterozyklischen Ring im Vergleich zu Quercetin kann bei Hesperetin keine Elektronendelokalisierung zwischen Ring A und B stattfinden (Rice-Evans et al., 1996).

Für Hesperetin konnte auch bei vorliegender Untersuchung nur eine sehr niedrige antioxidative Aktivität aufgrund der Position der Hydroxylgruppe am B-Ring beobachtet werden. Die 3'-Position bietet nur geringes Potential zur Elektronenabgabe (Sekher et al., 2001).

Phloretin

Chalkone werden über den 'Shikimate-Pathway' in der Pflanze gebildet und sind Vorstufen der Flavonoide. Phloretin zählt zu dieser Gruppe und ist damit den anderen Flavonoiden strukturell sehr ähnlich, der Unterschied liegt im C-Ring, der bei den Chalkonen nicht geschlossen ist (Abb. 59) (Tomas-Barberan und Clifford, 2000).

Miranda et al. (2000) untersuchten verschiedene Chalkone und Flavonoide auf deren antioxidative Wirkung gegenüber kupfer-induzierter LDL-Oxidation (Kupferkonzentration 2 μM). Dabei konnten sie feststellen, dass die Inkubation der LDL mit 5 μM Phloretin keinen Einfluss auf die lag-phase von LDL hatte, verglichen mit Kontroll-LDL. Eine Konzentration von 25 μM Phloretin hatte nur eine geringe Verlängerung der lag-phase in bezug auf die Kontrolle

zur Folge. Im Gegensatz dazu verhinderte 5 oder 25 μM Quercetin eine Oxidation der LDL über einen Zeitraum von fünf Stunden vollständig.

Auch bei den Chalkonen haben Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung gezeigt, dass die Anwesenheit von Hydroxy- und Methoxygruppen am A- oder B-Ring eine entscheidende Rolle bei der antioxidativen Aktivität dieser Substanzen spielen (Anto et al., 1995). Butein, ein Chalkon mit Catecholstruktur (ortho-Dihydroxystruktur) am B-Ring und zwei weiteren Hydroxygruppen am A-Ring zeigte eine hohe antioxidative Wirkung bei der kupfer-induzierten LDL-Oxidation (Cheng et al., 1998). Dagegen konnten Vaya et al. (1997) bei Isoliquiritigenin, einem Chalkon mit nur jeweils einer 7-Hydroxygruppe am A-Ring und einer 4'-Hydroxygruppe am B-Ring, eine geringe antioxidative Aktivität während AAPH-induzierter LDL-Oxidation feststellen. Für Chalkone scheint also eine ähnliche Struktur-Wirkungsbeziehung bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation wie für die Flavone oder Phenolsäuren zu gelten.

Für Phloretin konnte bei der hier vorliegenden Untersuchung nur eine schwache antioxidative Aktivität bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation registriert werden. Dies dürfte vor allem daran liegen, dass die Catecholstruktur fehlt, die einen entscheidenden Beitrag zur Komplexbildung mit Kupferionen leistet (Pietta, 2000). Die 5-Hydroxygruppe in Verbindung mit der 4-oxo-Gruppe ist zwar eine Metallbindungsstelle, allerdings fehlt die 2,3-Doppelbindung. Dadurch ist eine Mesomeriestabilisierung zwischen A- und B-Ring bei dem entstehenden Radikal nicht gewährleistet.

Synergistische Wirkung verschiedener Antioxidantien

Zahlreiche Studien haben bestätigt, dass Ascorbinsäure in der Lage ist, α -Tocopherol zu regenerieren und so die antioxidative Kapazität von Membranen zu erhöhen (Frei et al., 1989, Retsky and Frei, 1995, Packer et al., 1979, Niki et al., 1995, Niki, 1991, Jialal und Grundy, 1991, Doba et al., 1985, Frei et al., 1996). Ascorbinsäure regeneriert α -Tocopherol von dessen Radikalform, und das dabei entstehende Radikal der Ascorbinsäure wird wiederum durch Thiole, wie z.B. Glutathion (GSH) zu Ascorbinsäure umgewandelt.

Auch verschiedene Flavonoide und Ascorbinsäure sind in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen, analog dem Synergismus von Ascorbinsäure und α -Tocopherol (Fuhrman and Aviram, 2001). Rusznyak und Szent-Györgyi (1936), Bentsath et al. (1936) und Bentsath et al. (1937) konnten schon vor einigen Jahrzehnten beobachten, dass Zitronensaft oder Paprikaextrakt die Brüchigkeit und die Permeabilität der Kapillarwand reduziert, aber Ascorbinsäure allein

keinen Effekt hatte. Als aktive Substanz dieser Extrakte wurde ein Flavone oder Flavonglycosid identifiziert und als Vitamin P bezeichnet. Es wurde damals vermutet, dass Skorbut durch einen Mangel an Vitamin C und P verursacht wird.

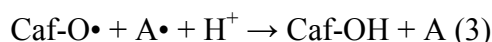
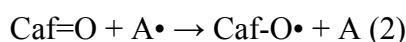
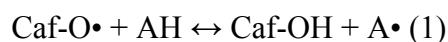
Die Fähigkeit der Flavonoide, durch Elektronenabgabe einen oxidativen Angriff abzuwehren, hängt von dem Redoxpotential von Flavonoid und Oxidans ab. Bei der Bestimmung des Redoxpotentials wird die Veränderung der freien Enthalpie bei einer Redoxreaktion gemessen (Jovanovic et al., 1998). Bors et al. (1995) haben beobachtet, dass die 2,3-Doppelbindung und die Catecholstruktur des B-Rings einen starken Einfluss auf das Redoxpotential haben. Substanzen, die diese Strukturen besitzen, wie etwa Quercetin, haben ein höheres Redoxpotential als Ascorbinsäure und wären somit in der Lage Ascorbinsäure zu oxidieren (Abb. 60) (Rice-Evans und Miller, 1998). Dagegen könnten Flavonoide mit einem niedrigeren Redoxpotential Ascorbinsäure regenerieren (Bors et al., 1995, Jovanovic et al., 1996, Cossins et al., 1998).

Vieira et al. (1998) konnten bei der Kombination von Phenolsäuren und Ascorbinsäure einen synergistischen, antioxidativen Effekt auf die Ferrylmyoglobin-induzierte LDL-Oxidation feststellen. Ferrylmyoglobin ist ein Oxidationsprodukt, das bei der Reaktion von Metmyoglobin und H_2O_2 entsteht. Gemessen wurde die Abnahme von Cholesterol und Cholesterolestern während der Oxidation der LDL und die Entstehung von Oxidationsprodukten. Kaffeesäure schützte die LDL bei gleicher Konzentration (jeweils 2 μM) weit stärker vor Oxidation als Ascorbinsäure. Wenn Kaffeesäure zusammen mit Ascorbinsäure zugesetzt wurde, konnte eine Hemmung der LDL-Oxidation beobachtet werden, die stärker war als die Summe der Einzeleffekte. Ascorbinsäure potenzierte den Schutz durch Kaffeesäure. Der gleiche Effekt konnte auch bei Kombination mit p-Cumarsäure beobachtet werden. Es konnte ein synergistischer Effekt der Phenolsäuren in Verbindung mit Ascorbinsäure und ein additiver Effekt bei Kombination von Phenolsäuren festgestellt werden (Vieira et al., 1998).

Dieser Synergieeffekt wird erklärt durch die Fähigkeit der Ascorbinsäure, das Phenoxylradikal der Kaffeesäure zu regenerieren. Es entsteht dabei ein sehr stabiles Ascorbylradikal. Die Reaktion von Ascorbinsäure und Phenolsäuren ist sowohl kinetisch als auch thermodynamisch möglich. Die Substanzen besitzen die gleiche Lokalisation und außerdem weist das Ascorbylradikal ein niedrigeres Reduktionspotential auf als Kaffeesäure (Jovanovic et al., 1994, Steenken und Neta P., 1982).

Laranjinha und Cadenas (1999) untersuchten das Zusammenspiel von Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure auf die Oxidationsresistenz von LDL. Das Plasma wurde vor Isolation der LDL mit α -Tocopherol angereichert, anschließend wurden die LDL mit Kaffeesäure und/oder Ascorbinsäure (jeweils 2 μ M) inkubiert. Die Wirkungen von Kaffeesäure und Ascorbinsäure scheinen sich zu ergänzen und resultieren in einer synergistischen antioxidativen Aktivität gegenüber LDL-Oxidation, die deutlich über der Summe der Einzeleffekte lag (Laranjinha und Cadenas, 1999).

Kaffeesäure besitzt ebenfalls wie Quercetin eine Catecholstruktur und eine laterale Doppelbindung (Bors et al. 1995). Hinsichtlich der Redoxpotentiale der Redoxpaare scheint auch die Regeneration des Kaffeesäureradikals (Caf-O \bullet) durch Ascorbinsäure (AH) möglich zu sein (Reaktion 1) (Jovanovic et al., 1994, Buettner und Jurkiewicz, 1993); erst wenn die Konzentration der Kaffeesäure höher ist als die der Ascorbinsäure könnte die Reaktion vermehrt nach links verlagert werden (Laranjinha und Cadenas, 1999).



Doch neben Reaktion 1 scheinen auch noch andere Abläufe eine Regeneration von Kaffeesäure zu bewirken. Durch Reduktion des Kaffeesäurequinons (Caf=O) durch das Radikal der Ascorbinsäure (A \bullet) (Reaktion 2) und die Reaktion der Radikale von Kaffeesäure und Ascorbinsäure kommt es zur Regeneration der Kaffeesäure (Caf-OH) und Bildung von Dehydroascorbinsäure (A) (Reaktion 3) (Laranjinha und Cadenas, 1999).

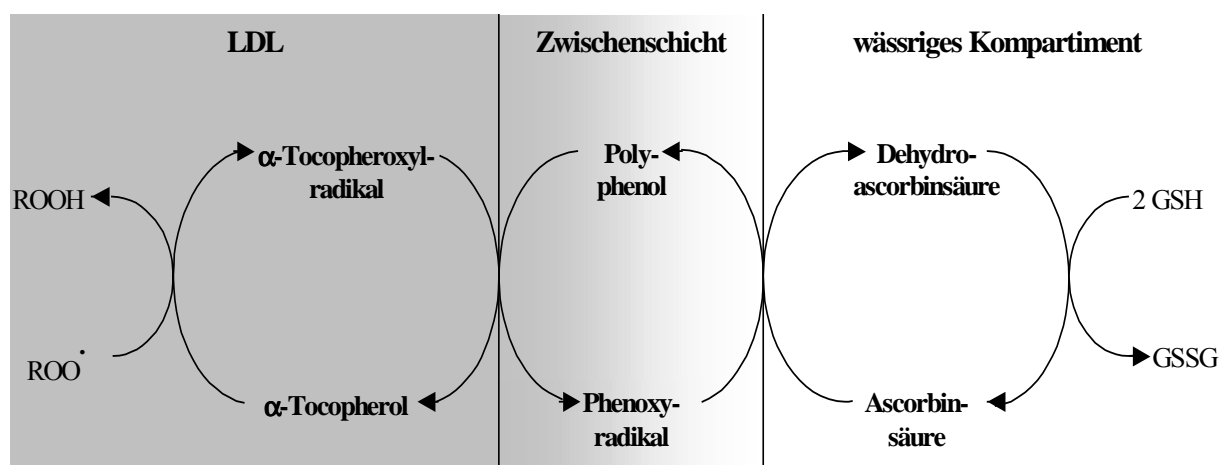


Abb. 60: Mögliche synergistische Wirkung von α -Tocopherol, Polyphenolen und Ascorbinsäure während LDL-Oxidation (nach Laranjinha und Cadenas (1999), Cossins et al. (1998), Vieira et al. (1998), Laranjinha et al. (1995), Fuhrman und Aviram (2001))

Ascorbinsäure spielt eine wichtige Rolle im antioxidativen Netzwerk *in vivo*, bei dem auch Flavonoide und Phenolsäuren mitwirken können, da sie in der Lage sind, α -Tocopherol zu regenerieren und selbst durch Ascorbinsäure regeneriert werden (Abb. 60).

Auch Croft (1998) hält eine Reaktion von Flavonoiden oder Phenolsäuren mit anderen physiologischen Antioxidantien wie Ascorbinsäure für durchaus möglich. Kandaswami et al. (1993) zeigten, dass der antiproliferative Effekt von Quercetin bei Anwesenheit von Ascorbinsäure erhöht war. Möglicherweise wird hierbei die Phenolsäure durch Ascorbinsäure vor Oxidation geschützt.

Meyer et al. (1998) haben den Einfluss verschiedener Phenolkombinationen auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation untersucht. Gemessen wurde dabei die Hemmung der Hexanalbildung während der Oxidation. LDL wurde mit Catechin, Quercetin, Ellagsäure, Cyanidin und Kaffeesäure, einzeln oder in Kombination von zwei oder drei Antioxidantien (Konzentration von jeweils 2,5 μ M), inkubiert. Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von Catechin und Ellagsäure konnte eine antioxidative Aktivität beobachtet werden, die etwa die Hälfte des Einzelsubstanzeffekts von Catechin betrug. Wurde Catechin mit einer anderen Substanz kombiniert, lag der antioxidative Effekt unter der Summe der Effekte der Einzelsubstanzen. Weder bei Kombination von zwei noch von drei Antioxidantien konnte ein synergistischer Effekt beobachtet werden. Die Kombination von Quercetin und Kaffeesäure zeigte einen additiven Effekt. Der von Meyer et al. (1998) beobachtete antagonistische Effekt von Catechin und Ellagsäure wurde auf eine Wasserstoffbindung zwischen der ortho-Dihydroxygruppe von Catechin und den Carbonylgruppen von Ellagsäure zurückgeführt. Dadurch wird die Möglichkeit von Catechin zur Wasserstoffabgabe behindert.

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte keine synergistische Wirkung von α -Tocopherol und Ascorbinsäure festgestellt werden. Die Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure hatte bei der Dienkonjugation sogar einen verkürzenden Effekt auf die lag-phase, bezogen auf den Einzelsubstanzeffekt von α -Tocopherol. Dieser Effekt trat auch bei der Kombination von α -Tocopherol und Phloretin auf. Bei Kombination von α -Tocopherol mit Quercetin, Kaffeesäure, Epicatechin oder Hesperetin war der Effekt stärker als der Einzelsubstanzeffekt von α -Tocopherol, jedoch nicht höher als die Summe der Einzeleffekte. Dagegen konnte bei Kombination von Ascorbinsäure mit einem Polyphenol ein LDL-protektiver Effekt beobachtet werden, der höher war als bei der entsprechenden Kombination mit

α -Tocopherol, obwohl der Einzelsubstanzeffekt von Ascorbinsäure niedriger war als der von α -Tocopherol. Bei Kombination von Ascorbinsäure mit einem Polyphenol war die antioxidative Wirkung höher als die Summe der Einzelsubstanzeffekte. Einzige Ausnahme war die Kombination von Ascorbinsäure mit Phloretin, hier lag der Effekt unter der Summe der Einzelsubstanzeffekte.

Diese Ergebnisse lassen eine synergistische Wirkung von Ascorbinsäure mit den Polyphenolen vermuten. Wahrscheinlich wurden die bei der Oxidation entstehenden Radikale der Polyphenole durch Ascorbinsäure regeneriert.

Anordnung der Antioxidantien im LDL-Modell

α -Tocopherol ist ein Antioxidans, das die Kettenreaktion bei der Lipidperoxidation unterbrechen kann, diese Reaktion beinhaltet einen Wasserstofftransfer auf ein sekundäres Lipidperoxyradikal (Esterbauer et al., 1989c). Eine Eigenschaft des dabei entstehenden Tocopheroxyradikal ist, dass es nicht aus den LDL diffundiert. Der polare Teil der Phenolgruppe von α -Tocopherol trägt aber dazu bei, dass sich α -Tocopherol nahe der Zwischenphase befindet und diese Anordnung erlaubt eine Reaktion des Tocopheroxyradikals mit wasserlöslichen Antioxidantien (Laranjinha und Cadenas, 1999).

Die hydrophilen Eigenschaften der Polyphenole und Flavonoide ermöglichen eine Anordnung in der Grenzschicht der LDL. Dadurch sind sie in der Lage, einen Angriff durch freie Radikale im wässrigen Medium abzuwehren und außerdem lipophile Radikale (Tocopheroxyradikal) zu regenerieren. Das dabei entstehende Phenoxyradikal kann wiederum von Elektronendonatoren in der wässrigen Phase, wie Ascorbinsäure, regeneriert werden (Laranjinha und Cadenas, 1999, Croft, 1998, Rice-Evans und Miller, 1998).

Kaffeesäure ist nach Laranjinha et al. (1995) in der Lage, den Verbrauch von endogenem α -Tocopherol während LDL-Oxidation zu hemmen. Verglichen mit Ascorbinsäure schützt 6 μ M Kaffeesäure das α -Tocopherol für 6 Stunden, während 6 μ M Ascorbinsäure nur einen Schutz für 2,5 Stunden bieten. Wird Ascorbinsäure erst nach dem Start der Oxidationsreaktion zugegeben, so wird die Oxidation sofort gestoppt. Bei Zugabe von Kaffeesäure wird die Oxidationsreaktion erst nach einer kurzen Verzögerung gestoppt. Wurde LDL, angereichert mit α -Tocopherol, mit Kaffeesäure inkubiert, war die Hemmung der Oxidation stärker als die Summe der einzelnen Effekte (Laranjinha et al., 1995).

α -Tocopherol als lipophiles Antioxidans wurde bei vorliegender Untersuchung zu einer wässrigen LDL-Präparation gegeben. Unter diesen Bedingungen wurde wahrscheinlich kaum α -Tocopherol an die LDL gebunden. Diese Situation ist nur schwer vergleichbar mit der in vivo. Esterbauer et al. (1989b) inkubierten Plasma mit α -Tocopherol für 2 Stunden, isolierten anschließend die LDL und bestimmten die Konzentration von α -Tocopherol in den LDL. Dabei wurde beobachtet, dass bei einer Konzentration von 125 μ M α -Tocopherol im Plasma nur 1,66 μ M in die LDL aufgenommen wurden. Bei Verwendung von höheren Konzentrationen konnte der Tocopherolgehalt der LDL gesteigert werden. In einem zweiten Versuchsansatz von Esterbauer et al. (1989b) wurden die LDL direkt mit α -Tocopherol inkubiert. Hierbei wurde beobachtet, dass ein noch geringerer Anteil des α -Tocopherols in die LDL aufgenommen wurde. Dies lässt vermuten, dass unter den vorliegenden Versuchsbedingungen bei einer Konzentration von 5 μ M α -Tocopherol die Aufnahme in die LDL sehr gering war. Deshalb besaß α -Tocopherol bei der vorliegenden Untersuchung eine niedrige antioxidative Aktivität und es konnte eine antagonistische Wirkung bei α -Tocopherol und Ascorbinsäure beobachtet werden.

Wurde nämlich bei der vorliegenden Untersuchung Plasma vor Isolation der LDL mit α -Tocopherol (Endkonzentration im Plasma 250 μ M) inkubiert und LDL dann anschließend isoliert war das Ergebnis anders. Bei Inkubation der mit α -Tocopherol vorinkubierten LDL mit Ascorbinsäure (3 μ M) konnte mit einer Kupferkonzentration von 16,6 μ M eine Verlängerung der lag-phase um 31 %, bezogen auf die Inkubation mit α -Tocopherol allein, beobachtet werden. Allerdings lag dieser Effekt unter der Summe der Einzeleffekte. Mit einer Kupferkonzentration von 5 μ M konnte dagegen bei Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure ein additiver Effekt festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Tocopherolen besitzen die Flavonoide sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile und sind so in der Lage freie Radikale im hydrophilen als auch im lipophilen Milieu zu beseitigen. Außerdem ermöglichen die chemischen Eigenschaften der Flavonoide eine Regeneration der endogenen Antioxidantien (Fuhrman und Aviram, 2001). Ascorbinsäure ist hydrophil und befindet sich in der wässrigen Phase und scheint sich in der Wirkung mit den Polyphenolen zu ergänzen.

Die antioxidative Wirkung von Antioxidantienkombinationen scheint sehr stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Antioxidantien und der damit verbundenen Anordnung im LDL-Modell abzuhängen. Die einzelnen Substanzen besitzen unterschiedliche antioxidative Mechanismen, die sich aber nur teilweise ergänzen. Die Unterschiede in der

antioxidativen Aktivität der Substanzen, können möglicherweise auf die unterschiedliche Löslichkeit und Anordnung der einzelnen Substanzen in der hydrophilen und der lipophilen Phase im LDL-System zurückgeführt werden.

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung konnten synergistische aber auch antagonistische Effekte unter den getesteten Antioxidantien beobachtet werden. Da die Antioxidantien in der Natur in verschiedenen Kombinationen vorgefunden werden, dürfen sie auch bei in vitro Untersuchungen nicht isoliert voneinander betrachtet werden. In vitro Effekte solcher Antioxidantienkombinationen geben natürlich nicht die Situation in vivo wieder, könnten aber bei der Planung klinischer Studien eine große Hilfe sein.

Die Ergebnisse der Messung der Tryptophanfluoreszenz und der Carbonylgruppenbildung haben die Beobachtungen bei der Dienkonjugation bestätigt. Mit beiden Methoden konnte bei Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure keine synergistische Wirkung beobachtet werden. Sowohl bei der Tryptophanfluoreszenz als auch bei der Carbonylgruppenbildung konnte ein stärkerer antioxidativer Effekt bei Kombination von Ascorbinsäure mit Quercetin oder Kaffeesäure beobachtet werden, als bei Kombination der beiden Polyphenole mit α -Tocopherol, wengleich auch mit diesen Methoden α -Tocopherol bei den Einzelsubstanzen eine höhere antioxidative Aktivität als Ascorbinsäure besaß. Die höchste antioxidative Wirkung wurde bei Kombination von Quercetin und Kaffeesäure erzielt. Dieser hier aufgetretene Synergieeffekt wurde in Studie 3 näher untersucht.

4.2 Studie 2: Konzentrationen von α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure in den Low Density Lipoproteinen im Verlauf der kupfer-induzierten Oxidation

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung sollte der Verbrauch der zugesetzten Antioxidantien während kupfer-induzierter LDL-Oxidation verfolgt werden. Die LDL wurden mit α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure, einzeln oder in verschiedenen Kombinationen, inkubiert. Ein Konzentrationsverlauf konnte allerdings nur für α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure bestimmt werden.

Betrachtet man die Antioxidantiengehalte während der kupfer-induzierten LDL-Oxidation, so fällt auf, dass Quercetin am schnellsten oxidiert wird. Bereits nach 5 Minuten sind im Ansatz nur noch 3-17 % vorhanden. Dabei ist in dem hier verwendeten Versuchsansatz unerheblich, ob die LDL mit Quercetin allein oder zusammen mit anderen Antioxidantien inkubiert wurden. Lediglich bei Inkubation einer Kombination aus Quercetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure ist die Oxidation von Quercetin gering verzögert.

Der α -Tocopherolgehalt in den LDL-Präparationen liegt nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten noch zwischen 5 und 12 %. Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure oder einer Kombination von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure nimmt der α -Tocopherolgehalt langsamer ab als bei den anderen Ansätzen.

Esterbauer et al. (1989b) untersuchten den Verbrauch von endogenem α -Tocopherol der LDL während kupfer-induzierter LDL-Oxidation (Kupferkonzentration 1,66 μ M). Bei einer lag-phase von 55 Minuten war α -Tocopherol schon nach 10 Minuten vollständig verbraucht. Cartron et al. (2001) stellten bei ihrer Untersuchung fest, dass endogenes α -Tocopherol während kupfer-induzierter LDL-Oxidation (Kupferkonzentration 5 μ M) nach 60 Minuten verbraucht war. Wurden die LDL mit 1,6 μ M Kaffeesäure inkubiert, war α -Tocopherol erst nach etwa 180 Minuten verbraucht. Und bei einer Konzentration von 3,1 μ M Kaffeesäure war der Verbrauch von α -Tocopherol noch stärker verzögert, erst nach etwa 270 Minuten war kein α -Tocopherol mehr vorhanden. Cartron et al. (2001) vermuteten, dass Kaffeesäure bei diesem Versuchsansatz bereits zu Beginn der Oxidationreaktion noch vor α -Tocopherol verbraucht wird. Dies konnte bei vorliegender Untersuchung nicht festgestellt werden. Kaffeesäure wird gegenüber α -Tocopherol und Quercetin deutlich langsamer verbraucht und es konnte ein starker

Einfluss der Kombinationen auf den Verlauf beobachtet werden. Kaffeesäure wurde am schnellsten verbraucht bei Inkubation der LDL mit Kaffeesäure, allein oder in Kombination mit Ascorbinsäure. Bei einer Kombination von Kaffeesäure und Quercetin oder Kaffeesäure, Quercetin, α -Tocopherol und Ascorbinsäure wurde die Kaffeesäure langsamer verbraucht.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung kann eine Regeneration der Kaffeesäure durch Ascorbinsäure (Laranjinha und Cadenas, 1999) (vergleiche 4.1) nicht bestätigt werden. Bei Kombination von Ascorbinsäure und Kaffeesäure war der Verbrauch von Kaffeesäure sogar am schnellsten. Dies könnte vor allem an der Sensitivität der Methode liegen. Die Antioxidantienkonzentrationen waren sehr gering, die Kupferkonzentration hingegen aber sehr hoch. Dies führt zu einem schnellen Verlust der Antioxidantien. Eine niedrigere Kupferkonzentration wäre bei diesem Versuchsansatz von Vorteil gewesen, die Antioxidantien wären dann weniger schnell verbraucht worden und der Verlauf wäre besser nachvollziehbar gewesen.

Synergistische Wirkungen konnten bei Kombination von Quercetin und α -Tocopherol (Fuhrman und Aviram, 2001, Rice-Evans und Miller, 1998) oder Kaffeesäure und α -Tocopherol (Laranjinha und Cadenas, 1999) (vergleiche 4.1), nicht beobachtet werden. Bei Kombination von Quercetin und Kaffeesäure konnte eine deutliche Verzögerung des Kaffeesäureverbrauchs festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte möglicherweise den in Studie 1 und 3 beobachteten Synergieeffekt von Quercetin und Kaffeesäure erklären, eventuell wird Kaffeesäure während kupfer-induzierter Oxidation durch Quercetin geschützt. Außerdem konnte bei Kombination aller vier Antioxidantien ein gewisser Spareffekt auf die einzelnen Antioxidantien beobachtet werden.

α -Tocopherol als lipophiles Antioxidans wurde bei vorliegender Untersuchung zu einer wässrigen LDL-Präparation gegeben. Diese unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften erschweren eine Aufnahme von α -Tocopherol in die LDL. Es war bei dieser Versuchsanordnung davon auszugehen, dass das α -Tocopherol kaum in die LDL aufgenommen wird (vergleiche 4.1). Bei vorliegender Untersuchung wäre es hilfreich gewesen, das Plasma vor Isolation der LDL mit α -Tocopherol anzureichern. Dann wäre das α -Tocopherol in der LDL-Präparation wahrscheinlich wirklich an die LDL gebunden gewesen.

4.3 Studie 3: Vergleich des Synergieeffekts von Quercetin und Kaffeesäure mit der Wirkung strukturverwandter Substanzen auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Mit Hilfe dieser Studie sollte der bei einer vorangegangenen Untersuchung (Studie 1) beobachtete Synergieeffekt von Quercetin und Kaffeesäure bei Inkubation der LDL untersucht werden; speziell sollte der Einfluss der chemischen Struktur der getesteten Substanzen auf deren antioxidative Aktivität bei der Hemmung der kupfer-induzierten LDL-Oxidation ermittelt werden. Neben Quercetin und Kaffeesäure wurden strukturverwandte Substanzen getestet, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abb. 61). Es sollte geklärt werden, ob auch durch die Kombination dieser Substanzen eine synergistische Hemmung der LDL-Oxidation erreicht wird.

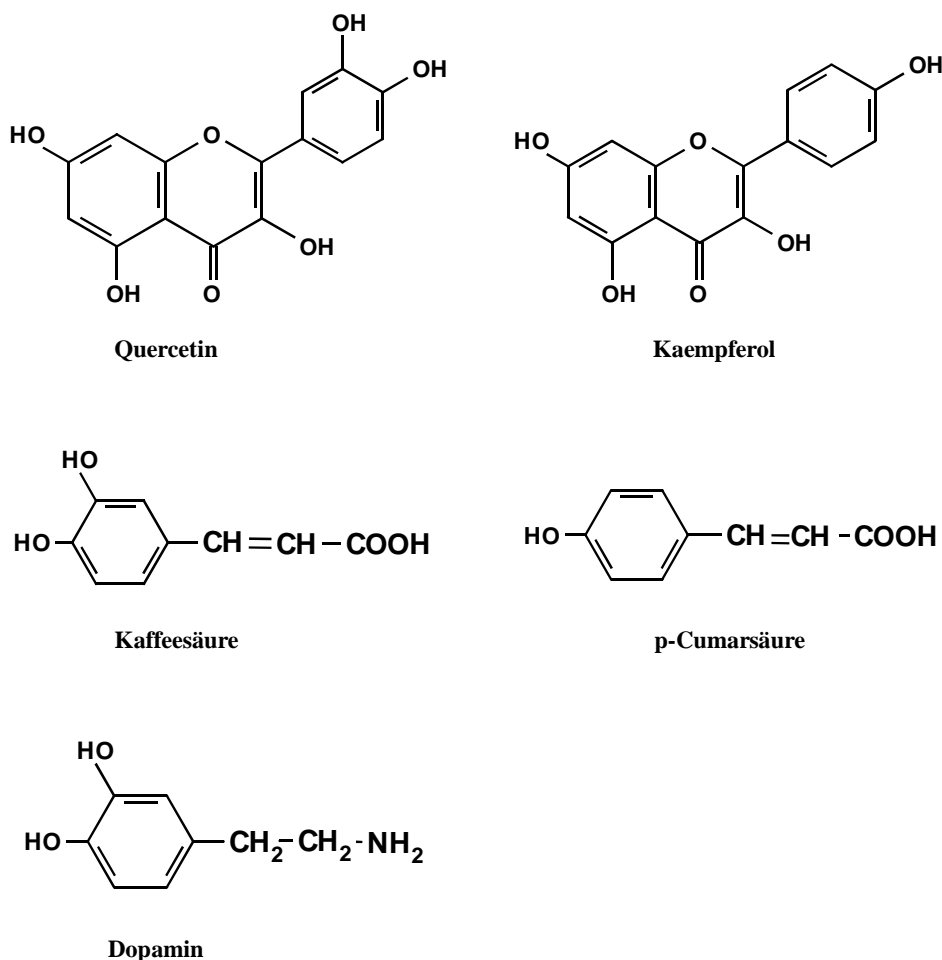


Abb. 61: Darstellung der chemischen Struktur der in Studie 3 getesteten Substanzen

Hydroxyzimtsäuren stellen zentrale Verbindungen bei der Biosynthese der Polyphenole in der Pflanze dar. Der „Shikimate-Pathway“ beinhaltet unter anderem den Stoffwechsel von L-Phenylalanin, das durch ein Enzym zur trans-Zimtsäure umgewandelt wird. Durch Hydroxylierung an Position 4 des aromatischen Rings entsteht p-Cumarsäure und durch weitere Hydroxylierung an Position 3 Kaffeesäure. Der A-Ring der Flavonoide wird durch drei Einheiten Malonyl-CoA geformt. Das erste Zwischenprodukt ist ein Chalkon, das weiter isomerisiert wird zu den entsprechenden Flavonoiden (Rechner et al., 2001). Daraus ergibt sich für Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren eine ähnliche chemische Struktur.

Struktur-Wirkungsbeziehung

Wie zu erwarten war, hatten die getesteten Substanzen unterschiedliche antioxidative Aktivität. Die Fähigkeit einer Substanz als Radikalfänger zu wirken, hängt stark von der Struktur und den Substituenten des heterozyklischen und des B-Rings ab (Bors et al., 1990). Auch bei der vorliegenden Untersuchung konnte ein starker Einfluss der chemischen Struktur der Substanzen auf ihre antioxidative Wirkung beobachtet werden.

Quercetin hatte den stärksten Effekt auf die Hemmung der LDL-Oxidation bei den Einzelsubstanzen und bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 1053 %, bezogen auf die Kontrolle. Quercetin und Kaempferol haben bis auf die bei Kaempferol fehlende ortho-Dihydroxystruktur (Catecholstruktur) eine identische Struktur. Dieser kleine strukturelle Unterschied hatte aber eine starke Auswirkung auf die antioxidative Wirkung; Kaempferol hatte eine wesentlich niedrigere antioxidative Aktivität (286 %) als Quercetin.

Kaffeesäure zählt zu den Hydroxyzimtsäuren und besitzt ebenfalls eine ortho-Dihydroxystruktur und eine laterale Doppelbindung, in Konjugation mit einer Carbonylgruppe und dem Phenolrest. Die Inkubation der LDL mit Kaffeesäure bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 730 % im Vergleich zur Kontrolle.

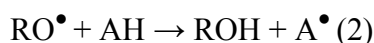
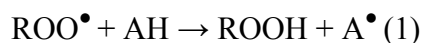
Durch Hydroxylierung wird bei der Flavonoidbiosynthese in Pflanzen aus p-Cumarsäure die Kaffeesäure gebildet (Rechner et al., 2001). Bei p-Cumarsäure fehlt also im Vergleich zu Kaffeesäure die Dihydroxystruktur am Phenolrest. Diese funktionelle Gruppe scheint aber für die antioxidative Aktivität von ganz entscheidender Bedeutung zu sein, denn die Inkubation von LDL mit p-Cumarsäure hatte keinen Einfluss auf die lag-phase von LDL, verglichen mit der Kontrolle.

Die Hydroxyzimtsäuren, im speziellen Kaffeesäure, sind den Katecholaminen sehr ähnlich. In sympathischen Neuronen wird Tyrosin durch Hydroxylierung zu L-Dopa umgewandelt, das selbst wiederum enzymatisch zu Dopamin decarboxyliert wird. Dopamin besitzt ebenfalls eine Dihydroxyphenylstruktur (Rice-Evans et al., 1996). Der strukturelle Unterschied zwischen Dopamin und Kaffeesäure ist, dass Dopamin keine ungesättigte Carbonseitenkette besitzt, und die Carbonylgruppe von Kaffeesäure ist bei Dopamin durch eine Aminogruppe ersetzt. Dopamin bewirkte eine Verlängerung der lag-phase von LDL um 606 %.

Eine synergistische Wirkung auf die Verlängerung der lag-phase von LDL konnte nur bei Kombination von 1 μM Quercetin und 1 μM Kaffeesäure beobachtet werden. Die Verlängerung der lag-phase lag mit 2190 % über der Summe der Einzeleffekte. Die Inkubation von LDL mit 2 μM Quercetin oder 2 μM Kaffeesäure verlängerte die lag-phase um 1447 bzw. 1047 %. Bei Einsatz von Quercetin oder Kaffeesäure in einer Konzentration von 2 μM konnte also kein additiver Effekt, bezogen auf die Wirkung von 1 μM , beobachtet werden. Dies lässt bei Kombination von Quercetin und Kaffeesäure auf eine echte synergistische Wirkung schließen. Und es ist auszuschließen, dass dieser Effekt durch eine Gesamtkonzentration von 2 μM (Quercetin + Kaffeesäure) verursacht wird. Vielmehr ist der synergistische Effekt von Quercetin und Kaffeesäure während kupfer-induzierter LDL-Oxidation ein Hinweis auf die Ergänzung der antioxidativen Mechanismen beider Substanzen. Bei Inkubation von LDL mit einer Kombination von Quercetin und Dopamin (1245 %) war die antioxidative Aktivität geringer, als durch Addition der Einzelsubstanzeffekte zu erwarten gewesen wäre. Die Kombination von Quercetin mit p-Cumarsäure hatte keinen Effekt auf die Verlängerung der lag-phase (1041 %) von LDL, verglichen mit dem Einzeleffekt von Quercetin. Auch bei Kombination von Kaffeesäure und Kaempferol konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden (917 %). Die Verlängerung der lag-phase der LDL lag bei dieser Kombination unter der Summe der Einzeleffekte.

Wirkung als Radikalfänger

Phenolische Antioxidantien (AH) greifen in die Lipidperoxidation ein, indem sie Elektronen oder Wasserstoffatome an Lipidradikale (ROO^\bullet , RO^\bullet) abgeben (Reaktion 1 und 2) (Shahidi und Wanasundara, 1992, Rice-Evans et al., 1996).



Das bei der Reaktion zwischen einem Lipidradikal und einem Phenol gebildete Phenoxyradikal wird durch die Wanderung eines ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring stabilisiert (Abb. 62).

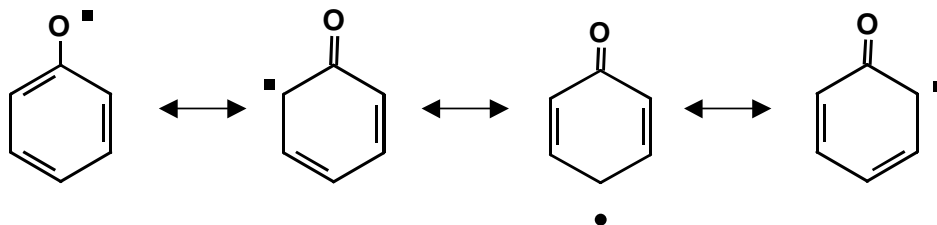


Abb. 62: Stabilisierung des Phenoxyradikals durch die Delokalisierung des ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring (Shahidi und Wanasundara, 1992)

Bedeutung der Substituenten

Das Phenol an sich ist nicht antioxidativ wirksam, eine antioxidative Wirkung wird erst durch die Substitution mit Hydroxy- oder Alkylgruppen erreicht (Shahidi und Wanasundara, 1992). Die antioxidative Aktivität von Polyphenolen wird definiert durch die Anwesenheit von ortho-Dihydroxy-Substituenten, die eine maximale Radikalstabilisierung oder Metallkomplexierung gewährleisten und hängt von der Anzahl der Hydroxygruppen im Molekül ab. Außerdem wird die antioxidative Aktivität durch die sterische Hinderung erhöht, ebenso wie die Möglichkeiten zur Elektronenabgabe und -aufnahme der Substituenten des Phenylrests (Castelluccio et al., 1995). So besitzt Kaffeesäure durch die Catecholstruktur eine höhere antioxidative Aktivität als p-Cumarsäure (nur eine Hydroxygruppe) oder Ferulasäure (Hydroxy- und Methoxygruppe) (Cartron et al., 2001).

Eine Voraussetzung für die Reaktivität gegenüber Lipidradikalen sind Alkylgruppen in ortho- oder para-Position zu den Hydroxygruppen am Phenolrest. Durch den elektronenschiebenden Effekt der Alkylgruppen wird die Elektronendichte und die Reaktivität gegenüber Lipidradikalen erhöht (Shahidi und Wanasundara, 1992).

Die Stabilität des Phenoxyradikals ist erhöht durch Substituenten in ortho-Stellung. Diese Substituenten erweitern die räumliche Behinderung in der Region des Radikals und reduzieren so die Rate der möglichen Propagationsreaktionen.

Die Einführung einer zweiten Hydroxygruppe in ortho- oder para-Stellung zur ersten Hydroxygruppe erhöht die antioxidative Aktivität eines Phenols (Shahidi und Wanasundara,

1992). In wässriger Phase ist die Anzahl der Hydroxygruppen am Molekül von Bedeutung; drei und weniger Hydroxygruppen haben eine geringe oder keine antioxidative Wirkung und mehr als sechs bringen nur ausnahmsweise eine Steigerung. Das Optimum liegt also bei vier bis sechs Hydroxygruppen (Böhm et al., 1998). Wichtig erscheint die Position dieser Substituenten. Ihre Anordnung in 3'- und 4'-Stellung des B-Ringes ist häufig mit einer relativ starken Fähigkeit zum Abfangen freier Radikale verbunden. Dies gilt sowohl für Flavonol-Aglykone wie auch für Anthocyanidine, also vor allem für Quercetin und Cyanidin. Demnach hängt die Mitwirkung des C-Rings nicht nur von der 2,3-Doppelbindung ab, sondern allgemein von einem ungesättigten Charakter, der eine Elektronenwanderung erlaubt (Böhm et al., 1998).

Die Fähigkeit der Polyphenole, durch Abgabe von Wasserstoffatomen radikalische ROS abzufangen, stellt den Schwerpunkt ihrer antioxidativen Aktivitäten dar. Unter verschiedensten Versuchsbedingungen konnte bestätigt werden, dass Flavonole und Flavone wirkungsvolle Fänger von Hydroxylradikalen, Superoxidanionen und Peroxylradikalen sind (Cao et al., 1997, Robak and Gryglewski, 1988, Bors et al., 1990, Salah et al., 1995).

Die wesentlichen strukturellen Voraussetzungen für die antioxidative Aktivität sind orthoständige Hydroxygruppen des B-Rings, die 2,3-Doppelbindung des C-Rings in Verbindung mit der Carbonylgruppe am C-Atom 4 und deren Wechselwirkung mit benachbarten Hydroxygruppen (Böhm et al., 1998) (Croft, 1998). Das Ziel der Radikale ist die Catecholgruppe (Laranjinha et al., 1994). Auch Bors et al. (1990) haben bestätigt, dass Flavonole als Radikalfänger wirken. Aber nur Substanzen, die eine Catecholstruktur besitzen, sind in der Lage, sehr stabile Phenoxyradikale zu bilden. Dagegen wird die Oxidationsreaktion durch die Entstehung eines reaktiven Phenoxyradikals beschleunigt. Die Catecholstruktur trägt also durch die Beteiligung an der Elektronendelokalisation zur Stabilität des Phenoxyradikals bei (Laranjinha et al., 1994).

Auch Phenolsäuren, die nicht zur Gruppe der Flavonoide gehören, können aber dennoch sehr wirksame Antioxidantien darstellen, speziell diejenigen Substanzen, die ebenfalls eine Catecholstruktur besitzen, wie beispielsweise Kaffeesäure (Croft, 1998). Diphenole wie Kaffeesäure haben eine höhere Fähigkeit zum Radikalscavenging als Monophenole wie p-Cumarsäure (Castelluccio et al., 1995).

Neben der Catecholgruppe haben aber auch die Substituenten der Seitenkette bei Phenolsäuren einen Einfluss auf die antioxidative Aktivität. Eine konjugierte Doppelbindung in der Seitenkette eines Catechols, wie bei der Kaffeesäure, trägt maßgeblich zur Stabilisierung des

Phenoxyradikals bei (Laranjinha et al., 1994). Das erklärt die bei der Kaffeesäure beobachtete hohe antioxidative Wirkung bei der kupfer-induzierten LDL-Oxidation. Quercetin und auch Kaffeesäure sind also in der Lage, nach einer Oxidation sehr stabile Phenoxyradikale zu bilden. Kaempferol, p-Cumarsäure und Dopamin bilden aufgrund ihrer chemischen Struktur Radikale, die wahrscheinlich weit weniger stabil sind.

Die synergistische Wirkung bei Kombination von Quercetin und Kaffeesäure in der vorliegenden Untersuchung kann mit der Stabilität ihrer entstehenden Radikale zusammenhängen. Außerdem war zu beobachten, dass die Catecholstruktur einen größeren Einfluss auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation besitzt, als die ungesättigte Seitenkette. Es konnte gezeigt werden, dass Dopamin (Catecholstruktur) eine hohe antioxidative Wirkung besitzt, p-Cumarsäure ohne Catecholstruktur aber mit einer ungesättigten Seitenkette hatte in der eingesetzten Konzentration keine Wirkung auf die Verlängerung der lag-phase. Kaffeesäure besitzt sowohl eine Catecholstruktur, als auch eine ungesättigte Seitenkette und hatte eine höhere antioxidative Aktivität als Dopamin und p-Cumarsäure.

Komplexbildung mit freien Metallionen

Bei einer Untersuchung von Brown et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass die Phenole, die die stärkste Neigung für eine Komplexierung von Kupferionen besitzen, auch den stärksten Effekt auf die LDL-Oxidation hatten. Kaempferol, welches keine Catecholstruktur besitzt, war weniger effektiv und zeigte nur minimale Affinität gegenüber Kupferionen im Vergleich zu Quercetin (Brown et al., 1998).

Die 3',4'-Dihydroxysubstitution des B-Rings ist wichtig für die Kupfer-Komplexierung und beeinflusst die antioxidative Aktivität. Die Anwesenheit einer 3-Hydroxygruppe in der Flavonoidstruktur erhöht außerdem die Oxidationsneigung von Quercetin und Kaempferol; Substanzen, denen die 3-Hydroxygruppe fehlt (z.B. Rutin), oxidieren nicht so bereitwillig in der Anwesenheit von Kupferionen (Brown et al., 1998).

Bei den Flavonoiden stellen die Catecholstruktur des B-Rings, die 3-Hydroxygruppe in Verbindung mit der 4-oxo-Gruppe des C-Rings und die 4-oxo-Gruppe und die 5-Hydroxygruppe des C-Rings Metallbindungsstellen dar (Abb. 63). Den größten Beitrag zur Chelatbildung von Metallen erbringt allerdings die Catecholstruktur des B-Rings (Pietta, 2000).

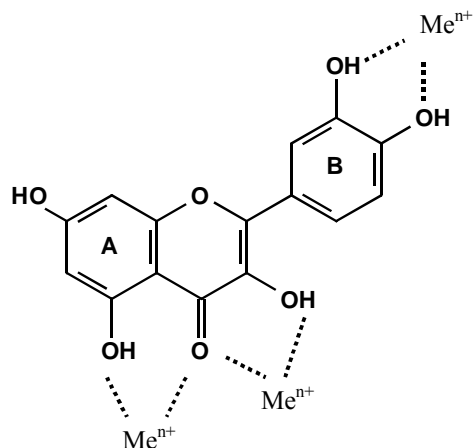


Abb. 63: Bindungsstellen für Übergangsmetalle bei Flavonoiden (Pietta, 2000)

Bei Kaffeesäure können zwei Mechanismen für die antioxidative Wirkung bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation verantwortlich gemacht werden. Dies ist zum einen die Komplexierung von Kupferionen und zum anderen das Abfangen von Alkoxyradikalen ($\text{RO}\cdot$). Nach Nardini et al. (1995) reagiert 1 Mol Kaffeesäure mit 1 Mol Cu^{2+} . Der entstehende Kupfer-Kaffeesäure-Komplex ist allerdings nicht stabil. Kupferionen scheinen die Oxidation von Kaffeesäure über einen Elektronentransfer von Kaffeesäure zu Sauerstoff zu katalysieren, wobei ein Quinon der Kaffeesäure gebildet wird (Abb. 64).

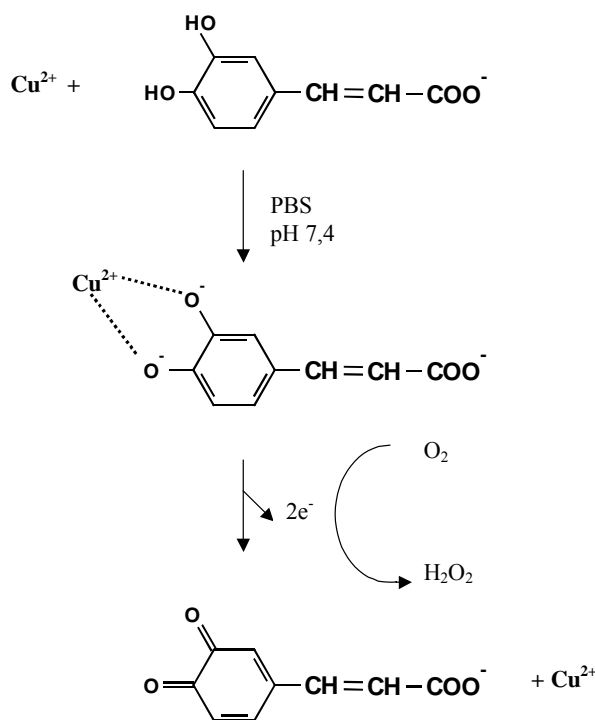


Abb. 64: Allgemeines Schema der Oxidation von Kaffeesäure durch Kupferionen (Nardini et al., 1995)

Wirkung als Radikalfänger

Laranjinha et al. (1994) konnten bei der AAPH-induzierten LDL-Oxidation zeigen, dass Kaffeesäure in der Lage ist, Peroxylradikale in einer wässrigen Lösung zu beseitigen. Der Vorteil der AAPH-induzierten LDL-Oxidation ist, dass eine Reaktion von Kupferionen mit dem Antioxidans ausgeschlossen werden kann. Durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms konnte eine Initiierung der Kettenreaktion verhindert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ließen vermuten, dass es an der Oberfläche der LDL zu Reaktionen zwischen Phenolsäuren und Lipidperoxylradikalen kommt. Phenolsäuren beseitigen Peroxylradikale an der Oberfläche der LDL und verhindern so eine Oxidation. Außerdem scheint Kaffeesäure in der Lage zu sein, α -Tocopherol an der Oberfläche der LDL zu regenerieren. Bei der Kaffeesäure wird der Radikalcharakter auf die konjugierte Doppelbindung der Seitenkette übertragen, und es entsteht ein Alkylquinonradikal. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Stabilisierung des Radikals und zu einer erhöhten antioxidativen Aktivität.

Bei einer Studie von Vieira et al. (1998) wurde der Einfluss von Kaffeesäure und p-Cumarsäure auf die Ferrylmyoglobin-induzierte LDL-Oxidation untersucht. Kaffeesäure (2 μ M) und p-Cumarsäure (12 μ M) hatten eine ähnliche antioxidative Aktivität bei der Hemmung der LDL-Oxidation. Wurden die beiden Antioxidantien kombiniert, so unterschied sich die Hemmung nicht signifikant von der Summe der Einzelsubstanzeffekte. Auch bei der vorliegenden Untersuchung konnte beobachtet werden, dass Kaffeesäure eine höhere antioxidative Aktivität als p-Cumarsäure aufweist, obwohl die Antioxidantien chemisch sehr ähnlich sind. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Kaffeesäure aufgrund der ortho-Dihydroxystruktur ein stärkerer Radikalfänger als p-Cumarsäure ist (Laranjinha et al., 1994), und das Semiquinonradikal der Kaffeesäure wesentlich stabiler ist, als das Radikal der p-Cumarsäure (Bors et al., 1990).

Laranjinha et al. (1995) konnten durch ihre Untersuchung zeigen, dass sowohl Kaffeesäure als auch p-Cumarsäure in der Lage ist, LDL vor Ferrylmyoglobin-induzierter Oxidation zu schützen. Beide Antioxidantien konnten einen Abbau der ungesättigten Fettsäuren im LDL verhindern. Jedoch war Kaffeesäure wirksamer als p-Cumarsäure; 6 μ M Kaffeesäure entsprachen einer Konzentration von 36 μ M p-Cumarsäure beim Schutz der LDL vor Oxidation (Laranjinha et al., 1995). Dies lässt vermuten, dass bei vorliegender Untersuchung eine Konzentration von 1 μ M

p-Cumarsäure zu niedrig war, um eine antioxidative Wirkung bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation zu erzielen.

Ob Flavonoide einen Radikalangriff abwehren können, hängt von dem Reduktionspotential ihrer Radikale ab. Um als Antioxidantien zu wirken, dürfen die Radikale der Flavonoide nicht mit Sauerstoff reagieren und dabei Peroxylradikale oder Singulett-Sauerstoff bilden, die dann wiederum den oxidativen Prozess beschleunigen würden (Jovanovic et al., 1998).

Sowohl Quercetin als auch Kaempferol sind für ihre Eigenschaft als Radikalfänger bekannt; jedoch ist das Aroxyradikal von Quercetin wesentlich stabiler als das von Kaempferol (Brown et al., 1998). Substanzen, die nur eine 4'-Hydroxygruppe im B-Ring besitzen sind weniger wirksame Antioxidantien, wobei der Mechanismus möglicherweise die Bildung eines weniger stabilen Phenoxyradikals ist (Rice-Evans et al., 1996). Kaempferol, ein Flavonol mit einer 4'-Hydroxygruppe am B-Ring, hat jedoch eine relativ hohe Aktivität verglichen mit anderen Monohydroxysubstanzen. Grund dafür ist wahrscheinlich die Konjugation zwischen der 4'-Hydroxygruppe und der 3-Hydroxygruppe über den konjugierten C-Ring (Sekher et al., 2001).

Anordnung im LDL-Modell

Der günstige Effekt bei Kombination von natürlichen Antioxidantien könnte mit den unterschiedlichen physiochemischen Eigenschaften der verschiedenen Antioxidantien zusammenhängen (Fuhrman et al., 2000, Fuhrman et al., 1997). Untersuchungen zeigten, dass die Inkubation der LDL mit einer Kombination von Lycopin und Vitamin E eine synergistische antioxidative Wirkung auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation hatte. Diese Ergänzungswirkung wurde erklärt mit der Lokalisation der Antioxidantien in den LDL. Lycopin befindet sich im Inneren des Lipidkerns der LDL, wohingegen sich Vitamin E in der Hülle der LDL nahe der Membranoberfläche befindet (Cartron et al., 2001).

Flavonoide sind Antioxidantien mit einem lipophilen als auch hydrophilen Charakter, sie sind jedoch hydrophiler als beispielsweise α -Tocopherol. Sie sind in der Hülle der LDL lokalisiert und können Radikale aus der wässrigen Lösung abfangen und den Verbrauch von α -Tocopherol verhindern (Sanchez-Moreno et al., 2000).

Auch die antioxidative Aktivität der Kaffeesäure steht in Bezug mit der Position im LDL-System. Kaffeesäure befindet sich in der Grenzschicht und kann so bei der LDL-Oxidation entstehende Tocopheroxylradikale regenerieren (Laranjinha und Cadenas, 1999). Das Radikal der

Kaffeensäure kann wiederum von Elektronendonatoren in der wässrigen Phase, wie Ascorbinsäure, regeneriert werden (vergleiche 4.1).

Kaffeensäure ist in der Lage α -Tocopherol auf der Oberfläche der LDL zu regenerieren, wohingegen p-Cumarsäure den Verbrauch von α -Tocopherol beschleunigt (Laranjinha et al., 1995). Das Phenoxyradikal der p-Cumarsäure besitzt eine hohe Reaktivität gegenüber α -Tocopherol.

Die antioxidative Aktivität der Flavonoide und Phenolsäuren in bezug auf die LDL-Oxidation beruht also sowohl auf der Lokalisation im LDL-Partikel als auch auf der chemischen Struktur.

Der Schutz von LDL vor kupfer-induzierter oder radikal-induzierter Oxidation durch Polyphenole ist abhängig von deren Anordnung in den wässrigen und lipophilen Kompartimenten im Plasma und in den LDL und auch von der physikalischen Lokalisation der freien Radikale. Die Flavonoide besitzen sowohl lipophile als auch hydrophile Anteile und so können sie auch gegen freie Radikale, sowohl im lipophilen als auch im hydrophilen Milieu, eingreifen.

Antioxidantien, die im Plasma, aber nicht in den LDL nachgewiesen werden können, könnten die LDL vor Oxidation schützen, indem sie im wässrigen Milieu wirken, das die LDL umgibt (Fuhrman und Aviram, 2001).

Bei der vorliegenden Untersuchung könnte die synergistische antioxidative Aktivität bei Kombination von Quercetin und Kaffeensäure mit der hohen Stabilität der gebildeten Radikale zusammenhängen. Die durch die anderen Antioxidantien gebildeten Radikale sind weit weniger stabil als die von Quercetin oder Kaffeensäure.

Bei Kombination von 0,5 μ M Quercetin und 0,5 μ M Kaffeensäure konnte keine synergistische Wirkung beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Kaffeensäure bei einer Konzentration von 0,5 μ M prooxidative Wirkung besitzt, die allerdings durch die Komplexbildung der Kupferionen durch Quercetin aufgehoben wird. Bei einer Konzentration von 1 μ M könnte dann die antioxidative Wirkung überwiegen. Fukumoto und Mazza (2000) konnten bei ihrer Untersuchung feststellen, dass die meisten Phenole bei niedrigen Konzentrationen eine prooxidative Aktivität besaßen und diese mit steigender Konzentration zunahm. Ab einer bestimmten Konzentration allerdings überwog dann die antioxidative Aktivität der Substanzen.

Kaffeensäure besitzt diejenigen chemischen Strukturen, die für die antioxidativen Eigenschaften bei Flavonoiden verantwortlich gemacht werden. So weist Kaffeensäure ebenfalls eine ortho-Dihydroxystruktur (Abb. 65) auf, die Angriffsstelle für Radikale, die bei der Delokalisierung von Elektronen des Phenoxyradikals mitwirkt. Außerdem hat Kaffeensäure eine laterale Doppelbindung, in Konjugation mit einer Carbonylgruppe und dem Phenolrest, was eine weitergehende Stabilisierung des Phenoxyradikals erlaubt (Laranjinha und Cadenas, 1999). In Abb. 65 wird noch einmal deutlich, wie sehr sich Quercetin und Kaffeensäure in ihrer chemischen Struktur ähnlich sind.

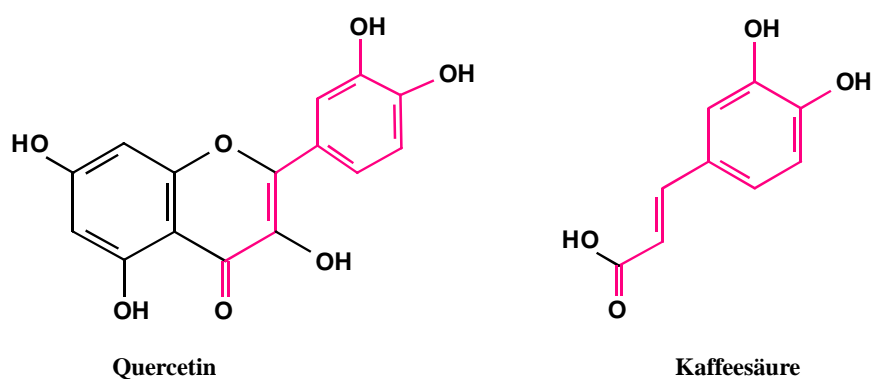


Abb. 65: Darstellung der chemischen Struktur von Quercetin und Kaffeensäure

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass von den getesteten Antioxidantien Quercetin und Kaffeensäure eine sehr hohe antioxidative Aktivität gegenüber LDL-Oxidation besitzen. Kaempferol ist ebenfalls ein Chelatbildner gegenüber Metallionen, jedoch ist diese Eigenschaft durch das Fehlen der Catecholstruktur weniger ausgeprägt als bei Quercetin.

p-Cumarsäure (1 μM) hatte keinen Einfluss auf die lag-phase von LDL; dies lässt sich durch das Fehlen der Catecholstruktur erklären. Dopamin besitzt die Eigenschaft, Übergangsmetalle zu komplexieren. Im Vergleich zu Kaffeensäure bildet Dopamin allerdings ein weniger stabiles Radikal, weil die ungesättigte Seitenkette fehlt.

Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Antioxidantien, trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit, unterschiedliche antioxidative Wirkungen und Mechanismen besitzen. Und auch bei Kombination verschiedener Antioxidantien konnten unterschiedlich starke Effekte

beobachtet werden. Die Antioxidantien scheinen sich also teilweise in ihrer Wirkung zu ergänzen und zu verstärken, andere wiederum wirken wohl eher antagonistisch.

Die antioxidative Wirkung bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation hängt sehr stark von den strukturellen Eigenschaften der unterschiedlichen Substanzen ab. Die chemische Struktur beeinflusst die Komplexierung von Kupferionen, die Anordnung im LDL-System in der wässrigen Phase und der lipophilen Umgebung des LDL-Partikel und die antioxidativen Eigenschaften bezüglich Wasserstoffabgabe.

Die antioxidative Wirkung von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren darf nicht isoliert betrachtet werden, da diese Substanzen auch in der Nahrung nur in Kombination mit anderen Antioxidantien auftreten.

Die Supplementierung einer Kombination mehrerer Antioxidantien, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung ergänzen, könnte eine günstigere Auswirkung haben als einzelne Substanzen. Die Kombination von lipophilen und hydrophilen Antioxidantien könnte verschiedene Oxidationsreaktionen in vivo beeinflussen und so einen erhöhten Schutz gegenüber LDL-Oxidation bieten. Jedoch werden weitere Untersuchungen benötigt, um die Wechselwirkung verschiedener Antioxidantien zu klären, bevor für sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide oder Hydroxyzimtsäuren Zufuhrempfehlungen ausgesprochen werden können.

Vorinkubation von Plasma mit Quercetin und Kaffeesäure

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Flavonoide und Phenolsäuren in der Lage sind die Oxidation von LDL zu verzögern oder verhindern (Rice-Evans et al., 1995, Viana et al., 1996, Sanchez-Moreno et al., 2000). Jedoch gibt es nur wenig Information über die Lokalisation dieser Antioxidantien im LDL-Modell.

Bei vorliegender Untersuchung konnten Kaffeesäure und Quercetin nach Isolation und Dialyse der LDL in den LDL-Präparationen nachgewiesen werden. Es ist jedoch unklar ob die Antioxidantien tatsächlich an die LDL gebunden waren.

Die Verlängerung der lag-phase nach Vorinkubation von Plasma mit Kaffeesäure und Quercetin könnte auch durch den Schutz und die Regeneration von α -Tocopherol während der Isolation bedingt sein. Kontroll-LDL ohne Zusatz von Kaffeesäure oder Quercetin würde demnach weniger endogenes α -Tocopherol besitzen, hätte somit auch eine niedrigere antioxidative Kapazität und eine kürzere lag-phase als LDL, das mit Kaffeesäure und/oder Quercetin vorinkubiert ist.

Scheek et al. (1995) untersuchten, wie sich die Dialyse der isolierten LDL auf die Antioxidantienkonzentrationen und auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation auswirkt. Sie konnten dabei während der Entfernung von EDTA aus den LDL-Präparationen einen signifikanten Verlust von α -Tocopherol feststellen. Nach einer Dialysezeit von 22 Stunden war weniger als die Hälfte der α -Tocopherolkonzentration in nativem LDL vorhanden und es konnte eine Verkürzung der lag-phase beobachtet werden.

Auch Carbonneau et al. (1998) und Cartron et al. (2001) stellten fest, dass Phenole und Phenolsäuren wie Kaffeesäure oder Ferulasäure sehr leicht während Dialyse von den LDL dissoziiert werden. Die eher hydrophilen Eigenschaften dieser Substanzen lassen eine lockere Bindung an die LDL vermuten.

Es müsste also angenommen werden, dass bei vorliegender Untersuchung der Gehalt an Antioxidantien nach einer Dialysezeit von 16 Stunden bereits sehr stark abgenommen hat, unabhängig davon ob die Substanzen nun an die LDL gebunden sind oder sich nur in der wässrigen Lösung befinden.

Ferulasäure besitzt eine ähnliche Struktur wie Kaffeesäure (vergleiche 4.1 und 4.4), die beiden Antioxidantien unterscheiden sich lediglich durch einen Substituenten am Phenolrest.

Kaffeensäure besitzt eine ortho-Dihydroxystruktur im Gegensatz zu Ferulasäure, bei der eine Hydroxygruppe methyliert ist.

Castelluccio et al. (1996) stellten bei ihrer Untersuchung fest, dass Ferulasäure nicht in der Lage war an den lipophilen Teil der LDL zu binden. Ihre Ergebnisse lassen eine nicht-spezifische Bindung von Ferulasäure an den Proteinanteil der LDL oder andere Plasmaproteine vermuten.

Laranjinha et al. (1994) dagegen vermuteten, dass Phenole wie Kaffeensäure zu einem bestimmten Grad fähig sind an die LDL zu binden.

Auch nach Aviram und Fuhrman (1998) sind einige Polyphenole in der Lage an LDL zu binden. LDL das mit Polyphenolen angereichert ist, ist resistenter gegenüber Oxidation.

Mäusen mit einem Mangel an Apolipoprotein E wurde Rotwein, Quercetin oder Catechin verabreicht, anschließend wurden LDL isoliert (Aviram und Fuhrman, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass LDL mit diesen Polyphenolen angereichert war. Die Polyphenole waren in der Lage über eine Etherbindung (R-O-R') an LDL zu binden. Die Oxidationsresistenz der LDL war gegenüber der Placebogruppe erhöht (Aviram und Fuhrman, 1998).

Die Ergebnisse von Covas et al. (2000) und Fito et al. (2000) ließen vermuten, dass Phenole aus Olivenöl wie Rutin in der Lage sind an LDL zu binden und so die antioxidative Kapazität der LDL zu erhöhen.

Diese Beobachtungen sind also nicht sehr einheitlich und weitere Untersuchungen müssen folgen um zu klären ob und wie Phenole in der Lage sind an die LDL zu binden.

4.4 Studie 4: Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Kaffeesäurederivate

Bisher wurde den einfachen Phenolsäuren, Derivate der Zimt- oder Benzoesäure, wenig Beachtung geschenkt. Aber gerade Hydroxyzimtsäurederivate sind die am häufigsten in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden Phenolsäuren und erhöhen damit die Bedeutung des Lebensmittels als nutritives Antioxidans (Natella et al., 1999). Während der Biosyntheseweg von Polyphenolen in der Pflanze bekannt ist, gibt es nur vereinzelt Informationen über den Stoffwechselweg dieser Substanzen nach Nahrungsaufnahme beim Menschen.

In einer Studie von Rechner et al. (2001) sollten Biomarker für die Bioverfügbarkeit und den Stoffwechsel von Hydroxyzimtsäurederivaten festgelegt werden. Die Pharmakokinetik und die Elimination der Metaboliten im Urin nach Kaffeekonsum wurden untersucht. Ferulasäure konnte dabei als Biomarker für die Absorption und den Stoffwechselweg von Kaffeesäure- und Ferulasäurederivaten aus Kaffee identifiziert werden. Isoferulasäure zeigte sich als spezifischer Biomarker für den Konsum von Lebensmitteln, die reich an Kaffeesäurederivaten sind.

Dihydroferulasäure und Vanillinsäure wurden als Metaboliten von Ferulasäure identifiziert, deren Ursprung Ester der Feruloylchinasäure und/oder Caffeyloylchinasäure im Kaffee sein könnten. Durch Methylierung entsteht aus Kaffeesäure Ferulasäure oder Isoferulasäure. Durch Reduktion wird Dihydroferulasäure und daraus wiederum durch β -Oxidation Vanillinsäure gebildet (Abb. 66).

Hippursäure und 3-Hydroxyhippursäure konnten als unspezifische Biomarker für die Absorption und den Stoffwechsel von Hydroxyzimtsäuren aus Kaffee ermittelt werden. Der Nachweis dieser Substanzen weist auf den Abbau der Hydroxyzimtsäurederivate durch die Mikroflora des Darms hin; die Hydroxyzimtsäuren werden in einfachere Phenole umgewandelt, die wiederum absorbiert und weiter umgewandelt werden (Abb. 66) (Rechner et al., 2001).

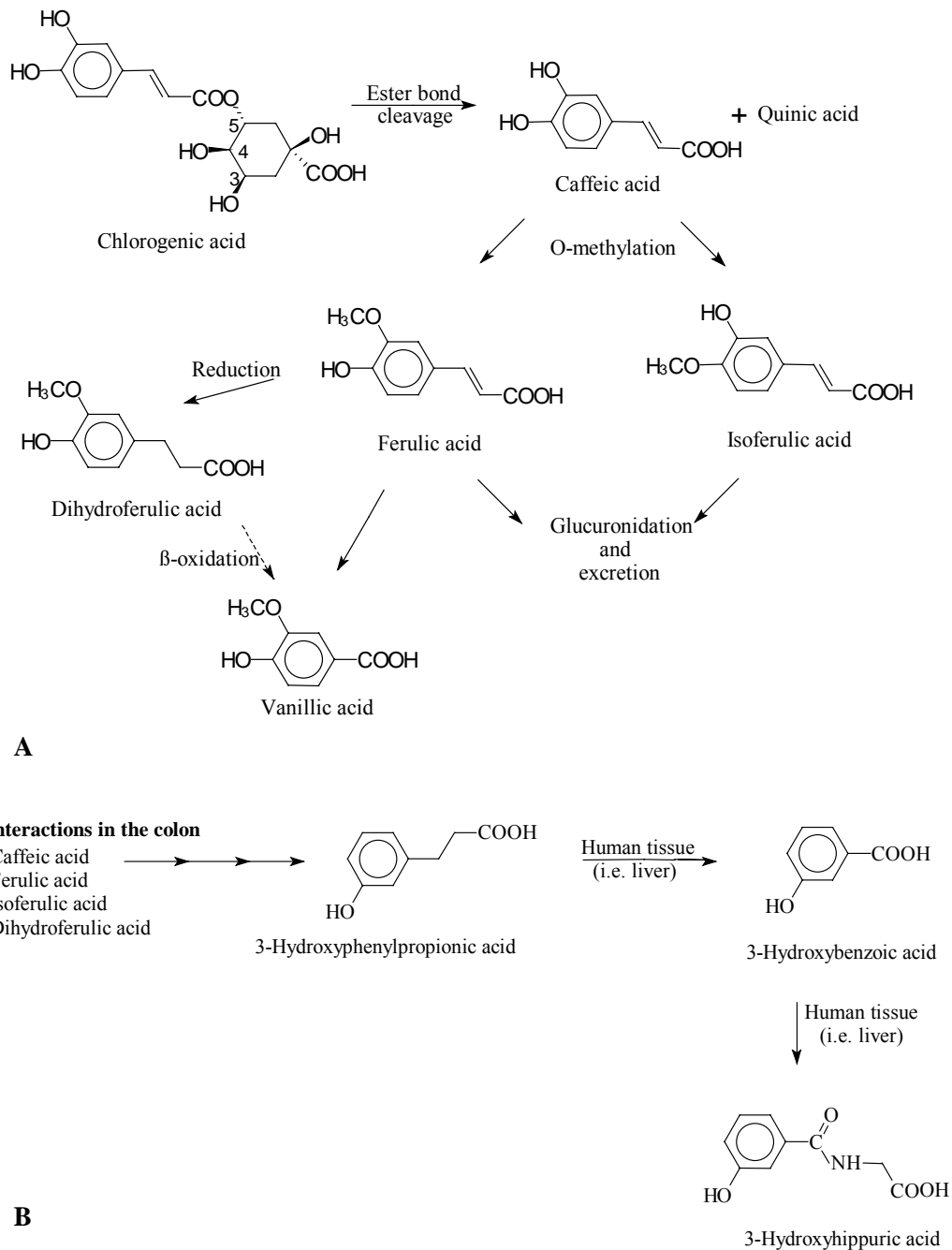


Abb. 66: (A) Möglicher Biosyntheseweg von Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroferulasäure und Vanillinsäure aus Chlorogensäure. (B) Möglicher Biosyntheseweg von 3-Hydroxyhippursäure aus Polyphenolen (Rechner et al., 2001)

Die vorliegende Studie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rechner et al. (2001) durchgeführt. Dabei sollten die im Urin nachgewiesenen Hydroxyzimtsäurederivate (Rechner et al., 2001) auf ihre antioxidative Wirksamkeit überprüft werden. In Abb. 67 sind die chemischen

Strukturen der Testsubstanzen dargestellt. Für 3-Hydroxyhippursäure wurde ersatzweise o-Hydroxyhippursäure verwendet, weil 3-Hydroxyhippursäure nicht verfügbar war.

Bei der hier vorliegenden Untersuchung konnte bei Inkubation der LDL mit Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure oder 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure keine Veränderung der lag-phase von LDL, in bezug auf die Kontrolle, während kupfer-induzierter Oxidation beobachtet werden. Der Verlauf der Dienkonjugation nach Inkubation der LDL mit einer der Testsubstanzen unterschied sich nicht signifikant vom Verlauf des Kontroll-LDL. Dabei hatte die Konzentration der Substanzen in einem Bereich von 1 bis 7,5 μM keinen Einfluss. Bei Vanillinsäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure konnten also weder antioxidative noch prooxidative Wirkungen beobachtet werden.

Ferulasäure wies sowohl antioxidative als auch prooxidative Wirkungen auf, die Aktivität war dabei konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 1 μM konnte eine Verkürzung der lag-phase um 15 % beobachtet werden, bei 2,5 μM betrug die Verkürzung 22 %. Wurde dagegen LDL mit 5 μM Ferulasäure inkubiert, konnte keine Veränderung der lag-phase in bezug auf die Kontrolle beobachtet werden; der Verlauf der Dienkonjugation von LDL inkubiert mit 5 μM Ferulasäure unterschied sich nicht vom Verlauf von Kontroll-LDL. Bei 7,5 μM Ferulasäure konnte eine antioxidative Aktivität beobachtet werden. Die Inkubation der LDL mit 7,5 μM Ferulasäure bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 40 % in bezug auf die Kontrolle.

Dihydroferulasäure und Isoferulasäure hatten bei dem hier verwendeten Versuchsansatz ausschließlich prooxidative Wirkung. Bei Inkubation der LDL mit Dihydroferulasäure oder Isoferulasäure konnte eine Verkürzung der lag-phase beobachtet werden. Wurden die LDL mit 1 μM Dihydroferulasäure inkubiert, konnte eine Verkürzung der lag-phase um 24 % festgestellt werden. Bei Einsatz einer höheren Konzentration verstärkte sich der prooxidative Effekt noch; es konnte aber kein signifikanter Unterschied innerhalb des Konzentrationsbereiches von 2,5 und 7,5 μM beobachtet werden, eine Inkubation der LDL mit 2,5, 5, oder 7,5 μM Dihydroferulasäure bewirkte eine Verkürzung der lag-phase um 34, 35 oder 31 %. Bei Inkubation der LDL mit Isoferulasäure konnte mit steigender Konzentration eine abnehmende Oxidationsresistenz der LDL festgestellt werden. Bei 1 μM verkürzte sich die lag-phase um 6 %, bei 2,5 μM um 10 %. Bei einer Konzentration von 5 μM wurde eine Abnahme der lag-phase um 12 % beobachtet und bei 7,5 μM sogar um 18 %.

o-Hydroxyhippursäure war die einzige Substanz in diesem Versuchsansatz, bei der durchgehend antioxidative Aktivitäten im Konzentrationsbereich von 1 bis 7,5 μM festgestellt werden

konnten. Eine Konzentration von 1 μM bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 8 % in bezug auf die Kontrolle. Bei 2,5 oder 5 μM konnte eine Verlängerung um 16 bzw. 23 % beobachtet werden. Wurden die LDL mit 7,5 μM o-Hydroxyhippursäure inkubiert betrug die Verlängerung sogar 33 %. Auch in diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung von Kaffeesäure (1 μM) getestet. Kaffeesäure war weit wirksamer als die anderen getesteten Substanzen und bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 233 %.

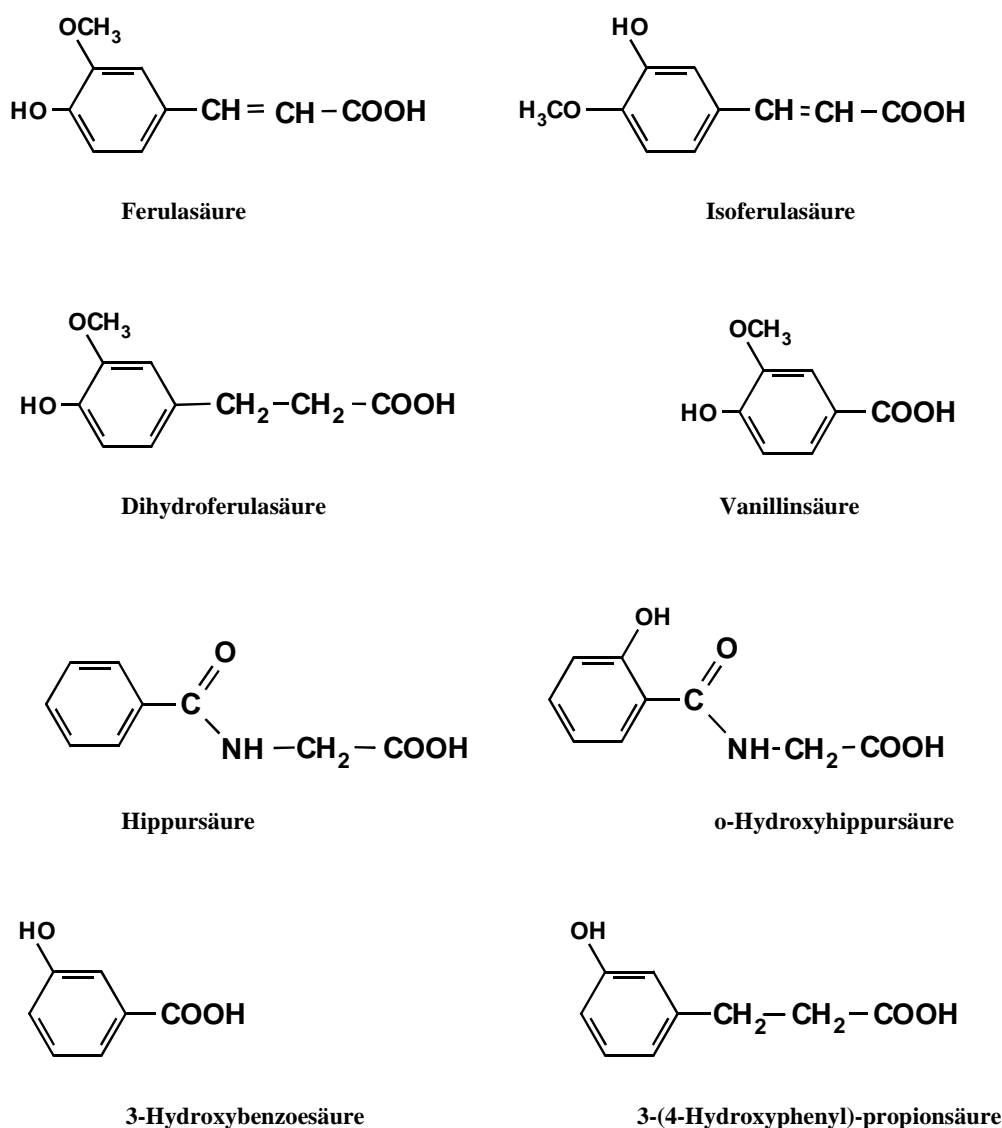


Abb. 67: Chemische Struktur der in Studie 4 getesteten Substanzen

Struktur-Wirkungsbeziehung

Die wesentlichen strukturellen Voraussetzungen für eine antioxidative Wirkung der Flavonoide sind orthoständige Hydroxygruppen des B-Rings, die Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 des C-Rings in Zusammenhang mit der Carbonylgruppe am C-Atom 4 und deren Wechselwirkung mit benachbarten Hydroxygruppen (Rice-Evans et al., 1996). Einen Hinweis auf die Bedeutung der 3-Hydroxygruppe an 4-oxo-Flavonoiden liefert der Vergleich zwischen Flavonen und Flavonolen. Luteolin hat bis auf die 3-Hydroxygruppe ein identisches Substitutionsmuster wie Quercetin, die antioxidative Aktivität beträgt allerdings weniger als die Hälfte des Quercetins (Böhm et al., 1998, Rice-Evans et al., 1996).

Auch o-Hydroxyhippursäure besitzt eine phenolische Hydroxygruppe und eine benachbarte Ketogruppe. Die antioxidative Wirkung bei Inkubation von LDL mit o-Hydroxyhippursäure während kupfer-induzierter LDL-Oxidation bei der hier vorliegenden Untersuchung beruht auf der Komplexbildung von Kupferionen durch die Hydroxy- und die Ketogruppe an zwei unterschiedlichen Ringen, die in peri-Position angeordnet sind (Hider et al., 2001).

Anstelle von 3-Hydroxyhippursäure wurde allerdings bei der vorliegenden Untersuchung o-Hydroxyhippursäure verwendet. Die antioxidative Wirkung von o-Hydroxyhippursäure darf aber nicht einfach auf 3-Hydroxyhippursäure übertragen werden. Die Eigenschaft zur Komplexbildung mit Metallen fehlt wahrscheinlich, weil die beiden funktionellen Gruppen bei 3-Hydroxyhippursäure nicht mehr benachbart sind.

Prooxidative Wirkung von Polyphenolen

Substanzen mit antioxidativer Aktivität können jedoch unter bestimmten Bedingungen auch prooxidatives Verhalten aufweisen (Fukumoto und Mazza, 2000). Eine prooxidative Aktivität kann eine Schädigung von Molekülen wie beispielsweise DNA oder Proteinen beschleunigen (Aruoma, 1994). Potentielle Antioxidantien sollten deswegen auch auf ihre prooxidativen Aktivitäten hin getestet werden.

Yamanaka et al. (1997) konnten für Kaffeesäure (1 μM) eine prooxidative Aktivität während kupfer-induzierter LDL-Oxidation beobachten, wenn Kaffeesäure erst während der Propagationsphase der Lipidperoxidation zugegeben wurde. Eine antioxidative Aktivität dagegen konnte beobachtet werden, wenn Kaffeesäure schon zu Beginn der Oxidationsreaktion vorhanden war.

Bei den hier vorliegenden Versuchsbedingungen verlängerte Kaffeesäure die lag-phase von LDL um 233 % und hatte somit eine antioxidative Wirkung. Kaffeesäure war wesentlich wirksamer als die getesteten Kaffeesäurederivate, was auf die chemische Struktur zurückgeführt werden kann. Durch die ortho-Dihydroxystruktur und eine laterale Doppelbindung in Konjugation mit einer Carbonylgruppe und dem Phenolrest wird die antioxidative Wirkung der Kaffeesäure definiert (Laranjinha und Cadenas, 1999) (vergleiche 4.1 und 4.3). Da Kaffeesäure bei der vorliegenden Untersuchung schon vor der Zugabe der Kupferionen vorhanden war, konnten eventuelle prooxidative Reaktionen verhindert werden.

Natella et al. (1999) untersuchten die antioxidative Aktivität von Benzoesäure- und Zimtsäurederivaten auf die kupfer- oder AAPH-induzierte LDL-Oxidation (200 μM Protein/ml LDL; 5 μM CuCl_2). Gemessen wurde unter anderem die Bildung konjugierter Diene und der Verbrauch von α -Tocopherol. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass die Zimtsäurederivate wirksamer waren als die entsprechenden Benzoesäurederivate. Die Doppelbindung in der Seitenkette trägt zur Stabilisierung des Phenoxyradikals bei und erhöht so die antioxidative Aktivität einer Substanz. Außerdem hat die Carboxylgruppe der Benzoesäurederivate einen negativen Einfluss auf die Abgabe eines Wasserstoffatoms des Phenolrests. Methoxygruppen oder die Catecholstruktur erhöhen die antioxidative Aktivität durch die zunehmende Stabilisierung des Phenoxyradikals.

Ferulasäure, Vanillinsäure und p-Hydroxybenzoesäure waren bei einer Konzentration von 5 μM nicht in der Lage die Bildung konjugierter Diene im Vergleich zur Kontrolle zu reduzieren (Natella et al., 1999).

Auch bei der vorliegenden Untersuchung konnte bei Inkubation der LDL mit Vanillinsäure, Hippursäure, 3-Hydroxybenzoesäure oder 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure keine Verlängerung der lag-phase von LDL, verglichen mit der Kontrolle, beobachtet werden. Diese Substanzen wiesen weder prooxidative noch antioxidative Aktivitäten auf. Die vier Substanzen besitzen unterschiedliche chemische Strukturen, jedoch fehlen bei allen die entscheidenden strukturellen Voraussetzungen für eine antioxidative Aktivität. Hippursäure besitzt keine Substituenten am Phenolrest, und erst durch diese Substituenten wird eine antioxidative Aktivität von Phenolen definiert (Shahidi und Wanasundara, 1992). Vanillinsäure und 3-Hydroxybenzoesäure sind Benzoesäurederivate und die Carboxylgruppe scheint einen negativen Einfluss auf die Abgabe eines Wasserstoffatoms des Phenolrests zu haben (Natella et

al., 1999). 3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure besitzt nur eine OH-Gruppe am Phenolrest und außerdem fehlt eine ungesättigte Seitenkette, die eine antioxidative Aktivität verstärken würde (Natella et al., 1999).

Prooxidative Wirkung von Phenolen

Fukumoto und Mazza (2000) testeten verschiedene Phenole auf deren antioxidative oder prooxidative Wirkung. Mittels HPLC wurde die Bildung von Malondialdehyd in einer Linolsäure-Emulsion während kupfer-induzierter Oxidation bestimmt. Der Gehalt an Malondialdehyd einer Probe (Zusatz eines Phenols) wurde mit der Kontrolle (ohne Zusatz eines Phenols) verglichen. War der Malondialdehydgehalt der Probe höher als in der Kontrolle so wurde eine prooxidative Aktivität der jeweiligen Substanz angenommen. Unter den zahlreichen getesteten Substanzen waren auch Benzoesäure- und Zimtsäurederivate und Flavonoide. Mit dieser Methode konnte bei fast allen Phenolen bei niedriger Konzentration eine prooxidative Wirkung beobachtet werden. Ferulasäure, Vanillinsäure und 3-Hydroxybenzoesäure wiesen sowohl prooxidative als auch antioxidative Wirkung auf. Die prooxidative Aktivität nahm mit steigender Konzentration zu, bis zu einer Konzentration, bei der die antioxidative Wirkung der Substanzen dominierte.

Die Zimtsäurederivate der Phenolsäuren hatten eine höhere Aktivität als die Benzoesäurederivate. Das Fehlen der Doppelbindung im heterozyklischen Ring führt dazu, dass die Stabilität (Delokalisierung von ungepaarten Elektronen) niedriger ist. Für eine antioxidative Aktivität bei Phenolsäuren sind mindestens zwei Hydroxygruppen nötig (Fukumoto und Mazza, 2000).

Bei einer Untersuchung von Bourne und Rice-Evans (1997) wurde der Einfluss von Ferulasäure auf die LDL-Oxidation, induziert durch Kupferionen oder Metmyoglobin, getestet (62,5 µg Protein/ml LDL; 5µM Metmyoglobin oder 1,66 µM CuSO₄). Ferulasäure wurde in einer Konzentration von 0,5-2,0 µM verwendet, was zu einer signifikanten Verkürzung der lag-phase gegenüber der Kontrolle führte. Ferulasäure wirkt als Prooxidans, wenn die LDL-Oxidation durch Kupferionen induziert wird. Der Mechanismus dabei ist die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Ferulasäure und das dabei entstehende Phenoxyradikal der Ferulasäure. Die Wechselwirkung von Kupfer und Ferulasäure wurde untersucht und dabei eine Stöchiometrie des Komplexes von 1:1 ermittelt (Bourne und Rice-Evans, 1997). Unter diesen

Versuchsbedingungen war Ferulasäure in der Lage Cu^{2+} zu Cu^+ zu reduzieren. Auch andere Hydroxycimtsäuren waren dazu in der Lage, wie beispielsweise Kaffeesäure, Chlorogensäure und p-Cumarsäure.

Antioxidantien können die Oxidation von LDL durch Abfangen von Peroxyl- oder Alkoxyradikalen oder durch Komplexbildung von Kupferionen verhindern. Jedoch kann die Reduktion von Kupferionen durch Ferulasäure bei niedrigen Konzentrationen unter Bildung eines Phenoxyradikals und Cu^+ -Ionen auch einen prooxidativen Mechanismus auslösen (Abb. 68).

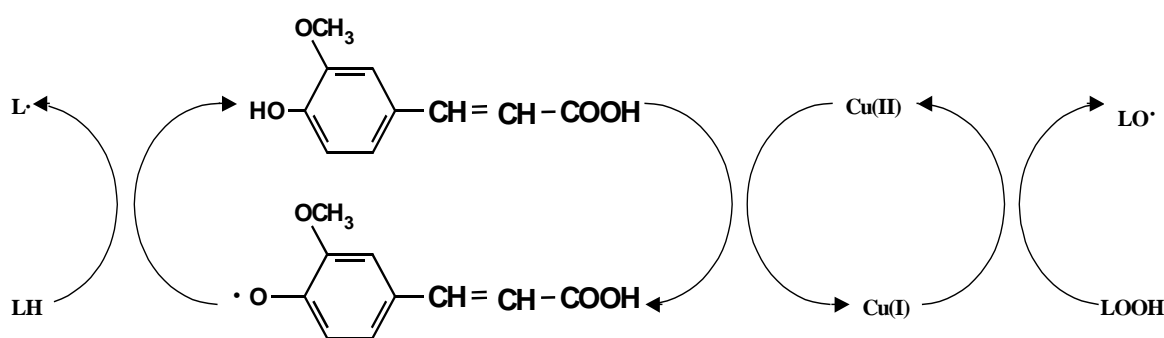


Abb. 68 : Mechanismus der prooxidativen Wirkung von Ferulasäure während kupfer-induzierter Oxidation (Bourne und Rice-Evans, 1997)

Es gibt zwei Mechanismen, die für die prooxidative Aktivität von Ferulasäure verantwortlich gemacht werden können. Die Reduzierung der Kupferionen und die damit verbundene Bildung des Phenoxyradikals könnte die Lipidperoxidationsrate erhöhen, indem ein Wasserstoffatom von einer mehrfach ungesättigten Fettsäure abstrahiert wird (Abb. 68). Außerdem reagiert Cu(I) mit Lipidhydroperoxiden (LOOH) schneller als Cu(II) , die Reaktion von Cu(II) mit LOOH ist aber der limitierende Schritt in diesem Prozess (Patel et al., 1997). Die Reduktion von Cu(II) durch Ferulasäure unter Bildung von Cu(I) und eines Phenoxyradikals könnte so die Oxidationsrate erhöhen und die lag-phase von LDL verkürzen. Eine prooxidative Aktivität der Ferulasäure wurde auch bei höheren Konzentrationen von Eisen beobachtet.

Für Ferulasäure konnten bei der vorliegenden Untersuchung sowohl antioxidative als auch prooxidative Aktivitäten beobachtet werden. Bei Inkubation der LDL mit $5 \mu\text{M}$ Ferulasäure

wurde keine Veränderung der lag-phase von LDL in bezug auf die Kontrolle beobachtet. Hier könnte die Beobachtung eine Rolle spielen, dass Ferulasäure in der Lage ist, Kupferionen in einem Verhältnis von 1:1 zu komplexieren (Bourne und Rice-Evans, 1997). Eine Konzentration von 5 μ M Ferulasäure entspricht der Kupferkonzentration und Ferulasäure scheint so weder antioxidative noch prooxidative Aktivität zu besitzen. Auch bei der schon erwähnten Untersuchung von Natella et al. (1999) konnte weder eine pro- noch eine antioxidative Aktivität von Ferulasäure, bei identischer Kupferkonzentration, beobachtet werden.

Liegt die Konzentration von Ferulasäure unter der Kupferkonzentration, scheinen verstärkt prooxidative Reaktionen aufzutreten. Es kommt zur Reduktion der Kupferionen, und die Oxidation von LDL wird dadurch verstärkt (Bourne und Rice-Evans, 1997). Ist die Konzentration von Ferulasäure höher als die der Kupferionen, scheint die antioxidative Wirkung verstärkt einzusetzen.

Eine Methylierung der Hydroxygruppe in ortho-Position der Diphenole, wie bei Ferulasäure, resultiert in einer Abnahme der antioxidativen Aktivität gegenüber Kaffeesäure. Ferulasäure ist aber dennoch effektiver als Monophenole, weil die Methoxygruppe mit Möglichkeit zur Elektronenabgabe eine erhöhte Stabilisierung des resultierenden Aryloxyradikals, durch eine Elektronendelokalisierung nach Abgabe eines Wasserstoffatoms der Hydroxygruppe, erlaubt (Castelluccio et al., 1995). Bedeutung für die antioxidative Aktivität von Ferulasäure scheint neben der Hydroxy- und Methoxygruppe auch die laterale Doppelbindung zu besitzen. Sie trägt maßgeblich zur Stabilisierung des Phenoxyradikals bei (Natella et al., 1999).

Auch für Isoferulasäure und Dihydroferulasäure war bei der vorliegenden Untersuchung eine prooxidative Wirkung zu beobachten. Die beiden Substanzen scheinen wie Ferulasäure in der Lage zu sein, Kupferionen zu reduzieren und so die Lipidperoxidation zu beschleunigen. Bei Isoferulasäure und Dihydroferulasäure konnten allerdings ausschließlich prooxidative Tendenzen und nicht wie bei Ferulasäure auch eine antioxidative Aktivität beobachtet werden. Der Grund dafür könnte die laterale Doppelbindung sein. Bei Dihydroferulasäure fehlt die laterale Doppelbindung und daraus ergibt sich eine geringere Stabilisierung, des bei der Oxidation entstehenden Phenoxyradikals. Isoferulasäure besitzt zwar eine laterale Doppelbindung, allerdings kann die Seitenkette, aufgrund der Position der Substituenten des Phenolrests, nicht mit in die Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals einbezogen werden (Abb. 69). Eine Hydroxygruppe in para-Stellung zur Seitenkette wie bei Ferulasäure erlaubt eine

Mesomeriestabilisierung unter Einbeziehung der lateralen Doppelbindung und erhöht so die antioxidative Aktivität. Bei Isoferulasäure dagegen befindet sich die Hydroxygruppe in meta-Stellung zur Seitenkette und eine Mesomeriestabilisierung unter Einbeziehung der lateralen Doppelbindung ist nicht möglich (Abb. 69).

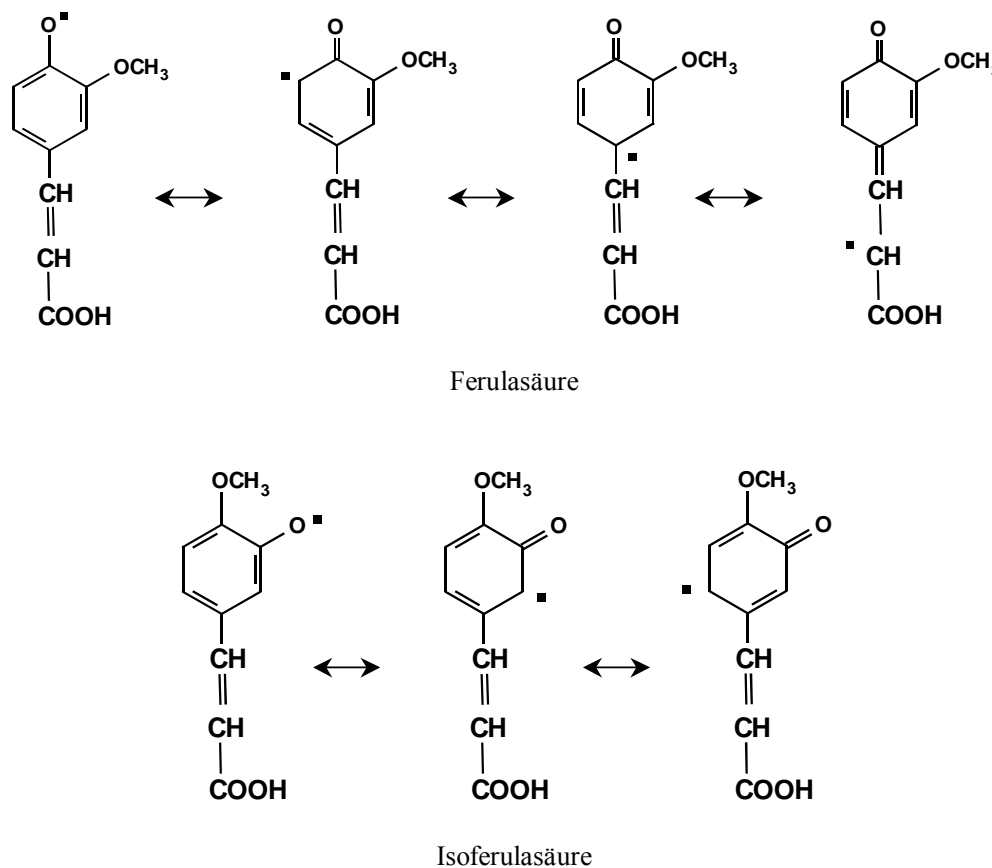


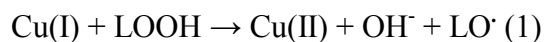
Abb. 69: Mesomeriestabilisierung des Phenoxyradikals von Ferulasäure und Isoferulasäure durch die Delokalisierung des ungepaarten Elektrons im aromatischen Ring

Prooxidative Wirkung von Harnsäure

Harnsäure ist in sehr hohen Konzentrationen (300 μM) im Plasma vorhanden (Bagnati et al., 1999); α -Tocopherol befindet sich in der Randschicht der LDL und ist so für Harnsäure zugänglich. Die antioxidative Aktivität von Harnsäure beruht sehr wahrscheinlich auf der Fähigkeit α -Tocopherol in den LDL zu regenerieren (Bagnati et al., 1999).

Jedoch kann auch bei Inkubation der LDL mit Harnsäure eine prooxidative Wirkung beobachtet werden (Bagnati et al., 1999). Harnsäure kann durch Cu(II) unter Bildung von Cu(I) oxidiert

werden. Das dabei entstehende Radikal wiederum geht eine Reaktion mit einer mehrfach ungesättigten Fettsäure ein, unter Bildung eines Lipidradikals (Reaktion 1). Bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff entsteht daraus ein Lipidperoxyradikal wodurch die Lipidperoxidation in den LDL verstärkt werden könnte (Bagnati et al., 1999).



Wenn die endogenen Antioxidantien verbraucht sind, kann nach Bagnati et al. (1999) außerdem auch die zweite Reaktion ablaufen und so prooxidative Mechanismen aktivieren. Diese Reaktion erfordert aber Cu(I), die Anwesenheit von Lipidhydroperoxiden und den vorherigen Verbrauch der endogenen Antioxidantien, deren Regeneration das Fortschreiten der Propagationsphase verhindern würde.

Prooxidative Wirkung von Flavonoiden

Auch bei einigen Flavonoiden können neben ihren antioxidativen Aktivitäten prooxidative Eigenschaften, abhängig von ihrer Konzentration und der Art der freien Radikale beobachtet werden (Cao et al., 1997). Diese Substanzen wirken antioxidativ, wenn die dabei entstehenden Radikale stabil sind. Sind jedoch Übergangsmetalle wie Kupferionen verfügbar, kann über einen Redoxzyklus Kupfer reduziert werden und es entsteht eine prooxidativ wirksame Form (Rice-Evans, 2001). Die antioxidative Wirkung und die kupfer-induzierten prooxidativen Eigenschaften dieser Substanzen sind abhängig von deren chemischen Struktur (Cao et al., 1997).

Cao et al. (1997) zeigten, dass in Anwesenheit von Cu^{2+} die Wirkung der Flavonoide eher prooxidativ als antioxidativ war. Bestimmt wurde die Aktivität mittels ORAC-Assay (oxygen radical absorbance capacity) unter Verwendung von AAPH, $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{2+}$ oder CuSO_4 .

Bei Substanzen, die die gleiche chemische Grundstruktur besaßen, war die kupfer-induzierte prooxidative Wirkung abhängig von der Anzahl der OH-Substituenten der Substanzen. Bei Flavonen und 6-Hydroxyflavonen, die keine oder nur eine OH-Substitution besaßen, konnten keine prooxidative Eigenschaften nachgewiesen werden. Bei Flavonen mit mehreren Hydroxygruppen (Quercetin oder Kaempferol, 2,3-Doppelbindung im heterozyklischen Ring) konnte eine stärkere prooxidative Aktivität beobachtet werden als bei Flavanonen (keine

Doppelbindung im heterozyklischen Ring), mit der gleichen Anzahl von OH-Substituenten (Eriodictyol und Taxifolin). Flavone und Flavanone, die keine OH-Substituenten aber sonst die gleiche chemische Grundstruktur besitzen wie Flavonoide, wirkten weder pro- noch antioxidativ. Dies weist auf die Bedeutung der Konjugation des A- und B-Ringes der Flavone bei der kupfer-induzierten prooxidativen Wirkung hin. Eine prooxidative Wirkung der Flavonoide konnte bei vorliegender Untersuchung (Studie 1) allerdings nicht beobachtet werden.

Die kupfer-initiierte prooxidative Aktivität der Flavonoide, wie auch die Fähigkeit Peroxyl- oder Hydroxylradikale abzufangen, hängt von der Anzahl freier OH-Substituenten ab. O-Methylierung und wahrscheinlich auch weitere O-modifizierte OH-Substituenten inaktivieren die prooxidative Wirkung.

Gerade diese Inaktivierung der prooxidativen Aktivität durch Methylierung oder glykosidische Veränderungen der OH-Substituenten könnte bei physiologischen und pharmakologischen Vorgängen von Bedeutung sein.

Die Inaktivierung von mutagenen Flavonoiden, katalysiert durch die Catechol-O-Methyltransferase, wurde durch Zhu et al. (1994) *in vivo* nachgewiesen und könnte der Grund dafür sein, warum einige Flavonoide *in vivo* nicht kanzerogen wirksam sind.

Die kupfer-induzierten prooxidativen Eigenschaften einiger Phenolsäuren, Ascorbinsäure, Harnsäure oder auch α -Tocopherol dürften *in vivo* kaum Bedeutung haben, da beim Menschen Metallionen vor allem in Formen (beispielsweise Coeruloplasmin) vorliegen, die nicht in der Lage sind, Radikalreaktionen zu katalysieren (Halliwell und Gutteridge, 1990). Dagegen können bei Gewebeschädigungen Eisen- oder Kupferionen freigesetzt werden (Halliwell et al., 1992), in diesem Zusammenhang konnten auch Metallionen in atherosklerotischen Läsionen gemessen werden (Smith et al., 1992). Wenn Metallionen eine Bedeutung für die LDL-Oxidation *in vivo* haben, dann sollten mögliche prooxidative Effekte von Phenolen nicht ignoriert werden.

Die Wahl des Prooxidans für die LDL-Oxidation ist sehr wichtig bei der Untersuchung der antioxidativen Aktivität von Substanzen und Nahrungsbestandteilen gegenüber LDL-Oxidation. Um die physiologische und pharmakologische Wirkung dieser Substanzen zu erklären, ist es von Bedeutung, das antioxidative als auch das prooxidative Verhalten und die Struktur-Wirkungsbeziehung zu untersuchen. Ob Substanzen im Organismus antioxidativ oder prooxidativ wirken, dürfte demnach wesentlich von den verfügbaren Übergangsmetall-Ionen und dem Redoxpotential möglicher Reaktionspartner abhängen (Böhm et al., 1998).

4.5 Studie 5: Einfluss von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte Oxidation von Low Density Lipoproteinen

Zink ist eines der essentiellen Spurenelemente für den menschlichen Körper und die empfohlene Zufuhr liegt bei etwa 7-10 mg/Tag für den Erwachsenen (Deutsche Gesellschaft für Ernährung et al., 2000). Eine orale Substitution von Zink kann bei einigen Erkrankungen wie Leberzirrhose oder Morbus Crohn angezeigt sein (Schölmerich et al., 1987). Der physiologisch vorkommende Zink-Histidin-Komplex findet in diesem Zusammenhang eine immer größere Beachtung. So haben Untersuchungen gezeigt, dass Zink-Histidin in der Lage ist, eine maximale Bioverfügbarkeit von Zink zu garantieren (Schopf, 2000).

In jüngster Zeit werden außerdem mögliche antioxidative Eigenschaften von Zink diskutiert. Es wird sehr kontrovers diskutiert ob ein niedriger Serumzinkspiegel in einer höheren Anfälligkeit für cardiovaskuläre Erkrankungen resultiert (Wilkins and Leake, 1994).

Ziel der vorliegenden Studie war es die antioxidative Wirkung von Zinkhistidin, Zinksulfat und Histidin zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Vorinkubation von Plasma

Im ersten Abschnitt dieses Versuchs wurde Plasma mit Zinkhistidin, Histidin oder Zinksulfat (Endkonzentration jeweils 20 μM) inkubiert, anschließend wurden die LDL isoliert. Es konnten, verglichen mit der Kontrolle (Plasma inkubiert mit entsprechendem Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$), keine Unterschiede in den Lag-Phasen der einzelnen LDL-Präparationen beobachtet werden. Daraus ist zu schließen, dass die getesteten Substanzen nicht in der Lage waren, an die LDL zu binden, sie wurden während der Isolierung der LDL abgetrennt. Eine Aufnahme der getesteten Substanzen in die LDL-Partikel war aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften auch nicht zu erwarten.

Inkubation von LDL

In einem zweiten Abschnitt wurden isolierte LDL mit Zinkhistidin, Histidin oder Zinksulfat inkubiert. Der Einfluss verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen auf die Oxidationsresistenz der LDL sollte untersucht werden.

Die Inkubation der LDL mit Zinkhistidin (Endkonzentration 0 – 10 μM) hatte einen inhibitorischen Effekt auf die LDL-Oxidation; eine zunehmende Konzentration der Testsubstanz

bewirkte eine Verlängerung der lag-phase der LDL. Bei einer Konzentration des Zinkhistidin von 10 μM betrug die Verlängerung der lag-phase 205 %. Zinksulfat dagegen war bei keiner der eingesetzten Konzentrationen in der Lage, die LDL vor kupfer-induzierter Oxidation zu schützen. Der Zinkhistidin-Komplex ist also nicht durch die Zinkionen per se wirksam.

Bei Inkubation der LDL mit Histidin allein (Endkonzentration 0 – 20 μM) konnte ebenfalls eine Verlängerung der lag-phase beobachtet werden; die Verlängerung betrug bei einer Konzentration von 20 μM 230 %. Die antioxidativen Effekte waren auf molarer Ebene niedriger als die von Zinkhistidin; 10 μM Histidin bewirkten eine Verlängerung der lag-phase um 134 % im Vergleich zu 10 μM Zinkhistidin mit einer Verlängerung von 205 %.

Wurden die Ergebnisse allerdings in Bezug auf die Stöchiometrie der Histidinmoleküle betrachtet, so war Histidin die wirksame Substanz. Die Wirksamkeit von Zinkhistidin gegenüber LDL-Oxidation war niedriger als die der entsprechenden Menge Histidin (1 Mol Zinkhistidin, das 2 Moleküle Histidin besitzt, verglichen mit 2 Mol Histidin).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass Zinkhistidin antioxidative Eigenschaften besitzt und in der Lage, ist LDL vor kupfer-induzierter Oxidation zu schützen. Die Anwesenheit von Zink scheint die Wirksamkeit von Histidin gegenüber kupfer-induzierter Oxidation zu reduzieren. Die Inkubation der LDL mit Zinksulfat hatte in der vorliegenden Untersuchung keinen Einfluss auf die Resistenz der LDL gegenüber Oxidation. Diese Beobachtung könnte Histidin als die antioxidativ wirksame Komponente des Zinkhistidin-Komplexes identifizieren. Die Wirksamkeit von Zinkhistidin bei der Hemmung der LDL-Oxidation war niedriger als die von Histidin.

Dass Zink an sich nicht in der Lage ist, die LDL vor Oxidation zu schützen, wird durch Ergebnisse von Gatto und Samman (1995) bestätigt. In ihrer Studie wurden den Versuchsteilnehmern 220 mg Zinksulfat pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht. Dabei konnte keine Hemmung der LDL-Oxidation beobachtet werden; weder strukturelle Veränderungen des Apolipoprotein B, noch eine Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Lipidteil der LDL konnten dadurch verzögert werden. Außerdem wurden LDL direkt mit Zinksulfat inkubiert. Aber auch dies veränderte den Verlauf der LDL-Oxidation nicht.

Aminosäuren, wie Histidin, sind in der Lage, LDL vor Oxidation zu schützen. Patterson und Leake (1998) untersuchten die antioxidative Wirkung von Histidin, Alanin und Cystein. Von den

getesteten Aminosäuren hatte Histidin den stärksten Effekt auf die Verlängerung der lag-phase. Verantwortlich für die unterschiedlichen antioxidativen Effekte waren die Seitenketten der Aminosäuren. Nur Histidin besitzt eine Imidazolgruppe, was die antioxidativen Eigenschaften aufgrund der hohen Affinität zu Kupferionen zu erhöhen scheint (Zhao et al., 1997, Patterson und Leake, 1998).

In einer Untersuchung von van Hinsbergh et al. (1986) konnte gezeigt werden, dass Histidin die LDL-Oxidation verhindert, weil es in der Lage ist, Singulett-Sauerstoff abzufangen und Kupferionen zu komplexieren und so die Oxidation von LDL verhindert. So könnte Zinkhistidin, im Plasma angereichert, LDL *in vivo* vor Oxidation schützen.

Patterson und Leake (1998) zeigten ebenfalls, dass Histidin ein wirksamer Kupferchelator ist. Bei einer Konzentration von 25 μM , deutlich unter der normalen Plasmakonzentration (ca. 90 μM , (Lentner, 1985)), schützte Histidin sehr wirksam LDL vor Oxidation. Histidin unterdrückt bei Einsatz physiologischer Konzentrationen neben der Lipidperoxidation auch die Oxidation des Proteinteils der LDL (Kalant und McCormick, 1992). Durch die Untersuchung von Kuzuya et al. (1992) konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Histidin während kupfer-induzierter LDL-Oxidation die Entstehung von TBARS und die Bildung eines LDL-Kupfer-Komplexes verhindert. Die Addition von Histidin zu einer LDL-Präparation vor Zugabe von Kupfersulfat verhinderte eine Peroxidation der LDL; wurde Histidin während der Oxidationsreaktion, zu einem beliebigen Zeitpunkt zugegeben, so wurde ein Fortschreiten der Peroxidation verhindert. Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit EDTA beobachtet, das ebenfalls für seine Wirkung als Komplexbildner bekannt ist (Kuzuya et al., 1992). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Hemmung der LDL-Oxidation durch Histidin nicht nur durch die Komplexierung des freien Kupfers in der wässrigen Lösung erfolgt. Histidin scheint in der Lage zu sein, das an LDL gebundene Kupfer zu entfernen (Kuzuya et al., 1992).

Retsky et al. (1999) beobachteten, dass Histidin (500 μM) die Bindung von Kupfer an LDL vollständig verhindert. Schon geringe Histidinkonzentrationen verhinderten einen Großteil der Kupferbindung, aber nur hohe Histidinkonzentrationen verhinderten eine vollständige Kupferbindung und so eine LDL-Oxidation. Die Erklärung hierfür dürfte sein, dass freies Histidin mit dem Apolipoprotein B um die Bindung von Kupfer konkurriert (Retsky et al., 1999). Auch Esterbauer und Ramos (1996) schreiben Histidin die Fähigkeit zu, Kupfer von der Bindungsstelle am Apolipoprotein B zu entfernen; es kommt zur Komplexbildung und die Oxidation von LDL wird dadurch verzögert oder sogar vollständig verhindert.

Im Verlauf von entzündlichen Prozessen kann eine Abnahme der Plasmakonzentration von Histidin beobachtet werden, wohingegen eine Supplementierung mit Histidin zu einer Erhöhung der Plasmakonzentrationen führt. Außerdem wird die Plasmakonzentration von Histidin vom Krankheitsverlauf und der Pharmakotherapie beeinflusst (Akrivos et al., 1984, Berthon et al., 1984, Dixon et al., 1983, Steinhauer et al., 1985). Darüber hinaus scheint Histidin eine Affinität für Zink oder Kupfer zu besitzen (Hallman et al., 1971) und die Komplexbildung von Histidin mit Zink oder Kupfer kann einen Hinweis auf einen spezifischen Transportmechanismus für diese beiden Spurenelemente in menschlichem Plasma darstellen (Ettinger et al., 1986).

Zinkhistidin ist eine metallorganische Verbindung und wird verstärkt als Supplement bei der Behandlung von Zinkmangel oder Zinkunterversorgung eingesetzt (Schopf, 2000, Schölmerich et al., 1987). Histidin ist auch ein Komplexbildner gegenüber Zink, klinische Studien zeigten einen positiven Effekt von Histidin auf die Zinkabsorption beim Menschen. Dies konnte durch erhöhte Zinkkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden (Lonnerdal, 2000). Die biologische Verfügbarkeit von Zink kann im Vergleich zu Zinksulfat durch die Verwendung von Zinkhistidin-Komplexen erhöht werden. Histidin kann die Aufnahme von Zink beim Menschen steigern, eine 15 mg Dosis Zink in Form von Zinkhistidin entspricht etwa einer 45 mg Dosis Zinksulfat (Schölmerich et al. 1987).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigten, dass Zinkhistidin antioxidative Eigenschaften gegenüber kupfer-induzierter LDL-Oxidation besitzt. Der Mechanismus dabei ist die Eigenschaft von Zinkhistidin, als Komplexbildner für Übergangsmetalle zu wirken. Bei Inkubation der LDL mit Zinkhistidin konnte ein stark konzentrationsabhängiger Hemmeffekt gegenüber LDL-Oxidation beobachtet werden, während Zinksulfat keine Wirkung auf den Schutz der LDL vor Oxidation hatte. Zinkhistidin ist in der Lage, die Plasmakonzentrationen von Zink, aber auch die antioxidativen Eigenschaften des Plasmas zu erhöhen. Dies verdeutlicht, dass bei Zinksubstitution aufgrund einer Unterversorgung der Einsatz von Zinkhistidin gegenüber Zinksulfat vorzuziehen ist. In diesem Zusammenhang sollte auch noch einmal erwähnt werden, dass die Freisetzung von Kupferionen in atherosklerotischen Läsionen sehr spät im Verlauf der Atherosklerose beobachtet wird (Evans et al., 1995). Demnach könnte die Supplementierung mit Zinkhistidin einen Beitrag zur Reduzierung von potentiell oxidativen Prozessen, verursacht durch Kupferionen, leisten.

Kombination von Zinkhistidin mit Quercetin oder Kaffeesäure

In einem dritten Teil dieser Untersuchung, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Kombination von Histidin (2,5 μM) oder Zinksulfat (2,5 μM) mit einem Polyphenol auf die Oxidationsresistenz der LDL hat. Als Vertreter der Polyphenole wurden Quercetin (1 μM) und Kaffeesäure (1 μM) verwendet. Bei Kombination von Zinksulfat mit Quercetin oder Kaffeesäure konnte keine Veränderung der lag-phase bezogen auf die Einzeleffekte der Polyphenole beobachtet werden. Zinksulfat war also weder allein noch in Kombination mit einer antioxidativ wirksamen Substanz, in der Lage die antioxidative Kapazität von LDL zu erweitern.

Wurde Histidin mit Quercetin oder Kaffeesäure kombiniert, so konnte eine Verkürzung der lag-phase, bezogen auf die Einzeleffekte von Quercetin oder Kaffeesäure, beobachtet werden. Die Verlängerung der lag-phase von Quercetin, bezogen auf die Kontrolle, betrug 191 %. Für Histidin allein konnte eine Verlängerung von 33 % ermittelt werden. Wurden diese beiden Substanzen kombiniert, ergab sich eine Verlängerung von 77 %. Die Verlängerung der lag-phase bei Inkubation mit Kaffeesäure betrug 169 %, bei Kombination mit Histidin lag dieser Wert bei 60 %. Bei beiden Phenolsäuren lag die Verlängerung der lag-phase bei Kombination mit Histidin unter den Einzeleffekten. Allerdings konnte, bezogen auf den Einzelsubstanzeffekt von Histidin, durch Zusatz eines Antioxidans eine Verlängerung erreicht werden.

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Hemmeffekt könnte eine Bindung der Phenolsäuren an Histidin sein. Kupferionen könnten dann verstärkt die Bindungsstellen am Apolipoprotein B besetzen und eine Oxidation der LDL begünstigen. Polyphenole haben aufgrund des aromatischen Ringes und der Hydroxygruppen eine hohe Affinität gegenüber Proteinen (Hollman et al., 2001). Untersuchungen von Manach et al. (1995) haben dies für Quercetin gezeigt, welches in Plasma an die Albuminfraktion gebunden ist.

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Zinkhistidin antioxidative Eigenschaften besitzt und in der Lage ist die kupfer-induzierte LDL-Oxidation zu hemmen. Histidin scheint also außer, dass es eine maximale Bioverfügbarkeit von Zink garantiert (Schopf, 2000), auch antioxidative Eigenschaften zu besitzen und könnte so die antioxidative Kapazität von Plasma erhöhen. Plasma, angereichert mit Zink und Histidin in der Form von Zinkhistidin, könnte somit in vivo einen erhöhten Schutz für LDL vor Oxidation darstellen.

5 Zusammenfassung

Oxidative Veränderungen von Low Density Lipoproteinen (LDL) können die Bildung von Atheromen begünstigen. Hierbei wird den Antioxidantien eine protektive Wirkung gegenüber Arteriosklerose zugesprochen, indem sie eine Oxidation von LDL verzögern oder sogar verhindern. Gerade in den letzten Jahren haben die Flavonoide und Phenolsäuren aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Durch ihre Fähigkeit, den Organismus vor Schädigung durch freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies zu schützen, werden sie neben ihrer Beteiligung bei der Arteriosklerose auch in Zusammenhang mit Erkrankungen wie Krebs oder Katarakt diskutiert.

Es existieren inzwischen zahlreiche Studien zur antioxidativen Wirkung von Polyphenolen. Es ist jedoch wenig bekannt über die Aktivität von Kombinationen verschiedener Antioxidantien. Deshalb wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Untersuchung (Studie 1) der Einfluss von α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Kaffeesäure und ausgewählten Flavonoiden (einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen) auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation untersucht. Die Lipidperoxidation der LDL wurde durch den Verlauf der Dienkonjugation verfolgt, die Fragmentierung des Apolipoprotein B während LDL-Oxidation wurde durch den Verlauf der Tryptophanfluoreszenz und der Carbonylgruppenbildung gemessen.

Es konnte beobachtet werden, dass die Phenolsäuren eine höhere antioxidative Aktivität als α -Tocopherol oder Ascorbinsäure besitzen. Die wirksamsten Antioxidantien waren Quercetin gefolgt von Epicatechin und Kaffeesäure; diese Antioxidantien weisen eine Dihydroxystruktur auf. Quercetin (1 μ M) bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 108 % gegenüber der Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien), Epicatechin (1 μ M) und Kaffeesäure (1 μ M) um 74 bzw. 80 %. α -Tocopherol (5 μ M) verlängerte die lag-phase um 74 % und Ascorbinsäure (3 μ M) nur um durchschnittlich 47 %. Die Flavonoide Phloretin und Hesperetin (jeweils 1 μ M), die keine Dihydroxystruktur besitzen, hatten eine vergleichsweise niedrige antioxidative Wirkung und verlängerten die lag-phase der LDL um 31 bzw. 38 %.

Bei Kombination von zwei verschiedenen Antioxidantien zeigten Quercetin und Kaffeesäure den stärksten Effekt auf die Verlängerung der lag-phase (244 %). Die antioxidative Wirkung dieser Kombination war höher als durch Addition der Einzeleffekte zu erwarten gewesen wäre. Die Inkubation der LDL mit einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure oder

α -Tocopherol und Phloretin hatte einen verkürzenden Effekt auf die lag-phase bezogen auf den Einzeleffekt von α -Tocopherol. Verschiedene Flavonoide und Ascorbinsäure scheinen in der Lage zu sein sich gegenseitig zu beeinflussen, analog dem Synergismus von Ascorbinsäure und α -Tocopherol.

Die Ergebnisse der Messung der Tryptophanfluoreszenz und der Carbonylgruppenbildung haben die Beobachtungen der Dienkonjugation bestätigt.

In Studie 2 wurde der Konzentrationsverlauf von α -Tocopherol, Quercetin und Kaffeesäure in verschiedenen LDL-Präparationen untersucht. Dazu wurden die LDL zunächst mit den Substanzen inkubiert (allein oder in Kombination) und anschließend wurde die Oxidationsreaktion durch Zugabe von Kupferionen gestartet.

Quercetin wurde, verglichen mit Kaffeesäure und α -Tocopherol, am schnellsten verbraucht. Bei Inkubation der LDL mit einer Kombination von Quercetin, α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure wurde Quercetin langsamer verbraucht (16 % nach fünf Minuten) als bei den anderen Kombinationen (3-7 % nach fünf Minuten).

α -Tocopherol wurde etwas langsamer verbraucht als Quercetin, nach fünf Minuten konnte noch ein Tocopherolgehalt von 26-30 % gemessen werden. Bei einer Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure oder α -Tocopherol, Ascorbinsäure und zusätzlich Quercetin und Kaffeesäure lag der Gehalt nach fünf Minuten noch bei 41 bzw. 44 %.

Kaffeesäure wurde deutlich langsamer verbraucht als α -Tocopherol oder Quercetin, nach fünf Minuten waren noch zwischen 90 und 100% der Kaffeesäure vorhanden. Bei Inkubation der LDL mit Kaffeesäure allein oder einer Kombination von Kaffeesäure und Ascorbinsäure sank der Kaffeesäuregehalt am schnellsten; nach 10 Minuten lag der Gehalt bei 70 bzw. 60 %. Wurde dagegen eine Kombination von Kaffeesäure und Quercetin oder α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure getestet, so lag der Kaffeesäuregehalt nach 10 Minuten noch bei 93 bzw. 94 %.

In Studie 3 sollte der in Studie 1 beobachtete Synergieeffekt von Quercetin und Kaffeesäure bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation näher untersucht werden. Dazu wurde die antioxidative Wirkung von Quercetin und Kaffeesäure auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation mit den strukturverwandten Substanzen Kaempferol, p-Cumarsäure und Dopamin verglichen.

Es konnte festgestellt werden, dass Kaempferol (Verlängerung der lag-phase von 286%), p-Cumarsäure (2 %) oder Dopamin (606 %) in dem hier verwendeten Versuchsansatz eine

niedrigere antioxidative Aktivität besitzen als Quercetin (1053 %) und Kaffeesäure (730 %). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nur die Kombination von Quercetin und Kaffeesäure eine antioxidative Aktivität aufwies, die über der Summe der Einzeleffekte lag. Kaffeesäure besitzt diejenigen chemischen Strukturen (ortho-Dihydroxystruktur, laterale Doppelbindung in Konjugation mit Carbonylgruppe und Phenolrest), die für die antioxidativen Eigenschaften bei Flavonoiden verantwortlich gemacht werden und ist damit Quercetin sehr ähnlich.

In Studie 4 wurden unterschiedliche Kaffeesäurederivate auf ihre antioxidative Wirkung gegenüber LDL-Oxidation untersucht.

Ferulasäure hatte in dem hier verwendeten Versuchsansatz sowohl prooxidative als auch antioxidative Wirkung, abhängig von der eingesetzten Konzentration. Bei Inkubation der LDL mit 1 oder 2,5 μM Ferulasäure konnte eine Verkürzung der lag-phase von LDL um 15 bzw. 20 % gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 5 μM war kein Unterschied zu Kontroll-LDL festzustellen. Wurde allerdings eine Konzentration von 7,5 μM Ferulasäure verwendet, war die lag-phase gegenüber Kontroll-LDL um 40 % verlängert. Liegt die Konzentration von Ferulasäure unter der Kupferkonzentration scheinen verstärkt prooxidative Reaktionen aufzutreten. Es kommt zur Reduktion der Kupferionen und die Oxidation von LDL wird dadurch verstärkt. Ist die Konzentration von Ferulasäure höher als die der Kupferionen scheint die antioxidative Wirkung verstärkt einzusetzen.

Isoferulasäure und Dihydroferulasäure hatten eine prooxidative Aktivität bei kupfer-induzierter LDL-Oxidation in den hier verwendeten Konzentrationen (0 – 7,5 μM). Inkubation der LDL mit 7,5 μM Isoferulasäure bewirkte eine Verkürzung der lag-phase um 18 % gegenüber Kontroll-LDL, bei Dihydroferulasäure betrug die Verkürzung 31 %. Die beiden Substanzen scheinen wie Ferulasäure in der Lage zu sein, Kupferionen zu reduzieren und so die Lipidperoxidation zu beschleunigen. Aufgrund der chemischen Struktur konnten allerdings bei Isoferulasäure und Dihydroferulasäure ausschließlich prooxidative Tendenzen und nicht wie bei Ferulasäure auch eine antioxidative Aktivität beobachtet werden. o-Hydroxyhippursäure wirkte unabhängig von der Konzentration antioxidativ; bei Inkubation der LDL mit 7,5 μM o-Hydroxyhippursäure konnte eine Verlängerung der lag-phase um 33 % beobachtet werden.

In Studie 5 wurde die Wirkung von Zinkhistidin, Histidin und Zinksulfat auf die kupfer-induzierte LDL-Oxidation untersucht. Der Zink-Histidin-Komplex findet bei der

Zinksubstitution eine immer größere Bedeutung. Anhand der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden ob Zinkhistidin auch antioxidative Wirkung besitzt.

Dazu wurde LDL mit Zinkhistidin, Histidin oder Zinksulfat inkubiert und anschließend der Verlauf der Dienkonjugation verfolgt. Zinksulfat hatte in dem hier verwendeten Versuchsansatz keine antioxidative Aktivität, die lag-phase unterschied sich nicht von der lag-phase von Kontroll-LDL. Zinkhistidin und Histidin dagegen wiesen eine antioxidative Aktivität auf. Zinkhistidin (10 μM) bewirkte eine Verlängerung der lag-phase um 205 %, bei Histidin (20 μM) konnte eine Verlängerung von 230 % beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass Zinkhistidin antioxidative Eigenschaften besitzt und in der Lage, ist LDL vor kupfer-induzierter Oxidation zu schützen. Die Anwesenheit von Zink scheint die Wirksamkeit von Histidin gegenüber kupfer-induzierter Oxidation zu reduzieren. Die Inkubation der LDL mit Zinksulfat hatte in der vorliegenden Untersuchung keinen Einfluss auf die Resistenz der LDL gegenüber Oxidation. Diese Beobachtung könnte Histidin als die antioxidativ wirksame Komponente des Zinkhistidin-Komplexes identifizieren.

Die getesteten Substanzen wiesen sehr unterschiedliche antioxidative Aktivitäten gegenüber kupfer-induzierter LDL-Oxidation auf. Es konnte beobachtet werden, dass bei Flavonoiden und Phenolsäuren ein starker Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der antioxidativen Wirkung besteht. Einige Polyphenole waren in der Lage, die Oxidation von LDL zu verzögern und möglicherweise kann Plasma in vivo angereichert mit diesen Antioxidantien einen Schutz der LDL vor Oxidation bieten. Aber auch mögliche kupfer-induzierte prooxidative Eigenschaften einzelner Substanzen könnten in vivo eine Rolle spielen, denn vor allem in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen kommt es zur Freisetzung von Metallionen wie Kupfer.

In der Ernährung und im Organismus liegen Antioxidantien als komplexe Gemische vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine kombinatorische Wirkung verschiedener Antioxidantien in vitro und können dazu beitragen die Bedeutung von Interaktionen zwischen einzelnen Antioxidantien auch in vivo besser zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

Akrivos F, Blais MJ, Hoffelt J, Berthon G (1984) An assessment of the physiological significance of cimetidine interactions with copper and zinc in biofluids as based on the computer-simulated distribution of the involved complexes at therapeutic levels of the drug. *Agents Actions* 15: 649-659

Anto RJ, Sukumaran K, Kuttan G, Rao MN, Subbaraju V, Kuttan R (1995) Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. *Cancer Lett* 97: 33-37

Aruoma OI (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 32: 671-683

Aviram M, Fuhrman B (1998) Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis* 137 Suppl: S45-S50

Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G (1999) When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. *Biochem J* 340: 143-152

Bentsath A, Ruzsnyak S, Szent-Györgyi A (1936) Vitamin nature of flavones. *Nature* 138: 798

Bentsath A, Ruzsnyak S, Szent-Györgyi A (1937) Vitamin P. *Nature* 139: 326-327

Berthon G, Blais MJ, Piktas M, Hounbossa K (1984) Trace metal requirements in total parenteral nutrition (TPN). 5. Formation constants for the copper(II)-histidine ternary complexes with threonine, lysine, glycine, phenylalanine, valine, and cystine, and discussion of their implications regarding the copper distribution in blood plasma during TPN and the evaluation of the daily dose of copper. *J Inorg Biochem* 20: 113-130

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-355

Bors W, Michel C, Schikora S (1995) Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* 19: 45-52

Bourne LC, Rice-Evans CA (1997) The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. *Free Radic Res* 27: 337-344

- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A (1998) Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases]. *Z Ernährungswiss* 37: 147-163
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 330: 1173-1178
- Buettner GR, Jurkiewicz BA (1993) Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic Biol Med* 14: 49-55
- Cao G, Cutler RG (1995) Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys* 320: 106-114
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 44: 3426-3431
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-760
- Carbonneau MA, Leger CL, Descomps B, Michel F, Monnier L (1998) Improvement in the antioxidant status of plasma and low-density lipoprotein in subjects receiving a red wine phenolics mixture. *JAACS* 75: 235-240
- Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, Dedieu F, Descomps B (1997) Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur J Clin Nutr* 51: 682-690
- Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Leger CL (2001) Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J Nat Prod* 64: 480-486
- Castelluccio C, Bolwell GP, Gerrish C, Rice-Evans C (1996) Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem J* 316: 691-694
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Rice-Evans C (1995) Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett* 368: 188-192

- Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM (1998) Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392: 291-299
- Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP (1980) Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res* 21: 284-291
- Cossins E, Lee R, Packer L (1998) ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. *Biochem Mol Biol Int* 45: 583-597
- Covas MI, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Sebastia N, Torre-Boronat C, Marrugat J (2000) Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation. *Int J Clin Pharmacol Res* 20: 49-54
- Cremin P, Kasim-Karakas S, Waterhouse AL (2001) LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem* 49: 1747-1750
- Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854: 435-442
- de Whalley CV, Rankin SM, Houlst JR, Jessup W, Leake DS (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 39: 1743-1750
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (2000) Zink. In *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*, pp 191-194. Umschau Braus GmbH: Frankfurt
- Dixon JS, Sitton NG, Surrall KE, Martin MF, Pickup ME, Bird HA (1983) The effect of drugs on serum histidine levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 3: 145-149
- Doba T, Burton GW, Ingold KU (1985) Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 835: 298-303
- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A (2001) Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and Hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* 131: 235-241
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G (1991) Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 53: 314S-321S

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341-390

Esterbauer H, Ramos P (1996) Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 31-64

Esterbauer H, Rotheneder M, Striegl G, Waeg G, Ashy A, Sattler W, Juergens G (1989b) Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation. *Fett Wissenschaft Technologie* 91: 316-324

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Oberreither S, Rotheneder M, el Saadani M, Jurgens G (1989c) The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 570: 254-267

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M (1989a) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 6: 67-75

Esterbauer H, Wag G, Puhl H (1993) Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull* 49: 566-576

Ettinger MJ, Darwish HM, Schmitt RC (1986) Mechanism of copper transport from plasma to hepatocytes. *Fed Proc* 45: 2800-2804

Evans PJ, Smith C, Mitchinson MJ, Halliwell B (1995) Metal ion release from mechanically-disrupted human arterial wall. Implications for the development of atherosclerosis. *Free Radic Res* 23: 465-469

Fito M, Covas MI, Lamuela-Raventos RM, Vila J, Torrents L, de la TC, Marrugat J (2000) Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids* 35: 633-638

Foley S, Navaratnam S, McGarvey DJ, Land EJ, Truscott TG, Rice-Evans CA (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic Biol Med* 26: 1202-1208

Frei B, England L, Ames BN (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6377-6381

Frei B, Gaziano JM (1993) Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation. *J Lipid Res* 34: 2135-2145

Frei B, Keaney JF, Retsky KL, Chen K (1996) Vitamins C and E and LDL oxidation. *Vitam Horm* 52: 1-34

Fuhrman B, Aviram M (2001) Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 12: 41-48

Fuhrman B, Ben-Yaish L, Hayek AT, Aviram M (1997) Tomato lycopene and beta-carotene inhibit low density lipoprotein oxidation and this effect depends on the lipoprotein vitamin E content. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 7: 433-443

Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M (2000) Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid Redox Signal* 2: 491-506

Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 3597-3604

Gatto LM, Samman S (1995) The effect of zinc supplementation on plasma lipids and low-density lipoprotein oxidation in males. *Free Radic Biol Med* 19: 517-521

Giessauf A, Steiner E, Esterbauer H (1995) Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta* 1256: 221-232

Giessauf A, van Wickern B, Simat T, Steinhart H, Esterbauer H (1996) Formation of N-formylkynurenine suggests the involvement of apolipoprotein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation. *FEBS Lett* 389: 136-140

Hess D, Keller HE, Oberlin B, Bonfanti R, Schuep W (1991) Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotenes and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Int J Vitam Nutr Res* 61: 232-238

Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33-50

Halliwell B, Gutteridge JM (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8

Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620

Hallman PS, Perrin DD, Watt AE (1971) The computed distribution of copper(II) and zinc(II) ions among seventeen amino acids present in human blood plasma. *Biochem J* 121: 549-555

- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34: 1345-1353
- Hider RC, Liu ZD, Khodr HH (2001) Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol* 335: 190-203
- van Hinsbergh VW, Scheffer M, Havekes L, Kempen HJ (1986) Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 878: 49-64
- Hoffmann J (1998) Verteilung und antioxidative Wirkung von Carotinoiden und α -Tocopherol in den Lipoproteinen des Plasmas beim Menschen. Dissertation am Lehrstuhl für Ernährungslehre der Technischen Universität München-Weihenstephan
- Hollman PC, Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21: 703-707
- Hollman PC, het Hof KH, Tijburg LB, Katan MB (2001) Addition of milk does not affect the absorption of flavonols from tea in man. *Free Radic Res* 34: 297-300
- Holvoet P, Collen D (1998) Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137 Suppl: S33-S38
- Horakova L, Giessauf A, Raber G, Esterbauer H (1996) Effect of stobadine on Cu(++)-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem Pharmacol* 51: 1277-1282
- Iwatsuki M, Niki E, Stone D, Darley-Usmar VM (1995) Alpha-tocopherol mediated peroxidation in the copper (II) and met myoglobin induced oxidation of human low density lipoprotein: the influence of lipid hydroperoxides. *FEBS Lett* 360: 271-276
- Jialal I, Grundy SM (1991) Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *J Clin Invest* 87: 597-601
- Jovanovic S, V, Steenken S, Hara Y, Simic MG (1996) Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal Chem Soc Perkin Trans. 2*: 2497-2504
- Jovanovic S, V, Steenken S, Simic MG, Hara Y (1998) Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C, Packer JE (eds) pp 137-161. Marcel Dekker, Inc.: New York

- Jovanovic S, V, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG (1994) Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116: 4846-4851
- Kalant N, McCormick S (1992) Inhibition by serum components of oxidation and collagen-binding of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1128: 211-219
- Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E, Jr. (1993) Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drugs* 4: 91-96
- Kerry NL, Abbey M (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 135: 93-102
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN (1992) Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem* 38: 2066-2072
- Kleinveld HA, Naber AH, Stalenhoef AF, Demacker PN (1993) Oxidation resistance, oxidation rate, and extent of oxidation of human low-density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid content to linoleic acid content: studies in vitamin E deficient subjects. *Free Radic Biol Med* 15: 273-280
- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschutter A, Beisiegel U (1996) Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res* 37: 1436-1448
- Kuzuya M, Yamada K, Hayashi T, Funaki C, Naito M, Asai K, Kuzuya F (1992) Role of lipoprotein-copper complex in copper catalyzed-peroxidation of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1123: 334-341
- Laranjinha J, Cadenas E (1999) Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *IUBMB Life* 48: 57-65
- Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L (1995) Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys* 323: 373-381
- Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM (1994) Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharmacol* 48: 487-494
- Leibovitz BE, Mueller JA (1993) Bioflavonoids and polyphenols: medical applications. *Journal of Optimal Nutrition* 2: 17-35

Lentner C (1985) Blut - Stickstoffhaltige Substanzen. In *Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik*, Lentner C (ed) pp 89-103. CIBA-GEIGY AG: Basel

Levine M, Daruwala RC, Park JB, Rumsey SC, Wang Y (1998) Does vitamin C have a pro-oxidant effect? *Nature* 395: 231

Lonnerdal B (2000) Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr* 130: 1378S-1383S

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Maiani G, Serafini M, Salucci M, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1997) Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 692: 311-317

Maiorino M, Zamburlini A, Roveri A, Ursini F (1993) Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* 330: 174-176

Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, Rémésy C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426: 331-336

Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, Regeat F, Rémésy C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125: 1911-1922

Markwell MA, Haas SM, Tolbert NE, Bieber LL (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods Enzymol* 72: 296-303

Meyer AS, Heinonen M, Frankel EN (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food chemistry* 61: 71-75

Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR (2000) Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem* 48: 3876-3884

Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C (1995) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med* 19: 541-552

Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem* 47: 1453-1459

- Niki E (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr* 54: 1119S-1124S
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 62: 1322S-1326S
- Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738
- Parthasarathy S, Auye N, Santanam N (1998) Implications of lag time concept in the oxidation of LDL. *Free Radic Res* 28: 583-591
- Patel RP, Svistunenko D, Wilson MT, Darley-Usmar VM (1997) Reduction of Cu(II) by lipid hydroperoxides: implications for the copper-dependent oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem J* 322: 425-433
- Patterson RA, Leake DS (1998) Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH. *FEBS Lett* 434: 317-321
- Pfannhauser W (1997) Antioxidantien und Gesundheit. *Ernährung/Nutrition* 21: 496-499
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042
- Pinchuk I, Gal S, Lichtenberg D (2001) The dose-dependent effect of copper-chelating agents on the kinetics of peroxidation of Low-Density Lipoprotein (LDL). *Free Radic Res* 34: 349-362
- Puhl H, Waeg G, Esterbauer H (1994) Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol* 233: 425-441
- Rechner AR, Spencer JP, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA (2001) Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med* 30: 1213-1222
- Rein D, Lotito S, Holt R, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG (2000) Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 130: 2109S-2114S
- Retsky KL, Chen K, Zeind J, Frei B (1999) Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic Biol Med* 26: 90-98
- Retsky KL, Freeman MW, Frei B (1993) Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J Biol Chem* 268: 1304-1309

- Retsky KL, Frei B (1995) Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1257: 279-287
- Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 357-363
- Rice-Evans C (2001) Flavonoid Antioxidants. *Curr Med Chem* 8: 797-807
- Rice-Evans C, Miller NJ (1998) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids. In *Flavonoids in Health and Disease*, Rice-Evans C, Packer L (eds) pp 199-219. Marcel Dekker, Inc.: New York
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22: 375-383
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956
- Robak J, Gryglewski RJ (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37: 837-841
- Rusznayk S, Szent-Györgyi A (1936) Vitamin P: Flavonols as vitamin. *Nature* 138: 27
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346
- Sanchez-Moreno C, Jimenez-Escrig A, Saura-Calixto F (2000) Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research* 20: 941-953
- Scheek LM, Wiseman SA, Tijburg LB, van Tol A (1995) Dialysis of isolated low density lipoprotein induces a loss of lipophilic antioxidants and increases the susceptibility to oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 117: 139-144
- Schopf R (2000) Zink-Histidin. *Deutsche Apotheker Zeitung* 140: 475-484
- Schölmerich J, Freudemann A, Kottgen E, Wietholtz H, Steiert B, Lohle E, Haussinger D, Gerok W (1987) Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. *Am J Clin Nutr* 45: 1480-1486
- Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA (2000) Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 29: 1222-1233

Sekher PA, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1161-1168

Shahidi F, Wanasundara PK (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103

Smith C, Mitchinson MJ, Aruoma OI, Halliwell B (1992) Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 286: 901-905

Stait SE, Leake DS (1994) Ascorbic acid can either increase or decrease low density lipoprotein modification. *FEBS Lett* 341: 263-267

Stait SE, Leake DS (1996) The effects of ascorbate and dehydroascorbate on the oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem J* 320: 373-381

Steenken S, Neta P. (1982) One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest. *J Phys Chem* 86: 3661-3667

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924

Steinhauer HB, Kluthe R, Lubrich I, Schollmeyer P (1985) Effect of L-histidine in vivo on human platelet function and arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Med* 18: 245-254

Tomas-Barberan F, Clifford MN (2000) Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1073-1080

van Acker SA, Bast A, van der Vijgh WJF (1998) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans CA, Packer L (eds) pp 221-252. Marcel Dekker Inc.: New York

van Hinsbergh VW, Scheffer M, Havekes L, Kempen HJ (1986) Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 878: 49-64

Vaya J, Belinky PA, Aviram M (1997) Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 23: 302-313

Viana M, Barbas C, Bonet B, Bonet MV, Castro M, Fraile MV, Herrera E (1996) In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 123: 83-91

- Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L (1998) Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *Biochem Pharmacol* 55: 333-340
- Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry MM, Cai S (1995) Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2798-2799
- Voet D, Voet JG (1992) *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim
- Wang H, Cao G, Prior RL (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705
- Wilkins GM, Leake DS (1994) The oxidation of low density lipoprotein by cells or iron is inhibited by zinc. *FEBS Lett* 341: 259-262
- Yamanaka N, Oda O, Nagao S (1997) Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett* 405: 186-190
- Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Packer L (1997) Apolipoprotein B carbonyl formation is enhanced by lipid peroxidation during copper-mediated oxidation of human low-density lipoproteins. *Arch Biochem Biophys* 339: 165-171
- Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228: 349-351
- Yoshida Y, Tsuchiya J, Niki E (1994) Interaction of alpha-tocopherol with copper and its effect on lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1200: 85-92
- Zhao F, Ghezzi-Schoneich E, Aced GI, Hong J, Milby T, Schoneich C (1997) Metal-catalyzed oxidation of histidine in human growth hormone. Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol. *J Biol Chem* 272: 9019-9029
- Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG (1994) Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem* 269: 292-299

Anhang

Tab. A1: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 1; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

	MEAN ± SD
α-Tocopherol	99 ± 2,1
Ascorbinsäure	37 ± 2,8
Quercetin	101 ± 1,4
Epicatechin	71 ± 5,7
Hesperetin	14 ± 0,7
Kaffeesäure	80 ± 10,6
Phloretin	20 ± 0,7
α-Tocopherol und Ascorbinsäure	83 ± 2,8
α-Tocopherol und Quercetin	207 ± 2,8
α-Tocopherol und Epicatechin	178 ± 2,1
α-Tocopherol und Hesperetin	101 ± 1,4
α-Tocopherol und Kaffeesäure	79 ± 6,4
α-Tocopherol und Phloretin	65 ± 2,1
Ascorbinsäure und Quercetin	227 ± 0,7
Ascorbinsäure und Epicatechin	303 ± 1,4
Ascorbinsäure und Hesperetin	53 ± 2,8
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	136 ± 0,7
Ascorbinsäure und Phloretin	96 ± 6,4
Quercetin und Epicatechin	452 ± 4,2
Quercetin und Hesperetin	193 ± 2,1
Quercetin und Kaffeesäure	229 ± 0,7
Quercetin und Phloretin	267 ± 2,8
Epicatechin und Hesperetin	150 ± 13,4
Epicatechin und Kaffeesäure	287 ± 2,8
Epicatechin und Phloretin	122 ± 9,9
Hesperetin und Kaffeesäure	99 ± 1,4
Hesperetin und Phloretin	25 ± 1,4
Kaffeesäure und Phloretin	102 ± 1,4
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	442 ± 4,2
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	347 ± 3,5

Tab. A1: Fortsetzung

α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	149 \pm 10,6
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	340
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	330 \pm 4,2
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	530 \pm 2,8
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	657 \pm 15,6
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	419 \pm 18,4
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	726 \pm 95,5
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	457 \pm 38,9
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	808 \pm 28,3
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	924 \pm 20,5

Tab. A2: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 2; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

	MEAN \pm SD	
α -Tocopherol	57	\pm 4,2
Ascorbinsäure	44	\pm 0,7
Quercetin	89	\pm 7,1
Epicatechin	63	\pm 0,7
Hesperetin	41	\pm 0,0
Kaffeesäure	50	\pm 0,7
Phloretin	44	\pm 2,1
α -Tocopherol und Ascorbinsäure	46	\pm 2,8
α -Tocopherol und Quercetin	130	\pm 1,4
α -Tocopherol und Epicatechin	82	\pm 0,7
α -Tocopherol und Hesperetin	89	\pm 9,9
α -Tocopherol und Kaffeesäure	73	\pm 0,0
α -Tocopherol und Phloretin	41	\pm 0,7
Ascorbinsäure und Quercetin	128	\pm 1,4
Ascorbinsäure und Epicatechin	89	\pm 0,7
Ascorbinsäure und Hesperetin	47	\pm 2,1
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	113	\pm 2,1
Ascorbinsäure und Phloretin	65	\pm 0,7
Quercetin und Epicatechin	157	\pm 0,7
Quercetin und Hesperetin	154	\pm 0,7
Quercetin und Kaffeesäure	240	\pm 2,8
Quercetin und Phloretin	157	\pm 0,7
Epicatechin und Hesperetin	98	\pm 2,1
Epicatechin und Kaffeesäure	197	\pm 3,5
Epicatechin und Phloretin	92	\pm 0,7
Hesperetin und Kaffeesäure	122	\pm 0,7
Hesperetin und Phloretin	86	\pm 1,4
Kaffeesäure und Phloretin	136	\pm 2,1
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	217	\pm 0,7
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	112	\pm 1,4
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	84	\pm 3,5
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	179	\pm 10,6

Tab. A2: Fortsetzung

α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	77 \pm 0,7
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	351 \pm 7,8
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	444 \pm 11,3
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	333 \pm 2,1
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	494 \pm 2,1
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	289 \pm 4,2
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	432 \pm 5,7
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	631 \pm 11,3

Tab. A3: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 3; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

	MEAN ± SD
α-Tocopherol	42 ± 9,9
Ascorbinsäure	42 ± 4,2
Quercetin	110 ± 2,1
Epicatechin	49 ± 0,7
Hesperetin	41 ± 2,1
Kaffeesäure	116 ± 3,5
Phloretin	27 ± 4,9
α-Tocopherol und Ascorbinsäure	49 ± 1,4
α-Tocopherol und Quercetin	122 ± 3,5
α-Tocopherol und Epicatechin	125 ± 0,7
α-Tocopherol und Hesperetin	80 ± 6,4
α-Tocopherol und Kaffeesäure	160 ± 7,1
α-Tocopherol und Phloretin	54 ± 4,2
Ascorbinsäure und Quercetin	116 ± 7,1
Ascorbinsäure und Epicatechin	127 ± 1,4
Ascorbinsäure und Hesperetin	99 ± 2,8
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	191 ± 3,5
Ascorbinsäure und Phloretin	49 ± 12,0
Quercetin und Epicatechin	209 ± 17,7
Quercetin und Hesperetin	164 ± 20,5
Quercetin und Kaffeesäure	428 ± 28,3
Quercetin und Phloretin	138 ± 37,5
Epicatechin und Hesperetin	157 ± 7,1
Epicatechin und Kaffeesäure	271 ± 9,2
Epicatechin und Phloretin	150 ± 3,5
Hesperetin und Kaffeesäure	156 ± 4,9
Hesperetin und Phloretin	75 ± 4,2
Kaffeesäure und Phloretin	138 ± 10,6
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	136 ± 4,9
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	150 ± 7,1
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	102 ± 3,5
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	222 ± 1,4

Tab. A3: Fortsetzung

α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	82 \pm 2,8
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	227 \pm 12,7
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	249 \pm 11,3
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	191 \pm 6,4
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	315 \pm 12,7
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	280 \pm 7,8
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	472 \pm 31,8
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	729 \pm 38,9

Tab. A4: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 4; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

	MEAN ± SD
α-Tocopherol	95 ± 3,5
Ascorbinsäure	72 ± 3,5
Quercetin	132 ± 10,6
Epicatechin	104 ± 2,1
Hesperetin	49 ± 2,8
Kaffeesäure	71 ± 5,7
Phloretin	50 ± 9,9
α-Tocopherol und Ascorbinsäure	70 ± 3,5
α-Tocopherol und Quercetin	122 ± 1,4
α-Tocopherol und Epicatechin	108 ± 1,4
α-Tocopherol und Hesperetin	89 ± 14,1
α-Tocopherol und Kaffeesäure	103 ± 12,0
α-Tocopherol und Phloretin	67 ± 5,7
Ascorbinsäure und Quercetin	160 ± 4,9
Ascorbinsäure und Epicatechin	147 ± 3,5
Ascorbinsäure und Hesperetin	68 ± 5,7
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	132 ± 0,0
Ascorbinsäure und Phloretin	83 ± 5,7
Quercetin und Epicatechin	240 ± 2,1
Quercetin und Hesperetin	136 ± 13,4
Quercetin und Kaffeesäure	131 ± 8,5
Quercetin und Phloretin	154 ± 6,4
Epicatechin und Hesperetin	98 ± 7,1
Epicatechin und Kaffeesäure	190 ± 13,4
Epicatechin und Phloretin	108 ± 4,2
Hesperetin und Kaffeesäure	105 ± 2,1
Hesperetin und Phloretin	82 ± 3,5
Kaffeesäure und Phloretin	171
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	139 ± 4,9
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	123 ± 1,4
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	92 ± 1,4
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	118 ± 6,4

Tab. A4: Fortsetzung

α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	103	\pm	3,5
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	245	\pm	13,4
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	235	\pm	2,1
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	231	\pm	12,0
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	264	\pm	4,2
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	240	\pm	2,1
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	286	\pm	12,0
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	448	\pm	14,8

Tab. A5: Verlängerung der lag-phase humaner LDL (Person 5; in %; MEAN und SD) nach Inkubation mit Antioxidantien, im Vergleich zur Kontrolle (LDL ohne Zusatz von Antioxidantien)

Antioxidantien	MEAN ± SD
α-Tocopherol	76 ± 12,0
Ascorbinsäure	39 ± 2,8
Quercetin	107 ± 2,8
Epicatechin	83 ± 2,8
Hesperetin	47 ± 2,1
Kaffeesäure	85 ± 1,4
Phloretin	17 ± 4,2
α-Tocopherol und Ascorbinsäure	50 ± 2,8
α-Tocopherol und Quercetin	105 ± 2,1
α-Tocopherol und Epicatechin	139 ± 2,8
α-Tocopherol und Hesperetin	102 ± 2,1
α-Tocopherol und Kaffeesäure	104 ± 4,9
α-Tocopherol und Phloretin	66 ± 4,2
Ascorbinsäure und Quercetin	189 ± 4,9
Ascorbinsäure und Epicatechin	195 ± 16,3
Ascorbinsäure und Hesperetin	191 ± 9,9
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	198 ± 2,1
Ascorbinsäure und Phloretin	53 ± 2,8
Quercetin und Epicatechin	157 ± 2,1
Quercetin und Hesperetin	138 ± 1,4
Quercetin und Kaffeesäure	193 ± 4,9
Quercetin und Phloretin	104 ± 2,1
Epicatechin und Hesperetin	86 ± 1,4
Epicatechin und Kaffeesäure	173 ± 4,9
Epicatechin und Phloretin	96 ± 2,1
Hesperetin und Kaffeesäure	152 ± 4,2
Hesperetin und Phloretin	43 ± 1,4
Kaffeesäure und Phloretin	152 ± 5,7
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	179 ± 13,4
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Epicatechin	130 ± 11,3
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Hesperetin	134 ± 4,2
α-Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	197 ± 2,8

Tab. A5: Fortsetzung

α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Phloretin	142	\pm	3,5
Quercetin, Epicatechin und α -Tocopherol	220	\pm	5,7
Quercetin, Epicatechin und Ascorbinsäure	291	\pm	2,8
Quercetin, Epicatechin und Hesperetin	243	\pm	4,2
Quercetin, Epicatechin und Kaffeesäure	299	\pm	5,7
Quercetin, Epicatechin und Phloretin	218	\pm	11,3
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin und Kaffeesäure	344	\pm	5,7
Quercetin, Epicatechin, Hesperetin, Kaffeesäure, α -Tocopherol und Ascorbinsäure	459	\pm	8,5

Tab. A6: Fluoreszenzintensität (% des höchsten Wertes, MEAN \pm SD) von LDL (n = 2), inkubiert mit verschiedenen Antioxidantien, zu unterschiedlichen Zeitpunkten während kupfer-induzierter Oxidation

	<i>120 min</i>	<i>180 min</i>	<i>240 min</i>	<i>300 min</i>	<i>360 min</i>	<i>420 min</i>	<i>480 min</i>	<i>530 min</i>
Kontrolle	50 \pm 6,8	25 \pm 2,4	18 \pm 1,3	15 \pm 1,0	13 \pm 0,8	12 \pm 0,7		
α-Tocopherol	67 \pm 9,2	49 \pm 17,7	33 \pm 18,4	23 \pm 9,2	17 \pm 5,7	14 \pm 4,2		
Ascorbinsäure	54 \pm 16,9	29 \pm 14,2	18 \pm 5,9	15 \pm 5,1	12 \pm 3,3	11 \pm 2,9		
Quercetin	78 \pm 2,8	74 \pm 6,7	63 \pm 20,5	44 \pm 23,3	28 \pm 11,7	20 \pm 4,6		
Kaffeesäure	73 \pm 7,4	70 \pm 9,9	58 \pm 22,1	40 \pm 26,6	25 \pm 12,9	18 \pm 6,5	14 \pm 2,1	
α-Tocopherol und Ascorbinsäure	68 \pm 3,7	48 \pm 10,5	27 \pm 11,4	18 \pm 5,6	15 \pm 3,7	12 \pm 3,2	11 \pm 2,1	
α-Tocopherol und Quercetin	75 \pm 1,9	72 \pm 2,7	64 \pm 11,2	51 \pm 20,1	35 \pm 17,6	23 \pm 6,4	18 \pm 2,8	
α-Tocopherol und Kaffeesäure	73 \pm 3,5	71 \pm 4,1	67 \pm 8,2	61 \pm 13,8	49 \pm 12,7	36 \pm 8,0	23 \pm 1,8	
Ascorbinsäure und Quercetin	79 \pm 2,5	73 \pm 5,7	65 \pm 17,3	59 \pm 25,8	50 \pm 32,2	41 \pm 30,4	29 \pm 16,3	21 \pm 7,1
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	76 \pm 4,9	73 \pm 5,7	70 \pm 6,7	70 \pm 10,3	63 \pm 12,7	49 \pm 12,7	33 \pm 2,1	22 \pm 2,8
Quercetin und Kaffeesäure	78 \pm 0,7	77 \pm 1,4	77 \pm 0,7	75 \pm 1,4	74 \pm 1,4	74 \pm 1,4	64 \pm 7,1	48 \pm 12,7

Tab. A7: Carbonylgehalt (nmol Carbonyl/mg Protein; MEAN \pm SD) humaner LDL (n=5) nach Inkubation mit unterschiedlichen Antioxidantien

	MEAN \pm SD						
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Kontrolle	1,3 \pm 0,3	7,7 \pm 2,8	19,8 \pm 4,1	27,0 \pm 4,6	32,9 \pm 4,7	37,1 \pm 4,7	39,6 \pm 5,0
α -Tocopherol	1,2 \pm 0,6	3,2 \pm 1,2	12,9 \pm 6,7	21,6 \pm 7,8	28,8 \pm 8,6	-	-
Ascorbinsäure	1,5 \pm 0,3	5,4 \pm 2,4	16,3 \pm 6,2	24,0 \pm 7,7	32,6 \pm 9,5	-	-
Quercetin	1,5 \pm 0,4	4,0 \pm 0,6	6,6 \pm 1,7	12,6 \pm 5,3	21,0 \pm 6,9	-	-
Kaffeesäure	1,4 \pm 0,3	3,7 \pm 1,0	5,7 \pm 0,9	17,7 \pm 5,8	29,6 \pm 9,5	-	-
α -Tocopherol und Ascorbinsäure	1,5 \pm 0,3	3,7 \pm 0,9	9,5 \pm 4,4	19,5 \pm 7,9	29,4 \pm 10,7	-	-
α -Tocopherol und Quercetin	1,6 \pm 0,2	3,7 \pm 1,0	5,3 \pm 1,0	8,0 \pm 1,9	14,2 \pm 6,2	-	-
α -Tocopherol und Kaffeesäure	1,5 \pm 0,3	3,7 \pm 1,1	5,0 \pm 1,3	10,7 \pm 2,8	22,2 \pm 6,5	-	-
Ascorbinsäure und Quercetin	1,6 \pm 0,6	3,5 \pm 1,1	4,8 \pm 1,4	6,2 \pm 1,8	10,1 \pm 6,5	-	-
Ascorbinsäure und Kaffeesäure	1,5 \pm 0,4	3,8 \pm 0,9	5,4 \pm 1,2	8,0 \pm 2,8	18,5 \pm 4,8	-	-
Quercetin und Kaffeesäure	1,4 \pm 0,4	4,2 \pm 0,9	6,0 \pm 2,3	7,7 \pm 3,1	10,0 \pm 4,2	-	-
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Quercetin	1,4 \pm 0,2	-	5,3 \pm 1,3	-	8,0 \pm 1,5	-	23,2 \pm 5,8
α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Kaffeesäure	1,3 \pm 0,1	-	5,1 \pm 0,6	-	10,7 \pm 2,5	-	35,2 \pm 6,8
α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Quercetin und Kaffeesäure	1,5 \pm 0,5	-	6,9 \pm 0,9	-	9,1 \pm 2,7	-	14,5 \pm 7,7

Tab. A8: Verlängerung der lag-phase von LDL (in % der Kontrolle) nach Inkubation mit Quercetin, Kaffeesäure und strukturverwandten Substanzen

	MEAN ± SD
Quercetin 1 µM	1053 ± 4,2
Kaffeesäure 1 µM	730 ± 5,7
p-Cumarsäure	2 ± 2,8
Dopamin 1 µM	606 ± 3,5
Kaempferol 1 µM	286 ± 8,5
Quercetin 1 µM und Kaffeesäure 1 µM	2190 ± 8,5
Quercetin 0,5 µM und Kaffeesäure 0,5 µM	866 ± 10,6
Quercetin 1 µM und Quercetin 1 µM	1447 ± 22,6
Kaffeesäure 1 µM und Kaffeesäure 1 µM	1047 ± 12,7
Quercetin 1 µM und Dopamin 1 µM	1245 ± 8,5
Quercetin 1 µM und p-Cumarsäure 1µM	1041 ± 13,4
Quercetin 1 µM und Kaempferol 1 µM	993 ± 2,1
Kaffeesäure 1 µM und Kaempferol 1 µM	917 ± 19,8

Tab. A9: Veränderung der lag-phase von LDL (%) inkubiert mit Ferulasäure, Isoferulasäure, Dihydroferulasäure oder o-Hydroxyhippursäure (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (100 %)

	Veränderung der lag-phase (%)											
	1 µM			2,5 µM			5 µM			7,5 µM		
Ferulasäure	-14	-17	-14	-18	-20	-28	0	0	1	+39	+43	+38
Isoferulasäure	-9	-5	-5	-12	-10	-7	-14	-12	-10	-22	-17	-14
Dihydroferulasäure	-26	-28	-17	-33	-33	-36	-33	-35	-36	-31	-33	-29
o-Hydroxyhippursäure	+10	+9	+5	+15	+17	+15	+20	+28	+20	+34	+35	+30

Tab. A10: Veränderung der lag-phase von LDL (% MEAN ± SD) inkubiert mit Zinkhistidin, Zinksulfat oder Histidin (unterschiedliche Konzentrationen) im Vergleich zur Kontrolle (100 %)

	Veränderung der lag-phase				
	2,5 µM	5 µM	7,5 µM	10 µM	20 µM
Zinkhistidin	+21 ± 4,0	+93 ± 4,0	+155 ± 5,2	+205 ± 13,2	
Zinksulfat	-2 ± 3,1	-2 ± 1,1	-2 ± 1,1	-5 ± 6,1	
Histidin	+11 ± 1,3	+34 ± 0,6	+133 ± 0,9		+230 ± 2,3

Lebenslauf

Name Vera Christiane Yeomans
Geburtsdatum 08.07.1970
Geburtsort München
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung

1976-1978 Volksschule, München
1978-1981 Volksschule Uffing, Seehausen am Staffelsee
1981-1990 Benedikt-Stattler Gymnasium, Kötzing
Abschluss allgemeine Hochschulreife

Studium

1991-1996 Studium der Ökotrophologie an der Technischen Universität
München-Weihenstephan

Promotion

07.1997-09.2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Ernährungslehre,
Department für Lebensmittel und Ernährung der Technischen
Universität München-Weihenstephan