

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

**Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetes-assoziierte  
Risikofaktoren für Dickdarmkrebs und das Polyphenolprofil  
bei gesunden Probanden**

**Heike Daumann**

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 Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schemann  
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. G. Rechkemmer  
Universität Karlsruhe (TH)  
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 29.01.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.07.2009 angenommen.

*Meiner Familie*

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>III</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>IV</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Darmkrebs</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologische Daten.....	1
1.1.2	Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese.....	1
1.1.3	Einflussfaktoren auf die Entstehung kolorektaler Karzinome.....	2
1.1.3.1	Alimentäre Einflussfaktoren .....	2
1.1.3.2	Adipositas und Typ 2-Diabetes als Risikofaktoren .....	4
1.1.4	Relevante Biomarker aus Humaninterventionsstudien.....	6
1.1.4.1	Diabetes- und Adipositas-assoziierte Biomarker für Dickdarmkrebs.....	6
1.1.4.2	Kolonkarzinogenese-relevante Fäzeswasserbiomarker.....	8
<b>1.2</b>	<b>Polyphenole</b> .....	<b>10</b>
1.2.1	Chemische Struktur, Biosynthese und Vorkommen.....	10
1.2.2	Polyphenole in Äpfeln und Apfelsaft.....	14
1.2.2.1	Resorption, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Apfelsaftpolyphenolen.....	18
1.2.2.2	Protective Wirkung von Apfelsaftpolyphenolen.....	22
<b>1.3</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien und Chemikalien</b> .....	<b>29</b>
2.1.1	Allgemein verwendete Geräte und Materialien.....	29
2.1.2	Allgemein verwendete Chemikalien.....	31
2.1.3	Geräte und Materialien für die Fäzeswasserpräparation.....	31
2.1.4	Chemikalien für die Fettsäureanalytik (GC/FID).....	32
2.1.5	Geräte und Materialien für die Festphasenextraktion.....	32
2.1.6	Chemikalien für die Polyphenolanalytik (GC/MS).....	33

2.1.7	ELISA-Materialien.....	35
2.1.8	Zusammensetzung des Apfelsaftes und des Kontrollgetränkes für die Humaninterventionsstudie.....	36
<b>2.2</b>	<b>Rekrutierung und medizinische Voruntersuchung für die Humaninterventionsstudie.....</b>	<b>39</b>
2.2.1	Probanden-Rekrutierung.....	39
2.2.2	Ablauf der medizinischen Voruntersuchung.....	39
<b>2.3</b>	<b>Durchführung der Humaninterventionsstudie.....</b>	<b>40</b>
2.3.1	Studiendesign.....	40
2.3.2	Ablauf der Hauptuntersuchung.....	41
2.3.3	Probennahme und Aufbewahrung.....	42
<b>2.4</b>	<b>Fäzes- und Fäzeswasseruntersuchungen.....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Gewinnung von Fäzeswasser.....	43
2.4.2	Bestimmung des Stuhlwassergehaltes.....	43
2.4.3	Polyphenolanalytik in Fäzeswasser mittels GC/MS.....	44
2.4.4	Fettsäureanalytik in Fäzeswasser mittels GC/FID.....	46
<b>2.5</b>	<b>Polyphenolanalytik in Urin mittels GC/MS.....</b>	<b>46</b>
<b>2.6</b>	<b>Polyphenolanalytik in Plasma mittels GC/MS.....</b>	<b>47</b>
<b>2.7</b>	<b>Enzymgekoppelte Immunabsorptionstests (ELISA) .....</b>	<b>48</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung der Daten.....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der Probandenrekrutierung.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2</b>	<b>Daten aus der Ernährungserhebung.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf anthropometrische und Fettstoffwechselfparameter.....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Anthropometrische Parameter.....	53
3.3.2	Fettstoffwechselfparameter.....	54
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Fäzes- und Fäzeswasserparameter.....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Stuhlgewicht, Stuhlwassergehalt und pH-Wert.....	55
3.4.2	Kurzkettige Fettsäuren in Fäzeswasser.....	56
3.4.3	Fäzeswasser-Zytotoxizität.....	56
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf das Polyphenolprofil.....</b>	<b>59</b>

3.5.1	Polyphenolprofil in Urin und Fäzeswasser.....	59
3.5.1.1	Hydroxybenzoesäuren und Phlorogluzinol.....	60
3.5.1.2	Hydroxyphenyllessigsäuren.....	62
3.5.1.3	Hydroxyphenylpropionsäuren.....	64
3.5.1.4	Hydroxyzimtsäuren.....	66
3.5.1.5	Intakte Apfelsaftpolyphenole.....	68
3.5.2	Polyphenole in Plasma.....	69
<b>3.6</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum Diabetes- und Adipositas-assozierte Risikofaktoren für Dickdarmkrebs.....</b>	<b>70</b>
3.6.1	Diabetesmarker.....	70
3.6.2	Adipositasmarker.....	71
3.6.3	Entzündungsmarker.....	72
3.6.4	Korrelationsananalysen.....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Probandendaten, Studiendesign und Compliance.....</b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf anthropometrische und Fettstoffwechselfparameter.....</b>	<b>75</b>
4.2.1	Anthropometrische Parameter.....	75
4.2.2	Fettstoffwechselfparameter.....	77
<b>4.3</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Fäzes- und Fäzeswasserparameter.....</b>	<b>79</b>
4.3.1	Stuhlgewicht und Stuhlwassergehalt.....	79
4.3.2	pH-Wert von Fäzeswasser.....	81
4.3.3	Kurzkettige Fettsäuren.....	81
4.3.4	Fäzeswasser-Zytotoxizität.....	82
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von Apfelsaftkonsum auf das Polyphenolprofil in Urin, Fäzeswasser und Plasma.....</b>	<b>84</b>
4.4.1	Einfluss auf die Konzentrationen an intakten Apfelsaft-Polyphenolen.....	84
4.4.2	Einfluss auf die Konzentrationen an Phenolsäuren.....	86
<b>4.5</b>	<b>Beeinflussung Adipositas- und Diabetes-assoziierter Risikofaktoren für Dickdarmkrebs durch Apfelsaftkonsum.....</b>	<b>90</b>
4.5.1	Diabetesmarker.....	90

4.5.2	Adipositasmarker.....	92
4.5.3	Entzündungsmarker.....	94
<b>4.6</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick.....</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>131</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese.....	1
Abbildung 1.2:	Biosyntheseweg der verschiedenen Flavonoide.....	10
Abbildung 1.3:	Struktur verschiedener Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren.....	11
Abbildung 1.4:	Struktur des Flavan.....	12
Abbildung 1.5:	Struktur von Flavonoiden und Dihydrochalkonen des Apfels.....	15
Abbildung 1.6:	Postulierter Abbau von Quercetin durch <i>Eubacterium ramulus</i> .....	19
Abbildung 1.7:	Postulierter Abbau der Chlorogensäure im Menschen.....	21
Abbildung 1.8:	Struktur des Flavonols Quercetin.....	24
Abbildung 2.1:	Studiendesign der fünfwöchigen Humaninterventionsstudie.....	41
Abbildung 3.1:	Ergebnis des oralen Glukosetoleranztests von Apfelsaft- und Kontrollgruppe.....	51
Abbildung 3.2:	Zytotoxischer, dosisabhängiger Effekt von Fäzeswasser.....	55
Abbildung 3.3:	Einfluss der Apfelsaftinterventionen auf die Fäzeswasser- Zytotoxizität.....	55
Abbildung 3.4:	Einfluss der Apfelsaftinterventionen auf die Fäzeswasser- Zytotoxizität.....	55
Abbildung 3.5:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an 3-OH-BA, Phlorogluzinol und Vanillinsäure in Urin.....	56
Abbildung 3.6:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an 3-OH-BA, Phlorogluzinol und Vanillinsäure in Fäzeswasser.....	57
Abbildung 3.7:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Hydroxyphenylelessigsäuren in Urin.....	58
Abbildung 3.8:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Hydroxyphenylelessigsäuren in Fäzeswasser.....	59
Abbildung 3.9:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phenylpropionsäuren in Urin.....	60
Abbildung 3.10:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phenylpropionsäuren in Fäzeswasser.....	61
Abbildung 3.11:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Hydroxyzimtsäuren in Urin.....	62

Abbildung 3.12:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Hydroxyzimtsäuren in Fäzeswasser.....	63
Abbildung 3.13:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an intakten Apfelsaftpolyphenole in Urin und Fäzeswasser.....	64
Abbildung 3.14:	Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phenolsäuren in Plasma.....	65



### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Die wichtigsten Verbindungsklassen der Flavonoide mit ihren Vorkommen und Eigenschaften.....	13
Tabelle 1.2:	Polyphenolgehalte in trüben Apfelsäften.....	16
Tabelle 2.1:	Konzentration in mg/L der Polyphenole im Apfelsaft AS05.....	37
Tabelle 2.2:	Vergleich des in der Humaninterventionsstudie eingesetzten Kontrollgetränkes bzw. Apfelsaftes.....	38
Tabelle 3.1:	Anthropometrische Daten und Fettstoffwechselfparameter der Apfelsaft- und Kontrollgruppe.....	50
Tabelle 3.2:	Kontrollierte Nährstoffaufnahme während der Probensammlung.....	52
Tabelle 3.3:	Einfluss der Getränkeinterventionen auf anthropometrische Daten.....	52
Tabelle 3.4:	Einfluss der Getränkeinterventionen auf Fettstoffwechselfparameter.....	53
Tabelle 3.5:	Einfluss der Getränkeinterventionen auf verschiedene Fäzes- und Fäzeswasserparameter.....	54
Tabelle 3.6:	Flüssigkeitszufuhr der Probanden während der Stuhlsammelperiode.....	54
Tabelle 3.7:	Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetesmarker.....	66
Tabelle 3.8:	Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Adipositasmarker.....	67
Tabelle 3.9:	Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Entzündungsmarker.....	68
Tabelle 8.1:	Retentionszeiten und Massenübersicht der im Rahmen dieser Studie erfassten Polyphenole für die GC/MS-Analytik.....	131
Tabelle 8.2:	Datenwerte (MW $\pm$ STABW) der kurzkettigen Fettsäuren der Apfelsaft- und Kontrollgruppe aus den betreffenden Studienphasen.....	133
Tabelle 8.3:	Angeordnete Mahlzeiten während der 48-stündigen Sammelperiode.....	134
Tabelle 8.4a:	Wöchentliches Ernährungsprotokoll zur Apfelsaftstudie Teil 1.....	136
Tabelle 8.4b:	Wöchentliches Ernährungsprotokoll zur Apfelsaftstudie Teil 2.....	137
Tabelle 8.5:	Protokoll zu Dokumentation der Trinkmenge.....	138

## IV Abkürzungsverzeichnis

*	signifikant mit $p < 0,05$
**	signifikant mit $p < 0,01$
***	signifikant mit $p < 0,001$
amu	<i>atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
ACN	Acetonitril
AS	Apfelsaft
AS05	Apfelsaft Erntejahr 2005
BA	Benzoessäure
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	<i>Body mass index</i>
BMR	<i>Basal metabolic rate</i> (Grundumsatz)
BSTFA	N,O-bis-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CRP	<i>Capsel-reactive protein</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	<i>Electron impact</i> (Elektronenstoß)
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
gGT	gamma-Glutamyl-Transpeptidase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HbA1c	Hämoglobin A1c (glykiertes Hämoglobin)
HCl	Salzsäure
HDL	<i>High density lipoproteins</i> (Lipoproteine hoher Dichte)
HK	Hämatokrit
KG	Kontrollgetränk
LDL	<i>Low density lipoproteins</i> (Lipoproteine niedriger Dichte)
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IGFBP	<i>IGF-binding protein</i>
IS	Interner Standard
M	Molekulargewicht

m/z	Masse / Ladungsverhältnis
mAU	<i>Milli absorption units</i> (Milliabsorptionseinheiten)
MCH	<i>mean corpuscular haemoglobin</i> (Hämoglobingehalt eines Einzel-Erythrozyten)
MCHC	<i>mean corpuscular haemoglobin concentration</i> (mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt)
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> (Volumeninhalt des Einzel-Erythrozyten)
MeOH	Methanol
MW	arithmetischer Mittelwert
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert.</i> -Butylether
MTBSTFA	<i>N-tert</i> -Butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoroacetamid
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i> (Phosphatpuffer mit 0,15 M NaCl, pH = 7,3)
PA	Phenyllessigsäure
PP	Phenylpropionsäure
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RKI	Robert Koch-Institut
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RR	<i>Relative Risk</i>
RT	Raumtemperatur
STABW	Standardabweichung
sICAM	<i>Soluble intracellular adhesion molecule</i>
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
sVCAM	<i>Soluble vascular cell adhesion molecule</i>
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TMS-	Trimethylsilyl-
TMCS	Trimethylchlorsilan
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WHR	<i>Waist-to-hip-ratio</i> (Taille-Hüft-Verhältnis)
U	Units



# 1 Einleitung

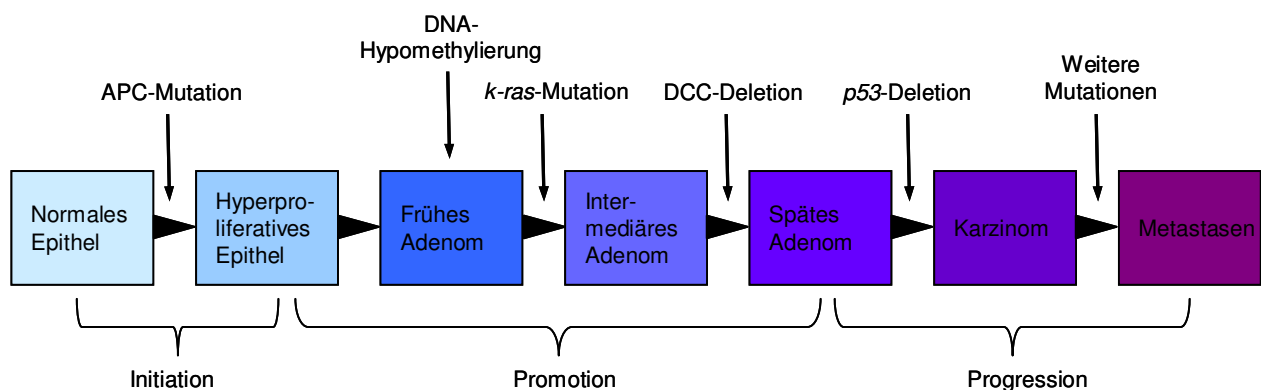
## 1.1 Darmkrebs

### 1.1.1 Epidemiologische Daten

Maligne Tumoren des Darms (des Dickdarms und des Mastdarms) stellen weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung dar. In Deutschland zählt das kolorektale Karzinom nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen zu der häufigsten Krebstodesursache. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird auf 35.000 geschätzt. Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder steht die Inzidenz für Kolorektalkrebs in Deutschland für Frauen an erster, für Männer an vierter Stelle [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, 2006].

### 1.1.2 Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese

Der Übergang einer gesunden Zelle infolge neoplastischer Transformation in eine Krebszelle und deren klonales Auswachsen zu einem Tumor ist nach heutiger Auffassung ein mehrstufiger Prozess, der beim Menschen Jahre bis Jahrzehnte benötigt. Der Gesamtprozess wird in die drei Phasen Initiation, Promotion und Progression unterteilt, die allesamt durch zunehmende Mutationen in zellwachstumsregulierenden Genen gekennzeichnet sind [Gryfe *et al.*, 1997]. Das Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese (Abbildung 1.1), die Adenom-Karzinom-Sequenz, wurde erstmals 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben [Fearon & Vogelstein, 1990]. Es schildert, wie durch die Akkumulation verschiedener Gendefekte ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen etabliert wird, die es der transformierten Zelle ermöglichen, den Kontrollpunkten des Zellzyklus bzw. der Apoptose zu entgehen.



**Abbildung 1.1:** Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese; modifiziert nach [Fearon & Vogelstein, 1990].

Auf genetischer Ebene sind Mutationen in drei Genklassen von Bedeutung für die Krebsentstehung:

- Protoonkogene: kodieren Proteine, die das Zellwachstum und die –differenzierung steuern. Infolge genetischer Modifikationen werden sie zu Onkogenen und fördern abnormales Zellwachstum [Gryfe *et al.*, 1997].
- Tumorsuppressorgene: kontrollieren das Zellwachstum durch Zellzyklusarrest und Einleitung des programmierten Zelltods. Ein Tumorsuppressorgen, das in über 50 % aller Kolon-Adenokarzinome mutiert ist, ist *p53*. Es aktiviert die Transkription nachgeordneter Gene, die Zellzyklus und Apoptose regulieren [Narayan & Roy, 2003; Gryfe *et al.*, 1997].
- DNA-Reparaturgene: sind für eine fehlerfreie DNA-Replikation von Bedeutung. Ihre Inaktivierung durch genetische Modifikation führt zu Mutationen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgen [Lynch & Lynch, 1998].

### **1.1.3 Einflussfaktoren auf die Entstehung kolorektaler Karzinome**

Das steigende Inzidenzrisiko für das Kolonkarzinom in Wohlstandsgesellschaften ist insbesondere durch eine überhöhte Energieaufnahme mit vergleichsweise geringer körperlicher Aktivität und Übergewicht gekennzeichnet. Neben alimentären Einflussfaktoren (Abschnitt 1.1.3.1) können Zivilisationskrankheiten wie Typ 2-Diabetes und Adipositas (Abschnitt 1.1.3.2) das Erkrankungsrisiko aufgrund chronischer entzündlicher Prozesse zusätzlich signifikant verstärken [Giovannucci *et al.*, 1995].

#### **1.1.3.1 Alimentäre Einflussfaktoren**

Aufgrund ihrer komplexen Interaktion mit vielen Stoffwechselprozessen und ihrer Fähigkeit, molekulare Mechanismen der Kanzerogenese beeinflussen zu können, kommt der Ernährung in der Kolonkarzinogenese eine große Bedeutung zu [Willett, 2001]. Schätzungen ergaben, dass etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome durch Ernährungsintervention vermieden werden könnten. Während bestimmte Nahrungsmittel bzw. ihre Bestandteile protektive Effekte ausüben, wirken andere potenziell kanzerogen [Stewart & Kleihues, 2003].

Laut neuesten statistischen Erhebungen des *World Cancer Research Fund* (WCRF) wird das Inzidenzrisiko für Dickarmkrebs durch eine hohe Energieaufnahme (Fette, Kohlenhydrate, zucker- und alkoholhaltige Getränke), verbunden mit einer bewegungsarmen Lebensweise, gestärkt. Insbesondere der häufige Verzehr von gegrilltem oder rotem Fleisch (z.B. Rind, Lamm) scheint das Risiko für die Entstehung kolorektaler Tumoren erheblich zu erhöhen. Dies ist, neben der hohen Energiezufuhr, auch zurückzuführen auf potentiell enthaltene Mutagene wie heterozyklische Amine

und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die beim Grillen oder Braten von Fleisch entstehen. Eine weitere wichtige Rolle scheinen *N*-Nitroso-Verbindungen zu spielen, die in gepökelten und geräucherten Fleischwaren enthalten sind bzw. durch endogene Produktion beim Verzehr von rotem Fleisch entstehen können. Laut Empfehlung des WCRF soll eine wöchentliche Aufnahme von 500 g rotem Fleisch nicht überschritten werden [WCRF, 2006].

Vorbeugend hingegen wirken neben täglicher körperlicher Aktivität von 30 bis 60 Minuten eine kalorienreduzierte Kost in Form von Lebensmitteln mit einem hohen Wasser- und Ballaststoffgehalt wie beispielsweise Gemüse, Obst und Getreideprodukte [WCRF, 2006]. Der präventive Effekt von Ballaststoffen im Zusammenhang mit Dickdarmkrebs wird unter anderem auf eine beschleunigte Stuhl-Transitzeit, eine Erhöhung der Wasserbindungskapazität und des Stuhlgewichtes zurückgeführt. Potenziell karzinogene Substanzen verweilen dadurch kürzer im Darmlumen und werden stärker verdünnt [Gazzaniga & Lupton, 1987]. Durch Übergewicht und Bewegungsmangel ist die Kolontransitzeit verlängert, was eine potentielle Ursache für die Schädigung des Darmepithels infolge längerer Einwirkung toxischer Substanzen sein könnte [Sandler, 1996]. Ergebnisse der EPIC<sup>1</sup>-Studie zeigen, dass das Kolorektalkrebsrisiko in Populationen mit einem niedrigen Verzehr von ballaststoffreicher Nahrung bei Verdopplung der Ballaststoffaufnahme um bis zu 40 % gesenkt werden kann. Außerdem bewirkt die gesteigerte Fermentation der unverdaulichen Kohlenhydrate durch die intestinale Mikroflora eine erhöhte Konzentration kurzkettiger Fettsäuren wie Butyrat im Darmlumen, welche *in vitro* krebsprotektive Wirkung gezeigt haben [Gamet *et al.*, 1992; Hague & Paraskeva, 1995].

Zu den weiteren krebsprotektiven Nahrungsbestandteilen, insbesondere in Obst und Gemüse, zählen die sekundären Pflanzenstoffe. Am weitesten verbreitet in pflanzlicher Nahrung ist die Gruppe der Polyphenole [Kris-Etherton *et al.*, 2002]. Neben ihren antikarzinogenen, antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften könnte auch ihr antidiabetisches Potential in der Prävention von Adipositas- und Diabetes-assoziierten Risikofaktoren für Dickdarmkrebs von großer Bedeutung sein [Lin & Lin-Shiau, 2006]. Die Stoffgruppe der Polyphenole mit ihren präventiven Eigenschaften wird in Abschnitt 1.2 ausführlich diskutiert.

---

<sup>1</sup> EPIC = European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

### 1.1.3.2 Adipositas und Typ 2-Diabetes als Risikofaktoren

#### Definition und Ursachen von Adipositas und Typ 2-Diabetes

Die Adipositas (Fettleibigkeit, Fettsucht) bezeichnet eine übermäßige Akkumulation von Körperfett, die eine Beeinträchtigung der Gesundheit zur Folge haben kann (Walker *et al.*, 2007). Zur Abschätzung der Adipositas einer Person wird in der Regel der *Body Mass Index* (BMI) herangezogen, der Quotient von Körpergewicht zum Quadrat der Körpergröße. Die *World Health Organisation* (WHO) definiert Normalgewicht ab einem BMI von 18,5 bis 24,9 kg/m<sup>2</sup>, ab einem BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> spricht man von Übergewicht (Präadipositas), ab 30 kg/m<sup>2</sup> von Adipositas [WHO 2003]. Neben dem BMI spielt auch die anatomische Verteilung der Fettdepots eine wichtige Rolle. Bei adipösen Männern liegt häufig eine viszerale Fettverteilung vor, d. h. die Fettdepots verteilen sich auf die Bereiche Bauchhaut, Rücken und Seiten sowie an den inneren Organen (Magen, Darm, Leber). Die Fettverteilung kann durch Bestimmung des Taillen-Hüftquotienten (*Waist to Hip Ratio*, WHR) indirekt erfasst werden [Dalton *et al.*, 2003]. Die von der WHO empfohlenen Maximalwerte liegen bei Männern unter 1,0 [WHO 2003]. In Deutschland sind 66 % der Männer und 50,6 % der Frauen übergewichtig oder adipös [Nationale Verzehrstudie II, 2008]. Neben genetischer Prädisposition für Adipositas gelten insbesondere eine hohe Energieaufnahme in Form von Nahrungsfetten und Kohlenhydraten sowie eine bewegungsarme Lebensweise als Ursachen [Robert Koch-Institut, 2006].

Typ 2-Diabetes ist ein heterogenes Krankheitsbild, bei dem sowohl genetische Faktoren als auch äußere Einflüsse wie Übergewicht und eine kalorienreiche Ernährung eine Rolle spielen. Kennzeichen des Typ 2-Diabetes sind ein überhöhter Blutzuckerspiegel, bedingt durch eine Insulinresistenz. Neben der Glukosehomöostase werden auch Fett- und Aminosäurestoffwechsel beeinträchtigt. Diese Defekte können bereits lange vor dem Auftreten eines manifesten Typ 2-Diabetes entstehen (prädiabetische Phase) [Haffner *et al.*, 1990]. Insulin ist an der hormonellen Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt. Seine Sekretion erfolgt durch den Pankreas aus den B-Zellen der Langerhans-Inseln und wird durch einen Anstieg der Glukosekonzentration im Blut nach alimentärer Aufnahme von Kohlenhydraten stimuliert. Unter der Einwirkung des Insulins kommt es zu einer Aufnahme der Glukose in fast alle Körperzellen, so dass die Blutglukosekonzentration wieder absinkt. Ein ständig überhöhter Blutzuckerspiegel kann zu einer Insulinresistenz im Bereich Skelettmuskulatur, Leber und Fettgewebe führen. Die B-Zellen des Pankreas reagieren mit einer erhöhten Sekretion von Insulin, um den Blutglukosespiegel wieder zu senken (Hyperinsulinämie). Ohne präventive Gegenmaßnahmen wie beispielsweise Umstellung der Ernährung auf energiearme Kost und Gewichtsreduktion führen diese Störungen zur Manifestierung der Krankheit, welche durch eine Dysfunktion der B-Zellen des Pankreas und damit einem relativen Insulinmangel charakterisiert



ist [Spinas & Lehmann, 2001]. In Deutschland leben zurzeit ca. sechs Millionen Menschen mit einem diagnostizierten Diabetes mit steigender Inzidenz [Deutsche Diabetes Union, 2006; Robert Koch-Institut, 2005]. Methoden, um bei einer Person Insulinresistenz bzw. einen manifesten Diabetes festzustellen, stellen die Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests dar bzw. die Messung von Glykohämoglobin (HbA1c). HbA1c beschreibt den prozentualen Anteil an glukosyliertem Hämoglobin im Blut und ist bei unbehandelten Diabetikern signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Personen. Aufgrund der langen Lebensdauer von Erythrozyten spiegelt dieser Marker den Blutzuckerverlauf der letzten acht Wochen wider [Rohlfing *et al.*, 2002].

### **Evidenz aus epidemiologischen Daten**

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsrisiko für kolorektale Karzinome bei Personen mit Adipositas bzw. Typ 2-Diabetes.

In prospektiven Kohortenstudien konnte nachgewiesen werden, dass das Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinome besonders bei adipösen Männern, aber auch bei Frauen, signifikant erhöht ist im Vergleich zu normalgewichtigen [Terry *et al.*, 2002; Pischon *et al.*, 2006]. Giovannucci *et al.* wiesen nach, dass neben einem hohen BMI insbesondere ein WHR  $\geq 0,99$  das Inzidenzrisiko bei Männern erheblich steigert (*Relative Risk*, RR = 3,41). Des Weiteren fanden sie eine inverse Korrelation zwischen physischer Aktivität und dem Erkrankungsrisiko für Dickdarmkrebs [Giovannucci *et al.*, 1995].

Coughlin *et al.* zeigten in einer prospektiven Kohortenstudie über 16 Jahre mit ca. 1,2 Millionen US-Bürgern, dass Diabetes signifikant mit einer erhöhten Mortalität durch Dickdarmkrebs bei Männern (RR = 1,2) und bei Frauen (RR = 1,24) in Zusammenhang steht. Diese Assoziation konnte nicht durch einen hohen BMI erklärt werden [Coughlin *et al.*, 2004]. In der „Iowa Women`s Health Study“ wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte Inzidenzrate für kolorektale Tumoren (RR = 1,4) für Diabetikerinnen im Vergleich zu Frauen ohne Diabetes Typ 2 nachgewiesen [Limburg *et al.*, 2005]. Eine Metaanalyse diverser Fall-Kontroll- und Kohortenstudien mit insgesamt über 2,5 Millionen Teilnehmern bestätigte die Assoziation von Diabetes mit einem erhöhten Inzidenzrisiko (RR = 1,30) bzw. mit einer erhöhten Mortalität (RR = 1,26) für Kolonkrebs [Larsson *et al.*, 2005].

## 1.1.4 Relevante Biomarker für Humaninterventionsstudien

### 1.1.4.1 Diabetes- und Adipositas-assoziierte Biomarker für Dickdarmkrebs

Sowohl tierexperimentell als auch am Menschen konnte gezeigt werden, dass mit Adipositas-bedingter übermäßiger Akkumulation von Fett sowie durch Typ 2-Diabetes-bedingter Insulinresistenz ein subchronischer Entzündungszustand einhergeht. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine, oxidativen Stress und eine erhöhte Konzentration zirkulierender Wachstumsfaktoren wie Insulin und IGF-1<sup>2</sup> [Yudkin, 2003]. Es gibt zahlreiche Biomarker, die zur Abschätzung des Risikos für Dickdarmkrebs in Humanstudien untersucht werden können; ihre Wirkung in Diabetes- und Kolonkarzinogenese-promovierenden Mechanismen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

#### Diabetesmarker

IGF-1, auch unter dem Begriff Somatomedin C bekannt, vermittelt die wichtigsten wachstumsfördernden Wirkungen durch Stimulation der Zellteilung. In der Aminosäuresequenz haben die Somatomedine etwa 40 % Homologie zum Insulin. IGF-1 bindet mit geringer Affinität an den Insulin-Rezeptor, wie auch das Insulin an den IGF-1-Rezeptor bindet. Durch die Typ-2 Diabetes-bedingte Insulinresistenz werden das Kolonepithel und andere Kompartimente des Organismus ständig erhöhten Konzentrationen an zirkulierendem Insulin und IGF-1 exponiert [Bruce *et al.*, 2000]. Diese haben sowohl bei Studien mit Kolonkarzinomzellen als auch tierexperimentell proliferative Wirkungen gezeigt [Koenuma *et al.*, 1989; Koohestani *et al.*, 1997]. Ein weiterer Faktor für die gesteigerte Proliferationsrate durch Insulin und IGF-1 in der Kolonkarzinogenese scheint die Überexpression von IGF-1-Rezeptoren in Kolonkarzinomzellen zu sein. Ferner wird durch die Hyperinsulinämie die Konzentration an zirkulierenden IGF-Bindungsproteinen (IGFBP) beeinträchtigt, welche die Funktion haben, IGF-1 zu binden und zu inaktivieren. Die infolge der Hyperinsulinämie erhöhte Proliferationsrate und Zellteilungsrate des Darmepithels erhöht die statistische Wahrscheinlichkeit für Mutationen [Adenis *et al.*, 1995; Giovannucci, 2001].

---

<sup>2</sup> IGF-1=Insulin-like Growth Factor

## Adipositasmarker

Die viszeralen Fettzellen erfüllen neben ihrer Funktion als Lipidspeicher auch die Rolle als endokrin aktives Organ durch Sezernierung verschiedener hormonell aktiver Proteine, die unter dem Begriff „Adipokine“ oder „Adipozytokine“ zusammengefasst werden. Bei Adipositas zirkulieren diese in der Blutbahn in pathologisch veränderter Konzentration, und es gibt Hinweise, dass dies im engen Zusammenhang mit Insulinresistenz-promovierenden Prozessen steht.

Das erst im Jahre 2001 entdeckte Resistin scheint ein entscheidender Faktor für die Entwicklung der Insulinresistenz zu sein, jedoch ist die bisherige Datenlage noch unzureichend [Kowalska, 2007]. Im Fettgewebe adipöser Ratten wurde eine erhöhte Expression von Resistin festgestellt, ferner wurde eine gesteigerte Konzentration im Plasma gemessen [Steppan *et al.*, 2001]. Untersuchungen deuten auf eine Stimulation des NF- $\kappa$ B<sup>3</sup>-Signalweges durch Resistin hin, wodurch entzündliche Prozesse gesteigert werden [Bokarewa *et al.*, 2005]. In klinischen Studien korrelierte Resistin positiv mit proinflammatorischen Markern wie IL-6<sup>4</sup>. Eine positive Assoziation zwischen Resistin und dem BMI konnte beim Menschen bislang jedoch nicht festgestellt werden [Fehmann & Heyn, 2002; Reilly *et al.*, 2005].

Im Gegensatz zu Resistin scheint Adiponektin eine protektive Funktion auf die Insulinsensitivität durch Hemmung der hepatischen Glukoneogenese sowie Stimulation der Fettsäureoxidation und des Glukosemetabolismus auszuüben [Vendrell *et al.*, 2004]. In experimentellen und epidemiologischen Studien wurde eine geringere Adiponektinkonzentration bei Adipösen und Typ 2-Diabetikern im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen [Arita *et al.*, 1999; Hotta *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2002].

Die wichtigste Funktion des fettgewebsspezifischen Peptidhormons Leptin besteht in der Regulation der Nahrungsaufnahme: Hohe Leptinspiegel führen zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Energieaufnahme und -verbrauch mit der Folge, dass vermehrt Fettreserven aufgebraucht werden [Rehner & Daniel, 2002]. Die Plasmakonzentration von Leptin ist mit der Fettmasse des Körpers direkt proportional. Bei der Adipositas des Menschen liegen folglich hohe Leptinspiegel vor, jedoch erfüllt das Leptin seine physiologische Wirkung nur noch in unzureichender Weise, weshalb von einer Leptin-Resistenz gesprochen werden kann [Frederich *et al.* 1995]. Zimmet *et al.* wiesen eine positive Assoziation zwischen einem erhöhten Leptinspiegel und der Insulinkonzentration im Menschen nach, was den bedeutenden Einfluss von Adipositas in der Entwicklung von Diabetes verdeutlicht [Zimmet *et al.*, 1996].

---

<sup>3</sup> NF- $\kappa$ B=Nuclear Factor kappa B

<sup>4</sup> IL-6=Interleukin 6

## Entzündungsmarker

Neben der Sezernierung fettgewebsspezifischer Hormone (s.o.) konnten die Adipozyten auch als Expressionsort proinflammatorischer Zytokine identifiziert werden. So wird die in der Adipositas erhöhte intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) im Zusammenhang mit einer gesteigerten Expression von Entzündungsmarkern wie TNF- $\alpha$ <sup>5</sup> und IL-6 diskutiert [Hotamisligil *et al.*, 1993; Keaney, Jr. *et al.*, 2003; Diamant *et al.*, 2005]. Die Entzündungsmediatoren stimulieren prooxidative Enzyme wie die Lipoxygenase oder NADPH<sup>6</sup>-Oxidase, welche zu einer Steigerung der Lipidperoxidation beitragen [Fenster *et al.*, 2002]. Ferner regt IL-6 die hepatische Stimulation des Akute Phase Proteins CRP<sup>7</sup> an. Verschiedene Humanstudien haben gezeigt, dass der CRP-Plasmaspiegel positiv mit dem BMI assoziiert ist [Erlinger *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2007]. TNF- $\alpha$  kann spezifisch die Insulinrezeptor-vermittelte Glukoseaufnahme in die Muskelzellen blockieren und senkt somit die Insulinsensitivität [Steinberg, 2007]. Des Weiteren ist TNF- $\alpha$  ein Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, welcher antiapoptotische und proliferative Prozesse der Zelle einleitet. Eine übermäßige Aktivierung von NF- $\kappa$ B konnte bei verschiedenen humanen Krebserkrankungen, so auch bei kolorektalen Tumoren, identifiziert werden [Rayet & Gelinas, 1999].

Weitere Biomarker, die im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen stehen, sind die Adhäsionsmoleküle ICAM<sup>8</sup> und VCAM<sup>9</sup>. Die physiologische Aufgabe der Proteine besteht darin, der Migration von Immunzellen ins Gewebe zu verhelfen. Eine Hochregulierung dieser Proteine bedeutet eine Verstärkung der Immunantwort. Für den Organismus hat eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle möglicherweise eine Steigerung von Gewebeschäden zur Folge, wie es beispielsweise bei atherosklerotischen Prozessen der Fall ist [Papayianni *et al.*, 2002].

### 1.1.4.2 Kolonkarzinogenese-relevante Fäzeswasserbiomarker

Die Untersuchung der wässrigen Phase des Stuhls (Fäzeswasser) liefert wichtige Information über Mechanismen, die mit der Ernährung und der Entstehung von Dickdarmkrebs zusammenhängen. Substanzen, die in der wässrigen Phase des Stuhls gelöst sind, stehen enger mit der Darmmukosa in Kontakt als Substanzen der festen Phase [Rafter *et al.*, 1987]. Die Zusammensetzung von Fäzeswasser ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheinen sowohl tumorpromovierende als auch antikarzinogen wirkende Agenzien im Stuhlwasser enthalten zu sein. Es gibt Hinweise, dass

---

<sup>5</sup> TNF- $\alpha$ =Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

<sup>6</sup> NADPH=Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat

<sup>7</sup> CRP=C-reactive Protein

<sup>8</sup> ICAM=Intracellular Adhesion Molecule

<sup>9</sup> VCAM=Vascular Cell Adhesion Molecule

die Zusammensetzung und Eigenschaften von Fäzeswasser entscheidend durch die Ernährung beeinflusst werden [Rafter *et al.*, 1987; Govers *et al.*, 1996; Glinghammar *et al.*, 1997]. Um den Einfluss der Ernährung auf das schädigende Potential der wässrigen Phase des Stuhls abschätzen zu können, werden verschiedene Messparameter wie beispielsweise Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften, des pH-Wertes oder des Gehaltes an mikrobiellen Abbauprodukten wie kurzkettigen Fettsäuren in Fäzeswasser eingesetzt [Karlsson, 2005].

Die Zytotoxizität von Fäzeswasser wurde in mehreren Untersuchungen als Messparameter zur Abschätzung des schädigenden Potentials von Substanzen in der wässrigen Phase des Stuhls genutzt [Rafter *et al.*, 1987b; Govers *et al.*, 1996; Glinghammar *et al.*, 1997]. Dabei wird angenommen, dass durch die zytotoxischen Eigenschaften des Fäzeswasser vermehrt Epithelzellen der Darmmukosa absterben und es zu einer gesteigerten proliferativen Aktivität von Kryptenzellen kommt, womit sich das Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms erhöht [Gill & Rowland, 2002]. Es wird vermutet, dass die Zytotoxizität von Fäzeswasser durch die Ernährung maßgeblich beeinflusst wird. Insbesondere eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährung wird mit einer gesteigerten Fäzeswasser-Zytotoxizität in Verbindung gebracht [Nagengast *et al.*, 1995]. In einer Humanstudie zeigte sich bei der Untersuchungsgruppe mit hoher Fett- und geringer Kalzium- und Ballaststoffzufuhr, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit geringem Fettanteil und hohem Ballaststoff- und Kalziumanteil der Nahrung, nahezu eine zweifach erhöhte Zytotoxizität von Fäzeswasser [Rafter *et al.*, 1987b]. Als zugrunde liegende Mechanismen für die erhöhte Zytotoxizität werden die erhöhte Produktion an zytotoxisch wirksamen sekundären Gallensäuren infolge der hohen Fettzufuhr diskutiert oder die gesteigerte bakterielle Ammoniakproduktion durch die erhöhte Proteinzufuhr [Newmark & Lupton, 1990].

Neben der Fäzeswasser-Zytotoxizität liefert der pH-Wert Informationen über die Eigenschaften von Fäzeswasser. In einer Studie bei bestimmten ethnischen Gruppen wurden niedrige pH-Werte von Fäzeswasser mit einem verminderten Risiko für Dickdarmkrebs assoziiert [Walker *et al.*, 1986]. Als mögliche Ursachen gelten beispielsweise die verringerte Löslichkeit von freien Gallensäuren und langkettigen Fettsäuren bei erniedrigten pH-Werten, Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroflora sowie eine potentiell verringerte Bildung von Karzinogenen durch bakterielle Enzyme. Eine Erniedrigung des pH-Wertes kann eine Folge der vermehrten Produktion kurzkettiger Fettsäuren wie Azetat, Propionat und Butyrat durch Fermentation von Ballaststoffen im Darmlumen sein [American Gastroenterological Association, 2000].

Der Zusammenhang zwischen einem verminderten Risiko für kolorektale Tumoren durch erhöhte Polyphenolzufuhr in Form von Obst und Gemüse wird auch mit einer gesteigerten Konzentration an phenolischen Substanzen und deren Metaboliten im Darmlumen diskutiert. In einer Untersuchung

von Garsetti *et al.* konnte die Aufnahme von phenolischen Substanzen durch Kaffee und Rotwein mit einer gesteigerten antioxidativen Kapazität von Fäzes assoziiert werden [Garsetti *et al.*, 2000]. Untersuchungen des Fäzeswassers von Probanden ohne kontrollierte Diät zeigten nur sehr geringe Konzentrationen (0,56 bis 6,23  $\mu\text{M}$ ) von mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenolen. Die Analyse ihrer Metabolite, einfache phenolische und aromatische Säuren, ergab jedoch eine merklich höhere Gesamtkonzentration bis über 1 mM [Jenner *et al.*, 2005].

## 1.2 Polyphenole

### 1.2.1 Chemische Struktur, Biosynthese und Vorkommen

Die heterogene Stoffklasse der Polyphenole ist im Pflanzenreich weit verbreitete. Sie erfüllen zahlreiche physiologische Funktionen in der Pflanze wie Abwehr von Pilz- und Bakterieninfektionen, Schutz gegen UV-Strahlung und Regelung des pflanzlichen Hormonhaushalts. Des Weiteren dienen sie in Form von Farbpigmenten in Blüten und Blättern als Signalsubstanz [Matern & Grimmig, 1993]. Den Polyphenolen werden alle Verbindungen zugeordnet, die auf der Struktur des Phenols basieren. Zu den am weitesten verbreiteten Polyphenolen zählen die Gruppe der Phenolsäuren mit den Hydroxyzimtsäuren ( $\text{C}_6\text{-C}_3$ -Grundgerüst) und die Gruppe der Flavonoide ( $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ -Grundgerüst).

Alle Ausgangsubstanzen für die Biosynthese der Polyphenole (Abbildung 1.2) entstammen dem Kohlenhydratstoffwechsel. Die Synthese der aromatischen Verbindungen setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Segmenten zusammen: Das Shikimisäuresegment, das die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan produziert, das Phenylpropanoidsegment, das zur Bildung der Hydroxyzimtsäuren führt, sowie das Flavonoidsegment, welches diverse Flavonoide synthetisiert [Cooper-Driver, 2001].

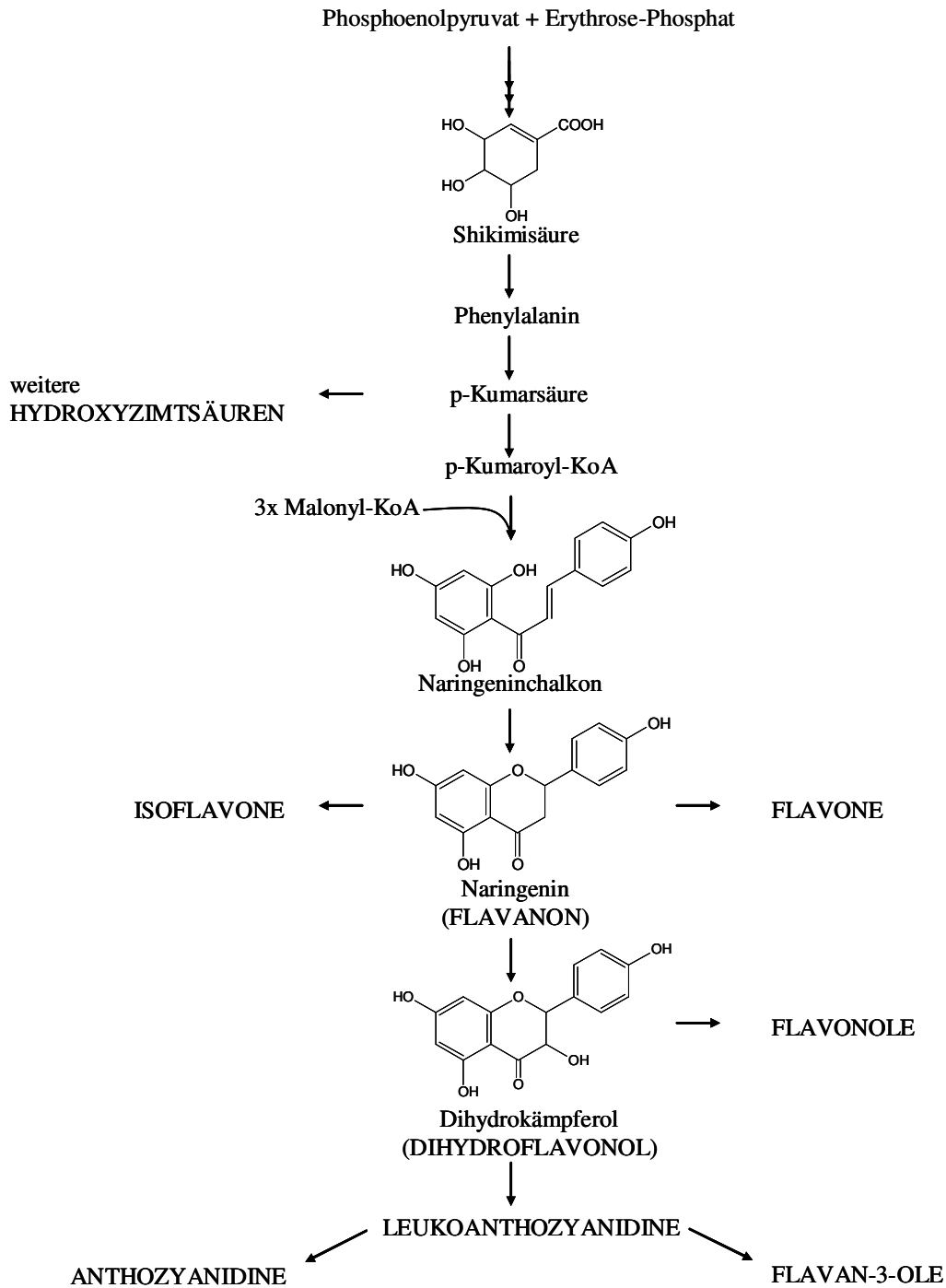
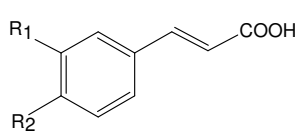
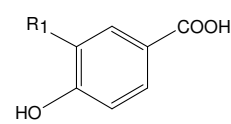


Abbildung 1.2: Biosyntheseweg der verschiedenen Flavonoide [Kuhnau, 1976; Cooper-Driver, 2001].

## Phenolsäuren

Unter der Gruppe der Phenolsäuren werden Polyphenole zusammengefasst, die eine Carboxylgruppe besitzen. In Früchten sind überwiegend die Hydroxybenzoesäuren und die Hydroxyzimtsäuren (Abbildung 1.3) vertreten, wobei Hydroxybenzoesäuren meist nur in geringen Mengen enthalten sind. Nur ein geringer Teil der Phenolsäuren kommt als freie Säure vor. Der Großteil ist durch Ester-, Ether- oder Amidbindungen mit Struktur bildenden Komponenten (Zellulose, Lignin, Proteine), mit organischen Säuren (z. B. China- und Weinsäure) oder mit Monosacchariden (z. B. Glukose) verbunden. Hydroxyzimtsäuren liegen in wasserlöslicher Form im Zytoplasma vor, als lipidlösliche Komponenten in der Wachsschicht auf der Oberfläche der Pflanze sowie kovalent an pflanzliche Zellwände gebunden [Chesson *et al.*, 1999]. Phenolsäuren tragen zu etwa einem Drittel zur Gesamtpolyphenolzufuhr bei. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Phenolsäuren im Rahmen einer gemischten Kost beträgt ungefähr 200-300 mg [DGE, 2004]. Die in pflanzlicher Nahrung am häufigsten vorkommenden Hydroxyzimtsäuren sind Kaffeesäure und Ferulasäure (Abb. 1.3) [Clifford, 1999]. Unter Berücksichtigung der üblichen Verzehrsmengen werden mit der Nahrung am meisten Hydroxyzimtsäuren durch Kaffee aufgenommen, wobei 1 Tasse Kaffee (200 mL) etwa 25-75 mg Kaffeesäure enthält [Clifford 2000]. Die in Früchten am weitesten verbreitete Hydroxyzimtsäure ist die Chlorogensäure, ein Ester aus Kaffeesäure und der Hydroxycarbonsäure L-Chinasäure [Treutter, 2001]. In einer Tasse Kaffeegetränk können bis zu 150 mg Chlorogensäure enthalten sein [Clifford 2000].

### Strukturen von Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren

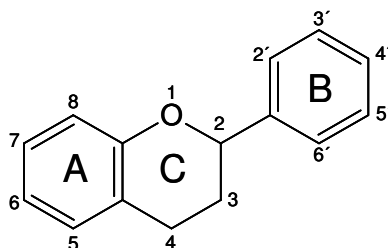
	
<b>Hydroxyzimtsäuren</b>	<b>Hydroxybenzoesäuren</b>
R1 = R2 = OH	R1 = OH
R1 = OMe, R2 = OH	R1 = OMe
R1 = H, R2 = OH	
R1 = R2 = H	
Kaffeesäure	Protokatechusäure
Ferulasäure	Vanillinsäure
p-Kumarsäure	
Zimtsäure	

**Abbildung 1.3:** Struktur verschiedener Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren.



## Flavonoide

Die umfangreiche Gruppe der Flavonoide basiert auf einem 2-Phenylchromangrundgerüst, dem Flavan (Abbildung. 1.4). Es besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C).



**Abbildung 1.4:** Struktur des Flavan (2-Phenylchromangrundgerüst).

Je nach Substitutions- und Oxidationsgrad des O-heterozyklischen Ringes werden Flavonoide in sechs Gruppen eingeteilt: Flavan-3-ole, Flavanone, Flavone, Flavonole, Anthocyanidine und Isoflavonoide. Zum Teil kommen sie nur in bestimmten Lebensmittelklassen vor und erfüllen dort spezifische Funktionen (Tabelle 1.1). Die Gruppe der Dihydrochalkone unterscheidet sich von den Flavonoiden durch den nicht kondensierten C-Ring, sie werden ebenfalls im Verlaufe des Flavonoid-Biosyntheseweges gebildet. Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht in freier Form vor (Aglykon), sondern sind über ihre Hydroxylgruppen an Mono- oder Disaccharide gebunden. Glykosylierung erhöht die Polarität der Flavonoide, was entscheidend für deren Speicherung in den pflanzlichen Vakuolen ist [Aherne & O'Brien, 2002].

Bei den Flavonolen ist der Zuckerrest bevorzugt an das C3 des Aglykons gebunden. Aufgrund ihrer Eigenschaft als gelbe Pigmente haben die Flavonole den Flavonoiden (flavus = gelb) ihren Namen gegeben. Das in pflanzlicher Nahrung am häufigsten vorkommende Flavonoid ist das Flavonol Quercetin, wobei die Zwiebel mit einem Quercetiningehalt von über 300 mg/kg Frischgewicht an erster Stelle steht. Weitere quercetinreiche Quellen sind Gemüsesorten wie Grünkohl, Brokkoli und Bohnen mit bis zu 100 mg/kg Frischgewicht, aber auch ungeschälte Früchte wie Äpfel oder Quitten [Watzl & Leitzmann, 1999]. In der Ersten Nationalen Verzehrsstudie betrug in einem bayrischen Teilkollektiv die Aufnahme an Flavonol 12 mg/Tag, die der Gesamtflavonoide 54 mg/Tag [Linseisen *et al.*, 1997].

Flavan-3-ole sind meist farblos und liegen in der Natur überwiegend als Aglyka vor. Sie tragen zum adstringierenden Geschmack in Früchten bei, wobei das Ausmaß der Bitterkeit abhängig ist von der Höhe des Polymerisationsgrads. So kann die adstringierende Wirkung oligomerer Prozyanidine, welche Kondensationsprodukte aus zwei und mehr Catechin-Einheiten sind, ein Vielfaches im Vergleich zu seinem Monomer überschreiten [Lea, 1978]. Flavonole kommen in Tee, Obst und

Gemüse vor, wobei Tee in den meisten Ländern die Hauptquelle ist. Eine weitere flavanolreiche Quelle ist dunkle Schokolade mit einem Gehalt bis zu 500 mg/kg. Im Rahmen der Zutphen Elderly Study hat man eine tägliche Catechinaufnahme von  $72 \pm 48$  mg errechnet [Arts *et al.*, 2001]. In den USA wird der Verzehr auf 17,1-38,6 mg/Tag an monomeren Flavanolten geschätzt [Lakenbrink *et al.*, 2000].

**Tabelle 1.1:** Die wichtigsten Verbindungsklassen der Flavonoide mit ihren Vorkommen und Eigenschaften [Watzl & Leitzmann, 1999].

Verbindung	Vorkommen, Beispiele	Eigenschaft
Flavan-3-ole	Rotwein, schwarzer/grüner Tee	adstringierende Wirkung
Flavanone	Grapefruit, Orangen	Bitterstoffe
Flavone	Sellerie, Fruchtschalen	hellgelbe Pigmente
Flavonole	Zwiebeln, Endivie	hellgelbe Pigmente
Anthozyane	blaue Trauben, Kirschen	Rote und blaue Farbpigmente
Isoflavonoide	Sojabohnen	Phytoöstrogene

### 1.2.2 Polyphenole in Äpfeln und Apfelsaft

In den westlichen Industrieländern zählen Tee, Zwiebeln und Äpfel zu den wesentlichen Flavonoidquellen [Hertog *et al.*, 1993b; Knekt *et al.*, 1996a]. Vom durchschnittlichen Pro-Kopf-Verbrauch in Höhe von 116 kg bei Obst entfallen 17 kg auf Äpfel in Deutschland. Des Weiteren ist bei einem Gesamtkonsum von 40 L Fruchtsaft pro Person im Jahr der Apfelsaft mit 12,4 L der meist verzehrte Fruchtsaft. An zweiter Stelle folgt Orangensaft mit knapp 9 L [Landesstelle für landwirtschaftliche Marktforschung, 2008].

In Äpfeln treten als wesentliche Polyphenole Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäure, Cumaroylchinasäuren), Flavan-3-ole ((+)-Catechin, (-)-Epicatechin), Prozyanidine (B1, B2) und verschiedene Glykoside des Flavonols Quercetin auf. Zusätzlich sind Dihydrochalkone (Phloretinglykoside) sowie in geringeren Konzentrationen diverse Glukoseester von p-Kumar-, Kaffee- und Feruläsuren enthalten [Herrmann 2001]. Die Polyphenole sind unterschiedlich über die Gewebsschichten des Apfels verteilt: Die Glykoside des Quercetins sind überwiegend in der Schale zu finden. Untersuchungen ergaben, dass in der Schale bis zu 140 mg Quercetin pro kg

Frischgewicht enthalten sind, im restlichen Gewebe weniger als 2 mg/kg [Herrmann 1976]. Die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin und deren Oligomere, die Prozyanidine, kommen hauptsächlich in der Schale vor, sind jedoch zu geringen Anteilen auch im Parenchym und im Kerngehäuse zu finden. Chlorogensäure sowie Phloretinglykoside befinden sich im Kerngehäuse und im Fruchtfleisch [Thielen 2004]. Die Strukturen der genannten Verbindungen sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

Die phenolischen Inhaltsstoffe des Apfels (*Malus domestica*) machen etwa 0,01 – 1 % des Frischgewichtes aus. Neben Reifegrad, Erntejahr, Kulturbedingungen und Lagerung ist insbesondere die Apfelsorte für den Polyphenolgehalt und das –muster ausschlaggebend [Guyot *et al.*, 2003b]. Mostäpfel können einen bis zu zehnmal höheren Gehalt aufweisen als Tafeläpfel [Herrmann 1973, Lea 1984]. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Apfelsaft AS05 wurde vorwiegend aus klassischen Mostapfelsorten (*Bittenfelder*, *Bohnapfel*, *Seestermüher* und *Börtlinger Weinapfel*) hergestellt, mit Ausnahme des Tafelapfels *Topaz*. Kahle *et al.* untersuchten das Polyphenolprofil verschiedener Tafel- und Mostapfelsorten. In klassischen Mostobstsorten wie Boskoop, Bohnapfel und Brettacher konnte ein Gesamtgehalt zwischen 570-830 mg/L nachgewiesen werden, in Boskoop sogar bis zu 970 mg/L. Tafeläpfel wie Granny Smith, Golden Delicious und Fuji weisen mit 154-178 mg/L deutlich geringer Polyphenolgehalte auf [Kahle *et al.*, 2007]. Das dominierende Polyphenol des Apfels ist die Chlorogensäure. In Boskoop wurden Konzentrationen über 450 mg/L nachgewiesen, bis zu zehnmal höher als in den untersuchten Tafeläpfeln. Bei den Flavan-3-olen sind (-)-Epicatechin und Prozyanidin B2 mit bis zu 150 mg/L die Hauptkomponenten. Bei den Dihydrochalkonen sind das Xylosid und das Glukosid des Phloretins vertreten. Im Vergleich zu den anderen Polyphenolgruppen sind Quercetin-3-O-Glykoside in geringeren Mengen enthalten, es gibt jedoch auch quercetinreiche Apfelsorten wie Bittenfelder und Bohnapfel [Guyot *et al.*, 2003c; Suarez *et al.*, 2005; Kahle *et al.*, 2005a].

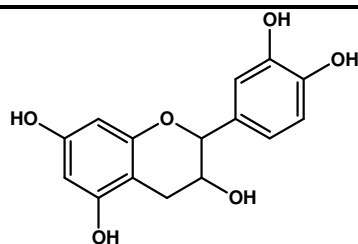
---

**Strukturen der Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren und Dihydrochalkone des Apfels**


---

**Monomere Flavan-3-ole**


---




---

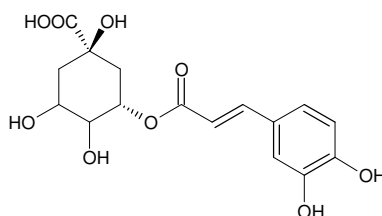
2,3-cis	Epicatechin
---------	-------------

2,3-trans	Catechin
-----------	----------

---

**Hydroxyzimtsäuren**


---



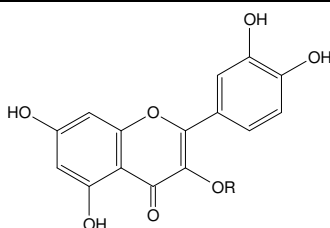

---

Chlorogensäure

---

**Flavonole**


---




---

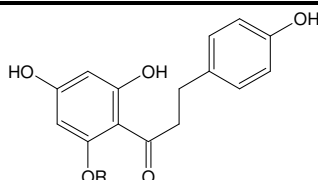
R = H	Quercetin
-------	-----------

R = Glykosid ( Xylo-, Rhamno-, Glukosid)	z. B. Quercetin-3-O-Glukosid
--	------------------------------

---

**Dihydrochalkone**


---




---

R = H	Phloretin
-------	-----------

R = Glukosid	Phloridzin
--------------	------------

---

**Abbildung 1.5:** Struktur von Flavonoiden und Dihydrochalkonen des Apfels [Treutter, 2001].

Das Polyphenolmuster und der –gehalt von Apfelsaft unterscheiden sich von denen des Apfels. Unzureichend wasserlösliche Polyphenole wie Quercetin-3-Glykoside, Phloridzin und polymere Prozyanidine gehen unvollständig in den Saft über und verbleiben hauptsächlich im Trester (Pressrückstand). Bei der Herstellung von klarem Apfelsaft bleiben über 80 % der Flavonoide im Pressrückstand zurück; nur etwa 10 % finden sich im Saft wieder [van der Sluis *et al.*, 1997]. Neben der schlechten Wasserlöslichkeit sind auch Oxidationsprozesse in der Maische und während des Pressens sowie unzureichender Zellaufschluss während der Verarbeitung des Obstes Ursachen für den hohen Verlust. Auch Schönungsprozesse und Filtration zu klaren Säften führen unvermeidlich zum Verlust an Polyphenolen [Guyot *et al.*, 2003a]. Der Gesamtpolyphenolgehalt in trüben Säften kann zwischen 152 bis 495 mg/L variieren, während in klaren Säften deutlich geringere Werte zwischen 110 bis 173 mg/L gefunden wurden [Kahle *et al.*, 2005b]. Tabelle 1.2 zeigt Konzentrationsbereiche für Polyphenole in trüben Apfelsaft.

**Tabelle 1.2:** Polyphenolgehalte in trüben Apfelsäften [Rechner, 2000; Kahle *et al.*, 2005].

<b>Polyphenole in trüben Apfelsaft (trüb)</b>	<b>Konzentrationsbereich [mg/L]</b>
<b>Hydroxyzimtsäuren</b>	
Chlorogensäure	18 – 311
4-Kumaroylchinasäure	7 – 54
Kaffeesäure	n.n. – 6
<b>Flavan-3-ole</b>	
Epicatechin	n.n. – 99
Catechin	n.n. – 6
Prozyanidin B1	n.n. – 21
Prozyanidin B2	n.n. – 68
<b>Flavonole</b>	
Quercetin-3-O-Galaktosid	n.n. – 7
Quercetin-3-O-Glukosid	n.n. – 4
Quercetin-3-O-Rhamnosid	1 – 5
Quercetin-3-O-Xylosid	n.n. – 6
<b>Dihydrochalkone</b>	
Phloretin-2`-O-xyloglukosid	1 – 86
Phloridzin	n.n. – 33

### 1.2.2.1 Resorption, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Apfelsaftpolyphenolen

Die Bioverfügbarkeit eines Polyphenols, also der Anteil an Substanz, der nach Aufnahme unverändert dem systemischen Kreislauf zur Verfügung steht, ist für seine physiologischen Funktionen entscheidend. Einflussfaktoren auf die biologische Verfügbarkeit einer Substanz sind beispielsweise ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie Resorptionsprozesse und Metabolisierung. Da die Wiederfindungsraten intakter Polyphenole in Ausscheidungsprodukten wie Urin und Fäzes gering sind, deutet dies auf eine intensive Biotransformation hin [Manach & Donovan, 2004]. Deshalb fokussiert man sich auf die Identifizierung ihrer möglichen Metabolite, die als potentielle Biomarker für Aufnahmemengen, Resorptionsvorgänge und -geschwindigkeit dienen könnten. Die Datenlage zu diesen Untersuchungen ist bislang jedoch limitiert [Blaut *et al.*, 2003a].

#### Flavonole

Von den bisher analysierten Flavonoiden wurde die Gruppe der Flavonole, insbesondere das Quercetin, sehr intensiv untersucht. Hollmann *et al.* demonstrierten in einer Humanstudie mit Ileostomiepatienten, dass Quercetinglykoside aus Zwiebeln mit 52 % Wiederfindung in der Ileostomaflüssigkeit effizienter im Dünndarm resorbiert werden als bei Verzehr des Aglykons (24 %) oder von Glykosiden aus anderen Nahrungsquellen wie Rutin (17 %). Die Bioverfügbarkeit von Quercetin ist abhängig vom Zuckerrest; in Zwiebeln sind hauptsächlich Glukoside des Quercetins enthalten, während in Äpfeln oder Tee vorwiegend das 3-O-Rhamnosid vorliegt [Hollman *et al.*, 1995b; Manach *et al.*, 2005]. In einer Bioverfügbarkeitsstudie mit Apfelsaft wurden das Quercetin-3-O-Rhamnosid und –Arabinosid in der Ileostomieflüssigkeit von Patienten nur in sehr geringen Mengen detektiert [Kahle *et al.*, 2005].

Da Quercetinglykoside zu hydrophil sind, um biologische Membranen passieren zu können, werden alternative Mechanismen für die Resorption im Dünndarm diskutiert. Eine Theorie ist die Resorption von Quercetinglykosiden durch Wechselwirkung mit dem natriumabhängigen Glukosetransporter SGLT1. Die resorbierten Glykoside würden dann anschließend über zytosolische  $\beta$ -Glykosidasen hydrolysiert [Gee *et al.*, 1998]. Möglicherweise führt diese Wechselwirkung jedoch an erster Stelle zu einer Blockade des SGLT1 und nicht zum Membrantransport [Lostao *et al.*, 1994]. Ein alternativer Resorptionsweg ist die Hydrolyse der Quercetinglykoside durch die Lakatat-Phloridzin-Hydrolase (LPH), eine  $\beta$ -Glukosidase. Dieser Enzymkomplex ist in der Bürstensaummembran der Dünndarmepithelzellen lokalisiert; nach Spaltung in das entsprechende Aglykon wird dieses über passive Diffusion in das Epithel aufgenommen [Day *et al.*, 1998]. Ein weiterer postulierter

Mechanismus gilt für Flavonole, die keine Substrate für die LPH und andere  $\beta$ -Glykosidasen sind, wie das Rhamnoglukosid Rutin. Die Resorption erfolgt vermutlich nach Deglykosylierung durch bakterielle  $\beta$ -Glykosidasen und Rhamnosidasen im Kolon [Hollman *et al.*, 1995a].

Der Transport im Blutkreislauf zu anderen Kompartimenten wie der Leber scheint durch Albumin-Bindung zu erfolgen. Im Plasma ist Quercetin nicht als Aglykon präsent, sondern nur in konjugierter Form. An dieser Biotransformation beteiligte Enzyme sind die Phase II-Enzyme UDP-Glukuronyltransferase, Catechol-O-Methyltransferase und Sulfotransferase (SULT) [Scalbert & Williamson, 2000a]. 20 bis 40 % des aufgenommenen Quercetins liegen in methylierter Form als Isorhamnetin vor [Olthof *et al.*, 2000]. Day *et al.* identifizierten außerdem Quercetin-3-O-Glukuronide und -3'-O-Sulfate als Hauptkonjugate [Day *et al.*, 2001]. Flavonoidmetabolite wie Glukuronide und -sulfate sind wasserlösliche Metabolite, die über den Urin oder über die Galle mit den Fäzes ausgeschieden werden. Die Eliminierung der Quercetinmetabolite erfolgt langsam, in der Literatur sind Halbwertszeiten zwischen 11 und 28 Stunden beschrieben. Infolge wiederholter Quercetinaufnahme könnte dies zu einer Akkumulation von Metaboliten im Plasma führen [Noroozi *et al.*, 2000; Erlund *et al.*, 2002]. In diversen Humanstudien konnten nach Quercetinaufnahme in Form von Zwiebeln, Äpfeln oder als Reinsubstanz Plasmawerte zwischen 0,08 bis zu 9,3  $\mu\text{mol/L}$  nachgewiesen werden. Einige Autoren weisen jedoch auf eine hohe interindividuelle Variabilität zwischen den Probanden hin [Scalbert & Williamson, 2000b; Scalbert & Williamson, 2000c].

Flavonole, die die Dünndarmpassage in intakter Form überstehen, unterliegen im Dickdarm dem enzymatischen Abbau durch die intestinale Mikroflora. Durch die Aktivität bakterieller  $\beta$ -Glykosidasen, Rhamnosidasen und Esterasen erfolgt nach Hydrolyse in das entsprechende Aglykon der Abbau des Flavonols durch Ringspaltung in einfache Phenolsäuren und andere organische Säuren. Generell rühren die Phenolsäuren vom B-Ring des Flavonoids her, der Metabolitentyp ist abhängig vom Hydroxylierungsmuster des ursprünglichen Polyphenols. Für Quercetin beispielsweise ist der mikrobielle Abbau durch *Eubacterium ramulus* in 3,4-Dihydroxy-Phenyllessigsäure, Azetat und Butyrat beschrieben (Abbildung. 1.6). Als Abbauprodukte des A-Ringes sind Phloroglucinol und 2,4,6-Trihydroxy-Benzoesäure bekannt. Letztere wird anscheinend nachfolgend zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Dies haben Untersuchungen mit radioaktivmarkierten Flavonolen in Tiermodellen gezeigt [Ueno *et al.*, 1983; Walle *et al.*, 2001]. Phloroglucinol unterliegt je nach Bakterienart einem weiteren Abbau zu kurzkettigen Fettsäuren [Blaut *et al.*, 2003b].

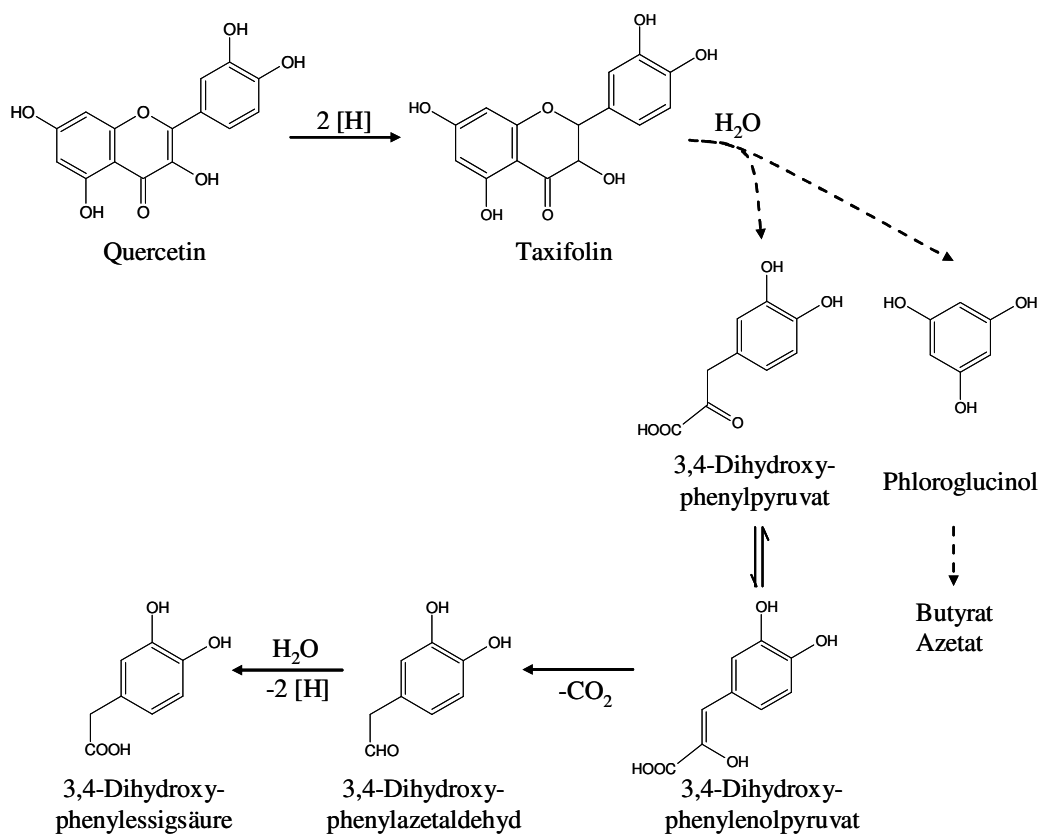


Abbildung 1.6: Postulierter Abbau von Quercetin durch *Eubacterium ramulus* [Blaut *et al.*, 2003].

### Monomere Flavan-3-ole

Humanstudien zur Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ole wurden hauptsächlich mit Grüntee oder catechinreichen Schokoladen durchgeführt [Bravo *et al.*, 1994; Rios *et al.*, 2003a; Lee *et al.*, 2006]. (-)-Epicatechin und (+)-Catechin werden im Dünndarm O-methyliert und glukuroniert [Kuhnle *et al.*, 2000]. In Humanplasma wurde (-)-Epicatechin in Form seiner Glukuronide und Sulfate, aber auch in freier Form nachgewiesen [Natsume *et al.*, 2003]. In einer Studie mit Apfelsaft konnte, trotz gleicher Aufnahmemengen, nur (-)-Epicatechin aber nicht (+)-Catechin in der Ileostomieflüssigkeit nachgewiesen werden [Scalbert & Williamson, 2000b; Kahle *et al.*, 2005d]. Für die rasche Elimination monomerer Catechine spricht die kurze Halbwertszeit zwischen 1 und 7 Stunden [Van Amelsvoort *et al.*, 2001]. Nach oraler Gabe von (+)-Catechin an Ratten konnten 3-Hydroxyphenylpropionsäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Hydroxyhippursäure als Abbauprodukte in Urin identifiziert werden [Gonthier *et al.*, 2003].



## **Prozyanidine**

Obwohl die Prozyanidine die am weitesten verbreiteten Polyphenole in unserer Nahrung sind, ist die Datenlage über ihre Bioverfügbarkeit und Resorptionsform begrenzt. Ihre polymere Struktur und das hohe Molekulargewicht beeinträchtigen die Absorption durch die Darmbarriere in intakter Form, Oligomere größer als Trimere werden wahrscheinlich gar nicht in ihrer nativen Form resorbiert [Manach & Donovan, 2004]. In zwei Humanstudien wurden die Dimere B1 und B2 im Plasma detektiert, allerdings war die Absorption der Prozyanidine um das 100fache geringer als bei den monomeren Flavanolen. Die maximale Plasmakonzentration war bereits nach 2 Stunden erreicht [Holt *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2003]. Postulierte mikrobielle Abbauprodukte der Prozyanidine, die hydroxylierte Phenylpropionsäuren und Phenylelessigsäuren sowie 3-Hydroxybenzoesäure wurden nach Verzehr dunkler Schokolade in Probandenurin in erhöhten Konzentrationen gefunden [Rios *et al.*, 2003]. Eine Studie an Ratten zeigte, dass der mikrobielle Abbau mit steigendem Oligomerisierungsgrad der Prozyanidine abnimmt, was möglicherweise mit ihren antimikrobiellen Eigenschaften und/oder ihrer Proteinbindungskapazität zusammenhängt [Gonthier *et al.*, 2003].

## **Hydroxyzimtsäuren**

Nicht veresterte Hydroxyzimtsäuren werden im Dün- und Dickdarm des menschlichen Organismus rasch resorbiert. Nach oraler Gabe von Kaffeesäure an Ratten konnte zusätzlich zu den Glukuroniden und Sulfaten freie Kaffeesäure im Plasma detektiert werden [Azuma *et al.*, 2000]. In der Ileostomieflüssigkeit von Patienten konnte nach Verzehr von Kaffeesäure nur noch 5 % der ursprünglichen Konzentration nachgewiesen werden, was für eine schnelle Resorption und Metabolisierung im Dünndarm spricht [Olthof *et al.*, 2001]. Veresterte bzw. an Polysaccharide pflanzlicher Zellwände gebundene Hydroxyzimtsäuren, wie sie vorwiegend in unverarbeiteten Lebensmitteln vorkommen, stellen komplexe Moleküle dar und können als solche nicht bzw. in nur geringem Maße absorbiert werden. Bei Ileostomiepatienten wurden Anteile der aufgenommenen Chlorogensäure nach Verzehr der Reinsubstanz zu 67 % [Olthof *et al.*, 2001] bzw. nach Apfelsaftkonsum zu 10 % [Kahle *et al.*, 2005d] in der Ileostomaflüssigkeit wiedergefunden. Bislang ist unklar, ob Chlorogensäure, sei es in freier oder konjugierter Form, im Plasma präsent ist [Manach *et al.*, 2004]. Nach Passage des Dünndarms in intakter Form wird Chlorogensäure durch bakterielle Esterasen in Kaffee- und Chinasäure gespalten (Abbildung 1.7). Durch anschließende Biotransformation wie Hydrierung, Dehydroxylierung, Methylierung und Dekarboxylierung kann Kaffeesäure weiter zur Phenylpropionsäure, 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure, Zimtsäure, Ferulasäure, Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure metabolisiert werden, die dann z. B. über den Urin ausgeschieden werden [Rechner *et al.*, 2001; Olthof *et al.*, 2001].

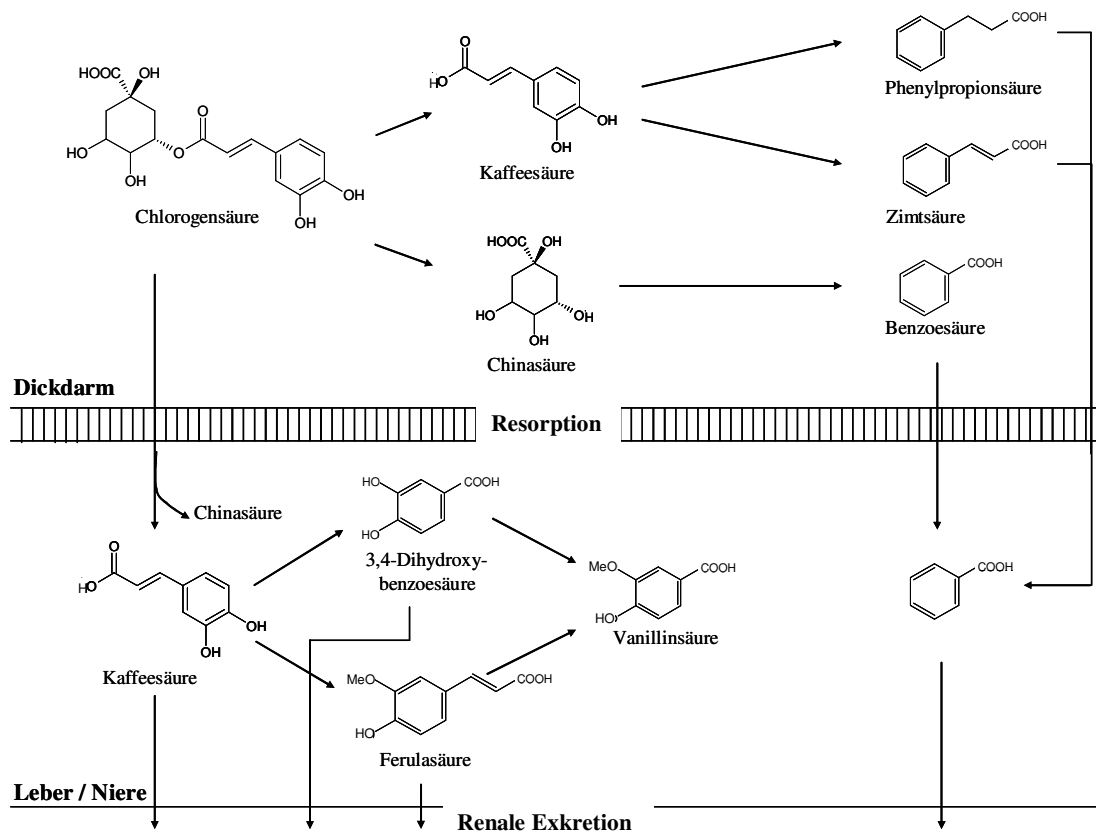


Abbildung 1.7: Postulierter Abbau der Chlorogensäure im Menschen [nach Olthof *et al.*, 2001].

## Dihydrochalkone

In Ileostomaflüssigkeit bei Patienten konnten Phloretin und sein 2'-O-Glukuronid zu insgesamt 24,8 % wiedergefunden werden, jedoch kein Phloridzin [Kahle *et al.*, 2005d]. Des Weiteren wurde nach Phloridzinfusion in Ratten im Plasma das Aglykon sowie die Konjugate (Glukuronid, Sulfat) gefunden [Crespy *et al.*, 2001]. Nach intragastrischer Applikation von Phloretin in Ratten wurde die Hälfte der verabreichten Dosis in Form seiner Konjugate (Glukuronide, Sulfate) und Abbauprodukte über die Niere ausgeschieden. Die Ausscheidungsprodukte wurden noch am zweiten Tag nach Applikation nachgewiesen. Als Abbauprodukte von Phloretin wurden Phloroglucinol und 4-Hydroxyphenylpropionsäure identifiziert [Monge *et al.*, 1984].

### 1.2.2.2 Protektive Wirkung von Polyphenolen

Die präventiven Effekte von Polyphenolen auf chronisch-entzündliche Prozesse bei Krebs- oder kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes werden im Zusammenhang mit ihren antioxidativen,

antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antikanzerogenen Effekten in Verbindung gebracht [Boyer & Liu, 2004].

Es gibt aktuelle Daten der griechischen EPIC-Studie mit ca. 25.000 Probanden, wonach ein hoher Obst- und Gemüseverzehr mit einem niedrigeren Krebsrisiko verbunden ist [Benetou *et al.*, 2008]. Ferner zeigten Bobe *et al.*, dass insbesondere Flavonole, die in höheren Konzentrationen in Zwiebeln oder Äpfeln vorkommen, eine protektive Wirkung auf die Entstehung kolorektaler Adenome haben [Bobe *et al.*, 2008]. Ferner scheint eine erhöhte Flavonoidaufnahme auch mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert zu sein. So war in der „Zutphen Elderly“ Studie, der „Women`s Health“ Studie mit 40.000 Frauen und in einer finnischen Kohortenstudie mit 60.000 Personen die Flavonoidaufnahme mit der Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen invers assoziiert [Hertog *et al.*, 1993a; Knekt *et al.*, 1996b; Sesso *et al.*, 2003]. Eine erhöhte Aufnahme von Polyphenolen wird auch im Zusammenhang mit einem verminderten Diabetesrisiko diskutiert [Zhao *et al.*, 2004]. In einer finnischen Studie mit 10.000 Teilnehmern zeigte sich eine Assoziation zwischen einem erniedrigten Risiko für Typ 2-Diabetes und erhöhtem Apfelkonsum [Knekt *et al.*, 2002a]. Außerdem wurde bei den Frauen ein signifikant erniedrigter Blutglukoselevel gemessen [de Oliveira *et al.*, 2003]. In der „Women`s Health“ Studie mit 38.000 Teilnehmerinnen hatten Frauen, die täglich einen oder mehr Äpfel am Tag konsumierten, ein um 28 % reduziertes Risiko für Typ 2-Diabetes [Song *et al.*, 2005a].

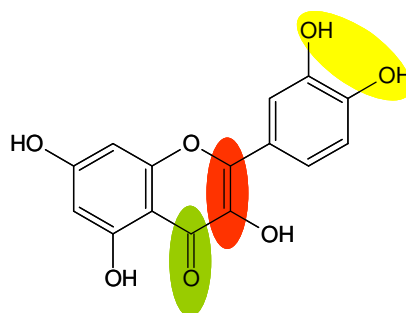
### **Antioxidative Wirkung**

Extrakte von Äpfeln und insbesondere von Apfelschalen gelten als potentielle Antioxidanzienquelle. Die totale antioxidative Kapazität von 100 g ungeschälten Äpfeln entspricht der von 1.500 mg Vitamin C. Obwohl Vitamin C ein potentes Antioxidans ist, trägt es im Apfel aufgrund der geringen Konzentration nur zu 0,4 % zur Gesamtkapazität bei. Folglich ist die starke Wirkung anderen bioaktiven Inhaltsstoffen wie den Polyphenolen zuzuschreiben [Eberhardt *et al.*, 2000].

ROS wie z. B. Hydroxyradikale ( $\text{OH}\cdot$ ), Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) und Alkyl- bzw. Peroxyradikale ( $\text{RO}\cdot$  bzw.  $\text{ROO}\cdot$ ), entstehen im Stoffwechsel durch endogene (z.B. Mitochondrien, Fremdstoffmetabolismus) als auch exogene Einflüsse (z.B. Xenobiotika, Strahlung). Durch körpereigene Schutzsysteme bzw. durch alimentäre Zufuhr von antioxidativ wirksamen Substanzen wie Vitamin C ist der Organismus in der Lage, ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Prozessen aufrecht zu erhalten. Verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zugunsten übermäßiger ROS-Bildung, kann dies zu oxidativem Stress und somit zur Schädigung von Membranlipiden, Proteinen und der DNA führen. Erhöhter oxidativer Stress fördert entzündliche

Prozesse und wird mit einem gesteigerten Risiko für Krankheitsbilder wie z. B. Krebserkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Alzheimer in Verbindung gebracht [Valko *et al.*, 2007].

Polyphenole können oxidativen Stress *in vitro* inhibieren, z. B. durch Komplexierung von Metallionen oder direktes Abfangen von Radikationen. Für die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren ist eine Wasserstoff (H)-Abstraktion verantwortlich. Es wird dabei eine Semichinon-Struktur des reaktionsträgen Phenoxyradikals erzeugt, welches durch Elektronendelokalisation stabilisiert ist. Durch einen weiteren Elektronentransfer geht es in eine stabile Chinonstruktur über [Pietta, 2000b; Moridani & O'Brien, 2001]. Maßgeblich für die Ein-Elektronenübergänge und somit das antioxidative Potential sind gewisse Strukturmerkmale der Flavonoide (Abb. 1.8). Entscheidend für die Stabilisierung des Flavonoidradikals durch Eielektronendelokalisation ist die Catecholstruktur des B-Ringes (je eine Hydroxylgruppe an C3`und C4`), weitere wichtige Merkmale sind eine Doppelbindung in C2-C3-Position sowie eine 4-Oxogruppe am C-Ring [Pietta, 2000a; Spencer *et al.*, 2003b].



**Abbildung 1.8:** Struktur des Flavonols Quercetin. Die Strukturmerkmale, die am antioxidativen Potential maßgeblich beteiligt sind, sind farbig hinterlegt: Die Catecholstruktur des B-Ringes (gelb) und die Doppelbindung (rot) und die Oxogruppe (grün) des C-Ringes [Spencer *et al.*, 2003].

Bei Messung der antioxidativen Kapazität von Apfelsaftpolyphenolen mittels TEAC<sup>10</sup> zeigten das Quercetinglykosid Rutin und Phloridzin die höchste antioxidative Kapazität, gefolgt von (-)-Epicatechin. Hydroxyzimtsäuren wie Chlorogensäure und Kaffeesäure zeigen nur eine geringe Wirksamkeit [Schäfer *et al.*, 2006].

Auch Untersuchungen am Tier oder am Menschen deuten auf eine antioxidative Wirkung von Apfel- und Apfelsaftpolyphenolen hin. Jedoch ist die Datenlage bislang uneinheitlich, was auf den verschiedenen Studienmodellen, Interventionsperioden und Apfelsaftformulierungen beruhen könnte. Durch Studien zur antioxidativen Kapazität an Hamstern konnte nach zwölfwöchiger Applikation von Apfelsaft eine signifikante Steigerung der antioxidativen Kapazität im Plasma der Tiere nachgewiesen werden [Decorde *et al.*, 2008]. Dieses Ergebnis konnte nicht bei einer Studie mit

<sup>10</sup> TEAC = Trolox equivalent antioxidative capacity

1,2-Dimethylhydrazin (DMH)-behandelten Ratten bestätigt werden, die über einen siebenwöchigen Zeitraum mit klarem bzw. trübem Apfelsaft gefüttert wurden. DMH ist ein Kanzerogen, welches in Ratten Tumore in Dünn- und Dickdarm erzeugt [Barth *et al.*, 2005]. Auch im Rahmen einer Bioverfügbarkeitsstudie wurde nach Verzehr von 1 kg Äpfeln keine Modifikation der antioxidativen Aktivität im Probandenplasma gemessen [Briviba *et al.*, 2007].

### **Antikarzinogene Wirkung**

Zahlreiche *in vitro*- und tierexperimentelle Untersuchungen deuten auf eine antikarzinogene Wirkung der Flavonoide und Phenolsäuren *in vivo* hin. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert:

- Hemmung von Phase-I-Enzymen: Bestimmte Flavonoide und Phenolsäuren sind starke Inhibitoren der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (Cyp 450). Diese Enzyme haben Bedeutung für den Metabolismus von lipophilen Fremdstoffen, indem sie molekularen Sauerstoff aktivieren und ein Atom auf den Fremdstoff übertragen („Funktionalisierung“). Dadurch entstehen funktionelle Ankergruppen, die im folgenden Phase-II-Metabolismus weiter konjugiert werden können. Allerdings kann diese Funktionalisierung den Fremdstoff auch zu potentiellen Kanzerogenen aktivieren, indem sie durch kovalente Bindung, z. B. an die DNA, zu Mutationen führen.
- Induktion von Phase-II-Enzymen: Phase-II-Enzyme (z.B. Glukuronosyltransferase, Sulfo-transferase, Quinonreduktase) katalysieren Konjugationsreaktionen, die zur Entgiftung aktivierter Kanzerogene führen; die Endprodukte sind wasserlösliche Metabolite, die über Galle oder Urin ausgeschieden werden [Eisenbrand & Metzler, 2002].
- Induktion von Apoptose, Hemmung der Zellproliferation: Die Karzinogenese ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Zellproliferation und/oder eine verminderte Zelltodesrate, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum und folglich zur Ausbildung von Tumoren führen kann. Durch Beeinflussung zellulärer Signale können Polyphenole durch Arretierung des Zellzyklus oder Stimulation von Apoptose das Zellwachstum unterbinden [Kampa *et al.*, 2004].

### **Antiinflammatorische Wirkung**

Bis zu 10 % aller Krebsfälle sind möglicherweise auf chronische Entzündungsprozesse zurückzuführen [Gerhaeuser, 2001]. Die antiinflammatorischen Eigenschaften der Polyphenole scheinen insbesondere mit ihrem Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionskaskaden zusammenzuhängen. Beispielsweise wurden Polyphenole aus Äpfeln, Grüntee und Rotwein als potente Hemmstoffe des NF- $\kappa$ B-Signalweges identifiziert [Aggarwal & Shishodia, 2006]. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kontrolliert die Expression proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6, TNF- $\alpha$ ), von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM<sup>11</sup>, VCAM<sup>12</sup>), Akute-Phase-Proteinen (z.B. CRP) und induzierbaren Enzymen wie Cyclooxygenasen und Lipoxxygenasen, die die Bildung weiterer Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) katalysieren [Nam, 2006].

### **Antidiabetische Wirkung**

Für die blutzuckersenkende Wirkung von Polyphenolen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Eine Möglichkeit besteht in der Hemmung der Glukoseabsorption im Darm durch Inhibierung intestinaler Glykosidasen oder von Glukosetransportern [Matsui *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002a; Scalbert *et al.*, 2005]. So hemmten 10-20  $\mu$ M Quercetin den intestinalen Glukosetransport durch GLUT2 in einem transfizierten Oozytenmodell sowie in übergewichtigen, diabetischen Zucker-Ratten [Song *et al.*, 2002b]. In weiteren *in-vitro* Modellen inhibierten Quercetin und seine Glykoside, Phloridzin sowie Chlorogensäure den Na<sup>+</sup>-abhängigen Hexose-Transporter SGLT1 in Konzentrationen ab 1 mM [Gee *et al.*, 2000a; Kottra & Daniel, 2007; Ikumi *et al.*, 2008]. Neben der Hemmung der intestinalen Glukoseabsorption können Polyphenole auch die Resorption in der Niere hemmen, wie es bereits für Phloridzin gezeigt wurde [Dimitrakoudis *et al.*, 1992; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1995].

Nachweise anhand klinischer Studien und epidemiologischer Erhebungen für den Einfluss von Polyphenolen auf das Diabetesrisiko beim Menschen sind sehr begrenzt. Die Einnahme von polyphenolreichen Supplementen bei Patienten mit Typ 1-Diabetes führte zu einer signifikanten Reduktion von HbA1c [Keenoy *et al.*, 1999]. Eine Studie an gesunden Probanden zeigte nach mehrwöchigem Konsum von 400 mL entkoffeinierten Kaffee einen niedrigeren Nüchternblutzucker, was auf eine reduzierte intestinale Glukoseabsorption durch Chlorogensäure zurückzuführen sein könnte [Naismith *et al.*, 1970]. Kein Effekt wurde dagegen bei Patienten mit Typ 2-Diabetes nach zweimonatiger Einnahme eines Orangenextraktes beobachtet [Bonina *et al.*, 2002].

---

<sup>11</sup> Intracellular vascular adhesion molecule

<sup>12</sup> Vascular cellular adhesion molecule

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Aufgrund der hohen Inzidenz für Zivilisationskrankheiten wie Adipositas und Typ 2-Diabetes sowie ihre bedeutende Rolle als Risikofaktoren der Kolonkarzinogenese steht die Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit einem präventiven Potential im Fokus des gesundheitlichen Interesses. Jedoch ist nicht nur die Untersuchung der präventiven Effekte isolierter Komponenten von Bedeutung, insbesondere sollte die Analyse der Wirkung komplexer Lebensmittelmatrizes im Vordergrund stehen. Ferner sollte bei der Prävention durch Ernährung auch die Verbraucherrelevanz des untersuchten Lebensmittels berücksichtigt werden. Da Apfelsaft in Deutschland der am meisten konsumierte Fruchtsaft ist, ist davon auszugehen, dass dieses Lebensmittel auf eine breite Akzeptanz trifft und regelmäßig von der Bevölkerung konsumiert wird.

Aktuelle Forschungsergebnisse von Barth *et al.* zeigten vielversprechende krebsprotektive Effekte durch Konsum von trübem Apfelsaft an DMH<sup>13</sup>-induzierten Ratten [Barth *et al.*, 2005a]. Die Verwendung von klarem Apfelsaft zeigte im Rahmen dieser Studie an den Tieren im Vergleich zur Kontrolle nur geringe krebsprotektive Wirkung; vermutlich tragen neben den phenolischen Inhaltsstoffen auch die Ballaststoffe des Apfelsafttrubs zum präventiven Potenzial bei.

Ein krebsprotektives Potenzial durch Apfelsaft am Menschen ist nicht belegt, jedoch weisen verschiedene epidemiologische Studien am Menschen auf ein antidiabetisches und Potential durch regelmäßigen Konsum von Äpfeln bzw. Apfelsaft hin, wodurch potenzielle Risikofaktoren für Darmkrebs verringert werden könnten [Knekt *et al.*, 2002b; Song *et al.*, 2005b].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der präventive Einfluss durch regelmäßigen Konsum von trübem Apfelsaft über einen fünfwöchigen Zeitraum an gesunden Männern untersucht werden. Dazu wurde eine randomisierte, plazebokontrollierte Humaninterventionsstudie im Paralleldesign mit naturtrübem Apfelsaft durchgeführt, um anschließend unter Verwendung verschiedener Biomarker die *in vivo* Bioaktivität und –verfügbarkeit der Apfelsaftinhaltsstoffe zu charakterisieren.

Der Einsatz verschiedener analytischer Methoden diente der Klärung folgender Fragstellungen:

- Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Fäzes- und Fäzeswasser-Biomarker: Die Untersuchung von Stuhlproben und daraus präpariertem Fäzeswasser sollte klären, ob durch die regelmäßige Zufuhr von Ballaststoffen aus dem Apfelsafttrub z. B. der pH-Wert moduliert oder die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren in Fäzeswasser erhöht werden kann.
- Einfluss von Apfelsaftkonsum auf das Polyphenolprofil in Urin, Fäzeswasser und Plasma: In den genannten Matrizes sollten intakte Apfelsaftpolyphenole sowie deren mikrobielle

---

<sup>13</sup> DMH = 1,2-Dimethylhydrazin; ein Kanzerogen, welches in Ratten Tumore in Dünn- und Dickdarm erzeugt.

Metabolite, die Phenolsäuren, nachgewiesen werden. Es sollte geklärt werden, ob nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum erhöhte Konzentrationen an Phenolsäuren gemessen werden können. Ferner sollte die Analyse von Phase-II-Konjugaten (Glukuronide, Sulfate) darüber Aufschluss geben, ob die Polyphenole in den Proben hauptsächlich in ihrer freien (unkonjugierten) oder in ihrer konjugierten Form als Glukuronide und Sulfate vorliegen.

- Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Anthropometrie, Fettstoffwechselfparamter sowie Diabetes-, Adipositas- und Entzündungsmarker: Die Untersuchung dieser Faktoren sollte klären, inwiefern eine positive Beeinflussung dieser Biomarker durch eine Ernährungsintervention mit Apfelsaft bei gesunden Männern möglich ist.



## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Materialien und Chemikalien

#### 2.1.1 Allgemein verwendete Geräte und Materialien

Gerät / Material	Firma
Akku-Check Softclix Pro	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Akku-Check Softclix Pro Lanzetten	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Autoklav	Systemec GmbH, Wetzlar, DE
BIA 2000-C Monofrequenz-Impedanzanalysator	Data Input GmbH, Darmstadt, DE
BIANOSTIC AT <sup>®</sup> Elektroden	Data Input GmbH, Darmstadt, DE
Blutzuckermessgerät Super GL Easy	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Digitalwaage APX-6001	Denver Instrument GmbH, Göttingen, DE
Einmalspritzen 2-20 mL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Feinanalysenwaage	Denver Instrument GmbH, Göttingen, DE
Gefriertrockner Thermo Modulo D	Thermo Electron, Dreieich, DE
Gefrier-toilette (-15°C)	Toppfritid Marinesenter, NO
Glucose Kontrolle Normal	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Glucose Kontrolle Pathologisch	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Hamilton-Spritzen	Reno, Nevada, USA
Hämolyselösung	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Kalibratorlösung	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Kapillaren	Hitado Diagnostic Systems, Möhnesee, DE
Kreatinin-Kit	Diaglobal GmbH, Berlin, DE
Küvetten, Polystyrol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

---

Küvetten, Quarz	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DE
Mikrozentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Osmomat 030	Gonotec, Berlin, DE
Polypropylenröhrchen, 15 und 50 mL	Greiner, Solingen, DE
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 mL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Rotationsverdampfer	Thermo Electron, Dreieich, DE
SpeedVac Concentrator SPD 111V	
Pasteurpipetten Plastibrand	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
pH-Messgerät	WTW GmbH & Co. KG, Weilheim
Plattenschüttler Thermostar	BMG Labtech
Probenbecher	Hitado Diagnostic Systems, Möhnensee, DE
S-Monovette m. Lithium-Heparin, 9 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
S-Monovette m. Kalium-EDTA, 9 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
S-Monovette m. Gerinnungsaktivator, 9 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
S-Sedivette (Blutsenkungsröhrchen)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Spektralphotometer DU 800	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
Spektralphotometer Multiscan Spectrum	Thermo Labsystems
Kühlzentrifuge Sigma 4K15C	Sartorius, Göttingen, DE
Urin-Becher, 125 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Urin-Sammelflasche, 3.000 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Urin-Teststreifen Combur-Test	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Glukosesaft (75 g Glukose/300 mL)	Dextro OGT, Roche Diagnostics, Mannheim, DE

### 2.1.2 Allgemein verwendete Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle angegebenen Chemikalien und Lösungsmittel mit höchstem Reinheitsgrad erworben.

Chemikalie	Firma
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Ameisensäure, 99 %ig	Fluka, Neu-Ulm, DE
Azetonitril	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Methyl- <i>tert</i> -butylether (MTBE)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Natriumazetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Natriumazid	Fluka, Neu-Ulm, DE
Salzsäure, 37%ig	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS (Phosphatpuffer)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE

### 2.1.3 Geräte und Materialien für die Fäzeswasserpräparation

Gerät / Material	Firma
BagClips	Interscience, St.Nom, F
Bagmixer <sup>®</sup> 400	Interscience, St.Nom, F
Glasperlen	CLN, Freising, DE
Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µM	Millipore, Eschborn, DE
Stomacher-Beutel	Interscience, St.Nom, F
Ultrazentrifuge Optima™ L-100 XP	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
Ultrazentrifugenröhrchen, 25x82 mm	Beckmann Coulter, Krefeld, DE

### 2.1.4 Chemikalien für die Fettsäureanalytik (GC/FID)

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle angegebenen Chemikalien und Lösungsmittel mit höchstem Reinheitsgrad erworben.

Chemikalie	Firma
MTBSTFA <sup>14</sup>	Fluka, Neu-Ulm, DE
Propionsäure Natriumsalz	Fluka, Neu-Ulm, DE
Buttersäure Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Capronsäure	Fluka, Neu-Ulm, DE
Essigsäure Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, DE
2-Ethylbuttersäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
3-Methylbuttersäure (Isovaleriansäure)	Fluka, Neu-Ulm, DE
2-Methylpropionsäure (Isobuttersäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Valeriansäure	Fluka, Neu-Ulm, DE

### 2.1.5 Geräte und Materialien für die Festphasenextraktion

Material	Firma
Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Festphasenextraktions-Station Visprep	Supelco, Deisenhofen, DE
Polymer-Kartuschen Oasis HLB 3cc	Waters, Eschborn, DE
Sulfatase ( <i>H. pomatia</i> ), 15.000 U/g	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
β-Glucuronidase ( <i>H. pomatia</i> ), 600.000 U/g	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE

<sup>14</sup> MTBSTFA = N-(t-butyltrimethylsilyl)-N-methyl-trifluoracetamid

### 2.1.6 Chemikalien für die Polyphenolanalytik (GC/MS)

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle angegebenen Chemikalien und Lösungsmitteln mit höchstem Reinheitsgrad erworben.

Chemikalie	Firma
Benzoessäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
BSTFA <sup>15</sup> (99% mit 1 % TMCS <sup>16</sup> )	Fluka, Neu-Ulm, DE
Catechin	Extrasynthese, Genay, FR
2,4- Dihydroxybenzoessäure (2,4-OH-BA)	Fluka, Neu-Ulm, DE
2,5- Dihydroxybenzoessäure (2,5-OH-BA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
3,4- Dihydroxybenzoessäure (Protocatechusäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (3,4-diOH-PA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-Propionsäure (3,4-diOH-PP)	Fluka, Neu-Ulm, DE
3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure)	Fluka, Neu-Ulm, DE
2,3-Dimethoxybenzoessäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Epicatechin	Extrasynthese, Genay, FR
3-Hydroxybenzoessäure (3-OH-BA)	Fluka, Neu-Ulm, DE
4-Hydroxybenzoessäure (4-OH-BA)	Fluka, Neu-Ulm, DE
4-Hydroxy, 3-Methoxybenzoessäure (Vanillinsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
3-Hydroxy, 4-Methoxybenzoessäure (Isovanillinsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
4-Hydroxy,3-Methoxyphenylessigsäure (Homovanillinsäure)	Fluka, Neu-Ulm, DE

<sup>15</sup> BSTFA = N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid

<sup>16</sup> TMCS = Trimethylchlorsilan

3-Hydroxyphenylessigsäure (3-OH-PA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
4-Hydroxyphenylessigsäure (4-OH-PA)	Fluka, Neu-Ulm, DE
3-(4-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (4-OH-PP)	Fluka, Neu-Ulm, DE
4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
4-Hydroxy, 3-Methoxyzimtsäure (Ferulasäure)	Fluka, Neu-Ulm, DE
3-Hydroxy, 4-Methoxyzimtsäure (Isoferulasäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Phenylessigsäure (PA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
3-Phenylpropionsäure (PP)	Fluka, Neu-Ulm, DE
Phloretin	Extrasynthese, Genay, FR
<i>trans</i> -Zimtsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (2,4,6-triOH-BA)	Fluka, Neu-Ulm, DE
3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
1,3,5-Trihydroxybenzol (Phlorogluzinol)	Fluka, Neu-Ulm, DE
2,4,5-Trimethoxy-Zimtsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE

**2.1.7 ELISA<sup>17</sup>-Materialien**

---

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Adiponektin	Mediagnost, Reutlingen, DE
CRP	DSL, Texas, USA
Ghrelin	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA
Insulin	DSL, Texas, USA
IGF-1	DSL, Texas, USA
IGFBP-3	DSL, Texas, USA
IL-6	Immunotech, Prag, CZ
Leptin	DRG Instruments GmbH, Marburg, DE
Resistin	Mediagnost, Reutlingen, DE
sICAM-1	Immunotech, Prag, CZ
sVCAM-1	Immunotech, Prag, CZ
TNF- $\alpha$	Immunotech, Prag, CZ

---

<sup>17</sup> ELISA = Enzym-linked Immunosorbent Assay

### **2.1.8 Zusammensetzung des Apfelsaftes und des Kontrollgetränkes für die Humaninterventionsstudie**

Die Studiengetränke wurden von der Forschungsanstalt (FA) Geisenheim, Fachgebiet Obstbau, produziert und für die Studie zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Getränke wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### **Herstellung des Apfelsaftes**

Der Saft wurde aus verschiedenen Apfelsorten der Ernte 2005 hergestellt. Die Äpfel stammten vom Fachgebiet Obstbau der FA Geisenheim bzw. wurden von Produzenten aus dem ganzen Bundesgebiet zugekauft. Es wurde folgende Zusammensetzung gewählt: *Bittenfelder* (10 %), *Topaz* (24 %), *Bohnapfel* (23 %), *Seestermüher* (25 %) und *Börtlinger Weinapfel* (18 %). Bei dem verwendeten Obst handelt es sich mit Ausnahme des Tafelapfels *Topaz* bei den übrigen Äpfeln um klassische Mostobstsorten. Die Apfelsäfte wurden zunächst sortenrein hergestellt. Die Äpfel wurden mit einer Schneidmühle (Fa. Seepex, Bottrop, DE) gemahlen. Anschließend wurde die Maische in einer Horizontalpresse (Fa. Bucher, Niederweningen, CH) abgepresst. In den ablaufenden trüben Saft wurden zum Schutz vor Oxidation 200 mg/L Ascorbinsäure zugegeben. Die Separation erfolgte in einem Tellerseparator (Westfalia SAR 3036). Die naturtrüben Säfte wurden über Kurzzeiterhitzung (85°C, 30-40 sec) in Edelstahltanks eingelagert. Die sortenreinen Säfte wurden anschließend gemischt, der fertige Saft wurde bis zur Verwendung in Kühlräumen bei 4°C gelagert. Die Analyse der Polyphenole (HPLC/DAD) sowie weiterer analytischer Kennzahlen fand in Geisenheim statt. Die Daten wurden für das Projekt freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Dietrich *et al.*, 2005) Die Ergebnisse der Polyphenolanalytik sind in Tabelle 2.1 dargestellt.



**Tabelle 2.1:** Konzentration in mg/L der Polyphenole im Apfelsaft AS05. Die Daten wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt.

<b>Polyphenol</b>	<b>Konzentration [mg/L]</b>
Procyanidin B1	3,8
Catechin	5,9
Procyanidin B2	13,8
Epicatechin	14,7
Procyanidin C1	6,1
Phloretin-2'-xyloglucosid	65,8
Unbekanntes Dihydrochalcon	6,0
Phlorizin	22,8
Cumaroylglucose	0,9
Chlorogensäure	168,8
Kryptochlorogensäure	14,1
4-Cumaroyl-Chinasäure	38,3
Quercetin-3-galactosid	1,2
Quercetin-3-glucosid	0,4
Quercetin-3-rhamnosid	1,3
<b>Gesamt-Polyphenolgehalt</b>	<b>363,7</b>

### Herstellung des isokalorischen Kontrollgetränkes

Das Kontrollgetränk sollte vergleichbare Konzentrationen an Zuckern, Mineralstoffen, Ascorbinsäure und an organischen Säuren zu dem in der Studie parallel eingesetzten Apfelsaftes AS05 enthalten. Nach Einwaage und Auflösen der entsprechenden Substanzen in destilliertem Wasser wurde das Getränk in 0,75 L Schlegelflaschen heiß abgefüllt. Wie der Apfelsaft wurde das Kontrollgetränk bis zu Verwendung bei 4°C gelagert. Ein Vergleich der analytischen Kennzahlen zwischen Kontrollgetränk und AS05 befindet sich in Tabelle 2.2.

**Tabelle 2.2:** Vergleich der Konzentrationen an Zuckern, organischen Säuren, Ascorbinsäure und Mineralstoffen des im Rahmen der Humaninterventionsstudie eingesetzten Kontrollgetränkes bzw. Apfelsaftes. Die Daten wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>ISOKALORISCHES KONTROLLGETRÄNK</b>	<b>APFELSAFT AS05</b>
Glukose [g/L]	21	21
Fruktose [g/L]	65	67
Saccharose [g/L]	32	36
L-Äpfelsäure [g/L]	5,6	9,8
Sorbit [g/L]	5,5	5,9
Ascorbinsäure [mg/L]	240	311
Kalium [mg/L]	1012	1217
Kalzium [mg/L]	62	68
Magnesium [mg/L]	53	57

## **2.2 Rekrutierung und medizinische Voruntersuchung für die Humaninterventionsstudie**

### **2.2.1 Probanden-Rekrutierung**

Für die Interventionsstudie wurden Probanden durch Zeitungsannoncen, Aushänge und Flugblätter im Kreis Freising / München rekrutiert. Die Interessenten wurden telefonisch zu ihrem Gesundheitszustand, ihren Körpermaßen und Ernährungsgewohnheiten befragt. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien (gesund, männlich, Nichtraucher, Alter 20-60 Jahre, BMI 20-25 kg/m<sup>2</sup>, keine vegetarische Ernährung oder sonstige alternative Ernährungsform, keine Extremsportler) wurden sie zur medizinischen Voruntersuchung eingeladen. Der Ablauf der Voruntersuchung wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

### **2.2.2 Ablauf der medizinischen Voruntersuchung**

Die Probanden hielten vor der medizinischen Voruntersuchung eine zwölfstündige Nahrungskarenz ein. Um eine Eignung für die Studienteilnahme festzustellen, wurden die Interessenten auf folgende Parameter untersucht:

- Erhebung anthropometrischer Daten (Größe und Gewicht)
- Urinstatus: Aus dem Mittelstrahl-Urin jedes Probanden wurden mittels Urinteststreifen Parameter wie pH-Wert, Dichte, Glukose, Leukozyten etc. bestimmt. Bei pathologischen Befunden der Teststreifenuntersuchung wurde das Urinsediment mikroskopisch begutachtet.
- Puls- und Blutdruckmessung
- Blutuntersuchung: Von jedem Probanden wurde die Blutsenkungsgeschwindigkeit durch Ablesen der Skala des Blutsenkungsröhrchens nach 1 und 2 h bestimmt. Durch ein zertifiziertes Auftragslabor (Medizinisches Untersuchungszentrum, Labor Tiller, München) wurde die Bestimmung der folgenden Parameter durchgeführt:
  - Kleines Blutbild (Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCV, MCHC<sup>18</sup>)
  - Transaminasen (GPT, GOT,  $\gamma$ GT<sup>19</sup>), Bilirubin

---

<sup>18</sup> MCH = Mean Corpuscular Haemoglobin; MCV = Mean Corpuscular Volume; MCHC = Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration.

<sup>19</sup> GPT=Glutamat-Pyruvat-Transaminase; GOT=Glutamat-Oxalazetat-Transaminase;

- Lipidstatus (Gesamtcholesterol, LDL, HDL<sup>20</sup>, Triglyceride)
- Harnsäure, Kreatinin
- Kalium, Natrium
- Oraler Glukosetoleranztest: Den Probanden wurde Kapillarblut aus der Fingerkuppe entnommen und der Nüchtern-Glukosewert bestimmt. Anschließend konsumierten die Probanden 300 mL Glukosesaft (75 g Glukose). Durch Entnahme von Kapillarblut nach 30, 60, 90 und 120 min wurde der Verlauf des Blut-Glukosespiegels ermittelt.

## 2.3 Durchführung der Humaninterventionsstudie

### 2.3.1 Studiendesign

Das Probandenkollektiv (n=58) wurde randomisiert in zwei Gruppen (Apfelsaftgruppe, n=30; Kontrollgruppe, n=28<sup>21</sup>) eingeteilt. Jeder Studienteilnehmer begann mit einer einwöchigen Depletionsphase mit polyphenolarmer Ernährung, der sich eine vierwöchige Interventionsphase anschloss (Abb. 2.1). Die eine Hälfte des Probandenkollektivs trank über den vierwöchigen Zeitraum täglich 750 mL des naturtrüben Apfelsaftes AS05 (Apfelsaftgruppe), die andere Hälfte konsumierte täglich 750 mL des isokalorischen Kontrollgetränkes (Kontrollgruppe). Alle Probanden sammelten jeweils am Ende der Depletionsphase (Tag 7) und der Interventionsphase (Tag 34) über 24 h Urin und fanden sich am Folgetag (Tag 8 bzw. 35) nüchtern zur medizinischen Hauptuntersuchung ein. Ein Teil der Probanden (12 aus der Apfelsaft-, 10 aus der Kontrollgetränkegruppe) sammelte zusätzlich gegen Ende der Depletions- (Tag 6-8) und der Interventionsphase (Tag 33-35) über 48 h Stuhl in Gefriertoiletten, in welchen die Proben sofort auf -15°C gekühlt werden können, so dass die mikrobielle Aktivität weitestgehend gestoppt wird. Während dieses 48-stündigen Zeitraums hielten sich die Probanden im Probandentrakt des Lehrstuhls für Ernährungsmedizin auf. Um ernährungsbedingte Einflussfaktoren auf z. B. den Polyphenolgehalt der Proben möglichst gering zu halten, bekamen die Probanden zwei Tage vor und während der Probensammlung eine standardisierte Diät (Anhang 8.3). Darüber hinaus dokumentierten die Probanden an diesen Tagen ihre Trinkmenge (Anhang 8.6). Jeder Teilnehmer erhielt detaillierte Anweisungen zum Verzicht bzw. Einschränkung des Verzehr

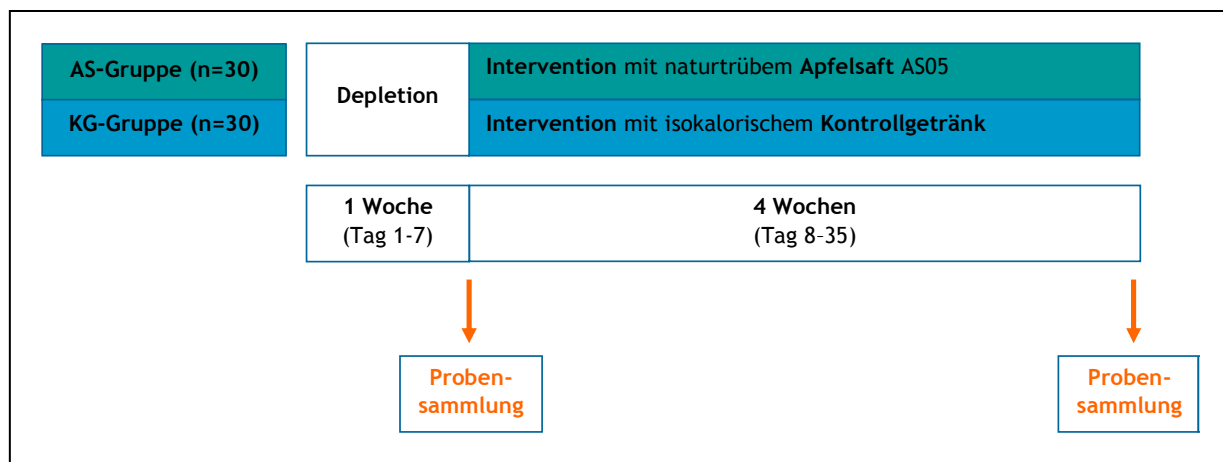
---

γGT=γ-Gammaplutamyltranspeptidase

<sup>20</sup> LDL = Low Density Lipoprotein; HDL = High Density Lipoprotein

<sup>21</sup> Zwei Probanden der Kontrollgruppe brachen die Studie in Studienwoche 2 bzw. 5 aus persönlichen Gründen ab.

polyphenolreicher Lebensmittel (Ernährungsleitfaden im Anhang, Abschnitt 8.4). Die Einhaltung dieser Instruktionen dokumentierten die Probanden in Ernährungsprotokollen über den gesamten Zeitraum (Ernährungsprotokoll im Anhang, Abschnitt 8.5). Ferner erhielten die Probanden eine Informationsbroschüre mit Terminkalender, um eine termingerechte Einhaltung und einen korrekten Ablauf der Probensammlung zu gewährleisten (Anhang 8.7).



**Abbildung 2.1: Studiendesign der fünfwöchigen Humaninterventionsstudie** mit naturtrübem Apfelsaft (Apfelsaftgruppe, AS-Gruppe) bzw. isokalorischem Kontrollgetränk (Kontrollgetränkgruppe, KG-Gruppe). Am Ende der Depletions- und Interventionsphase sammelten die Probanden über 48 h Stuhl, über 24 h Urin und kamen am Folgetag zur medizinischen Hauptuntersuchung.

### 2.3.2 Ablauf der Hauptuntersuchung

Wie bei der Rekrutierung fanden sich die Probanden nüchtern zur Hauptuntersuchung ein. Sowohl nach der Depletionsphase als auch nach der Interventionsphase wurden die Studienteilnehmer auf folgende Parameter untersucht:

- Bestimmung des WHR: Der Taillenumfang wurde im Stehen zwischen unterstem Rippenbogen und Hüftkamm gemessen. Der Hüftumfang wird eine Handbreit oberhalb des Oberschenkelknochens (sog. *Trochanter major*) ermittelt. Die Berechnung des WHR erfolgte durch Bildung des Quotienten aus Taille- zu Hüftumfang.
- Bestimmung des Körpergewichtes: ohne Schuhe, mit leichter Bekleidung (geeichte Digitalwaage, Firma Seca, Modell Stativ Seca 703, Oberhausen).
- Bioelektrische Impedanzanalyse: Das rechte Fuß- und Handgelenk wurde mit Desinfektionsspray von Schmutz- bzw. Fettpartikeln befreit und Klebelektroden an den entsprechenden Stellen befestigt, die mit dem Monofrequenz-Impedanzanalysator

verbunden sind. Durch Anlegen eines leichten Wechselstromfeldes werden über den Widerstand der verschiedenen Körpergewebe der prozentuale Fettgehalt und die fettfreie Masse des Probanden bestimmt. Des Weiteren berechnet das Gerät nach Angabe von Alter, Geschlecht, Gewicht und Größe des Probanden den Grundumsatz (kcal/Tag).

- Blutentnahme

### 2.3.3 Probennahme und Aufbewahrung

Für weitere Laboruntersuchungen wurden folgende Proben gesammelt und entsprechend konserviert:

- Blutentnahme: Aus den Blutproben wurde direkt nach der Entnahme EDTA<sup>22</sup>- bzw. Heparin-Plasma sowie Serum gewonnen. Ein Teil der Proben wurde zur Bestimmung verschiedener Fettstoffwechselmarker (Triglyceride, Gesamtcholesterol, LDL, HDL) sowie des Diabetes-Markers HbA1c genutzt. Diese Parameter wurden wie bei der Rekrutierung durch ein zertifiziertes Auftragslabor durchgeführt. Für weitere Analysen wurden die restlichen Serum- bzw. Plasmaproben aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.
- Sammlung von 24h-Urin: Die Urinproben wurden von den Probanden in 2,5 L Auffangbehältern gesammelt. Zur Stabilisierung wurden den Gefäßen vorher einige Kristalle Natriumazid zugegeben. Nach Ermittlung des pH-Wertes und photometrischer Bestimmung des Kreatiningehaltes (Kreatinin-Kit: Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, DE) wurden die Urinproben aliquotiert und bis zu Analyse bei -80°C gelagert.
- Sammlung von 48h-Stuhlproben: Die Stuhlproben wurden von den Probanden in speziellen Gefriertoiletten gesammelt, welche die Proben auf -15°C kühlten. Die Proben wurden gewogen und bis zu Aufarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

---

<sup>22</sup> Ethylendiamin-Tetraessigsäure

## 2.4 Fäzes- und Fäzeswasseruntersuchungen

### 2.4.1 Gewinnung von Fäzeswasser

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Fäzesproben wurden über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und am nächsten Morgen für 5 Minuten auf Stufe 7 im Bagmixer bei  $4^{\circ}\text{C}$  homogenisiert. Für die pH-Wertbestimmung wurde von jedem Probanden unverdünntes Fäzeswasser (Fäzeswasser) hergestellt. Für die Polyphenol- und Fettsäureanalytik wurden Fäzeswasser-Präparationen im Verhältnis 1:2 mit PBS hergestellt.

Alle folgenden Aufbereitungsschritte fanden bei  $4^{\circ}\text{C}$  bzw. unter Eiskühlung statt.

- unverdünntes Fäzeswasser für die Bestimmung des pH-Wertes und der Osmolalität: Aliquots von ca. 30 g wurden in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei  $100.000\times g$  für 1 Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mittels pH-Meter bzw. Osmometer wurden anschließend der pH-Wert und die Osmolalität (mosmol/L) bestimmt.
- 1:2 verdünntes Fäzeswasser für die Polyphenol- und Fettsäureanalytik und Bestimmung der Fäzeswasser-Zytotoxizität: ca. 15 g Fäzesprobe wurden mit 15 mL PBS ( $4^{\circ}\text{C}$ ) versetzt. Nach Zusatz 6-8 kleiner Glaskugeln wurde die Probe so lange gevortext, bis eine Suspension entstand. Die Suspension wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und ebenfalls bei  $100.000\times g$  für 1 Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort filtriert ( $0,45\ \mu\text{M}$ ), aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren

### **2.4.2 Bestimmung des Stuhlwassergehaltes**

1-2 g der aufgetauten Probe wurden auf einem vorgewogenem Wägeschiffchen ausgestrichen. Die Proben wurden in einer Gefriertrocknungsanlage innerhalb von 24 h zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Stuhlwassergehalt (%) nach Rückwaage des Wägeschiffchens errechnet.

### **2.4.3 Polyphenolanalytik von Fäzeswasser mittels GC/MS**

#### **Festphasenextraktion**

Zur Bestimmung des Anteils an Polyphenol-Metaboliten in Fäzeswasser mittels GC/MS wurden die Proben zur Aufreinigung einer Festphasenextraktion unterzogen. Die Fäzeswasser-Proben (1:2 verdünntes Fäzeswasser) wurden einmal ohne enzymatische Umsetzung analysiert bzw. zur Bestimmung des Anteils an Phase-II-Metaboliten mit einem Gemisch aus Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert. Die Festphasenkartuschen wurden mit 3 mL Methanol und 3 mL Wasser (pH = 2) vorkonditioniert.

Zur Bestimmung des Polyphenolprofils ohne enzymatische Hydrolyse wurden 1,8 mL Fäzeswasser mit 50  $\mu$ L 10 M HCl versetzt und zentrifugiert (13.000xg, 10 min). 1,5 mL Probe wurde auf die vorkonditionierte Säule appliziert. Der Waschvorgang erfolgte mit 3 mL Wasser (pH=2), die Elution mit 1,5 mL Methanol. Die Probe wurde zur Trockne eingengt.

Bei der Analyse mit enzymatischer Hydrolyse wurden zunächst 2,5 mL Fäzeswasser mit 0,3 mL Azetatpuffer (1,5 M, pH=5) sowie 1,5 mg  $\beta$ -Glucuronidase (ca. 600 Units) und 1,5 mg (ca. 150 Units) Sulfatase versetzt. Die Probe wurde bei 37°C für 2 h inkubiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ L 10 M HCl wurde die Reaktion gestoppt und die Probe 10 min abzentrifugiert (13.000xg). Vom Überstand wurden 2 mL zur Festphasenextraktion eingesetzt, die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

#### **Derivatisierung zu flüchtigen Trimethylsilyl-Derivaten**

Für die anschließende GC/MS-Analyse wurden die Polyphenole im aufgereinigten Fäzeswasser in flüchtige Verbindungen überführt. Als Ausgangsmaterial für die Derivatisierung dienten die getrockneten Eluate aus der Festphasenextraktion. Dazu wurden die einrotierten Proben (ohne und mit enzymatischer Behandlung) in 1,8 mL Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von 30  $\mu$ L wurde in ein GC-Gläschen überführt und unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Nach Zusatz von 30  $\mu$ L eines Gemisches der internen Standards 2,3-Dimethoxybenzoesäure und 2,4,5-Trimethoxyzimtsäure (jeweils 5  $\mu$ M) wurde



erneut zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgte durch Zusatz von 60  $\mu\text{L}$  BSTFA bei einer Reaktionstemperatur von 80°C innerhalb 20 min die Umsetzung von flüchtigen Trimethylsilyl(TMS)-Derivaten. Die Einführung einer TMS-Gruppe führt zu einer Massenerhöhung von 72 amu. Für die Identifizierung und die quantitative Analyse wurden für jede Komponente das Vorläufer-Ion und ein substanzspezifisches Qualifier-Ion herangezogen (Massenübersicht in Anhang 8.1).

### **Analyse mittels GC/MS**

Die gaschromatographische Analyse mit Massenanalysator (Quadrupol) erfolgte bei allen Proben unter folgenden Bedingungen:

#### **GC/MS-Parameter :**

Gaschromatograph:	Agilent Technologies 6980N
Säule:	HP-5ms, ca. 30 m, i. D. 25 mm (Agilent Technologies)
Trärgas:	Helium (0,7 mL/min)
Injektionsvolumen:	2 $\mu\text{L}$ (Split 12:1)
Injektortemperatur:	275°C
Interface:	280°C
Ionenquelle:	230°C
Quadrupol:	150°C
Scanrate:	100 ms
Massenbereich:	40-600 amu

#### **Temperaturprogramm:**

Anfangstemperatur: 75°C	→	Isotherme 1: 5 min	→	Aufheizrate 1: 10°C/min
Temperatur 2: 180°C	→	Isotherme 2: 5 min	→	Aufheizrate 2: 30°C/min
Temperatur 3: 240°C	→	Isotherme 3: 0 min	→	Aufheizrate 3: 40°C/min
Temperatur 4: 280°	→	Isotherme 3: 10min	→	Abkühlrate 3: 40°C/min
Temperatur 5: 75°C				

### 2.4.4 Fettsäureanalytik in Fäzeswasser mittels GC/FID

Zur Bestimmung des Anteils an kurzkettigen Fettsäuren in Fäzeswasser (1:2 verdünntes Fäzeswasser) wurde 1 mL Probe mit 50  $\mu$ L internem Standard (2-Ethylbuttersäure, Stammlösung 200 mM) versetzt und mit 500  $\mu$ L konzentrierter HCl angesäuert. Die protonierten Fettsäuren wurden mit 1 mL MTBE für 15 min extrahiert. 50  $\mu$ L der Etherphase wurden in ein GC-Gläschen überführt und mit 30  $\mu$ L des Derivatisierungsreagenzes MTBSTFA versetzt. Bei einer Reaktionstemperatur von 80°C für 20 min erfolgte die Umsetzung zu flüchtigen t-Butyldimethylsilyl-Derivaten, die anschließend mittels GC/FID analysiert wurden.

#### GC/FID-Parameter:

Gaschromatograph:	Hewlett Packard 5890 series
Säule:	HP-5ms, ca. 30 m, i. D. 25 mm (Agilent Technologies)
Trägergas:	Helium (1 mL/min)
Injektionsvolumen:	2 $\mu$ L (Splitless)
Injektortemperatur:	275°C
Detektortemperatur:	300°C

#### Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 50°C	→	Isotherme 1: 5 min	→	Aufheizrate 1: 10°C/min
Temperatur 2: 180°C	→	Isotherme 2: 5 min	→	Aufheizrate 2: 30°C/min
Temperatur 3: 240°C	→	Isotherme 3: 10 min	→	Abkühlrate 1: 30°C/min
Temperatur 2: 50°	→	Isotherme 3: 5 min		

## 2.5 Polyphenolanalytik in Urin mittels GC/MS

### **Festphasenextraktion**

Als Vorbereitung für die Festphasenextraktion wurden die Urinproben jedes Probanden zentrifugiert (5 min, 3.000xg) und filtriert. Die Vorkonditionierung der Kartuschen, der Waschritt und die Elution wurden wie unter 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Wie bei der Fäzeswasser-Analytik wurden die Proben einmal ohne und einmal mit enzymatischer Hydrolyse untersucht.

Bei der Analyse ohne enzymatische Hydrolyse wurden je 3 mL Urin mit 50  $\mu$ L 10 M HCl angesäuert. Anschließend wurden 2,5 mL Urin einer Festphasenextraktion unterzogen. Das Eluat wurde unter Vakuum zur Trockne eingengt.

Bei der Analyse mit enzymatischer Hydrolyse wurden zunächst 3 mL zentrifugierter Urin mit 0,3 mL Azetatpuffer (1,5 M, pH=5) sowie 1,5 mg  $\beta$ -Glukuronidase und 1,5 mg Sulfatase versetzt. Die Probe wurde bei 37°C für 2 h inkubiert. Durch Zugabe von 100  $\mu$ L 10 M HCl wurde die Reaktion gestoppt und die Probe 5 min abzentrifugiert (3.000xg). Vom Überstand wurden 2,5 mL zur Festphasenextraktion eingesetzt, die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

### **Derivatisierung zu flüchtigen Trimethylsilyl-Derivaten**

Die einrotierten Eluate der Urinproben wurden in 1,8 mL Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von 30  $\mu$ L wurde in ein GC-Gläschen überführt und unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Nach Zusatz von 30  $\mu$ L eines Gemisches der internen Standards (s. 2.4.3) wurde erneut zur Trockne eingengt. Durch Zusatz von 30  $\mu$ L BSTFA erfolgte bei einer Reaktionstemperatur von 80°C innerhalb 20 min die Umsetzung von flüchtigen TMS-Derivaten.

### **Analyse mit GC/MS**

Die gaschromatographische Analyse mit Massenanalysator (Quadrupol) erfolgte bei allen Urinproben unter den unter 2.4.3 beschriebenen Bedingungen. Das Injektionsvolumen betrug 2  $\mu$ L bei einem Split-Verhältnis 6:1.

## **2.6 Polyphenolanalytik in Plasma mittels GC/MS**

### **Festphasenextraktion**

Aufgrund des geringen Probenvolumens wurden die Plasmaproben nur ohne enzymatische Hydrolyse analysiert. Ferner wurde in Vorversuchen bei den Plasmaproben mit enzymatischer Hydrolyse eine Gelbildung der Probe beobachtet, welche eine nachfolgende GC-Injektion nicht zuließ.

Als Vorbereitung auf die Festphasenextraktion wurden 5 mL Plasma mit 200  $\mu$ L 10 M HCl versetzt und zentrifugiert (13.000xg, 10 min). Nach Vorkonditionierung der Kartuschen wie

unter 2.4.3 wurden 4 mL Probe auf die Säule appliziert. Die Elution erfolgte mit 1,5 mL Methanol, das Eluat wurde anschließend zur Trockne eingengt.

### **Derivatisierung zu flüchtigen TMS-Derivaten**

Die einrotierte Probe wurde in 200 µL Methanol aufgenommen. Ein Aliquot von 60 µL wurde in ein GC-Gläschen überführt und unter Stickstoff erneut zur Trockne eingengt. Ein Gemisch der internen Standards (s. 2.4.3) wurde zupipettiert und erneut zur Trockne eingengt. Die Probe wurde mit 30 µL BSTFA versetzt und 20 min bei 80°C derivatisiert.

### **Analyse mittels GC/MS**

Die gaschromatographische Analyse mit Massenanalysator (Quadrupol) erfolgte bei allen Plasmaproben unter den unter 2.4.3 beschriebenen Bedingungen. Das Injektionsvolumen betrug 2 µL im Splitless-Modus.

## **2.7 Enzymgekoppelte Immunabsorptionstests (ELISA)**

Sämtliche Diabetesmarker (Insulin, IGF-1, IGFBP-3), Adipositasmarker (Adiponektin, Resisitn, Leptin) und Inflammationsmarker (TNF- $\alpha$ , sVCAM, sICAM, CRP, IL-6) wurden mit ELISA bestimmt. Zur Durchführung wurden die beiliegenden Protokolle der unter 2.1.8 aufgelisteten Hersteller verwendet.

### **Prinzip**

Das Durchführungsprinzip der verwendeten ELISAs basierte auf der Sandwich-Methode: Standards, Kontrollen und Proben wurden in Mikrovertiefungen inkubiert, die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet waren. Nach Inkubation und Waschen wurden die Vertiefungen mit einem anderen polyklonalen Antikörper behandelt, der mit dem Enzym Merrettichperoxidase markiert war. Nachdem die Vertiefungen zum zweiten Mal inkubiert und gewaschen worden waren, wurden sie mit dem Substrat Tetramethylbenzidin inkubiert. Anschließend wurde eine saure Stopp-Lösung zupipettiert und der Grad der enzymatischen Umsetzung des Substrats durch Zweiwellenlängen-Absorptionsmessung bei 450 und 620 nm ermittelt. Die gemessene Absorption war direkt proportional zu der Konzentration des vorhandenen Markers in den Standards, den Kontrollen bzw. in der Probe. Anhand der Reihe

von Standards wurde eine Standardkurve aus den Absorptionen gegen die Konzentration des Markers aufgezeichnet, aus der sich die Konzentrationen des Markers in den Kontrollen und Proben errechnen ließen.

## **2.8 Statistische Auswertung der Daten**

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm Sigma Plot Version 4.01, SigmaStat 3.0 (SPSS Science Software GmbH, Ekrath) und Microsoft Excel Version 7.0 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P \leq 0,05$  festgelegt.

Zur Überprüfung möglicher Behandlungseffekte zwischen Apfelsaft- und Kontrollgetränkekonsum wurde folgendes Testverfahren angewendet: es wurde die Differenz ( $\Delta$ ) der Messdaten von Intervention und Depletion ( $\Delta = \text{Intervention} - \text{Depletion}$ ) von Apfelsaft- bzw. Kontrollgetränkegruppe gebildet. Zum Vergleich der Datenunterschiede zwischen  $\Delta$  Apfelsaftgruppe und  $\Delta$  Kontrollgetränkegruppe wurde ein ungepaarter t-Test angewendet.

Waren die Daten im Kolmogorov-Smirnov-Test (Leilliefors-Korrektur) nicht normalverteilt, dienten die entsprechenden parameterfreien Verfahren Mann-Whitney Rangsummen-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test zur statistischen Auswertung.

Zur Erfassung von Zusammenhängen bzw. Abhängigkeiten wurde Korrelationen zwischen den gemessenen Parametern durchgeführt. Die visuellen Darstellungen lieferten keine Annahme zu einer linearen Beziehungen der untersuchten Parameter (siehe 3.6.4) und wurden aus diesem Grund in dieser Arbeit nicht weiter dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Probandenrekrutierung

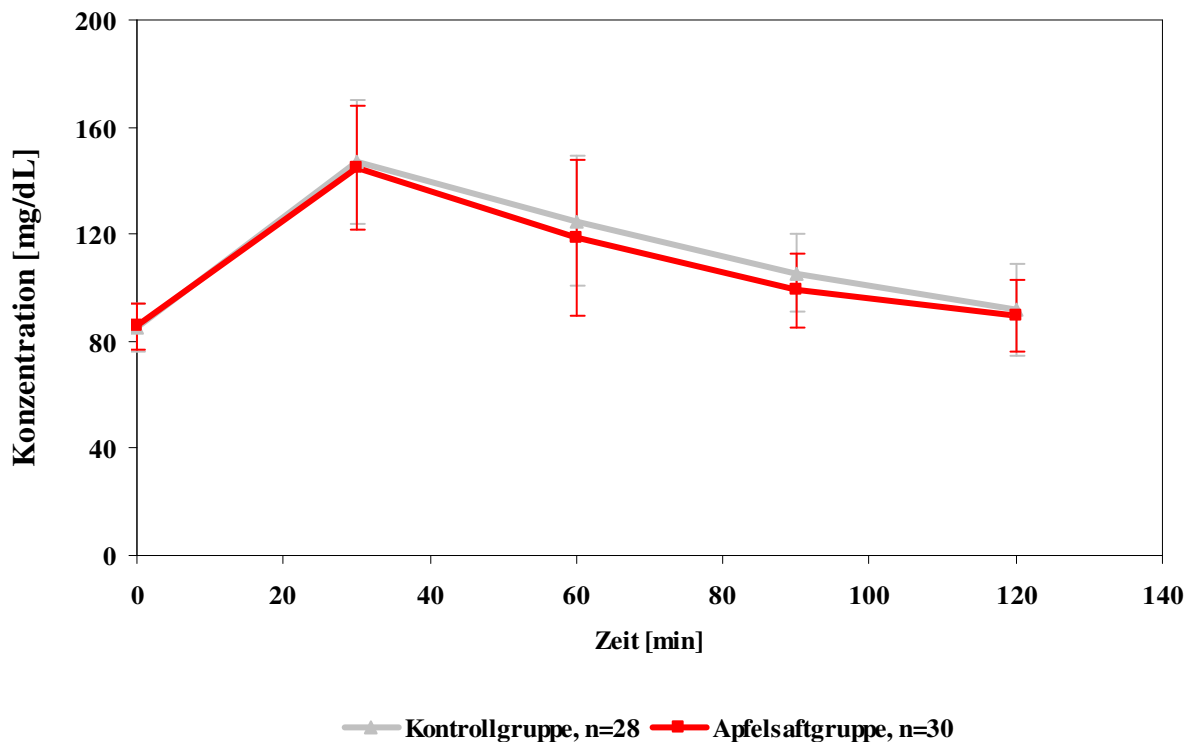
Im Rahmen der Rekrutierung wurden durch die medizinische Voruntersuchung die anthropometrischen Daten und Fettstoffwechselfparameter jedes Probanden erfasst (Tabelle 3.1). Die Teilnehmer wurden randomisiert der Kontroll- oder Apfelsaftgruppe zuordnet. Der statistische Vergleich zeigte keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Apfelsaftgruppe hinsichtlich ihrer anthropometrischen Daten und Fettstoffwechselfparameter.

**Tabelle 3.1: Anthropometrische Daten und Fettstoffwechselfparameter der Apfelsaft- und Kontrollgruppe,** die bei der der Probandenrekrutierung erhoben wurden (MW  $\pm$  SD).

<b>Probandendaten</b>	<b>Kontrollgruppe (n=28)</b>	<b>Apfelsaftgruppe (n=30)</b>	<b>Spanne des Gesamtkollektivs</b>	<b>p-Wert</b>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23,2 $\pm$ 1,3	23,4 $\pm$ 1,1	20,3 - 25,3	0,63
Alter [Jahre]	38,7 $\pm$ 10,8	38,3 $\pm$ 9,5	21 - 57	0,81
Serumtriglyzeride [mg/dL]	78,8 $\pm$ 31,3	90,7 $\pm$ 40,6	35 - 197	0,56
Gesamtcholes- terol [mg/dL]	185,6 $\pm$ 26,3	192,7 $\pm$ 27,6	134 - 245	0,42
LDL [mg/dL]	115,6 $\pm$ 30,1	123,3 $\pm$ 26,3	54 - 187	0,39
HDL [mg/dL]	61,1 $\pm$ 13,1	59,4 $\pm$ 14,6	39 - 94	0,69
LDL/HDL- Quotient	2,1 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,7	0,8 - 4,5	0,74

Mit jedem Probanden wurde ein oraler Glukosetoleranztest (OGT) durchgeführt, um Teilnehmer mit einer potentiellen Insulinresistenz und gestörter Glukosehomöostase auszuschließen. In Abbildung 3.1 ist der Nüchtern-Blutzuckerwert (t=0 min) sowie die Werte nach 30, 60, 90 und 120 Minuten nach einmaligem Konsum von Glukosesaft der Kontroll- und Apfelsaftgruppe dargestellt. Der durchschnittliche Nüchtern-Blutzuckerwert betrug 85,7  $\pm$  8,5 mg/dL (Apfelsaftgruppe) bzw. 85,0  $\pm$  8,7 mg/dL (Kontrollgruppe). Nach 120 min

betrug die Blutglukosekonzentration  $89,6 \pm 13,3$  mg/dL (Apfelsaftgruppe) bzw.  $92,0 \pm 17,1$  mg/dL (Kontrollgruppe).



**Abbildung 3.1: Ergebnis des oralen Glukosetoleranztests von Apfelsaft- und Kontrollgruppe (MW  $\pm$  SD).** t=0 min zeigt den Nüchterwert, die anderen Werte zeigen die Blutglukosekonzentrationen nach einmaligen Konsum eines Glukosesaftes nach 30, 60, 90 und 120 min.

## 3.2 Daten aus der Ernährungserhebung

Die Interessenten waren bereits im Rahmen der Rekrutierung eingehend zu ihren Ernährungsgewohnheiten befragt worden, um Teilnehmer mit einer vegetarischen oder sonstigen alternativen Ernährungsweise auszuschließen.

Zwei Tage vor und während der Probensammlung hielten alle Probanden der beiden Studiengruppen durch eine kontrollierte Diät eine einheitliche Nahrungsaufnahme ein. Tabelle 3.2 zeigt die angeordnete Nährstoffaufnahme der Probanden an den Studientagen 6-7 und 33-34 unter Berücksichtigung der Nährstoffzufuhr durch Apfelsaft bzw. Kontrollgetränk.

**Tabelle 3.2:** Kontrollierte Nährstoffaufnahme der Probanden aus Apfelsaft- bzw. Kontrollgetränkgruppe zwei Tage vor und während der Probensammlung.

<b>Nährstoffaufnahme (Tage 6,7 und 33, 34)</b>	<b>Energie [kcal]</b>	<b>Eiweiß [g]</b>	<b>Fett [g]</b>	<b>KH [g]</b>
Frühstück	533,1	17,7	19,4	85,1
Zwischenmahlzeit 1	94,0	1,1	0,2	21,4
Mittagessen	495,0	31,5	19,8	47,3
Nachtsch	100,8	1,9	4,8	12,5
Zwischenmahlzeit 2	117,0	4,5	2,0	20,4
Abendessen	462,9	31,5	11,4	71,6
Apfelsaft/Kontrollgetränk	427,5	0,8	0	87,8
<b>Gesamt</b>	<b>2230,3</b>	<b>89,0</b>	<b>57,6</b>	<b>345,9</b>
<b>Prozentualer Anteil [Energie %]</b>		<b>18,1</b>	<b>11,7</b>	<b>70,2</b>

### **3.3 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf anthropometrische Parameter und Fettstoffwechselfparameter**

In verschiedenen Studien konnte bei übergewichtigen Personen ein gewichtsreduzierender Effekt bzw. Senkung von Cholesterin oder Serumtriglyzeriden durch eine regelmäßige Zufuhr von Obst und Gemüse festgestellt werden [de Oliviera *et al.*, 2003]. Um den Effekt der Apfelsaftintervention bei gesunden Probanden zu ermitteln, wurden auch im Rahmen dieser Studie anthropometrische Größen und Fettstoffwechselfparameter vor und nach den Getränkeinterventionen erhoben.



### 3.3.1 Anthropometrische Parameter

Die anthropometrischen Daten der Kontroll- und Apfelsaftgruppe nach einwöchiger Depletion bzw. nach vierwöchiger Intervention sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Durch die Apfelsaftintervention wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe weder der BMI noch der Taille-Hüftquotient (WHR) der Probanden signifikant beeinflusst. Der durchschnittliche BMI in der Apfelsaftgruppe betrug  $23,3 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$ , in der Kontrollgruppe  $22,9 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$ . Der durchschnittliche betrug WHR  $0,93 \pm 0,04$ . Um Aufschluss über die Körperzusammensetzung der Probanden zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels bioelektrischer Impedanzanalyse der prozentuale Körperfettanteil sowie die fettfreie Masse jedes Probanden vor und nach Intervention erhoben. Durch die vierwöchige Apfelsaftintervention wurde die Körperzusammensetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant beeinflusst.

**Tabelle 3.3: Einfluss der Getränkeinterventionen auf anthropometrische Parameter (MW  $\pm$  SD).** Die untersuchten Größen änderten sich durch die vierwöchige Apfelsaftintervention nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Anthropometrischer Parameter	Kontrollgruppe (n=28)		Apfelsaftgruppe (n=30)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
BMI [ $\text{kg/m}^2$ ]	$22,9 \pm 1,3$	$22,9 \pm 1,3$	$23,3 \pm 1,3$	$23,3 \pm 1,3$	0,76
WHR	$0,93 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,04$	0,74
Fettfreie Masse [%]	$61,2 \pm 6,2$	$61,9 \pm 6,3$	$62,3 \pm 5,2$	$63,1 \pm 5,4$	0,84
Körperfett [kg]	$17,6 \pm 3,8$	$16,6 \pm 3,7$	$19,0 \pm 3,6$	$17,8 \pm 4,1$	0,67

### 3.3.1 Fettstoffwechselfparameter

Die Fettstoffwechselfparameter der Kontroll- und Apfelsaftgruppe nach einwöchiger Depletion bzw. nach vierwöchiger Intervention sind in Tabelle 3.4 dargestellt. In der Apfelsaftgruppe änderten sich die Fettstoffwechselwerte wie Serumtriglyzeride oder Gesamtcholesterol nach vierwöchiger Apfelsaftintervention im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Die durchschnittlichen Triglyzeridwerte betragen  $87,2 \pm 35,0$  mg/dL (Kontrollgruppe) bzw.  $89,4 \pm 47,1$  mg/dL (Apfelsaftgruppe). In der Kontrollgruppe lagen die durchschnittlichen Gesamtcholesterolwerte bei  $190,5 \pm 27,0$  mg/dL, in der Apfelsaftgruppe bei  $195,5 \pm 34,1$  mg/dL. Auch die Konzentrationen der einzelnen Cholesterolfractionen LDL und HDL wurden infolge der Apfelsaftintervention nicht signifikant verändert.

**Tabelle 3.4: Einfluss der Getränkeinterventionen auf Fettstoffwechselfparameter (MW  $\pm$  SD).** Die untersuchten Größen änderten sich durch die vierwöchige Apfelsaftintervention nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Fettstoffwechselparameter	Kontrollgruppe (n=28)		Apfelsaftgruppe (n=30)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
Serumtriglyzeride [mg/dL]	$81,5 \pm 35,3$	$93,3 \pm 34,6$	$83,6 \pm 37,8$	$95,2 \pm 56,4$	0,66
Gesamtcholesterol [mg/dL]	$185,1 \pm 24,1$	$195,9 \pm 29,9$	$188,3 \pm 30,7$	$202,6 \pm 37,5$	0,61
LDL [mg/dL]	$118,8 \pm 23,8$	$125,0 \pm 28,5$	$124,9 \pm 24,7$	$133,9 \pm 30,8$	0,66
HDL [mg/dL]	$61,0 \pm 13,3$	$59,7 \pm 14,0$	$56,0 \pm 13,3$	$59,0 \pm 16,7$	0,74
LDL/HDL-Quotient	$2,05 \pm 0,59$	$2,22 \pm 0,69$	$2,32 \pm 0,63$	$2,35 \pm 0,71$	0,51

### 3.4 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Fäzes- und Fäzeswasser-Parameter

Wie unter 2.3.1 beschrieben, sammelten zusätzlich 12 Teilnehmer der Apfelsaftgruppe und 10 Teilnehmer der Kontrollgruppe an den beschriebenen Tagen Stuhlproben. Der Altersdurchschnitt bzw. der BMI dieser Teilnehmer lag bei 36,4 Jahre und 23,0 kg/m<sup>2</sup> (Apfelsaftgruppe) bzw. 36,3 Jahre und 23,2 kg/m<sup>2</sup> (Kontrollgruppe).

#### 3.4.1 Stuhlgewicht, Stuhlwassergehalt und pH-Wert

Der vierwöchige Apfelsaftkonsum trug zu keiner Änderung des Stuhlgewichts und des Wassergehaltes der Fäzesproben bei (Tabelle 3.5). Der pH-Wert von unverdünntem Fäzeswasser blieb mit 6,90 vor und nach der vierwöchigen Apfelsaftintervention unverändert.

**Tabelle 3.5: Einfluss der Getränkeinterventionen auf verschiedene Fäzes- und FW-Parameter (MW ± SD).** Durch die Apfelsaftintervention wurden die untersuchten Größen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert.

Fäzes- / FW- parameter	Kontrollgruppe (n=10)		Apfelsaftgruppe (n=12)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
Stuhlgewicht [g]	206 ± 79	189 ± 123	178 ± 112	181 ± 127	0,83
Wassergehalt [%]	75,4 ± 4,1	73,4 ± 5,0	73,5 ± 7,9	75,2 ± 5,9	0,96
pH-Wert	6,89 ± 0,41	6,94 ± 0,44	6,90 ± 0,23	6,90 ± 0,33	0,72

Da die alimentäre Flüssigkeitszufuhr Größen wie Stuhlgewicht und Stuhlwassergehalt maßgeblich beeinflussen kann, dokumentierten die Probanden einen Tag vor und während der 48-stündigen Sammelperiode die tägliche Aufnahme an Getränken wie Wasser, Tee, Kaffee sowie Studien-Apfelsaft bzw. Kontrollgetränk (Protokoll siehe Anhang 8.6). Aus den Daten wurde die durchschnittliche Flüssigkeitszufuhr der Probanden aus Kontroll- und Apfelsaftgruppe erfasst (Tabelle 3.6). Die Zufuhr an Flüssigkeit blieb sowohl an den Tagen

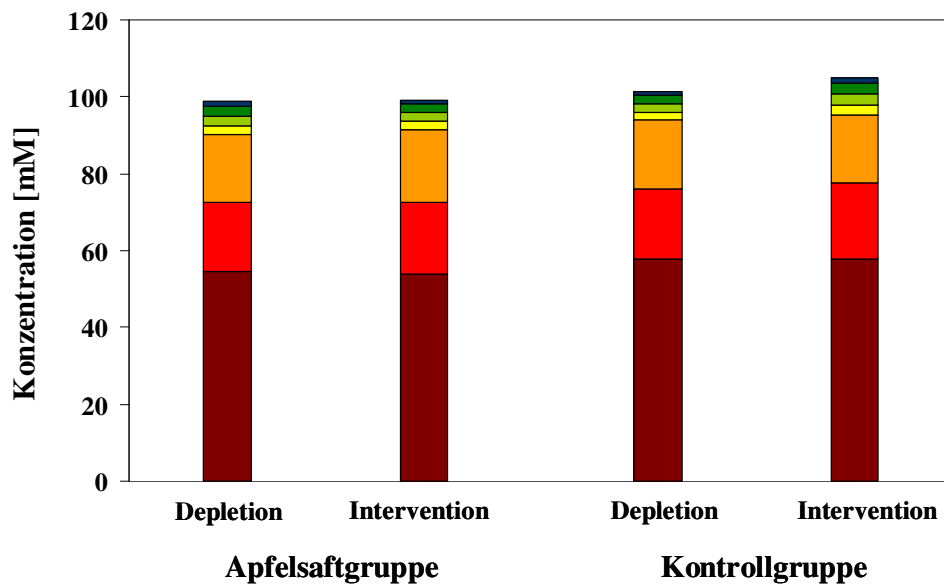
der Depletionsphase als auch während der Interventionsphase weitgehend konstant. Ferner wurde untersucht, ob eine hohe Flüssigkeitszufuhr mit einem hohen Stuhlgewicht oder Stuhlwassergehalt korreliert. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation ermittelt werden.

**Tabelle 3.6: Durchschnittliche Flüssigkeitszufuhr [L] der Probanden vor und während der 48-stündigen Stuhlsammelperiode (MW  $\pm$  SD).** Die alimentäre Aufnahme an Getränken blieb über die Tage vor (Tag 5 und 32) und während (Tag 6,7 und 33,34) der Sammelperiode weitgehend konstant.

Studienphase	Flüssigkeitszufuhr [L] der Kontrollgruppe (n=10)			Flüssigkeitszufuhr [L] der Apfelsaftgruppe (n=12)		
	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Depletion (MW $\pm$ SD)	2,1 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,9
	Tag 32	Tag 33	Tag 34	Tag 32	Tag 33	Tag 34
Intervention (MW $\pm$ SD)	2,4 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,9	2,6 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,8

### 3.4.2 Kurzkettige Fettsäuren in Fäzeswasser

Um den Einfluss der vierwöchigen Zufuhr des ballaststoffhaltigen Trubs des Apfelsaftes auf die luminale Konzentration an Fermentationsprodukten ermitteln zu können, wurden in den 1:2 mit PBS präparierten Fäzeswasserproben der Probanden die Hauptfermentationsprodukte Azetat, Propionat und Butyrat mittels GC/FID bestimmt (Abbildung 3.2). Zusätzlich wurden auch die längerkettigen Fettsäuren (Valerat, Caproat) und die verzweigt-kettigen Homologe (Isobutyrat, Isovalerat) in die Bestimmung aufgenommen. Die Messdaten (MW  $\pm$  SD) der einzelnen Fettsäuren befinden sich in Anhang 8.2.

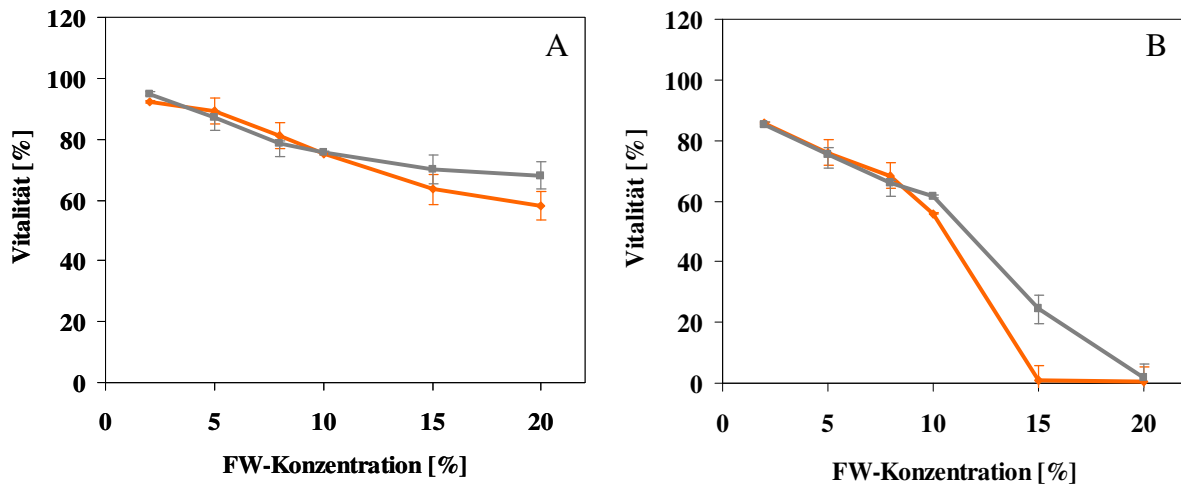


**Abbildung 3.2: Einfluss der Apfelsaftinterventionen auf die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren** (■ Azetat, ■ Propionat, ■ Butyrat, ■ Isobutyrat, ■ Isovalerat, ■ Valerat, ■ Caproat). Die Messdaten (MW ± SD) befinden sich in Anhang 8.2.

Der vierwöchige Konsum des naturtrüben Apfelsaftes beeinflusste die Konzentration der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht. Der durchschnittliche Gesamtfettsäuregehalt betrug  $101,1 \pm 2,8$  mM. Auch das prozentuale Verhältnis der einzelnen Fettsäuren im Vergleich zum Gesamtfettsäuregehalt blieb unverändert. Zwischen dem gemessenen pH-Wert und der Konzentration der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren bzw. der Gesamtfettsäurekonzentration ( $r=0,16$ ;  $p=0,43$ ) zeigte sich kein linearer Zusammenhang.

### 3.4.3 Fäzeswasser-Zytotoxizität

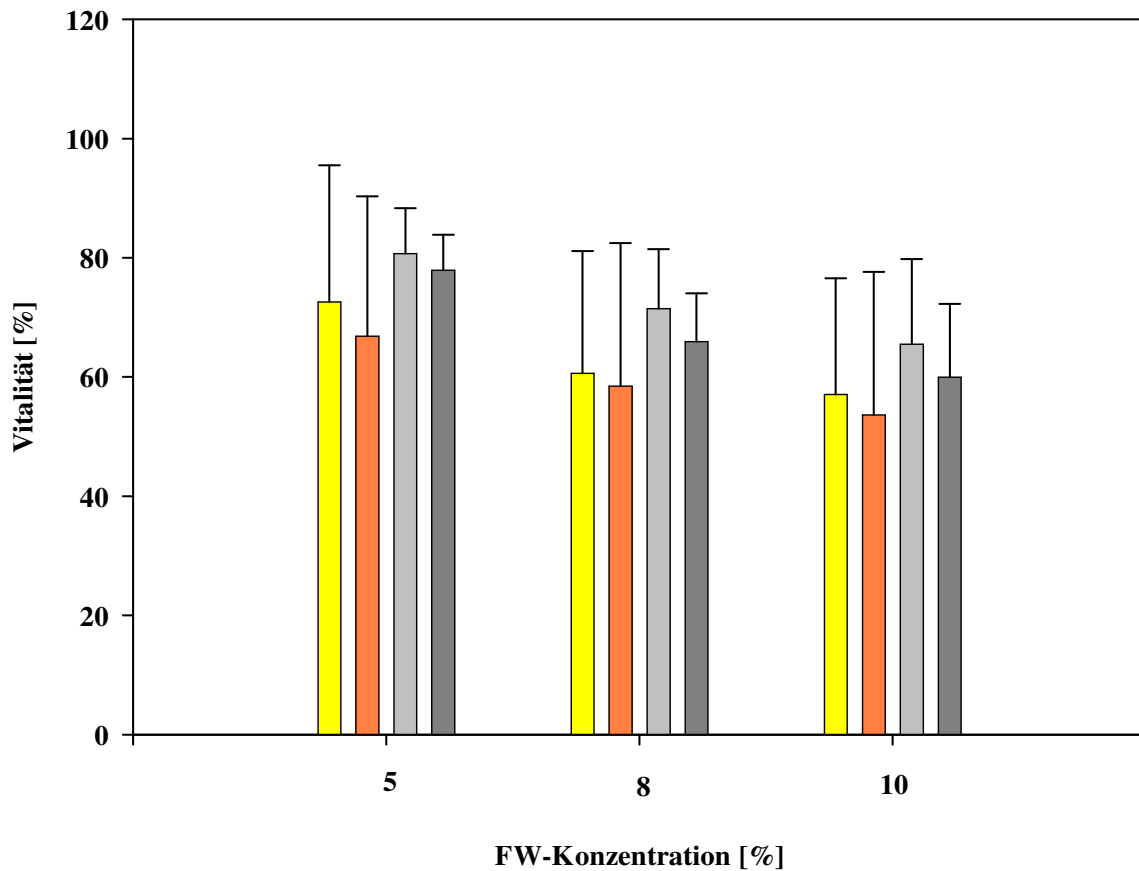
Nach 24h-Inkubation mit 1:2-präpariertem FW war bei allen Probanden eine deutliche dosisabhängige Abnahme der Vitalität von HT29-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (PBS) zu beobachten. Dies ist exemplarisch anhand zweier Probanden A und B der Apfelsaftgruppe sowohl vor als auch nach vierwöchiger Intervention dargestellt (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Dosisabhängiger zytotoxischer, Effekt von Fäzeswasser am Beispiel zweier Probanden A und B aus der Apfelsaftgruppe in Abhängigkeit der Studienphasen. Dargestellt sind die Vitalitätsraten aus einem Experiment in Dreifachbestimmung ( $MW \pm SD$ ) relativ zur unbehandelten PBS-Kontrolle (■ Depletion, ● Intervention).

Während die intraindividuellen Schwankungen der Probanden hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung der FW-Proben im Allgemeinen relativ gering waren, war dagegen eine deutliche interindividuelle Variabilität zu verzeichnen: Die FW-Proben einiger Probanden, wie anhand Proband B dargestellt, führten zum kompletten Absterben der Zellen im FW-Konzentrationsbereich von 15 - 20 %. Die FW-Proben anderer Probanden, wie an Beispiel A gezeigt, zeigten nur mäßig toxische Effekte, da selbst bei einer FW-Konzentration von 20 % (v/v in Komplettmedium) die Zellvitalität um maximal 40 - 50 % abnahm.

Um den Einfluss der Apfelsaftintervention auf die FW-Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch zu ermitteln, wurden die Vitalitätswerte bei einer FW-Konzentration von 5, 8 und 10 % FW (v/v in Komplettmedium) für die Auswertung herangezogen, da in diesem Bereich beginnende Effekte auf die Vitalität zu erwarten waren (Abbildung 3.4). Bei den FW-Konzentrationen von 5, 8 und 10 % zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der zytotoxischen Eigenschaften, weder in Abhängigkeit der Studienphase noch des konsumierten Getränkes.



**Abbildung 3.4:** Zytotoxische Wirkung von 5, 8 und 10 % Fäzeswasser der Apfelsaftgruppe (n=12) und der Kontrollgruppe (n=10) in Abhängigkeit der Studienphasen auf die Vitalität von HT29-Zellen nach 24h Inkubation (■ Apfelsaftgruppe Depletion; ■ Apfelsaftgruppe Intervention; ■ Kontrollgruppe Depletion; ■ Kontrollgruppe Intervention).

### 3.5 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf das Polyphenolprofil

#### 3.5.1 Polyphenole in Urin und Fäzeswasser

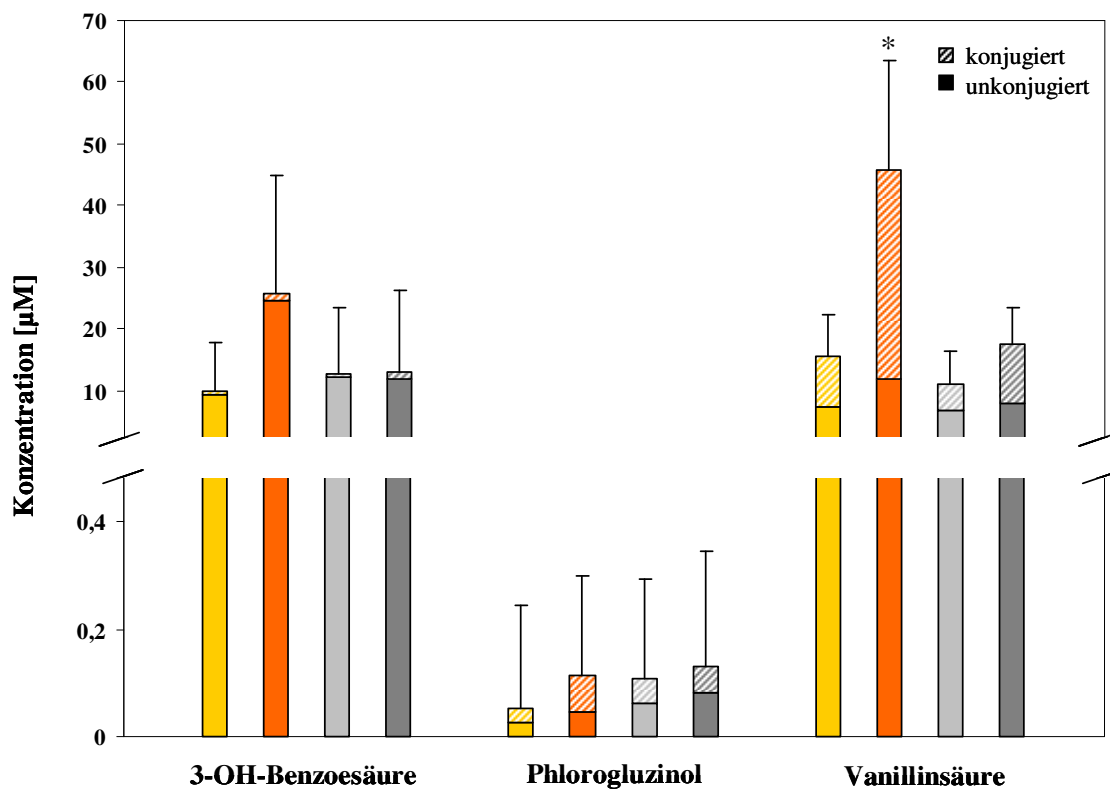
Mit den unter Abschnitt 2.4 und 2.5 vorgestellten Methoden wurden Apfelsaftpolyphenole und deren postulierte Abbauprodukte in den Urin- und FW-Proben der Probanden aus Apfelsaft- und Kontrollgruppe aus beiden Studienphasen gemessen. Zur besseren Übersicht wurden Metabolite mit strukturellen Gemeinsamkeiten (Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyphenylelessigsäuren, Phenylpropionsäuren und Hydroxyzimtsäuren und intakte Apfelsaftpolyphenole) graphisch zusammengefasst.

Da die Urin- und FW-Proben einmal ohne und einmal mit enzymatischer Hydrolyse aufbereitet wurden, konnte das Verhältnis von freier zu konjugierter Form (Glukuronide und Sulfate) der einzelnen Polyphenole ermittelt werden, was in den folgenden Abschnitten ebenfalls graphisch dargestellt ist.

### 3.5.1.1 Hydroxybenzoesäuren und Phlorogluzinol

#### Konzentration in Urin

Nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum wurden im Urin der Probanden erhöhte Vanillinsäurekonzentrationen nachgewiesen (Abbildung 3.5). Der Konzentrationsanstieg von  $15,5 \pm 6,79 \mu\text{M}$  (Depletion) auf  $45,7 \pm 17,79 \mu\text{M}$  (Intervention) war dabei signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Die Konzentrationen an 3-OH-Benzoesäure und Phlorogluzinol wurden infolge der Apfelsaftintervention nicht signifikant beeinflusst. Bei den untersuchten aromatischen Verbindungen zeigten sich deutliche interindividuelle Schwankungen in den Polyphenolkonzentrationen.

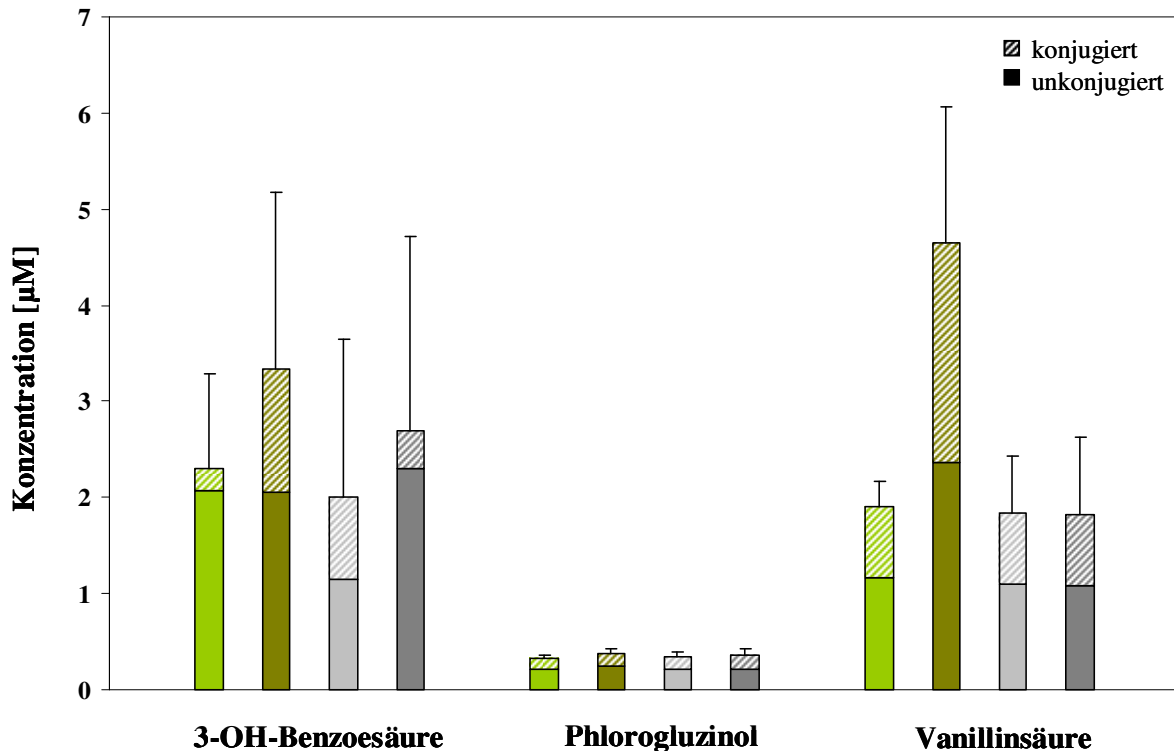


**Abbildung 3.5:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an 3-OH-BA, Phlorogluzinol und Vanillinsäure in Urin (MW $\pm$ SD), \* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ . ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.



### Konzentration in Fäzeswasser

In FW erhöhte sich die Vanillinsäurekonzentration von  $1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$  auf  $4,7 \pm 1,4 \mu\text{M}$ . Der Konzentrationsanstieg war jedoch nicht signifikant. Die Konzentrationen an 3-OH-Benzoessäure und Phlorogluzinol wurden infolge der Apfelsaftintervention nicht beeinflusst.



**Abbildung 3.6:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an 3-OH-BA, Phlorogluzinol und Vanillinsäure in FW (MW  $\pm$  SD). ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase

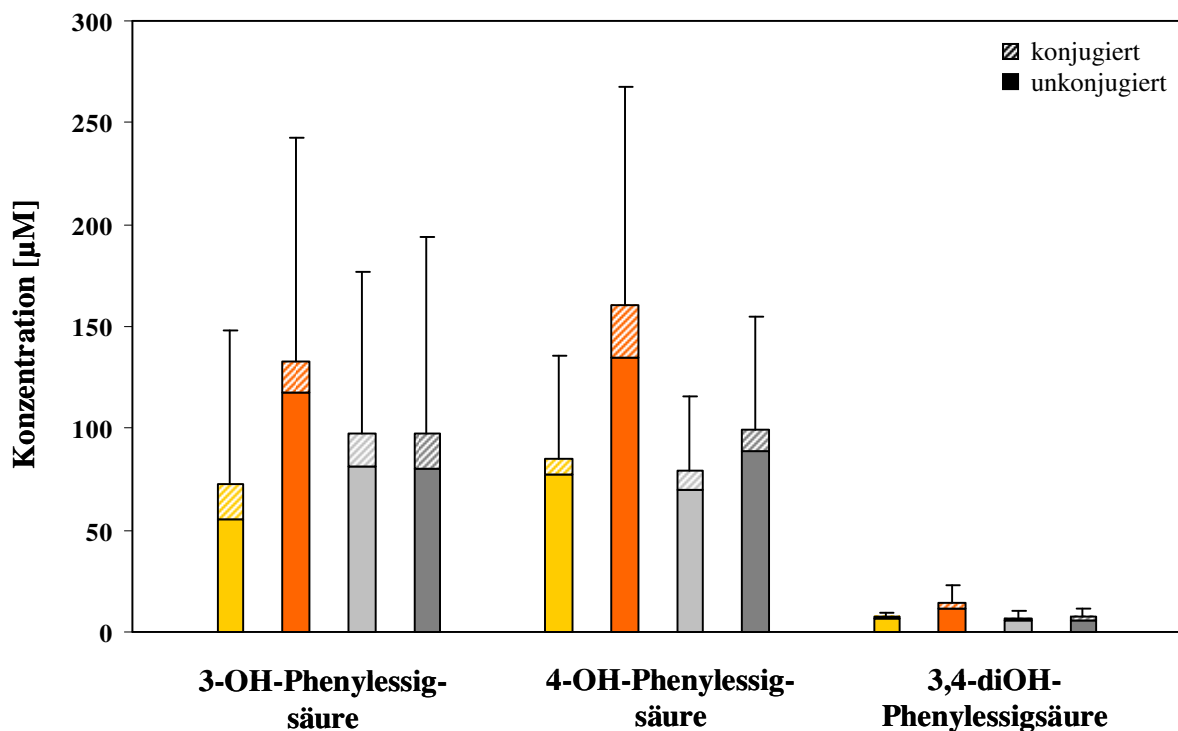
Da die Urin- und FW-Proben einmal ohne und einmal mit enzymatischer Hydrolyse aufbereitet wurden, konnte das prozentuale Verhältnis von freier zu konjugierter Form (Glukuronide und Sulfate) der einzelnen Polyphenole ermittelt werden (Abbildung 3.5 und 3.6): Vanillinsäure lag in den Proben der Kontrollgruppe und Apfelsaftgruppe (Depletion) zu ca.  $48,3 \pm 8,9 \%$  (Urin) bzw.  $38,9 \pm 12,3 \%$  (FW) in Form seiner Glukuronide und Sulfate vor. Nach Apfelsaftkonsum verschob sich dieses Profil zugunsten der konjugierten Form. Bis zu  $74,1 \pm 8,9 \%$  (Urin) bzw.  $49,2 \pm 15,7 \%$  (FW) der Vanillinsäure lagen in diesen Proben in konjugierter Form vor. Phlorogluzinol wurde durch enzymatische Hydrolyse der Proben im Vergleich zu den Proben ohne Hydrolyse in annähernd doppelter Konzentration

nachgewiesen, zu ca.  $47,3 \pm 9,6$  % (Urin) bzw.  $38,2 \pm 4,1$  % (FW) lag es in seinen konjugierten Formen vor. 3-OH-Benzoesäure wurde in Urin hauptsächlich in seiner freien Form nachgewiesen, es wurden im Urin nur  $5,9 \pm 1,4$  % in konjugierter Form detektiert, im Fäzeswasser  $26,6 \pm 16,6$  %.

### 3.5.1.2 Hydroxyphenyllessigsäuren

#### Konzentration in Urin

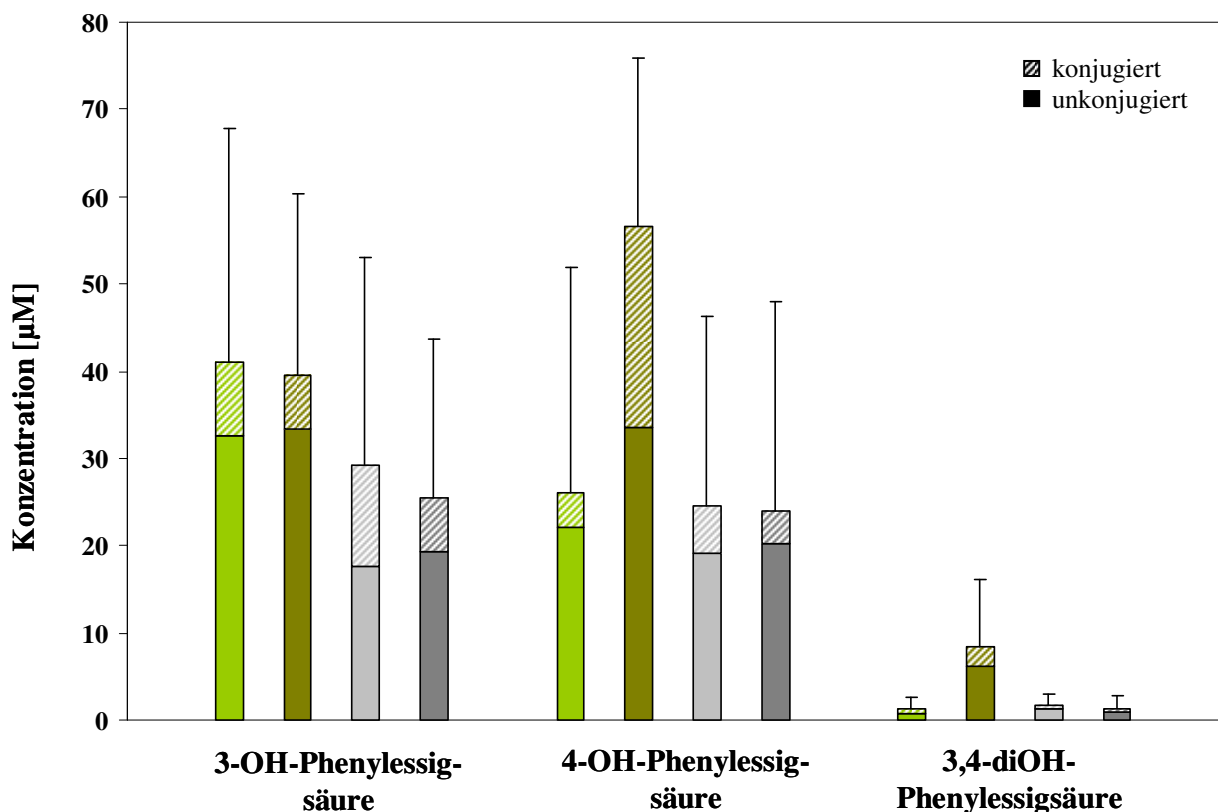
Die Phenyllessigsäuren 3-OH- und 4-OH-Phenyllessigsäure waren mit durchschnittlich  $132 \pm 110$   $\mu\text{M}$  (3-OH-Phenyllessigsäure) und  $160 \pm 106$   $\mu\text{M}$  (4-OH-Phenyllessigsäure) die im Urin am höchsten vertretenen Phenolsäuren (Abbildung 3.7). Nach vierwöchiger Apfelsaftintervention konnte kein signifikanter Konzentrationsanstieg der untersuchten Hydroxyphenyllessigsäuren im Urin nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.7:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Hydroxyphenyllessigsäuren in Urin (MW  $\pm$  SD). ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### Konzentration in Fäzeswasser

Bei 4-OH-Phenyllessigsäure bzw. 3,4-diOH-Phenyllessigsäure wurde im FW ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Konzentrationsanstieg infolge Apfelsaftkonsum von 25,9 auf 56,5  $\mu\text{M}$  (4-OH-Phenyllessigsäure) bzw. von 1,3 auf 8,3  $\mu\text{M}$  (3,4-diOH-Phenyllessigsäure) gemessen (Abbildung 3.8). Wie bei den Urinproben zeigten die FW-Proben der Probanden deutliche interindividuelle Unterschiede im Phenyllessigsäuregehalt, die prozentualen Standardabweichungen betragen zum Teil Werte über 100%.



**Abbildung 3.8:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an 3-OH-Phenyllessigsäure, 4-OH-Phenyllessigsäure und 3,4-diOH-Phenyllessigsäure in FW (MW  $\pm$  SD). ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

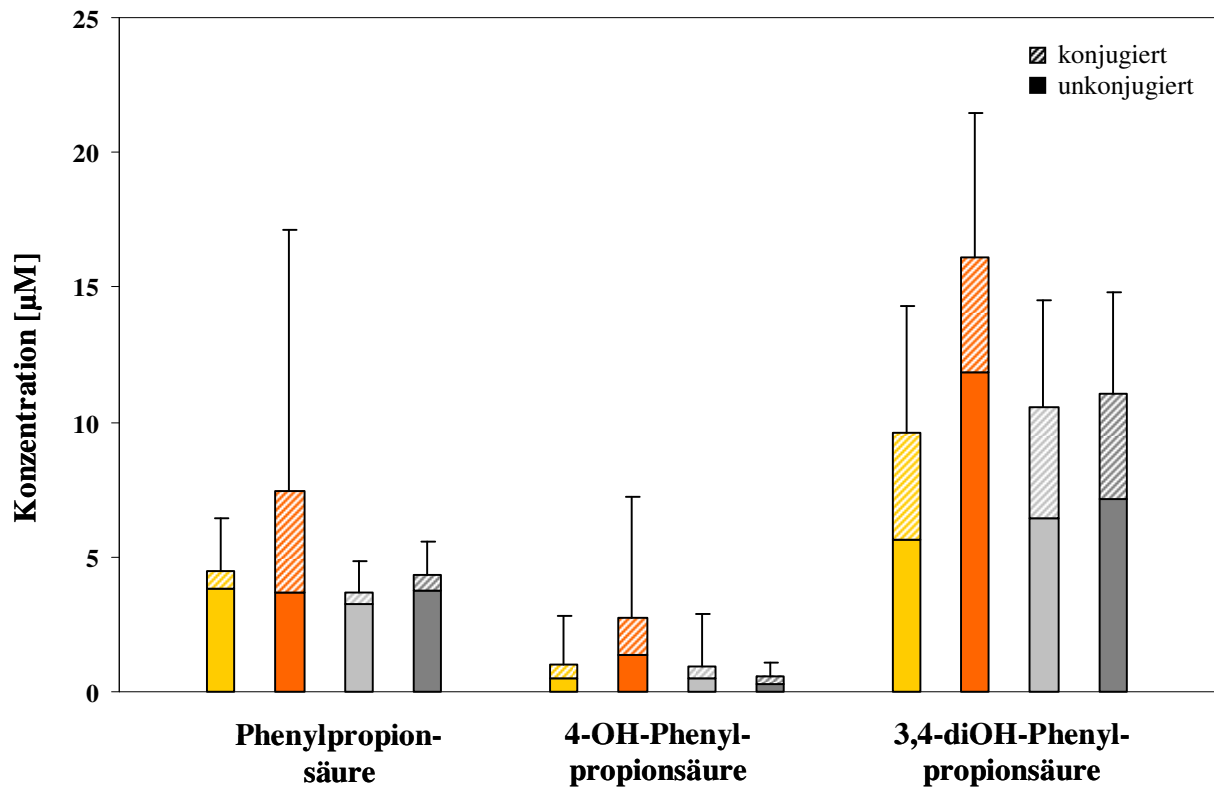
### Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase

In Urin wurden die drei analysierten Hydroxyphenyllessigsäuren überwiegend (> 75%) in ihrer unkonjugierten Form nachgewiesen (Abbildung 3.7). In FW betrug der Anteil der Konjugate  $24,9 \pm 10,5$  % (3-OH-Phenyllessigsäure),  $23,2 \pm 12,0$  % (4-OH-Phenyllessigsäure) und  $31,3 \pm 10,3$  % (3,4-diOH-Phenyllessigsäure) an der Gesamtkonzentration der einzelnen Phenyllessigsäuren (Abbildung 3.8).

### 3.5.1.3 Hydroxyphenylpropionsäuren

#### Konzentration in Urin

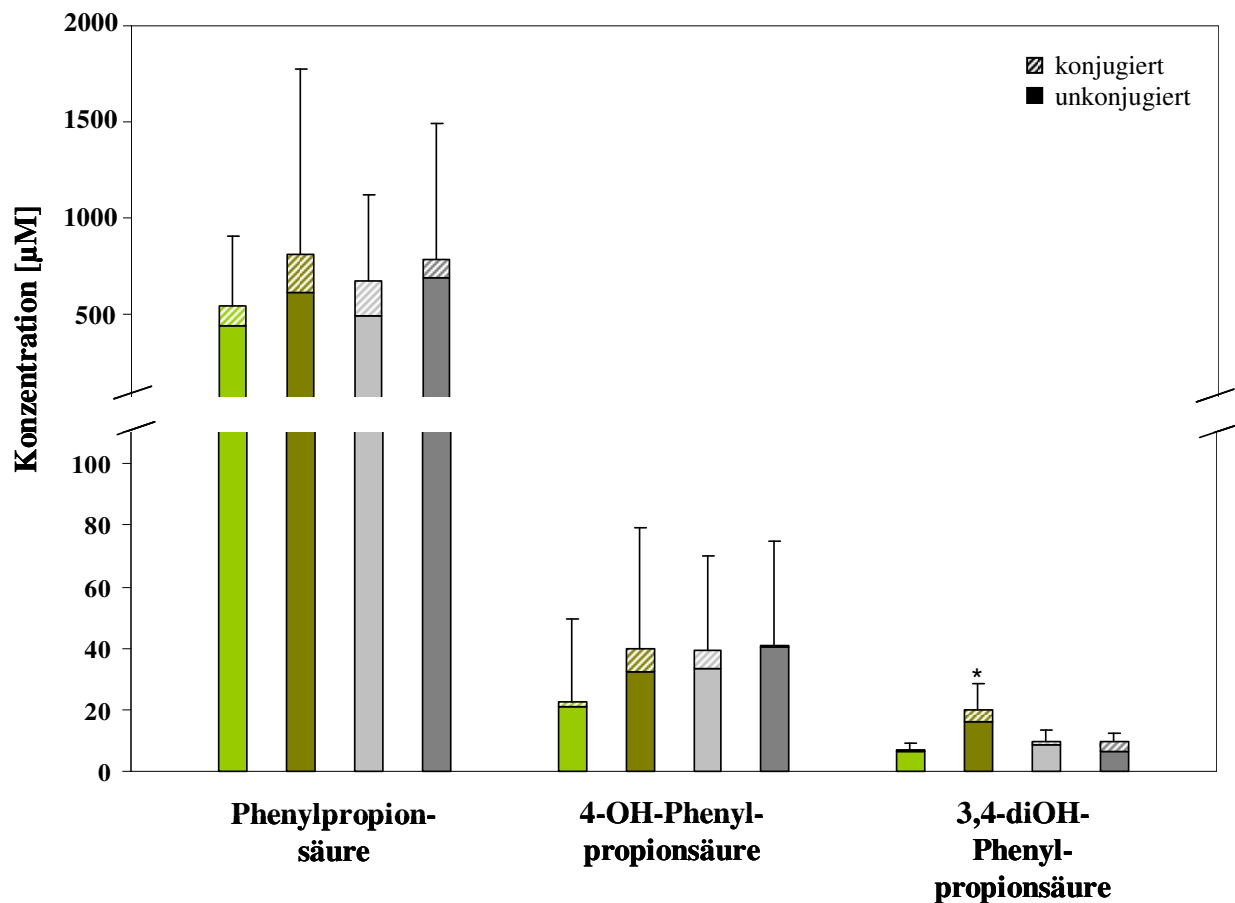
Im Urin der Probanden wurden nach Apfelsaftkonsum keine signifikant erhöhten Konzentrationen an Phenylpropionsäure, 4-OH-Phenylpropionsäure und 3,4-diOH-Phenylpropionsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phenylpropionsäure, 4-OH-Phenylpropionsäure und 3,4-diOH-Phenylpropionsäure in Urin (MW  $\pm$  SD). ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

#### Konzentration in Fäzeswasser

Phenylpropionsäure war mit einem durchschnittlichen Gehalt von  $805 \pm 122 \mu\text{M}$  die im FW in höchsten Konzentrationen vertretene aromatische Säure (Abbildung 3.10). Während die FW-Konzentrationen von Phenylpropionsäure und 4-OH-Phenylpropionsäure durch die Apfelsaftintervention nicht beeinflusst wurden, stieg die Konzentration der 3,4-diOH-Phenylpropionsäure von  $7,1 \pm 2,1$  auf  $20,1 \pm 8,5 \mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.10:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an PP, 4-OH-PP und 3,4-diOH-PP in FW (MW  $\pm$  SD), \* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ . ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase

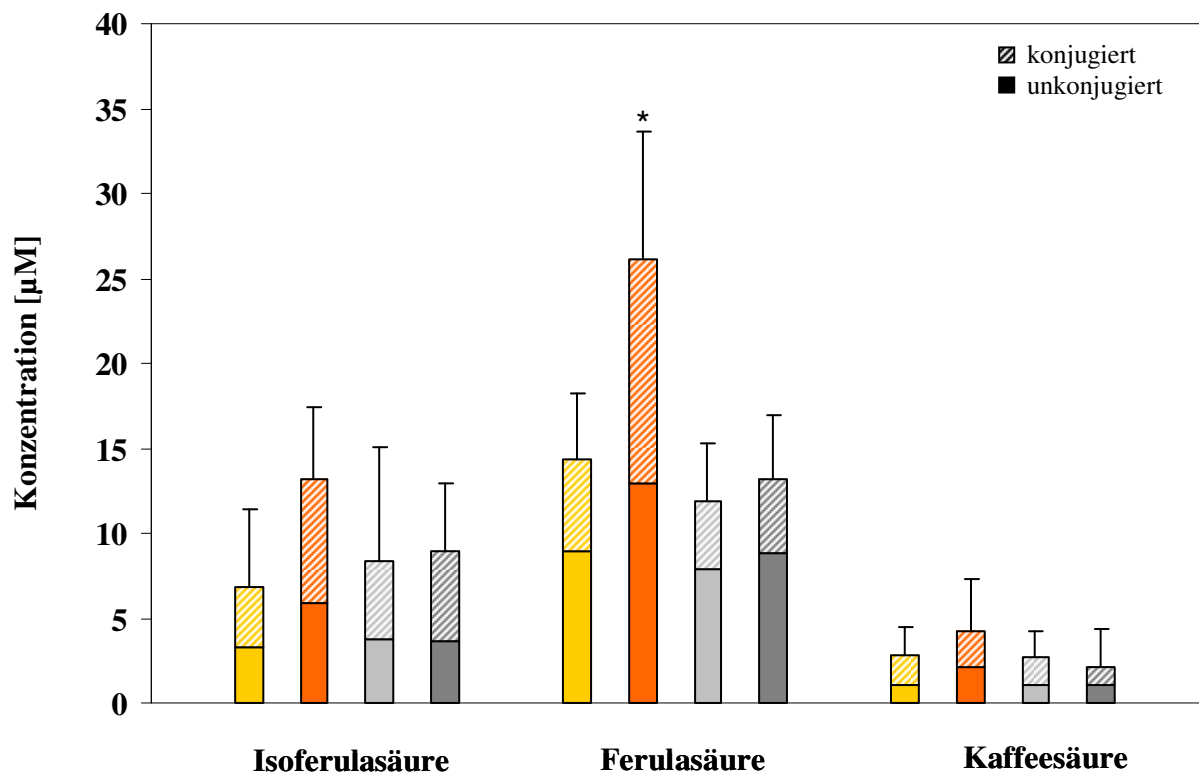
4-OH-Phenylpropionsäure wurde in den Urinproben aller Probanden zu  $49,3 \pm 3,5$  % in konjugierter Form detektiert, im FW mit  $10,5 \pm 8,6$  % deutlich geringer. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei der 3,4-diOH-Phenylpropionsäure ( $35,6 \pm 6,6$  % konjugiert in Urin, nur  $20,5 \pm 9,7$  % konjugiert in FW).

Im FW lag Phenylpropionsäure in beiden Studiengruppen und Studienphasen durchschnittlich zu  $18,3 \pm 6,1$  % in konjugierter Form vor. Im Urin wurde vor Apfelsaftintervention die Phenylpropionsäure nur zu  $12,8 \pm 1,4$  % in Form ihrer Konjugate nachgewiesen, nach Apfelsaftintervention verschob sich das Verhältnis zugunsten der konjugierten Form ( $50,5 \pm 18,6$  %), möglicherweise bedingt durch den Konzentrationsanstieg.

### 3.5.1.4 Hydroxyzimtsäuren

#### Konzentration in Urin

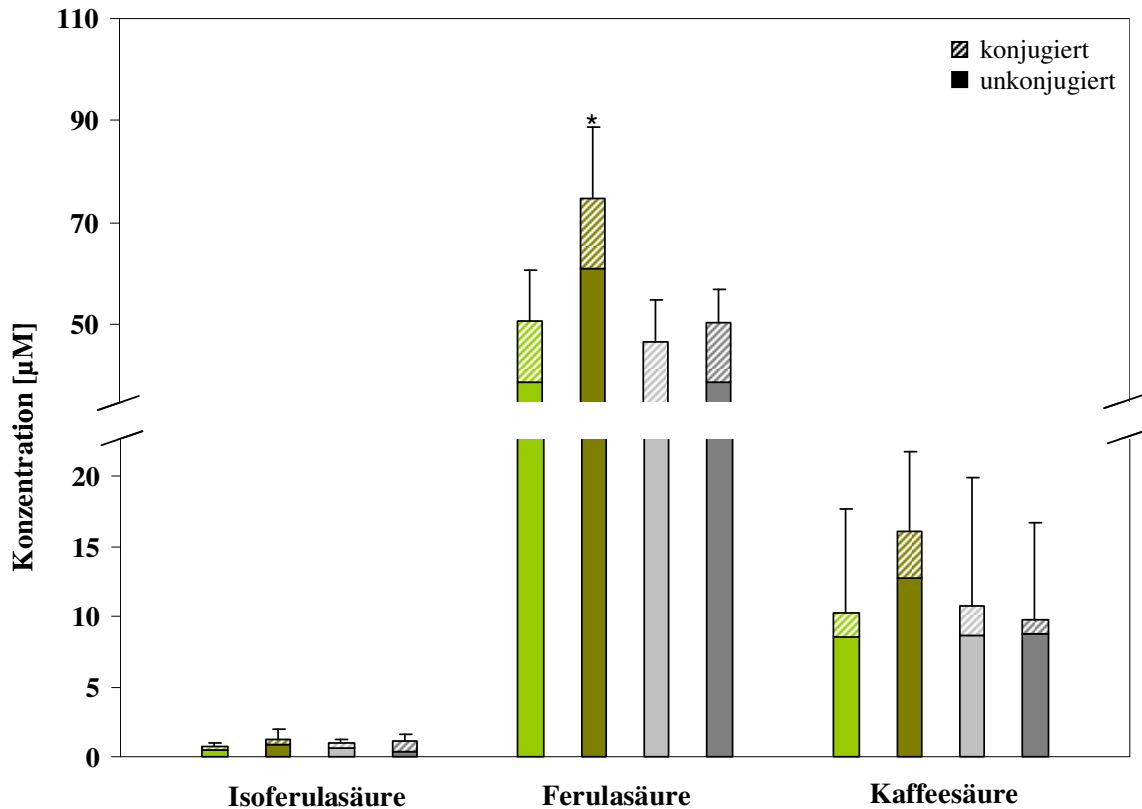
Nach vierwöchiger Apfelsaftintervention wurde Ferulasäure im Urin der Probanden in signifikant erhöhten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen ( $p < 0,05$ ). Die Ferulasäurekonzentration stieg von  $14,3 \pm 3,9 \mu\text{M}$  auf  $26,1 \pm 7,5 \mu\text{M}$  an. Die Konzentration von Isoferulasäure erhöhte sich ebenfalls von  $6,8 \pm 4,5 \mu\text{M}$  auf  $13,2 \pm 4,3 \mu\text{M}$ , der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Die Kaffeesäurekonzentration wurde durch die Apfelsaftintervention nicht moduliert. Sie betrug durchschnittlich im Gesamtkollektiv  $2,9 \pm 2,1 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 3.11:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Isoferulasäure, Ferulasäure und Kaffeesäure in Urin ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ), \* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ . ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### Konzentration in Fäzeswasser

Auch im FW stieg die Ferulasäurekonzentration nach Apfelsaftintervention signifikant ( $p < 0,05$ ) von  $50,5 \pm 9,9 \mu\text{M}$  auf  $74,8 \pm 14,0$  an (Abbildung 3.10). Die Konzentrationen von Kaffee- und Isoferulasäure änderten sich durch die Apfelsaftintervention nicht.



**Abbildung 3.12:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Isoferulasäure, Ferulasäure und Kaffeesäure in FW (MW  $\pm$  SD), signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ . ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase

Im Urin aller Probanden lag Kaffeesäure mit  $66,3 \pm 5,9 \%$  überwiegend in konjugierter Form vor, im FW dagegen nur zu  $17,2 \pm 4,7 \%$ . Glukuronide und Sulfate der Ferulasäure hatten im Probandenurin  $38,7 \pm 8,1 \%$  Anteil an der Ferulasäuregesamtkonzentration, im FW  $24,1 \pm 4,6 \%$ . Für Isoferulasäure betrug der prozentuale Anteil der Konjugate im Urin  $55,3 \pm 3,3 \%$ , im FW  $41,9 \pm 13,1 \%$ .

### 3.5.1.5 Intakte Apfelsaftpolyphenole

#### Konzentration in Urin und Fäzeswasser

Phloretin war in den Proben der Probanden der Depletionsphase der Apfelsaftgruppe sowie in beiden Studienphasen der Kontrollgruppe nicht nachweisbar. Nach der vierwöchigen Apfelsaftintervention wurden  $2,51 \pm 1,62 \mu\text{M}$  Phloretin im Urin nachgewiesen, im FW  $0,53 \pm 0,16 \mu\text{M}$ . Auch Epicatechin konnte nur in den Proben nach Apfelsaftkonsum detektiert werden mit  $3,06 \pm 6,31 \mu\text{M}$  (Urin) und  $0,67 \pm 0,31$  (FW). Die Daten sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

#### Hydrolyse mit $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase

Die Apfelsaftpolyphenole Phloretin und Epicatechin konnten in Urin und FW nur in den Proben mittels GC/MS quantifiziert werden, die vorher durch enzymatische Hydrolyse mittels  $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase aufgearbeitet worden waren. Die Polyphenole lagen somit überwiegend in ihrer Form ihrer Phase-II-Konjugate vor.

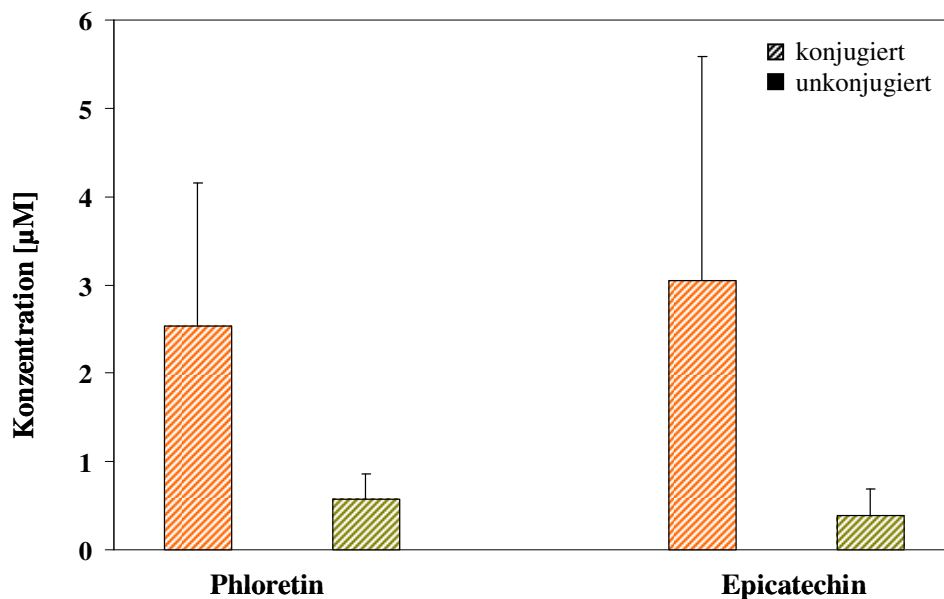
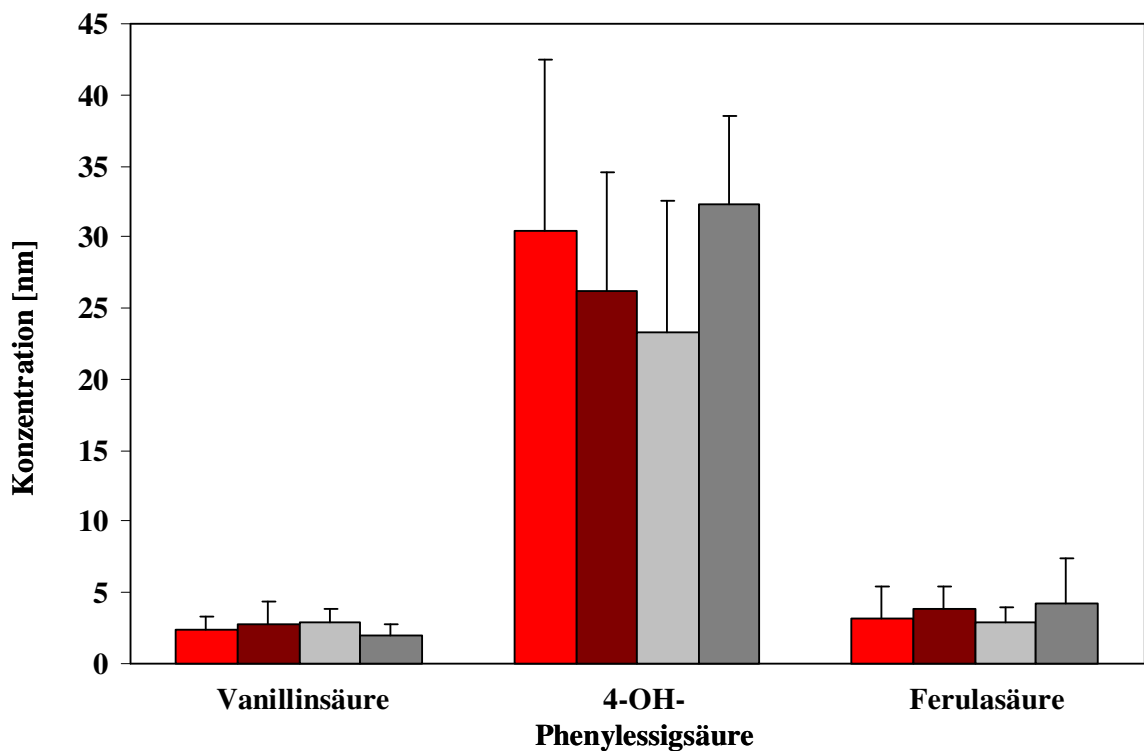


Abbildung 3.13 Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phloretin und Epicatechin in Urin und FW (MW  $\pm$  SD). ■ Konzentration im Urin; ■ Konzentration im FW.



### 3.5.2 Polyphenole in Plasma

Im Nüchternplasma der Probanden konnten aufgrund ihrer geringen Konzentrationen (Konzentrationen im nanomolaren Bereich) nur die in Abbildung 3.14 dargestellten Phenolsäuren detektiert werden. Ein Einfluss der Apfelsaftintervention auf den Gehalt der im Plasma bestimmten Phenolsäuren Vanillinsäure, 4-OH-Phenyllessigsäure und Ferulasäure konnte nicht nachgewiesen werden. Eine enzymatische Hydrolyse der Plasmaproben war aufgrund der unter 2.6 beschriebenen Gelbildung der Probe nicht möglich. Somit konnten nur die Phenolsäuren nachgewiesen werden, die im Plasma in freier Form vorlagen.



**Abbildung 3.14:** Einfluss der Apfelsaftintervention auf die Konzentrationen an Phenolsäuren in Plasma (MW  $\pm$  SD). ■ Apfelsaftgruppe, Depletion; ■ Apfelsaftgruppe, Intervention; ■ Kontrollgruppe, Depletion; ■ Kontrollgruppe, Intervention.

### 3.6 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetes- und Adipositas-assoziierte Risikofaktoren für Dickdarmkrebs

#### 3.6.1 Diabetesmarker

Aufgrund der potenziellen antidiabetischen Eigenschaften von Apfelsaftpolyphenolen wurden im Rahmen dieser Studie die Diabetesmarker Insulin, IGF-1<sup>23</sup> und IGFBP-3<sup>24</sup> und HbA1c<sup>25</sup> untersucht. Infolge des vierwöchigen Konsums von Apfelsaft konnten keine signifikanten Änderungen der untersuchten Diabetesmarker Insulin, IGF-1 und IGFBP-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei HbA1c zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme von  $5,51 \pm 0,32 \%$  auf  $5,36 \pm 0,31 \%$  in der Apfelsaftgruppe ( $p = 0,08$ ). Insulin sank ebenfalls tendenziell in der Apfelsaftgruppe ( $p = 0,11$ ).

**Tabelle 3.7: Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetesmarker.** Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen aus den Studienphasen. Die Konzentrationen an Insulin und HbA1c nahmen durch die Apfelsaftintervention tendenziell im Vergleich zur Kontrollgruppe ab, die anderen Marker änderten sich nicht.

Diabetesmarker	Kontrollgruppe (n=28)		Apfelsaftgruppe (n=30)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
Insulin [ $\mu$ U/mL]	$6,00 \pm 5,32$	$6,67 \pm 5,47$	$6,73 \pm 3,71$	$5,32 \pm 2,65$	0,11
IGF-1 [ng/mL]	$260 \pm 90$	$266 \pm 92$	$270 \pm 103$	$241 \pm 90$	0,28
IGFBP-3 [ $\mu$ g/mL]	$4,59 \pm 0,83$	$4,76 \pm 0,80$	$4,88 \pm 0,83$	$4,78 \pm 0,87$	0,78
HbA1c [%]	$5,48 \pm 0,24$	$5,48 \pm 0,32$	$5,51 \pm 0,32$	$5,36 \pm 0,31$	0,08

<sup>23</sup> IGF-1=Insulin Growth Factor-1

<sup>24</sup> IGFBP-3=IGF-Binding Protein-1

<sup>25</sup> HbA1c=Glykohämoglobin A1c

### 3.6.2 Adipositasmarker

Die erhöhte Inzidenz für kolorektale Tumoren bei adipösen Personen wird mit einer erhöhten Sezernierung fettgewebsspezifischer Proteine in Verbindung gebracht [Cowey, 2006]. Um den Einfluss von Apfelsaftkonsum auf diese Adipositasmarker bei gesunden Männern zu ermitteln, wurden im Serum und Plasma der Probanden vor und nach Intervention die Konzentrationen verschiedener Adipokine ermittelt.

Die Werte der gemessenen Adipositasmarker Resistin und Adiponektin wurden durch den Apfelsaftkonsum im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht moduliert. Die Leptinkonzentration erhöhte sich nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum jedoch signifikant ( $p = 0,04$ ) von  $3,01 \pm 0,83$  auf  $4,03 \pm 1,51$  ng/mL im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 3.8).

**Tabelle 3.8: Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Adipositasmarker.** Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen aus den Studienphasen. Durch die Apfelsaftintervention stieg die Leptinkonzentration signifikant ( $p=0,04$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe an, die anderen Adipositasmarker änderten sich nicht.

Adipositasmarker	Kontrollgruppe (n=28)		Apfelsaftgruppe (n=30)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
Resistin [ng/mL]	$3,78 \pm 1,07$	$3,82 \pm 1,16$	$3,93 \pm 1,09$	$4,00 \pm 0,90$	0,94
Adiponektin [ $\mu$ g/mL]	$5,80 \pm 3,10$	$6,12 \pm 2,38$	$5,82 \pm 3,27$	$5,85 \pm 3,93$	0,63
Leptin [ng/mL]	$3,38 \pm 0,64$	$3,04 \pm 0,88$	$3,01 \pm 0,83$	$4,03 \pm 1,51$	0,04*

### 3.6.3 Entzündungsmarker

Durch die vierwöchige Apfelsaftintervention konnten keine Änderungen in den Konzentrationen der untersuchten Entzündungsmarker TNF  $\alpha$ <sup>26</sup>, IL-6<sup>27</sup>, hsCRP<sup>28</sup>, sVCAM<sup>29</sup> und sICAM<sup>30</sup> ermittelt werden. Die Werte der Apfelsaft- und Kontrollgruppe sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

**Tabelle 3.9: Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Entzündungsmarker.** Dargestellt sind die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen aus den Studienphasen.

Entzündungsmarker	Kontrollgruppe (n=28)		Apfelsaftgruppe (n=30)		p-Wert
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention	
TNF- $\alpha$ [pg/mL]	5,27 $\pm$ 3,36	5,62 $\pm$ 2,99	5,18 $\pm$ 3,66	4,15 $\pm$ 3,99	0,19
IL-6 [pg/mL]	1,39 $\pm$ 0,96	1,49 $\pm$ 1,56	1,60 $\pm$ 1,45	1,73 $\pm$ 1,26	0,95
hsCRP [ng/mL]	1600 $\pm$ 1506	1629 $\pm$ 1401	1528 $\pm$ 1239	1604 $\pm$ 1162	0,91
sVCAM [ng/mL]	700 $\pm$ 231	723 $\pm$ 262	684 $\pm$ 247	695 $\pm$ 251	0,84
sICAM [ng/mL]	415 $\pm$ 161	424 $\pm$ 201	506 $\pm$ 277	463 $\pm$ 163	0,36

### 3.6.4 Korrelationsanalysen

Im Rahmen der Korrelationsanalyse wurden die verschiedenen Parameter auf Korrelationen untereinander sowie auf Korrelationen mit dem BMI oder Alter untersucht. Die Analyten wurden dabei entweder nur vor oder nur nach der Intervention miteinander korreliert.

Folgende, aus der Literatur bekannte gemessene Korrelationen bei Studien mit Adipösen oder Diabetikern, wurden im Rahmen dieser Arbeit überprüft: Resistin–Adiponektin; Insulin–IGF-1; IGF-1–IGFBP-3; Leptin–BMI; Leptin–Körperfett; Insulin–Alter; Insulin–BMI;

<sup>26</sup> TNF $\alpha$ =Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

<sup>27</sup> IL-6=Interleukin-6

<sup>28</sup> hsCRP=high sensitive C-reactive Protein

<sup>29</sup> sVCAM=soluble vascular cell adhesion molecule

Adiponektin–IL-6; IL-6–CRP; Adiponektin–IL-6; Adiponektin–BMI; Resistin–BMI; TNF $\alpha$ –BMI; CRP–BMI. Weder für die Kontroll- noch für die Apfelsaftgruppe konnten signifikante lineare Zusammenhänge der untersuchten Parameter untereinander festgestellt werden. Dies beruht möglicherweise auf dem gesunden Probandenkollektiv (sämtliche Werte der gemessenen Diabetes-, Adipositas- und Entzündungsmarker lagen im Normalbereich) und der engen BMI-Spanne von 20,3-25,3 kg/m<sup>2</sup>.

## 4 Diskussion

Die protektiven Effekte von Apfelsaft, Apfelsaftextrakten oder isolierten Polyphenolen aus Apfelsaft hinsichtlich ihres antidiabetischen und antiinflammatorischen Potentials wurden bereits in einer Vielzahl von Zellkulturstudien oder in Tiermodellen belegt [Barth *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2006; Decorde *et al.*, 2008]. Auch weisen verschiedene epidemiologische Studien am Menschen auf ein präventives Potential durch regelmäßigen Konsum von Äpfeln bzw. Apfelsaft hin [Knekt *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005]. Um eine Beurteilung des präventiven Potentials von Apfelsaft am Menschen ermöglichen zu können, sind Ergebnisse aus kontrollierten Humaninterventionsstudien notwendig.

### 4.1 Probandendaten, Studiendesign und Compliance

Gemäß den Studienanforderungen sollten für die Interventionsstudie nur normalgewichtige, männliche Teilnehmer mit einer Altersspanne von 20-60 Jahren rekrutiert werden. Mit einer BMI-Spanne von 20,3 - 25,3 kg/m<sup>2</sup> und einer Altersspanne von 21 - 57 Jahren des Gesamtkollektivs wurden diese Kriterien erfüllt. Ferner kamen die Interessenten für eine Studienteilnahme nur dann in Frage, wenn sie keine Störungen im Fettstoffwechsel aufwiesen. Die im Rahmen der Rekrutierung untersuchten Fettstoffwechselwerte der Probanden (Tabelle 3.1) lagen weitgehend im Bereich der Referenzwerte. Für Serumtriglyzeride ist ein Referenzbereich von 50 - 150 mg/dL, für Serumcholesterol von 120 - 200 mg/dL angegeben [Thomas L., 1998]. Eine Teilnahme von Diabetikern an dieser Studie war nicht zugelassen. Mit Typ 2-Diabetikern soll in einem nachfolgenden Studienteil eine Interventionsstudie unter denselben Bedingungen stattfinden, ebenso mit adipösen Probanden. Das Ergebnis des oralen Glukosetoleranztests (Abbildung 3.1) zeigt, dass mit einem durchschnittlichen Nüchtern-Blutglukosewert von 85,4 ± 8,6 mg/dL (normal: < 100 mg/dL) und einem Wert zwei Stunden nach Glukosebelastung von 90,8 ± 15,2 mg/dL (normal: < 140 mg/dL) bei allen Probanden eine Störung des Glukosestoffwechsels ausgeschlossen werden konnte [American Diabetes Association, 2008].

Die Humanstudie wurde randomisiert, kontrolliert und im Paralleldesign durchgeführt. Die Kontrollgetränkegruppe diente zur Elimination von Einflüssen, die nicht auf getränkenspezifische Faktoren zurückzuführen sind. Bei Ernährungsstudien über einen

mehrwöchigen Zeitraum könnten beispielsweise Faktoren wie bewusstere Einstellung zur Ernährung eine bedeutende Rolle spielen und die Ergebnisse beeinflussen.

Der Zusatz des gleichen Anteils von Zuckern, Mineralstoffen und Vitamin C im Kontrollgetränk ermöglichte die Fokussierung auf die Wirkung der bioaktiven Inhaltsstoffe des Apfelsaftes wie Polyphenole und Ballaststoffe. Der vierwöchigen Interventionsphase von Apfelsaft- und Kontrollgruppe ging jeweils eine einwöchige Depletion voraus, in der die Probanden mit der Einhaltung der Vorgaben des Ernährungsprotokolls begannen. Die einwöchige Auswaschphase diente dazu, mögliche Nachwirkungen einer der Studie vorausgegangen polyphenolreichen Ernährung weitgehend zu vermeiden. Die Depletionsdauer von einer Woche wurde in Anlehnung an die in zahlreichen anderer Studien dokumentierten raschen Bioverfügbarkeit von Polyphenolen gewählt [reviewed in Scalbert & Williamson, 2000; Manach *et al.*, 2004]. Ferner wurde dies zuvor in einer Pilotstudie mit sechs Probanden überprüft.

Jeder Studienteilnehmer erhielt vor Beginn der Studie eine Studienbroschüre mit einem individuellen Terminplan. Dies gewährleistete die termingerechte Durchführung der beiden Hauptuntersuchungen sowie Probensammlung durch die Probanden an den Studientagen 6-8 und 33-35 (Studiendesign Abbildung 2.1). Ferner ergab die Überprüfung der Ernährungsprotokolle (Anhang 8.5) und die persönliche Befragung der Probanden am Studienende, dass keiner der Teilnehmer über den gesamten Studienzeitraum von den vorgegebenen Ernährungsinstruktionen (Anhang 8.4) abwich. Von den 60 rekrutierten Teilnehmern brachen zwei Teilnehmer aus der Kontrollgruppe die Studie ab; einer in der fünften Studienwoche aus beruflichen Gründen, der zweite wegen Unverträglichkeit des Kontrollgetränkes in der zweiten Studienwoche. Die anderen 58 führten die Studie bis zum Ende durch, was insbesondere für die gute Verträglichkeit von 0,75 L Apfelsaft am Tag spricht. Ferner zeigt die geringe Abbrecherquote, dass die Einschränkungen für den Konsum von Lebensmitteln wie Kaffee, Säften und alkoholischen Getränken für die Teilnehmer über den fünföchigen Zeitraum vertretbar waren.

## **4.2 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf anthropometrische Parameter und Fettstoffwechselfparameter**

### **4.2.1 Anthropometrische Parameter**

Aufgrund des hohen Gehaltes an unlöslichen Ballaststoffen wie Hemizellulosen und Lignin in Obst und Gemüse wird deren gewichtsreduzierendes Potential diskutiert. Ballaststoffe haben eine lange Verweildauer im Darm, bei ausreichender Flüssigkeitszufuhr ein hohes Quellvermögen und damit einen sättigenden Effekt [Danjo *et al.*, 2008]. In einer Studie von Conceicao *et al.* mit übergewichtigen Frauen konnte beim Verzehr von 3 Äpfeln pro Tag nach zwölf Wochen bei normaler Ernährung eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden [Conceicao de *et al.*, 2003].

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Apfelsaft konnte im Vergleich zur Gruppe mit isokalorischem Kontrollgetränk kein gewichtsreduzierender Effekt bei den Probanden nachgewiesen werden, der durchschnittliche BMI änderte sich über die Interventionsperiode nicht (Tabelle 3.3). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Probanden bereits normalgewichtig waren und eine zusätzliche Reduktion des Körpergewichtes durch Apfelsaftkonsum nicht wünschenswert ist. Die Messung der anthropometrischen Parameter soll im Zusammenhang mit den Folgestudien (Übergewichtige und Typ 2-Diabetiker) vielmehr als Kontrolle dienen.

Der BMI ermöglicht keine genaue Information über die Körperzusammensetzung und auch keine Information über die Körperfettverteilung [Volkert, 2006]. Aufgrund dieser Limitationen wurde der BMI im Rahmen dieser Studie nicht als einziger anthropometrischer Parameter herangezogen. Als ergänzender Parameter diente die Messung der Verteilung des Körperfetts durch Bestimmung des Taille-Hüftquotienten (WHR). Ein hoher WHR ist mit einer hohen Akkumulation von Fettdepots um Bauchhaut, Rücken, Seiten und inneren Organen (Viszerafett) assoziiert. Ferner wird ein WHR über 1,0 bei Männern mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen in Verbindung gebracht [WHO, 2003]. Dabei scheint insbesondere die gesteigerte Sezernierung proinflammatorischer Zytokine aus den viszeralen Fettzellen (siehe auch Abschnitt 4.5) eine Rolle zu spielen [Filipovsky *et al.*, 1993]. In beiden Studiengruppen wurde vor und nach Intervention ein durchschnittlicher WHR von  $0,93 \pm 0,04$  gemessen, der damit unterhalb des Risikowertes von 1,0 lag.



Aus einer Vielzahl an Studien ist bekannt, dass die Zufuhr von unlöslichen Ballaststoffen aufgrund ihres Sättigungsgefühls invers mit dem Körperfettanteil assoziiert ist [reviewed in Slavin 2005]. Im Rahmen dieser Studie konnte, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, keine signifikante Reduktion des Körperfetts durch die vierwöchige Intervention mit trübem Apfelsaft ermittelt werden (Tabelle 3.3). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass trüber Apfelsaft nur einen geringen Anteil an Ballaststoffen enthält. Die unlöslichen Ballaststoffe sind in den Trubstoffen des Apfelsaftes enthalten. Der Trub besteht vorwiegend aus Proteinen (40 %), Lipiden (30 %), Pektinen (0,5 %) und neutralen Polysacchariden wie Hemizellulosen und Lignin (7 %). Der Trub macht ca. 1-2 g/L des Apfelsaftes aus [Will & Dietrich, 1992]. Somit hatte die Zufuhr von täglich 0,75 L trübem Apfelsaft nur einen geringen Anteil an der täglichen Gesamtaufnahme an Ballaststoffen, die in einer typisch westlichen Diät mit 12-20 g pro Tag jedoch noch deutlich unter der empfohlenen Zufuhr von 30 g liegt [Young 2005; DGE 2000]. Zudem ist zu berücksichtigen, dass der durchschnittliche prozentuale Körperfettanteil mit  $18,4 \pm 3,9$  % (Apfelsaftgruppe) und  $17,1 \pm 3,8$  % (Kontrollgruppe) bereits im Referenzbereich (10-20 %) für schlanke Männer lag [Reuter 2006]. Zudem sollen, wie bereits oben erläutert, die Ergebnisse der Apfelsaftstudie mit den gesunden Probanden nachfolgend mit den Resultaten der Studien mit Übergewichtigen und Diabetikern verglichen werden.

#### **4.2.2 Fettstoffwechselfparameter**

Die protektiven Effekte der bioaktiven Inhaltsstoffe aus Apfelsaft für kardiovaskuläre Erkrankungen beruhen möglicherweise auf ihren lipidsenkenden Eigenschaften [Boyer & Liu, 2004]. Verschiedene Studien mit Supplementation von isolierten Apfelpolyphenolen konnten sowohl bei Ratten als auch beim Menschen nach mehrwöchiger Intervention eine signifikante Reduktion des Gesamtcholesterols, der LDL-Fraktion und der Serumtriglyzeride nachweisen [Nagasako-Akazome *et al.*, 2005; Duclos *et al.*, 2003; Aprikian *et al.*, 2001; Leontowicz *et al.* 2002; Aprikian *et al.*, 2003]. Auch die Untersuchungen von löslichen Ballaststoffen wie Pektin aus Obst und Gemüse haben positive Effekte auf den Cholesterin-Spiegel bei Probanden bestätigt. Als relevanter Mechanismus wird die Bindung von Gallensäuren im Darm diskutiert. Der Organismus muss die Gallensäuren unter Verbrauch von Cholesterin neu generieren, was zu einem erniedrigten Serumcholesterinspiegel führt [Kühn 2004].

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Apfelsaftintervention konnte keine signifikante Änderung der Fettstoffwechselfparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden

(Tabelle 3.4), was darauf zurückzuführen ist, dass die Werte der Probanden bereits im Normalbereich lagen. Ferner leistet der in dieser Studie verwendete Apfelsaft nur einen geringen Beitrag zur Gesamtaufuhr an löslichen Ballaststoffen wie Pektin sein (siehe auch 4.2.1). Durchschnittliche Pektingehalte trüber Apfelsäfte betragen 600-1000 mg/L, was wahrscheinlich einen zu geringen Anteil an der Gesamtaufuhr von Ballaststoffen ausmacht [Dietrich & Will, 1992]. Eine technologische Möglichkeit, den Gehalt an löslichen Ballaststoffen wie Pektin in Apfelsaft zu erhöhen, kann durch eine so genannte Tresterextraktion (enzymatischer Aufschluss des Apfeltresters) geschehen. Durch diese Technik kann der Ballaststoffgehalt um das zehnfache gesteigert werden. Ferner erhöht sich durch den Aufarbeitungsprozess der Gehalt an Polyphenolen aus der Apfelschale wie z. B. Quercetin, wodurch der ernährungsphysiologische Wert des Saftes zusätzlich gesteigert werden kann [Mehrländer *et al.*, 2003]. Für weitere Interventionsstudien wäre eine Durchführung mit diesem Tresterextraktionssaft aufgrund des höheren Gehalts an Ballaststoffen und Polyphenolen aufgrund ihres gewichtsreduzierenden und lipidsenkenden Potentials interessant. In diesem Zusammenhang könnte die Untersuchung von Risikokollektiven wie Übergewichtigen und Typ 2-Diabetikern wichtige Ergebnisse liefern.

Zusätzlich ist bei dieser Arbeit zu berücksichtigen, dass die Studie mit einer komplexen Lebensmittelmatrix in Form von Apfelsaft durchgeführt wurde. In den oben geschilderten Studien, in denen lipidsenkende Eigenschaften von Apfelpolyphenolen festgestellt wurden, sind die isolierten Inhaltsstoffe verwendet worden. Somit wurden in den Studien Einflüsse anderer Inhaltsstoffe, die für Früchte und Fruchtsäfte charakteristisch sind, ausgeschlossen. Beispielsweise konnte in einer Vielzahl von Humanstudien bei gesunden, normalgewichtigen Probanden die mehrwöchige Supplementation von Früchten mit einer signifikanten Zunahme des Serumcholesterols und der -triglyceride assoziiert werden. Dieser Zusammenhang wurde mit der erhöhten Fruktosezufuhr durch die Früchte in Verbindung gebracht [Swanson *et al.*, 1992; Bantle *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2003]. Mechanistisch beruht der lipidsteigernde Effekt von Fruktose vermutlich auf Stimulation der hepatischen *de novo* Lipogenese [Le & Tappy, 2006]. Eine Interventionsstudie von Faeh *et al.* zeigte bei gesunden Probanden nach 28 Tagen einer fruktosereichen Kost einen signifikanten Anstieg der Serumtriglyceride um  $79 \pm 22 \%$  [Faeh *et al.*, 2005].

Ein signifikanter Anstieg der Fettstoffwechselfparameter durch die Apfelsaftintervention konnte im Rahmen dieser Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht gemessen werden. Die tägliche Fruktosezufuhr des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kontrollgetränkes und Apfelsaftes lag mit etwa 50 g Fruktose pro 0,75 L deutlich unter der eingesetzten Menge

anderer Interventionsstudien wie beispielsweise in der von Faeh *et al.* (3 g Fruktose pro kg Körpergewicht). Jedoch zeigen die geschilderten Studien die hohe Relevanz, dass man bei der Untersuchung von bioaktiven Inhaltsstoffen nicht nur die Wirkung des isolierten Produkts, sondern auch die komplexe Lebensmittelmatrix berücksichtigen muss, da auch andere Inhaltsstoffe in der Beeinflussung der untersuchten Parameter eine wichtige Rolle spielen können.

## **4.3 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Fäzes- und Fäzeswasserparameter**

### **4.3.1 Stuhlgewicht und Stuhlwassergehalt**

Die individuelle Zusammensetzung des Stuhls wird überwiegend durch die aufgenommene Nahrung, die Mikroflora und die Transitzeit bestimmt. Die Mikroflora macht bis zu 55 % der Stuhltrockenmasse aus. Trotz intensiver Wasserrückresorption im Dickdarm besteht Stuhl nach der intestinalen Darmpassage zum Großteil aus Wasser [Stephen & Cummings, 1980]. Ein hohes Stuhlgewicht, was mit einem hohen Stuhlwassergehalt und einer kurzen Transitzeit im Darm verbunden ist, wird mit einem verminderten Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome assoziiert. Dies beruht auf Verdünnungseffekten, die den Kontakt potentieller Karzinogene im Darm mit dem Darmepithel vermindern. Durch eine beschleunigte Transitzeit wird zudem die Kontaktzeit verringert [Cummings *et al.*, 1992].

Da der Stuhlwassergehalt und das Stuhlgewicht sowohl inter- als auch intraindividuell beträchtlich variieren kann [Stephen & Cummings, 1980], wurde am Ende jeder Studienphase über eine Periode von 48 h von einem Teil der Probanden Stuhl gesammelt. Aus organisatorischen Gründen war es nicht möglich, alle Probanden in die Stuhlsammlung einzubeziehen, da nur drei Räume mit Gefriertoiletten zur Verfügung standen. Durch eine kontrollierte Diät wurde an den Tagen der Probensammlung eine einheitliche Zufuhr von Flüssigkeit und Ballaststoffen gewährleistet. Letztere können durch ihr Wasserbindungsvermögen und die dadurch bedingte Quellung im Dickdarm das Stuhlgewicht maßgeblich steigern [Gibson *et al.*, 2005]. Sowohl die intra- als auch die interindividuellen Schwankungen des Stuhlwassergehaltes waren mit  $74,4 \pm 4,6 \%$  (Kontrollgruppe) bzw.  $74,3 \pm 6,9 \%$  (Apfelsaftgruppe) sehr gering. Der durchschnittliche Stuhlwassergehalt lag im Bereich der ermittelten Werte anderer Studien [Allinger *et al.*, 1989; Jenner *et al.*, 2005].

Durch die vierwöchige Apfelsaftintervention wurde der Stuhlwassergehalt der Fäzesproben im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst. Inhaltsstoffe des Apfelsaftes, die zu einer Erhöhung des Stuhlwassergehaltes führen könnten, sind die Ballaststoffe. Jedoch scheint die Konzentration an unlöslichen Ballaststoffen des in dieser Arbeit verwendeten Apfelsaftes im Vergleich zur üblichen täglichen Gesamtaufuhr an Ballaststoffen (siehe auch 4.2.1) zu gering zu sein, so dass Effekte auf die hier vorgestellten Parameter nicht nachweisbar waren. In verschiedenen Studien wurde eine signifikante Erhöhung des Stuhlgewichts erst ab einer täglichen Supplementation von 15-30 g Ballaststoffen in Form von Zellulose, zusätzlich zur normalen Ernährung, erreicht [Gibson *et al.*, 1995; Castiglia-Delavaud *et al.*, 1998].

Das durchschnittliche Stuhlgewicht verschiedener ethnischer Gruppen kann zwischen 72-470 g pro Tag variieren, wobei ein hohes Stuhlgewicht mit einer höheren Zufuhr an Ballaststoffen assoziiert wird. Das Stuhlgewicht von Populationen speziell aus Wohlstandsgesellschaften mit geringer Ballaststoffzufuhr variiert mit 80-120 g pro Tag deutlich im unteren Bereich [Stephen & Cummings, 1980; Cummings *et al.*, 1992]. Unter Ausschluss intraindividuelle Schwankungen kann aus den Daten von Cummings *et al.* ein durchschnittliches Stuhlgewicht von 160-240 g/48 h errechnet werden. Dies entspricht annähernd den in im Rahmen dieser Studie ermittelten Daten: Für die 48-stündigen Sammlerperioden vor und nach Intervention wurde eine mittlere Stuhlmasse von  $196 \pm 101$  g /48 h (Kontrollgruppe) bzw.  $180 \pm 98$  g/48 h (Apfelsaftgruppe) ermittelt (siehe Tabelle 3.5). Im Vergleich zum Stuhlwassergehalt unterlag das Stuhlgewicht erheblich größeren interindividuellen Schwankungen von ca. 50%. Durch den Apfelsaftkonsum wurde auch das Stuhlgewicht nicht signifikant beeinflusst, was wie beim Stuhlwassergehalt auf den zu geringen Ballaststoffgehalt des Apfelsaftes zurückgeführt werden kann.

Da Ballaststoffe aufgrund ihres Einflusses auf die vorgestellten Fäzesparameter wahrscheinlich in einem bedeutenden Zusammenhang mit der Darmkrebsprävention stehen, könnte in einer weiteren Studie als Alternative zum Apfelsaft ein Lebensmittel mit einem höheren Ballaststoffgehalt eingesetzt werden, beispielsweise der unter 4.2.2 vorgestellte Tresterextraktionsaft, wobei sich durch die Methode hauptsächlich der Gehalt an löslichen Ballaststoffen wie Pektin erhöht. Ferner könnte als alternatives Studiengetränk auch ein so genannter „Smoothie“ in Betracht gezogen werden: Ein Smoothie kann zur Hälfte aus Saft und zur Hälfte aus Fruchtmark oder -püree bestehen, der Ballaststoffgehalt ist dadurch deutlich höher [DGE, 2007]. Die Darreichungsform wäre ebenfalls in unkomplizierter Form

eines Getränks, und durch den Herstellungsprozesses sind die bioaktiven Inhaltsstoffe in den Portionen homogen verteilt.

### 4.3.2 pH-Wert von Fäzeswasser

Niedrige pH-Werte von Fäzeswasser werden mit einem verminderten Risiko für kolorektale Tumoren in Verbindung gebracht [Walker *et al.*, 1986]. Dabei gelten beispielsweise die verringerte Löslichkeit von freien Gallensäuren und langkettigen Fettsäuren bei erniedrigten pH-Werten, Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroflora sowie eine potentiell verringerte Bildung von Karzinogenen durch bakterielle Enzyme als Ursachen [American Gastroenterological Association, 2000]. Das luminale pH-Gleichgewicht ist dynamisch und hängt von zahlreichen Faktoren ab, z. B. von der Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren und anderen organischen Säuren, Bikarbonat, Phosphat, Ammoniak und von anorganischen Kationen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sowie der Zusammensetzung der Mikroflora [Newmark und Lupton, 1990]. Eine Ursache für eine pH-Wert-Erniedrigung kann eine erhöhte Aktivität der Mikroflora sein, die Substanzen wie kurzkettige Fettsäuren durch den Abbau von löslichen Ballaststoffen wie Pektin produziert. In einer Humanstudie von Hillman *et al.* konnte gezeigt werden, dass erst ab einer täglichen Supplementation von 12 g Ballaststoffen über einen vierwöchigen Zeitraum der pH-Wert von Fäzeswasser signifikant reduziert wurde [Hillman *et al.*, 1983].

Die in dieser Arbeit ermittelten pH-Werte von unverdünntem Fäzeswasser entsprachen mit durchschnittlich  $6,90 \pm 0,28$  (Apfelsaftgruppe) und  $6,92 \pm 0,43$  (Kontrollgruppe) den Werten aus anderen Studien [Schnäbele *et al.*, 2008, Allinger *et al.*, 1989; Glinghammar *et al.*, 1997]. Durch die Apfelsaftintervention wurde der pH-Wert im Fäzeswasser der Probanden nicht verändert, sondern blieb über beide Studienphasen konstant. Dies ist vermutlich auf den zu geringen Anteil an Ballaststoffen des Apfelsaftes zurückzuführen, wodurch die Zusammensetzung und Aktivität der Mikroflora und nachfolgend der pH-Wert von Fäzeswasser nicht wesentlich beeinflusst wurde. Wie bereits in den vorigen Abschnitten diskutiert, könnten in weiteren Studien mit Fäzeswasseruntersuchungen Apfelsaftprodukte mit einem höheren Ballaststoffanteil eingesetzt werden.

### 4.3.3 Kurzkettige Fettsäuren

Die dominierenden kurzkettigen Fettsäuren des Kolons, die durch die bakterielle Fermentation ballaststoffhaltiger Nahrung entstehen, sind Azetat (C2), Propionat (C3) und Butyrat (n-C4). Sie machen ca. 90 % der kurzkettigen Fettsäuren im Dickdarm aus [Scheppach *et al.*, 1992]. Die Fermentation von Proteinen liefert neben den drei genannten Fettsäuren auch höherkettige Monokarbonsäuren wie Valerat (n-C5) und Caproat (n-C6) sowie die verzweigt-kettigen Fettsäuren Isobutyrat (iso-C4) bzw. Isovalerat (iso-C5).

Die Konzentration und das molare Verhältnis der kurzkettigen Fettsäuren werden im Wesentlichen durch das Substratangebot bestimmt [Scheppach *et al.*, 1992]. Das durchschnittliche molare Verhältnis der in dieser Arbeit erfassten Hauptfettsäuren Azetat:Propionat:Butyrat betrug 54:18:18 (Apfelsaftgruppe) bzw. 58:19:18 (Kontrollgruppe). Diese Verhältnisse stimmten damit annähernd mit den ermittelten Werten aus anderen Studien überein: Muir *et al.* ermittelten in Populationen, die durchschnittlich 24 g Ballaststoffe am Tag zuführten, in Fäzeswasser ein molares Verhältnis von 56:15:18 [Muir *et al.*, 1998].

Die Konzentrationen der in dieser Arbeit erfassten kurzkettigen Fettsäuren wurden infolge der vierwöchigen Apfelsaftintervention im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3.2). Ähnlich wie beim gemessenen pH-Wert der Fäzeswasserproben, lässt sich dies auf den vermutlich zu geringen Gehalt an Ballaststoffen des Apfelsaftes zurückführen, welche ein potentiell Substrat für die intestinale Mikroflora darstellen.

Kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Azetat und Butyrat, sind nicht nur mikrobielle Abbauprodukte von Ballaststoffen, sondern auch von Flavonoiden. So wiesen Ueno *et al.* und Blaut *et al.* den mikrobiellen Abbau durch *Eubacterium ramulus* von Quercetin in die Phenolsäure 3,4-Dihydroxy-Phenyllessigsäure und die Fettsäuren Azetat und Butyrat nach [Ueno *et al.*, 1983]. Da Flavonoide wie Quercetin in dem in dieser Studie verwendeten Apfelsaft nur in geringen Mengen (ca. 2,9 mg/L) vertreten waren, wird diese Konzentration für eine signifikante Beeinflussung der Fettsäurekonzentration im millimolaren Bereich wahrscheinlich nicht ausreichend sein.

### 4.3.4 Fäzeswasser-Zytotoxizität

Es wird vermutet, dass zytotoxische Komponenten im Darmlumen vermehrt zum Absterben von Epithelzellen der Darmmukosa führen und es zu einer gesteigerten proliferativen Aktivität von Kryptenzellen kommt, womit sich das Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms erhöhen kann [Gill & Rowland, 2002].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fäzeswasserproben zeigten bei Inkubation mit HT29-Zellen eine dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität (siehe Abbildung 3.3). Trotz der kontrollierten Diät während der Sammelperiode und einheitlichen Ernährungsvorgaben zeigten sich deutliche interindividuelle Schwankungen, was bereits in anderen Studien beobachtet werden konnte [Osswald *et al.*, 2000]. Die Fäzeswasserproben der Probanden der Apfelsaftgruppe zeigten nach vierwöchiger Saftintervention im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Änderung ihrer zytotoxischen Eigenschaften in HT29-Zellen (bei 5, 8 und 10 % im Zellkulturmedium, siehe Abbildung 3.4).

Mögliche Mechanismen, die zu einer Reduktion der Fäzeswasser-Zytotoxizität beitragen können, sind beispielsweise Konzentrationsänderungen an potentiell toxischen Substanzen wie Gallensäuren, langkettige Fettsäuren und Ammoniak im Fäzeswasser. Wie bereits unter 4.3.1 beschrieben, können unlösliche Ballaststoffe durch ihr Quellvermögen zu einem erhöhten Wassergehalt im Kolon führen, was zu Verdünnungseffekten führt, wodurch der Gehalt an potentiell toxischer Komponenten im Darmlumen verringert wird. Ferner können lösliche Ballaststoffe wie Pektin als Substrat der Mikroflora deren Aktivität und Zusammensetzung modulieren, so dass es zu einer verringerten Produktion bzw. erhöhtem Abbau toxischer Agenzien im Darm kommt [Gibson *et al.*, 2005]. Jedoch scheint die Konzentration an Ballaststoffen für eine Modulation der genannten Faktoren nicht auszureichen.

Im Zusammenhang mit einer erhöhten Polyphenolzufuhr durch die Nahrung wird auch eine gesteigerte Konzentration an phenolischen Substanzen und deren Metaboliten im Darmlumen diskutiert. Aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung könnten sie zu einer Verringerung entzündlicher Prozesse im Kolon führen [Garsetti, 2000]. Obwohl Apfelsaftpolyphenole sowie charakteristische Metabolite (siehe 3.4) im Fäzeswasser nachgewiesen werden konnten, scheint ihre Konzentration zu gering zu sein, um die Fäzeswasser-Zytotoxizität zu beeinflussen. Für zukünftige Fäzeswasserstudien wäre eine Ergänzung mit zusätzlichen Untersuchungen wie z. B. Messung der antioxidativen Kapazität von Fäzeswasser interessant, um zusätzliche Informationen einer Ernährungsintervention auf die Eigenschaften von Fäzeswasser zu erhalten.

## **4.4 Einfluss von Apfelsaftkonsum auf das Polyphenolprofil in Urin, Fäzeswasser und Plasma**

### **4.4.1 Einfluss auf die Konzentration intakter Apfelsaftpolyphenole**

Die Konzentration intakter Polyphenole in Plasma und Urin ist bereits in einer Vielzahl von Humanstudien untersucht worden, für Fäzesproben sind die Daten bislang begrenzt [reviewed in Manach *et al.*, 2004]. Die Wiederfindung von Polyphenolen in der Matrix des entsprechenden untersuchten Humanmaterials kann sich sehr unterscheiden, vermutlich aufgrund struktureller Besonderheiten. So wurden nach Aufnahme von Flavonolen wie Quercetin Mengen von 0,3 - 3,6 % der ursprünglichen Verzehrsmenge im Urin detektiert [Hollman *et al.*, 1997; Graefe *et al.*, 2001]. Wiederfindungsraten von Flavanolen wie Catechin, Epicatechin und Proanthozyanidinen in Urin variierten stark von ihrer ursprünglichen Aufnahmequelle (Tee: 0,5 - 6 %, Rotwein: 2 - 10 %, Kakao: bis zu 30 %) [Lee *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2002].

In dieser Arbeit konnten sowohl in den Urin- als auch in den Fäzeswasserproben der Probanden aus der Apfelsaftgruppe nach vierwöchiger Intervention Phloretin (Urin:  $2,51 \pm 1,62 \mu\text{M}$ ; Fäzeswasser:  $0,53 \pm 0,16 \mu\text{M}$ ) und Epicatechin (Urin:  $3,07 \pm 6,31 \mu\text{M}$ ; Fäzeswasser:  $0,67 \pm 0,31 \mu\text{M}$ ) identifiziert werden (siehe Abbildung 3.13). In den Proben der Depletionsphase der Apfelsaftgruppe und beiden Studienphasen der Kontrollgruppe konnten diese Polyphenole nicht detektiert werden. Die genannten Apfelsaftpolyphenole konnten in Urin und Fäzeswasser nur in den Proben quantifiziert werden, die vorher durch enzymatische Hydrolyse mittels  $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase aufgearbeitet worden waren. Dies weist darauf hin, dass die Polyphenole einem intensiven Phase-II-Metabolismus unterliegen und überwiegend in Form ihrer Glukuronide oder Sulfate ausgeschieden werden, was bereits vielfach in anderen Studien beschrieben wurde [Natsume *et al.*, 2003; Mullen *et al.*, 2006; Jaganath *et al.*, 2006]. In Form der Phase-II-Konjugate liegen die Pflanzenstoffe als hochmolekulare, wasserlösliche Verbindungen vor, die als solche von den Körperzellen nicht resorbiert werden können, um potentielle protektive Funktionen in der Zelle ausüben zu können [Moon *et al.*, 2001].

In einer Studie von DuPont *et al.* wurde im 24 h-Urin von Probanden, die 1 L Apfelwein konsumiert hatten, eine Phloretinkonzentration von  $3,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$  ermittelt [DuPont *et al.*, 2002]. Da Phloretin, variierend nach Apfelsorte, in hohen Mengen enthalten ist, kann dieses Polyphenol als aussagekräftiger Biomarker für die Polyphenolzufuhr durch Äpfel und Apfelprodukte herangezogen werden. Jenner *et al.* detektierten bei einem Probanden nach



einer polyphenolreichen, jedoch nicht kontrollierten Diät eine Phloretinkonzentration bis zu 0,05  $\mu\text{M}$  in Fäzeswasser, also deutlich weniger als im Rahmen dieser Arbeit [Jenner *et al.*, 2005].

Im Plasma der Probanden konnten nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum keine intakten Apfelsaftpolyphenole detektiert werden. Dies könnte darauf beruhen, dass eine enzymatische Hydrolyse der Proben (siehe Abschnitt 2.6) wegen Gelbildung der Probe nicht möglich war und somit die Polyphenole in Form ihrer Sulfate und Glukuronide nicht identifiziert werden konnten. Eine weitere Begründung könnte in der raschen Bioverfügbarkeit der Polyphenole liegen: Die Blutentnahme der Probanden fand jeweils am Morgen nach der zweitägigen Sammelperiode unter Einhaltung einer zwölfstündigen Nahrungskarenz statt. Aufgrund der in anderen Studien ermittelten raschen Bioverfügbarkeit der Polyphenole ist davon auszugehen, dass nach 12stündigen Fasten die Apfelsaftpolyphenole bereits aus dem Blut eliminiert waren [Scalbert & Williamson, 2000]. Um die Bioverfügbarkeit der Apfelsaftpolyphenole anhand von Messdaten im Probandenplasma beurteilen zu können, müsste im Rahmen einer Kinetik-Studie der Apfelsaft einmalig zu einem bestimmten Zeitpunkt von den Probanden konsumiert werden und anschließend Blutabnahmen zu mehreren, kontrollierten Zeitpunkten stattfinden.

Trotz eines breiten Spektrums an Polyphenolen, die im Apfelsaft enthalten sind, wurden bis auf die beiden Aglyka Epicatechin und Phloretin keine weiteren intakten Apfelsaftpolyphenole in den untersuchten Proben detektiert. Dies könnte zum einen darauf beruhen, dass diese beiden Polyphenole mit Konzentrationen von 14,7 mg/L (Epicatechin) und 88,6 mg/L (Phloretinglykoside) nach der Chlorogensäure und ihren Derivaten die im Apfelsaft am häufigsten vertretenen Polyphenole waren (siehe Tabelle 2.1). Möglicherweise waren andere Polyphenole nach der Darmpassage und Resorption in den Urin- bzw. Fäzeswasserproben enthalten, jedoch in so geringen Mengen, dass sie mit der in dieser Arbeit angewendeten GC/MS-Methode nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Zudem werden für eine höhere Nachweisempfindlichkeit für hochmolekulare Polyphenole häufig Analysemethoden wie HPLC-ESI/MS oder HPLC-APCI/MS eingesetzt, welche wiederum für die Analytik von Phenolsäuren ungeeignet sind. Aufgrund des geringen Volumens der Fäzeswasser- und Plasmaproben war eine Aufteilung der Proben nicht möglich. Da insbesondere die Analytik von charakteristischen Metaboliten der Polyphenole im Vordergrund stand, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Analyse mittels GC/MS bevorzugt.

#### 4.4.2 Einfluss auf die Konzentration an Phenolsäuren

Im Rahmen dieser Arbeit stand neben der Identifikation intakter Apfelsaftpolyphenole in Urin, Fäzeswasser und Plasma insbesondere die Analyse einfacher Phenolsäuren in Vordergrund. Der Abbau intakter Polyphenole in einfache Phenolsäuren findet durch die mikrobielle Aktivität im Kolon statt. Sie können dann direkt mit den Fäzes ausgeschieden werden, oder infolge Resorption im Kolonepithel durch das Blut transportiert und schließlich über den renalen Weg eliminiert werden [Aherne & O'Brien, 2002]. In anderen Humanstudien sind einige Phenolsäuren bereits als potentielle Metabolite bestimmter Polyphenole identifiziert wurden und können somit als Biomarker für die Polyphenolzufuhr herangezogen werden [DuPont *et al.*, 2002; Olthof *et al.*, 2003; Jenner *et al.*, 2005; Mennen *et al.*, 2006].

Die phenolische Verbindung Phlorogluzinol (1,3,5-TriOH-Benzol) gilt als charakteristisches Abbauprodukt von Phloretin und Quercetin [Monge *et al.*, 1984; Walle *et al.*, 2001]. Die detektierten Mengen in Urin und Fäzeswasser waren bei allen Probanden sehr gering (beispielsweise im Fäzeswasser  $0,35 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ), die Konzentration blieb auch nach Apfelsaftkonsum unverändert (siehe Abbildungen 3.5 und 3.6). Jenner *et al.* detektierten mit  $0,11 \pm 0,12 \mu\text{M}$  Phlorogluzinol im Fäzeswasser ebenfalls nur sehr geringe Mengen. Blaut *et al.* beschrieben den raschen mikrobiellen Abbau von Phlorogluzinol zu kurzkettigen Fettsäuren wie Azetat und Butyrat. Vermutlich stellt Phlorogluzinol nur ein kurzfristiges Zwischenprodukt dar, welches rasch einem weiteren Metabolismus unterliegt [Blaut *et al.*, 2003].

Die in dieser Arbeit untersuchte Phenylelessigsäure 3,4-diOH-Phenylelessigsäure wurde unter anderem als mikrobieller Metabolit des Quercetins beschrieben, welche weiter zu 4-OH-Phenylelessigsäure und 3-OH-Phenylelessigsäure abgebaut werden kann [Justesen & Arrigoni, 2001]. Der Apfelsaftkonsum zeigte keinen signifikanten Einfluss auf eine Konzentrationszunahme der gemessenen Phenylelessigsäuren im Urin und Fäzeswasser der Probanden, was auch auf der geringen Quercetinkonzentration des Apfelsaftes beruhen könnte. 4-OH-Phenylelessigsäure und 3-OH-Phenylelessigsäure waren unter den untersuchten Phenolsäuren im Urin quantitativ am stärksten vertreten (siehe Abbildungen 3.7 und 3.8). In Plasma wurden ebenfalls mit über 0,2 nM relativ hohe Konzentrationen im Vergleich zu den anderen im Plasma detektierten Säuren gemessen (siehe Abbildung 3.14)

Die in dieser Arbeit bestimmten Hydroxymzimtsäuren Kaffeesäure, Ferulasäure und Isoferulasäure sowie deren mikrobielle Folgeprodukte 3,4-diOH-Phenylpropionsäure,

4-OH-Phenylpropionsäure, Vanillinsäure und 4-OH-Phenylpropionsäure wurden in einer Studie von Olthof *et al.* als mikrobielle Metabolite der Chlorogensäure identifiziert [Olthof *et al.*, 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte der Apfelsaftkonsum im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Konzentrationserhöhung ( $p \leq 0,05$ ) von Ferulasäure und Vanillinsäure im Urin der Probanden (siehe Abbildung 3.11). Im Fäzeswasser konnte neben Ferulasäure auch die 3,4-diOH-Phenylpropionsäure in signifikant erhöhten Konzentrationen ( $p \leq 0,05$ ) infolge Apfelsaftkonsums nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.12). Der Konzentrationsanstieg dieser drei Phenolsäuren könnte auf die erhöhte Zufuhr an Chlorogensäure zurückzuführen sein; mit dem Konsum von 0,75 L Apfelsaft nahmen die Probanden täglich ca. 130 mg Chlorogensäure am Tag auf. In der Untersuchung von Olthof *et al.* konnte im 24h-Urin von Probanden, die zuvor 2 g Chlorogensäure in isolierter Form aufgenommen hatten, ein ähnliches Metabolitenprofil analysiert werden: Die Konzentrationen von Ferulasäure und 3,4-diOH-Phenylpropionsäure stiegen infolge der Chlorogensäure-Supplementation stark signifikant ( $p \leq 0,01$ ) an [Olthof *et al.* 2003].

Ein Einfluss auf die Konzentration in Urin und Fäzeswasser an 3-OH-Benzoessäure (siehe Abbildung 3.5 und 3.6) und die detektierten Phenylpropionsäuren (siehe Abbildung 3.9 und 3.10) als mögliche Abbauprodukte monomerer Flavan-3-ole konnte in dieser Arbeit nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum nicht gemessen werden. Olthof *et al.* wiesen im 24 h-Urin von Probanden nach Verzehr eines catechinreichen Teeextrakts signifikant erhöhte Konzentrationen ( $p \leq 0,01$ ) an 3-OH-Benzoessäure nach, jedoch war die Zufuhr an Catechinen aus Teeextrakt mit 1,25 g merklich höher als mit dem in dieser Arbeit verwendeten Apfelsaft (20,6 mg/L monomere Catechine). In einer Studie von Jenner *et al.* hatte der einmalige Verzehr einer polyphenolreichen Kost nach einer eintägigen polyphenolarmen Diät im Fäzeswasser eines Probanden einen dreifachen Anstieg an 3-OH-Benzoessäure zur Folge [Jenner *et al.*, 2005]. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der Studie von Jenner *et al.* nur um die Untersuchung eines Individuums handelte und somit keine interindividuellen Schwankungen berücksichtigt werden mussten.

Obwohl die Probanden durch den Apfelsaftkonsum täglich ca. 270 mg Polyphenole aufnahmen, war nach der vierwöchigen Saftintervention nur bei wenigen Phenolsäuren eine signifikante Konzentrationszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Aufgrund der in zahlreichen Studien ermittelten raschen Bioverfügbarkeit der Polyphenole und in der eigenen Pilotstudie gemessenen Daten ist davon auszugehen, dass die einwöchige Depletionsphase für eine Elimination typischer Metabolite von Apfelsaftpolyphenolen in Urin

und Fäzeswasser ausreichend gewesen ist, um einen Effekt vor und nach der Apfelsaftintervention nachweisen zu können. Trotz kontrollierter Ernährung zeigten sich sowohl in Urin als auch in Fäzeswasser hohe inter- und intraindividuelle Schwankungen bezüglich der Phenolsäurekonzentrationen. Dies zeigten auch Ergebnisse anderer Studien, sowohl mit als auch ohne kontrollierter Diät [Jenner *et al.*, 2005; Karlsson *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2005; Mennen *et al.*, 2006b]. Ursachen dafür können neben Polymorphismen für intestinale Hydrolyse- und Transportenzyme auch Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikroflora sein [Scalbert & Williamson, 2000]. Des Weiteren stellen die analysierten Phenolsäuren nicht nur Metabolite von Polyphenolen dar; als weitere Quellen kommen z.B. aromatische Aminosäuren und endogene Katecholamine in Frage [Goldstein *et al.*, 2003].

Die Verwendung von Phenolsäuren als Biomarker für die Polyphenolaufnahme in Form einer Lebensmittelmatrix gestaltet sich zusätzlich kompliziert, da Polyphenole ubiquitär in pflanzlichen Nahrungsmitteln enthalten sind. Laut Ernährungsprotokoll waren während der Studie beispielsweise eine Tasse Kaffee oder Tee am Tag zugelassen. Eine Tasse Kaffee kann bis zu 150 mg Chlorogensäure enthalten, wobei der Gehalt je nach Zubereitungsart, Kaffeesorste usw. variieren kann. Dies entspricht mehr als der täglichen Zufuhr durch 0,75 L Apfelsaft (ca. 130 mg Chlorogensäure) [Clifford *et al.*, 2000]. Ein kompletter Verzicht der Probanden auf polyphenolhaltige Lebensmittel über den gesamten Studienzeitraum wurde jedoch aufgrund der langen Studiendauer ausgeschlossen: eine strikt polyphenolarme Kost in Form von beispielsweise Fleisch, Weißbrot, Nudeln hätte nicht einer üblichen, gesunden Ernährung entsprochen. Mögliche Folgen wären dadurch möglicherweise eine geringe Probanden-Compliance, d. h. Nichteinhaltung der vorgegebenen Ernährungsinstruktionen, vorzeitiger Studienabbruch oder Verdauungsbeschwerden gewesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht, in welchem Ausmaß Phenolsäuren einem Phase-II-Metabolismus unterliegen und somit in Form ihrer konjugierten Metabolite als Glukuronide und Sulfate in Urin und Fäzeswasser ausgeschieden werden. Durch enzymatische Hydrolyse der Proben wurde die Gesamtkonzentration der einzelnen Phenolsäuren erfasst, d. h. sowohl der Gehalt an freien als auch konjugierten Metaboliten. Durch Vergleich der Phenolsäurekonzentration aus den Proben ohne enzymatische Hydrolyse konnte somit bei jedem Probanden ermittelt werden, zu wie viel Prozent die betreffende Substanz in freier bzw. in konjugierter Form im Verhältnis zur Gesamtkonzentration der entsprechenden Phenolsäure vorliegt. Neben Bestimmung der Gesamtkonzentration einzelner Phenolsäuren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur die intakten

Apfelsaftpolyphenole, sondern auch deren Metabolite in Form niedermolekularer phenolischer und aromatischer Verbindungen einem intensiven Metabolismus unterliegen und zu einem beträchtlichen Anteil in konjugierter Form ausgeschieden werden.

In der Gruppe der Hydroxyzimtsäuren wurden dabei Unterschiede im Ausmaß der Konjugation festgestellt, die möglicherweise auf ihre unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften zurückzuführen sind: Während im Urin die Kaffeesäure mit knapp 70 % überwiegend in Form ihrer Glukuronide und Sulfate detektiert wurde, waren die prozentualen Verhältnisse für andere Hydroxyzimtsäuren wie Ferulasäure (knapp 40 %) und Isoferulasäure (etwa 55 %) deutlich geringer. Isoferulasäure und Ferulasäure unterscheiden sich von Kaffeesäure durch ihre funktionellen Gruppen am aromatischen Ring: Kaffeesäure besitzt einen Catecholrest (benachbarte Hydroxylgruppen an C3 und C4), bei Isoferulasäure bzw. Ferulasäure ist eine der Hydroxylgruppen durch eine Methoxygruppe an C3 bzw. C4 ersetzt. In diversen *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Hydroxyzimtsäureverbindungen mit einer Catecholfunktion wie Kaffeesäure trotz ihrer hohen antioxidativen Kapazität auch prooxidative Effekte entfalten können und deshalb vom Organismus bevorzugt konjugiert werden, um die rasche Elimination einer potentiell toxischen Substanz zu ermöglichen [Boersma *et al.*, 2002]. In einer Studie von Nardini *et al.* wurde im Plasma von Probanden nach Bierkonsum die Kaffeesäure fast ausschließlich zu 87 - 100 % in konjugierter Form detektiert, Ferulasäure mit ca. 70 % dagegen deutlich geringer [Nardini *et al.*, 2006]. Um dieses Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit zu bestätigen, wäre ein zusätzlicher Vergleich der Plasmawerte interessant gewesen. Jedoch war eine enzymatische Hydrolyse der Plasmaproben wegen der unter 2.6 beschriebenen Gelbildung der Proben und somit ein Vergleich des Verhältnisses von konjugierten und nicht-konjugierten Phenolsäuren nicht möglich; ferner hätte der Zeitpunkt der Blutentnahme aufgrund der raschen Bioverfügbarkeit der Polyphenole 1 - 2 h nach Apfelsaftkonsum statt finden müssen.

## **4.5 Beeinflussung Adipositas- und Diabetes-assoziierter Risikofaktoren für Dickdarmkrebs durch Apfelsaftkonsum**

Unter 1.1.3 wurden bereits die Zusammenhänge zwischen Adipositas, Diabetes und damit assoziierten Komorbiditäten wie Darmkrebs geschildert. Da die im Rahmen dieser Studie bestimmten verschiedenen Diabetes-, Adipositas- und Entzündungsmarker ein mögliches Verbindungsglied zwischen diesen Erkrankungen darstellen, sind diese Analyten bedeutende Biomarker für die Abschätzung des Erkrankungsrisikos bzw. für die Prävention: In „Risikokollektiven“ wie Übergewichtigen können sie beispielsweise zur Beurteilung des Erkrankungsrisikos der Probanden für Diabetes eingesetzt werden. Die Untersuchung dieser Biomarker im Rahmen von Ernährungsstudien kann darüber Auskunft geben, ob die Parameter durch die Aufnahme bioaktiver Inhaltsstoffe wie Polyphenole mit entzündungshemmender oder antidiabetischer Wirkung positiv beeinflusst werden und damit der präventive Effekt einer polyphenolreichen Ernährung auf die Gesundheit des Menschen bestätigt wird.

### **4.5.1 Diabetesmarker**

#### **HbA1C**

HbA1c beschreibt den prozentualen Anteil an glukosyliertem Hämoglobin im Blut und ist bei Diabetikern aufgrund ihrer Hyperglykämie signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Personen [Rohlfing *et al.*, 2002]. Die Normwerte für HbA1c bei Personen ohne gestörte Glukosehomöostase bzw. Insulinresistenz liegen unter 6 % [Thomas L., 1998], was bei allen Teilnehmern dieser Studie der Fall war (siehe Tabelle 3.7). In *in vitro*-Studien haben Apfelsaftpolyphenole wie Phloretin antidiabetische Effekte durch Inhibierung intestinaler Glukosetransporter gezeigt [Dimitrakoudis *et al.*, 1992; Panayotova-Heiermann *et al.*, 1995]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine tendenzielle Reduktion ( $p=0,08$ ) von HbA1c infolge des vierwöchigen Apfelsaftkonsums im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden. Möglicherweise ist dieser Effekt bedingt durch die geschilderte antidiabetische Eigenschaft des Phloretins: die Hemmung der Glukose-Resorption im Darm verringert die alimentäre Glukosezufuhr und damit die Konzentration im Blut, was zu einem reduzierten HbA1c-Wert führen könnte. Phloretin in Form seiner Glykoside war mit ca. 90 mg/L im in dieser Arbeit verwendeten Apfelsaft in relativ hohen Mengen enthalten (Tabelle 2.1); umgerechnet auf das

Aglykon Phloretin entspricht dies 200  $\mu\text{M}$ . In einer *in vitro*-Studie war jedoch eine Polyphenolkonzentrationen von 1 mM nötig, um SGLT1 effektiv zu hemmen, also das fünffache dessen, was die Probanden täglich durch 0,75 L Apfelsaft konsumierten [Kottra & Daniel, 2007]. Jedoch sollten in einem komplexen Organismus auch andere Effekte wie Hemmung renaler Glukosetransporter oder synergistische Effekte durch die verschiedenen Apfelsaftpolyphenole berücksichtigt werden. Zudem spiegelt HbA1c den Blutglukosespiegel der letzten acht Wochen wider, dient somit also Langzeitmarker. Vermutlich spielt für eine Reduktion des Wertes nicht nur die Dosis, sondern auch die Dauer der Supplementation eine bedeutende Rolle. Deshalb wäre zusätzlich die Durchführung einer Intervention mit Apfelsaft über eine Periode von 8 - 12 Wochen interessant, um zu untersuchen, ob der HbA1c-Wert durch die längere Studiendauer signifikant gesenkt werden könnte.

### **Insulin, IGF-1 und IGFBP-3**

Aufgrund der potentiellen mitogenen Wirkung von Insulin und IGF-1 besteht insbesondere bei Diabetikern aufgrund ihrer Hyperinsulinämie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kolorektaler Tumoren. Beide Proteine wurden bei Diabetikern und auch bei Übergewichtigen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen. IGF-1 zirkuliert im Blut zu weniger als 5 % in freier, ungebundener und damit wirksamer Form, hauptsächlich ist es an Bindeproteine wie IGFBP-3 gebunden und damit inaktiviert [Zapf *et al.*, 1986]. IGFBP-3 wird bei Übergewichtigen im Vergleich zu normalgewichtigen Personen ebenfalls in erhöhten Konzentrationen expremiert [Frystyk, 2004]. Ein linearer Zusammenhang zwischen BMI und IGF-1 bzw. IGFBP-3 konnte bislang jedoch noch nicht bestätigt werden [Chang *et al.*, 2002].

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Nüchterninsulinkonzentration (siehe Tabelle 3.8) liegen im Referenzbereich von 2,5 - 41 mU/mL [Thomas, 1998]. In der Literatur finden sich für IGF-1 und IGFBP-3 in der Literatur Plasmakonzentrationen von 114 - 452 ng/mL (IGF-1) und 2,01 - 5,47  $\mu\text{g/mL}$  (IGFBP-3), was mit den in dieser Arbeit erfassten Werten nahezu übereinstimmt (siehe Tabelle 3.7) [Granada *et al.*, 2000]

Während IGF-1 und IGFBP-3 durch die Apfelsaftintervention nicht beeinflusst wurden, zeigte sich bei Insulin eine tendenzielle Reduktion ( $p=0,11$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnlich wie beim HbA1c könnte dieser Effekt auf die antidiabetischen Eigenschaften von Polyphenolen wie Phloretin zurückzuführen sein. Um die Tendenz für die antidiabetischen Eigenschaften von Apfelsaft zusätzlich zu unterstützen, wäre es für zukünftige Untersuchungen sinnvoll, neben den vorgestellten Diabetesmarkern zusätzlich die Nüchtern-

Blutglukosekonzentration der Probanden zu bestimmen: Da die Plasmakonzentrationen von Insulin und HbA1c mit dem Blutglukosespiegel zusammenhängen, könnten die tendenziell reduzierten Insulin- und HbA1c-Werte mit einem erniedrigten Glukose-Spiegel assoziiert werden.

## **4.5.2 Adipositasmarker**

### **Adiponektin**

In Studien mit Übergewichtigen und Patienten mit Typ 2-Diabetes wurden signifikant erniedrigte Adiponektinkonzentrationen im Plasma gemessen [Hotta *et al.*, 2000; Vendrell *et al.*, 2004]. Aufgrund seiner günstigen Beeinflussung des Fett- und Glukosemetabolismus werden für Adiponektin insulinsensitivierende Eigenschaften diskutiert [Vendrell *et al.*, 2004]. Bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen wurde nach vierwöchigem Verzehr von täglich 1 L Oolongtee signifikant erhöhte Adiponektinkonzentrationen ermittelt [Shimada *et al.*, 2004]. Dieser Effekt könnte auf einer möglichen Interaktion mit anderen Adipokinen beruhen: So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  die Adiponektinsekretion aus dem Fettgewebe hemmen. Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkungen von Polyphenolen (siehe auch nächster Abschnitt) könnte eine Hemmung dieser Inflammationsmarker die Adiponektinkonzentration günstig beeinflussen [Fasshauer & Paschke, 2003].

Ein Einfluss des vierwöchigen Apfelsaftkonsums auf die Adiponektinkonzentration konnte im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.8). Eine Ursache hierfür ist vermutlich das gesunde Probandenkollektiv: Mit durchschnittlichen Adiponektinkonzentrationen von  $5,96 \pm 2,74 \mu\text{g/mL}$  (Kontrollgruppe) und  $5,84 \pm 3,6 \mu\text{g/mL}$  (Apfelsaftgruppe) liegen diese gemessenen Konzentrationen im Bereich von aus anderen Studien ermittelten Werten für gesunde, schlanke Männer zwischen 20-60 Jahren [Poppitt *et al.*, 2008].

### **Resistin**

Während Adiponektin potentiell insulinsensitivierende Wirkung zeigt, wird Resistin als Promotor der Insulinresistenz diskutiert [Vendrell *et al.*, 2004]. Inwiefern das Protein beim Menschen tatsächlich zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt ist bislang noch unklar, da viele Humanstudien im Gegensatz zu *in vitro*-Untersuchungen oder Studien an Tiermodellen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Resistinkonzentration, Insulinresistenz,



Adipositas und Diabetes zeigen können [Heilbronn *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006]. Verschiedene *in vitro*-Studien deuten auf eine Beeinflussung der Regulation von Resistin durch Ernährungsfaktoren hin: So konnte eine Hemmung der Genexpression von Resistin in humanen Adipozyten durch Polyphenole aus Grünteeextrakt gezeigt werden [Liu *et al.*, 2006].

In der Literatur wurden für gesunde Personen Resistinwerte zwischen  $4,1 \pm 1,7$  ng/ml gefunden, was annähernd mit den im Rahmen dieser Studie bestimmten Daten (siehe Tabelle 3.8) übereinstimmt [Vendrell *et al.*, 2004]. Durch die vierwöchige Apfelsaftintervention wurde die Resistinkonzentration der Probanden nicht beeinflusst, was vermutlich, ähnlich wie beim Adiponektin, auf das gesunde Probandenkollektiv zurückzuführen ist.

### **Leptin**

Das Hormon Leptin wird spezifisch aus dem Fettgewebe sezerniert. Übergewichtige haben aufgrund der hohen Akkumulation von Fettzellen höhere Leptinkonzentrationen im Serum im Vergleich zu normalgewichtigen Personen [Vendrell *et al.*, 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach vierwöchigem Apfelsaftkonsum eine signifikant erhöhte Leptinkonzentration ( $p = 0,04$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Da die Leptinkonzentration mit der Fettmasse des Körpers positiv assoziiert ist, müsste dies bedeuten, dass das Körperfett der Probanden im Rahmen der Apfelsaftstudie ebenfalls anstieg. Jedoch wurden die anthropometrischen Parameter wie BMI, Körperfett und WHR, die im Rahmen dieser Arbeit erfasst wurden (Abschnitt 3.2.1), durch die vierwöchige Apfelsaftintervention nicht verändert. Somit kann eine Steigerung der Leptinkonzentration durch die Zunahme an Fettmasse der Probanden ausgeschlossen werden.

Aus verschiedenen Humanstudien ist bekannt, dass die Plasmakonzentration von zirkulierendem Leptin mit der Aufnahme an Nahrungsfetten positiv assoziiert ist [Yannakoulia *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2007]. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Menge an zirkulierendem Leptin einer Vielzahl von Einflüssen anderer Faktoren unterliegt. So besitzen Glukokortikoide und Wachstumshormone eine stimulierende Wirkung auf die Leptinsekretion [Ryan 1996]. Zudem wird die Menge an freiem Leptin durch die Anzahl und Bindung an Leptin-Rezeptoren beeinflusst, welche in einer Vielzahl von Geweben (Fettzellen, Gehirn, Herz- und Skelettmuskel, Niere, Lunge etc.) vorkommen [Wang *et al.* 1998]. In einer Humanstudie wurde eine positive Korrelation zwischen löslichem Leptinrezeptor und einer erhöhten Zufuhr an Ballaststoffen analysiert, die Menge an zirkulierendem Leptin und Ballaststoffen war dagegen invers assoziiert [Yannakoulia *et al.*, 2003].

Ob der in dieser Arbeit gemessene signifikante Anstieg von Leptin bei den Probanden der Apfelsaftgruppe auf eine Änderung der Ernährungsgewohnheiten während der Interventionsperiode zurückzuführen ist, ist unklar. Die Probanden sollten über den Studienzeitraum ihre Ernährungsgewohnheiten unter Berücksichtigung der Instruktionen des Ernährungsprotokolls beibehalten. Ferner sollten durch die Studie im Paralleldesign unter Berücksichtigung einer Kontrollgruppe unter gleichen Ausgangsbedingungen äußere Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Die Leptinkonzentration in der Apfelsaftgruppe stieg von  $3,01 \pm 0,83$  ng/mL vor Intervention auf  $4,03 \pm 1,51$  ng/mL nach Intervention an. Bei gesunden, schlanken Männern wurden Leptinkonzentrationen mit einer breiten Spanne von 2,8 - 17,5 ng/mL im Serum analysiert [Hotta *et al.*, 2000; Kanaya *et al.*, 2006]. Somit liegen auch nach der Apfelsaftintervention die Leptinkonzentrationen der Probanden in einen physiologischen Bereich. Um zukünftig zusätzliche Informationen über den Einfluss einer Ernährungsintervention auf den Leptinspiegel zu erhalten, könnten weitere Untersuchungen wie z. B. Bestimmung des Gehaltes an löslichen Leptinrezeptoren dazu beitragen, eine Änderung der Leptinkonzentration zu begründen.

### **4.5.3 Entzündungsmarker**

#### **TNF- $\alpha$ , IL-6 UND CRP**

In verschiedenen Studien mit übergewichtigen Personen konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 im Serum im Vergleich zu normalgewichtigen nachgewiesen werden [Ofei *et al.*, 1996; Pedersen *et al.*, 2003]. Als Induktoren weiterer Zytokine und Kontrolle der Akute-Phase-Antwort fördern diese Proteine entzündliche Prozesse.

Der Beitrag des Fettgewebes zur TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum ist jedoch fraglich: so wurde in einer Studie mit Probanden (BMI-Spanne 22,3-38,7 kg/m<sup>2</sup>) festgestellt, dass die Expression im Fettgewebe die im Blut zirkulierende Menge nur unwesentlich beeinflusst [Mohamed-Ali *et al.*, 1997]. Die insulinresistenzfördernde Wirkung durch TNF- $\alpha$  scheint vermutlich nicht durch endokrine Mechanismen, sondern über para- und autokrine Mechanismen vermittelt zu werden [Kanety *et al.*, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1996]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Borst & Conover in einer Studie mit adipösen, insulinresistenten Nagern: zwar konnte eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  in den Muskelzellen gemessen werden, jedoch nicht im Serum der Tiere, was für einen autokrinen Mechanismus von TNF- $\alpha$  als Promotor der Insulinresistenz spricht [Borst & Conover, 2005].

Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  ist die Sezernierung von IL-6 aus dem Fettgewebe mit einer erhöhten Konzentration an zirkulierendem IL-6 *in vivo* assoziiert. IL-6 vermittelt seine Funktionen über endokrine Mechanismen, weshalb eine erhöhte Serumkonzentration auf pathophysiologische Zustände im Zusammenhang mit Adipositas hinweisen könnte [Mohamed-Ali *et al.*, 1997].

IL-6 stimuliert die hepatische Produktion von CRP. Eine positive Korrelation zwischen CRP und BMI konnte eindeutig belegt werden [Erlinger *et al.*, 2004; Nishida *et al.*, 2007]. CRP wird als spezifischer Marker für das Vorliegen einer akuten (z. B. bei bakteriellen Infekten) bzw. chronischen (z. B. bei atherosklerotischen oder Krebserkrankungen) Entzündung herangezogen.

Die antiinflammatorischen Eigenschaften der Polyphenole scheinen insbesondere mit ihrem Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionskaskaden zusammenzuhängen. Beispielsweise wurden Polyphenole aus Äpfeln, Grüntee und Rotwein als potente Hemmstoffe des NF- $\kappa$ B-Signalweges identifiziert [Aggarwal & Shishodia, 2006]. Eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B und der damit verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ ) und Akute-Phase-Proteinen (z.B. CRP) ist mit einem verringerten Risiko für kolorektale Tumoren assoziiert [Karin, 2006]. In einer Studie von Watzl *et al.* wurde bei gesunden Probanden, die täglich hohe Mengen Obst und Gemüse verzehrten, nach vier Wochen eine signifikante Reduktion der CRP-Konzentration ermittelt [Watzl *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder eine Reduktion von CRP noch der anderen Entzündungsmarker TNF- $\alpha$  und IL-6 durch den vierwöchigen Apfelsaftkonsum gemessen werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Probanden im Rahmen dieser Arbeit trotz täglichem Konsum von 0,75 L Apfelsaft eine deutlich geringere Zufuhr an sekundären Pflanzenstoffen hatten als in der Studie von Watzl *et al.*: in dieser Studie verzehrten die Probanden täglich acht Portionen Obst und Gemüse, was noch deutlich über den empfohlenen Verzehrsmengen der DGE von fünf Portionen liegt. Eine Beeinflussung dieser Biomarker bei gesunden Probanden ist vermutlich nur mit einer extrem hohen Zufuhr an sekundären Pflanzenstoffen möglich.

### **sICAM und sVCAM**

Eine hohe Zufuhr an sekundären Pflanzenstoffen wird mit einem verringerten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht, welche häufig Folgekomplikationen von Adipositas und Diabetes sind. Bei Übergewichtigen und Diabetikern konnten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen an zirkulierendem sICAM und sVCAM gemessen werden [Lee *et al.*, 2008; Leinonen *et al.*, 2003]. Eine verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle

sICAM und sVCAM wird mit atherosklerotischen Prozessen in Verbindung gebracht, da sie durch Verstärkung der Immunantwort zu Schäden am Endothelgewebe führen können [Papayianni *et al.*, 2002].

In einer Studie von Estruch *et al.* konnte bei gesunden Männern nach vierwöchigem Rotweinkonsum (30 g Ethanol am Tag) eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentration beider Adhäsionsmoleküle ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Effekt durch Apfelsaftkonsum auf die Konzentrationen von sICAM und sVCAM gemessen; neben dem höheren Polyphenolgehalt von Rotwein (4 - 6,5 g/L) im Vergleich zum Apfelsaft kann der von Estruch *et al.* gemessene Effekt auch auf einem potentiellen synergistischen Effekt der Pflanzenstoffe in Kombination mit moderater Alkoholzufuhr beruhen [Estruch *et al.*, 2004]. Mit durchschnittlichen Konzentrationen für sICAM von  $484 \pm 219$  ng/mL (Apfelsaftgruppe) und  $419 \pm 181$  ng/mL (Kontrollgruppe) und für sVCAM von  $690 \pm 249$  ng/mL (Apfelsaftgruppe) und  $710 \pm 247$  ng/mL (Kontrollgruppe) entsprechen diese Werte annähernd den Daten aus anderen Studien mit gesunden Probanden (siehe Tabelle 3.9) [Papayianni *et al.*, 2002; Estruch *et al.*, 2004].

## 4.6 Schlussbetrachtung und Ausblick

Interventionsstudien unter Berücksichtigung komplexer Lebensmittelmatrizes wie Apfelsaft anstelle isolierter Inhaltsstoffe werden im Rahmen der Krebsprävention immer häufiger als Untersuchungsmodell angewandt, um potentiell präventive Mechanismen aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob ein Einfluss einer polyphenolreichen Ernährung in Form von Apfelsaft auf Biomarker für Diabetes- und Kolonkarzinogenese-relevante Prozesse möglich ist. Dazu wurde ein breites Spektrum an analytischen und diagnostischen Parametern verwendet.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Analytik postulierter Abbauprodukte von Apfelsaftpolyphenolen, den Phenolsäuren, als Biomarker für den Apfelsaftkonsum. Die Identifizierung charakteristischer Metabolite von alimentär zugeführten Polyphenolen in Humanproben gewinnt in der aktuellen Ernährungsforschung zunehmend an Bedeutung, um Aufschluss über die *in vivo*-Bioverfügbarkeit und -aktivität zu erhalten: aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit intakter Polyphenole der Nahrung wird eine bioaktive Wirkung ihrer Abbauprodukte nicht ausgeschlossen. Der Zusammenhang zwischen einem verminderten Risiko für kolorektale Tumoren durch erhöhte Polyphenolzufuhr in Form von Obst und Gemüse wird unter Anderem mit einer gesteigerten Konzentration der phenolischen

Substanzen und deren Metabolite im Darmlumen diskutiert. Im Rahmen dieser Studie wurden im Fäzeswasser und Urin der Probanden nach Apfelsaftkonsum nur geringe Konzentrationen intakter Polyphenole wie Epicatechin und Phloretin detektiert. Die Analyse ihrer Metabolite, einfache phenolische und aromatische Säuren, ergab jedoch eine merklich höhere Konzentration, beispielsweise für Ferulasäure wurden Konzentrationen über 80  $\mu\text{M}$  im Fäzeswasser der Probanden analysiert. Obwohl die Probanden während der Probensammlung von Fäzes, Plasma und Urin eine kontrollierte Diät einhielten, war die interindividuelle Variabilität der Phenolsäure-Konzentrationen in den Proben beträchtlich. Neben Unterschieden in Resorptionsvorgängen und Metabolismus dieser Substanzen, bedingt beispielsweise durch eine individuelle Mikroflora, spielt vermutlich auch die Komplexität der untersuchten Matrices eine wichtige Rolle. Insbesondere das Fäzeswassermodell wird in analytischen Studien wenig angewendet. Daten aus Untersuchungen zur Bindung der Polyphenole an Proteine bzw. feste Bestandteile in der Fäzesmatrix wären für eine Optimierung der Probengewinnung von Vorteil. Ferner könnten weitere Untersuchungen über die Aktivität bakterieller Enzyme in den Fäzesproben von Bedeutung sein, da diese entscheidend an der Biotransformation der Polyphenole im Kolon beteiligt sind. Auch hinsichtlich der Bioaktivität der konjugierten Metabolite sind mehr Informationen durch z. B. zellphysiologische Studien nötig, inwieweit durch die Konjugation der Polyphenole weitere Resorptionsmechanismen und die physiologische Wirkung beeinflusst werden.

Fehlende Wirkung auf anthropometrische Größen, Fettstoffwechselfparameter sowie Fäzes- und Fäzeswasserbiomarker weisen darauf hin, dass aufgrund des geringen Ballaststoffgehaltes des Apfelsaftes die entsprechenden Parameter nicht beeinflusst werden. Für zukünftige Interventionsstudien sollte hinsichtlich dieser Parameter ein Lebensmittel mit einem höheren Ballaststoffgehalt gewählt werden. Ballstoffe beeinflussen das Sättigungsgefühl, besitzen ein Quellungsvermögen im Darm und können die Aktivität und Zusammensetzung der Mikroflora verändern. Möglicherweise könnte unter Einsatz des in der Arbeit erwähnten Tresterextraktionssaftes die genannten Faktoren beeinflusst werden.

Die tendenzielle Reduktion von Insulin und HbA1c bei den Probanden der Apfelsaftgruppe ist ein viel versprechender Hinweis darauf, dass in den nachfolgenden Studien mit Adipösen und Typ 2-Diabetikern möglicherweise noch stärkere Effekte durch den polyphenolreichen Apfelsaft zu erwarten sind. Wegen fehlender Wirkung auf weitere Diabetes-, Adipositas- und Entzündungsmarker sollte für zukünftige Studien eine längere Interventionsdauer von acht bis zwölf Wochen in Betracht gezogen werden. Alternativ könnten in Anlehnung an die erwähnte Tresterextraktion weitere technologische Untersuchungen zur Anreicherung von

Polyphenolen im Apfelsaft unternommen werden, um den Gehalt an antiinflammatorischen und antidiabetischen Inhaltsstoffen zu erhöhen. Allerdings muss man bei einem gesunden Probandenkollektiv damit rechnen, dass Effekte auf Biomarker, die bereits im physiologischen Normalbereich liegen, gering sind.

Insgesamt sollte der geringe Einfluss der Apfelsaftintervention bei den Probanden nicht den Schluss zu lassen, dass für gesunde Menschen der Verzehr einer Ernährung reich an Obst und Gemüse unerheblich ist. Pflanzliche Nahrungsmittel versorgen den Organismus mit essentiellen Vitaminen und Mineralstoffen, sind zudem wasserreich und energiearm. Durch regelmäßigen Verzehr kann das Risiko für Zivilisationskrankheiten wie Übergewicht, Diabetes, Herz-Kreislaufkrankungen und Krebserkrankungen vermindert werden, zumal dadurch auch der Verzehr von kalorienreichen Nahrungsmitteln reduziert werden kann.

Diese Humaninterventionsstudie wurde im Rahmen eines BMBF-geförderten Netzwerkes durchgeführt, das die Untersuchung von Apfelsaftinhaltsstoffen in der Prävention von Darmkrankheiten zum Ziel hat. Weitere Humaninterventionsstudien werden noch an zwei Risikokollektiven, mit Übergewichtigen und Typ 2-Diabetikern, durchgeführt, wobei die Studie mit den gesunden Probanden als Referenz für die nachfolgenden Studien gilt. Aufgrund chronisch entzündlicher Prozesse, die mit Übergewicht und Typ 2-Diabetes einhergehen, sind einige der im Rahmen dieser Studie untersuchten Biomarker in ihrer Konzentration bei diesen Probanden erhöht, so dass potentiell präventive Effekte durch den Apfelsaftkonsum deutlich werden könnten.

## 5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen dar. Die meisten kolorektalen Tumore sind sporadisch, wobei Ernährungsfaktoren die Tumorentwicklung maßgeblich beeinflussen können. Ein hoher Obst- und Gemüseverzehr wird häufig mit einem erniedrigten kolorektalen Krebsrisiko in Verbindung gebracht. Krebsprotektive Wirkungen von Obst und Gemüse werden auf darin enthaltene Substanzen mit potenziell antiinflammatorischen, antidiabetischen und antikarzinogenen Eigenschaften wie Ballaststoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe, z.B. Polyphenole, zurückgeführt. Die protektiven Mechanismen von Polyphenolen sind derzeit unzureichend geklärt, insbesondere sind die Daten aus kontrollierten klinischen Studien limitiert.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen einer Humaninterventionsstudie mit einem polyphenolreichen Apfelsaft durch Analyse von Urin, Fäzeswasser und Plasma der Probanden Aufschluss über den Metabolismus von Apfelsaftpolyphenolen zu erhalten. Ferner wurde untersucht, ob durch den Apfelsaftkonsum verschiedene Biomarker, welche mit der Entstehung bzw. Prävention von kolorektalen Tumoren assoziiert werden, beeinflusst wurden. In der randomisierten, kontrollierten Interventionsstudie konsumierten 30 gesunde, männliche Probanden bei ansonsten polyphenolarmer Ernährung täglich 750 mL trüben Apfelsaftsaft (Apfelsaftgruppe) über einen Zeitraum von vier Wochen, eine zweite Gruppe mit 28 Probanden (Kontrollgruppe) konsumierte über den gleichen Zeitraum täglich 750 mL eines isokalorischen Kontrollgetränkes. Beiden Getränkeinterventionen ging eine einwöchige Depletionsphase mit polyphenolarmer Ernährung voraus. Am Ende jeder Studienphase wurde von den Probanden über 24 h Urin gesammelt, von einem kleineren Kollektiv (Apfelsaftgruppe n=12, Kontrollgruppe n=10) über 48 h Stuhlproben. Am Folgetag kamen alle Probanden nüchtern zur Blutabnahme und zur medizinischen Untersuchung, in welcher zusätzlich anthropometrische Parameter der Probanden erhoben wurden. Aus den Stuhlproben wurde Fäzeswasser gewonnen. Die Fäzeswasserkonzentrationen der wichtigsten kurzkettigen Fettsäuren wurden mittels GC erfasst. GC/MS-Analysen dienten zur Bestimmung der Konzentrationen intakter Apfelsaftpolyphenole sowie deren mikrobieller Metabolite, den Phenolsäuren, in Urin, Fäzeswasser und Plasma. Im Serum bzw. Plasma der Probanden wurden neben Fettstoffwechselfparametern auch verschiedene Diabetesmarker (Insulin, IGF-1, IGFBP-3, HbA1c), Adipositasmarker (Leptin, Adiponektin, Resistin) und Entzündungsmarker (TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, sICAM, sVCAM) bestimmt.

Nach vierwöchiger Apfelsaftintervention konnten charakteristische Apfelsaftpolyphenole wie Phloretin und Epicatechin im Urin und Fäzeswasser der Probanden nachgewiesen werden.

Die Konzentrationen mikrobieller Metabolite wie Ferulasäure, Vanillinsäure und 3,4-diOH-Phenylpropionsäure waren im Urin bzw. Fäzeswasser nach vierwöchiger Apfelsaftintervention signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Durch die enzymatische Hydrolyse der Glukuronide und Sulfate in den Proben wurde die Konzentration an freien Phenolsäuren deutlich gesteigert, was dafür spricht, dass eine gewisse Menge der Metabolite in Form ihrer Phase-II-Konjugate ausgeschieden wird. Durch den Apfelsaftkonsum wurden weder der pH-Wert, die zytotoxischen Eigenschaften noch die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren von Fäzeswasser moduliert. Die vierwöchige Apfelsaftintervention führte zu einer tendenziellen Reduktion von HbA1c ( $p = 0,08$ ) und Insulin ( $p = 0,11$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist möglicherweise auf die antidiabetischen Eigenschaften von Apfelsaftpolyphenolen zurückzuführen. Andere Diabetes-assoziierte Marker wurden durch den Apfelsaftkonsum jedoch nicht beeinflusst. Leptin erhöhte sich nach vierwöchiger Apfelsaftintervention signifikant ( $p < 0,05$ ). Da sich anthropometrische Daten wie der BMI und der prozentuale Körperfettanteil der Probanden durch die Saftintervention nicht erhöhten, kann der gesteigerte Leptinwert nicht durch eine Zunahme an Fettgewebe und damit bedingter gesteigerter Sezernierung assoziiert werden. Weitere Adipositas- und Entzündungsmarker wurden durch die Apfelsaftintervention nicht verändert.

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob eine vierwöchige Intervention mit einem trüben, polyphenolreichen Apfelsaft bei gesunden Probanden zu Änderungen von Biomarkern, die mit der Entwicklung bzw. Prävention von Dickdarmkrebs assoziiert sind, führt. Intakte Apfelsaftpolyphenole wurden in geringen Mengen mit dem Urin bzw. mit den Fäzes ausgeschieden. Die Konzentrationen einiger Polyphenolmetabolite in Urin und Fäzeswasser waren signifikant erhöht, was für den intensiven Metabolismus von Polyphenolen spricht. Die fehlenden Wirkungen auf Fäzeswasserparameter sowie anthropometrische Größen nach Apfelsaftintervention deuten darauf hin, dass für zukünftige Humaninterventionsstudien ein Lebensmittel mit einem höheren Ballaststoffgehalt in Betracht gezogen werden sollte, z.B. Tresterextraktionsaft. Die tendenzielle Reduktion der Insulin- und HbA1c-Konzentration durch den vierwöchigen Apfelsaftkonsum könnte ein viel versprechender Hinweis darauf sein, dass Biomarker, die mit Diabetes und Adipositas assoziiert sind, durch Apfelsaftkonsum moduliert werden können. Weitere Untersuchungen mit einem veränderten Studiendesign wie verlängerter Interventionszeit oder Verwendung eines Studiengetränkes mit einem höheren Polyphenolgehalt und/oder Ballaststoffgehalt könnten über eine Modulation dieser Biomarker Aufschluss geben.



## 6 Summary

Colorectal cancer is one of the most common types of cancer world-wide. Most of the colorectal tumours are sporadic, whereas diet may be significantly involved in cancer development. A high intake in fruits and vegetables is often associated with a reduced risk of colorectal cancer. Cancer protective effects of fruits and vegetables are attributed to ingredients with potentially anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-carcinogenic properties, such as fibre, vitamins and phytochemicals (e.g. polyphenols). The protective mechanisms of polyphenols are insufficiently clarified at present, especially data of controlled clinical trials are limited so far.

Aim of this human intervention study with a polyphenol-rich apple juice was to obtain information about metabolism of apple polyphenols by analysis of urine, fecal water and plasma. Furthermore, the influence of apple juice consumption on various biomarkers, associated with the development and prevention of colorectal cancer, was investigated. In the randomised controlled trial, 30 healthy male subjects on a diet low in polyphenols consumed 750 mL of cloudy apple juice (apple juice group) daily for a period of four weeks. A second group with 28 healthy subjects consumed 750 mL daily of an isocaloric control beverage over the same period (control group). Intervention was preceded by a one-week depletion phase with a diet low in polyphenols. At the end of each study period, subjects collected urine over a 24-hour period. Additionally, a subgroup (apple juice group n=12, control group n=10) collected stool samples over a 48-hour period at the end of each study phase. Taking of blood samples and further medical investigations of every participant followed after a 12 h fasting period, including measurement of anthropometric parameters. Fecal water was prepared of stool samples. Short chain fatty acids in fecal water were detected by GC. GC/MS-Analysis was used for quantification of entire apple juice polyphenols as well as of their microbial metabolites, phenolic acids, in urine, fecal water and plasma. Lipid profile and various parameters associated with diabetes (Insulin, IGF-1, IGFBP-3), adiposity (Leptin, Resistin, Adiponectin) and inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, sICAM, sVCAM) were assessed in serum and plasma samples.

After four-week apple juice consumption, characteristic apple juice polyphenols such as Phloretin and Epicatechin could be identified in urine and fecal water of the subjects. Concentrations of microbial metabolites such as ferulic acid, vanillic acid and 3,4-diOH-phenylpropionic acid were significantly increased after four-week apple juice intervention ( $p < 0,05$ ) in urine and fecal water, respectively. Enzymatic hydrolysis of the

samples induced high release of free phenolic acids out of their glucuronide and sulfate conjugation, indicating that a part of these metabolites was excreted as phase-II-conjugates. No change in pH, cytotoxic properties or in concentration of short chain fatty acids of fecal water was observed after apple juice consumption. Apple juice intervention tended to result in a slight reduction of HbA1c ( $p=0.08$ ) and insulin ( $p=0.11$ ) compared to the control group. This may be due to anti-diabetic properties of apple polyphenols like phloretin. However, other diabetes-associated parameters were not modulated by apple juice intervention. Leptin concentrations in plasma significantly increased after apple juice consumption ( $p<0.05$ ), but this was not accompanied by an increase in body fat mass. Other parameters involved in adiposity and inflammation were not affected by apple juice consumption.

This work should show whether a four-week intervention with a cloudy, polyphenol-rich apple juice could lead to changes in biomarkers associated with the development of diabetes and colorectal cancer in healthy volunteers. Entire apple juice polyphenols were excreted only in minor amounts in urine and feces. Concentrations of various polyphenol metabolites were significantly increased after apple juice consumption, indicating an intensive metabolism of polyphenols. As no effects on fecal water parameters and anthropometric data could be detected, for further human intervention studies a food with a higher content in dietary fibres could be considered, such as pomace extraction juice. Four-week apple juice consumption tended to result in reduction of insulin and HbA1c concentrations; this could be a promising advice that biomarkers associated with diabetes and obesity can be modulated. Further investigations with a modified study design such as an extended intervention period or using a study beverage with a higher content in polyphenols and/or fibre could give information about modulation of these biomarkers.

## 7 Literaturverzeichnis

### A

**Adenis,A.**, Peyrat,J.P., Hecquet,B., Delobelle,A., Depadt,G., Quandalle,P., Bonneterre,J., Demaille,A. (1995). Type I insulin-like growth factor receptors in human colorectal cancer. *Eur.J.Cancer* 31A, 50-55.

**Aggarwal,B.B.**, Shishodia,S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem.Pharmacol.* 71, 1397-1421.

**Aherne,S.A.**, O'Brien,N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81.

**Allinger,U.G.**, Johansson,G.K., Gustafsson,J.A., Rafter,J.J. (1989). Shift from a mixed to a lactovegetarian diet: influence on acidic lipids in fecal water--a potential risk factor for colon cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 50, 992-996.

**American** Diabetes Association (2008). <http://www.diabetes.org/pre-diabetes/pre-diabetes-symptoms.jsp>. 21. 02. 2008. Webseite aufgerufen am 21.02.2008.

**American** Gastroenterological Association medical position statement (2000). Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *American College of Gastroenterology. Gastroenterology* 118, 1235-1257.

**Aprikian,O.**, Busserolles,J., Manach,C., Mazur,A., Morand,C., Davicco,M., Besson,C., Rayssiguier,Y., Remesy,C., Demigne,C. (2001). Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr*, 72, 1969-1976.

**Aprikian,O.**, Levrat-Verny,M., Besson,C., Busserolles,J., Remesy,C., Demigne,C. (2001). Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chem*, 75, 445-452.

**Arita,Y.**, Kihara,S., Ouchi,N., Takahashi,M., Maeda,K., Miyagawa,J., Hotta,K., Shimomura,I., Nakamura,T., Miyaoka,K., Kuriyama,H., Nishida,M., Yamashita,S., Okubo,K., Matsubara,K., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Funahashi,T., Matsuzawa,Y. (1999).

Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257, 79-83.

**Arts,I.C., Hollman,P.C., Feskens,E.J., Bueno de Mesquita,H.B., Kromhout,D.** (2001). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 74, 227-232.

**Azuma,K., Ippoushi,K., Nakayama,M., Ito,H., Higashio,H., Terao,J.** (2000). Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J.Agric.Food Chem.* 48, 5496-5500.

## **B**

**Baba,S., Osakabe,N., Yasuda,A., Natsume,M., Takizawa,T., Nakamura,T., Terao,J.** (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic.Res.* 33, 635-641.

**Bantle,J.P., Raatz,S.K., Thomas,W., Georgopoulos,A.** (2000). Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* 72, 1128-1134.

**Bantle,J.P., Swanson,J.E., Thomas,W., Laine,D.C.** (1992). Metabolic effects of dietary fructose in diabetic subjects. *Diabetes Care* 15, 1468-1476.

**Barth,S.W., Fahndrich,C., Bub,A., Dietrich,H., Watzl,B., Will,F., Briviba,K., Rechkemmer,G.** (2005). Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 26, 1414-1421.

**Barth,S.W., Fahndrich,C., Bub,A., Dietrich,H., Watzl,B., Will,F., Briviba,K., Rechkemmer,G.** (2005). Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 26, 1414-1421.

**Benetou V., Orfanos P., Lagiou P., Trichopoulos D., Boffetta P., Trichopoulou A.** (2008). Vegetables and fruits in relation to cancer risk: evidence from the Greek EPIC cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17(2), 387-392.

- Blaut,M., Schoefer,L., Braune,A.** (2003). Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 73, 79-87.
- Bobé G., Sansbury L.B., Albert P.S., Cross A.J., Kahle L., Ashby J., Slattery M.L., Caan B., Paskett E., Iversen F., Kikendall J.W., Lance P., Daston C., Marshall J.R., Schatzkin A., Lanza E.** (2008). Dietary flavonoids and colorectal adenoma recurrence in the polyp prevention trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17(6), 1344-1353.
- Boersma,M.G., van der,W.H., Bogaards,J., Boeren,S., Vervoort,J., Cnubben,N.H., van Iersel,M.L., van Bladeren,P.J., Rietjens,I.M.** (2002). Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem.Res.Toxicol.* 15, 662-670.
- Bokarewa,M., Nagaev,I., Dahlberg,L., Smith,U., Tarkowski,A.** (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J.Immunol.* 174, 5789-5795.
- Bonina,F.P., Leotta,C., Scalia,G., Puglia,C., Trombetta,D., Tringali,G., Roccazzello,A.M., Rapisarda,P., Saija,A.** (2002). Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutr.Metab* 15, 14-19.
- Borst,S.E., Conover C.F.** (2005). High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life Sci* 9, 2156-2165.
- Bourne,L.C., Rice-Evans,C.** (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 253, 222-227.
- Boyer,J., Liu,R.H.** (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr.J.* 3, 5.
- Bravo,L., Abia,R., Eastwood,M.A., Saura-Calixto,F.** (1994). Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *Br.J.Nutr.* 71, 933-946.
- Briviba,K., Stracke,B.A., Rufer,C.E., Watzl,B., Weibel,F.P., Bub,A.** (2007). Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *J.Agric.Food Chem.* 55, 7716-7721.
- Bruce,W.R., Wolever,T.M., Giacca,A.** (2000). Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr.Cancer* 37, 19-26.
- Burkitt, D.P.** (1971). Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 28, 3-13.

**C**

**Castiglia-Delavaud,C.**, Verdier,E., Besle,J.M., Vernet,J., Boirie,Y., Beaufriere,B., De,B.R., Vermorel,M. (1998). Net energy value of non-starch polysaccharide isolates (sugarbeet fibre and commercial inulin) and their impact on nutrient digestive utilization in healthy human subjects. *Br.J.Nutr.* 80, 343-352.

**Chang,S.**, Wu,X., Yu,H., Spitz,M.R. (2002). Plasma concentrations of insulin-like growth factors among healthy adult men and postmenopausal women: associations with body composition, lifestyle, and reproductive factors. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11, 758-766.

**Chesson,A.**, Provan,G.J., Russell,W.R., Scobbie,L., Richardson,A.J., Stewart,C. (1999). Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J Sci Food Agric* 79, 373-378.

**Clifford,M.N.** (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 79, 362-372.

**Clifford,M.N.**, Copeland,E.L., Bloxside,J.P., Mitchell,L.A. (2000). Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica* 30, 317-326.

**Conceicao de,O.M.**, Sichieri,R., Sanchez,M.A. (2003). Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. *Nutrition* 19, 253-256.

**Cooper-Driver,G.A.** (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56, 229-236.

**Coughlin,S.S.**, Calle,E.E., Teras,L.R., Petrelli,J., Thun,M.J. (2004). Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am.J.Epidemiol.* 159, 1160-1167.

**Cowey,S.**, Hardy,R.W. (2006). The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol.* 169, 1505-1522.

**Crespy,V.**, Aprikian,O., Morand,C., Besson,C., Manach,C., Demigne,C., Remesy,C. (2001). Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J.Nutr.* 131, 3227-3230.

**Cummings**,J.H., Bingham,S.A., Heaton,K.W., Eastwood,M.A. (1992). Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103, 1783-1789.

**Cummings**,J.H., Pomare,E.W., Branch,W.J., Naylor,C.P., Macfarlane,G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227.

**Cummings**,J. (1996). The large intestine in nutrition and disease. Faculty of medicine and MRC Dunn Clinical Nutrition Centre, Cambridge.

## D

**Danjo** K., Sakamoto J., Iwane S., Tamura K., Nakaji S., Fukuda S., Murakami H., Shimoyama T., Takahashi I., Umeda T. (2008). Effects of cellulose supplementation on fecal consistency and fecal weight. *Dig Dis Sci* 53(3), 712-718.

**Dalton**,M., Cameron,A.J., Zimmet,P.Z., Shaw,J.E., Jolley,D., Dunstan,D.W., Welborn,T.A. (2003). Waist circumference, waist-hip ratio and body mass index and their correlation with cardiovascular disease risk factors in Australian adults. *J.Intern.Med.* 254, 555-563.

**Day**,A.J., DuPont,M.S., Ridley,S., Rhodes,M., Rhodes,M.J., Morgan,M.R., Williamson,G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 436, 71-75.

**Day**,A.J., Mellon,F., Barron,D., Sarrazin,G., Morgan,M.R., Williamson,G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic.Res.* 35, 941-952.

**Decorde**,K., Teissedre,P.L., Auger,C., Cristol,J.P., Rouanet,J.M. (2008). Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. *Mol.Nutr.Food Res.*

**DeOliviera**,M., Sichieri,R., Moura,A. (2003). Weight loss associated with a daily intake of three apples or three pears among overweight women. *Nutrition*, 19, 253-256.

**Deutsche** Gesellschaft für Ernährung: <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=262>. Webseite aufgerufen am: 20.05.2008. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn.

**Deutsche** Gesellschaft für Ernährung (Hrsg.) (2004): Ernährungsbericht 2004. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn.

**Deutsche** Gesellschaft für Ernährung: <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=477>. Webseite aufgerufen am 21.02.2008. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn.

**Deutsche** Gesellschaft für Ernährung: <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=764>. Webseite aufgerufen am: 20.05.2008. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn.

**Diamant**,M., Lamb,H.J., van de Ree,M.A., Endert,E.L., Groeneveld,Y., Bots,M.L., Kostense,P.J., Radder,J.K. (2005). The association between abdominal visceral fat and carotid stiffness is mediated by circulating inflammatory markers in uncomplicated type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 90, 1495-1501.

**Dietrich**,H., Peceroni,S., Gierschner,K., Zimmer,E., Will,F. (1996). Neue Erkenntnisse zu den Phänomenen der Trübungsstabilität. Erste Ergebnisse aus dem laufenden Forschungsprogramm. *Flüssiges Obst*, 63, 7-10.

**Dimitrakoudis**,D., Vranic,M., Klip,A. (1992). Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *J.Am.Soc.Nephrol.* 3, 1078-1091.

**Donovan**,J.L., Kasim-Karakas,S., German,J.B., Waterhouse,A.L. (2002). Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *Br.J.Nutr.* 87, 31-37.

**Duclos**,V.,; Aprikian,O., Guyot,S., Besson,C.; Manach,C., Bernalier,A., Morand,C., Remesy,C., Demigne,C. (2003). Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J Nutr*, 133, 1860-1865.

**DuPont**,M.S., Bennett,R.N., Mellon,F.A., Williamson,G. (2002). Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *J.Nutr.* 132, 172-175.



**E**

**Eberhardt**,M.V., Lee,C.Y., Liu,R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903-904.

**Eisenbrand**,G., Metzler,M. (2002). *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Wiley-VCH, 2. aktualisierte Auflage.

**Erlinger**,T.P., Platz,E.A., Rifai,N., Helzlsouer,K.J. (2004). C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA* 291, 585-590.

**Erlund**,I., Silaste,M.L., Alfthan,G., Rantala,M., Kesaniemi,Y.A., Aro,A. (2002). Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur.J.Clin.Nutr.* 56, 891-898.

**Estruch**,R., Sacanella,E., Badia,E., Antunez,E., Nicolas,J.M., Fernandez-Sola,J., Rotilio,D., de,G.G., Rubin,E., Urbano-Marquez,A. (2004). Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. *Effects of wine on inflammatory markers. Atherosclerosis* 175, 117-123.

**F**

**Faeh**,D., Minehira,K., Schwarz,J.M., Periasamy,R., Park,S., Tappy,L. (2005). Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* 54, 1907-1913.

**Fasshauer**,M., Paschke,R. (2003). Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46, 1594-1603.

**Fearon**,E.R., Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

**Fehmann**,H.C., Heyn,J. (2002). Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm.Metab Res.* 34, 671-673.

**Fenster,C.P.**, Weinsier,R.L., rley-Usmar,V.M., Patel,R.P. (2002). Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes.Res.* *10*, 964-968.

**Feskanich,D.**, Ziegler,R.G., Michaud,D.S., Giovannucci,E.L., Speizer,F.E., Willett,W.C., Colditz,G.A. (2000). Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J.Natl.Cancer Inst.* *92*, 1812-1823.

**Filipovsky,J.**, Ducimetiere,P., Darne,B., Richard,J.L. (1993). Abdominal body mass distribution and elevated blood pressure are associated with increased risk of death from cardiovascular diseases and cancer in middle-aged men. The results of a 15- to 20-year follow-up in the Paris prospective study I. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* *17*, 197-203.

**Frederich R.C.**, Hamann A., Anderson S., Löllmann B., Lowell B.B., Flier J.S (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine* *1*, 1311 - 1314.

**Frystyk,J.** (2004). Free insulin-like growth factors measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. *Growth Horm.IGF.Res.* *14*, 337-375.

## G

**Gamet,L.**, Daviaud,D., is-Pouxviel,C., Remesy,C., Murat,J.C. (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int.J.Cancer* *52*, 286-289.

**Garsetti,M.**, Pellegrini,N., Baggio,C., Brighenti,F. (2000). Antioxidant activity in human faeces. *Br.J.Nutr.* *84*, 705-710.

**Gazzaniga,J.M.**, Lupton,J.R. (1987). Dilution effect of dietary fiber sources: An in vivo study in the rat. *Nutr.Res.* *7*, 1261-1268.

**Gee,J.M.**, DuPont,M.S., Day,A.J., Plumb,G.W., Williamson,G., Johnson,I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J.Nutr.* *130*, 2765-2771.

**Gee,J.M.**, DuPont,M.S., Rhodes,M.J., Johnson,I.T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic.Biol.Med.* *25*, 19-25.

**Gerhaeuser,C.** (2001). Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel Ernaehr Med* 26, 137-143.

**Gesellschaft** der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.) (2006). Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut, Saarbrücken.

**Gibson,G.R., Beatty,E.R., Wang,X., Cummings,J.H.** (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108, 975-982.

**Gill,C.I., Rowland,I.R.** (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *Br.J.Nutr.* 88 *Suppl 1*, S73-S87.

**Giovannucci,E.** (2001). Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J.Nutr.* 131, 3109S-3120S.

**Giovannucci,E., Ascherio,A., Rimm,E.B., Colditz,G.A., Stampfer,M.J., Willett,W.C.** (1995). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann.Intern.Med.* 122, 327-334.

**Glinghammar,B., Venturi,M., Rowland,I.R., Rafter,J.J.** (1997). Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet: influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water--potential risk factors for colon cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 66, 1277-1282.

**Goldstein,D.S., Eisenhofer,G., Kopin,I.J.** (2003). Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 305, 800-811.

**Gonthier,M.P., Cheynier,V., Donovan,J.L., Manach,C., Morand,C., Mila,I., Lapiere,C., Remesy,C., Scalbert,A.** (2003). Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J.Nutr.* 133, 461-467.

**Govers,M.J., Termont,D.S., Lapre,J.A., Kleibeuker,J.H., Vonk,R.J., Van der,M.R.** (1996). Calcium in milk products precipitates intestinal fatty acids and secondary bile acids and thus inhibits colonic cytotoxicity in humans. *Cancer Res.* 56, 3270-3275.

**Granada,M.L., Murillo,J., Lucas,A., Salinas,I., Llopis,M.A., Castells,I., Foz,M., Sanmarti,A.** (2000). Diagnostic efficiency of serum IGF-1, IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), IGF-

1/IGFBP-3 molar ratio and urinary GH measurements in the diagnosis of adult GH deficiency: importance of an appropriate reference population. *Eur.J.Endocrin.* 142, 243-253.

**Graefe,E.U., Wittig,J., Mueller,S., Riethling,A.K., Uehleke,B., Drewelow,B., Pforte,H., Jacobasch,G., Derendorf,H., Veit,M.** (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J.Clin.Pharmacol.* 41, 492-499.

**Gryfe,R., Swallow,C., Bapat,B., Redston,M., Gallinger,S., Couture,J.** (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr.Probl.Cancer* 21, 233-300.

**Guyot,S., Marnet,N., Sanoner,P., Drilleau,J.F.** (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J.Agric.Food Chem.* 51, 6240-6247.

## H

**Haffner,S.M., Stern,M.P., Mitchell,B.D., Hazuda,H.P., Patterson,J.K.** (1990). Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes* 39, 283-288.

**Hague,A., Paraskeva,C.** (1995). The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur.J.Cancer Prev.* 4, 359-364.

**Heilbronn,L.K., Rood,J., Janderova,L., Albu,J.B., Kelley,D.E., Ravussin,E., Smith,S.R.** (2004). Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89, 1844-1848.

**Herrmann,K.** (1973). Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. I. Bisherige Kenntnisse über Vorkommen, Gehalte sowie Veränderungen während des Fruchtwachstums. *Lebens. Unters. Forsch.* 151, 41-51.

**Hermann,K.** (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* 11, 433-448.

**Hermann,K.** (2001): Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse. Verlag Eugen Ulmer.

**Hertog,M.G.**, Feskens,E.J., Hollman,P.C., Katan,M.B., Kromhout,D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.

**Hillman,L.**, Peters,S., Fisher,A., Pomare,E.W. (1983). Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *British Journal of Nutrition*, 50, 189-195.

**Hollman,P.C.**, de Vries,J.H., van Leeuwen,S.D., Mengelers,M.J., Katan,M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am.J.Clin.Nutr.* 62, 1276-1282.

**Hollman,P.C.**, van Trijp,J.M., Buysman,M.N., van der Gaag,M.S., Mengelers,M.J., de Vries,J.H., Katan,M.B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 418, 152-156.

**Holt,R.R.**, Lazarus,S.A., Sullards,M.C., Zhu,Q.Y., Schramm,D.D., Hammerstone,J.F., Fraga,C.G., Schmitz,H.H., Keen,C.L. (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am.J.Clin.Nutr.* 76, 798-804.

**Hotamisligil,G.S.**, Shargill,N.S., Spiegelman,B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.

**Hotamisligil,G.S.**, Peraldi,P., Budavari,A., Ellis,R., White,M.F., Spiegelman,B.M. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.

**Hotta,K.**, Funahashi,T., Bodkin,N.L., Ortmeier,H.K., Arita,Y., Hansen,B.C., Matsuzawa,Y. (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50, 1126-1133.

**Hotta,K.**, Funahashi,T., Arita,Y., Takahashi,M., Matsuda,M., Okamoto,Y., Iwahashi,H., Kuriyama,H., Ouchi,N., Maeda,K., Nishida,M., Kihara,S., Sakai,N., Nakajima,T., Hasegawa,K., Muraguchi,M., Ohmoto,Y., Nakamura,T., Yamashita,S., Hanafusa,T., Matsuzawa,Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20, 1595-1599.

**Huber,R.**, Nauck,M., Ludtke,R., Scharnagl,H. (2003). Effects of one week juice fasting on lipid metabolism: a cohort study in healthy subjects. *Forsch.Komplementarmed.Klass.Naturheilkd.* 10, 7-10.

**Hyson,D.**, Studebaker-Hallmann,D., Davis,P., Gershwin,E. (2000). Apple Juice Consumption reduces plasma low-density Lipoprotein oxidation in healthy men and women. *Journal of medicinal food*, 3, 159-166.

## I

**Ikumi,Y.**, Kida,T., Sakuma,S., Yamashita,S., Akashi,M. (2008). Polymer-phloridzin conjugates as an anti-diabetic drug that inhibits glucose absorption through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) in the small intestine. *J.Control Release* 125, 42-49.

**Ito,H.**, Gonthier,M.P., Manach,C., Morand,C., Mennen,L., Remesy,C., Scalbert,A. (2005). Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br.J.Nutr.* 94, 500-509.

## J

**Jaganath,I.B.**, Mullen,W., Edwards,C.A., Crozier,A. (2006). The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic.Res.* 40, 1035-1046.

**James,P.T.**, Leach,R., Kalamara,E., Shayeghi,M. (2001). The worldwide obesity epidemic. *Obesity Researc.* 9, 228-233

**Jenner,A.M.**, Rafter,J., Halliwell,B. (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic.Biol.Med.* 38, 763-772.

**Justesen,U.**, Arrigoni,E. (2001). Electrospray ionisation mass spectrometric study of degradation products of quercetin, quercetin-3-glucoside and quercetin-3-rhamnoglucoside, produced by in vitro fermentation with human faecal flora. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 15, 477-483.

**K**

**Kahle,K.**, Huemmer,W., Kempf,M., Scheppach,W., Erk,T., Richling,E. (2007). Polyphenols Are Intensively Metabolized in the Human Gastrointestinal Tract after Apple Juice Consumption. *J.Agric.Food Chem.*

**Kahle,K.**, Kraus,M., Richling,E. (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Mol.Nutr.Food Res.* 49, 797-806.

**Kahle,K.**, Kraus,M., Scheppach,W., Richling,E. (2005). Colonic availability of apple polyphenols--a study in ileostomy subjects. *Mol.Nutr.Food Res.* 49, 1143-1150.

**Kanaya,A.M.**, Wassel,F.C., Vittinghoff,E., Harris,T.B., Park,S.W., Goodpaster,B.H., Tylavsky,F., Cummings,S.R. (2006). Adipocytokines and incident diabetes mellitus in older adults: the independent effect of plasminogen activator inhibitor 1. *Arch.Intern.Med.* 166, 350-356.

**Kanety,H.**, Feinstein,R., Papa,M.Z., Hemi,R., Karasik,A. (1995). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J.Biol.Chem.* 270, 23780-23784.

**Karin,M.** (2006). NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog.* 45, 355-361.

**Karlsson,P.C.**, Huss,U., Jenner,A., Halliwell,B., Bohlin,L., Rafter,J.J. (2005). Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. *J.Nutr.* 135, 2343-2349.

**Karlsson,P.** (2005). Biomarkers for colon cancer: Applications in human and rat studies. From the Department of Medical Nutrition, Karolinska Insitute, Stockholm, Sweden. 1-56.

**Keaney,J.F.**, Jr., Larson,M.G., Vasan,R.S., Wilson,P.W., Lipinska,I., Corey,D., Massaro,J.M., Sutherland,P., Vita,J.A., Benjamin,E.J. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23, 434-439.

**Keenoy,B.**, Vertommen,J., De,L., I (1999). The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr.Metab* 12, 256-263.

**Keller,P., Streker,P., Arnold,G., Schieber,A. Carle,R.** (2001). Bestimmung phenolischer Verbindungen in Tafel- und Mostäpfeln mittels HPLC. *Flüssiges Obst*, 68, 480-483.

**Kern,M., Pahlke,G., Balavenkatraman,K.K., Bohmer,F.D., Marko,D.** (2007). Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J.Agric.Food Chem.* 55, 4999-5006.

**Knekt,P., Jarvinen,R., Reunanen,A., Maatela,J.** (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312, 478-481.

**Knekt,P., Jarvinen,R., Seppanen,R., Hellovaara,M., Teppo,L., Pukkala,E., Aromaa,A.** (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am.J.Epidemiol.* 146, 223-230.

**Knekt,P., Kumpulainen,J., Jarvinen,R., Rissanen,H., Heliovaara,M., Reunanen,A., Hakulinen,T., Aromaa,A.** (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am.J.Clin.Nutr.* 76, 560-568.

**Koenuma,M., Yamori,T., Tsuruo,T.** (1989). Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate proliferation of metastatic variants of colon carcinoma 26. *Jpn.J.Cancer Res.* 80, 51-58.

**Konishi,Y., Kobayashi,S.** (2004). Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 52, 2518-2526.

**Konishi,Y., Shimizu,M.** (2003). Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67, 856-862.

**Koohestani,N., Tran,T.T., Lee,W., Wolever,T.M., Bruce,W.R.** (1997). Insulin resistance and promotion of aberrant crypt foci in the colons of rats on a high-fat diet. *Nutr.Cancer* 29, 69-76.

**Kottra,G., Daniel,H.** (2007). Flavonoid glycosides are not transported by the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 322, 829-835.

**Kowalska,I.** (2007). Role of adipose tissue in the development of vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. Article in Press.



**Kris-Etherton**,P.M., Hecker,K.D., Bonanome,A., Coval,S.M., Binkoski,A.E., Hilpert,K.F., Griel,A.E., Etherton,T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am.J.Med.* 113 *Suppl 9B*, 71S-88S.

**Kühn**,A. (2004). Pektine in der Ernährung. *Ernährung & Medizin* 1, 1-5.

**Kuhnau**,J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev.Nutr.Diet.* 24, 117-191.

**Kuhnle**,G., Spencer,J.P., Schroeter,H., Shenoy,B., Debnam,E.S., Srail,S.K., Rice-Evans,C., Hahn,U. (2000). Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 277, 507-512.

## L

**Lakenbrink**,C., Lapczynski,S., Maiwald,B., Engelhardt,U.H. (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J.Agric.Food Chem.* 48, 2848-2852.

**Landestelle** für landwirtschaftliche Marktkunde: [http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1164369\\_11/index.html](http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1164369_11/index.html); Webseite aufgerufen am 16.01.2008.

**Larsson**,S.C., Orsini,N., Wolk,A. (2005). Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J.Natl.Cancer Inst.* 97, 1679-1687.

**Le**,K.A., Tappy,L. (2006). Metabolic effects of fructose. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 9, 469-475.

**Lee**,M.J., Wang,Z.Y., Li,H., Chen,L., Sun,Y., Gobbo,S., Balentine,D.A., Yang,C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 4, 393-399.

**Le**,M.L., Murphy,S.P., Hankin,J.H., Wilkens,L.R., Kolonel,L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 154-160.

- Lea, A.G.** (1978). The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. *J.Sci.Food Agric.* *29*, 471-477.
- Lea, A.** (1984). Farb- und Gerbstoffe in englischen Mostäpfeln. *Flüss. Obst*, *51*, 356-361.
- Lee, H.C., Jenner, A.M., Low, C.S., Lee, Y.K.** (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res.Microbiol.* *157*, 876-884.
- Lee, S., Bacha, F., Gungor, N., Arslanian, S.** (2008). Comparison of different definitions of pediatric metabolic syndrome: relation to abdominal adiposity, insulin resistance, adiponectin, and inflammatory biomarkers. *J Pediatr.* *152*, 177-184.
- Leinonen, E., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., Hulten, L.M., Hiukka, A., Taskinen, M.R.** (2003). Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* *166*, 387-394.
- Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Ciz, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y., Jung, S., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O.** (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches, and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J Nutr Biochem*, *13*, 603-610.
- Limburg, P.J., Anderson, K.E., Johnson, T.W., Jacobs, D.R., Jr., Lazovich, D., Hong, C.P., Nicodemus, K.K., Folsom, A.R.** (2005). Diabetes mellitus and subsite-specific colorectal cancer risks in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* *14*, 133-137.
- Lin, J.K., Lin-Shiau, S.Y.** (2006). Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol.Nutr.Food Res.* *50*, 211-217.
- Lindsay, R.S., Funahashi, T., Hanson, R.L., Matsuzawa, Y., Tanaka, S., Tataranni, P.A., Knowler, W.C., Krakoff, J.** (2002). Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* *360*, 57-58.
- Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G.** (1997). [Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. *Z.Ernahrungswiss.* *36*, 403-412.

**Liu,H.S.**, Chen,Y.H., Hung,P.F., Kao,Y.H. (2006). Inhibitory effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 290, E273-E281.

**Lostao,M.P.**, Hirayama,B.A., Loo,D.D., Wright,E.M. (1994). Phenylglucosides and the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions. *J.Membr.Biol.* 142, 161-170.

**Lu,H.L.**, Wang,H.W., Wen,Y., Zhang,M.X., Lin,H.H. (2006). Roles of adipocyte derived hormone adiponectin and resistin in insulin resistance of type 2 diabetes. *World J.Gastroenterol.* 12, 1747-1751.

**Lynch,H.T.**, Lynch,J.F. (1998). Genetics of colonic cancer. *Digestion* 59, 481-492.

## M

**MacFarlane,G.**, Gibson,G., Cummings,J. (1995). Metabolic significance of the gut microflora. *Gastrointestinal and oesophageal pathology, 2<sup>nd</sup> Edition*, 138-160.

**Manach,C.**, Donovan,J.L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic.Res.* 38, 771-785.

**Manach,C.**, Scalbert,A., Morand,C., Remesy,C., Jimenez,L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.* 79, 727-747.

**Manach,C.**, Williamson,G., Morand,C., Scalbert,A., Remesy,C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am.J.Clin.Nutr.* 81, 230S-242S.

**Matern,U.**, Grimmig,B. (1993). Polyphenols in plant pathology. *Polyphenolic Phenomena*, INRA Editions, Paris, 143-147.

**Matsui,T.**, Ueda,T., Oki,T., Sugita,K., Terahara,N., Matsumoto,K. (2001). alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J.Agric.Food Chem.* 49, 1952-1956.

- Mehrländer, K., Will, F., Dietrich, H., Sembries, S., Dongowski, G. (2003).** Anreicherung von wertgebenden Pflanzeninhaltsstoffen in Getränken durch enzymatische Tresterextraktion von Obst und Gemüse. *Lebensmittelchemie* 57, 32.
- Mennen, L.I., Sapinho, D., Ito, H., Bertrais, S., Galan, P., Herberg, S., Scalbert, A. (2006).** Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. *Br.J.Nutr.* 96, 191-198.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S., Coppack, S.W. (1997).** Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, 4196-4200.
- Monge, P., Solheim, E., Scheline, R.R. (1984).** Dihydrochalcone metabolism in the rat: phloretin. *Xenobiotica* 14, 917-924.
- Moon, J.H., Tsushida, T., Nakahara, K., Terao, J. (2001).** Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic.Biol.Med.* 30, 1274-1285.
- Moridani, M.Y., O'Brien, P.J. (2001).** Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers(1). *Biochem.Pharmacol.* 62, 1579-1585.
- Muir, J.G., Walker, K.Z., Kaimakamis, M.A., Cameron, M.A., Govers, M.J., Lu, Z.X., Young, G.P., O'Dea, K. (1998).** Modulation of fecal markers relevant to colon cancer risk: a high-starch Chinese diet did not generate expected beneficial changes relative to a Western-type diet. *Am.J.Clin.Nutr.* 68, 372-379.
- Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A. (2006).** Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br.J.Nutr.* 96, 107-116.
- Murakami, K., Sasaki, S., Takahashi, Y., Uenishi, K., Yamasaki, M., Hayabuchi, H., Goda, T., Oka, J., Baba, K., Ohki, K., Watanabe, K., Sugiyama, Y. (2007).** Nutrient and food intake in relation to serum leptin concentration among young Japanese women. *Nutr.* 23, 462-468.

## N

- Nagasako-Akazome, Y.**, Kanda, T., Ikeda, M., Shimasaki, H. (2005). Serum Cholesterol-Lowering Effect of Apple Polyphenols in Healthy Subjects. *Journal of Oleo Science*, 54, 143-151.
- Nagengast, F.M.**, Grubben, M.J. (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur.J.Cancer* 31A, 1067-1070.
- Naismith, D.J.**, Akinyanju, P.A., Szanto, S., Yudkin, J. (1970). The effect, in volunteers, of coffee and decaffeinated coffee on blood glucose, insulin, plasma lipids and some factors involved in blood clotting. *Nutr.Metab* 12, 144-151.
- Nam, N.H.** (2006). Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini.Rev.Med.Chem.* 6, 945-951.
- Narayan, S.**, Roy, D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol.Cancer* 2, 41.
- Nardini, M.**, Natella, F., Scaccini, C., Ghiselli, A. (2006). Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J.Nutr.Biochem.* 17, 14-22.
- Natsume, M.**, Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T., Terao, J. (2003). Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic.Biol.Med.* 34, 840-849.
- Newmark, H.L.**, Lupton, J.R. (1990). Determinants and consequences of colonic luminal pH: implications for colon cancer. *Nutr.Cancer* 14, 161-173.
- Nishida, M.**, Moriyama, T., Sugita, Y., Yamauchi-Takahara, K. (2007). Abdominal obesity exhibits distinct effect on inflammatory network in apparently healthy Japanese men. *Cardiovasc.Diabetol.* 6, 27.
- Noroozi, M.**, Burns, J., Crozier, A., Kelly, I.E., Lean, M.E. (2000). Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur.J.Clin.Nutr.* 54, 143-149.

**O**

**Ofei,F.**, Hurel,S., Newkirk,J., Sopwith,M., Taylor,R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881-885.

**Olthof,M.R.**, Hollman,P.C., Katan,M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J.Nutr.* 131, 66-71.

**Olthof,M.R.**, Hollman,P.C., Vree,T.B., Katan,M.B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J.Nutr.* 130, 1200-1203.

**Osswald,K.**, Becker,T.W., Grimm,M., Jahreis,G., Pool-Zobel,B.L. (2000). Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat.Res.* 472, 59-70.

**P**

**Panayotova-Heiermann,M.**, Loo,D.D., Wright,E.M. (1995). Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J.Biol.Chem.* 270, 27099-27105.

**Papayianni,A.**, Alexopoulos,E., Giamalis,P., Gionanlis,L., Belechri,A.M., Koukoudis,P., Memmos,D. (2002). Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrol.Dial.Transplant.* 17, 435-441.

**Pedersen,M.**, Bruunsgaard,H., Weis,N., Hendel,H.W., Andreassen,B.U., Eldrup,E., Dela,F., Pedersen,B.K. (2003). Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech.Ageing Dev.* 124, 495-502.

**Pietta,P.G.** (2000). Flavonoids as antioxidants. *J.Nat.Prod.* 63, 1035-1042.

**Pischon,T.**, Lahmann,P.H., Boeing,H., Friedenreich,C., Norat,T., Tjonneland,A., Halkjaer,J., Overvad,K., Clavel-Chapelon,F., Boutron-Ruault,M.C., Guerneq,G., Bergmann,M.M., Linseisen,J., Becker,N., Trichopoulou,A., Trichopoulos,D., Sieri,S., Palli,D., Tumino,R.,

Vineis,P., Panico,S., Peeters,P.H., Bueno-de-Mesquita,H.B., Boshuizen,H.C., Van,G.B., Palmqvist,R., Berglund,G., Gonzalez,C.A., Dorronsoro,M., Barricarte,A., Navarro,C., Martinez,C., Quiros,J.R., Roddam,A., Allen,N., Bingham,S., Khaw,K.T., Ferrari,P., Kaaks,R., Slimani,N., Riboli,E. (2006). Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J.Natl.Cancer Inst.* 98, 920-931.

**Poppitt,S.D.**, Keogh,G.F., Lithander,F.E., Wang,Y., Mulvey,T.B., Chan,Y.K., McArdle,B.H., Cooper,G.J. (2008). Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutrition*.

## R

**Rafter,J.J.**, Child,P., Anderson,A.M., Alder,R., Eng,V., Bruce,W.R. (1987). Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *Am.J.Clin.Nutr.* 45, 559-563.

**Rayet,B.**, Gelinas,C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.

**Rechner,A.** (2000): Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und die antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften. Dissertation Universität Gießen.

**Rechner,A.R.**, Spencer,J.P., Kuhnle,G., Hahn,U., Rice-Evans,C.A. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic.Biol.Med.* 30, 1213-1222.

**Rechner,A.R.**, Pannala,A.S., Rice-Evans,C.A. (2001). Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo. *Free Radic.Res.* 35, 195-202.

**Reilly,M.P.**, Lehrke,M., Wolfe,M.L., Rohatgi,A., Lazar,M.A., Rader,D.J. (2005). Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111, 932-939.

**Rehner,G.**, Daniel,H. (2002). *Biochemie der Ernährung*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.

**Reuter,P.** (2006): *Springer Lexikon Diagnose & Therapie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

**Rios,L.Y.**, Bennett,R.N., Lazarus,S.A., Remesy,C., Scalbert,A., Williamson,G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 76, 1106-1110.

**Rios,L.Y., Gonthier,M.P., Remesy,C., Mila,I., Lapierre,C., Lazarus,S.A., Williamson,G., Scalbert,A.** (2003). Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* 77, 912-918.

**Robert Koch-Institut (Hrsg)** (2006): Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Diabetes Mellitus. Robert Koch-Institut und das statistische Bundesamt, Berlin.

**Roberts,S.B.** (2000). High-glycemic index foods, hunger, and obesity: is there a connection? *Nutr.Rev.* 58, 163-169.

**Rohlfing,C.L., Wiedmeyer,H.M., Little,R.R., England,J.D., Tennill,A., Goldstein,D.E.** (2002). Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 25, 275-278.

**Ryan,A.S., Elahi,D.** (1996). The effect of acute hyperglycemia and hyperinulinemia on plasma leptin levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81, 4433-4438.

## S

**Sandler,R.S.** (1996). Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 25, 717-735.

**Sano,A., Yamakoshi,J., Tokutake,S., Tobe,K., Kubota,Y., Kikuchi,M.** (2003). Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 67, 1140-1143.

**Scalbert,A., Manach,C., Morand,C., Remesy,C., Jimenez,L.** (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* 45, 287-306.

**Scalbert,A., Williamson,G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J.Nutr.* 130, 2073S-2085S.

**Schaefer,S., Baum,M., Eisenbrand,G., Dietrich,H., Will,F., Janzowski,C.** (2006). Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 2006 Jan;50(1):24-33.



**Scheppach,W.**, Bartram,P., Richter,A., Richter,F., Liepold,H., Dusel,G., Hofstetter,G., Ruthlein,J., Kasper,H. (1992). Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 16, 43-48.

**Schnäbele,K.** (2005). Einfluss von Karotten- und Tomatensaftkonsum auf Colon-carcinogenese-relevante Faecesmarker beim Menschen. Dissertation, veröffentlicht an der Universität Hohenheim.

**Schnäbele,K.**, Briviba,K., Bub,A., Roser,S., Pool-Zobel,B.L., Rechkemmer,G (2008). Effects of carrot and tomato juice consumption on faecal markers relevant to colon carcinogenesis in humans. *Br J Nutr.* 99, 606-13.

**Sembries,S.**, Dongowski,G., Mehrlander,K., Will,F., Dietrich,H. (2006). Physiological effects of extraction juices from apple, grape, and red beet pomaces in rats. *J.Agric.Food Chem.* 54, 10269-10280.

**Sesso,H.D.**, Gaziano,J.M., Liu,S., Buring,J.E. (2003). Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am.J.Clin.Nutr.* 77, 1400-1408.

**Shimada,K.**, Kawarabayashi,T., Tanaka,A., Fukuda,D., Nakamura,Y., Yoshiyama,M., Takeuchi,K., Sawaki,T., Hosoda,K., Yoshikawa,J. (2004). Oolong tea increases plasma adiponectin levels and low-density lipoprotein particle size in patients with coronary artery disease. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 65, 227-234.

**Shoji,T.**, Masumoto,S., Moriichi,N., Akiyama,H., Kanda,T., Ohtake,Y., Goda,Y. (2006). Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J.Agric.Food Chem.* 54, 884-892.

Slavin J.L. (2005). Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21, 411-418.

**Sluis,A.A.**, Dekker,M., Jongen,W.M.F. (1997). Flavonoids as bioactive components in apple products. *Cancer Lett*, 14, 107-108.

**Song,J.**, Kwon,O., Chen,S., Daruwala,R., Eck,P., Park,J.B., Levine,M. (2002). Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. *J.Biol.Chem.* 277, 15252-15260.

- Song, Y.,** Manson, J.E., Buring, J.E., Sesso, H.D., Liu, S. (2005). Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 376-384.
- Souci, S.W.,** Fachmann, W., Kraut, H. (2000). *Lebensmitteltabelle für die Praxis.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage, Stuttgart.
- Spencer, J.P.,** Chaudry, F., Pannala, A.S., Srai, S.K., Debnam, E., Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 236-241.
- Spencer, J.P.,** Kuhnle, G.G., Williams, R.J., Rice-Evans, C. (2003). Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem. J.* 372, 173-181.
- Spencer, J.,** Mohsen, M.M. Abd El, Minihane, A.M., Mathers, J.C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and applications in nutrition research. *Brit J Nutr*, 99, 12-22
- Spinas, G.A.,** Lehmann R. (2001). Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese. *Schweiz Med Forum*, 20, 519-525.
- Steinberg, G.R.** (2007). Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cell Cycle* 6, 888-894.
- Stephen, A.M.,** Cummings, J.H. (1980). The microbial contribution to human faecal mass. *J. Med. Microbiol.* 13, 45-56.
- Steppan, C.M.,** Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.
- Suarez, B.,** Palacios, N., Fraga, N., Rodriguez, R. (2005). Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection. *J. Chromatogr. A* 1066, 105-110.
- Swanson, J.E.,** Laine, D.C., Thomas, W., Bantle, J.P. (1992). Metabolic effects of dietary fructose in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 851-856.

**T**

**Terry,P.D., Miller,A.B., Rohan,T.E.** (2002). Obesity and colorectal cancer risk in women. *Gut* 51, 191-194.

**Thielen, C., Will, F., Zacharias, J., Dietrich, H., Jacob, H.** (2004): Polyphenole in Äpfeln: Verteilung von Polyphenolen im Apfelgewebe und Vergleich der Frucht mit Apfelsaft. *Deutsch. Lebensm. Rundsch.* 100, 389-398.

**Thomas,L.** (1998). Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 5. Auflage, Frankfurt/Main.

**Treutter,D.** (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34, 71-89.

**U**

**Ueno,I., Nakano,N., Hirono,I.** (1983). Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn.J.Exp.Med.* 53, 41-50.

**V**

**Valko,M., Leibfritz,D., Moncol,J., Cronin,M.T., Mazur,M., Telser,J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 39, 44-84.

**Van Amelsvoort,J.M., Van Hof,K.H., Mathot,J.N., Mulder,T.P., Wiersma,A., Tijburg,L.B.** (2001). Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica* 31, 891-901.

**Veeriah,S., Hofmann,T., Gleis,M., Dietrich,H., Will,F., Schreier,P., Knaup,B., Pool-Zobel,B.L.** (2007). Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J.Agric.Food Chem.* 55, 2892-2900.

**Veeriah,S.**, Kautenburger,T., Habermann,N., Sauer,J., Dietrich,H., Will,F., Pool-Zobel,B.L. (2006). Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol.Carcinog.* 45, 164-174.

**Vendrell,J.**, Broch,M., Vilarrasa,N., Molina,A., Gomez,J.M., Gutierrez,C., Simon,I., Soler,J., Richart,C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes.Res.* 12, 962-971.

**Volkert,D.** (2006). Der Body-Mass-Index (BMI) - ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Ernährungszustands. *Akt Ernähr Med* 31, 126-132.

## W

**Walker,A.R.**, Walker,B.F., Walker,A.J. (1986). Faecal pH, dietary fibre intake, and proneness to colon cancer in four South African populations. *Br.J.Cancer* 53, 489-495.

**Walker,C.G.**, Zariwala,M.G., Holness,M.J., Sudgen,M.C. (2007). Diet, obesity and diabetes: a current update. *Clinical Science* 112, 93-111

**Walle,T.**, Walle,U.K., Halushka,P.V. (2001). Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J.Nutr.* 131, 2648-2652.

**Wang,J.**, Liu,R., Hawkins,M., Barzilai,N., Rossetti,L.A. (1998). A nutrient sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684-688.

**Watzl,B.**, Rechkemmer,G. (2001). Flavonoide. *Ern.-Umsch.*, 48, 498-502.

**Watzl,B.**, Kulling,S.E., Moseneder,J., Barth,S.W., Bub,A. (2005). A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am.J.Clin.Nutr.* 82, 1052-1058.

**Welsch,C.A.**, Lachance,P.A., Wasserman,B.P. (1989). Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. *J.Nutr.* 119, 1698-1704.

**Will,F.**, Dietrich,H. (1992). Isolation, Purification and Characterisation of neutral Polysaccharides from extractet Apple Juice. *Carbohydrate Polymers* 18, 109-117.

**Willett,W.C.** (2001). Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10, 3-8.

**Wolffram,S.,** Weber,T., Grenacher,B., Scharrer,E. (1995). A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr.* 125, 1300-1308.

**World** Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research (Hrsg.) (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, Washington.

**World** Health Organization (2000): Preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series, Genf.

**World** Health Organization (2003): Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. WHO technical report series, Genf.

## Y

**Yannakoulia,M.,** Yiannakouris,N., Blüher,S., Matalas,A.L., Klimis-Zacas,D., Mantzoros,C.S. (2003). Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Apr;88(4):1730-6.

**Young,G.Y.,** Hu,Y., Le Leu,R.K., Nyskohus,L. (2005). Dietary fibers and colorectal cancers: A model for environment - gene interactions. *Mol Nutr Food Res* 49, 571-584.

**Yudkin,J.S.** (2003). Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 27 *Suppl* 3, S25-S28.

## Z

**Zapf,J.,** Hauri,C., Waldvogel,M., Froesch,E.R. (1986). Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J.Clin.Invest* 77, 1768-1775.

**Zhao,H.**, Yakar,S., Gavrilova,O., Sun,H., Zhang,Y., Kim,H., Setser,J., Jou,W., LeRoith,D. (2004). Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 2901-2909.

**Zimmet P.**, Hodge A., Nicolson M., Staten M., de Courten M., Moore J., Morawiecki A., Lubina J., Collier G., Alberti G., Sowse G. (1996). Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study. *BMJ* 19, 965-969.

## 8 Anhang

### 8.1 Retentionszeiten und Massenübersicht der Polyphenolanalytik (GC/MS)

**Tabelle 8.1:** Retentionszeiten und Massenübersicht der im Rahmen dieser Studie erfassten Polyphenole für die GC/MS-Analytik.

I.	Substanz	II. [min]	Retentionszeit	Vorläufer-Ion [amu <sup>31</sup> ]	Qualifier-Ion [amu]
	Benzoessäure	11,89		179	105
	Phenyllessigsäure	12,70		193	104
	Phenylpropionsäure	14,43		222	207
	<i>trans</i> -Zimtsäure	16,04		220	205
	3-OH-Benzoessäure	16,45		282	267
	3-OH- Phenyllessigsäure	17,12		296	281
	2,3-Dimethoxybenzoessäure	17,13		254	224
	4-OH-Benzoessäure	17,39		282	267
	4-OH- Phenyllessigsäure	17,61		296	281
	1,3,5-triOH-Benzol (Phlorogluzinol)	17,75		342	327
	4-OH-Phenylpropionsäure	19,99		310	192
	4-OH, 3-MeO-Benzoessäure (Vanillinsäure)	20,33		312	297
	3-OH, 4-MeO-Benzoessäure (Isovanillinsäure)	20,46		312	297
	4-OH,3-MeO-Phenyllessigsäure (Homovanillinsäure)	20,55		326	311

<sup>31</sup> amu=*atomar mass unit*

---

2,5-diOH-BA	20,73	370	355
2,4-diOH-BA	21,44	355	281
3,4-DiOH-Benzoessäure (Protocatechusäure)	21,48	370	193
3,4-diOH- Phenyllessigsäure	21,64	384	369
4-OH-Zimtsäure ( <i>p</i> -Cumarsäure)	22,71	308	293
3,4-diOH- Phenylpropionsäure (Hydrokaffeesäure)	22,84	398	267
3,4,5-TriOH-Benzoessäure (Gallussäure)	23,01	458	443
2,4,6-TriOH- Benzoessäure	23,24	443	355
3-OH, 4-MeO-Zimtsäure (Isoferulasäure)	24,04	323	308
4-OH, 3-MeO-Zimtsäure (Ferulasäure)	24,23	323	308
3,4-diOH-Zimtsäure(Kaffeesäure)	24,69	396	381
2,4,5-Trimethoxyzimtsäure	24,84	310	221
Phloretin	34,83	369	342
Epicatechin	37,04	368	355



## 8.2 Messwerte der Fettsäureanalytik (GC/FID)

**Tabelle 8.2:** Datenwerte (MW  $\pm$  SD) der kurzkettigen Fettsäuren der Apfelsaft- und Kontrollgruppe aus den betreffenden Studienphasen. Durch die Apfelsaftintervention änderten sich die Fettsäurekonzentrationen nicht signifikant.

Fettsäure	Apfelsaftgruppe (MW $\pm$ SD, n=12)		Kontrollgruppe (MW $\pm$ SD, n=10)	
	Depletion	Intervention	Depletion	Intervention
Azetat [mM]	54,5 $\pm$ 12,2	53,9 $\pm$ 12,8	57,7 $\pm$ 14,7	57,8 $\pm$ 18,6
Propionat [mM]	18,1 $\pm$ 6,6	18,7 $\pm$ 5,8	18,2 $\pm$ 7,4	19,9 $\pm$ 7,9
Butyrat [mM]	17,5 $\pm$ 5,8	18,8 $\pm$ 3,6	18,1 $\pm$ 8,8	17,7 $\pm$ 5,9
Isobutyrat [mM]	2,4 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 1,1	2,5 $\pm$ 0,9
Isovalerat [mM]	2,5 $\pm$ 1,1	2,5 $\pm$ 0,9	2,3 $\pm$ 1,1	2,9 $\pm$ 1,2
Valerat [mM]	2,7 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 1,2
Caproat [mM]	1,2 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 1,6

### 8.3 Standardisierte Diät während der Sammelperiode

Während der 48-stündigen Sammelperiode von Urin und Stuhlproben hielten alle Probanden der beiden Studiengruppen eine einheitliche Nährstoffzufuhr und Energiezufuhr durch eine kontrollierte Diät ein. Tabelle 8.3 zeigt die angeordneten Mahlzeiten, welche von den Probanden an den Studientagen 6-7 und 33-34 konsumierten. Die Hauptgerichte und einige Zwischenmahlzeiten wurden vom Lehrstuhl zur Verfügung gestellt. Die anderen Lebensmittel, die frisch gekauft werden mussten (Banane, Käse,...), organisierten sich die Probanden selbst.

**Tabelle 8.3:** Angeordnete Mahlzeiten während der 48-stündigen Sammelperiode.

Mahlzeit	Tag 6 bzw. 33	Tag 7 bzw. 34
Frühstück	2-3 Scheiben Brot (Bauern- oder Körnerbrot) mit Becel (20 g) als Aufstrich, wahlweise Belag mit Marmelade, 1 Scheibe Kochschinken oder fettarmen Frischkäse	2-3 Scheiben Brot (Bauern- oder Körnerbrot) mit Becel (20 g) als Aufstrich, wahlweise Belag mit Marmelade, 1 Scheibe Kochschinken oder fettarmen Frischkäse
1. Zwischenmahlzeit	1 Banane	1 Banane
Mittagessen	Hähnchenkeule mit Beilage	Hühnerfrikassee mit Beilage
Nachtsch	Vanille-Himbeer-Eis	Schoko-Sahne-Eis
2. Zwischenmahlzeit	1 Fruchtjoghurt	1 Fruchtjoghurt
Abendessen	2-3 Scheiben Brot (Bauern- oder Körnerbrot) mit Becel (20 g) als Aufstrich, wahlweise Belag 1 Scheibe Kochschinken oder fettarmen Frischkäse	2-3 Scheiben Brot (Bauern- oder Körnerbrot) mit Becel (20 g) als Aufstrich, wahlweise Belag 1 Scheibe Kochschinken oder fettarmen Frischkäse

## 8.4 Ernährungsleitfaden

Jeder Studienteilnehmer erhielt zu Beginn der Studie den Ernährungsleitfaden. Die Vorgaben sollten über den gesamten fünfwöchigen Studienzeitraum eingehalten werden. Jeder Studienteilnehmer dokumentierte die Einhaltung der Vorgaben im Ernährungsprotokoll (Abschnitt 8.5).

Eingeschränkt verzehrte Lebensmittel:

- Kaffee oder Kakao oder grüner Tee: maximal 1 Tasse am Tag
- Wein oder Bier: maximal 1 Glas am Tag (Wein 0,25 L, Bier 0,5 L)
- Gemüse: maximal 1 Portion am Tag (z. B. eine Banane)
- Obst: maximal 1 Portion am Tag (z. B. eine Beilage Salat)

Verbotene Lebensmittel:

- Alle Äpfel und Apfelprodukte (z. B. Apfelsaft, Apfelkuchen, getrocknete Äpfel im Müsli, Apfelwein etc.)
- Obst- und Gemüsesäfte
- Pro- und präbiotische Joghurts (z. B. Actimel, LC-1, Yacult...)
- Vitamin- und ACE-Präparate
- Mineralstoff- und Spurenelement-Supplemente

Allgemeine Ausschlusskriterien während der Studie:

- Einnahme von Schmerzmitteln (Aspirin, Ibuprofen,...)
- Einnahme von Antibiotika
- Krankheit

## 8.5 Ernährungsprotokoll

Am Ende jeder Studienwoche waren die Probanden angewiesen, die Verzehrmenngen der angegebenen Lebensmittel zu dokumentieren.

**Tabelle 8.4a:** Wöchentliches Ernährungsprotokoll zur Apfelsaftstudie Teil 1.

Haben Sie diese Getränke in der vergangenen Woche konsumiert?		Wenn ja, wie oft?
1 Tasse Kaffee	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Tasse Kakao	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
Tasse Tee (schwarz / grün)	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Glas Obstsaft	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Glas Gemüsesaft	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Glas Rot-/ Weißwein	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Glas Bier	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie





**Tabelle 8.4b:** Wöchentliches Ernährungsprotokoll zur Apfelsaftstudie Teil 2.

<b>Haben Sie diese Lebensmittel in der vergangenen Woche konsumiert?</b>		<b>Wenn ja, wie oft?</b>
1 Portion Obst (z. B. 1 Banane, 1 Orange, 1 handvoll Trauben...)	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
1 Portion Gemüse (Beilage)	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> 1 x täglich <input type="checkbox"/> mehrmals täglich <input type="checkbox"/> mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> selten / nie
<b>Haben Sie diese Medikamente in der vergangenen Woche konsumiert?</b>		
Schmerzmittel	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Wenn <b>ja</b> , setzen Sie sich bitte mit der <b>Studienorganisation</b> (08161/71-2020 oder Heike.Daumann@wzw.tum.de) in Verbindung
Antibiotika	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	
<b>Allgemeines</b>		
Waren Sie krank? (Erkältung, Fieber, Magen-Darm-Erkrankungen...)	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Wenn <b>ja</b> , setzen Sie sich bitte mit der <b>Studienorganisation</b> (08161/71-2020 oder Heike.Daumann@wzw.tum.de) in Verbindung

## 8.6 Dokumentation der Trinkmenge

Jeder Studienteilnehmer dokumentierte während der 48-stündigen Sammelperiode von Urin und Stuhl die Trinkmenge (Tabelle 8.5). Im folgenden Protokoll dokumentierten die Probanden ihre Flüssigkeitszufuhr (Wasser, Milch, Kaffee, Tee, Studien-Apfelsaft, Kontrollgetränk etc.) an den drei Tagen vor der Blutabnahme. Als Orientierung dienten die Abbildungen: Für jedes getrunkene Glas bzw. jede Tasse wurde ein Strich am entsprechenden Tag gemacht. Wurde eine ganze Flasche getrunken, wurde statt einzelner Gläsern ein Strich für eine Flasche eingetragen.

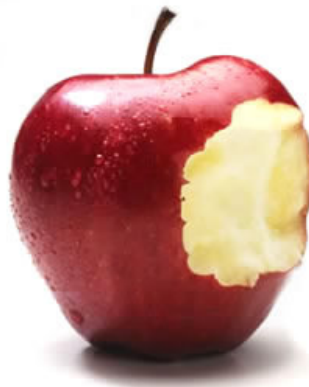
**Tabelle 8.5:** Protokoll zur Dokumentation der Trinkmenge.

Menge	Bsp.	Depletionsphase			Interventionsphase		
		Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 32	Tag 33	Tag 34
1 Kleines Glas (0,2 L)							
1 Großes Glas (0,5 L)							
1 kleine Flasche (0,75 L)							
1 große Flasche (1 L)							

## 8.7 Informationsbroschüre

Jeder Studienteilnehmer erhielt zu Beginn der Studie eine Informationsbroschüre mit Terminkalender, um eine termingerechte Einhaltung und einen korrekten Ablauf der Probensammlung zu gewährleisten. Die Inhalte sind auf den Seiten 139-149 dargestellt.

# Informationsbroschüre zur Apfelsaftstudie 2007



Technische Universität München  
Institut für Biofunktionalität der Lebensmittel  
Hochfeldweg 1  
85350 Freising

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b>	<b>3</b>
<b>2. Allgemeine Informationen</b>	<b>4</b>
▪ Studienplan	4
▪ Getränkelagerung	4
▪ Getränkeverzehr	4
▪ Studienabbruch	5
<b>3. Ihre Ernährung während der Studie</b>	<b>5</b>
▪ Ernährungsleitfaden	5
▪ Ernährungsprotokolle	5
▪ Standardisierte Ernährungsvorschriften	6
<b>4. Probensammlung und Untersuchungen</b>	<b>6</b>
▪ 24Stunden-Urinsammlung	6
▪ 48Stunden-Stuhlsammlung	7
▪ Ärztliche Untersuchung	7
<b>5. Anhang</b>	<b>8</b>
▪ Anhang 1: Studienplan	9
▪ Anhang 2: Legende zum Studienplan	11
▪ Anhang 3: standardisierte Ernährungsvorschriften	12
▪ Anhang 4: Ernährungsleitfaden	13
▪ Anhang 5: Ernährungsprotokolle 1-5	14



## 1. Einführung



Lieber Studienteilnehmer,

vielen Dank für Ihr Interesse, an der Apfelsaftstudie teilzunehmen. Mit dieser Broschüre werden wir Sie über den detaillierten Ablauf der Studie informieren. Des Weiteren erhalten Sie im Anhang einen Studienplan, die für die Studie benötigten Protokolle und Leitfäden etc.

Zunächst möchten wir Ihnen grundlegende Informationen über Getränkelagerung, Studienplan, Studienabbruch etc. geben. Des Weiteren erhalten Sie genaue Angaben über Ihre Ernährung während der Studie. Den dazugehörigen Ernährungsleitfaden, Ernährungsprotokolle und –vorschriften können Sie jeweils im Anhang finden.

Zudem werden Sie detailliert über den Ablauf der Probensammlung (z. B. 24Stunden-Urinsammlung) aufgeklärt und können sich informieren, was wir bei den zwei ärztlichen Untersuchungen analysieren werden.




**Bitte lesen Sie sich die Informationen aufmerksam durch. Bei Fragen und Unklarheiten können Sie sich jederzeit an uns wenden.**

Tel.: 08161 / 71-2020

e-Mail: Heike.Daumann@wzw.tum.de

## 2. Allgemeine Informationen

### Studienplan (Anhang 1)


- Im Studienplan befindet sich eine Übersicht über Ihre Termine für die Probensammlung (Urin, Stuhl), wann die standardisierten Mahlzeiten verzehrt werden sollen sowie die Termine für die ärztlichen Untersuchungen.
- Ihre Termine bzw. Probensammlungstage sind jeweils mit einem bestimmten Symbol gekennzeichnet, z. B. steht das Symbol  für „24Stunden-Urinsammlung“ (eine Erläuterung der Symbole finden Sie in Anhang 2).
- Bitte beachten Sie: Sobald Sie mit der Studie beginnen, sind die **Untersuchungstermine fixe Tage** und können nicht mehr verschoben werden.

### Getränkelagerung


- Den Apfelsaft/das Kontrollgetränk (28 Flaschen) sollten Sie während der gesamten 4wöchigen Studie **kühl lagern**, z. B. im Kühlschrank oder in einem kühlen Keller (allerdings darf der Saft nicht gefrieren).
- Die leeren Flaschen können entsorgt werden und müssen nicht bei uns zurückgegeben werden.

### Getränkeverzehr



- Im angegebenen 4wöchigen Studienzeitraum (gekennzeichnet mit ) werden Sie **täglich eine Flasche** (0,75 L) Apfelsaft/Kontrollgetränk konsumieren (sog. „Interventionsphase“).
- Das Getränk sollten Sie über den Tag verteilt zu den Mahlzeiten trinken.
- Der Apfelsaft bzw. das Kontrollgetränk kann auch mit Wasser verdünnt getrunken werden.

#### **Bitte beachten Sie:**

- In der Startwoche (sog. Depletionsphase, beginnt eine Woche vor der Interventionsphase; gekennzeichnet mit ) **soll noch kein** Apfelsaft/Kontrollgetränk konsumiert werden.

**Ihre Teilnahme an der Studie können Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen.** Sollte bei Ihnen während der Studie eines der aufgelisteten Ereignisse auftreten, melden Sie sich bitte umgehend bei der Studienorganisation:

- Studienabbruch**
- Krankheit (z. B. grippaler Infekt, Magen-Darm-Erkrankung,...)
  - Einnahme von Medikamenten (z. B. Antibiotika)
  - Apfelsaft-Unverträglichkeit

**Beachten Sie bitte:** bei Studienabbruch verlieren Sie Ihren Anspruch auf die Studienvergütung von 300,- Euro. Eine Teilauszahlung ist ebenfalls nicht möglich.

### 3. Ihre Ernährung während der Studie

Während der Studie sollen Sie weitgehend Ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beibehalten. Das gleiche gilt auch für Ihre gewohnte Trinkmenge. Die Einschränkungen oder Verzicht sind im Ernährungsleitfaden aufgelistet.

- Ernährungsleitfaden**
- Bitte achten Sie darauf, dass Sie die Vorgaben ab Beginn der Studie (erster Tag der Startwoche) bis zum Ende einhalten.
  - Die gelb markierten Lebensmittel sollten Sie während dem Studienzeitraum eingeschränkt konsumieren (Mengenangaben befinden sich in der Tabelle).
  - Auf alle rot markierten Lebensmittel / Medikamente sollten Sie bitte während der Studie verzichten.

- Ernährungsprotokolle**
- Füllen Sie bitte am Ende jeder Studienwoche ein Ernährungsprotokoll aus.
  - Die fünf ausgefüllten Protokolle können Sie dann an Ihrem letzten Untersuchungstag bei uns abgeben.

## Standardisierte Ernährungs- vorschriften



- Die Ernährungsvorschriften in Anhang 5 (Tabelle) halten Sie bitte an den zwei vorgehenden Tagen vor der ärztlichen Untersuchung ein.
- Die standardisierte Ernährung aller Studienteilnehmer an diesen 4 Tagen ist wichtig, um bei allen Probanden die Aufnahme der gleichen Nährstoffe mit gleichem Energiegehalt zu gewährleisten.

## 4. Probensammlung und Untersuchungen

### 24Stunden- Sammelurin




#### **Vorbedingungen:**

Halten Sie Ihre normale Trinkmenge ein (ca. 1.5-2.5 L/Tag).

Ein Stabilisator (pulverförmig) wurde von uns in der 3L-Sammelflasche zugesetzt, der nicht entfernt werden darf.

Zur besseren Handhabbarkeit der Urinsammlung verwenden Sie bitte den 500mL-Auffangbecher und füllen die Urinportion in die 3L-Sammelflasche um.

#### Sammelperiode:

Beginn: morgens am gekennzeichneten Tag ( Symbol ).

Den ersten Morgenurin nach dem Aufstehen verwerfen.

Alle darauf folgenden Urinportionen bis zum nächsten Morgen einschließlich des Morgenurins werden gesammelt. **Beachten Sie**

**bitte:** Der **3L-Sammlebehälter** muss **kühl gelagert** werden (Kühlschrank), um die Stabilität der Probe zu gewährleisten.


Nach Beendigung der 24Stunden-Urinsammlung können Sie den 500mL-Auffangbecher entsorgen.

Die 3L-Sammelflasche bringen Sie zur Untersuchung mit, die im Anschluss stattfindet.

#### 48h-Stuhlsammlung



Die Sammlung von Stuhlproben erfolgt in Gefriertoiletten in den Probandenzimmern.

Dazu finden Sie sich bitte am gekennzeichneten Tag (Symbol ) zu einem vorher vereinbarten Termin im Untersuchungszimmer ein (im ZIEL am Forum 5, wie bei der Voruntersuchung), wo ihnen ein **Schlüssel ausgehändigt** wird.

**Handtücher** und sonstige **Waschutensilien** bringen Sie bitte selbst mit.

Für frische **Bettwäsche und Verpflegung** an diesen Tagen sorgen wir.

#### Ärztliche Untersuchung



Die Termine für die zwei Untersuchungen können Sie dem Zeitplan im Anhang entnehmen: Datum und Uhrzeit, zu der Sie sich bei uns im Untersuchungszimmer einfinden sollen, ist bereits auf dem Plan notiert.





























- > falls eine frühere / spätere Uhrzeit günstiger für Sie ist, melden Sie sich bitte rechtzeitig bei uns. Das Datum kann aber leider nicht mehr verschoben werden.



























#### Bitte beachten Sie:

- **Dauer** der Untersuchung: ca. 30 min
- **Ort:** Untersuchungszimmer (im ZIEL am Forum 5, wie bei der Voruntersuchung)
- Sie müssen **nüchtern** erscheinen (danach können Sie gerne wieder bei uns frühstücken)
- Was wird untersucht:

- **Gewicht**
- Messung des **Hüft- und Taillenumfanges**
- **Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA)**: an **Hand- und Fußgelenk** werden **Elektroden** aufgelegt; mit dieser Methode wird der Wassergehalt, Fett- und fettfreie Masse des Körpers bestimmt.
- **Blutabnahme**

## Anhang 1: Studienplan

Datum		III. Legende							Studienwoche
									
		Ärztliche Untersuchung	24Stunden-Urinsammlung	Übernachtung mit 48Stunden-Stuhlsammlung	Standardisierte Mahlzeiten „Tag 1“	Standardisierte Mahlzeiten „Tag 2“	Startwoche (Depletionsphase)	Apfelsaft-/ Kontrollgetränk-Konsum (Interventionsphase)	
Januar	Fr	19							1
	Sa	20							
	So	21							
	Mo	22							
	Di	23							
	Mi	24							
	Do	25							
	Fr	26	 8:00 Uhr						2
	Sa	27							
	So	28							
	Mo	29							
	Di	30							
	Mi	31							
	Do	1							
	Fr	2						3	

Februar	Sa	3								
	So	4								
	Mo	5								
	Di	6								
	Mi	7								
	Do	8								
	Fr	9								4
	Sa	10								
	So	11								
	Mo	12								
	Di	13								
	Mi	14								
	Do	15								5
	Fr	16								
	Sa	17								
	So	18								
	Mo	19								
	Di	20								
	Mi	21								
	Do	22								
	Fr	23			8:00 Uhr					



## Anhang 2: Legende zum Studienplan



### Ärztliche Untersuchung (s. Seite 7)

Ort: Am Forum 5 /wie bei der Voruntersuchung

Uhrzeit: s.Vermerk im Studienplan



### 24Stunden-Urinsammlung ( s. Seite 6)

Beginn: morgens am gekennzeichneten Tag bis zum darauffolgenden Morgen.



### 48Stunden-Stuhlsammlung ( s. Seite 7)

Am gekennzeichneten Tag finden Sie sich abends (Zeit wird vorher mit Studienorganisation vereinbart) im Untersuchungszimmer ein



### Standardisierte Mahlzeit „Tag 1“

s. Tabelle in Anhang 3



### Standardisierte Mahlzeit „Tag 1“

s. Tabelle in Anhang 3



### Startphase (Depletionsphase)

- Beginn der Einhaltung der Vorgaben des Ernährungsleitfaden (Anhang 3)
- Noch **kein Konsum** von Apfelsaft / Kontrollgetränk



### Apfelsaft-/Kontrollgetränk-Konsum (Interventionsphase, s. Seite 4)

- Weiterhin Einhaltung der Vorgaben des Ernährungsleitfaden (Anhang 3)
- **Konsum** von Apfelsaft / Kontrollgetränk

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. Gerhard Rechkemmer für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und die Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Wilfried Schwab für die Übernahme des Koreferats, die wertvollen fachlichen Gespräche und sein stetes Engagement.

Frau Dr. Silvia Roser und Frau Dr. Kerstin Schnäbele für ihre stets kompetente und umfassende Betreuung. Durch ihr unermüdliches Engagement, ihre wertvollen Anregungen und ihre eingehenden Korrekturen haben sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Yu-Mi Lee und Herrn Dr. Thomas Skurk für die jederzeit gewährte Hilfe bei der Planung und Durchführung der Humaninterventionsstudie.

Herrn Ingolf Krause und Herrn Florian Vitzthum für die freundliche Unterstützung bei der massenspektrometrischen und gaschromatographischen Methodenentwicklung.

Herrn Benjamin Tiemann für sein Ideenreichtum, seine Hilfsbereitschaft und seine stets engagierte Mitarbeit bei sämtlichen analytischen Arbeiten.

Frau Theresa Asen, Frau Julia Stoll, Frau Doris Kappen und Herrn Nico Gebhardt für die großartige Unterstützung und das Engagement bei der Durchführung der Humaninterventionsstudie.

Allen Kollegen des Lehrstuhls Biofunktionalität der Lebensmittel der Technischen Universität München für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Allen meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich haben, für ihre Motivation sowie das Korrekturlesen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf diesem Weg jederzeit unterstützt hat, für ihre stete Zuversicht und ihren Glauben an mich.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Heike Daumann  
Geburtsdatum, -ort: 16. April 1981, Mannheim  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

09/1987 - 07/1991 Grundschohle Mannheim-Wallstadt  
09/1991 - 07/2000 Feudenheim-Gymnasium, Mannheim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium

10/2000 - 09/2005 Studium der Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Technischen Universität Kaiserslautern  
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin  
02/2004 - 04/2004 Praktikum im Fachbereich Biochemie an der Universidad de Murcia, Spanien  
08/2004 - 09/2004 Praktikum im Bereich Mikrobiologie und Qualitätskontrolle bei Rudolf Wild GmbH, Heidelberg  
10/2004 - 12/2004 Praktikum im Bereich Life Science Analytics bei Merck KGaA  
03/2005 - 09/2005 Diplomarbeit in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie  
Thema: „Modulation der Histondeacetylase-Inhibierung durch mikrobielle Metabolite ballaststoffhaltiger Nahrung.“

## Dissertation

11/2005 - 04/2008 Experimenteller Teil der Dissertation an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, Freising  
Thema: „Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetes-assoziierte Risikofaktoren für Dickdarmkrebs und das Polyphenolprofil bei gesunden Probanden.“

## Berufstätigkeit

seit 07/2008 Projektmanagerin in der Abteilung Klinische Forschung bei Hexal AG, Holzkirchen