

Lehrstuhl für Phytopathologie
der Technischen Universität München

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIOXIDATIVEN KAPAZITÄT VON BIER UND
BIERINHALTSSTOFFEN SOWIE ZU
ABSORPTION UND METABOLISMUS VON HYDROXYZIMTSÄUREN IM MENSCHEN**

SANDRA M. KERN

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

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: UNIV.-PROF. DR. B. HOCK
Prüfer der Dissertation: 1. UNIV.-PROF. DR. E.F. ELSTNER
2. UNIV.-PROF. DR. D. TREUTTER

Die Dissertation wurde am 24.09.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.11.2003 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1. <u>MATERIAL</u>	10
2.1.1. Chemikalien und Enzyme.....	10
2.1.2. Geräte und Laborartikel.....	13
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	14
2.1.4. Probenmaterial.....	16
2.2. <u>METHODEN ZUR BESTIMMUNG ANTIOXIDATIVER KAPAZITÄTEN VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN</u>	17
2.2.1. Biochemische Testsysteme.....	17
2.2.1.1. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	17
2.2.1.2. NADH/Diaphorase-System.....	18
2.2.1.3. Hydroxylaminoxidations-System.....	18
2.2.1.4. Fenton-System.....	19
2.2.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System.....	19
2.2.1.6. Rose Bengal-System.....	20
2.2.1.7. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	20
2.2.1.8. Vollblut-System.....	21
2.2.2. Untersuchungen von humanem Blutplasma.....	21
2.2.2.1. Plasma-Gewinnung und Protein-Quantifizierung im Plasma.....	21
2.2.2.2. LDL-Isolierung, -Präparation und -Quantifizierung.....	22
2.2.2.3. Anreicherung von Testsubstanzen im LDL und Plasma.....	23
2.2.2.4. Extraktion und Analyse der Hopfenöl-Komponenten aus LDL.....	23
2.2.2.5. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien im LDL und Plasma.....	24
2.2.3. Durchführung der Trinkstudien mit Bier.....	25
2.2.3.1. Trinkstudie 1.....	25
2.2.3.2. Trinkstudie 2.....	27
2.2.3.3. Trinkstudie 3.....	28
2.2.3.4. Trinkstudie 4.....	29
2.3. <u>METHODEN ZUR STUDIE ÜBER DIE ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN</u>	30
2.3.1. Analyse der Zerealien.....	30
2.3.1.1. Wässrige Extraktion.....	30
2.3.1.2. Alkalische Extraktion.....	30
2.3.2. Durchführung der Humanstudie.....	30
2.3.3. Präparation der Plasmaproben (Ethylacetat-Extraktion).....	31
2.3.4. Präparation der Urinproben (SPE-Extraktion).....	31
2.3.5. HPLC-Analyse.....	32
2.3.6. LC/MS-Analyse.....	33
2.3.7. Synthese von Feruloylglycin.....	34
2.4. <u>METHODEN ZU DEN METABOLISMUSSTUDIEN VON HYDROXYZIMTSÄUREN IN CACO-2</u>	35
2.4.1. Zellkultur von Caco-2.....	35
2.4.2. Durchführung der metabolischen Studien.....	35
2.4.3. Untersuchungen zur Esterase-Aktivität.....	36
2.4.4. Identifizierung der Metaboliten.....	36
2.4.4.1. Enzymbehandlung der Zellmedien und synthetisierten Sulfate.....	36
2.4.4.2. HPLC- und LC/MS-Analyse der Zellmedien.....	36
2.5. <u>STATISTISCHE AUSWERTUNG</u>	37

3. ERGEBNISSE	38
3.1. <u>ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN</u>	38
3.1.1. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	38
3.1.2. NADH/Diaphorase-System.....	48
3.1.3. Hydroxylaminoxidations-System.....	55
3.1.4. Rose Bengal-System.....	60
3.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System.....	68
3.1.6. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	72
3.1.6.1. Vorinkubation mit Hopfenextrakt.....	73
3.1.6.2. Vorinkubation mit Myrcen und α -Humulen.....	74
3.1.6.3. Vorinkubation mit β -Caryophyllen und Ocimen.....	77
3.1.6.4. Vorinkubation mit α -Tocopherol und α -Humulen.....	79
3.1.6.5. Vorinkubation mit Bier und Bierfraktionen.....	80
3.1.6.6. Direktinkubation von LDL mit Bier und Bierfraktionen.....	80
3.1.7. Vollblut-System.....	82
3.1.8. Zusammenfassung.....	88
3.2. <u>ERGEBNISSE DER TRINKSTUDIEN</u>	90
3.2.1. Trinkstudie 1.....	90
3.2.1.1. In vivo-Untersuchungen.....	91
3.2.1.1.1. Blutwerte.....	91
3.2.1.1.2. Vollblut-System.....	93
3.2.1.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	95
3.2.1.1.4. Fenton-System.....	98
3.2.1.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System.....	100
3.2.1.1.6. Proteingehalt im Plasma.....	100
3.2.1.1.7. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	101
3.2.1.2. Ex vivo-Untersuchungen.....	102
3.2.1.2.1. Vollblut-System.....	102
3.2.1.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	103
3.2.1.2.3. Fenton-System.....	105
3.2.1.2.4. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System.....	105
3.2.1.2.5. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	106
3.2.1.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 1.....	107
3.2.2. Trinkstudie 2.....	108
3.2.2.1. In vivo-Untersuchungen.....	108
3.2.2.1.1. Blutwerte.....	108
3.2.2.1.2. Vollblut-System.....	110
3.2.2.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	112
3.2.2.1.4. Fenton-System.....	113
3.2.2.1.5. Proteingehalt im Plasma.....	114
3.2.2.1.6. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	115
3.2.2.1.7. Extraktion der lipophilen Antioxidantien aus LDL.....	115
3.2.2.1.8. Extraktion der lipophilen Antioxidantien aus Plasma.....	115
3.2.2.2. In vitro- und ex vivo-Untersuchungen der Biere aus Trinkstudie 2.....	118
3.2.2.2.1. Vollblut-System.....	118
3.2.2.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase.....	119
3.2.2.2.3. Fenton-System.....	121
3.2.2.2.4. Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	122
3.2.2.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 2.....	124
3.2.3. Trinkstudie 3.....	125
3.2.3.1. In vivo-Untersuchungen.....	125
3.2.3.1.1. Blutwerte.....	125
3.2.3.1.2. Vollblut-System.....	127
3.2.3.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	129
3.2.3.1.4. Fenton-System.....	130
3.2.3.1.5. Proteingehalt im Plasma.....	131

3.2.3.1.6.	Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	131
3.2.3.2.	In vitro- und ex vivo-Untersuchungen der Biere aus Trinkstudie 3.....	132
3.2.3.2.1.	Vollblut-System.....	132
3.2.3.2.2.	Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	133
3.2.3.2.3.	Fenton-System.....	135
3.2.3.2.4.	Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	137
3.2.3.3.	Zusammenfassung von Trinkstudie 3.....	138
3.2.4.	Trinkstudie 4.....	139
3.2.4.1.	In vivo-Untersuchungen.....	139
3.2.4.1.1.	Blutwerte.....	139
3.2.4.1.2.	Vollblut-System.....	139
3.2.4.1.3.	Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	142
3.2.4.1.4.	Proteingehalt im Plasma.....	144
3.2.4.1.5.	Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	145
3.2.4.2.	In vitro- und ex vivo-Untersuchungen des Bieres aus Trinkstudie 4...	146
3.2.4.2.1.	Vollblut-System.....	146
3.2.4.2.2.	Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	147
3.2.4.2.3.	Kupferinduzierte LDL-Oxidation.....	149
3.2.4.3.	Zusammenfassung von Trinkstudie 4.....	149
3.3.	<u>ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN AUS ZEREALIEN.</u>	151
3.3.1.	Analyse der Zerealien.....	151
3.3.2.	Plasma-Analyse.....	152
3.3.3.	Urin-Analyse.....	154
3.3.4.	Zusammenfassung.....	157
3.4.	<u>HYDROXYZIMTSÄURE-METABOLITEN IN CACO-2.</u>	158
3.4.1.	Metabolit-Identifizierung durch HPLC- und LC/MS-Analysen.....	158
3.4.2.	Identifizierung durch enzymatische Behandlung.....	163
3.4.3.	Esterase-Aktivität im Zellmedium.....	166
3.4.4.	Metabolismus in Abhängigkeit von der Zeit.....	166
3.4.5.	Zusammenfassung.....	171
4.	DISKUSSION	172
4.1.	<u>ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN.</u>	172
4.1.1.	Eigenschaften als Radikalscavenger.....	172
4.1.2.	Hemmung der Lipidperoxidation.....	174
4.1.3.	Kupferkomplexierung.....	174
4.1.4.	LDL-Oxidationsschutz.....	175
4.1.5.	Immunmodulierende Eigenschaften.....	176
4.2.	<u>TRINKSTUDIEN.</u>	177
4.2.1.	Antioxidative Kapazität des Plasmas in vivo.....	177
4.2.2.	Kupferkomplexierung in vivo.....	179
4.2.3.	Immunmodulation in vivo.....	179
4.2.4.	Blutparameter in vivo.....	180
4.2.5.	LDL-Oxidation.....	181
4.2.6.	Zusammenfassende Bemerkungen.....	181
4.3.	<u>ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN AUS ZEREALIEN.</u>	182
4.4.	<u>HYDROXYZIMTSÄURE-METABOLITEN IN CACO-2.</u>	184
5.	ZUSAMMENFASSUNG	187
6.	LITERATUR	189

ABKÜRZUNGEN

ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Kaffeesäure
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
DAD	Diode Array Detector
DHF	Dihydroxyfumarsäure
diFA	Diferulasäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-	Negative ion electrospray
ES+	Positive ion electrospray
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ferulasäure
FID	Flammenionisationsdetektor
GA	Gesamtaldehyde
GC	Gaschromatographie
GlcA	Glucuronsäure
HDL	High density lipoprotein
HOCl	Hypochlorige Säure
HPLC	High performance liquid chromatography
i.A./ i.VA.	Im Ansatz/ im Vorinkubationsansatz
IC	Inhibitionskoeffizient
KMB	α -Keto- γ -methiolbuttersäure
LC/MS	Liquid chromatography mass spectrometry
LDL	Low density lipoprotein
MCA	Methylkaffeat
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MFA	Methylferulat
MPA	Methyl- <i>p</i> -Cumarat
MPO	Myeloperoxidase
MSA	Methylsinapat
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
n.b.	Nicht bestimmt
n.d.	Nicht detektiert
PA	<i>p</i> -Cumarsäure
PBS	Phosphate buffered saline
PTV	Programmed temperature vaporizer
RF	Responsefaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Retentionszeit
SA	Sinapinsäure
SIM	Selected ion monitoring
ST	Sulfotransferase
Std	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
SPE	Solid phase extraction
TFA	Trifluoroessigsäure
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase
X	Xanthin
XOD	Xanthinoxidase

1. EINLEITUNG

In den letzten Jahren konnte in der Humanmedizin ein zunehmendes Interesse an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet werden. Dabei stehen besonders Krankheiten wie Atherosklerose, Krebs, Diabetes und Katarakt im Mittelpunkt, die durch oxidative Prozesse verursachte chronische Zell- und Gewebeschädigungen aufweisen und deren Pathogenese mit dem Auftreten freier Radikale in Zusammenhang gebracht wird (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Im menschlichen Körper sind verschiedene antioxidative Systeme aktiv, um die Bildung unerwünschter reaktiver Sauerstoffspezies möglichst zu unterbinden oder diese unschädlich zu machen. Zur „antioxidativen Strategie“ aerober Zellen zählen nach Elstner (1993) niedermolekulare Antioxidantien wie Vitamin C und Vitamin E, die als Radikalfänger (Scavenger oder Quencher aktivierter Zustände) fungieren. Auch Enzyme wie Superoxiddismutasen, Katalasen oder Gluthationperoxidasen, die mit bestimmten aktivierten Sauerstoffspezies reagieren und diese in weniger toxische Verbindungen überführen, gehören dazu. Desweiteren gibt es Rekonstitutionssysteme (Elektronentransportketten), die Scavenger und Quencher reaktivieren, und Reparatursysteme, die Schadstellen reparieren und geschädigte Moleküle aus dem Metabolismus entfernen.

Eine Unterstützung dieser antioxidativen Systeme über die Ernährung ist essentiell, vor allem im Hinblick auf die Vitamine. Antioxidativ wirkende Stoffe, die mit der Nahrung aufgenommen werden, können durch das Abfangen oder durch die Inaktivierung freier Radikale Zellschädigungen verhindern und damit kann das Risiko einer möglichen Initiation für die daraus resultierenden Krankheiten herabgesetzt werden.

Dementsprechend weist die Lebensmittelindustrie zunehmend bei der Vermarktung ihrer Produkte auf positive Wirkungen auf die Gesundheit hin und reagiert so auf das steigende Gesundheitsbewußtsein in der westlichen Bevölkerung. Oft werden, wie zum Beispiel bei den ACE-Säften, Lebensmittel mit Substanzen angereichert, die aufgrund von wissenschaftlichen Erkenntnissen als gesundheitsfördernd eingestuft werden. Vor allem der Rotwein wird aufgrund seiner positiven Wirkungen auf die Gesundheit, die wissenschaftlich belegt sind, von der Getränkeindustrie propagiert und ist im Zusammenhang mit dem Phänomen des French Paradox „in aller Munde“.

Aber auch das Bier enthält Komponenten, die einen wesentlichen Beitrag zur Ernährung leisten können, darunter bestimmte B-Vitamine, Mineralien, Antioxidantien und möglicherweise auch Ballaststoffe (Bamforth, 2002). Vor allem für die im Bier enthaltenen Polyphenole und Hopfenbitterstoffe werden gesundheitsfördernde Wirkungen diskutiert. Piendl und Biendl (2000) verfaßten einen Übersichtsartikel über die physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres, in welchem unter anderem die antimutagenen und LDL-schützenden Eigenschaften von Polyphenolen im Bier sowie die antikanzerogenen und antiatherogenen Eigenschaften verschiedener Flavonoide des Hopfens, vor allem von Xanthohumol und seinen Derivaten, aufgezeigt werden.

Unter den phenolischen Komponenten, die im Bier identifiziert wurden, ist vor allem die Ferulasäure zu nennen, die einen wesentlichen Bestandteil der Gerstenzellwand darstellt (Bourne et al., 2000). Aber auch Vanillinsäure, Vanillin, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Sinapinsäure, *p*-Hydroxybenzoesäure (Bartolome et al., 2000) sowie zahlreiche Catechine und Proanthocyanidine (Madigan und McMurrough, 1994) konnten im Bier detektiert werden. Dabei stammen etwa 80% der phenolischen Komponenten im Bier aus dem Gerstenmalz (Goupy et al., 1999), während die übrigen 20% aus dem Hopfen kommen, der vorwiegend kondensiertes polyphenolisches Material enthält. Da die beiden Hauptrohstoffe des Bieres, der Hopfen und das Malz, sehr flavonoidreich sind, kann davon ausgegangen werden, daß Bier eine relativ reichhaltige Quelle dieser Komponenten darstellt (Bourne et al., 2000).

Phenole sind bekannt für ihre antioxidativen Eigenschaften, da sie die Lipidperoxidation hemmen und als Scavenger freier Radikale und Chelatoren für prooxidante Übergangsmetalle fungieren können. Aber auch die im Bier enthaltenen Maillard-Reaktionsprodukte (Melanoide), die während des Mälzens entstehen, können antioxidativ wirksam sein (Goupy et al., 1999).

Zu den Inhaltsstoffen des Hopfens zählen neben den Polyphenolen vor allem die Hopfenbitterstoffe und die Hopfenöle. Unter den Hopfenbitterstoffen werden die Hopfenbittersäuren, die α -Säuren (Humulone) und die β -Säuren (Lupulone), sowie die Harze als deren Oxidationsprodukte, unterschieden. Dabei sind die Lupulone mit ihrem geringen Bitterwert bei den in der Würze vorherrschenden pH-Werten unlöslich und gehen mit dem Hopfentreber bzw. mit dem Trub verloren (Narziß, 1995). Die Löslichkeit der Humulone mit ihrem hohen Bitterwert ist ebenfalls als gering zu bezeichnen (De Keukeleire et al., 1999). Das charakteristische Aroma des Hopfens machen allerdings die Hopfenöle aus, die in frischem Hopfen hauptsächlich aus Monoterpenen wie Myrcen, α - und β -Pinen und Sesquiterpenen wie Humulen und β -Caryophyllen bestehen (Narziß, 1995). **Abbildung 1** zeigt die Strukturen einiger Hauptkomponenten der lipophilen Hopfenöle (De Keukeleire et al., 1999).

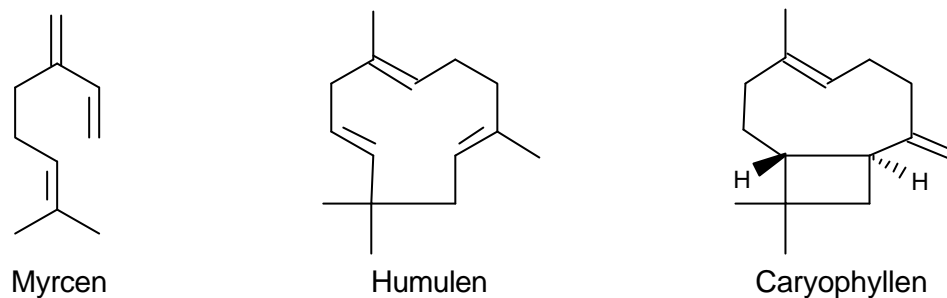


Abbildung 1: Strukturen der Hauptkomponenten der Hopfenöle

Als weitere Hopfeninhaltsstoffe sind Prenylflavonoide wie das Xanthohumol und Isoxanthohumol zu finden, die chemopräventive Wirkungen gegen Krebs zeigen, indem sie die metabolische Aktivierung heterozyklischer Amine hemmen können (Miranda et al., 2000). Allerdings wurde von den Autoren darauf hingewiesen, daß die benötigte Menge an Prenylflavonoiden, unter der Voraussetzung einer Absorptionsrate von 10% der konsumierten Komponenten, für eine Hemmung *in vivo* nicht über das Trinken von Bier zu erreichen ist (10,6 mg Gesamt-Prenylflavonoide/Tag entsprechen etwa 2,6 l Bier/Tag). Außerdem ist die Frage zu klären, ob die *in vivo* gebildeten Metaboliten ebenfalls bioaktiv sind. Bei Biotransformationsstudien mit Ratten- und humanen Leber-Mikrosomen konnten *in vitro* Monoglucuronide von Xanthohumol (Yilmazer, 2001) identifiziert werden. Miranda et al. (1999) konnten ebenfalls antiproliferative Eigenschaften und eine Hemmung des Tumorstwachstums durch Xanthohumol und Isoxanthohumol gegenüber Zellen verschiedener Krebsarten wie MCF-7 (Brustkrebszellen), HT-29 (Dickdarmkrebszellen) und A-2780 (Eierstockkrebszellen) zeigen.

Ein weiterer Bestandteil von Bier ist der bei der Gärung entstehende Alkohol. Es existieren mittlerweile zahlreiche Studien zum Einfluß des Alkohols auf die Gesundheit, die von Denke (2000) in Bezug auf Bier zusammengefaßt wurden. Mäßiger Alkoholkonsum, womit ein bis drei Getränke täglich gemeint sind, wird im Vergleich zu Nichttrinkern mit einem 30 – 40% verminderten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und kardiovaskulärer Erkrankungen nicht linear, sondern ergibt eine U-förmige Kurve. Demnach wird ein schützender Effekt durch leichtes bis mäßiges Trinken erreicht, während Nichttrinker und schwere Trinker einem erhöhten Risiko unterliegen. In einigen Studien wurden die Wirkmechanismen auf antithrombotische Eigenschaften von Alkohol, eine Verbesserung der Insulin-Resistenz und antioxidative Eigenschaften von Inhaltsstoffen bestimmter alkoholischer Getränke, hauptsächlich jedoch auf einen HDL-erhöhenden Effekt des Alkohols zurückgeführt und einer daraus resultierenden 30 – 50%igen Reduktion an Herzerkrankungen. Durch den Genuß von einem

Bier täglich wird von einer Erhöhung des HDL um 4,4% berichtet (Denke, 2000). Durch HDL wird überschüssiges Cholesterin aus den peripheren Geweben entfernt und zur Leber zurücktransportiert. Aus diesem Grund wird HDL auch als anti-atherogen betrachtet (Halliwell und Gutteridge, 1999).

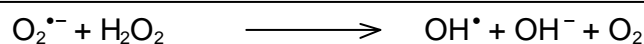
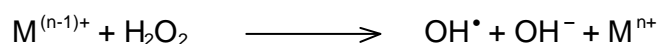
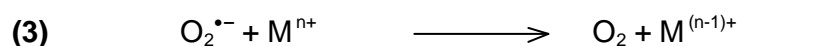
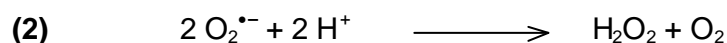
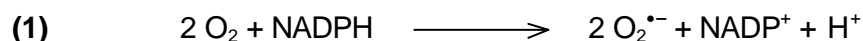
Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Fragestellung, ob es unter dem besonderen Punkt der Einhaltung des Reinheitsgebotes möglich ist, in einem Bier Substanzen anzureichern, denen wissenschaftlich fundiert positive Wirkungen hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirksamkeit in vivo nachzuweisen sind. Dieses Bier sollte durch die besondere Auswahl der Bierrohstoffe und, wie bereits erwähnt, unter Einhaltung des Reinheitsgebotes gebraut werden. Dafür wurden zuerst die verschiedenen Bierrohstoffe auf ihre antioxidative, und damit auf ihre mögliche gesundheitsfördernde Wirkung, in mehreren biochemischen Testsystemen getestet. Eine spezifischere Aussage bezüglich der gesundheitsfördernden Eigenschaften ist dadurch möglich, daß die antioxidative Kapazität nicht in einem einzigen Testsystem mit einem standardisierten Antioxidans verglichen wird (wie zum Beispiel im weitverbreiteten TEAC [Trolox equivalent antioxidant capacity]-Test), sondern daß in verschiedenen physiologisch relevanten Modellen die Schlüsselreaktionen von oxidativen Pathoprozessen nachgestellt werden, in denen die antioxidative Kapazität der jeweiligen Substanzen und Extrakte bestimmt werden kann.

Auf diesen in vitro-Ergebnissen basierend wurde in einer nächsten Stufe die physiologische Wirksamkeit in vivo anhand von Testbieren in Trinkstudien überprüft, um Empfehlungen zur Entwicklung eines „Gesundheitsbieres“ ableiten zu können.

Die durchgeführten Untersuchungen stehen dabei vor dem Hintergrund folgender biologischer Vorgänge:

• AKTIVIERTE LEUKOZYTEN

Segmentkernige neutrophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Phagozytose eingedrungener Pathogene und anderer Fremdkörper sowie in der Bildung und Sezernierung reaktiver Verbindungen und Enzyme, die den aufgenommenen Mikroorganismus abtöten sollen. Die Simulation einer Entzündung kann mit Zymosan A, einer Hefezellwandpräparation, durchgeführt werden. Nach der Zugabe von Zymosan zum Vollblut findet eine Opsonierung mit Immunglobulin G und Komplementfaktoren statt. Durch eine Interaktion dieses opsonierten Zymosans mit den Oberflächenrezeptoren der Neutrophilen kommt es zu einer Aktivierung der Immunzellen, wobei es im Verlauf des Phagozytoseprozesses zur Auslösung einer Arachidonsäurekaskade, zur Degranulation und zum respiratory burst kommt. Hierbei werden ROS wie das Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal und Singulett-Sauerstoff generiert. Durch die Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase werden auf Kosten von NADPH im Cytosol Elektronen auf den Sauerstoff im Phagosom beziehungsweise im extrazellulären Raum übertragen, wobei $O_2^{\bullet-}$ (1) entsteht, welches wiederum spontan oder SOD katalysiert zu H_2O_2 dismutiert (2). Durch Übergangsmetallkatalyse in der sogenannten Haber-Weiss-Reaktion (3) können schließlich die äußerst reaktiven OH^\bullet gebildet werden.



Das Cytoplasma der neutrophilen Granulozyten ist reich an Granula (mit Enzymen gefüllte Lysosomen), die bei der Degranulation mit dem Phagosom verschmelzen und dadurch Enzyme wie Lysozym, Elastase, Myeloperoxidase und Kollagenase freisetzen. Verschmelzen die Granula mit der Zellmembran, gelangen diese Enzyme in den extrazellulären Raum und können dort Nebeneffekte wie Entzündungen auslösen, die, bei chronischem Auftreten, zu Krankheiten wie Arthritis, Rheuma oder Arthrose führen können. Die bei der Degranulation freigesetzte Myeloperoxidase kann das während des respiratory burst generierte H_2O_2 mit Cl^- zu HOCl umsetzen (4), bei dem es sich um ein mikrobizid wirkendes, starkes Oxidans handelt.



Die Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Vollblut kann direkt über die Bildung von HOCl im Zuge der Degranulation und des respiratory burst ermittelt werden. Dieses reagiert spezifisch mit dem Indikatormolekül ACC (1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure), wobei Ethen als Spaltprodukt gaschromatographisch quantifiziert werden kann.

Im Hinblick auf die erwähnten Entzündungen und ihrem chronischen Auftreten könnten aufgrund der geschilderten Vorgänge Substanzen, die den respiratory burst abschwächen, durchaus von therapeutischem Nutzen sein (Halliwell und Gutteridge, 1999).

In dieser Hinsicht ist es außerdem als interessant anzusehen, daß im Falle von Erkältungen, die sich durch einen erhöhten Immunstatus im Zuge von Abwehrreaktionen auszeichnen, volksmedizinisch das Trinken von warmen Bier empfohlen wird.

• ATHEROSKLEROSE

Cardiovaskuläre Krankheiten gehören zu den Haupttodesursachen in Europa und den USA. Dabei sind die meisten Herzinfarkte und Schlaganfälle auf Folgeschäden des atherosklerotischen Zustandes zurückzuführen (Halliwell und Gutteridge, 1999). Ein Ansatz zur Prävention von Arteriosklerose und ihren Folgeschäden besteht in einem Oxidationsschutz des LDL (low density lipoprotein). Das LDL ist ein Lipoproteinpartikel im Blutserum und fungiert in erster Linie als ein Transportmittel für das Cholesterin zur Leber, damit es dort weiter abgebaut werden kann. Durch pathologische Prozesse kann das LDL jedoch so modifiziert werden, daß es von den Makrophagen im Blut nicht mehr über den LDL-Rezeptor, der für eine geregelte Aufnahme in die Fresszellen zuständig ist, erkannt wird. Es folgt statt dessen eine unkontrollierte Aufnahme von LDL über den Scavenger-Rezeptor. Diese Makrophagen sedieren schließlich in der Intima der Blutgefäßwände, werden zu sogenannten Schaumzellen und können dort zu Ausgangsherden der arteriosklerotischen Plaquebildung mit ihren bekannten Folgeschäden werden. Eine Oxidation des LDL-Partikels kann zu einer solchen Modifikation führen, die nach der gängigen Lehrmeinung als Ausgangspunkt der geschilderten Vorgänge betrachtet wird. Für eine Untersuchung von LDL-Partikeln hinsichtlich eines Oxidationsschutzes ist die durch Kupferionen ausgelöste LDL-Oxidation ein anerkanntes Modell, wobei einerseits eine Schutzwirkung durch eine Anreicherung von lipophilen Antioxidantien im LDL erreicht werden kann, andererseits die Oxidation durch eine Komplexbildung der induzierenden Kupferionen im umgebenden wässrigen Milieu verhindert werden kann.

• DIABETES MELLITUS

Diabetes zählt zu den häufigsten Erkrankungen der westlich geprägten Bevölkerung. Bei der diabetischen Erkrankung, die sich vor allem durch einen hohen Glucosespiegel im Blut auszeichnet, spielt die Autoxidation von Zuckern für die beobachteten Blutgefäß- und Organschäden eine erhebliche Rolle. Die während der Autoxidation von Zuckern gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies sind in der Lage, LDL oxidativ zu modulieren und stehen damit im Zusammenhang mit den schweren atherosklerotischen Komplikationen bei zuckerkranken

Patienten. Auch die Ausbildung des bei Diabetes mellitus auftretenden grauen Stars (Katarakt), bei dem es sich um eine Trübung der Augenlinse aufgrund oxidativer Veränderungen an den Linsenproteinen handelt, wird auf eine Zuckerautoxidation, die Übergangsmetallkatalysiert zum Beispiel durch Kupferionen ausgelöst werden kann, zurückgeführt. In diesem Zusammenhang sollte den Extrakten oder Substanzen eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden, die in der Lage sind, Kupfer und andere Übergangsmetalle zu komplexieren.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde das Hauptaugenmerk auf die Wirkung von Bier hinsichtlich der antioxidativen Effekte *in vivo* gerichtet, unabhängig davon, welche Substanzen aus dem Bier aufgenommen werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde in einer Humanstudie speziell die Absorption einer bestimmten Gruppe von phenolischen Säuren untersucht, nämlich die Aufnahme von Hydroxyzimtsäuren (**Abb. 2**) und Dimeren der Ferulasäure (Diferulate genannt, **Abb. 3**) aus Frühstückszerealien, die einen hohen Anteil an Weizenkleie enthalten. Auch im Bier konnten die abgebildeten Hydroxyzimtsäuren identifiziert werden (siehe oben), was auch auf die Verwendung der gleichen Rohfrucht in Form von Getreide zurückzuführen ist.

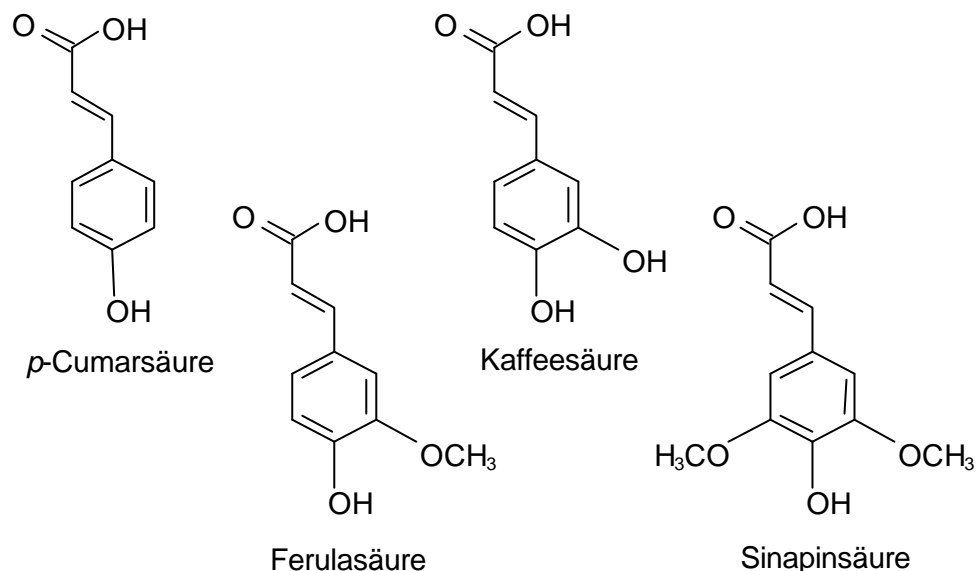


Abbildung 2: Chemische Struktur diätetisch vorkommender Hydroxyzimtsäuren

Phenolische Säuren haben neben den Flavonoiden aufgrund ihrer bioaktiven Eigenschaften und einem dadurch möglichen gesundheitlichen Nutzen in den letzten Jahren verstärkt Aufmerksamkeit erlangt. Besonders aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung *in vitro* (Graf, 1992; Rice-Evans et al., 1996; Garcia-Conesa et al., 1997a,b, 1999a; Natella et al., 1999; Andreasen et al., 2001c; Kikuzaki et al., 2002) und ihrer antikanzerogenen Eigenschaften (Huang et al., 1988; Kawabata et al., 2000) stehen diese „phytochemicals“ im Vordergrund des Interesses.

Um ihren möglichen Beitrag hinsichtlich einer Gesundheitsförderung *in vivo* abschätzen zu können, ist es wichtig, der Frage nachzugehen, ob diese Substanzen überhaupt bioverfügbar sind, ob die absorbierten Substanzen metabolischen Umwandlungen wie zum Beispiel in der Leber unterworfen sind, ob sie andere Gewebe im Körper erreichen, um dort eine gesundheitsfördernde Wirkung entfalten zu können und wie schnell sie über den Urin wieder ausgeschieden werden (ADME = Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion).

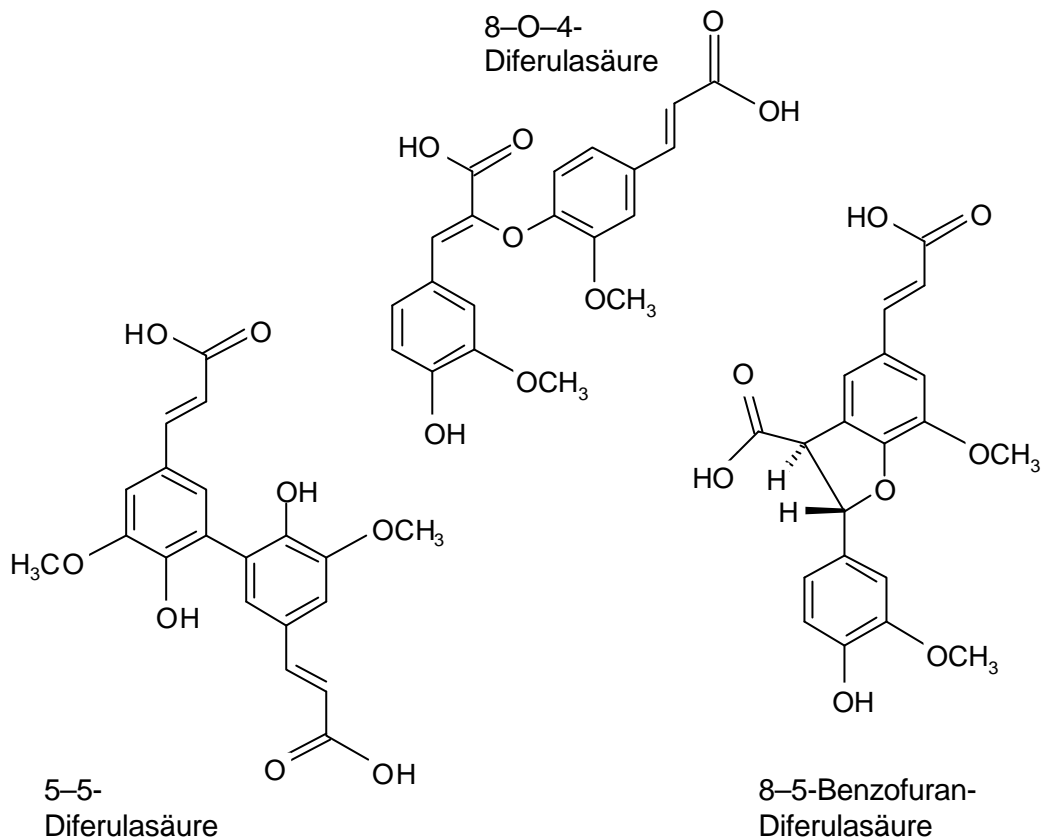


Abbildung 3: Strukturen von in Weizenkleie vorhandenen Diferulasäuren

In den letzten Jahren wurden deshalb bereits etliche Humanstudien durchgeführt, die sich mit der Absorption von Hydroxycimtsäuren, insbesondere von Ferulasäure und Kaffeesäure, aus verschiedenen Nahrungsmitteln befassen. Dabei wurden Bioverfügbarkeitsstudien mit Bier (Bourne et al., 2000), Tomaten (Bourne und Rice-Evans, 1998a), Kaffee (Rechner et al., 2001; Olthof et al., 2001; Nardini et al., 2002), Pycnogenol (Virgil et al., 2000), *Equisetum*-Extrakt (Gräfe und Veith, 1999), Rotwein (Simonetti et al., 2001), Früchten (Bourne und Rice-Evans, 1998b), Pflaumen (Cremin et al., 2001) und mit polyphenolreicher Kost (Rechner et al., 2002) durchgeführt.

Anhand dieser weitgestreuten Quellen läßt sich erkennen, daß Hydroxycimtsäuren als sekundäre Pflanzenstoffe in sehr vielen Nahrungsmitteln pflanzlichen Ursprungs vorhanden sind (Kroon und Williamson, 1999). In einer Nationalen Verzehrsstudie wurde eine mittlere Phenolsäurezufuhr von 222 mg/d angegeben, wobei Kaffee und Obst/-produkte/-säfte als wichtigste Zufuhrquellen für Phenolsäuren angegeben wurden (Radke et al., 1998).

Die meisten Zimtsäuren in den Nahrungsmitteln und Getränken liegen jedoch gebunden in Form von Chlorogensäuren und ihren Derivaten, anderen Estern, Amiden und Glycosiden vor, sowie als Transformationsprodukte, die während des Herstellungsprozesses gebildet werden (Clifford, 1999). Speziell Getreidekleien und mit Kleie angereicherte Produkte werden als die wichtigste Quelle zellwandgebundener Zimtsäuren eingeschätzt, wobei Clifford (1999) auf fehlende Daten hinsichtlich der Gehalte in Brot, Kuchen und in Frühstückszerealien hinweist.

Es wird vermutet, daß die durch den Verzehr von Vollkornprodukten aufgenommenen Polyphenole zumindest teilweise für die gesundheitsfördernden Effekte hinsichtlich Herz-Kreislauf-Erkrankungen und bestimmter Formen von Krebs, speziell von Darm- und Brustkrebs, verantwortlich sind (Ferguson und Harris, 1999). Getreidekleie enthält vor allem

signifikante Mengen an Ferulasäure sowie Dehydrodimere der Ferulasäure, die jedoch vorwiegend mit Hemizellulosekomponenten, genauer gesagt mit der Arabinofuranose der Heteroxylane und der Xylose der Xyloglucane (Faulds und Williamson, 1999), verestert sind und deshalb in dieser Form nicht verfügbar sind (Andreasen et al., 2001b). Die Diferulate kommen in verschiedenen Formen vor, die aus 5–5-, 8–O–4-, 8–5- und 8–8-Kopplungen zweier Ferulasäuremoleküle resultieren (**Abb. 3**), und wurden von Ralph et al. (1994) zuerst beschrieben. Auch hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaften sind die Diferulate als interessant anzusehen, da sie sowohl in der wässrigen als auch in der lipophilen Phase *in vitro* effektivere Antioxidantien darstellen als die Ferulasäure alleine (Garcia-Conesa et al., 1997b; Garcia-Conesa et al., 1999a; Andreasen et al., 2001c).

Die Löslichkeit und Aktivität der Phenole in Weizenkleie könnten durch die sauren Bedingungen und die enzymatische Hydrolyse während des Verdauungsvorgangs erhöht werden (Baublis et al., 2000). Sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm des Menschen sind Esterasen vorhanden, die in der Lage sind, diätetisch gebundene Hydroxycimtsäuren zu hydrolysieren (Andreasen et al., 2001a; Kroon et al., 1997). Dies wäre ein wichtiger Schritt, um durch eine Hydrolyse die freien Säuren aus der Zerealienmatrix in das Darmlumen zu entlassen, die dann für eine Absorption zur Verfügung stehen würden. Daß eine Absorption von Diferulaten möglich ist, konnte an Ratten gezeigt werden, wobei die Dehydrodimere der Ferulasäure als in Öl gelöste Reinsubstanzen oral administriert wurden und anschließend im Plasma identifiziert werden konnten (Andreasen et al., 2001b).

Auch andere Arbeitsgruppen führten Studien mit Ratten durch, um die Bioverfügbarkeit von Hydroxycimtsäuren, darunter speziell der Ferulasäure, ihren Metabolismus sowie ihre Exkretion zu untersuchen (Choudhury et al., 1999; Spencer et al., 1999; Rondini et al., 2002). Dabei wurde die Ferulasäure nicht nur als freie Säure angeboten, sondern auch als Ferulasäure-Zuckerester (Zhao et al., 2003) und in Form von Zerealien (Adam et al., 2002), wobei Sulfo- und Glucuronid-Konjugate als Metaboliten im Plasma und im Urin der Ratten identifiziert werden konnten.

Aufgrund der soeben aufgeführten Tatsachen erscheint eine Absorption von Diferulaten aus einer Zerealienmatrix möglich. Deshalb wurde im Rahmen eines von der EU geförderten Marie Curie Fellowship am Institute of Food Research (IFR) in Norwich, UK, das Projekt „Diferulasäuren als bioaktive Pflanzen-Polyphenole: Biologische Effekte und Bioverfügbarkeit im Menschen“ gestartet. Das Ziel dieser Humanstudie waren Untersuchungen zur Absorption von Hydroxycimtsäuren und Diferulaten aus Frühstückszerealien mit einem hohen Anteil an Weizenkleie, da bisher noch keine Daten hinsichtlich einer Freisetzung und Aufnahme dieser phenolischen Säuren aus einer solch komplexen Nahrungsmatrix im menschlichen Körper erhoben wurden. Weiterhin sollte eine Identifizierung der möglichen Metaboliten im Blutkreislauf und der Ausscheidungsprodukte im Urin stattfinden. In diesem Zusammenhang wurden die verwendeten Zerealien auf ihren Gehalt an phenolischen Säuren untersucht und geben damit erstmals einen Anhaltspunkt für die Zusammensetzung kommerziell erhältlicher Frühstückszerealien in Bezug auf die identifizierten Phenolsäuren.

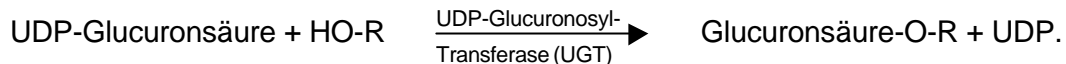
Wie bereits zuvor erwähnt, stellt dieses Projekt den zweiten Teil dieser Dissertation dar, wobei neben der Durchführung der Humanstudie zusätzlich noch Zellexperimente zum Metabolismus von diätetisch vorkommenden Hydroxycimtsäuren an Caco-2 Zellen durchgeführt wurden, um den Beitrag des Dünndarmepithels zur möglichen Biotransformation im sogenannten „first pass metabolism“ zu untersuchen.

Vom Körper werden Biotransformationen zur Entgiftung körperfremder Stoffe, sogenannter Xenobiotika, durchgeführt. Dabei werden lipophile Substanzen enzymatisch in polarere und damit wasserlöslichere Derivate umgewandelt, um ihre Ausscheidung zu erleichtern. Bei der Detoxifizierung werden Phase I und Phase II Reaktionen unterschieden, die hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Organen wie Lunge, Niere und Darm stattfinden. Phase I Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, daß über eine Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt beziehungsweise frei werden, die dann einer Phase II Konjugation unterzogen werden können. Eine wichtige Reaktion zur Einführung einer

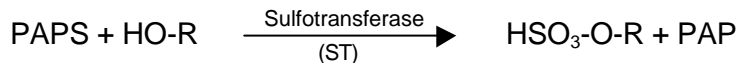
solchen Gruppe ist eine Hydroxylierung durch unspezifische Monooxygenasen, die meist Cytochrom P-450 enthalten. Diese Bioaktivierung kann mitunter aber auch zu reaktiveren Intermediaten führen, die toxischer sein können als die Ausgangssubstanz.

Die Produkte aus Phase I und andere Xenobiotika, die bereits funktionelle Gruppen enthalten, können folgenden Konjugationsreaktionen (Phase II Reaktionen) mit endogenen Metaboliten unterzogen werden: Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung, sowie Konjugation mit Glutathion oder Aminosäuren wie Glycin, Taurin, Glutamin, Ornithin und Arginin.

Relativ häufig kommt die Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure (Uridindiphosphat-Glucuronsäure, UDPGA) vor, die von einer UDP-Glucuronosyl-Transferase, einem mikrosomalen Enzym, katalysiert wird:



Für Phenole ist die Bildung von Sulfaten eine wichtige Konjugationsform. Diese Reaktion erfordert aktiviertes Sulfat, das 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS), und wird über cytosolische Sulfotransferasen katalysiert. Unter den verschiedenen Isoenzymen ist hierbei die Phenol-Sulfotransferase zu nennen, die in der Leber, im Darm und in den Nieren vorkommt.



Zwischen diesen beiden Detoxifizierungswegen kann es zu einer Competition um das Substrat kommen. Allgemein läßt sich sagen, daß die Sulfat-Konjugation bei niedrigen Substratkonzentrationen dominiert, während bei höheren Konzentrationen die Glucuronid-Bildung aufgrund der Reaktionskinetiken und des limitierten Vorrat an PAPS in der Zelle im Vergleich zu UDPGA überwiegt (Mulder, 1984).

Desweiteren werden aromatische Carbonsäuren häufig über CoA-Derivate mit Glycin gepaart, wie z.B. die Konjugation von Benzoesäure zu Hippursäure:



Die frühen Studien zum Metabolismus von aromatischen Säuren wurden von Scheline (1991) zusammengefaßt. Vor allem in Tierstudien und durch Inkubationen mit der mikrobiellen Darmflora wurden der Metabolismus und die bakterielle Degradierung von verschiedenen Hydroxymitsäuren untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum sogenannten „first pass“ Metabolismus von Hydroxymitsäuren an Caco-2 Zellen durchgeführt.

Die Caco-2 Zell-Linie stammt ursprünglich von einem humanen colorectalen Carcinom ab. Sobald diese Zellen den Zustand der Konfluenz erreicht haben, differenzieren sie unter konventionellen Kulturbedingungen spontan zu Enterozyten und stellen damit ein Modell für das Dünndarmepithel dar. Einige aktive Transportsysteme, die im intestinalen Epithel lokalisiert sind, werden auch in Caco-2 Zellen exprimiert sowie Enzyme, die in den Membranen des Bürstensaums gefunden werden (z.B. Aminopeptidase, alkaline Phosphatase und Sucrase). Außerdem wurde von der Existenz von Phase I (u.a. CYP1A1) und Phase II Enzymen (Glutathion-S-Transferase, Glucuronidase und Sulfotransferase) in diesem Zellsystem berichtet. Aufgrund der morphologischen und biochemischen Ähnlichkeiten zwischen Caco-2 Monolayern und dem intestinalen Epithel werden Caco-2 Zellen weltweit als in vitro Modell für Absorptionsstudien benutzt (Gan und Thakker, 1997).

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung der antioxidativen Kapazitäten von Bier und Bierinhaltsstoffen in verschiedenen Modellsystemen. Weiterführend sollte auf der Basis dieser Ergebnisse versucht werden, antioxidativ wirksame Substanzen in Zusammenarbeit mit der Paulaner Brauerei unter Einhaltung des Reinheitsgebotes im Bier anzureichern. Dabei sollte ihre physiologische Wirksamkeit *in vivo* in Form von Trinkstudien überprüft werden, um im Zuge dessen Empfehlungen für die Entwicklung eines gesundheitsfördernden Bieres ableiten zu können.

Ein Bestandteil von Bier ist die antioxidativ wirksame Ferulasäure, deren Ursprung hauptsächlich zellwandgebunden im Braugetreide zu finden ist. Dahingehend befaßt sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit der Untersuchung zur Absorption von Hydroxyzimtsäuren und Diferulaten aus Frühstückszerealien, die durch einen hohen Anteil an Weizenkleie eine reiche Quelle für zellwandgebundene Ferulasäure darstellen. Im Zusammenhang mit dieser Humanstudie sollten auch mögliche Metaboliten im Blutkreislauf und im Urin identifiziert werden. Einen weiteren Anhaltspunkt bezüglich der Absorption und des „first pass metabolism“ von Hydroxyzimtsäuren wie der Ferulasäure sollten Studien mit Caco-2 Zellen als *in vitro*-Modell für das Dünndarmepithel liefern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Name	M (g/mol)	Hersteller	Artikel- nummer
1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure	101,10	Sigma	A-3903
Acetonitril	41,05	Merck	1.00030
Acetonitril	41,05	Riedel-de Haën	34888
Ascorbinsäure	176,10	Sigma	A-5960
Borsäure	61,83	Merck	165
Calciumchlorid Dihydrat	147,02	Merck	2382
(-)- <i>trans</i> -Caryophyllen (β -Caryophyllen)	204,40 Dichte: 0,9	Sigma	C-9653
<i>o</i> -Cumarsäure	164,16	Avocado Research Chemicals Ltd.	11740
<i>p</i> -Cumarsäure	164,16	Lancaster Synthesis Ltd.	2561
Dextran	ca. 580000	Sigma	D-5251
Diaphorase (aus Schweineherz)		Boehringer Mannheim	104 345
Dichlormethan	84,93	Merck	1.06044
Diethylcyanophosphanat	163,11	Lancaster Synthesis Ltd.	14107
Dihydroxyfumarsäure	148,10	Sigma	D-8128
Dimethylformamid	73,10	Fluka	40255
Dimethylsulfoxid (DMSO)	78,13	Sigma	D-5879
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	278,00	Sigma	F-7002
Essigsäure	60,05	Merck	1.00063
Essigsäure	60,05	Riedel-de Haën	33209
Ethan Prüfgas		Messer-Griesheim	
Ethanol	46,07	Merck	1.00983
Ethanol	46,07	BDH Laboratory Supplies	10107
Ethen Prüfgas		Messer-Griesheim	
Ethylacetat	88,11	Riedel-de Haën	34858
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	372,24	Merck	8418
<i>trans</i> -Ferulasäure	194,20	Sigma	F-3500
β -Glucuronidase (<i>E. coli</i> , EC 3.2.1.31, Typ IX-A)		Sigma	G-7396
Glycinmethylester-hydrochlorid	125,56	Lancaster Synthesis Ltd.	6661
Helium		Messer-Griesheim	
α -Humulen	204,40 Dichte: 0,9	Sigma	H-5887
Hydroxylammoniumchlorid	69,49	Merck	4614
Iso-Ferulasäure	194,20	Aldrich	10.301-2

Name	M (g/mol)	Hersteller	Artikel- nummer
Kaffeensäure	180,20	Sigma	C-0625
Kaliumbromid	119,00	Merck	1.04905
Kaliumchlorid	74,56	Merck	4936
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	Merck	4873
α -Keto- γ -methiolbuttersäure (KMB)	170,20	Sigma	K-6000
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	249,68	Merck	2790
α -Linolensäure	278,40	Sigma	L-2376
Magnesiumchlorid Hexahydrat	203,30	Sigma	M-9272
Magnesiumsulfat (Anhydrat)		BDH Laboratory Supplies	29118
Methanol		Merck	1.06007/ 1.13351
Methanol		Fisher Chemicals	32.04
Methansulfonsäure	96,10	Sigma	M-6391
Methylferulat	208,22	Apin Chemicals Ltd.	02838m
Methylkaffeat	194,16	Apin Chemicals Ltd.	18706m
Methyl- <i>p</i> -Cumarat	178,17	Apin Chemicals Ltd.	16975m
1-Methyl-2-phenylindol		Sigma	M-1164
Methylsinapat	238,22	Apin Chemicals Ltd.	18703m
Myrcen	136,24 Dichte: 0,793	Merck	8.14593
N-(1-Naphthyl)Ethylendiamin- dihydrochlorid (NED)	259,20	Sigma	N-9125
Natriumacetat	82,03	Merck	6268
Natriumbicarbonat	84,01	Sigma	S-6014
Natriumcarbonat	105,99	Sigma	S-1641
Natriumchlorid	58,44	Merck	6404
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	137,99	Merck	1.06346
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	177,99	Merck	1.06580
Natriumhydroxid	40,00	Merck	6498
Natriumhydroxid	40,00	Riedel-de Haën	30620
Natriumtetraborat	201,22	Merck	6310
β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH)	709,40	Sigma	N-6005
n-Hexan	86,18	Merck	1.04369
n-Hexan	86,18	Merck	1.04374
Ocimen	136,24	Fluka	74730
PBS (10x) W/O Calcium + Magnesium		Gibco Invitrogen Corporation	14200-059
Proteinassay-Farbstoffkonzentrat		Bio-Rad	500-0006
Rindereserumalbumin (BSA)		Sigma	A-2153
Rose Bengal	1017,60	Sigma	R-3877
Saccharose	342,30	Sigma	S-8501
Saccharose	342,30	Fluka	84 100
Salzsäure	36,46	Merck	1.00319

Name	M (g/mol)	Hersteller	Artikel- nummer
Salzsäure	36,46	Riedel-de Haën	30721
Sinapinsäure	224,20	Sigma	D-7927
Stickstoff Typ 5.0		Messer-Griesheim	
Sulfanilamid	172,20	Sigma	S-9251
Sulfatase (<i>Helix pomatia</i> , EC 3.1.6.1, Typ H-1)		Sigma	S-9626
Superoxiddismutase		Sigma	S-2515
Synthetische Luft		Messer-Griesheim	
α -Tocopherol	430,70	Sigma	T-4389
α -Tocopherolacetat	472,80	Sigma	T-3376
Triethylamin	101,20	Sigma	T-0886
Trifluoressigsäure	114,00	Sigma	T-6508
Trypanblau	960,80	Merck	11732
Tween 20		Merck	822184
Vanillin	152,10	Sigma	V-2375
Vanillinsäure	168,10	Sigma	V-2250
Wasserstoff Typ 5.0		Messer-Griesheim	
Wasserstoffperoxid	34,01	Merck	1.08597
Xanthin	152,10	Sigma	X-0125
Xanthinoxidase		Boehringer Mannheim	110 442
Zymosan A		Sigma	Z-4250

Substanzen für Zellkultur	Hersteller	Artikelnummer
EMEM medium (Eagle's minimum essential medium)	Sigma	M-2279
Fötales Kalbserum (fcs)	Gibco Invitrogen Corporation	
Natrium bicarbonat 7,5%	Gibco Invitrogen Corporation	25080-060
Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 μ g/ml)	Gibco Invitrogen Corporation	15140-122
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Sigma	M-7145
L-Glutamin (200 mM)	Sigma	G-7513
Trypsin EDTA	Gibco Invitrogen Corporation	15400-054
PBS (10x) W/O Calcium + Magnesium	Gibco Invitrogen Corporation	14200-059

Die als Standardsubstanzen verwendeten Diferulate (8–5(offene Form)-, 8–5-Benzofuran-, 8–O–4-, 5–5-Diferulat) und die für die Metabolismus-Studien mit Caco-2 verwendeten Diethylester der Diferulate wurden von M.-T. Garcia-Conesa, Institute for Food Research, Norwich, zur Verfügung gestellt.

Das synthetisierte Ferulasäure- und das Sinapinsäure-Sulfat wurden von P. Needs, Institute for Food Research, Norwich, nach einer Beschreibung von Todd et al. (1993) hergestellt. Die bereits relativ reinen Rohextrakte aus dieser Synthese wurden nicht weiter aufgereinigt. Durch HPLC/DAD- und LC/MS-Analysen (m/z 273 $[M - H]^-$ für Ferulasäure-Sulfat und m/z 303 $[M - H]^-$ für Sinapinsäure-Sulfat) konnte das Vorhandensein der Hydroxyzimtsäure-Sulfate bestätigt werden.

2.1.2. Geräte und Laborartikel

Lehrstuhl für Phytopathologie, TUM:

pH-Meter	Orion Research 701 A, Bachhofer
Photometer	Kontron Uvikon Modell 930 und Modell 922 Pharmacia LKB Ultrospec III
Thermostat	2209 Multitemp, Pharmacia LKB Bromma Julabo F 18
Zentrifugen	Ultrazentrifuge Optima LE-70, Beckman mit Swinging Bucket Rotor SW 40 Ti Biofuge A, Heraeus Sepatech Minifuge RF, Heraeus Centrifuge 5810 R, Eppendorf
Gaschromatographen	Varian Star 3400 CX mit Shimadzu Integrator C-R6A Chromatopac Säulen: 1/8 Zoll x 80 cm Aluminiumoxid 1/8 Zoll x 100 cm Aluminiumoxid Detektor: FID Säulentemperatur: 80 °C Injektionstemperatur: 80 °C Detektionstemperatur: 225 °C Trärgas: Stickstoff (25 ml/min) Brennergase: Wasserstoff (25 ml/min) Synthetische Luft (250 ml/min) DANI GC 86.10 mit PTV und FID mit Integrationseinheit ESWE-Analysentechnik und Apex 2.06 Software Säule: Fisons DB-225; Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 25 µm
HPLC-Anlage	Solvent Delivery Module Typ 112 und Typ 114 M, Beckman Hochdruckmischkammer und Injektor (20 µl Probenschleife) ALTEX 210 A Valve, Beckman, Organizer Typ 340, Beckman System Controller Model 420, Beckman Säule: reversed phase, Hypersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm Säulen-Thermostatisiereinheit, Waters Festwellendetektor Typ 160, Beckman Integrator Chromatopac C-R1B, Shimadzu
Waagen	MC1 Analytic AC 210 S Feinwaage Modell 2474, Sartorius
Whirly Mix	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Wasserschüttelbad	Köttermann Labortechnik
Lyophilisator	Lyovac, Finn-Aqua
Vakuum-Konzentrator	Christ RVC 2-18 mit Membranvakuumpumpe CVC 2, Vacuubrand
Wasserbad belichtet	Selbstgebaut von Mitarbeitern des Lehrstuhls
Inkubationsrad	Selbstgebaut von Mitarbeitern des Lehrstuhls
Kugelmühle	I.G. Braun
Zählkammer	Typ:Thoma, Brand
Mikroskop	Leitz
Insulinspritzen	Mikrofine IV, Plastipac
Gelfiltrationssäule	EconoPac DG-10, Bio-Rad
Sterilfilter 0,2 µm	Nr. 191-2020, Nalge Nunc International
Bidest-Anlage	Seralpur PRO 90 CN, Seral

IFR, Norwich:

Zentrifugen	Centrifuge Sigma 4 K10, Howe Biofuge pico, Heraeus
Waagen	Sartorius
Rotoevaporator	RE 111, Buechl
HPLC-Anlage	Gilson HPLC System mit binärem Gradientenpumpsystem (Model 306), dynamischem Mixer (Model 811 C), Dilutor (Model 401 C), Autoinjektor (Model 231 X), Injektionsschleife 200 µl und Gilson DAD (Model 170). Säule: Prodigy ODS 3 reversed phase-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, UK). System-Kontrolle durch Gilson Unipoint software (Version 1.71).
LC/MS-Anlage	Micromass Quattro II triple quadrupole Massenspektrometer (Micromass) mit Jasco PU-1585 triple pump HPLC, AS-1559 gekühlter Autoinjektor, CO-1560 Säulenofen und UV Detektor (Jasco Ltd.) Säulentemperatur: 25 °C Autoinjektor: 4 °C Aufteilung der Eluenten-Flußrate von 1 ml/min zwischen Massenspektrometer und UV Detektor im Verhältnis 1:5 durch ASI 600 fixed splitter valve (Presearch), gemessen mit Humonics Optiflow 1000 flowmeter (Sigma-Aldrich). Micromass Z-spray™ Ionenquelle mit folgenden Parametern: Electrospray-Kapillarspannung: 3,5 kV Source block-Temperatur: 120 °C Desolvationstemperatur: 350 °C. Flußraten von Stickstoff als „drying gas“: 500 l/h und „nebulising gas“: 15 l/h. Säule: Prodigy ODS 3 reversed phase-column (250 x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, UK). Software: Micromass MassLynx™ Version 3.4
Inkubator	5% CO ₂ , 95% Luft, 37 °C
Bidest-Anlage	Millex Q plus System, Millipore (Grad: 18 Ü)

2.1.3. Puffer und Lösungen

- Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,4

Lösung A: 0,2 M Na₂HPO₄ · 2 H₂O (35,6 g/l)

Lösung B: 0,2 M NaH₂PO₄ · H₂O (27,6 g/l)

Einstellen des pH-Wertes mit Lösung B.

- PBS-Puffer für Vollblut-System, pH 7,2

NaCl 8,0 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ · 2 H₂O 1,44 g

KH₂PO₄ 0,2 g

MgCl₂ · 6 H₂O 0,1 g in 900 ml Aqua bidest lösen,

CaCl₂ · 2 H₂O 0,1 g gesondert in 100 ml Aqua bidest anlösen und zugeben, Einstellen des pH-Wertes mit HCl.

- PBS-Puffer für LDL-Versuche
9,0 g NaCl in 100 ml Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4) lösen und ad 1 l mit Aqua bidest auffüllen.
- Boratpuffer 0,2 M, pH 9,0
Lösung A: 0,2 M H_3BO_3 (12,4 g/l)
Lösung B: 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (10,1 g/l)
Einstellen des pH-Wertes mit Lösung A.
- α -Linolensäure-Lösung, 71 mM
0,5 ml Tween 20 in 10 ml Boratpuffer (0,2 M, pH 9,0) lösen, tropfenweise 0,5 ml α -Linolensäure unter leichtem Rühren emulgieren, 1,3 ml 1 N NaOH zugeben und rühren, bis eine klare Lösung entsteht; mit 12,7 ml Boratpuffer auf 25 ml Endvolumen auffüllen.
- Carbonatpuffer 0,2 M, pH 10,0
Lösung A: 0,2 M Na_2CO_3 (21,2 g/l)
Lösung B: 0,2 M NaHCO_3 (16,8 g/l)
Einstellen des pH-Wertes mit Lösung B.
- Acetat-Puffer 0,2 M, pH 4,0
Lösung A: 0,2 M CH_3COOH (11,4 ml/l)
Lösung B: 0,2 M CH_3COONa (16,4 g/l)
Einstellen des entsprechenden pH-Wertes mit Lösung A.
- NaCl-Lösung 0,9%
9,0 g NaCl in 1 l Aqua bidest lösen.
- Dextranlösung 1,5%
15,0 g Dextran in 1 l NaCl-Lösung 0,9% lösen.
- Trypanblau-Lösung
100,0 mg Trypan Blau in 20 ml NaCl-Lösung 0,9% lösen.
- Dichtelösungen
Lösung A: 40,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen, die Dichte wird durch Zusatz von KBr auf genau 1,08 g/ml eingestellt.
Lösung B: 25,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen, die Dichte wird durch Zusatz von KBr auf genau 1,05 g/ml eingestellt.
Lösung C: 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen.
- MPI-Lösung = Methyl-phenylindol-Lösung, 11,4 mM
1,18 g 1-Methyl-2-phenylindol in 500 ml Acetonitril (CH_3CN) lösen (im Kühlschrank haltbar). Vor Gebrauch werden drei Teile dieser MPI-Lösung mit einem Teil Methanol (CH_3OH) versetzt.
- MS-Lösung = Methansulfonsäure-Lösung, 10,4 M
Methansulfonsäure mit Aqua bidest verdünnen: 3,25 ml H_2O auf Eis vorkühlen und vorsichtig 6,75 ml Methansulfonsäure zupipettieren, abkühlen lassen und vorsichtig umrühren.
- Enzym-Lösungen (β -Glucuronidase- und Sulfatase)
 β -Glucuronidase (5000 U/ml) und Sulfatase (1000 U/ml) wurden in PBS-Puffer (1:10 Verdünnung des Konzentrats von Gibco) angelöst, in Aliquots bei -12°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

2.1.4. Probenmaterial

Von der Paulaner Brauerei GmbH & Co. KG wurden folgende Biere und Bierinhaltsstoffe zur Verfügung gestellt:

- Helles Bier als Kontrollbier bzw. Grundlage für Testbier Nr. 1,
Ethanolgehalt 4,9%, Gesamt-Polyphenolgehalt 134 mg/l
- Testbiere:
 - Nr. 1: Helles Bier mit Zusätzen (siehe unten)
 - Nr. 2: teilentalkolisierter Salvator, Ethanolgehalt 5,0%,
Gesamt-Polyphenolgehalt 295 mg/l
 - Nr. 3: Bier mit erhöhtem Hopfengehalt, Ethanolgehalt 5,4%,
Gesamt-Polyphenolgehalt 215 mg/l
 - Nr. 4: Salvator, Ethanolgehalt 5,2%
 - Nr. 5: entalkolisierter Salvator, Ethanolgehalt 1,4%
 - Nr. 6: Märzen mit erhöhtem Hopfen- und Stammwürzegehalt,
Ethanolgehalt 5,6%

Desweiteren wurde mit folgenden Bierrohstoffen gearbeitet, die, in Aliquots abgefüllt, bei $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut wurden:

- Maische: wässriger Überstand des geschroteten Braugetreides nach Zentrifugation bei $17950 \times g$ für 10 min; wird im folgenden „Maische-Fraktion“ genannt
- Untergärige Hefe (unter Vermehrungsbedingungen): wässriger Überstand nach Zentrifugation bei $17950 \times g$ für 10 min; wird im folgenden „Hefe-Fraktion“ genannt
- Läuterwürze
- Anstellwürze
- Hopfenpellets: verwendet wurden, nachdem die Pellets mit einer Kugelmühle klein gemörsert worden waren (je vier Pellets mit zwei Achatkugeln für 2 min), folgendermaßen hergestellte Extrakte:
 - Ethanolischer Extrakt: 10 mg/ml EtOH
 - Saurer Extrakt: 400 mg/50 ml Acetatpuffer pH 4, für 60 min bei Raumtemperatur gerührt, Zentrifugation bei $17950 \times g$ für 10 min, verwendet wurde der Überstand
 - Alkalischer Extrakt: 400 mg/50 ml Carbonatpuffer pH 10, für 60 min bei Raumtemperatur gerührt, Zentrifugation bei $17950 \times g$ für 10 min, verwendet wurde der Überstand
- Hopfenextrakt:
 - Ethanolischer Extrakt: 25 mg/ml EtOH
 - Alkalischer Extrakt: 1 g/50 ml Carbonatpuffer, für 60 min bei Raumtemperatur gerührt; der lipophile Anteil wurde entfernt

Herstellung von Testbier Nr. 1: Zu jeweils 500 ml Hellem Bier mit einem Ethanolgehalt von 4,9% wurden folgende Zusätze zugegeben:

- 40 g eines Maische-Lyophilisats (der wasserlösliche Anteil der Maische wurde 10 min gekocht, nach dem Abkühlen zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert)
- 125 mg Hopfenextrakt in 500 μl Ethanol (96%, aus einer Apotheke) gelöst
- 75 mg eines Hopfenpellet-Lyophilisats (dazu wurden 2,5 g gemahlene Hopfenpellets in 125 ml 1:50 verdünnter handelsüblicher Essigessenz [in Anlehnung an den pH-Wert beim Würzekochen] suspendiert, 30 min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert)

Durch die Zugabe des in Ethanol gelösten Hopfenextraktes erhöhte sich der Alkoholgehalt des Testbieres 1 um 0,1% auf 5,0%. Dementsprechend wurde auch das Kontrollbier im Versuch mit der entsprechenden Menge an Ethanol versetzt.

2.2. METHODEN ZUR BESTIMMUNG ANTIOXIDATIVER KAPAZITÄTEN VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN

2.2.1. Biochemische Testsysteme

Die nachfolgend beschriebenen Modellsysteme beruhen (mit Ausnahme des Systems der Hydroxylaminoxidation und der LDL-Oxidation) auf der gaschromatographischen Bestimmung von Ethen, welches nach einem Angriff verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus dem zugesetzten Indikatormolekül α -Keto- γ -methiolbuttersäure (KMB), der α -Linolensäure oder durch Hypochlorige Säure aus 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) freigesetzt wird. Die jeweilige Reaktion wurde in volumengeeichten gasdicht verschlossenen Reagenzgläsern durchgeführt ($n = 4$), wobei die Kontrollreaktion je nach zu untersuchendem Extrakt mit dem entsprechenden Lösungsmittel (z.B. EtOH), Puffer oder bidestilliertem Wasser anstatt der Probe durchgeführt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden mit gasdichten Insulinspritzen 1 ml-Gasaliquots aus dem Kopfraum der Reagenzgläser (Headspace) abgezogen und gaschromatographisch quantifiziert. Nach täglicher Bestimmung des Eichfaktors mit Hilfe von Prüfgas wurde die im Ansatz enthaltene Ethen- oder Ethanmenge nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Area x (Gesamtvolumen [ml] – Probenvolumen [ml])}}{\text{Eichfaktor [ml / pmol]}} = \text{Ethen bzw. Ethan [pmol]}$$

Für die Bestimmungen zur antioxidativen Kapazität von Plasma wurde dieses gemäß seines IC_{50} -Wertes den verschiedenen Testsystemen zugegeben (Janisch et al., 2002). Der IC_{50} -Wert wurde als diejenige Plasmamenge (aus einem Plasmapool) definiert, die zu einer 50%igen Hemmung der jeweiligen Grundreaktion der Testsysteme führte. Die IC -Werte der Testsubstanzen wurden anhand einer Ausgleichskurve durch die Meßpunkte mit der Software MicrocalTM OriginTM, Version 5.0, bestimmt.

2.2.1.1. Xanthin/Xanthinoxidase-System (X/XOD-System)

Dieses System dient als Modell für Vorgänge in ischämischen Geweben mit nachfolgender Reperfusion. Katalysiert über das Enzym Xanthinoxidase (XOD) wird Xanthin zu Harnsäure oxidiert und die Elektronen auf den Sauerstoff übertragen, der dadurch zum Superoxidradikalanion beziehungsweise H_2O_2 reduziert wird. Wasserstoffperoxid kann durch Übergangsmetallkatalyse zum Hydroxylradikal reduziert werden. Aus dem zugesetzten Indikatormolekül KMB entsteht nach Angriff der generierten ROS als oxidatives Spaltprodukt Ethen, welches gaschromatographisch detektiert wird (Meyer et al., 1995).

Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		600 μ l
KMB	1 mM	100 μ l
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 μ l
Xanthin	0,5 mM	100 μ l
Xanthinoxidase	0,016 U	100 μ l

Inkubation: 30 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

Xanthin wurde in 0,1 N NaOH (15% des Lösungsmittelvolumens) gelöst und anschließend mit Aqua bidest auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

2.2.1.2. NADH/Diaphorase-System

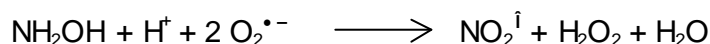
Dieses System stellt einen Teil der Elektronentransportkette zur Sauerstoffaktivierung im aktivierten Leukozyten dar. Während des sogenannten respiratory burst werden ROS wie $O_2^{\bullet-}$ und vor allem H_2O_2 generiert. Diaphorasen sind Oxidoreduktasen, die auf Kosten von NADH (β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid) Sauerstoff reduzieren können. Durch das als Indikatormolekül zugesetzte KMB können ROS gaschromatographisch durch das entstehende Ethen quantifiziert werden (Meyer et al., 1995).

Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		600 μ l
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 μ l
NADH	75 μ M	100 μ l
KMB	1 mM	100 μ l
Diaphorase	2,2 U	100 μ l

Inkubation: 30 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

2.2.1.3. Hydroxylaminoxidations-System

Mit Hilfe der Xanthinoxidase (XOD) wird Xanthin zu Harnsäure oxidiert, wobei Elektronen auf den Sauerstoff übertragen werden, der dadurch zum Teil zum Superoxidradikalanion $O_2^{\bullet-}$ reduziert wird. Das zugesetzte Hydroxylamin (NH_2OH) wiederum wird durch $O_2^{\bullet-}$ zu Nitrit oxidiert, welches mit Sulfanilamid und α -Naphthylethylendiamin (NED) einen roten Azofarbstoff bildet, der photometrisch detektiert werden kann (Elstner und Heupel, 1976).



Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		600 μ l
Xanthin	0,5 mM	100 μ l
Hydroxylamin	0,5 mM	100 μ l
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 μ l
Xanthinoxidase	0,08 U	100 μ l

Inkubation: 30 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

Xanthin wurde in 0,1 N NaOH (30% des Lösungsmittelvolumens) gelöst und anschließend mit Aqua bidest auf das Endvolumen aufgefüllt.

Nach der Inkubation werden dem Ansatz für den Nitrit-Nachweis zugesetzt:

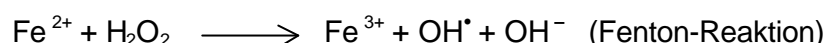
Sulfanilamid (in 8%iger HCl)	10 mM	500 μ l
NED	130 μ M	500 μ l

Inkubation: 50 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, anschließend photometrische Messung der Absorption bei 540 nm gegen Referenz ohne Hydroxylamin.

Ob die Farbstoffbildung wirklich auf eine Hydroxylaminoxidation durch $O_2^{\bullet -}$ zurückzuführen ist, wurde durch zusätzliche Ansätze innerhalb der Konzentrationsreihen kontrolliert, denen Superoxiddismutase (SOD, 100 U i.A.) zugesetzt wurde. Diese wurden mit einem entsprechenden Ansatz ohne Hydroxylamin als Referenz inkubiert und die Absorption gemessen, wobei eine Farbstoffbildung unterbleiben sollte.

2.2.1.4. Fenton-System

Im Fenton-System wird Wasserstoffperoxid reaktiv durch Fe^{2+} -Ionen gespalten und Hydroxylradikale gebildet, die mit dem zugesetzten Indikatormolekül KMB reagieren und Ethen freisetzen, welches gaschromatographisch detektiert werden kann. Durch den Zusatz von EDTA zur Komplexbildung von Fe^{2+} wird die Oxidationswirkung noch verstärkt.



Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		500 µl
KMB	1 mM	100 µl
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 µl
EDTA	50 µM	100 µl
Fe ²⁺	10 µM	100 µl
H ₂ O ₂	10 µM	100 µl

Inkubation: 30 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

2.2.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System (DHF/Cu-System)

Dieses System stellt ein biochemisches Modell für das Krankheitsbild von Diabetes mellitus (erhöhter Glucose-Spiegel im Blut) und gleichzeitig ein Modell für die Übergangsmetallkatalyse dar. Die Autoxidation von Monosacchariden, die eine entscheidende Rolle bei der diabetischen Erkrankung spielt, verläuft relativ langsam mit einer Endiol-Bildung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Die als Endiol vorliegende Dihydroxyfumarsäure autoxydiert durch Spuren von Übergangsmetallen, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale entstehen, die KMB unter anderem oxidativ zu Ethen fragmentieren.

Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		600 µl
KMB	1,5 mM	100 µl
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 µl
Cu ²⁺	20 µM	100 µl
DHF	250 µM	100 µl

Inkubation: 30 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

2.2.1.6. Rose Bengal-System

In diesem System wird die Oxidation ungesättigter Fettsäuren als Hauptbestandteile von Membranlipiden nachgestellt, wobei es sich um einen Radikalkettenprozeß handelt.

Durch die synthetische Verbindung Rose Bengal wird lichtaktiviert über eine photodynamische Typ II-Reaktion vor allem Singulett-Sauerstoff generiert. Es werden aber auch andere ROS (H_2O_2 , OH^*) gebildet. Die Fettsäureperoxide zerfallen übergangsmetall-katalysiert zu instabilen Alkoxyradikalen, die unter anderem zu gasförmigen Produkten (Ethen) und aldehydischen Abbauprodukten (Malondialdehyd) fragmentieren. Zugewetzte Cu^{2+} -Ionen katalysieren die Disproportionierung des entstehenden Ethylradikals zu Ethen und Ethan, die gaschromatographisch detektiert werden können; ohne Cu^{2+} entsteht ausschließlich Ethan (Heiser et al., 1998). Damit kann durch eine Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses auf eine Kupferkomplexierung durch die Testsubstanz geschlossen werden.

Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	100 mM	1 ml
H ₂ O		600 µl
α-Linolensäure	3,55 mM	100 µl
Cu ²⁺	5 µM	100 µl
Probe	verschiedene Konzentrationen	100 µl
Rose Bengal	20 µM	100 µl

Inkubation: 30 min im Lichtbad mit $2000 \mu E/m^2 \cdot s$ bei 37 °C

Zusätzlich zur gaschromatographischen Detektion von Ethen und Ethan erfolgte aus oben genanntem Ansatz die Bestimmung von Malondialdehyd und der Gesamtaldehyde als Endprodukte der Lipidperoxidation mit Hilfe von 1-Methyl-2-phenylindol. Der entstehende Farbstoff kann photometrisch quantifiziert werden (Gerard-Monnier et al., 1998).

Ansätze:

a) für die Bestimmung von Malondialdehyd: b) für die Bestimmung der Gesamtaldehyde

	Volumen		Volumen
MPI-Lösung	650 µl	MPI-Lösung	650 µl
Inkubationsansatz	200 µl	Inkubationsansatz	200 µl
32%ige HCl	150 µl	MS-Lösung	150 µl

Inkubation: 40 min im Wasserschüttelbad bei 45 °C,
anschließend photometrische Messung der Absorption bei 586 nm

2.2.1.7. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Mit Cu^{2+} -Ionen kann im LDL die Lipidperoxidation induziert werden, wobei es durch die Verschiebung von Doppelbindungen zur Bildung konjugierter Diene kommt, die sich photometrisch bei 234 nm verfolgen läßt (Esterbauer et al., 1989, 1992).

Ansatz in Quarzküvetten:

PBS Puffer	ad 1 ml
LDL (entsalzt, Gewinnung und Präparation siehe 2.2.2.2.)	25 µg, quantifiziert über Proteingehalt
Cu ²⁺ (als CuSO ₄ in 50 µl)	1,67 µM i.A.

Die Inkubation erfolgte in einem auf 37 °C thermostierten Küvettenhalter.

2.2.1.8. Vollblut-System

In diesem System werden durch Zusatz von Zymosan die neutrophilen Granulozyten im Blut stimuliert. Durch ablaufende Degranulation und den sogenannten respiratory burst nach Aktivierung der NADPH-Oxidase kommt es zur Bildung verschiedener ROS wie des Superoxidradikalanions, des Wasserstoffperoxids und des Hydroxylradikals. Desweiteren entsteht Hypochlorige Säure (HOCl) aufgrund der Aktivität der sezernierten Myeloperoxidase. Das als Indikatormolekül zugesetzte ACC wird spezifisch durch HOCl zu Ethen fragmentiert (Kruedener et al., 1996) und dieses gaschromatographisch quantifiziert. Um Gerinnung zu vermeiden, wurde das Blut für diese Versuche sofort nach der Entnahme mit EDTA (1 mg/ml Blut) versetzt und der Ansatz umgehend pipettiert.

Ansatz:	Konzentration i.A.	Volumen
PBS-Puffer pH 7,2		300 µl
ACC (in PBS)	2,5 mM	100 µl
Zymosan (in PBS)	5 mg	500 µl
Probe (in PBS)	verschiedene Konzentrationen	100 µl
Vollblut		1 ml

Inkubation: 60 min im Wasserschüttelbad bei 37 °C

Zytotoxizitätstest:

Um eine mögliche Zellschädigung durch die Testsubstanzen zu untersuchen, wurden entsprechenden Ansätze analog dem zuvor beschriebenen Vollblut-Ansatz, jedoch ohne Zymosan (= 0,5 ml PBS-Puffer statt Zymosan), für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden ca. 1 ml des Ansatzes auf 1 ml Dextran-Lösung in einem schmalen Reagenzglas gegeben, vorsichtig umgeschwenkt, und zur Sedimentation der Erythrozyten für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Aus dem oberen leukozytenreichen Überstand wurden Aliquots entnommen, diese 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und bis zur mikroskopischen Untersuchung auf Eis belassen. Insgesamt wurden dreimal je 100 Zellen aus zwei verschiedenen Ansätzen mit Hilfe einer Thoma-Kammer auf die Anzahl geschädigter Zellen ausgezählt, wobei nicht vitale Zellen eine Blaufärbung aufweisen.

2.2.2. Untersuchungen von humanem Blutplasma

2.2.2.1. Plasma-Gewinnung und Protein-Quantifizierung im Plasma

Sofort nach der Entnahme wurde das Vollblut mit EDTA (Endkonzentration 1 mg/ml Blut) versetzt. Dazu wurden 4 ml einer EDTA-Stammlösung (25 mg/ml) pro 100 ml Vollblut verwendet. Nach dem Zentrifugieren (3000 U, 10 °C, 20 min) wurde das Plasma vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und zu je 10 ml Plasma wurden 100 µl einer 60%igen Saccharoselösung zugesetzt. Das Plasma wurde in Cryogefäße abgefüllt, mit N₂ überschichtet und bei – 70 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung eines Plasmapools wurde in der Regel das Plasma von mindestens neun gesunden Personen im Alter von 18 – 40 Jahren verwendet.

Die Proteinbestimmung im Plasma erfolgte mit dem Biorad-Protein-Assay, wobei das Plasma als Probe 1:100 in 0,9% NaCl-Lösung verdünnt wurde und der Proteingehalt im Ansatz nach der Inkubationszeit photometrisch bei 595 nm gemessen wurde. Die Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge erfolgte mittels einer Kalibrationsgeraden mit BSA (**Abb. 4**).

Ansatz:	Volumen	
H ₂ O	790 µl	
Reagenzlösung	200 µl	
Probe	10 µl,	Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur

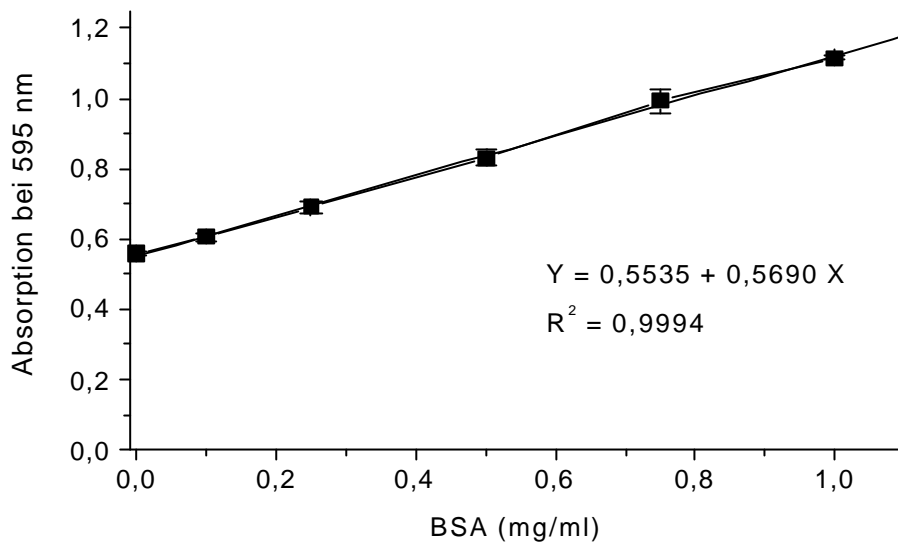


Abbildung 4: Kalibrationsgerade für die Proteinbestimmung unter Verwendung von BSA

2.2.2.2. LDL-Isolierung, -Präparation und -Quantifizierung

Die Isolierung von LDL aus Plasma erfolgte durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten. Dazu wurden 3 ml Plasma mit 1,23 g KBr auf eine Dichte von 1,41 g/ml eingestellt und in einem Beckman Polallomer Zentrifugen Tube mit jeweils 2,5 ml Dichtelösung A und Dichtelösung B überschichtet. Mit Dichtelösung C wurde das Gefäß komplett aufgefüllt und für 22 h bei 285000 x g (40000 U/min) zentrifugiert. In diesem Dichtegradienten sind drei Banden unterscheidbar: unten HDL (high density lipoprotein), Mitte LDL (low density lipoprotein) und an der Oberfläche VLDL (very low lipoprotein) und Chylomikronen. Die LDL-Bande wurde mit einer gebogenen Kanüle abgezogen, filtriert (0,2 µm, Nalge Nunc Filter) und bis zur weiteren (möglichst umgehenden) Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurden die LDL-Proben (300 µl bis maximal 1000 µl) jeweils mit einer EconoPac DG-10 Gelfiltrationssäule (Biorad) unter Verwendung des PBS-Puffers für LDL entsalzt. Anschließend wurde die LDL-Konzentration über den Proteingehalt quantifiziert, welcher mit dem Biorad-Protein-Assay bei 595 nm photometrisch bestimmt wurde.

Ansatz:	Volumen
H ₂ O	790 µl
Reagenzlösung	200 µl
Probe	10 µl

Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur

Die Bestimmung der enthaltenen Proteinmenge erfolgte mittels einer Kalibrationsgeraden mit BSA (**Abb. 4**).

2.2.2.3. Anreicherung von Testsubstanzen im LDL und Plasma (Vorinkubation)

Zur Klärung der Frage, ob sich Komponenten aus dem Bier oder etherische Öle wie Myrcen, α -Humulen oder β -Caryophyllen aus dem Hopfen im LDL anreichern können, um einen eventuellen Oxidationsschutz zu bieten, wurde Plasma aus dem Plasmapool mit den entsprechenden Substanzen vorinkubiert. Dazu wurden die Testsubstanzen wie die Hopfenöl-Komponenten entweder direkt oder in den gewünschten Konzentrationen in EtOH gelöst zu 3 ml Plasma gegeben (maximal 50 μ l EtOH). Bei der Verwendung von Bier oder den wässrigen Bierinhaltsstoffen wie die Maische-Fraktion als Testsubstanz wurde ein Verhältnis von 1:6 gewählt, d.h. zu 2,5 ml Plasma wurden 0,5 ml Bier/Extrakt gegeben. Das Plasma wurde in kleinen verschraubbaren Reagenzgläsern für 90 min bei 37 °C im Wärmeschrank am Inkubationsrad inkubiert, wobei die Proben durch die Drehungen des Rades einer stetigen Durchmischung unterworfen waren. Aus dem auf diese Weise vorinkubierten Plasma wurde entweder das LDL für weitere Untersuchungen isoliert oder das Bier/Plasma-Gemisch in die Testsysteme zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität eingesetzt.

2.2.2.4. Extraktion und Analyse der Hopfenöl-Komponenten aus LDL

Die Extraktion der zuvor entsalzten LDL-Lösung (siehe 2.2.2.2.) wurde nach einer ethanolischen Proteinfällung mit n-Hexan in 1 ml HPLC-Gefäßen aus Glas mit dichtem Stopfen (Waters) durchgeführt und der Hexanextrakt gaschromatographisch bezüglich der Hopfenöl-Komponenten analysiert.

Ansatz:

250 μ l	LDL-Lösung
250 μ l	EtOH (Schütteln zur Proteinfällung)
500 μ l	Hexan

Die LDL-Lösung wurde durch Vortexen für 1 min extrahiert und die Entmischung der zwei Phasen durch Zentrifugieren bei 1700 x g für 3min beschleunigt. Aus der Hexanphase wurde, nach vorsichtiger Durchmischung der organischen Phase durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Hamiltonspritze, 1 μ l für die gaschromatographische Analyse am DANI GC entnommen. **Tabelle 1** zeigt die Kalibrationsgeraden und Retentionszeiten der Hopfenöl-Komponenten.

Gaschromatographische Bedingungen:

Injektionsvolumen:	1 μ l Probenlösung bei geöffnetem Splitventil
Splitverhältnis:	1:10
PTV-Programm:	15 s 70 °C, mit voller Leistung auf 210 °C, diese Temperatur 25 min halten
Temperatur-Programm:	5 min 65 °C 5 °C/min auf 200 °C 5 min 200 °C zurück auf 65 °C
Detektor:	225 °C
Säule:	Fisons DB-225, 30 m
Trärgas:	Helium 3 ml/min
Brennergase:	Wasserstoff 40 ml/min Synthetische Luft 260 ml/min
Make up Gas	Stickstoff 22 ml/min

Tabelle 1: Kalibrationsgeraden und Retentionszeiten der Hopfenöl-Komponenten für die gaschromatographische Analyse am DANI-GC

Substanz	RT (min)	R ²	Kalibrationsgerade
Myrcen	4,2	0,9973	y (area) = 12104 + 1618390 * x (mM)
β-Caryophyllen	17,0	0,9990	y (area) = 54814 + 2950660 * x (mM)
α-Humulon	18,3	0,9988	y (area) = 9716 + 2789070 * x (mM)

2.2.2.5. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien im LDL und Plasma

Die Extraktion der endogenen lipophilen Antioxidantien aus den LDL- und Plasmaproben wurde nach einer Methode von J. Graßmann (mündlich) durchgeführt, bei der die lipophilen Komponenten nach einer ethanolischen Proteinfällung mit n-Hexan extrahiert und per HPLC analysiert werden.

Ansatz:

250 µl	LDL-Lösung (entsalzt) oder Plasma
50 µl	Standard (Tocopherolacetat, Stammlösung 2,5 mM in EtOH)
200 µl	EtOH (Schütteln zur Proteinfällung)
500 µl	Hexan

Die Probe wurde durch Vortexen für 1 min extrahiert und die Entmischung der zwei Phasen durch Zentrifugieren bei 1700 x g für 3min beschleunigt. Von der Hexanphase wurden 400 µl abgenommen und der Vorgang der Extraktion nach Zugabe von 400 µl frischem Hexan wiederholt. Von der zweiten Hexanfraktion wurden ebenfalls 400 µl entnommen und mit dem ersten Hexanextrakt vereinigt. Die resultierenden 800 µl der Hexanfraktion wurden anschließend bei 40 °C für 15 min im Vakuum-Konzentrator bis zur Trockenheit einroutiert und bis zur HPLC-Analyse bei -12 °C kurzzeitig aufbewahrt.

Für die HPLC-Analyse (Beckman-HPLC) wurden die lipophilen Rückstände in 50 µl Laufmittel mit Hilfe des Ultraschallbades bei 30 °C für ca. 30 s angelöst und die 20 µl fassende Probenschleife gefüllt. Als isokratisches Laufmittel wurde ein ternäres Gemisch aus Acetonitril, Methanol und Dichlormethan (45% / 45% / 10% v/v) verwendet. Die in **Tabelle 2** angegebenen Kalibrationsgeraden für die lipophilen Antioxidantien wurden wie folgt übernommen.

Tabelle 2: Kalibrationsgeraden und Retentionszeiten der lipophilen Antioxidantien für die HPLC-Analyse

Substanz	RT (min)	R ²	Kalibrationsgerade
Tocopherolacetat	6,4	1,0000	y (area) = 2189 * x (µM)
α-Tocopherol	5,6	0,9995	y (area) = 2,78 * 10 ⁶ * x (µM)
Lycopin	7,5	0,9995	y (area) = 16318 * x (µM)
β-Carotin	11,0	0,9987	y (area) = 13926 * x (µM)
Ubichinon	20,8	0,9991	y (area) = 1,21 * 10 ⁷ * x (µM)
Ubichinol (= reduziertes Ubichinon)	12,7	0,9999	y (area) = 3903 * x (µM)

2.2.3. Durchführung der Trinkstudien mit Bier

Insgesamt wurden vier Trinkstudien mit den Testbieren durchgeführt, um die Wirkungen auf das antioxidative Potential von humanem Plasma und auf die neutrophilen Granulozyten im Blut nach dem Genuß dieser Biere zu untersuchen. Die Teilnehmer wurden mittels eines Fragebogens zu Alter, Geschlecht, body mass index (BMI), Gesundheitszustand, Alkoholkonsum und Sportgewohnheiten befragt und mußten folgende Voraussetzungen erfüllen: Nichtraucher, keine Einnahme von Vitamin- und Mineralpräparaten vor beziehungsweise während der Trinkstudien, nicht schwanger, geringer Alkoholkonsum und keine Einnahme von Medikamenten. Mindestens einen Tag vor Beginn der jeweiligen Studie und während des Studienzeitraums wurde ein genaues Ernährungsprotokoll (mit Verzicht auf alle anderen alkoholischen Getränke) geführt.

Die Blutabnahmen wurden von Frau Dr. med. Dipl. Psych. Reinhardt in ihrer Praxis in Freising durchgeführt. Bei jeder Blutabnahme (30 ml) wurden zusätzlich folgende Blutwerte durch ein medizinisches Labor bestimmt (zusätzliche Abnahme von ca. 10 ml Blut):

- Großes Blutbild mit Erythrozytenanzahl, Hämoglobingehalt, MCH-Wert (mean corpuscular haemoglobin), MCV-Wert (mean corpuscular volume), Hämatokritwert, MCHC-Wert (mean corpuscular haemoglobin concentration), Thrombozytenanzahl, Leukozyten (aufgespalten in Segmentkernige = neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Basophile und Eosinophile)
- Blutfettwerte (Cholesterin, HDL, LDL, Triglyceride)
- Harnsäure

Unmittelbar vor dem Trinken wurde jeweils Blut als Kontrolle abgenommen. Die Zeit wurde jeweils mit Beginn des Trinkens gestartet, wobei das Bier innerhalb von 10 min getrunken wurde (Ausnahme Trinkstudie 4). Die Zeitpunkte der weiteren Blutabnahmen können den Beschreibungen der einzelnen Trinkversuche entnommen werden. Das Blut wurde mit Hilfe von Kanülen entnommen, die mit NaCl-Lösung gespült und freigehalten wurden und solange wie möglich während eines Versuchstages in den Venen der Probanden blieben.

2.2.3.1. Trinkstudie 1

Ziel dieser ersten Trinkstudie war der Vergleich der Wirkungen eines selbst hergestellten supplementierten Testbieres mit denen eines kommerziell erhältlichen hellen Paulanerbieres bezüglich der Neutrophilen-Aktivität im Vollblut, des antioxidativen Potentials des Plasmas und der LDL-Oxidierbarkeit. An dieser Studie nahmen sechs Probanden (drei weiblich, drei männlich, Nichtraucher) teil, wobei das Durchschnittsalter 30,2 Jahre ($\pm 4,5$) und der durchschnittliche Body Mass Index (BMI) $24,0 \text{ kg/m}^2$ ($\pm 2,0$) betrug. Jeweils einen Tag vor der Studie unterzogen sich die Probanden einer festgelegten vitamin- und flavonoidarmen Ernährung, um ernährungsbedingte Einflüsse weitgehend zu vermeiden. Die im folgenden aufgeführten Mahlzeiten wurden gemeinsam eingenommen: Frühstück: Weißbrot mit Margarine und Honig, Mittagessen: Nudelsuppe, Putenschnitzel mit Nudeln und etwas Kopfsalat, Abendessen: Weißbrot mit ausgesuchter Wurst. Die Probanden konsumierten ausschließlich Wasser als Getränk. Am Versuchstag morgens: Weißbrot mit Margarine und etwas Honig, während der beiden dreistündigen Trinkversuche wurde nichts gegessen oder getrunken.

Am ersten Versuchstag wurden einmalig 500 ml des Kontrollbieres und eine Woche später 500 ml des Testbieres 1 (Herstellung siehe 2.1.4.) konsumiert. Unmittelbar nach der Abnahme des Kontrollblutes ($t = 0 \text{ min}$) wurde das Bier innerhalb von höchstens 10 min getrunken und weitere Blutabnahmen erfolgten 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 180 min nach Beginn des Trinkens, wobei pro Zeitpunkt insgesamt 25 ml Blut (15 ml Blut für den Vollblutversuch und zur Plasmagewinnung und etwa 10 ml zur Bestimmung der Blutwerte) abgenommen wurden. **Abbildung 5** zeigt das Studiendesign zu Trinkstudie 1.

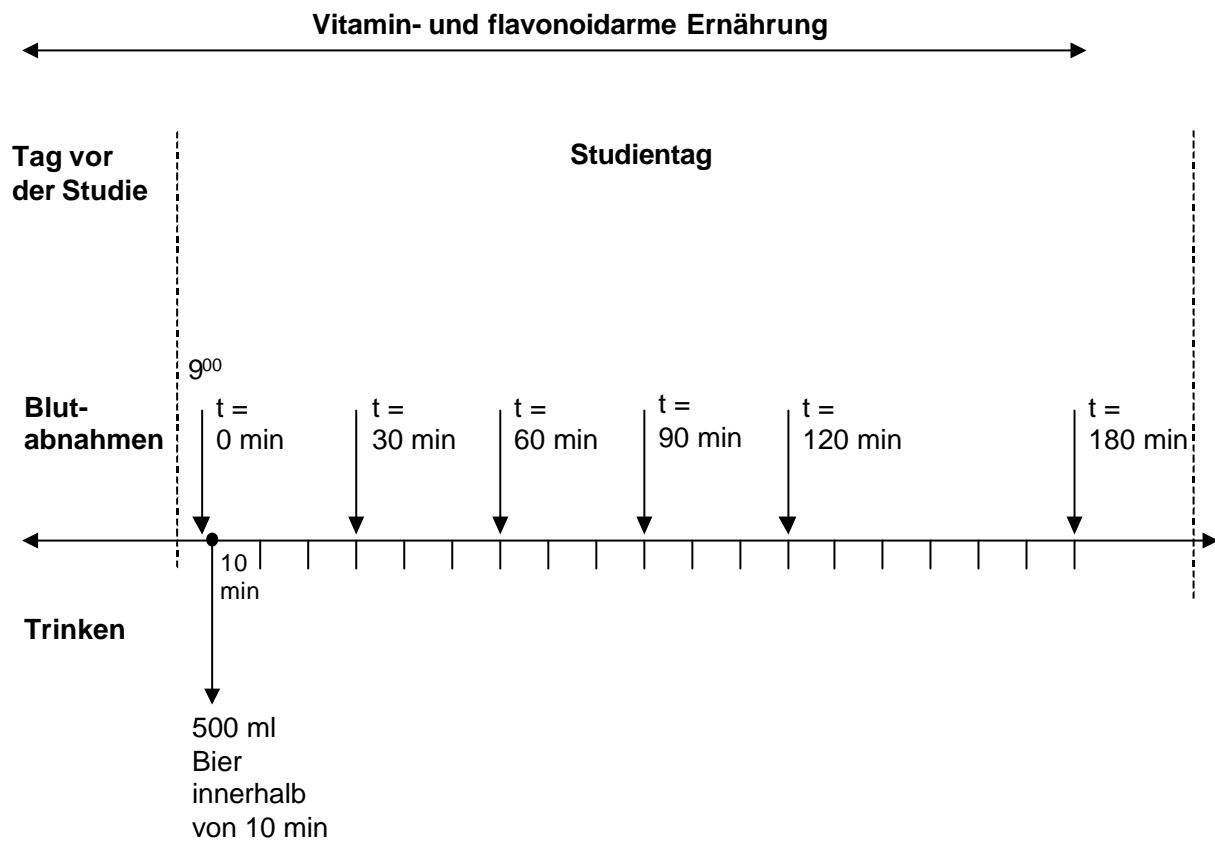


Abbildung 5: Studiendesign zu Trinkstudie 1

2.2.3.2. Trinkstudie 2

In dieser Studie wurden die Wirkungen von Testbier 2 (mit erhöhtem Stammwürzegehalt) und Testbier 3 (mit erhöhtem Hopfengehalt) im Vergleich zum Kontrollbier (Helles Bier) untersucht. Jeweils zwei Probanden konsumierten in einer zweiwöchigen Trinkphase 500 ml eines der drei Biere. Dabei wurden am Morgen des ersten Tages nach der Kontrollblut-Entnahme ($t = 0$ min) die ersten 500 ml des jeweiligen Bieres innerhalb von 10 min getrunken und nach weiteren 20 min beziehungsweise 50 min eine zweite und dritte Blutabnahme durchgeführt ($t = 30$ min und $t = 60$ min). Am nächsten Morgen wurde den Probanden nach 24 h nochmals Blut entnommen und ab dem Abend dieses zweiten Tages der Trinkstudie jeweils 500 ml Bier für die nächsten 13 Abende konsumiert. Um eine eventuelle Anreicherung von Bierinhaltsstoffen im Plasma beziehungsweise die längerfristige Wirkung des Biertrinkens auf die neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurde am Tag 14 morgens die letzte Blutabnahme ($t = 14$ d) durchgeführt (**Abb. 6**).

Die vier weiblichen und zwei männlichen Probanden dieser Studie besaßen ein Durchschnittsalter von 29,8 Jahren ($\pm 2,5$), einen durchschnittlichen BMI von $24,5 \text{ kg/m}^2$ ($\pm 3,0$) und waren alle Nichtraucher. Es wurden genaue Ernährungsprotokolle über den gesamten Versuchszeitraum geführt, aber keine spezielle Diät eingehalten.

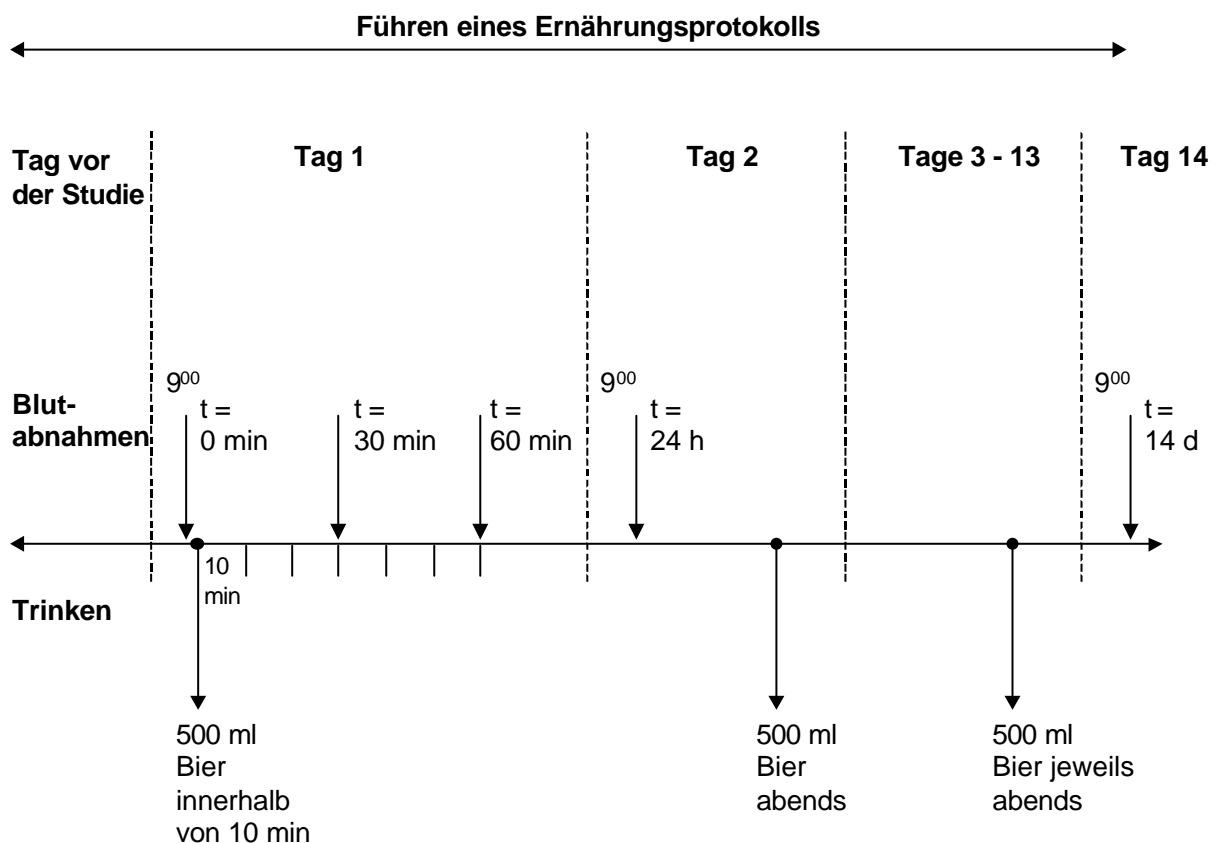


Abbildung 6: Studiendesign zu Trinkstudie 2

2.2.3.3. Trinkstudie 3

Inwieweit der Alkoholgehalt eines Bieres eine Wirkung auf das antioxidative Potential von Plasma beziehungsweise auf die Aktivität von Leukozyten zeigt, wurde in Trinkstudie 3 untersucht, bei der die Testbiere 4 und 5 mit einem höheren Stammwürzegehalt, aber unterschiedlichen Alkoholgehalten von 5,2% (Testbier 4) und 1,4% (Testbier 5) verglichen wurden. Von den Probanden (5 weiblich, 1 männlich) wurden, wie in Trinkstudie 2, über einen längeren Zeitraum von 13 Tagen täglich 500 ml eines der beiden Biere getrunken. Auch hier wurde das erste Bier morgens nach der Abnahme von Kontrollblut ($t = 0 \text{ min}$) innerhalb von 10 min getrunken und 30 min nach Beginn des Trinkens eine zweite Blutentnahme ($t = 30 \text{ min}$) durchgeführt. Nach einer weiteren Blutabnahme am zweiten Tag der Studie zum Zeitpunkt $t = 24 \text{ h}$ wurde jeden Abend ein Bier getrunken und nach 12 Tagen ($t = 13 \text{ d}$) die letzte Blutabnahme am Morgen durchgeführt. **Abbildung 7** stellt das Studiendesign dar.

Die sechs Probanden dieser Studie wiesen ein Durchschnittsalter von 32,2 Jahren ($\pm 4,8$) und einen durchschnittlichen BMI von $22,5 \text{ kg/m}^2$ ($\pm 3,5$) auf, wobei es sich bei Proband E um einen Raucher handelte. Während der Studie wurde keine spezielle Diät eingehalten, aber von den Probanden wurden über den Versuchszeitraum genaue Ernährungsprotokolle geführt.

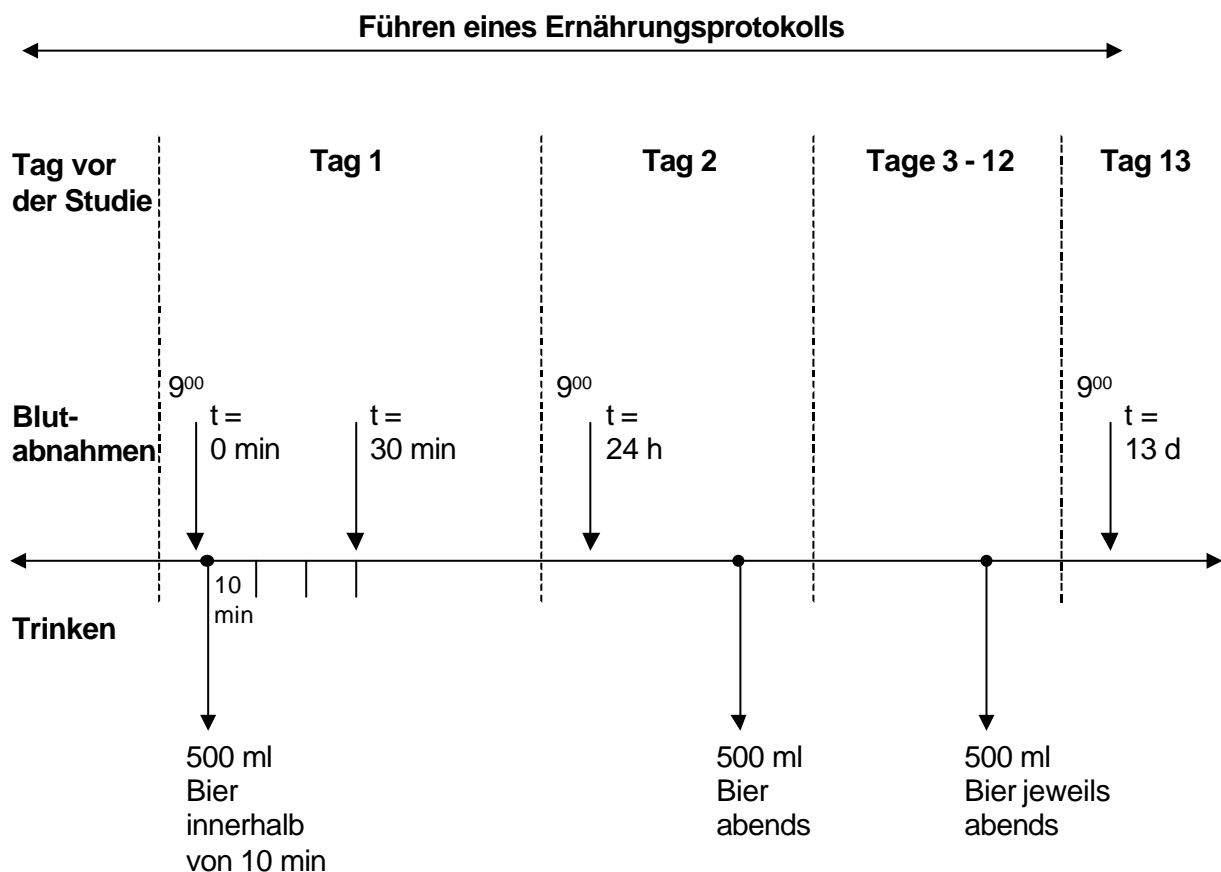


Abbildung 7: Studiendesign zu Trinkstudie 3

2.2.3.4. Trinkstudie 4

In dieser Studie wurde das als Testbier 6 bezeichnete Bier an einer möglichst großen Gruppe von Probanden getestet. Jeweils 1 l des Testbieres 6 wurde an drei Abenden von insgesamt 17 Probanden konsumiert, die in drei Gruppen zu je sechs (A – F), sechs (G – M) und fünf (N – T) Probanden eingeteilt wurden. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 31,7 Jahre ($\pm 7,5$), der durchschnittliche BMI $23,1 \text{ kg/m}^2$ ($\pm 3,4$) und vier der 17 Probanden waren Raucher. Während der dreitägigen Studie war zum Frühstück Kakao, Tee oder Kaffee in Maßen erlaubt, ansonsten jedoch keine anderen Getränke außer Wasser. Auch wurden die Probanden gebeten, nicht übermäßig viel Obst und Gemüse sowie Schokolade zu verzehren und ein genaues Ernährungsprotokoll zu führen. Am ersten Tag der Studie wurde der Trinkversuch, im Gegensatz zu den anderen Trinkstudien, am Abend gestartet. Das Blut für die Kontrolle wurde unmittelbar vor dem Trinken abgenommen ($t = 0$), und anschließend wurde 1 l Bier innerhalb von 30 min (gleichmäßig verteilt) konsumiert. Nach weiteren 15 min ($t = 45 \text{ min}$) wurde eine zweite Blutabnahme durchgeführt. An den folgenden zwei Abenden tranken die Probanden jeweils 1 l des Testbieres und die Studie wurde mit einer Blutabnahme am darauffolgenden Morgen ($t = 3 \text{ d}$) im nüchternen Zustand beendet (Studiendesign siehe **Abb. 8**)

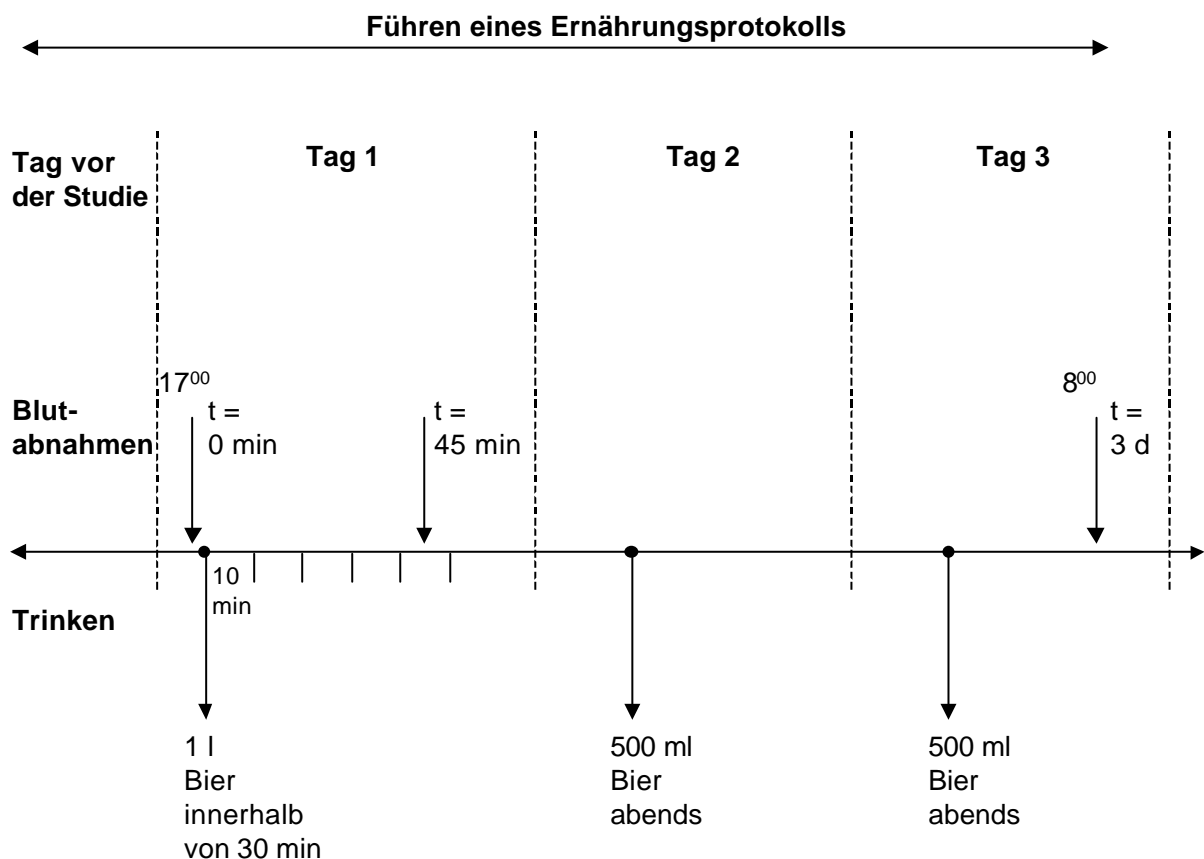


Abbildung 8: Studiendesign zu Trinkstudie 4

2.3. METHODEN ZUR STUDIE ÜBER DIE ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN

2.3.1. Analyse der Zerealien

2.3.1.1. Wässrige Extraktion

Die mit einer elektrischen Mühle fein gemahlene Zerealienproben (5 g) wurden mit 20 ml Wasser für 30 min bei 50 °C unter N₂ im Dunkeln geschüttelt (200 rpm) und anschließend für 10 min bei 13845 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde ein weiteres Mal extrahiert und die erhaltenen Überstände vereinigt. Ein Aliquot von 10 ml dieser Probe wurde mit 4 µg *o*-Cumarsäure als internen Standard versetzt, mit HCl auf pH < 2,0 angesäuert und mit Ethylacetat (3 x Vol.) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotoevaporators bei 40 °C unter Vakuum getrocknet und in 800 µl 50%igem Methanol gelöst. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 5 min und Filtration (0,22 µm, PTFE) wurden die freien Hydroxyzimtsäuren per HPLC/DAD analysiert.

2.3.1.2. Alkalische Extraktion

Zur Bestimmung des gesamten Gehalts an Hydroxyzimtsäuren (= frei und verestert) im Müsli wurde eine Methode zur alkalischen Hydrolyse (Andreasen et al., 2001a) verwendet. Die Proben wurden mit NaOH (1 M Endkonzentration) bei Raumtemperatur für 18 h unter N₂ im Dunkeln inkubiert. Dabei wurden zu 200 mg des fein gemahlene Müsli 10 ml einer 1 M NaOH und zu 10 ml der wasserlöslichen Fraktion (siehe oben) 2,5 ml einer 5 M NaOH zugegeben. Als interner Standard wurde *o*-Cumarsäure (4 µg in 50% Methanol gelöst) zugefügt, anschließend mit HCl auf pH < 2,0 angesäuert und mit Ethylacetat (3 x Vol.) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe eines Rotoevaporators bei 40 °C unter Vakuum getrocknet und in 800 µl Methanol 50% angelöst. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 5 min und Filtration (0,22 µm, PTFE) wurden die freien Hydroxyzimtsäuren und Diferulate mit HPLC/DAD analysiert.

2.3.2. Durchführung der Humanstudie

Die Studie wurde vom Norwich District Research Ethics Committee bewilligt. Vom Norwich Research Park wurden sechs gesunde Probanden, drei männliche und drei weibliche mit einem Durchschnittsalter von 32 Jahren (Spanne 26 – 39) und einem durchschnittlichen Body Mass Index von 25,7 kg/m² (Spanne 21,7 – 30,3), angeworben. Folgende Ausschlusskriterien wurden eingehalten: Akute oder chronische Krankheiten, Einnahme von Medikamenten, Blutwerte außerhalb der Normalwerte, Schwangere, Vegetarier, Veganer, Nahrungsmittelallergiker, frühere Erkrankungen des Verdauungstraktes, bekannte Veränderungen im Verdauungstrakt (z.B. Diarrhoe) und Blutspender in einem Zeitraum von einem Monat vor bzw. nach der Studie.

Die sechs Probanden unterzogen sich zwei Tage vor der Studie einer polyphenolarmen Ernährung. Dabei wurde auf Zerealien, Vollkornprodukte, Samen und Nüsse, alle Arten von Gemüse und Früchten, Kräuter, Gewürze und Fertigprodukte sowie auf Getränke wie Tee, Kaffee, Säfte, Rotwein, Cider (Apfelwein) und Bier verzichtet.

Abbildung 9 zeigt das im folgenden beschriebene Studiendesign. Am Studientag wurde zuerst Kontrollblut durch eine gelegte Kanüle abgenommen und anschließend wurden 100 g der kommerziell erhältlichen Zerealien (Kellogg's All-bran, mit 85% Weizenkleie) mit fettarmer Milch vom Probanden innerhalb von ca. 10 min konsumiert. Der Zeitpunkt, zu dem der Proband sein Frühstück beendet hatte, wurde als t = 0 gesetzt. Nach 1, 3, 6, 9, 12 und 24 h wurden weitere Blutproben genommen. Während des Studientages wurde Wasser und Mahlzeiten mit niedrigem Polyphenolgehalt serviert. Außerdem sammelten die Probanden am Tag vor der Studie als auch während des Studientags Urin in Plastikflaschen, die 2g Ascorbinsäure enthielten, als 24 h-Urinprobe. Die venösen Blutproben wurden sofort nach der Entnahme in Lithium-Heparin Tubes (Sarstedt) bei 1500 x g für 10 min zentrifugiert, das

Plasma abgezogen und während des Studientages auf Trockeneis gelagert. Die Plasmaproben wie auch die Urinproben wurden dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse aufbewahrt.

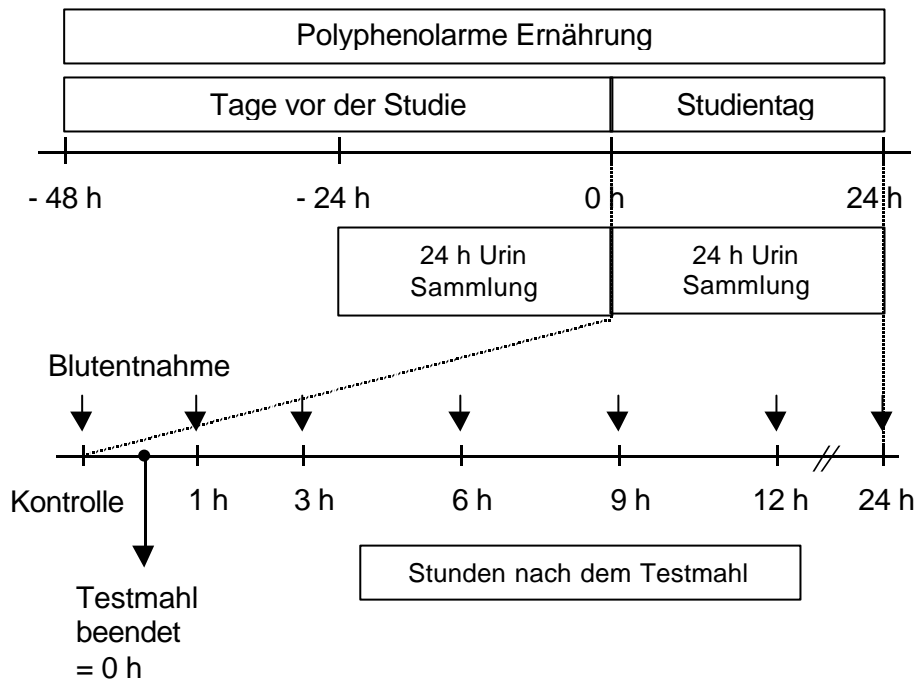


Abbildung 9: Studiendesign der Humanstudie zur Absorption von Diferulaten aus Frühstückszerealien mit einem hohen Anteil an Weizenkleie

2.3.3. Präparation der Plasmaproben (Ethylacetat-Extraktion)

Von den Plasmaproben wurden jeweils 7 ml mit *o*-Cumarsäure (0,5 μg , interner Standard) versetzt und nach einer modifizierten Version einer zuvor beschriebenen Methode (Andreasen et al., 2001b) folgendermaßen aufkonzentriert: Zur Proteinfällung wurden 20 ml Methanol zu dem Plasma-Aliquot gegeben, 30 s durchmischt (vortexen) und mit $1000 \times g$ 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde auf dieselbe Weise mit je 20 ml Methanol zweimal gewaschen und jeweils mit $2000 \times g$ und $2500 \times g$ zentrifugiert. Die vereinigten Methanol-Fractionen wurden mit dem Rotoevaporator bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Trockne einroutiert und in 10 ml PBS-Puffer wieder gelöst. Nach Ansäuerung auf pH 6,5 mit HCl 0,5 M wurden die Proben mit β -Glucuronidase ($7,5 \times 10^4\text{ U/l}$) und Sulfatase ($1,5 \times 10^4\text{ U/l}$) für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Dieses Gemisch wurde mit HCl auf pH $< 2,0$ gebracht, mit Ethylacetat (3 x Vol.) extrahiert und die organischen Phasen bis zur Trockenheit einroutiert. Der Rückstand wurde in 600 μl 50%igem Methanol aufgenommen, für 5 min bei $15000 \times g$ zentrifugiert und für die LC/MS-Analyse gefiltert (0,22 μm , PTFE).

2.3.4. Präparation der Urinproben (SPE-Extraktion)

Von den 24 h-Urinproben wurde jeweils ein Aliquot von 40 ml mit 4 ml konzentriertem PBS-Puffer (10 x) gemischt und der pH auf 6,5 mit 1 M NaOH eingestellt. Nach der Inkubation mit β -Glucuronidase ($7,5 \times 10^4\text{ U/l}$) und Sulfatase ($1,5 \times 10^4\text{ U/l}$) für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde als interner Standard *o*-Cumarsäure (13 μg) zugefügt und der pH mit HCl auf 2,0 eingestellt. Dieses Probengemisch wurde mit Hilfe einer Vakuumkammer auf eine vorkonditionierte

(10 ml Methanol, 10 ml HCl 5 mM) C18 Sep-Pak Säule (TechElut, 1000 mg/6 ml) mit einer Flußrate von ca. 1ml/min aufgetragen und anschließend mit 4ml Methanol eluiert. Ein Aliquot dieser methanolischen Fraktion wurde 1:1 mit H₂O verdünnt, 5 min bei 15000 x g zentrifugiert und für die Analyse mit HPLC und LC/MS gefiltert (0,22 µm, PTFE).

2.3.5. HPLC-Analyse

Die extrahierten Proben aus den Zerealien, Plasma und Urin wurden per HPLC/DAD analysiert. Folgende chromatographischen Bedingungen wurden in Anlehnung an eine Methode von Waldron et al. (1996) verwendet:

Mobile Phase A: 10% Acetonitril, 90% Wasser, 1 mM TFA

Mobile Phase B: 40% Acetonitril, 40% Methanol, 20% Wasser, 1 mM TFA

Gradient (Flußrate: 1 ml/min):

0 min	10% B
30 min	38% B
40 min	38% B
45 min	100% B
55 min	100% B
60 min	10% B
70 min	10% B

Die Injektionsvolumina betragen 100 µl für die Zerealien-Proben und 50 µl für die Plasma- und Urinproben. Detektiert wurde bei 325 und 280 nm und die Identifikation der Peaks wurde durch den Vergleich von Retentionszeit und Absorptionsspektren von Standardsubstanzen durchgeführt. Kalibrationsgeraden (**Tab. 3**) wurden durch dreifache Injektionen (100 µl) der verfügbaren Standards (gelöst in 50% Methanol) im Bereich von 2,5 – 125 µM erstellt:

$$y (\text{area}) = \text{Responsefaktor RF} * x (\text{ng})$$

Tabelle 3: Response-Faktoren und Bestimmtheitsmaß (R^2) der Kalibrationsgeraden der Standardsubstanzen sowie Retentionszeiten bei der HPLC-Analyse

Substanz	280 nm		325 nm		RT (min)
	RF	R ²	RF	R ²	
Vanillin	59319	0,9999	-	-	9,7
Kaffeensäure	31254	0,9996	60285	0,9996	14,4
<i>p</i> -Cumarsäure	70704	1,0000	79238	1,0000	16,3
Sinapinsäure	9134	0,9999	58029	0,9999	17,0
Ferulasäure	35797	0,9999	73500	1,0000	18,0
Iso-Ferulasäure	40145	1,0000	67715	1,0000	19,4
<i>o</i> -Cumarsäure	80361	1,0000	42518	1,0000	26,0
Methyl-Kaffeat	29740	0,9996	51688	0,9997	27,4*
Methyl- <i>p</i> -Cumarat	55078	0,9999	68920	1,0000	34,2*
Methyl-Sinapinat	5322	0,9995	64495	1,0000	34,4*
Methyl-Ferulat	30331	1,0000	70116	0,9999	34,7*
Feruloylglycin (x in ng/50 µl)			54365	0,9993	12,0

* Retentionszeit unter Verwendung des leicht veränderten Gradienten für Zellmedien, siehe **2.4.4.2.**

Die Response-Faktoren der Diferulate bei 280 nm wurden wie folgt übernommen (Garcia-Conesa, 1999b):

Tabelle 4: Response-Faktoren zur Quantifizierung der Diferulate

Substanz	RF	Retentionszeit (min)
8–5-Diferulasäure (offene Form)	22000	23,3
5–5-Diferulasäure	35000	31,5
8–O–4-Diferulasäure	23000	35,6
8–5-Benzofuran-Diferulasäure	18500	38,0

2.3.6. LC/MS-Analyse (Liquid chromatography – mass spectrometry)

Full scan-Spektren der Plasma- und Urinproben wurden im positiven Ionen Electrospray Modus (ES+) zwischen m/z 50–1000 mit einer Scan-Rate von 1,5 s (Interchannel-Verzögerung: 0,1s) bei einer Spannung (cone voltage) von 22 V angefertigt. Die chromatographischen Bedingungen wurden bereits unter **Punkt 2.3.5.** zur HPLC-Analyse beschrieben. Das Injektionsvolumen betrug 50 μ l. Die Identifikation und Quantifizierung der Hydroxycimtsäuren in den Proben basierte neben der Retentionszeit auf der Verwendung des SIM (selected ion monitoring) Modes, wobei folgende Ionenmassen ausgewählt wurden:

Ferulasäure	m/z 195 [M + H] ⁺ , m/z 177 [M - H ₂ O + H] ⁺ und m/z 217 [M + Na] ⁺
Sinapinsäure	m/z 225 [M + H] ⁺ , m/z 207 [M - H ₂ O + H] ⁺ und m/z 247 [M + Na] ⁺
<i>o</i> -Cumarsäure	m/z 165 [M + H] ⁺ , m/z 147 [M - H ₂ O + H] ⁺ und m/z 187 [M + Na] ⁺
Diferulate	m/z 387 [M + H] ⁺ , m/z 369 [M - H ₂ O + H] ⁺ und m/z 409 [M + Na] ⁺

Außerdem wurden für eine mögliche Reduktion einer der Doppelbindungen der Diferulate (Russell et al., 2000) m/z 389 [M + 2 H + H]⁺ und m/z 371 [M + 2 H - H₂O + H]⁺ ausgewählt.

Aus Gründen der Sensitivität wurden maximal 9 Kanäle pro Lauf genutzt. Im Fall der Bestimmung von Ferulasäure im Plasma wurden sogar zur Erhöhung der Empfindlichkeit sogenannte Fenster gesetzt, um im Bereich von 16–23 min (Retentionszeit der Ferulasäure: 19 min) mit nur drei Kanälen für die Ferulasäure-Ionen zu detektieren.

Die Detektionsgrenzen betragen jeweils für die Ferulasäure und die Sinapinsäure 2,5 pmol (injiziert) und für die Diferulate 5pmol (injiziert), wobei die Substanzen in 50% Methanol gelöst waren. Aufgrund der komplexen Matrix des Plasmaextraktes und der Urinproben mit zahlreichen niedermolekularen Verbindungen wurde ein Peak als positiv identifiziert, wenn eine Erhöhung der Peak-Area von mindestens zwei Ionen über dem signal-to-noise level = 3 und die richtige Retentionszeit vorlag.

Kalibrationsgeraden wurden im SIM Mode erstellt durch 50 μ l-Injektionen von Standardlösungen in 50% Methanol im Bereich von 10 nM–5 μ M für die Ferula- und Sinapinsäure und 500 nM–25 μ M für die *o*-Cumarsäure (**Tab. 5**). Die Peak-Areas der selektierten Ionen wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen.

$$y (\text{area}) = \text{Responsefaktor RF} \cdot x (\text{nM})$$

Tabelle 5: Response-Faktoren und Bestimmtheitsmaß (R^2) der Kalibrationsgeraden der Ionen der Standardsubstanzen sowie Retentionszeiten bei der LC/MS-Analyse

Substanz	m/z	RF	R^2	RT (min)
Ferulasäure	177	86,889	0,9999	19,0
	195	18,262	0,9997	19,0
	177 + 195	105,151	0,9997	19,0
Sinapinsäure	207	54,620	1,0000	18,6
	225	7,710	0,9998	18,6
	207 + 225	62,335	1,0000	18,6
o-Cumarsäure	147	55,886	0,9999	26,6
	165	14,164	0,9999	26,6
	147 + 165	70,050	0,9999	26,6

2.3.7. Synthese von Feruloylglycin

Das Glycin-Konjugat von Ferulasäure wurde in Anlehnung an eine Methode von Momose et al. (1997) zur Herstellung Glycin-konjugierter Gallensäuren folgendermaßen synthetisiert: 0,25 mmol Ferulasäure wurden in 1 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und sequenziell 0,5 mmol Glycinmethylester-hydrochlorid, 0,3 mmol Diethylcyanophosphanat und 400 μ l anhydr. Triethylamin hinzugefügt. Diese Suspension wurde für 20 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Ethylacetat (3 x Vol.) extrahiert. Die kombinierten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, mit $MgSO_4$ (anhydr.) getrocknet und mit dem Rotoevaporator bis zur Trockenheit einroutiert. Der Rückstand wurde in 5 ml einer 5% methanolischen KOH (1 M) aufgenommen und bei 100 °C in einem Heizblock für 30 min inkubiert. Die abgekühlte Lösung wurde auf eine vorkonditionierte (5 ml MeOH, 20 ml Wasser) C18 Sep-Pak Säule (Strata XTM, Phenomenex) aufgetragen und gemäß Anleitung von Momose et al. (1997) mit Wasser und Ethanol eluiert. Das Feruloylglycin befand sich jedoch hauptsächlich in der beim Auftragen auf die Säule nicht gebundenen Fraktion. Diese wurde deshalb mit HCl auf pH 4 angesäuert und mit Ethylacetat (3 x Vol.) extrahiert. Die organischen Phasen wurden durch Rotoevaporation getrocknet, um das Glycin-Konjugat als freie Säure zu erhalten. Der Anteil an nicht reagierter Ferulasäure betrug weniger als 5% (HPLC-Analyse). Die Masse des Konjugates wurde mit Hilfe von LC/MS im positiven Electrospray Modus (ES+) bestätigt und ergab das erwartete Molekül-Ion $[M + H]^+ = 252$.

2.4. METHODEN ZU DEN METABOLISMUSSTUDIEN VON HYDROXYZIMTSÄUREN IN CACO-2

2.4.1. Zellkultur von Caco-2

Humane colon adenocarcinoma (Caco-2) Zellen, bezogen von der European Collection of Cell Culture, wurden in Eagle's minimum essential medium (EMEM) kultiviert, das mit 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), 10% fötalem Kalbserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% Luft inkubiert und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Bei einer Konfluenzrate von etwa 80% wurde einmal wöchentlich subkultiviert.

2.4.2. Durchführung der metabolischen Studien

Für die metabolischen Experimente wurden Caco-2 Zellen (Passage-Nummern zwischen 30 und 45) in einer Dichte von 2×10^4 pro cm² in Plastik-Petrischalen (Fläche ca. 55 cm² mit 10 ml als empfohlenes Mediumvolumen) übertragen. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Konfluente Caco-2 Zellen wurden für weitere zehn Tage kultiviert und als differenzierte Zellen verwendet.

Die zu untersuchenden Hydroxyzimtsäuren, Ferula-, Sinapin-, *p*-Cumar- und Kaffeesäure, sowie ihre Methylester (**Abb. 10**) wurden jeweils in Methanol (50 mM) gelöst und frisch zubereitetem Medium in einer Endkonzentration von 50 µM zugegeben (100 µl/100 ml Medium). Daraus ergab sich eine Gesamtkonzentration von 0,1% Methanol im Kulturmedium. Nach Zufügen dieses präparierten Mediums wurden die Zellen unter normalen Bedingungen weiterkultiviert. Medium mit der zu untersuchenden Substanz, aber ohne Zellen, wurde zur Kontrolle der Substanzstabilität unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Untersuchungen zum Zeitverlauf (durchgeführt in Duplikaten) umfaßten folgende Zeitpunkte: 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Die Zellmedien wurden 1:1 mit Methanol verdünnt und für 16 h zur Proteinfällung bei 4 °C gelagert. Aliquots wurden bei 15000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und für die HPLC- und LC/MS-Analyse gefiltert (0,22 µm, PTFE).

Außerdem wurden Studien mit 5–5-Diferulat (15 µM im Medium) und in DMSO gelösten Diethylestern von 5–5-Diferulat (60 µM), 8–5-Benzofuran-Diferulat (60 µM) und 8–O–4-Diferulat (35 und 200 µM) mit 0,1% DMSO im Medium und einer Inkubationszeit von 16 h analog der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

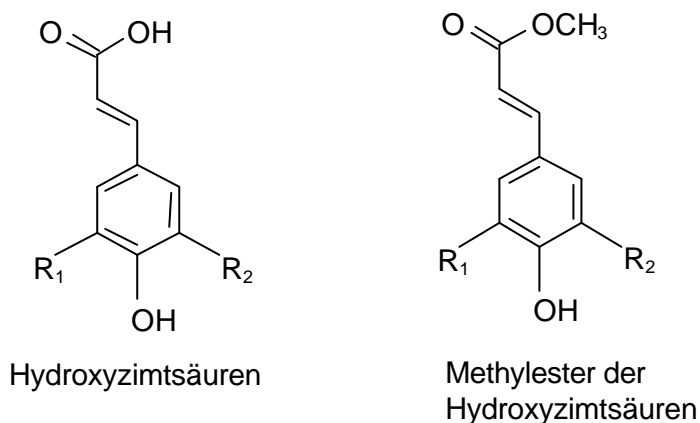


Abbildung 10: Strukturformeln von Hydroxyzimtsäuren und deren Methylestern

2.4.3. Untersuchungen zur Esterase-Aktivität

Differenzierte Caco-2-Zellen wurden nach einem Mediumswechsel unter normalen Bedingungen für 22 h kultiviert. Aliquots dieses mit Stoffwechselprodukten und Enzymen angereicherten Mediums wurden (in Abwesenheit der Zellen) jeweils mit 50 µM MFA, MSA, MPA und MCA (analog zu den metabolischen Studien unter 2.4.2.) für 18 h bei 37 °C inkubiert. Das Kontrollmedium wurde entsprechend ohne Zellen inkubiert. Aliquots wurden 1:1 mit MeOH verdünnt, bei 4 °C für 16 h zur Proteinfällung gelagert, für 15 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert und für die HPLC-Analyse gefiltert (0,22 µm, PTFE). Die Experimente wurden jeweils in drei Parallelen durchgeführt.

2.4.4. Identifizierung der Metaboliten

2.4.4.1. Enzymbehandlung der Zellmedien und synthetisierten Sulfate

Nach einer 24stündigen Inkubation wurden jeweils 1 ml-Aliquots der Kulturmedien mit 2 µl 50%iger Essigsäure angesäuert. Von dieser Lösung wurden 300 µl-Aliquots jeweils mit 5 µl PBS-Puffer (Lösungsmittel für die Enzyme, Kontrolle), mit Sulfatase (5 U, entspricht 5 µl) und mit β-Glucuronidase (25 U, entspricht 5 µl) für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden zur Proteinfällung 300 µl Methanol zugefügt, die Medien für 16 h bei 4 °C gelagert, zentrifugiert (15 min bei 15000 x g und 4 °C) und gefiltert (0,22 µm, PTFE). Von dem nicht weiter aufgereinigten Rohextrakt des synthetisierten Ferulasäure- und des Sinapinsäure-Sulfats wurden jeweils 100 µl unter einem leichten Strom von N₂ getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 ml PBS-Puffer (Gibson) gelöst und mit 2 µl 50%iger Essigsäure auf pH 6 angesäuert. Aliquots von 300 µl wurden, wie zuvor beschrieben, mit 10 µl PBS-Puffer oder 10 µl Sulfatase (= 10 U) inkubiert und nach der Proteinfällung mit Methanol für die HPLC-Analyse aufbereitet.

2.4.4.2. HPLC- und LC/MS-Analyse der Zellmedien

Die HPLC-Analyse der Zellmedien wurde mit einem leicht veränderten Gradienten und einem Injektionsvolumen von 100 µl durchgeführt:

Gradient (Flußrate: 1 ml/min):	0 min	10% B
	30 min	38% B
	35 min	100% B
	55 min	100% B
	60 min	10% B
	70 min	10% B

Alle weiteren Einzelheiten siehe 2.3.5..

Die Full-Scan-Spektren wurden bei der LC/MS-Analyse unter den zuvor genannten HPLC-Bedingungen sowohl im positiven (ES+) als auch im negativen (ES-) Ionen Electrospray Modus zwischen m/z 50–1000 mit einer Scan-Rate von 1,5 s, einer Interchannel-Verzögerung von 0,1 s und bei einer Spannung (cone voltage) von 18 V erstellt.

2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus den Parallelen mit zugehöriger Standardabweichung. Letztere berechnet sich dabei folgendermaßen:

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}{n - 1}}$$

Um die antioxidativen Kapazitäten der getesteten Substanzen besser untereinander vergleichen und IC-Werte bestimmen zu können, wurden die Mittelwerte (\bar{x}) relativ zu den Mittelwerten der Kontrollreaktionen (\bar{y}) umgerechnet und stellen somit die relativen Verhältnisse der Mittelwerte (rV) zueinander dar:

$$rV (\% \text{ von Kontrolle}) = \bar{x} / \bar{y} * 100$$

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte dementsprechend durch Multiplikation der relativen Verhältnisse der Mittelwerte zueinander mit der Wurzel aus der Summe der Quadrate der Variationskoeffizienten (= relatives Maß der Standardabweichung prozentual bezogen auf den arithmetischen Mittelwert):

$$\sigma_{n-1} (\% \text{ von Kontrolle}) = \bar{x} / \bar{y} * \sqrt{(100 * \sigma_{n-1;x} / \bar{x})^2 + (100 * \sigma_{n-1;y} / \bar{y})^2}$$

3. ERGEBNISSE

Hier werden zunächst Ergebnisse zu den antioxidativen Eigenschaften von Bier und den Bierrohstoffen in verschiedenen in vitro Testsystemen dargestellt. Weiterführend werden die Ergebnisse aus den Humanstudien bezüglich der antioxidativen Wirksamkeit von verschiedenen Testbieren in relevanten Modellsystemen gezeigt. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit einer Humanstudie zur Absorption von Hydroxyzimtsäuren aus Zerealien mit einem hohen Anteil an Weizenkleie und dem Metabolismus von Hydroxyzimtsäuren in einem in vitro Testmodell mit menschlichen Darmzellen (Caco-2).

3.1. ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN

In mehreren Modellsystemen wurden die antioxidativen Kapazitäten von Bier und seinen Inhaltsstoffen bezüglich ihrer Eigenschaften als Radikalfänger und Kupferkomplexatoren untersucht. Bei den getesteten Bierfraktionen handelt es sich um die jeweils wässrige Fraktion von Maische und von Hefe, um Läuter- und Anstellwürze, Hopfenpellets (als ethanolischer Extrakt oder in Acetatpuffer [pH 4] bzw. Carbonatpuffer [pH 10] extrahiert) und einen lipophilen Hopfenextrakt (ethanolisch gelöst oder in Carbonatpuffer [pH 10] extrahiert). Außerdem wurde verkaufsfertiges Helles Bier mit einem Ethanolgehalt von 4,9% untersucht.

3.1.1. Xanthin/Xanthinoxidase-System (X/XOD-System)

Verschiedene Bierinhaltsstoffe wurden im X/XOD-System auf ihre Eigenschaften als Radikalfänger getestet. In der zugrunde liegenden Reaktion werden enzymkatalysiert durch die XOD primär $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 und übergangsmetallkatalysiert auch OH^{\bullet} generiert. Die entstehenden ROS können über die Ethenfreisetzung aus KMB detektiert werden, wobei sich die antioxidative Kapazität der Testsubstanzen in einer niedrigeren Ethenbildung äußert. Durch den Zusatz von jeweils 100 μ l Plasma (entspricht 5% Plasma i.A.) wurde der Einfluß einer möglichen Bindung an Plasmaproteine, wodurch Substanzen mit Radikalfängereigenschaften in ihrer Wirksamkeit gehemmt oder neutralisiert werden können, überprüft. In den folgenden **Abbildungen 11 – 17** sind die Effekte der getesteten Bierinhaltsstoffe, d.h. der wässrigen Fraktionen von Maische und Hefe, Läuterwürze, Helles Bier, Hopfenpellet-Extrakte (pH 4 und pH 10), Hopfenextrakt (pH 10) sowie die ethanolisch gelösten Hopfenprodukte, auf die X/XOD-Reaktion jeweils einzeln und in Kombination mit Blutplasma dargestellt. **Tabelle 13** und **Abbildung 18** zeigen am Ende dieses Kapitels zusammenfassend eine Übersicht der IC_{25}^- , IC_{50}^- und IC_{75}^- -Werte der einzelnen Konzentrationsreihen, die ausgehend von den 100%-Werten (Kontrolle) bestimmt wurden. Bei den Konzentrationsreihen in Gegenwart von Plasmabestandteilen wurde die Kontrolle mit Plasma, aber ohne Testsubstanz gleich 100% gesetzt.

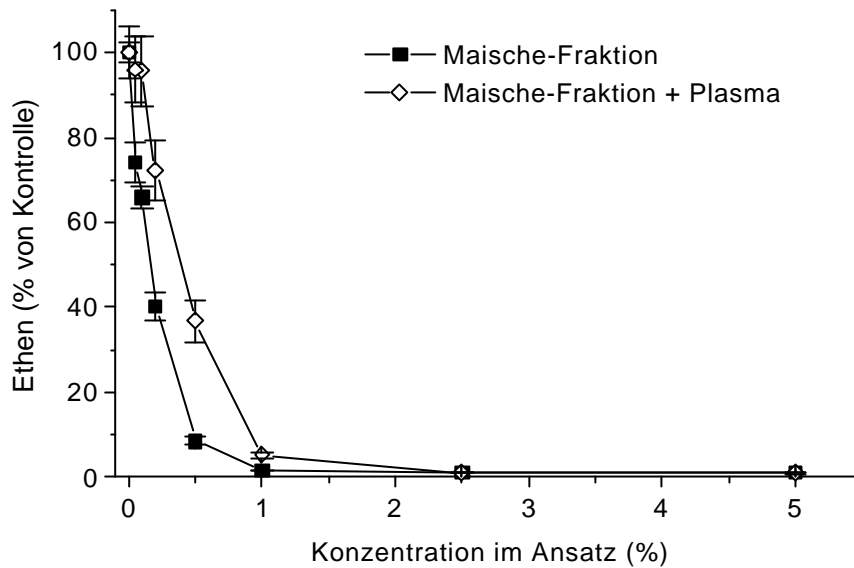


Abbildung 11: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 6: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Maische-Fraktion	Maische-Fraktion + Plasma
0,00	100 ± 2	100 ± 6
0,05	74 ± 5	96 ± 8
0,10	66 ± 2	96 ± 8
0,20	40 ± 3	72 ± 7
0,50	8 ± 1	37 ± 5
1,00	2 ± 0	5 ± 1
2,50	1 ± 0	1 ± 0
5,00	1 ± 0	1 ± 0

Die Kurvenverläufe der konzentrationsabhängigen Hemmung der Ethenfreisetzung aus KMB durch die Maische-Fraktion (**Abb. 11, Tab. 6**), Hefe-Fraktion (**Abb. 12, Tab. 7**) und Läuterwürze (**Abb. 13, Tab. 8**) zeigen, daß diese Substanzen die besten antioxidativen Kapazitäten unter den untersuchten Bierinhaltsstoffen im X/XOD-Modell aufweisen. Bereits bei einer Konzentration von 1% im Ansatz wird die Ethenbildung in allen drei Fällen fast vollständig gehemmt. Die dazugehörigen IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte in **Tabelle 13** beziehungsweise in **Abbildung 18** verdeutlichen die nahezu identischen antioxidativen Wirkungen dieser drei Fraktionen.

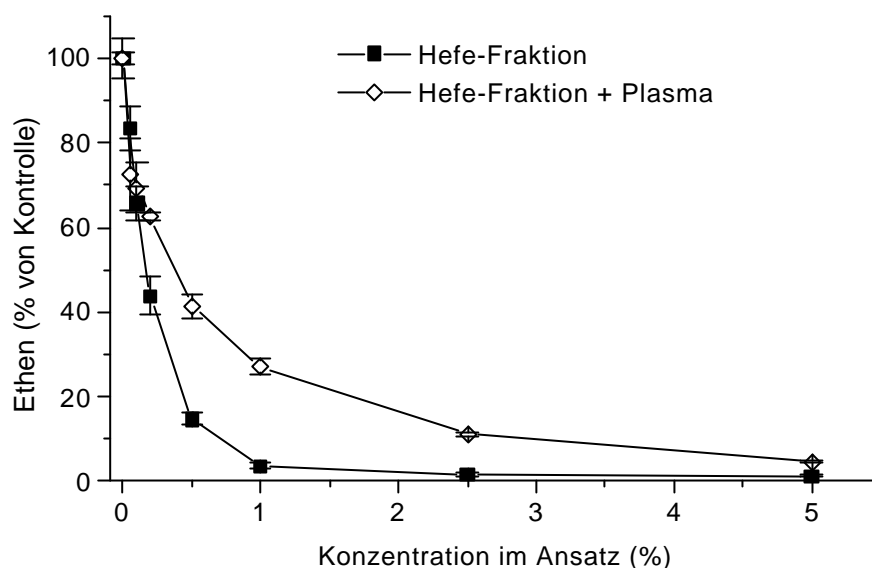


Abbildung 12: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 7: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Hefe-Fraktion	Hefe-Fraktion + Plasma
0,00	100 ± 5	100 ± 2
0,05	83 ± 5	73 ± 9
0,10	66 ± 4	69 ± 6
0,20	44 ± 5	63 ± 1
0,50	15 ± 1	41 ± 3
1,00	4 ± 1	27 ± 2
2,50	2 ± 0	11 ± 1
5,00	1 ± 0	5 ± 0

Durch den Zusatz von Plasma verschoben sich die Reaktionsverläufe nach rechts (**Abb. 11, 12 und 13**). Das bedeutet, daß in Gegenwart von Plasma zum Abfangen der gebildeten Oxidantien höhere Konzentrationen der Testsubstanzen benötigt werden. Dies zeigt sich auch anhand der höheren IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte, wobei die Maischekomponenten am wenigsten durch das Plasma beeinflusst werden. Mit 1% Maische im Ansatz wird die Plasmawirkung aufgehoben und die X/XOD-Reaktion gleich der ohne Plasma fast vollständig gehemmt. Sowohl bei der Hefe-Fraktion als auch bei der Läuterwürze wird eine Konzentration von mindestens 5% benötigt, um eine entsprechende Inhibition zu erreichen.

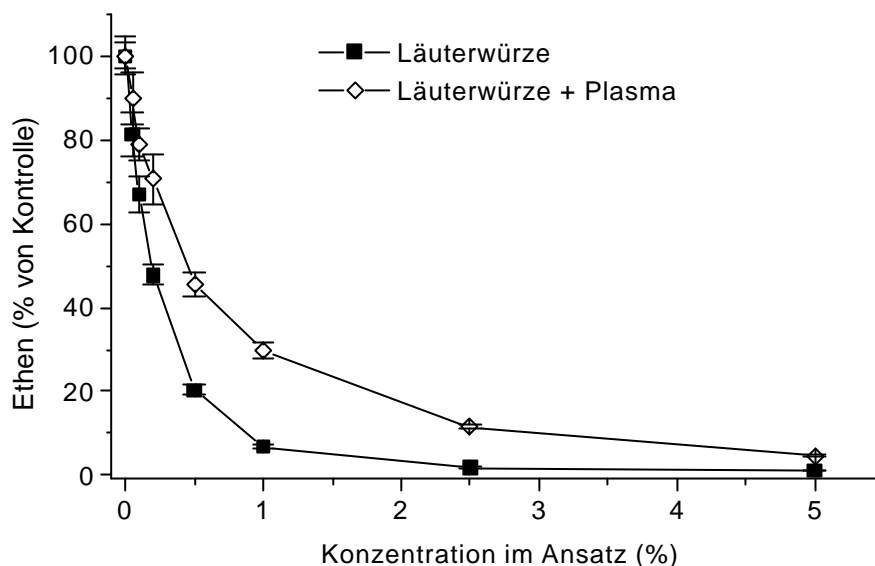


Abbildung 13: Einfluß von Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 8: Einfluß von Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Läuterwürze	Läuterwürze + Plasma
0,00	100 ± 5	100 ± 3
0,05	81 ± 5	90 ± 6
0,10	67 ± 4	79 ± 4
0,20	47 ± 2	71 ± 6
0,50	20 ± 1	46 ± 3
1,00	7 ± 0	30 ± 2
2,50	2 ± 0	11 ± 0
5,00	1 ± 0	5 ± 0

Das Helle Bier zeigt im Gegensatz zu den bisher dargestellten Bierrohstoffen eine geringere Hemmung der Ethenfreisetzung (**Abb. 14, Tab. 9**). Bei einer Konzentration von 5% Bier im Ansatz liefert das X/XOD-System noch eine Restaktivität von ca. 13%. Die dargestellten Werte sind auf eine EtOH-Kontrolle mit 4,9% EtOH bezogen, da dieser ebenfalls das System beeinflusst. Das antioxidative Potential von Hellem Bier wird im Gegensatz zu Maische, Hefe und Läuterwürze durch die Kombination mit Plasma in stärkerem Maße verringert.

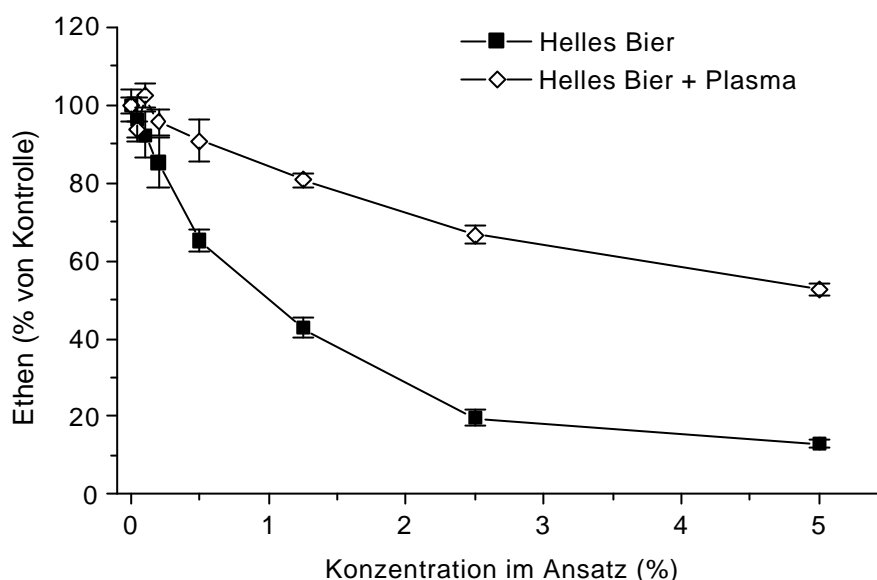


Abbildung 14: Einfluß von Bier auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 9: Einfluß von Bier auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Helles Bier	Helles Bier + Plasma
0,00	100 ± 4	100 ± 2
0,05	96 ± 6	94 ± 2
0,10	92 ± 6	103 ± 3
0,20	85 ± 7	96 ± 6
0,50	65 ± 3	91 ± 5
1,00	43 ± 3	81 ± 2
2,50	20 ± 2	67 ± 2
5,00	13 ± 1	53 ± 2

Die geringste antioxidative Kapazität zeigen in diesem System die wasserlöslichen Bestandteile aus dem lipophilen Hopfenextrakt, die in Carbonatpuffer pH 10 extrahiert wurden (**Abb. 15, Tab. 10**). Bei 2,5% Extraktlösung im Ansatz wird das System um 50% gehemmt, während bei der maximal getesteten Konzentration von 5% noch eine Restaktivität von 27% vorhanden ist, welche durch den Zusatz von Plasma auf 53% erhöht wird. Erst mit 2,5% Extraktlösung konnte eine signifikante Hemmung der X/XOD-Reaktion um ca. 20% bei Plasmazusatz festgestellt werden.

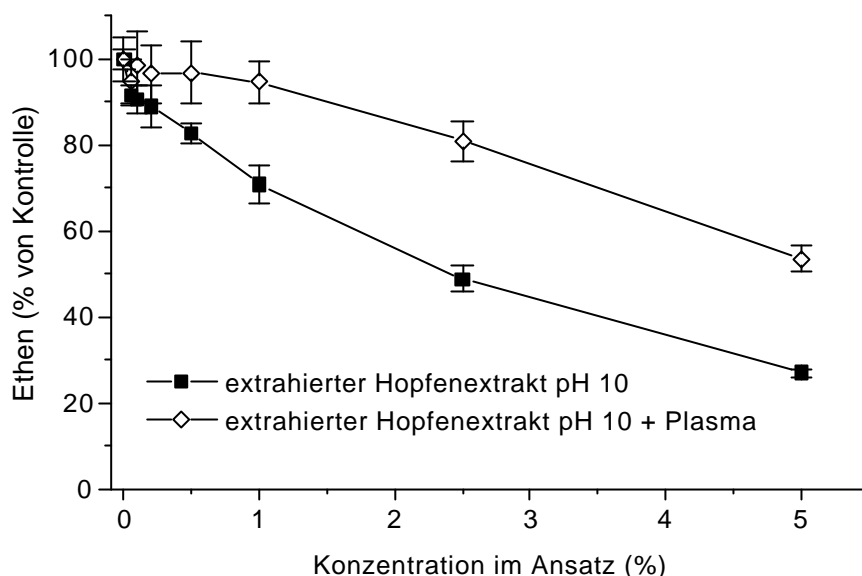


Abbildung 15: Einfluß von Hopfenextrakt, wässrig extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 10: Einfluß von Hopfenextrakt, wässrig extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Hopfenextrakt pH 10	Hopfenextrakt pH 10+ Plasma
0,00	100 ± 2	100 ± 5
0,05	91 ± 2	95 ± 5
0,10	91 ± 3	98 ± 8
0,20	89 ± 5	96 ± 7
0,50	83 ± 2	97 ± 7
1,00	71 ± 4	95 ± 5
2,50	49 ± 3	81 ± 5
5,00	27 ± 1	54 ± 3

Sowohl die alkalischen als auch sauren Extrakte der wässrig extrahierten Hopfenpellets zeigten gute antioxidative Aktivitäten (**Abb. 16, Tab. 11**). Bei der konzentrationsabhängigen Abnahme des freigesetzten Ethens besitzen die beiden Präparationen fast identische IC₂₅-, IC₅₀- und IC₇₅-Werte (**Tab. 13**) und hemmen bei einer Konzentration von 2,5% die X/XOD-Reaktion fast vollständig. In Kombination mit Plasma zeigt sich durch die deutlich verminderte Hemmung eine mögliche Anlagerung der wasserlöslichen Verbindungen aus dem Hopfenpellet an Plasmaproteine. Für beide Extrakte verlaufen die Kurven in Kombination mit Plasma nahezu identisch, wie die IC-Werte bestätigen. Allerdings wird beim alkalischen Extrakt eine 75%ige Hemmung nicht ganz erreicht, weshalb kein IC₇₅-Wert angegeben ist.

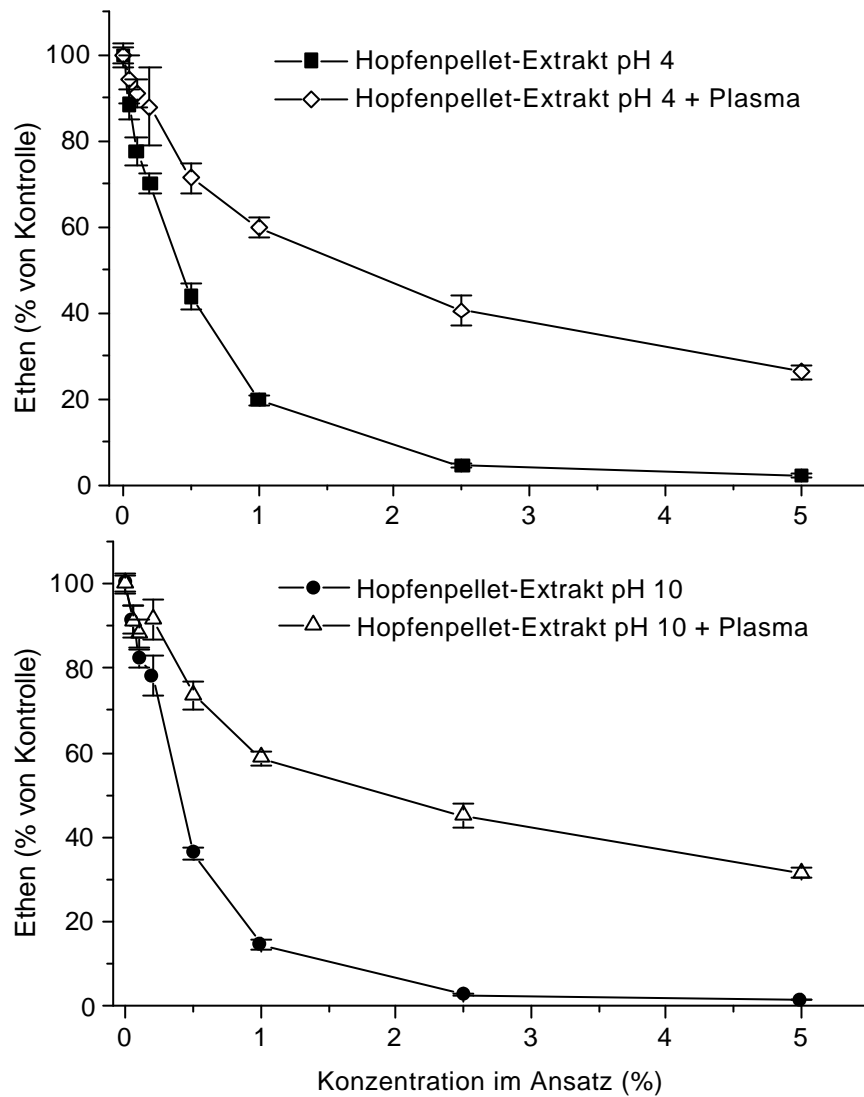


Abbildung 16: Einfluß von Hopfenpellet, wässrig extrahiert bei pH 4 und pH 10, auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 11: Einfluß von Hopfenpellet, wässrig extrahiert bei pH4 und pH 10, auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle			
	Hopfenpellet pH 4	Hopfenpellet pH 4+ Plasma	Hopfenpellet pH 10	Hopfenpellet pH 10+ Plasma
0,00	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 2
0,05	89 ± 3	94 ± 6	91 ± 3	91 ± 4
0,10	78 ± 3	91 ± 3	82 ± 2	88 ± 3
0,20	70 ± 2	88 ± 9	78 ± 5	92 ± 5
0,50	44 ± 3	71 ± 3	36 ± 1	74 ± 3
1,00	20 ± 1	60 ± 2	15 ± 1	59 ± 2
2,50	5 ± 0	41 ± 4	3 ± 0	45 ± 3
5,00	2 ± 0	26 ± 2	2 ± 0	32 ± 1

Neben den wässrigen Extrakten der Hopfenprodukte wurden der lipophile Hopfenextrakt und die Hopfenpellets auch als ethanolische Lösungen auf ihre antioxidative Kapazität getestet. Allerdings wirkt EtOH im X/XOD-System ebenfalls inhibierend. In Gegenwart von 5% EtOH (entspricht 100 µl) wurde die Ethenfreisetzung fast komplett gehemmt: In der Kontrollreaktion mit EtOH entstanden nur noch 60 pmol Ethen im Gegensatz zu 7500 pmol in der normalen Kontrolle. **Abbildung 17** stellt die Wirkung der Hopfenpräparate mit jeweils 5% EtOH im Ansatz dar. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit bei der Ethen-Detektion konnte trotzdem eine konzentrationsabhängige Hemmung durch den Hopfenextrakt festgestellt werden. Bei Zugabe von 0,25 mg Hopfenextrakt zeigte sich eine Restaktivität von 37%, welche sich auch durch Zugabe von 1,25 mg nicht wesentlich änderte. Beim Hopfenpellet ergab sich eine U-förmige Kurve mit einer maximalen 75%igen Hemmung bei 0,1 mg der Hopfenpellets, während bei 1 mg im Ansatz die Kontrollreaktion nur um ca. 10% reduziert wurde (**Tab. 12**).

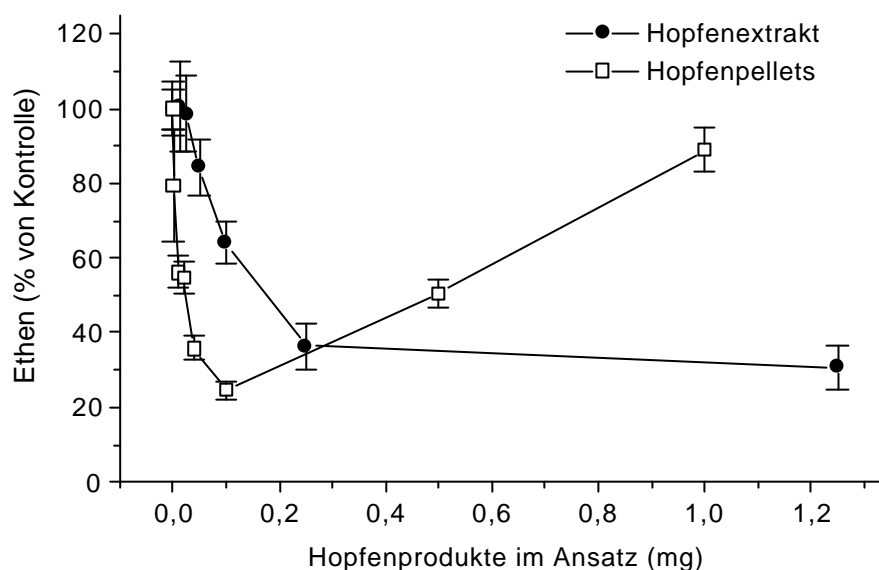


Abbildung 17: Einfluß von ethanolisch angelöstem Hopfenextrakt und Hopfenpellet auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 12: Einfluß von ethanolisch angelöstem Hopfenextrakt und Hopfenpellet auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Konzentration (mg im Ansatz)	Ethanolisch gelöster Hopfenextrakt (% Ethen v. Kontrolle)	Konzentration (mg im Ansatz)	Ethanolisch gelöste Hopfenpellets (% Ethen v. Kontrolle)
0,000	100 ± 7	0,000	100 ± 5
-	-	0,005	79 ± 15
0,0125	101 ± 12	0,010	56 ± 4
0,025	99 ± 10	0,020	55 ± 4
0,050	84 ± 8	0,040	36 ± 3
0,100	64 ± 5	0,100	25 ± 2
0,250	36 ± 6	0,500	51 ± 4
1,250	31 ± 6	1,000	89 ± 6

Anhand der in **Abbildung 18 (Tab. 13)** dargestellten IC-Werte lässt sich deutlich erkennen, daß die Maische-Fraktion, die Hefe-Fraktion und die Läuterwürze von den untersuchten Bierinhaltsstoffen im X/XOD-System die beste antioxidative Kapazität mit fast identischen IC-Werten aufweisen. Das heißt, ungefähr die gleichen Konzentrationen dieser Extrakte im Ansatz hemmen die Ethenentstehung als Maß für die antioxidative Kapazität um jeweils 25%, 50% beziehungsweise 75%. Das fertige Bier dagegen muß in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um die gleiche antioxidative Wirkung zu erbringen.

Die bei verschiedenen pH-Werten extrahierten Hopfenpellet-Extrakte zeigten ebenfalls gute antioxidative Eigenschaften. Der wässrig extrahierte lipophile Hopfenextrakt wies dagegen ein deutlich geringeres antioxidatives Potential auf; mit der am höchsten getesteten Konzentration von 5% i.A. konnte eine 75%ige Hemmung des Systems nicht erreicht werden.

Durch den Zusatz von Plasma (5% i.A.) wurden generell höhere Konzentrationen für eine entsprechende Inhibition des Testsystems benötigt, was sich in den höheren IC-Werten ausdrückt. Möglicherweise binden die wirksamen Inhaltsstoffe an Plasmaproteine und werden dadurch inaktiviert. Um in Gegenwart des Plasmas eine 50%ige Hemmung der X/XOD-Reaktion zu erreichen, bedarf es ungefähr der vierfachen Menge der Hopfenpellet-Extrakte und mehr als die fünffache Menge des Bieres im Vergleich zu den Reaktionen ohne Plasmazusatz. Dies kommt auch in den höheren Steigungen der Kurven in Anwesenheit von Plasma zum Ausdruck. Offenbar binden hier die effektiven Komponenten besonders gut an die Plasmabestandteile.

Tabelle 13: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im X/XOD-System

Testsubstanz		IC ₂₅ (% i.A.)	IC ₅₀ (% i.A.)	IC ₇₅ (% i.A.)
Maische-Fraktion		0,062	0,155	0,292
Maische-Fraktion	+ Plasma	0,195	0,353	0,602
Hefe-Fraktion		0,074	0,165	0,336
Hefe-Fraktion	+ Plasma	0,090	0,324	0,904
Läuterwürze		0,074	0,184	0,397
Läuterwürze	+ Plasma	0,156	0,430	1,072
Hopfenpellet-Extrakt 10		0,172	0,388	0,706
Hopfenpellet-Extrakt 10	+ Plasma	0,487	1,615	-
Hopfenpellet-Extrakt 4		0,143	0,384	0,891
Hopfenpellet-Extrakt 4	+ Plasma	0,465	1,440	5,000
Hopfenextrakt wässrig 10		0,810	2,332	-
Hopfenextrakt wässrig 10	+ Plasma	3,047	5,000	-
Helles Bier		0,344	0,900	2,240
Helles Bier	+ Plasma	1,697	5,000	-

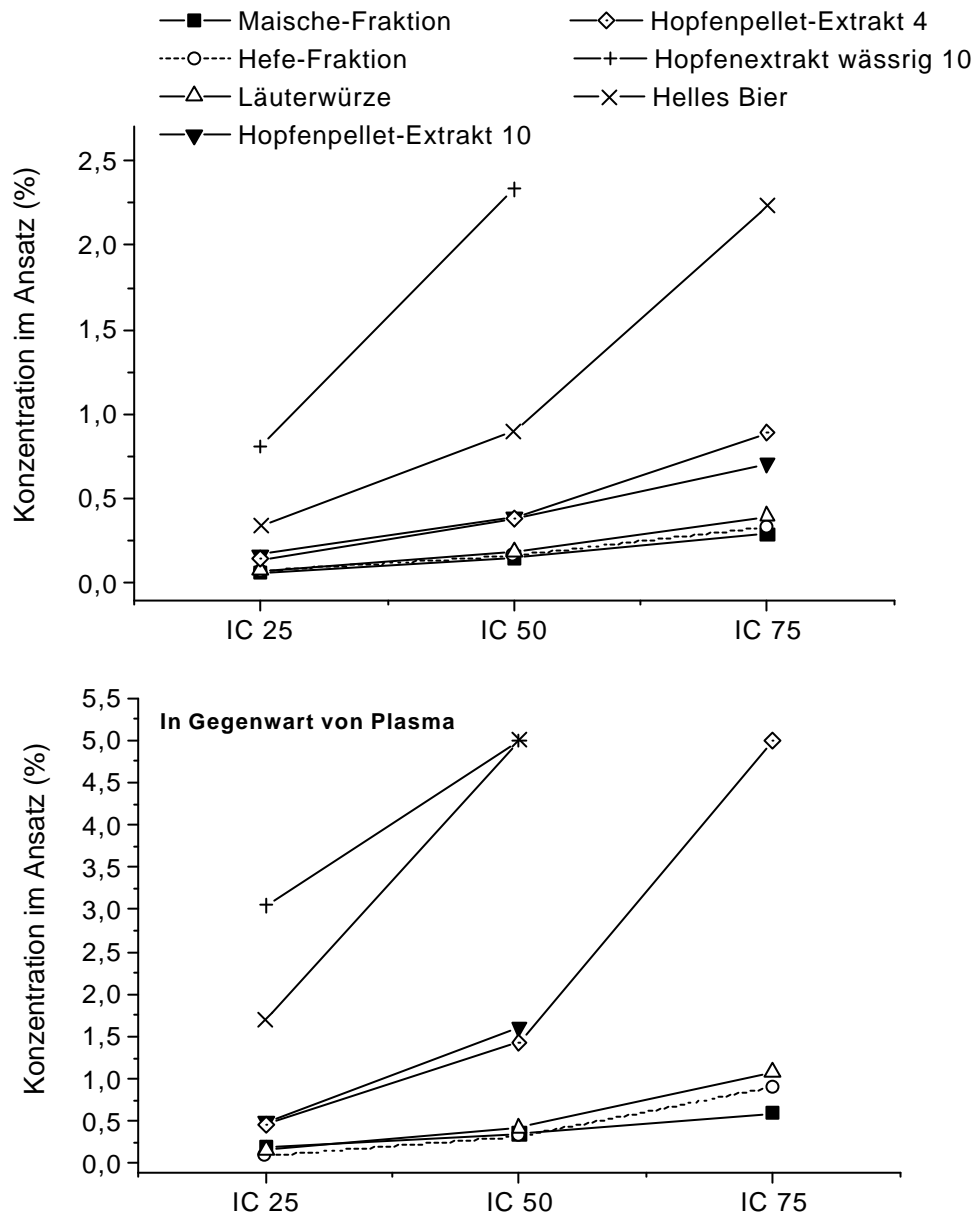


Abbildung 18: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im X/XOD-System

3.1.2. NADH/Diaphorase-System

Die antioxidativen Eigenschaften der wässrigen Maische- und Hefe-Fraktion, der Läuterwürze, des Hellen Bieres und des wässrig extrahierten Hopfenextraktes (pH 10) wurden in einem weiteren enzymkatalysierten Modell, dem NADH/Diaphorase-System, getestet. Die Diaphorase kann als Oxidoreduktase Sauerstoff unter Verwendung von NADH als Reduktionsmittel aktivieren, wobei die entstehenden ROS durch die oxidative Spaltung von KMB über eine Freisetzung von Ethen gaschromatographisch erfaßt werden können. In den folgenden **Abbildungen 19 – 23** sind sowohl die Konzentrationsreihen der einzelnen Bierrohstoffe als auch ihre Kombination mit Plasma (5% im Ansatz) dargestellt. Dabei wurde jeweils die produzierte Ethenmenge der Kontrollreaktionen ohne Testsubstanz gleich 100% gesetzt, um den Einfluß der Testsubstanz mit und ohne Zusatz von Plasma direkt vergleichen zu können. Das Plasma selbst wirkte antioxidativ und hemmte die Ethenbildung in den einzelnen Konzentrationsreihen zwischen 20 – 35% im Vergleich zur Kontrolle ohne Plasma.

In diesem Modell werden die zuvor gezeigten Ergebnisse aus dem X/XOD-System bestätigt. Sowohl die Maische-Fraktion (**Abb. 19, Tab. 14**), als auch die Hefe-Fraktion (**Abb. 20, Tab. 15**) und die Läuterwürze (**Abb. 21, Tab 16**) zeigten sehr gute und, beim Vergleich der IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte in **Tabelle 19**, nahezu identische antioxidative Kapazitäten. Ab Konzentrationen von 0,5% bzw. 1,0% im Ansatz wurde die Ethenbildung durch die drei Bierrohstoffe fast vollständig gehemmt. Durch die Zugabe von Plasma wurden die antioxidativen Eigenschaften negativ beeinflusst. Anhand der nach rechts verlagerten Kurven, die einen Aktivitätsverlust aufzeigen, kann auf eine Bindung der aktiven Komponenten an Plasmaproteine geschlossen werden. Auch hier wurden die Bestandteile der Maische-Fraktion durch die Zugabe von Plasma am wenigsten beeinflusst, während die Komponenten der Hefe-Fraktion und der Läuterwürze in höherem Maße an Aktivität verloren.

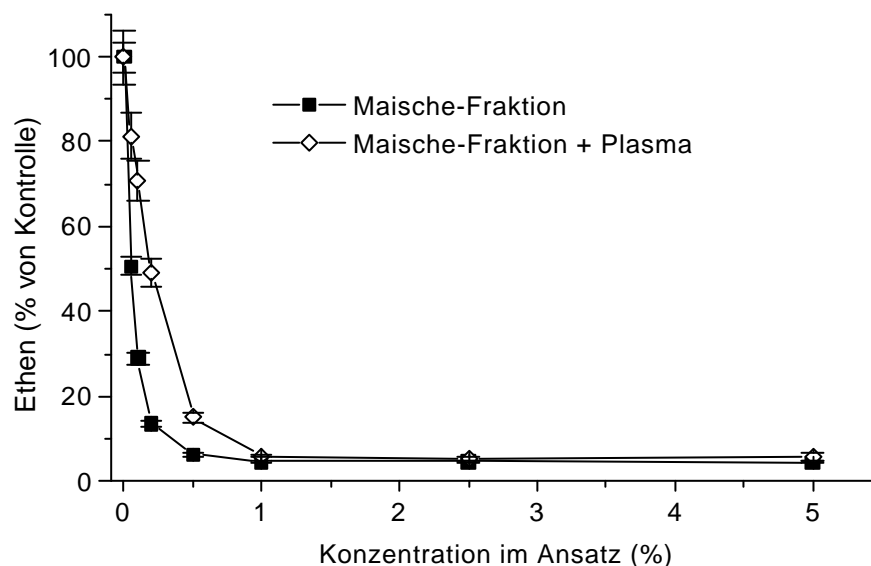


Abbildung 19: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 14: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Maische-Fraktion	Maische-Fraktion + Plasma
0,00	100 ± 4	100 ± 6
0,05	51 ± 2	81 ± 5
0,10	29 ± 1	71 ± 5
0,20	14 ± 1	49 ± 3
0,50	6 ± 0	15 ± 1
1,00	5 ± 0	6 ± 0
2,50	5 ± 0	5 ± 0
5,00	4 ± 0	6 ± 0

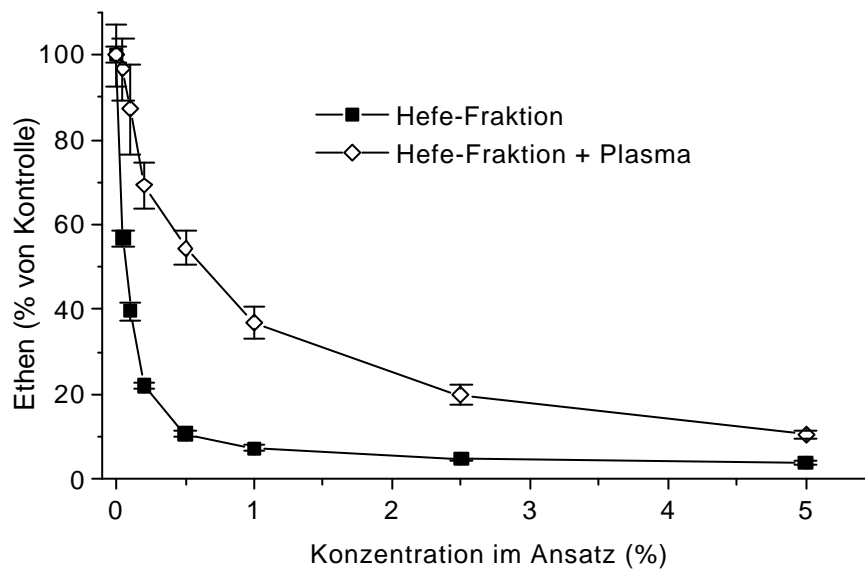


Abbildung 20: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 15: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Hefe-Fraktion	Hefe-Fraktion + Plasma
0,00	100 ± 2	100 ± 7
0,05	57 ± 2	97 ± 7
0,10	40 ± 2	87 ± 10
0,20	22 ± 1	69 ± 5
0,50	11 ± 1	55 ± 4
1,00	7 ± 1	37 ± 4
2,50	5 ± 0	20 ± 2
5,00	4 ± 0	11 ± 1

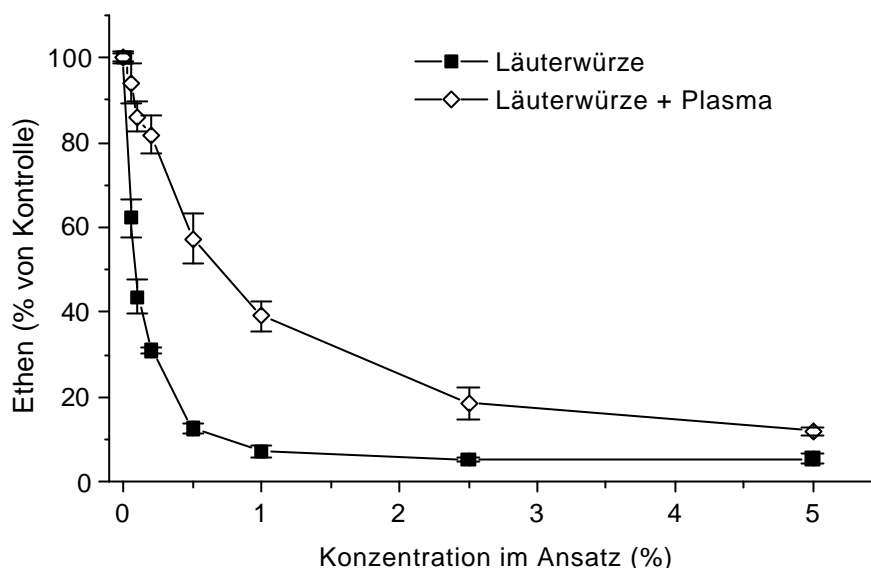


Abbildung 21: Einfluß von Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 16: Einfluß der Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Läuterwürze	Läuterwürze + Plasma
0,00	100 ± 1	100 ± 1
0,05	62 ± 5	94 ± 5
0,10	44 ± 4	86 ± 4
0,20	31 ± 1	82 ± 5
0,50	13 ± 1	57 ± 6
1,00	7 ± 1	39 ± 4
2,50	5 ± 1	19 ± 4
5,00	5 ± 1	12 ± 1

Das Helle Bier zeigte die geringste antioxidative Kapazität unter den getesteten Substanzen (**Abb. 22, Tab. 17**). Mit 0,5% Bier im Ansatz wurde eine Hemmung um 50% erreicht, während mit 1% Bier noch immer eine Restaktivität von ca. 40% meßbar war, die auch bei einer Erhöhung der Bierkonzentration die Ethenfreisetzung nicht weiter hemmte. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die gemessenen Ethenmengen auf eine EtOH-Kontrolle mit 4,9% EtOH (entspricht insgesamt 0,245% EtOH im Ansatz) bezogen wurden, um den Einfluß von EtOH auszuschließen zu können. Da EtOH auch als Radikal-Scavenger fungiert, entstanden statt 750 – 800 pmol Ethen in der Kontrollreaktion nur noch 125 pmol Ethen nach EtOH-Zugabe. Damit wurde das System allein durch den Alkoholgehalt des Bieres um ca. 85% gehemmt.

In Gegenwart von Plasma zeigte sich eine signifikante Hemmung der Ethenbildung um 35% erst ab 2,5% Bier im Ansatz, die auch bei einer Konzentration von 5% nicht zunahm. Damit war auch kein IC_{50} -Wert bestimmbar (**Tab. 19**). Die antioxidativen Effekte des Bieres, die in den niedrigeren Konzentrationsbereichen gemessen wurden, sind durch das Plasma fast komplett neutralisiert worden.

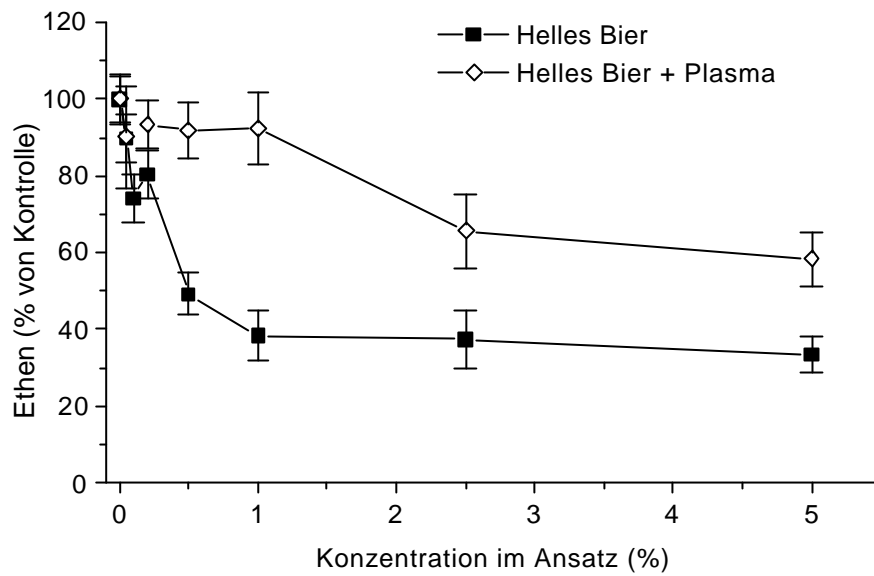


Abbildung 22: Einfluß von Bier auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 17: Einfluß der Bier auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Helles Bier	Helles Bier + Plasma
0,00	100 ± 6	100 ± 6
0,05	90 ± 6	90 ± 13
0,10	74 ± 6	-
0,20	80 ± 6	93 ± 6
0,50	49 ± 5	92 ± 7
1,00	38 ± 6	93 ± 9
2,50	37 ± 8	66 ± 10
5,00	34 ± 5	58 ± 7

Der im Carbonatpuffer wässrig extrahierte Hopfenextrakt zeigte mit zunehmender Konzentration eine kontinuierliche Abnahme der Ethenfreisetzung bis auf 16% mit 5% Extrakt im Ansatz (**Abb. 23, Tab. 18**). Ab einer Konzentration von 1% verläuft die Kurve in Kombination mit Plasma parallel zu der normalen Konzentrationsreihe, wobei die Differenz von ca. 20% Hemmung zwischen den beiden Kurven ebenfalls auf eine Inaktivierung der antioxidativ wirksamen Komponenten im Extrakt durch das Plasma schließen läßt. Da bei der maximal eingesetzten Konzentration von 5% Extrakt nur eine Hemmung der Ethenfreisetzung um 60% erreicht wurde, kann kein IC_{75} -Wert angegeben werden (**Tabelle 19**).

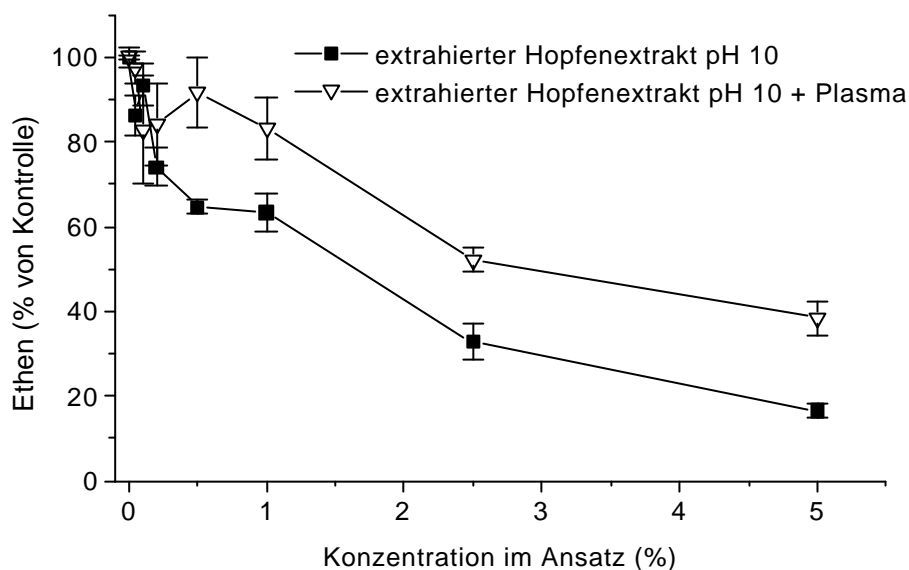


Abbildung 23: Einfluß von Hopfenextrakt, wässrig extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 18: Einfluß von Hopfenextrakt, wässrig extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im NADH/Diaphorase-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	% Ethen von Kontrolle	
	Hopfenextrakt pH 10	Hopfenextrakt pH 10 + Plasma
0,00	100 ± 2	100 ± 1
0,05	86 ± 5	97 ± 4
0,10	94 ± 5	83 ± 13
0,20	74 ± 4	84 ± 10
0,50	65 ± 2	92 ± 8
1,00	63 ± 5	83 ± 7
2,50	33 ± 4	52 ± 3
5,00	17 ± 2	38 ± 4

In diesem System zeichneten sich, wie im X/XOD-System, die Maische-Fraktion, die Hefe-Fraktion und die Läuterwürze hinsichtlich ihres antioxidativen Verhaltens als die wirksamsten Bierinhaltsstoffe aus (**Abb. 24, Tab. 19**), während das Helle Bier und besonders der wässrig extrahierte Hopfenextrakt ein deutlich geringeres antioxidatives Potential aufwiesen. In Gegenwart von Plasma unterschieden sich jedoch auch diese drei Fraktionen im NADH/Diaphorase-System. Die Maische-Fraktion zeigte sich beim Abfangen der generierten Radikale am potentesten, während das Bier, zusammen mit den Plasmabestandteilen getestet, sogar eine noch schlechtere antioxidative Kapazität aufwies als der Hopfenextrakt und dadurch mit der maximal untersuchten Konzentration von 5% i.A. weder eine Angabe des IC₇₅-Wertes noch des IC₅₀-Wertes möglich ist.

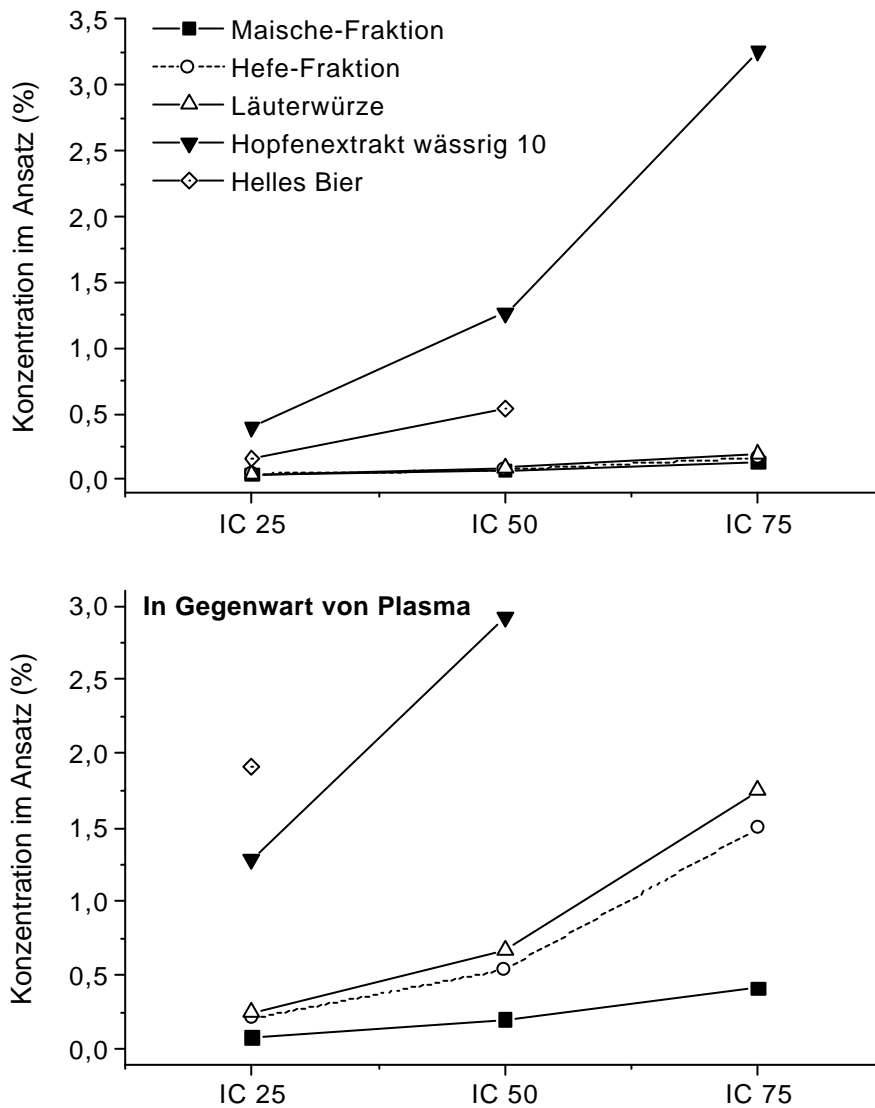


Abbildung 24: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im NADH/Diaphorase-System

Tabelle 19: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im NADH/Diaphorase-System

Testsubstanz		IC ₂₅ (% i.A.)	IC ₅₀ (% i.A.)	IC ₇₅ (% i.A.)
Maische-Fraktion		0,031	0,063	0,127
Maische-Fraktion	+ Plasma	0,081	0,200	0,414
Hefe-Fraktion		0,039	0,070	0,165
Hefe-Fraktion	+ Plasma	0,211	0,542	1,500
Läuterwürze		0,039	0,085	0,190
Läuterwürze	+ Plasma	0,247	0,673	1,748
Hopfenextrakt wässrig 10		0,400	1,266	3,260
Hopfenextrakt wässrig 10	+ Plasma	1,280	2,915	-
Helles Bier		0,164	0,543	-
Helles Bier	+ Plasma	1,910	-	-

3.1.3. Hydroxylaminoxidations-System

In diesem System wird Hydroxylamin in erster Linie durch $O_2^{\bullet-}$, das enzymkatalysiert von der XOD bei der Reaktion von Xanthin zur Harnsäure gebildet wird, oxidiert. Dabei entsteht neben H_2O_2 auch Nitrit, welches im Säuren mit Sulfanilamid als Diazoniumsalz fixiert wird und mit Naphthylamin einen roten Azofarbstoff bildet, der als Quantifizierungsmaßstab für $O_2^{\bullet-}$ photometrisch detektiert werden kann. Allerdings können auch übergangsmetall-katalysiert (Haber-Weiss-Reaktion) OH^{\bullet} -Radikale entstehen, die ebenfalls mit NH_2OH reagieren, so daß bei einer Hemmung der Nitrit- bzw. Azofarbstoffbildung nicht ausschließlich auf ein Abfangen von $O_2^{\bullet-}$ geschlossen werden kann.

In den nachfolgenden **Abbildungen 25 – 27** sind Konzentrationsreihen von Bier und Bierinhaltsstoffen in Abhängigkeit von der Extinktion bei 540 nm im Verhältnis zur Kontrollreaktion aufgetragen. **Tabelle 23** bzw. **Abbildung 28** stellen zusammenfassend die IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte der verschiedenen Testsubstanzen dar.

Die Reaktionen in Gegenwart von Plasma, wie im X/XOD- und NADH/Diaphorase-System, wurden nicht durchgeführt.

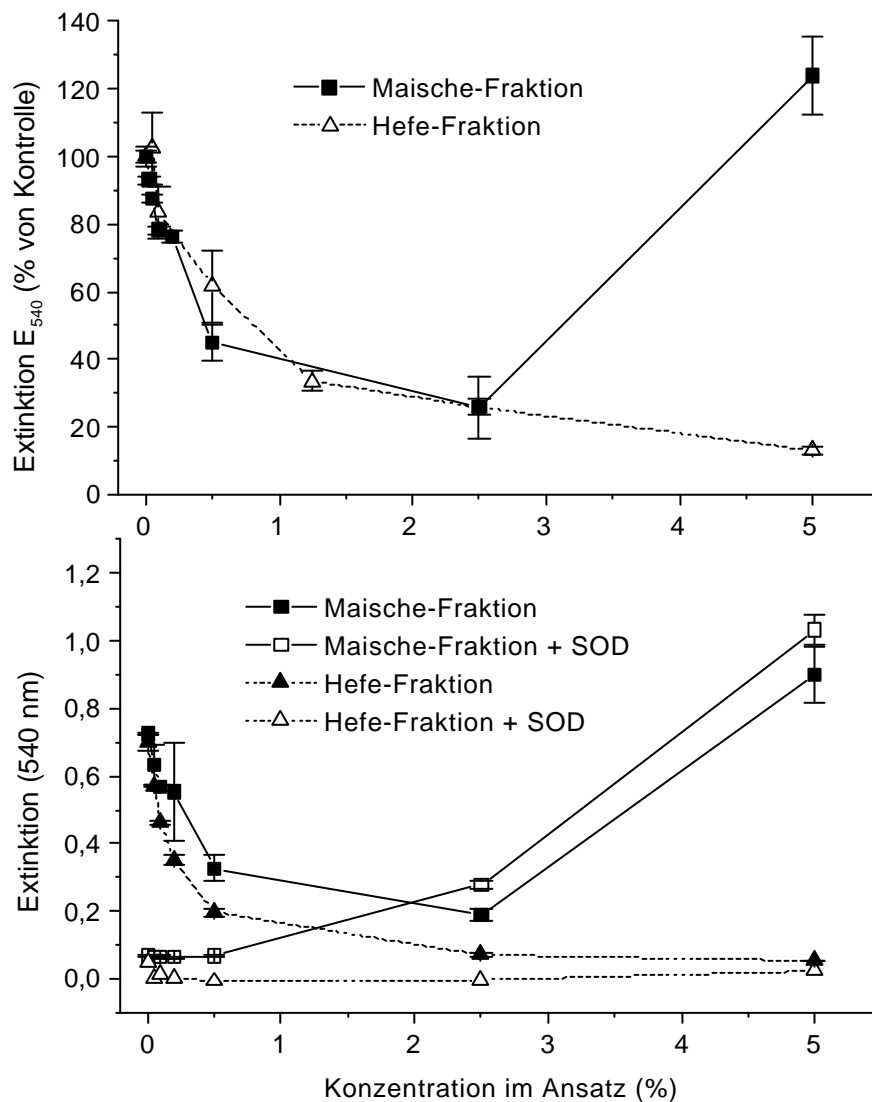


Abbildung 25: Einfluß der Maische- und Hefe-Fraktion auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System, dargestellt als relative Verhältnisse zur Kontrollreaktion (oben) und als gemessene Extinktionen mit SOD-Kontrolle (unten)

Tabelle 20: Einfluß der Maische- und Hefe-Fraktion auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System und SOD-Kontrollen

Konzentrationen (% im Ansatz)	Extinktion bei 540 nm (% von Kontrolle) Maische-Fraktion	Konzentrationen (% im Ansatz)	Extinktion bei 540 nm (% von Kontrolle) Hefe-Fraktion
0,000	100 ± 2	0,000	100 ± 3
0,025	93 ± 1	-	-
0,050	88 ± 1	0,050	103 ± 11
0,100	78 ± 1	0,100	84 ± 8
0,200	76 ± 2	0,500	62 ± 11
0,500	45 ± 5	1,250	34 ± 3
2,500	26 ± 3	2,500	26 ± 9
5,000	124 ± 12	5,000	13 ± 1

Konzentrationen (% im Ansatz)	Extinktion bei 540 nm			
	Maische-Fraktion	Maische-Fraktion + SOD	Hefe-Fraktion	Hefe-Fraktion + SOD
0,000	0,725 ± 0,004	0,068 ± 0,004	0,699 ± 0,023	0,050
0,050	0,635 ± 0,058	0,065 ± 0,001	0,572 ± 0,004	0,002
0,100	0,568 ± 0,008	0,066 ± 0,004	0,463 ± 0,006	0,013
0,200	0,553 ± 0,148	0,064 ± 0,003	0,351 ± 0,013	0,003
0,500	0,326 ± 0,038	0,067 ± 0,001	0,197 ± 0,011	0,007
2,500	0,188 ± 0,018	0,279 ± 0,010	0,071 ± 0,007	0,003
5,000	0,900 ± 0,084	1,033 ± 0,047	0,053 ± 0,003	0,023

Sowohl die wässrige Maische-Fraktion als auch die Hefe-Fraktion zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Farbstoffbildung, die bis zu einer Konzentration von 2,5% im Ansatz fast identisch verlief und eine 75%ige Inhibition erreichte (**Abb. 25, Tab. 20**). Allerdings wurde die Reaktion durch eine Erhöhung der Maische-Konzentration auf 5% deutlich stimuliert, während bei der Hefe-Fraktion eine weitere Hemmung auf eine Restaktivität von 13% erreicht wurde.

Bei den durchgeführten Konzentrationsreihen aller Testsubstanzen wurde durch Zusatz von Superoxiddismutase (SOD) überprüft, ob die Farbstoffbildung ausschließlich auf das generierte $O_2^{\bullet-}$ zurückzuführen ist. Eine Nitrit- und damit zusammenhängende Azofarbstoffbildung durch eine Oxidation des Hydroxylamins durch die Testsubstanzen war bei der Hefe-Fraktion (**Abb. 25, Tab. 20**), Läuter- und Anstellwürze, Bier und den Hopfenprodukten nicht feststellbar, d.h. eine Farbstoffbildung unterblieb in Gegenwart von SOD. Bei der Maische-Fraktion dagegen wurde trotz zugesetzter SOD eine Farbstoffentwicklung bei den höheren Konzentrationen von 2,5 und 5% im Ansatz beobachtet. Damit ist die Farbstoffentwicklung bei diesen Maische-Konzentrationen nicht (allein) auf die Oxidation von NH_2OH durch $O_2^{\bullet-}$ zurückzuführen.

In **Abbildung 26** und **Tabelle 21** sind die identischen Hemmungen der Farbstoffbildung durch die Läuter- und Anstellwürze dargestellt. Das Bier (bezogen auf 4,9%ige EtOH-Kontrolle) zeigte ein geringeres antioxidatives Potential als die Maische, Hefe und Würzen und dementsprechend etwas höhere IC₂₅-, IC₅₀- und IC₇₅-Werte in **Tabelle 23**. Wie auch bei der Maische- und Hefe-Fraktion waren bereits bei 0,5% der jeweiligen Testsubstanz signifikante Hemmungen zu beobachten.

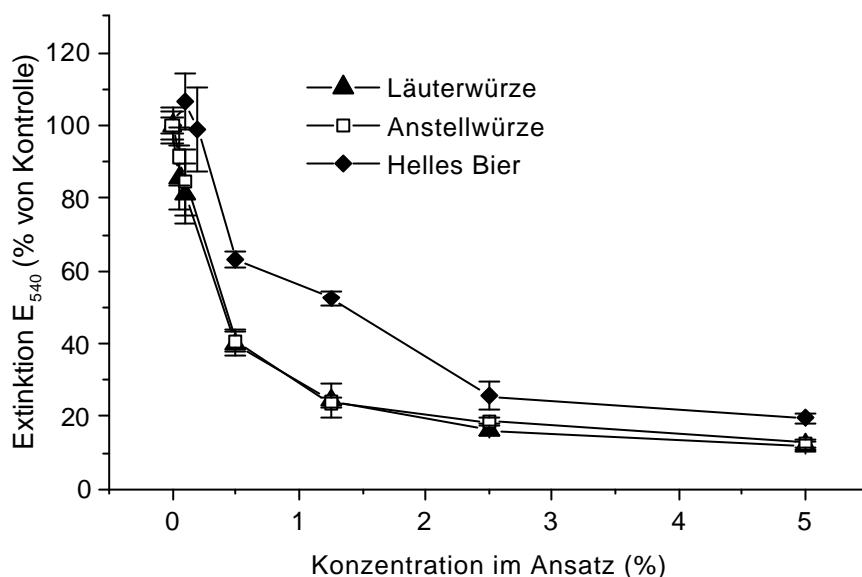


Abbildung 26: Einfluß von Läuterwürze, Anstellwürze und Bier auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System

Tabelle 21: Einfluß von Läuterwürze, Anstellwürze und Bier auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System

Konzentrationen (% im Ansatz)	Extinktion bei 540 nm (% von Kontrolle)		
	Läuterwürze	Anstellwürze	Helles Bier
0,00	100 ± 5	100 ± 4	100 ± 2
0,05	86 ± 8	91 ± 8	107 ± 8
0,10	81 ± 8	84 ± 9	99 ± 12
0,50	40 ± 3	41 ± 3	63 ± 2
1,25	24 ± 5	24 ± 2	52 ± 2
2,50	16 ± 2	19 ± 1	26 ± 4
5,00	12 ± 1	13 ± 1	20 ± 2

Die Hopfenprodukte wurden als ethanolisch angelöste Extrakte getestet. Die Hopfenpellet-Partikel und der durch Zugabe des sauren Sulfanilamids entstehende weißliche Niederschlag beim Hopfenextrakt wurden vor der photometrischen Messung abzentrifugiert. **Abbildung 27** und **Tabelle 22** zeigen die konzentrationsabhängigen Hemmungen von Hopfenextrakt und Hopfenpellets. Mit den Hopfenpellets wurden bei den maximal verwendeten Mengen von 0,5 und 1,0 mg Inhibitionen von 85% erreicht, während eine Hemmung von ca. 40% mit 0,25 mg Hopfenextrakt auch mit 1,25 mg im Ansatz nicht erhöht werden konnte, wobei möglicherweise der entstandene Niederschlag eine Rolle spielen könnte.

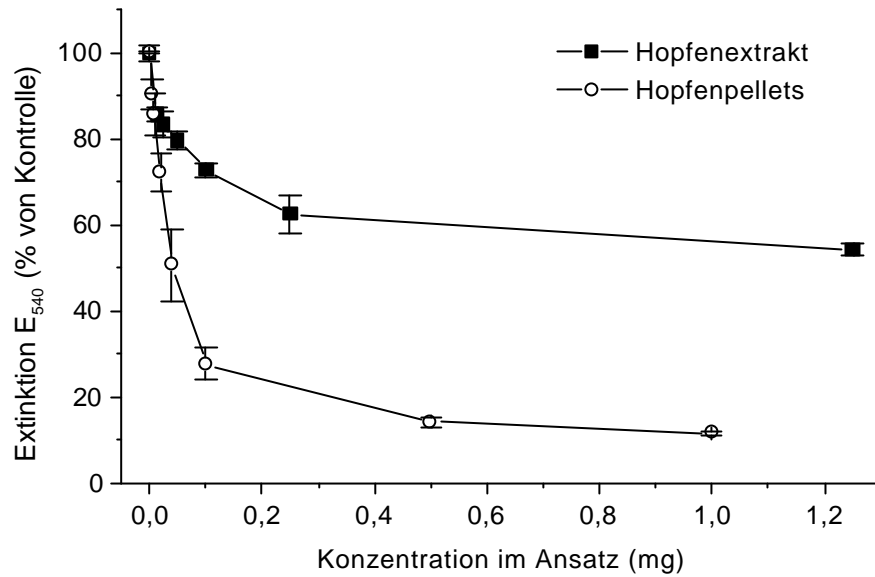


Abbildung 27: Einfluß der ethanolisch angelösten Hopfenprodukte auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System

Tabelle 22: Einfluß der ethanolisch angelösten Hopfenprodukte auf die Azofarbstoffbildung im Hydroxylaminoxidations-System

Konzentrationen (mg im Ansatz)	Ethanol. gel. Hopfenextrakt Extinktion bei 540 nm (% von Kontrolle)	Konzentrationen (mg im Ansatz)	Ethanol. gel. Hopfenpellets Extinktion bei 540 nm (% von Kontrolle)
0,000	100 ± 2	0,000	100 ± 0
0,0125	86 ± 2	0,005	90 ± 3
0,025	83 ± 3	0,010	86 ± 5
0,050	80 ± 2	0,020	72 ± 4
0,100	73 ± 2	0,040	51 ± 8
0,250	63 ± 4	0,100	28 ± 4
1,250	54 ± 2	0,500	14 ± 1
-	-	1,000	12 ± 1

Die anhand von Ausgleichskurven durch die Meßpunkte ermittelten IC-Werte der Bierinhaltsstoffe im Hydroxylaminoxidations-System sind in **Abbildung 28** und **Tabelle 23** dargestellt. Auch in diesem System zeigten sich die Maische-Fraktion und die Würzen als effektivste Radikalfänger. Allerdings ist bei der Maische ein höherer IC₇₅-Wert zu verzeichnen, als möglicherweise zu erwarten gewesen wäre. Dies muß im Zusammenhang mit der beobachteten Reaktion der in höheren Konzentrationen vorliegenden Maischekomponenten stehen, die nicht SOD hemmbar war. Die Hefe-Fraktion wies im Gegensatz zum X/XOD- und NADH/Diaphorase-System ein etwas niedrigeres antioxidatives Potential auf als die Läuterwürze. Auch in diesem Testsystem war das fertige Bier bezüglich seiner antioxidativen Kapazität nicht so effektiv wie seine Rohstoff-Extrakte.

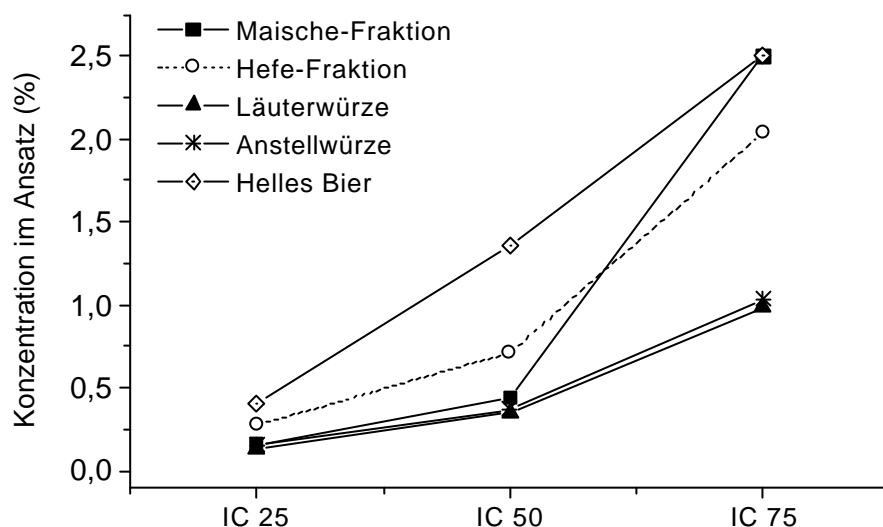


Abbildung 28: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im Hydroxylaminoxidations-System

Tabelle 23: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im Hydroxylaminoxidations-System

Testsubstanz	IC ₂₅ (% i.A.)	IC ₅₀ (% i.A.)	IC ₇₅ (% i.A.)
Maische-Fraktion	0,159	0,439	2,500
Hefe-Fraktion	0,276	0,713	2,036
Läuterwürze	0,132	0,349	0,989
Anstellwürze	0,158	0,370	1,037
Helles Bier	0,404	1,358	2,500
	IC₂₅ (mg i.A.)	IC₅₀ (mg i.A.)	IC₇₅ (mg i.A.)
Hopfenextrakt (ethanolisch)	0,065	2,500	-
Hopfenpellets (ethanolisch)	0,018	0,043	0,110

3.1.4. Rose Bengal-System

Untersucht wurde der Einfluß von verschiedenen Bierrohstoffen und Hellem Bier auf die photodynamisch induzierte Lipidperoxidation, bei der lichtaktiviert durch Singulett-Sauerstoff die Lipidperoxidation von α -Linolensäure initiiert und dadurch ein Radikalkettenmechanismus ausgelöst wird. Durch die zugesetzten Kupferionen wird der Zerfall der entstehenden Lipidhydroperoxide beschleunigt, wobei als Endprodukte neben Aldehyden wie z.B. dem Malondialdehyd auch gasförmige Produkte wie Ethan und Ethen entstehen, über deren Quantifizierung das Ausmaß der Lipidperoxidation bestimmt werden kann. Die Bildung von Ethen beruht auf einer Reduktion des entstehenden Ethylradikals durch Cu^{2+} , d.h. in Abwesenheit von Cu^{2+} entsteht nur Ethan (Heiser et al., 1998). Dementsprechend deutet eine Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses zugunsten des Ethans auf eine Kupferkomplexierung durch die Testsubstanz hin, wobei aber auch eine Reduktion von Cu^{2+} bzw. des Ethylradikals im Verlauf der Reaktion möglich wäre.

Das Ethan/Ethen-Verhältnis in den jeweiligen Kontrollen ohne Testsubstanz liegt mit $5\mu\text{M}$ Cu^{2+} im Ansatz zwischen 0,63 und 0,73, während bei Zusatz von Ethanol (100 μl im Reaktionsansatz) als Kontrolle für die ethanolischen Hopfenpräparate der Kontrollwert des Ethan/Ethen-Verhältnisses auf 0,86 und 1,03 stieg und mit insgesamt 7,7 und 8,6 nmol insgesamt etwas mehr Ethan und Ethen gebildet wurde als bei den „normalen“ Kontrollen mit 6,0 – 7,0 nmol (**Tab. 24**).

In den folgenden **Abbildungen 29 – 34** sind für die Konzentrationsreihen der verschiedenen Bierinhaltsstoffe die Ethan- und Ethenbildungsraten sowie die photometrisch bestimmten Extinktionen der Aldehydbestimmung jeweils in Prozent von der Kontrollreaktion (ohne Testsubstanz) dargestellt. **Tabelle 24** zeigt zusammenfassend die gemessenen Ethan- und Ethenmengen, einschließlich ihrer Summen und das jeweilige Ethan/Ethen-Verhältnis für die verschiedenen Konzentrationsreihen. In **Tabelle 25** sind die entsprechenden Werte für die Aldehyde (Malondialdehyd und Gesamtaldehyde) angegeben. Die $\text{IC}_{25\%}$ -, $\text{IC}_{50\%}$ - und $\text{IC}_{75\%}$ -Werte in **Tabelle 26** wurden auf der Basis der insgesamt produzierten gasförmigen Endprodukte, d.h. auf der Summe von Ethan und Ethen, berechnet und sind am Ende dieses Kapitels in **Abbildung 35** dargestellt.

Abbildung 29 zeigt eine signifikante Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses durch die wässrige Maische-Fraktion. Mit zunehmender Konzentration im Ansatz nahm die Ethenfreisetzung immer weiter ab. Bereits bei 0,5% Maische-Fraktion wurden bei steigender Ethanmenge nur noch etwa 10% der ursprünglichen Ethenmenge gebildet – dies entspricht einem Ethan/Ethen-Verhältnis von 10,9 (**Tab. 24**). In Gegenwart von 5% der Maische-Fraktion wurde die Ethenbildung fast komplett gehemmt. Das daraus resultierende Verhältnis von 46,7 ist sehr wahrscheinlich auf eine Kupferkomplexierung durch die Maische-Fraktion zurückzuführen.

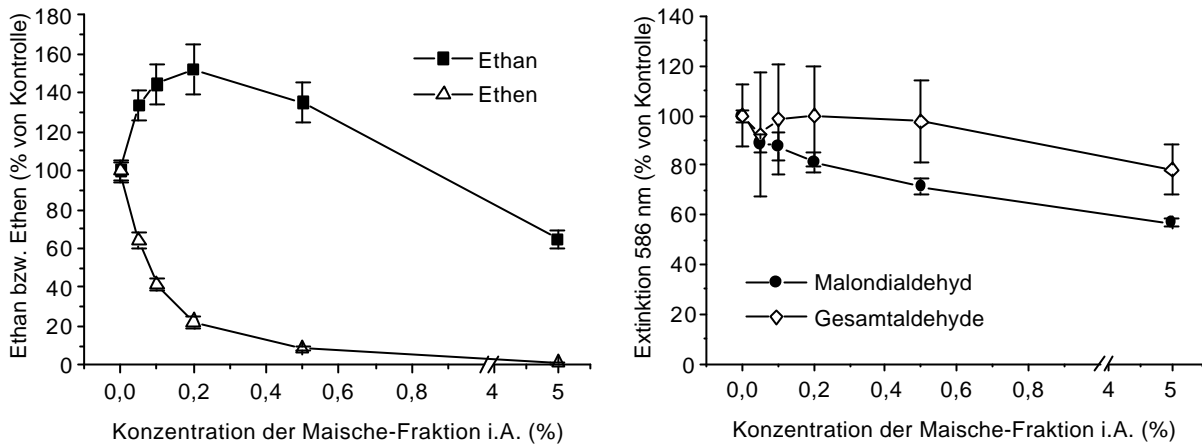


Abbildung 29: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

Die Konzentration von Malondialdehyd (MDA) nahm konzentrationsabhängig ab. Bei 5% Maische-Fraktion im Ansatz wurde die MDA-Bildung um 44% inhibiert. Die Konzentration der Gesamtaldehyde (GA) zeigte keine signifikante Änderung; nur in Gegenwart von 5% Maische sanken die GA um ca. 20% (**Tab. 25**). Das bedeutet, daß eine leicht gehemmte Lipidperoxidation abgelaufen war.

Diese Beobachtungen konnten auch bei der Inkubation mit der wässrigen Hefe-Fraktion gemacht werden (**Abb. 30**). Durch Kupferkomplexierung kam es während der Lipidperoxidation zu einer Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses, die jedoch nicht ganz so ausgeprägt war wie bei der Maische-Fraktion. Bei 0,5% Hefe-Fraktion i.A. lag das Verhältnis bei 4,4 und bei 5% im Ansatz bei 21,3 mit einer fast vollständig gehemmten Ethen-Bildung (**Tab. 24**). Sowohl MDA als auch GA als Endprodukte der Linolensäure-Peroxidation nahmen konzentrationsabhängig ab, wobei durch 5% Hefe-Überstand Hemmungen von jeweils ca. 50% bzw. 30% erreicht wurden (**Tab. 25**).

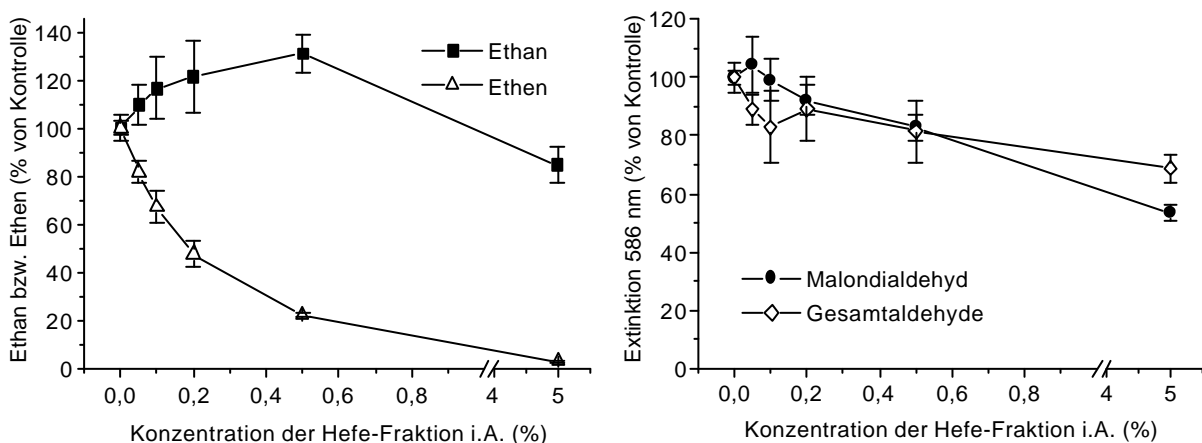


Abbildung 30: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

Auch die Anstellwürze besaß die Fähigkeit zur Kupferkomplexierung, wie in **Abbildung 31** zu erkennen ist. Das Ethan/Ethen-Verhältnis betrug bei 0,5% Würze i.A. 2,7 und bei 5% Würze 24,5 (**Tab. 24**). Die MDA- und GA-Bildung wurden nicht wesentlich beeinflusst: Bei 5% Anstellwürze konnte eine maximale Inhibition von 20% gemessen werden (**Tab. 25**).

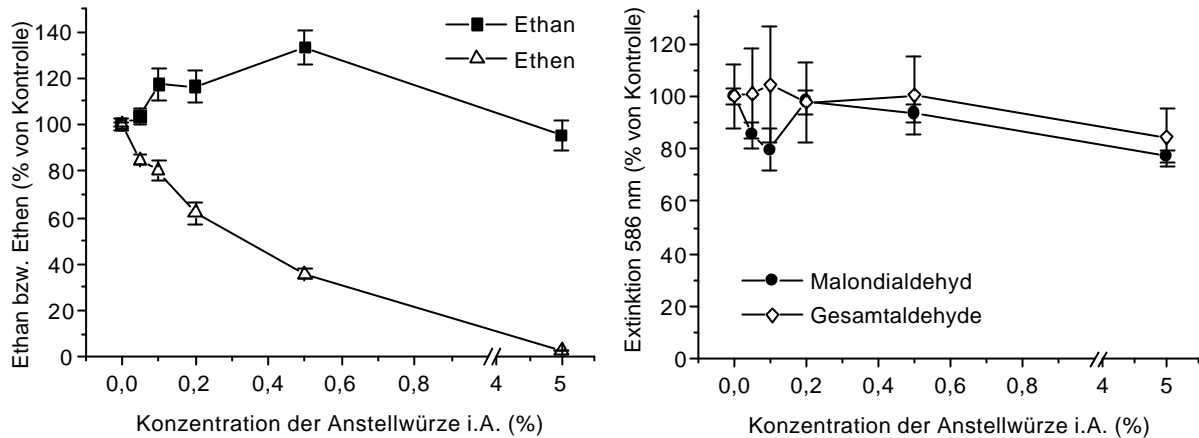


Abbildung 31: Einfluß von Anstellwürze auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

Die kupferkomplexierende Eigenschaft geht offensichtlich während des Brauprozesses nicht verloren, denn auch das fertige Bier zeigte eine Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses in Richtung Ethan (**Abb. 32**). Bei den niedrigeren Konzentrationen im Reaktionsansatz lagen die Werte für das fertige Bier nicht ganz so hoch wie bei den zuvor gezeigten Bierrohstoffen, doch bei 5% im Ansatz konnte ein Ethan/Ethen-Verhältnis von 18 festgestellt werden (**Tab. 24**).

Die Werte für GA zeigten keine signifikante Veränderung und schwankten um den Kontrollwert. Die MDA-Bildung war dagegen konzentrationsabhängig gehemmt und erreichte bei 5% Bier im Ansatz nur noch 66% des Kontrollwertes (**Tab. 25**).

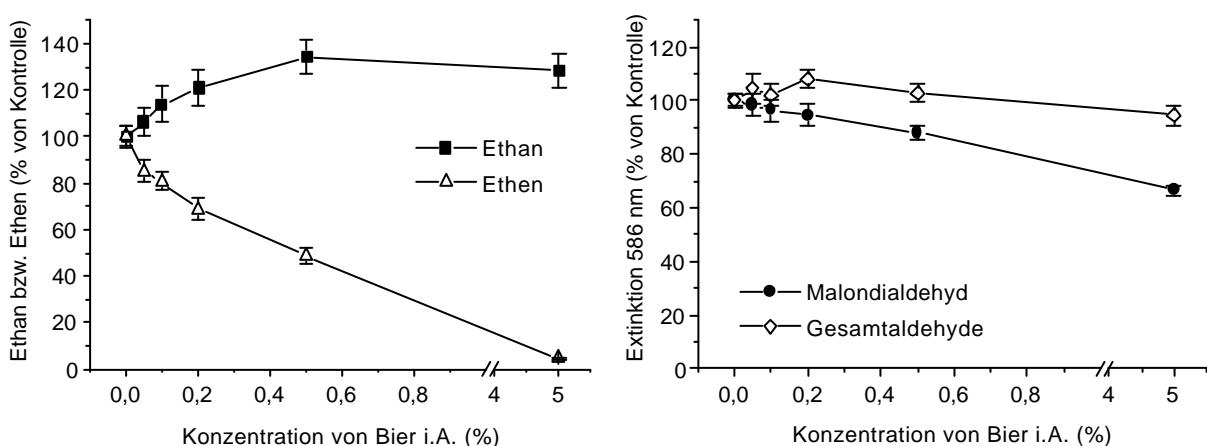


Abbildung 32: Einfluß von Hellem Bier auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

Die ethanolischen Hopfenpräparationen zeigten im Gegensatz zu den bisher gezeigten Bierinhaltsstoffen eine deutlich konzentrationsabhängige Inhibition der Lipidperoxidation (**Abb. 33**). Sowohl die gemahlene Hopfenpellets als auch der lipophile Hopfenextrakt wurden in EtOH angelöst und entsprechend verdünnt, so daß im Reaktionsansatz jeweils 5% EtOH vorlagen. Mit 0,5 mg der Hopfenpellets wurde die Ethenbildung um 70% und die Ethanbildung um 50% gehemmt. Bei der maximal getesteten Konzentration von 2,0 mg der Hopfenpellets wurden nur noch 16% der ursprünglichen Ethenmenge gemessen, während die Ethanbildung bis auf 28% inhibiert wurde. Das Ethan/Ethen-Verhältnis bleibt deshalb nahezu konstant (**Tab. 24**).

Auch die MDA- und GA-Werte zeigten eine Reduzierung der Endprodukte der Lipidperoxidation. Mit 0,5 mg der Hopfenpellets wurde die Bildung von MDA als auch von GA um 40% und mit 2,0 mg im Ansatz um 55% gehemmt (**Abb. 33, Tab. 25**).

Die Lipidperoxidationshemmung kann dabei auf das Abfangen des photodynamisch produzierten Singulett-Sauerstoffs und/oder auf das Abfangen der radikalischen Intermediärprodukte bei der Entstehung bzw. beim Zerfall der Lipidhydroperoxide zurückgeführt werden.

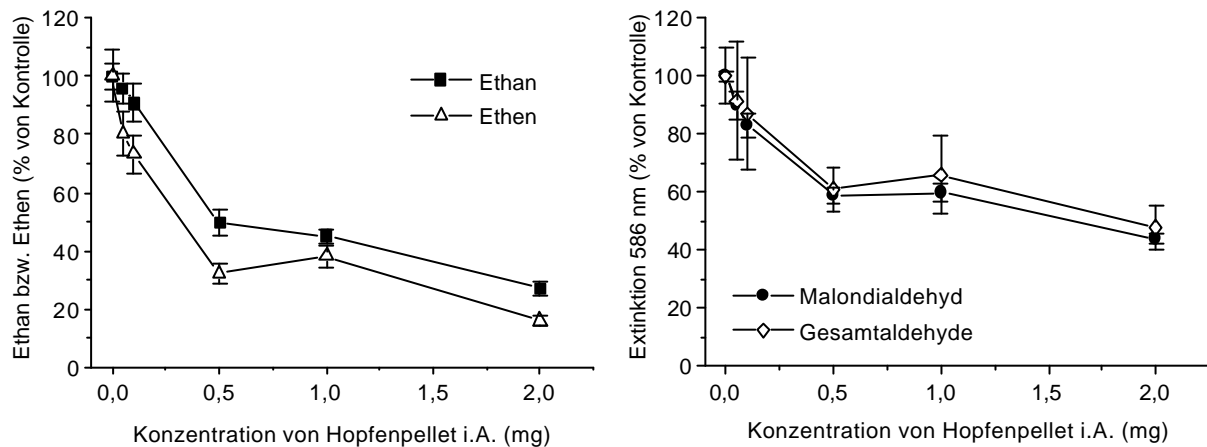


Abbildung 33: Einfluß von Hopfenpellets (in Ethanol) auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

Abbildung 34 stellt die konzentrationsabhängige Hemmung des ethanolisch angelösten Hopfenextraktes auf die Ethan- und Ethenfreisetzung aus der Linolensäure dar. Bei Zusatz von 0,5 mg des Hopfenextraktes wurden nur noch 17% Ethen und 36% Ethan freigesetzt, bei 2,0 mg wurde die Ethenbildung bis auf 4% und die Ethanbildung bis auf 15% gehemmt. Aufgrund des leicht erhöhten Ethan/Ethen-Verhältnisses könnte auf eine mögliche Kupferkomplexierung geschlossen werden.

Die Aldehyde nahmen ebenfalls kontinuierlich mit steigender Konzentration des Hopfenextraktes ab: Bei 2,0 mg im Ansatz war eine Abnahme um 63% und bei den GA-Werten um 55% zu verzeichnen (**Tab. 25**).

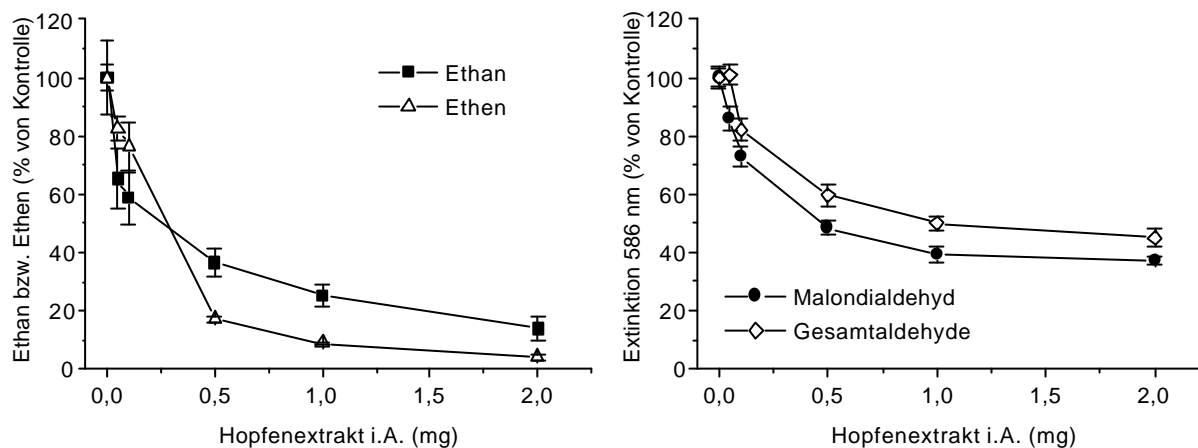


Abbildung 34: Einfluß von Hopfenextrakt (ethanolisch gelöst) auf die Ethan- und Ethenfreisetzung (links) und auf die Aldehydbildung (rechts) im Rose Bengal-System

In den nachfolgenden **Tabellen 24** und **25** werden die entsprechenden Zahlenwerte aus den bisher gezeigten Abbildungen im Rose Bengal-System hinsichtlich des Einflusses von Bier und den Bierinhaltsstoffen auf die Ethan- und Ethenfreisetzung sowie auf die MDA- und GA-Bildung gezeigt. Anschließend werden die IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} -Werte, berechnet aus der Summe der produzierten Ethan- und Ethenmengen, in **Abbildung 35** bzw. **Tabelle 26** dargestellt.

Tabelle 24: Einfluß von Bier und Bierinhaltsstoffen auf die Ethan- und Ethenfreisetzung im Rose Bengal-System

Testsubstanz	Konzentration i.A. (%)	Ethan (nmol)	Ethen (nmol)	Ethan + Ethen (nmol)	Verhältnis Ethan/Ethen
Maische-Fraktion	0,00	2,49 ± 0,12	3,57 ± 0,20	6,06 ± 0,32	0,70
	0,05	3,33 ± 0,10	2,28 ± 0,05	5,61 ± 0,15	1,46
	0,10	3,60 ± 0,18	1,47 ± 0,06	5,07 ± 0,23	2,44
	0,20	3,78 ± 0,25	0,79 ± 0,10	4,57 ± 0,18	4,49
	0,50	3,37 ± 0,20	0,31 ± 0,03	3,68 ± 0,22	10,92
	5,00	1,61 ± 0,10	0,03 ± 0,01	1,64 ± 0,11	46,66
Hefe-Fraktion	0,00	2,90 ± 0,16	3,86 ± 0,12	6,76 ± 0,26	0,75
	0,05	3,18 ± 0,18	3,15 ± 0,14	6,33 ± 0,32	1,01
	0,10	3,38 ± 0,33	2,58 ± 0,24	5,96 ± 0,57	1,31
	0,20	3,53 ± 0,39	1,84 ± 0,21	5,37 ± 0,60	1,92
	0,50	3,80 ± 0,08	0,86 ± 0,03	4,66 ± 0,11	4,43
	5,00	2,46 ± 0,17	0,11 ± 0,01	2,57 ± 0,18	21,28
Anstellwürze	0,00	2,66 ± 0,06	3,63 ± 0,04	6,29 ± 0,05	0,73
	0,05	2,75 ± 0,07	3,08 ± 0,08	5,83 ± 0,15	0,90
	0,10	3,11 ± 0,17	2,90 ± 0,16	6,01 ± 0,32	1,07
	0,20	3,09 ± 0,16	2,25 ± 0,18	5,34 ± 0,25	1,38
	0,50	3,53 ± 0,17	1,29 ± 0,08	4,82 ± 0,25	2,73
	5,00	2,53 ± 0,16	0,10 ± 0,01	2,63 ± 0,17	24,52
Helles Bier	0,00	2,78 ± 0,14	4,40 ± 0,19	7,18 ± 0,13	0,63
	0,05	2,96 ± 0,07	3,74 ± 0,13	6,70 ± 0,18	0,79
	0,10	3,16 ± 0,14	3,55 ± 0,07	6,71 ± 0,21	0,89
	0,20	3,36 ± 0,12	3,02 ± 0,17	6,38 ± 0,23	1,11
	0,50	3,73 ± 0,08	2,14 ± 0,12	5,87 ± 0,19	1,74
	5,00	3,56 ± 0,10	0,20 ± 0,01	3,76 ± 0,11	18,09
	Konzentration i.A. (mg)				
Hopfenextrakt (in EtOH)	0,00	4,37 ± 0,54	4,23 ± 0,19	8,60 ± 0,58	1,03
	0,05	2,87 ± 0,28	3,50 ± 0,08	6,37 ± 0,36	0,82
	0,10	2,57 ± 0,26	3,22 ± 0,34	5,79 ± 0,59	0,80
	0,50	1,60 ± 0,07	0,72 ± 0,03	2,32 ± 0,09	2,21
	1,00	1,10 ± 0,10	0,37 ± 0,02	1,47 ± 0,12	2,97
	2,00	0,61 ± 0,17	0,17 ± 0,03	0,78 ± 0,20	3,62
Hopfenpellet (in EtOH)	0,00	3,59 ± 0,17	4,17 ± 0,37	7,76 ± 0,46	0,86
	0,05	3,44 ± 0,11	3,36 ± 0,06	6,80 ± 0,17	1,03
	0,10	3,26 ± 0,18	3,05 ± 0,04	6,31 ± 0,20	1,07
	0,50	1,79 ± 0,14	1,34 ± 0,10	3,13 ± 0,23	1,33
	1,00	1,62 ± 0,05	1,59 ± 0,04	3,21 ± 0,09	1,02
	2,00	0,97 ± 0,09	0,70 ± 0,04	1,67 ± 0,12	1,46

Tabelle 25: Einfluß von Bier und Bierinhaltsstoffen auf die Malondialdehyd- und Gesamtaldehyd-Entstehung im Rose Bengal-System

Testsubstanz	Konzentration i.A. (%)	Extinktion bei 586 nm (% von Kontrolle)	
		Malondialdehyd	Gesamtaldehyde
Maische-Fraktion	0,00	100 ± 2	100 ± 13
	0,05	89 ± 4	92 ± 25
	0,10	87 ± 6	99 ± 22
	0,20	81 ± 4	100 ± 20
	0,50	71 ± 3	98 ± 17
	5,00	57 ± 2	78 ± 10
Hefe-Fraktion	0,00	100 ± 5	100 ± 2
	0,05	104 ± 10	89 ± 5
	0,10	99 ± 7	83 ± 12
	0,20	92 ± 5	89 ± 11
	0,50	83 ± 5	81 ± 11
	5,00	53 ± 3	69 ± 5
Anstellwürze	0,00	100 ± 3	100 ± 12
	0,05	85 ± 5	101 ± 17
	0,10	80 ± 8	104 ± 22
	0,20	98 ± 5	98 ± 15
	0,50	93 ± 3	100 ± 15
	5,00	77 ± 2	84 ± 11
Helles Bier	0,00	100 ± 3	100 ± 2
	0,05	98 ± 4	104 ± 6
	0,10	96 ± 4	102 ± 4
	0,20	95 ± 4	108 ± 3
	0,50	88 ± 3	103 ± 3
	5,00	66 ± 2	94 ± 4
Hopfenextrakt (in EtOH)	0,00	100 ± 4	100 ± 3
	0,05	86 ± 4	101 ± 3
	0,10	73 ± 3	82 ± 4
	0,50	48 ± 2	59 ± 4
	1,00	39 ± 3	50 ± 2
	2,00	37 ± 2	45 ± 3
Hopfenpellet (in EtOH)	0,00	100 ± 2	100 ± 9
	0,05	90 ± 5	91 ± 21
	0,10	83 ± 4	87 ± 19
	0,50	59 ± 3	61 ± 7
	1,00	60 ± 3	66 ± 14
	2,00	44 ± 2	48 ± 7

Bei der Berechnung der IC-Werte im Rose Bengal-System wurde die Summe des freigesetzten Ethans und Ethens als Marker für das Ausmaß der stattfindenden Lipidperoxidation genutzt. Eine Angabe der IC-Werte für die Aldehydbildung erwies sich nicht als sinnvoll, da außer bei den Hopfenpräparationen nicht einmal IC₅₀-Werte erreicht wurden. Aus **Abbildung 35** bzw. **Tabelle 26** ist die abnehmende Reihenfolge der Effektivität von der Maische, gefolgt von der Hefe-Fraktion, Anstellwürze und dem Helles Bier zu ersehen. Die letzten drei Fraktionen erreichten bei den untersuchten Konzentrationen keine 75%ige Inhibition der entstehenden Gase.

Die Hopfenprodukte (Angabe in mg i.A.) erwiesen sich als relativ wirksam hinsichtlich der Lipidperoxidationshemmung, wobei der Hopfenextrakt, zumindest beim IC₇₅-Wert der Summe Ethan/Ethen, wesentlich effektiver die Linolensäureperoxidation hemmte als die Hopfenpellets (**Abb. 35**).

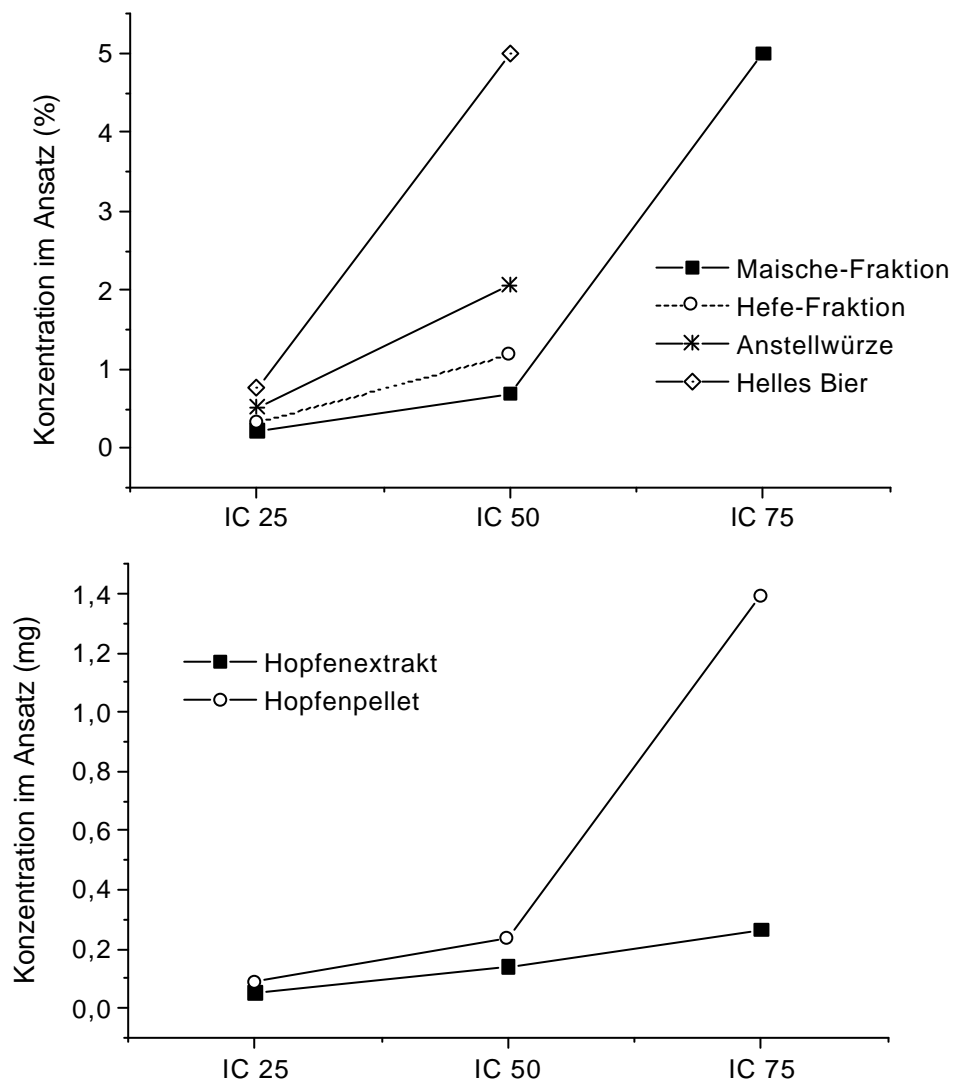


Abbildung 35: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe für die Summe der produzierten Ethan- und Ethenmengen im Rose Bengal-System

Tabelle 26: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe für die Summe der produzierten Ethan- und Ethenmengen im Rose Bengal-System

Testsubstanz	IC ₂₅ (% i.A.)	IC ₅₀ (% i.A.)	IC ₇₅ (% i.A.)
Maische-Fraktion	0,223	0,684	5,000
Hefe-Fraktion	0,320	1,180	-
Anstellwürze	0,514	2,063	-
Helles Bier	0,756	5,000	-
	IC ₂₅ (mg i.A.)	IC ₅₀ (mg i.A.)	IC ₇₅ (mg i.A.)
Hopfenextrakt (in EtOH)	0,052	0,140	0,266
Hopfenpellet (in EtOH)	0,086	0,237	1,393

3.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System (DHF/Cu)

Im Rose Bengal-System konnten kupferkomplexierende Eigenschaften der Maische- und Hefe-Fraktion, der Anstellwürze und des Hellen Bieres festgestellt werden. Diese Fraktionen wurden ebenfalls im DHF/Cu-System getestet, welches ein biochemisches Diabetes-Modell sowie ein Modell für die Übergangsmetallkatalyse darstellt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Autoxidation von Monosacchariden wie der Glucose ist die Endiol-Bildung. Die verwendete DHF liegt bereits als Endiol vor und autoxydiert durch Spuren an Übergangsmetallen, wobei ROS generiert werden, die über eine oxidative Spaltung des Indikatormoleküls KMB als Ethen meßbar sind.

Abbildung 36 und **Tabelle 27** stellen die Abhängigkeit der Ethenbildung von der Kupferkonzentration dar. Je mehr Kupfer im Ansatz vorhanden ist, desto größer ist die aus KMB freigesetzte Menge an Ethen (Kontrollreaktion). Allerdings ist die Ethenfreisetzung durch Zusatz von EtOH hemmbar, wie die EtOH-Kontrolle für das Helle Bier mit einem EtOH-Gehalt von 4,9% bewies. Dies entspricht, bei der Zugabe von 100 µl Probe, einer EtOH-Konzentration von 0,245% im Ansatz.

In Anwesenheit von Bier und den getesteten Bierinhaltsstoffen war eine deutliche Abnahme der Ethenbildung zu beobachten, die einerseits auf eine Kupferkomplexierung und andererseits auf das Abfangen generierter ROS zurückgeführt werden kann. Die Maische-Fraktion hemmte das System am kompetentesten, gefolgt von der Hefe-Fraktion und der Läuterwürze. Die Anstellwürze und das fertige Bier zeigten ähnliche Ethenwerte, wobei beim Bier der EtOH-Gehalt für einen Teil der Hemmung verantwortlich ist. Ohne Zusatz von Kupfer entstand bei der Kontrolle trotzdem Ethen im nmol-Bereich. Dies ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen mit Übergangsmetallen zurückzuführen (z.B. Puffersalze). Beim Zusatz aller Testsubstanzen lagen die entstandenen Ethenmengen unterhalb der des Kontrollwertes; dies deutet auf eine Komplexierung der Verunreinigungen hin bzw. wurden eventuell entstehende ROS durch die Testsubstanzen angefangen.

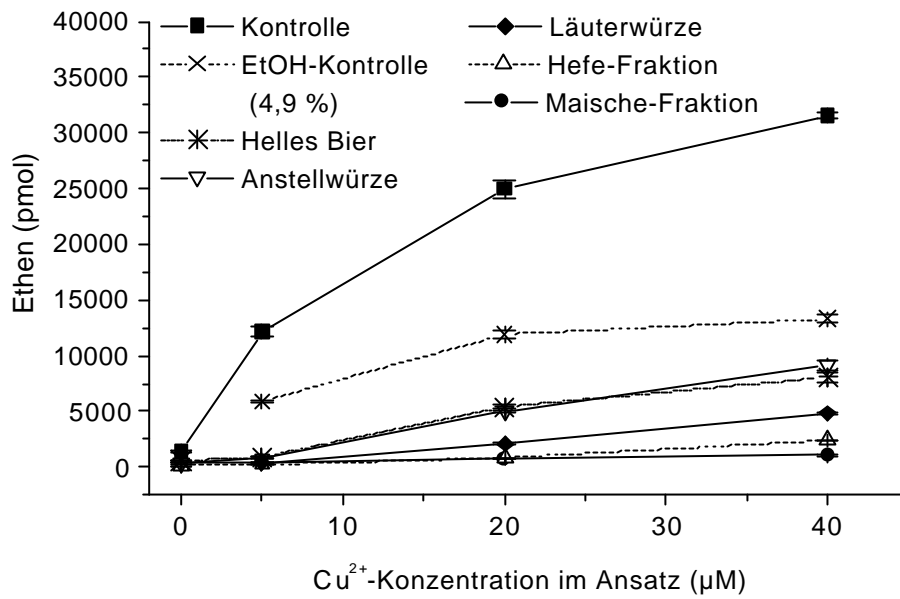


Abbildung 36: Einfluß der Kupferkonzentration auf die Ethenfreisetzung im DHF/Cu-System in Gegenwart von verschiedenen Bierinhaltsstoffen (jeweils 0,05% i.A.)

Tabelle 27: Einfluß der Kupferkonzentration auf die Ethenfreisetzung im DHF/Cu-System in Gegenwart von verschiedenen Bierinhaltsstoffen (jeweils 0,05% i.A.)

Testsubstanz	Ethen (pmol)			
	0 µM Cu i.A.	5 µM Cu i.A.	20 µM Cu i.A.	40 µM Cu i.A.
Kontrolle	1399 ± 60	12151 ± 418	24959 ± 798	31596 ± 252
EtOH-Kontrolle (4,9%)	n.b.	5902 ± 128	11913 ± 377	13300 ± 359
Helles Bier	342 ± 21	751 ± 19	4992 ± 189	9142 ± 480
Anstellwürze	578 ± 33	889 ± 17	5407 ± 186	8069 ± 387
Läuterwürze	n.b.	388 ± 9	2125 ± 50	4813 ± 145
Hefe-Fraktion	124 ± 5	237 ± 5	831 ± 36	2409 ± 66
Maische-Fraktion	391 ± 13	481 ± 12	736 ± 18	1083 ± 79

In Gegenwart einer Kupferkonzentration von 20 μM wurden Konzentrationsreihen verschiedener Bierfraktionen getestet (**Abb. 37, Tab. 28**) und daraus die IC-Werte bestimmt, welche in **Tabelle 29** aufgelistet sind. Deutlich zeigt sich das Aktivitätsgefälle des Kupferkomplexators in der bereits beschriebenen Reihenfolge Maische-Fraktion, Hefe-Fraktion, Läuterwürze, Anstellwürze und Helles Bier. Beim Zusatz von nur 1 μl des Maische- und des Hefe-Überstandes (entspricht 0,05% im Ansatz) wurde die Ethenbildung fast vollständig gehemmt, während bei der Läuterwürze eine Restaktivität von ca. 10%, bei der Anstellwürze von 22% und beim Bier von 45% vorhanden war.

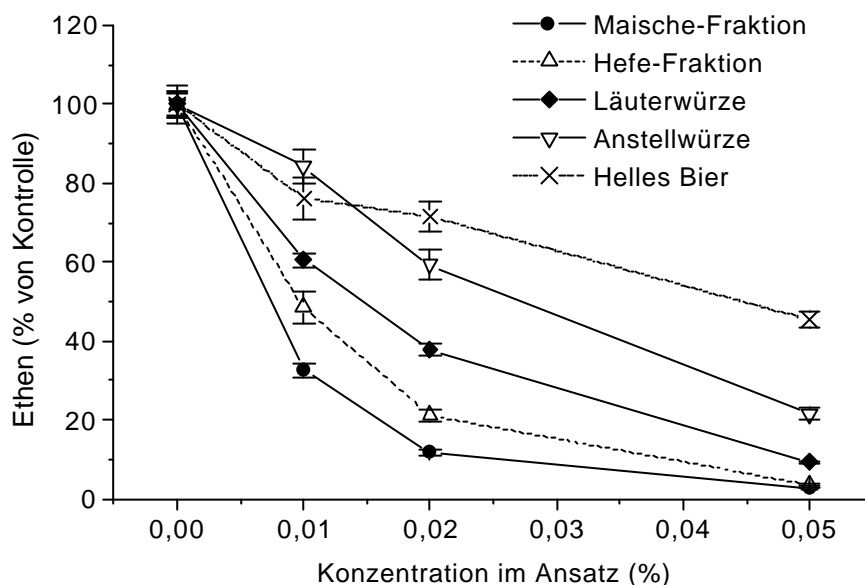


Abbildung 37: Einfluß von Bier und Bierinhaltsstoffen auf die Ethenfreisetzung im DHF/Cu-System mit 20 μM Cu^{2+} i.A.

Tabelle 28: Einfluß von Bier und Bierinhaltsstoffen auf die Ethenfreisetzung im DHF/Cu-System mit 20 μM Cu^{2+} i.A.

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)			
	0,00 % i.A.	0,01 % i.A.	0,02 % i.A.	0,05 % i.A.
Helles Bier	100 ± 3	76 ± 5	72 ± 4	45 ± 2
Anstellwürze	100 ± 5	84 ± 4	59 ± 4	22 ± 2
Läuterwürze	100 ± 3	61 ± 2	38 ± 2	9 ± 0
Hefe-Fraktion	100 ± 3	48 ± 4	21 ± 2	4 ± 0
Maische-Fraktion	100 ± 3	33 ± 2	12 ± 1	3 ± 0

Mit den niedrigsten IC-Werten war die Maische-Fraktion auch in diesem Testsystem am effektivsten. Weiter folgten die Hefe-Fraktion, die Läuterwürze, Anstellwürze und das Helle Bier mit der geringsten Kapazität (zur Kupferkomplexierung) unter den getesteten Extrakten (**Abb. 38, Tab. 29**).

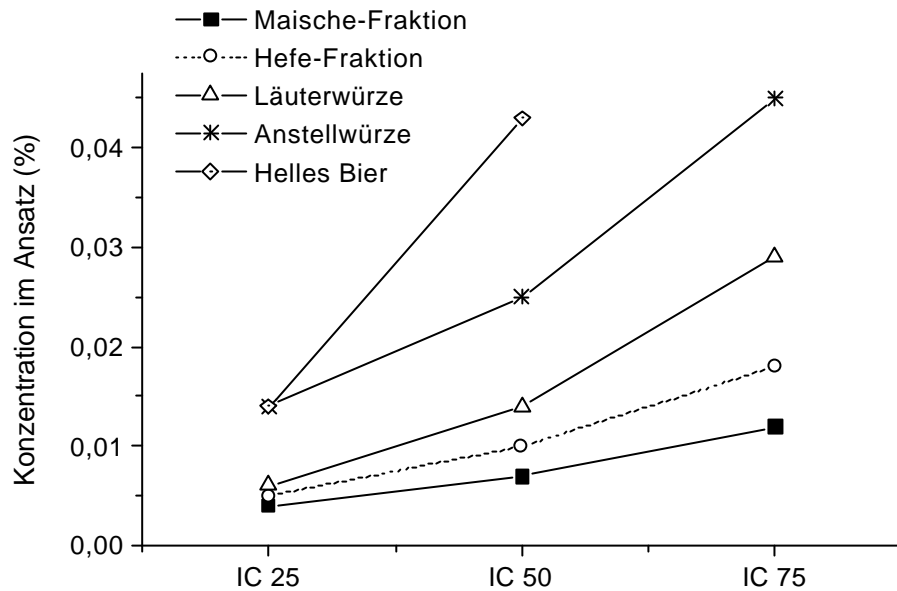


Abbildung 38: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im DHF/Cu-System

Tabelle 29: Inhibitionskoeffizienten (IC) für Bier und Bierinhaltsstoffe im DHF/Cu-System

Testsubstanz	IC ₂₅ (% i.A.)	IC ₅₀ (% i.A.)	IC ₇₅ (% i.A.)
Maische-Fraktion	0,004	0,007	0,012
Hefe-Fraktion	0,005	0,010	0,018
Läuterwürze	0,006	0,014	0,029
Anstellwürze	0,014	0,025	0,045
Helles Bier	0,014	0,043	-

3.1.6. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Bei der Oxidation von LDL durch Kupferionen handelt es sich um ein verbreitetes in vitro Modell zur LDL-Modifikation. Durch das Kupfer werden im Proteinanteil des LDL (Apolipoprotein B-100) Tryptophanradikale induziert, wodurch eine Radikalkettenreaktion im Lipidanteil ausgelöst wird, die wiederum zur Peroxidation der ungesättigten Fettsäuren im LDL-Partikel führt. (Gießauf et al., 1995) Im Verlauf dieser Fettsäureperoxidation kommt es zur Verschiebung von Doppelbindungen, die sich als Konjugation von Dienen photometrisch bei 234 nm verfolgen lässt. Durch eine Vorinkubation von Plasma vor der LDL-Isolierung können lipophile Testsubstanzen im LDL-Partikel angereichert werden und auf einen möglichen Oxidationsschutz überprüft werden. Ein Schutz des LDL vor Oxidation äußert sich dabei in einer verlängerten Lag-Phase.

Der typische Kurvenverlauf während der LDL-Oxidation kann in drei Phasen eingeteilt werden (**Abb. 39**). Während der sogenannten Lag-Phase werden die endogenen Antioxidantien im LDL aufgebraucht, wobei nur eine geringe Oxidation des Lipidteils stattfindet. In der darauffolgenden Propagationsphase, in der die maximale Dienbildungsrate erreicht wird, entstehen durch die Oxidation vielfach ungesättigter Fettsäuren Lipidhydroperoxide. In der dritten Phase, der Dekompositionsphase, findet ein Zerfall der oxidierten Produkte zu Aldehyden, Alkoholen, Epoxiden und anderen Verbindungen statt. Durch die Länge der Lag-Phase verschiedener LDL-Proben lassen sich Aussagen über deren Oxidationsresistenz treffen, wobei die Länge der Lag-Phase durch den Kreuzungspunkt der beiden Tangenten definiert wird, die an den Lag-Phasen- und den aufsteigenden Ast der LDL-Oxidationskurve angelegt werden.

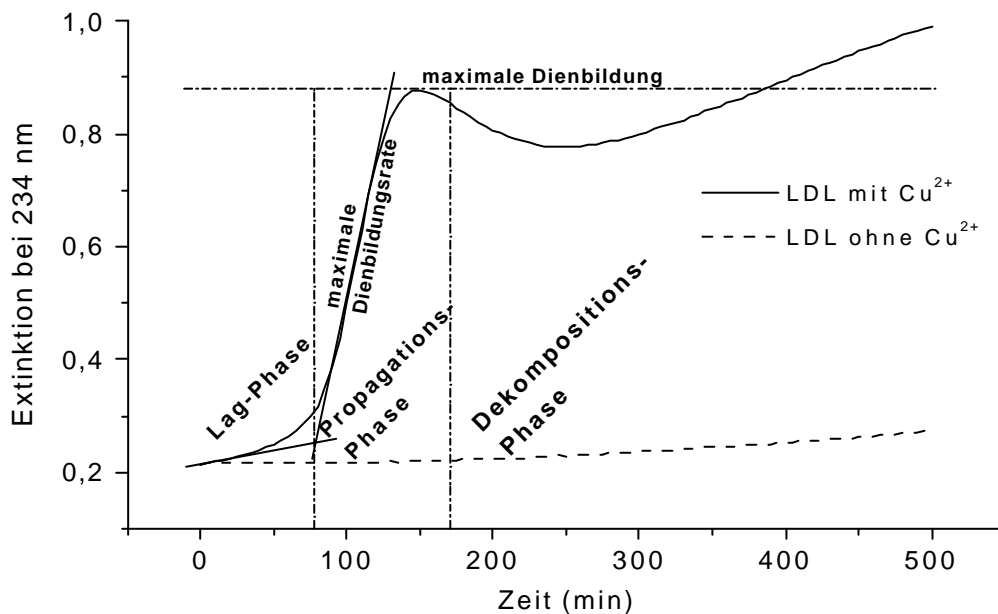


Abbildung 39: Kurvenverlauf mit den drei typischen Phasen der kupferinduzierten LDL-Oxidation

3.1.6.1. Vorinkubation mit Hopfenextrakt

Blutplasma wurde mit dem wasserunlöslichen Anteil des in Carbonatpuffer bei pH 10 extrahierten Hopfenextraktes (angelöst in EtOH) für 90 min bei 37 °C inkubiert, das LDL aus diesem Vorinkubationsansatz isoliert und einer Oxidation unterzogen. **Abbildung 40** und **Tabelle 30** zeigen eine konzentrationsabhängige Verlängerung der Lag-Phase des mit Hopfenextrakt-Komponenten angereicherten LDL. Neben einer verlängerten Lag-Phase war mit zunehmender Konzentration sowohl eine Abnahme der maximalen Dienbildung als auch der Dienbildungsrate in Form einer flacheren Steigung zu beobachten.

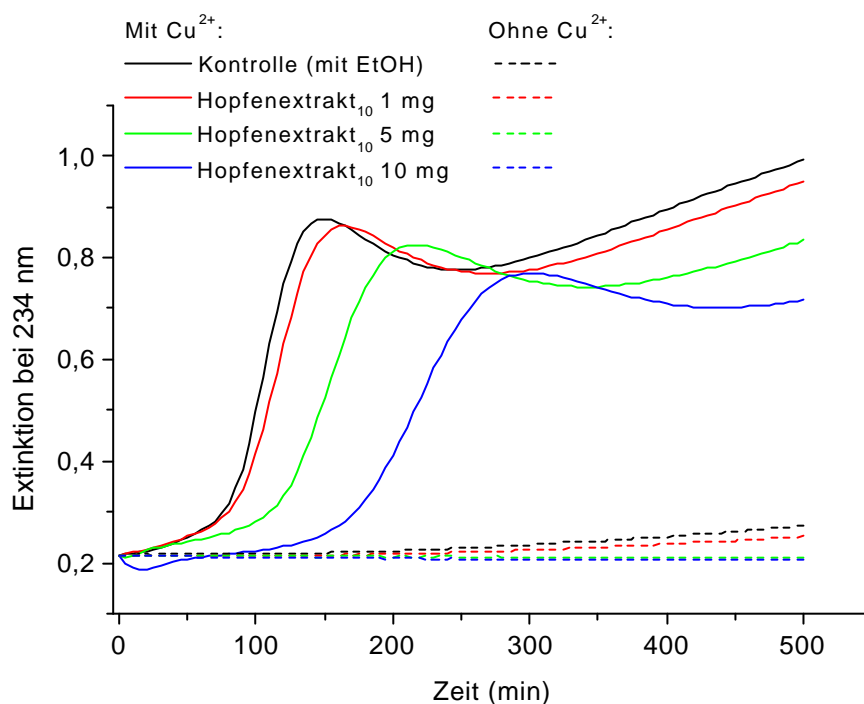


Abbildung 40: Einfluß des lipophilen Hopfenextraktes (nach Extraktion in Carbonatpuffer bei pH 10) auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 30: Lag-Phasen während der kupferinduzierten Oxidation des mit Hopfenextrakt vorinkubierten LDL

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Kontrolle	82
Hopfenextrakt ₁₀ 1 mg	87
Hopfenextrakt ₁₀ 5 mg	120
Hopfenextrakt ₁₀ 10 mg	171

Während der Vorinkubation fand offensichtlich eine Anlagerung von lipophilen Substanzen aus dem Hopfenextrakt an die LDL-Partikel statt, die einen Schutz vor Oxidation bieten. Bei einer Wiederholung der Vorinkubation des Plasmas mit normalem Hopfenextrakt konnte ein LDL-Oxidationsschutz durch eine verlängerte Lag-Phase (**Tab. 31**) sowie eine Abnahme der maximalen Dienbildung und der Dienbildungsrate bestätigt werden. Durch gaschromatographische Untersuchungen der in Hexan reextrahierten LDL-Lösungen konnten Myrcen, α -Humulen und β -Caryophyllen, Bestandteile der im Hopfenextrakt

vorhandenen Hopfenöle, im LDL identifiziert werden. Diese drei Hauptkomponenten wurden durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Reinsubstanzen identifiziert. In **Tabelle 31** sind die berechneten Mengen der Hopfenöl-Komponenten pro Mol LDL angegeben, die sich im Laufe der Vorinkubation angelagert haben und zusammen mit dem LDL isoliert wurden. Der LDL-Gehalt in 250 µl der entsalzten LDL-Lösung lag bei 0,20 – 0,24 nmol und wurde über den Proteingehalt mit $M = 540000$ berechnet. Eine gaschromatographische Analyse des in Hexan gelösten Hopfenextraktes ergab eine Konzentration von 169 nmol Myrcen/mg, 19 nmol Caryophyllen/mg und 118 nmol Humulen/mg Hopfenextrakt. Humulen lagerte sich dabei in einer höheren Konzentration (55 bzw. 84 mol/mol LDL) an, wobei eine Verdoppelung der Hopfenextraktmenge im Vorinkubationsansatz (i.VA.) nicht zu einer Verdoppelung der reextrahierten Humulenmenge führte. Myrcen dagegen erreichte mit 12,5 mg Hopfenextrakt i.VA. eine Konzentration von 31 mol/mol LDL, während β -Caryophyllen erst bei dieser höheren Menge des eingesetzten Hopfenextraktes im LDL nachweisbar war.

Tabelle 31: Lag-Phasen während der kupferinduzierten Oxidation und reextrahierte Hopfenöl-Komponenten aus mit Hopfenextrakt vorinkubiertem LDL (n = 2)

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)	Myrcen (mol/mol LDL)	α -Humulen (mol/mol LDL)	β -Caryophyllen (mol/mol LDL)
Kontrolle	103	-	-	-
Hopfenextrakt 6,25 mg	174	5 (n = 1)	55 ± 3	-
Hopfenextrakt 12,5 mg	227	31 ± 0	84 ± 3	5 ± 2

3.1.6.2. Vorinkubation mit Myrcen und α -Humulen

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Oxidationsschutz des LDL durch den Hopfenextrakt eventuell auf im LDL angereicherte Hopfenöl-Komponenten zurückzuführen ist, wurde Plasma mit den jeweiligen Einzelsubstanzen vorinkubiert und anschließend das LDL isoliert. **Abbildung 41** zeigt die LDL-Oxidation von mit Myrcen, Humulen, einer Kombination von beiden sowie von mit dem wasserunlöslichen Hopfenextrakt vorinkubiertem LDL. Durch alle vorinkubierten Substanzen wurde ein LDL-Schutz ausgeübt. Durch 0,5% Myrcen i.VA. (entspricht 29 mM) wurde die Lag-Phase um 42 min verlängert (**Tab. 32**) und die maximale Dienbildung deutlich gehemmt. Humulen mit 0,5% i.VA. (entspricht 22 mM) bewirkte eine enorme Abflachung der Kurve, d.h. die Dienbildungsrate wurde signifikant gehemmt. Mit der daraus resultierenden flacheren Tangente wurde die Länge der Lag-Phase mit 200 min bestimmt. Offensichtlich bietet Humulen einen besseren Oxidationsschutz als Myrcen. Die Kombination aus beiden Ölen zeigte ebenfalls eine deutliche Abflachung der Kurve, die offensichtlich auf das Humulen zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu bewirkte eine Inkubation mit Hopfenextrakt (10 mg i.VA.) eine Lag-Phase von 247 min, wobei der typische Kurvenaufbau der LDL-Oxidation deutlich erkennbar war, aber, wie bereits zu **Abbildung 40** erläutert wurde, die maximale Dienbildung unterhalb der von der Kontrolle blieb.

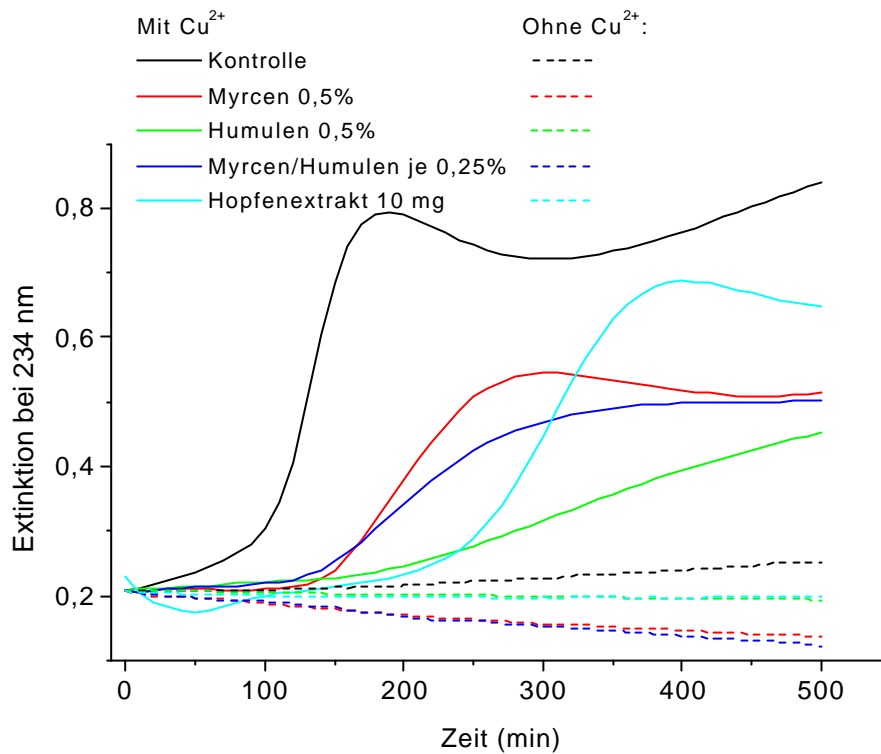


Abbildung 41: Einfluß von Myrcen, Humulen und Hopfenextrakt auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 32: Lag-Phasen des mit Myrcen, Humulen und Hopfenextrakt vorinkubierten LDL während der kupferinduzierten Oxidation

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Kontrolle (+ EtOH)	105
Myrcen 0,5%	147
Humulen 0,5%	200
Myrcen und Humulen je 0,25%	139
Hopfenextrakt ₁₀ 10 mg	247

Weiterhin wurde ein möglicher Einfluß der Oxidierbarkeit von LDL durch variable Mengen an Myrcen bei konstanter Humulenmenge (0,33% i.VA., entspricht 14,7 mM) getestet. **Abbildung 42** läßt keinen signifikanten Einfluß von Myrcen in den applizierten Mengen erkennen. Durch eine LDL-Reextraktion zeigte sich, daß Myrcen nur bei der höchsten verwendeten Konzentration von 0,033% i.VA. im LDL mit 10 mol/mol LDL nachweisbar ist (**Tab. 33**). Humulen dagegen erreichte bei 0,33% i.VA. eine enorme Anreicherung von 1800 – 2028 mol/mol LDL und eine Lag-Phasenverlängerung auf ca. 150 min. Myrcen bewirkte mit 291 mol/mol LDL eine Verschiebung der Lag-Phase von 10 min im Vergleich zur Kontrolle.

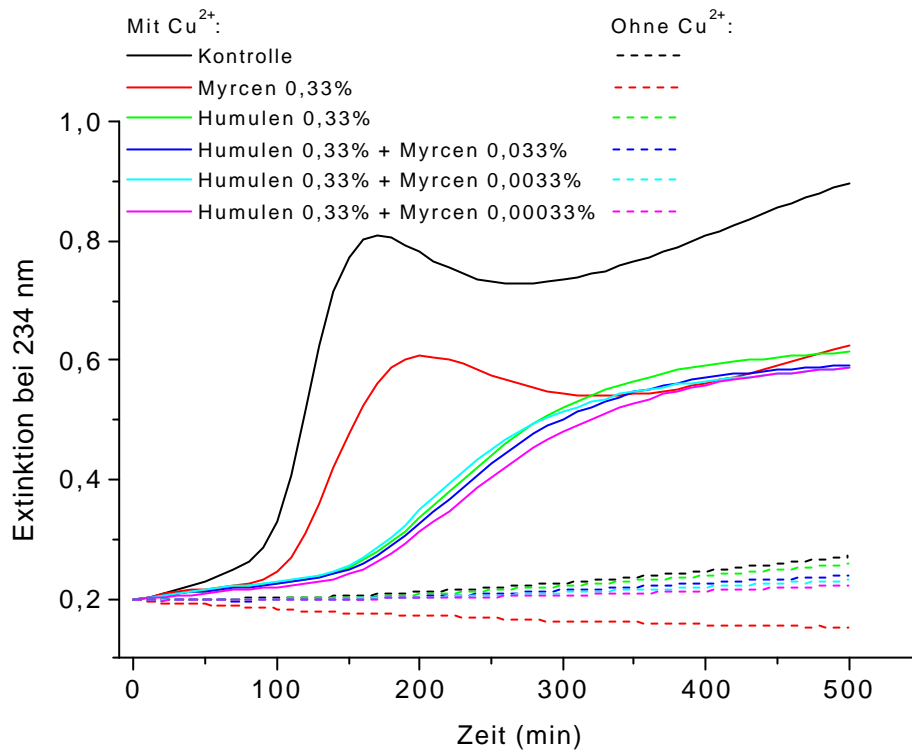


Abbildung 42: Einfluß von Myrcen und Humulen auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 33: Lag-Phasen während der LDL-Oxidation und reextrahierte Hopfenöl-Bestandteile aus mit Humulen und Myrcen vorinkubiertem LDL

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)	Myrcen (mol/mol LDL)	Humulen (mol/mol LDL)
Kontrolle	96	-	-
Myrcen 0,33%	106	291	-
Humulen 0,33%	150	-	1865
Humulen 0,33% + Myrcen 0,033%	153	10	1800
Humulen 0,33% + Myrcen 0,0033%	150	-	2000
Humulen 0,33% + Myrcen 0,00033%	157	-	2028

3.1.6.3. Vorinkubation mit β -Caryophyllen und Ocimen

β -Caryophyllen, ein Isomer des α -Humulens, zeigte nach einer Inkubation von 0,25 und 0,50% i.VA. den gleichen Effekt auf die LDL-Oxidation wie α -Humulen. In **Abbildung 43** ist die im Gegensatz zur Kontrolle stark abgeflachte Oxidationskurve dargestellt. Diese ist auf eine wesentlich niedrigere Dienbildungsrate und damit verlängerten Propagationsphase zurückzuführen. Durch die kontinuierliche Messung bis 1000 min läßt sich auch eine Verwischung der Dekompositionsphase, in der ein Zerfall der oxidierten Produkte stattfindet, beobachten. Eine solcher Kurvenverlauf ist typisch für eine LDL-Oxidation in Gegenwart einer geringen Kupferkonzentration. In **Tabelle 34** sind die dazugehörigen Lag-Phasen aufgeführt.

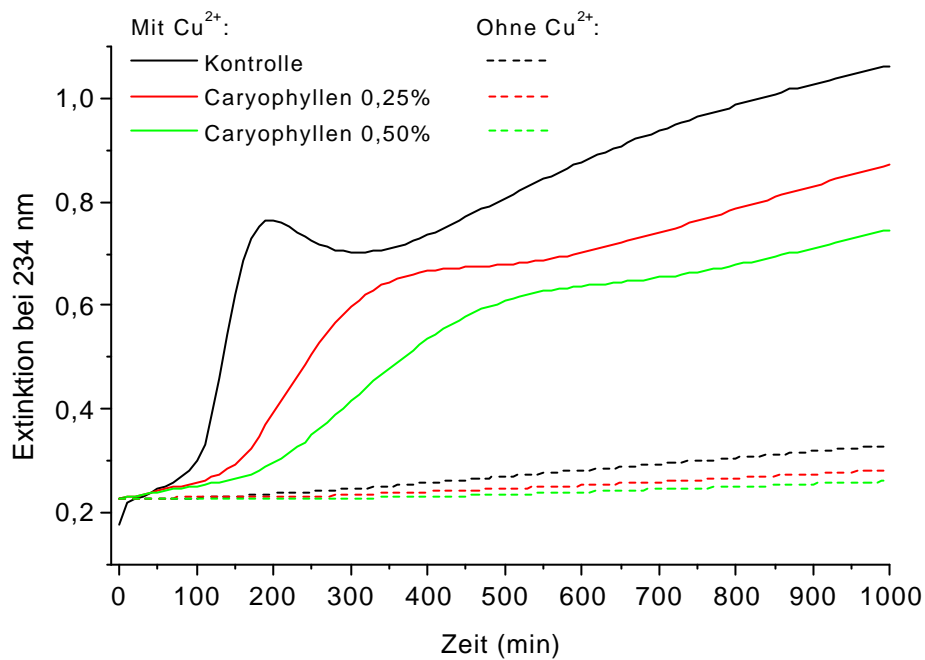


Abbildung 43: Einfluß von β -Caryophyllen auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 34: Lag-Phasen des mit β -Caryophyllen vorinkubierten LDL während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Kontrolle	108
β -Caryophyllen 0,25%	148
β -Caryophyllen 0,50%	191

Ocimen als ein weiterer Bestandteil des Hopfenöls wurde ebenfalls als Einzelsubstanz und in Kombination mit Humulen hinsichtlich eines LDL-Schutzes überprüft. Mit 0,25% i.VA. erreichte das mit Ocimen angereicherte LDL eine Lag-Phasenverlängerung um 54 min im Gegensatz zur Kontrolle und zeigte damit ebenfalls einen aktiven Schutz des LDL vor Oxidation (**Abb. 44**). Auch hier wurde die maximale Dienbildung signifikant gehemmt, aber im Gegensatz zum mit Humulen vorinkubierten LDL war die Dekompositionsphase deutlicher ausgeprägt. Eine Kombination von Ocimen und Humulen verlängerte die Lag-Phase auf 167 min, während die Einzelsubstanzen bei der gleichen Konzentration (0,25% i.VA.) eine Lag-Phase von 139 min im Gegensatz zur Kontrolle mit 84 min bewirkten (**Tab. 35**). Die zwei getesteten Kombinationen mit insgesamt 0,33% der Öle i.VA. führten zu einer identischen Lag-Phase von 150 min, wobei die Dekompositionsphase in der Kombination Humulen 0,08% / Ocimen 0,25% durch den Einfluß von Ocimen deutlicher ausgebildet ist als in der Kombination Humulen 0,17% / Ocimen 0,17%. Im Vergleich zur Plasmainkubation mit Ocimen (0,25%) bewirkte der Zusatz von 0,08% Humulen i.VA. eine zusätzliche Verschiebung der Lag-Phase von 12 min bei der LDL-Oxidation.

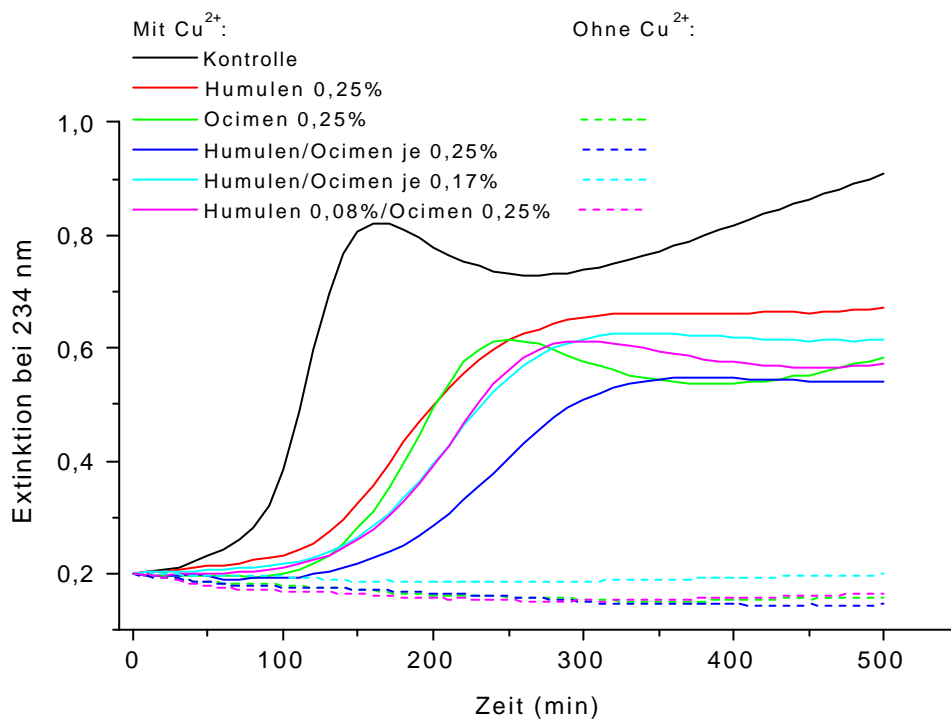


Abbildung 44: Einfluß von Humulen und Ocimen auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 35: Lag-Phasen des mit Humulen und Ocimen vorinkubierten LDL während der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Kontrolle	84
Humulen 0,25%	139
Ocimen 0,25%	138
Humulen und Ocimen je 0,25%	167
Humulen und Ocimen je 0,17%	150
Humulen 0,08% und Ocimen 0,25%	150

3.1.6.4. Vorinkubation mit α -Tocopherol und α -Humulen

Neben den verschiedenen Inhaltsstoffen des Hopfenöls wurde auch die Kombination von Humulen mit α -Tocopherol getestet, um eventuelle Effekte des Humulens auf die endogenen Antioxidantien des LDL zu untersuchen. Dazu wurde α -Tocopherol (in EtOH) entweder als Einzelsubstanz oder zusammen mit Humulen (0,33%, entspricht einer Konzentration von 14,7 mM i.VA.) in den Konzentrationen 0,5 mM und 1,0 mM i.VA. mit dem Plasma vorinkubiert. α -Tocopherol verzögerte die Lag-Phase um weitere 91 min bei 0,5 mM und um 143 min bei 1,0 mM im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 45, Tab. 36). Eine Reextraktion des LDL (mit $n = 2$) ergab 36 mol α -Tocopherol/mol LDL in beiden Fällen. Humulen, als Einzelsubstanz vorinkubiert, erreichte eine Anreicherung von 2445 mol/mol LDL und eine Lag-Phase von 161 min. Die Kombinationen von Humulen mit 0,5 und 1,0 mM α -Tocopherol i.VA. führten beide zu einer längeren Lag-Phase von 222 min, wobei sowohl weniger Humulen als auch weniger α -Tocopherol im Vergleich zu der Inkubation mit den Einzelsubstanzen im LDL nachweisbar waren. Offensichtlich hemmten sich die Substanzen in der Aufnahme, wirkten aber additiv auf die Verlängerung der Lag-Phase. Die Oxidationskurven zeigen die für Humulen-beladenes LDL typische Abflachung der Kurve, die auf eine Oxidation in Gegenwart einer niedrigen Kupferkonzentration hinweist.

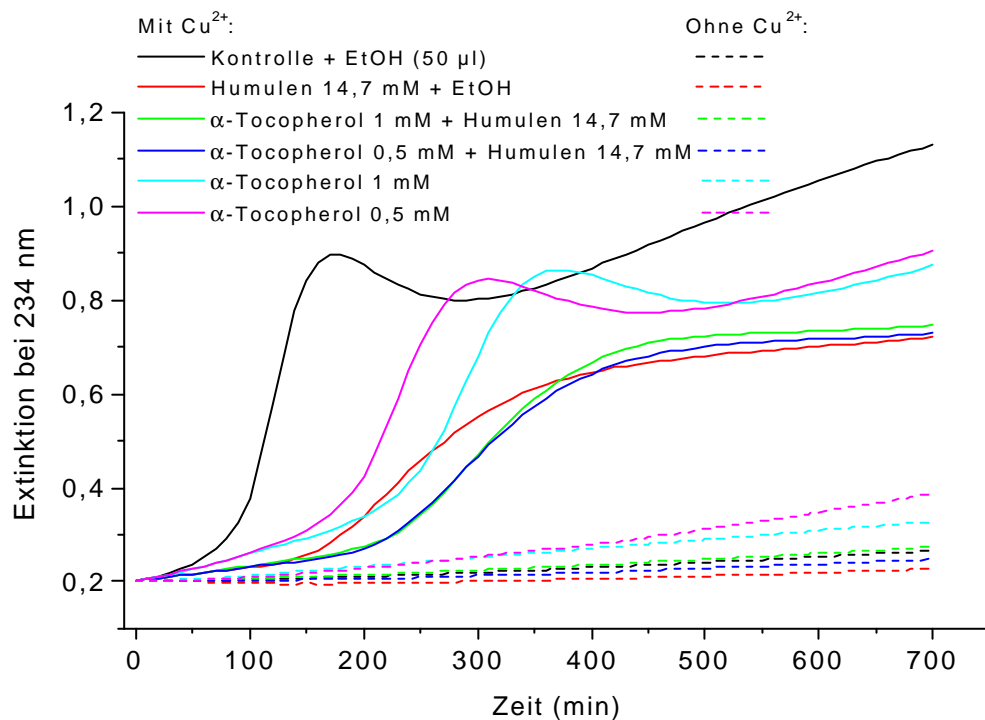


Abbildung 45: Einfluß von α -Tocopherol und Humulen auf die Oxidation des vorinkubierten LDL

Tabelle 36: Lag-Phasen aus der LDL-Oxidation und reextrahierte Substanzen aus mit Humulen und α -Tocopherol vorinkubiertem LDL (n = 2)

Vorinkubierte Testsubstanz	Lag-Phase (min)	α -Tocopherol (mol/mol LDL)	Humulen (mol/mol LDL)
Kontrolle	94	28 \pm 10	-
Humulen 0,33%	161	n.b.	2445 \pm 164
Humulen 0,33% + α -Tocopherol 1,0 mM	222	32 \pm 1	1826 \pm 95
Humulen 0,33% + α -Tocopherol 0,5 mM	222	30 \pm 3	1588 \pm 458
α -Tocopherol 1,0 mM	237	36 \pm 7	-
α -Tocopherol 0,5 mM	185	36 \pm 26	-

3.1.6.5. Vorinkubation mit Bier und Bierfraktionen

Eine Vorinkubation von jeweils 2,5 ml Plasma mit 0,5 ml Maische-, Hefe-, Würzefraktion oder Hellem Bier mit anschließender LDL-Isolierung und kupferinduzierten Oxidation führte nicht zu einer Verschiebung der Lag-Phase (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, daß sich aus diesen Bierfraktionen keine Verbindungen im LDL-Partikel angereichert haben, die nach der Isolierung des LDL aus dem vorinkubierten Plasma einen Oxidationsschutz bieten.

3.1.6.6. Direktinkubation von LDL mit Bier und Bierfraktionen

Bei der direkten Zugabe von Bier und den Bierfraktionen (0,5% im Ansatz) zu isoliertem LDL konnte die LDL-Oxidation durch alle Zusätze gehemmt werden. Für den Ansatz wurden zuerst jeweils 5 μ l der wässrigen Maische- und Hefe-Fraktion, der Läuterwürze und des Hellen Bieres mit den Kupferionen (1,67 μ M i.A.) für fünf Minuten vorinkubiert und die Oxidation mit der Zugabe von isoliertem LDL gestartet. **Abbildung 46** zeigt, daß durch den Hefe-Überstand und die Läuterwürze die LDL-Oxidation im beobachteten Zeitraum von 500 min komplett unterbunden wurde. Offensichtlich waren die Kupferionen in Gegenwart dieser Bierfraktionen nicht in der Lage, eine LDL-Oxidation auszulösen. Durch die Anwesenheit der wässrigen Maische-Fraktion findet jedoch ein Anstieg der Extinktion statt. Diese zögerliche LDL-Oxidation kann aber nicht auf das Kupfer zurückgeführt werden, denn der Ansatz ohne Kupfer zeigt eine identische Reaktion. Als weitere Kontrolle wurde die Maische-Fraktion ohne LDL, aber mit und ohne Kupfer inkubiert; dies führte nicht zu einem Anstieg der Extinktion (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, daß in der Maische Substanzen enthalten sind, die mit dem LDL reagieren können.

Das Bier, dessen geringere Fähigkeit zur Komplexbildung von Kupferionen im Vergleich zu den anderen Bierfraktionen bereits zuvor festgestellt wurde, wies von den getesteten Fraktionen die Oxidation im beobachteten Zeitraum die kürzeste Lag-Phase auf (**Abb. 47**).

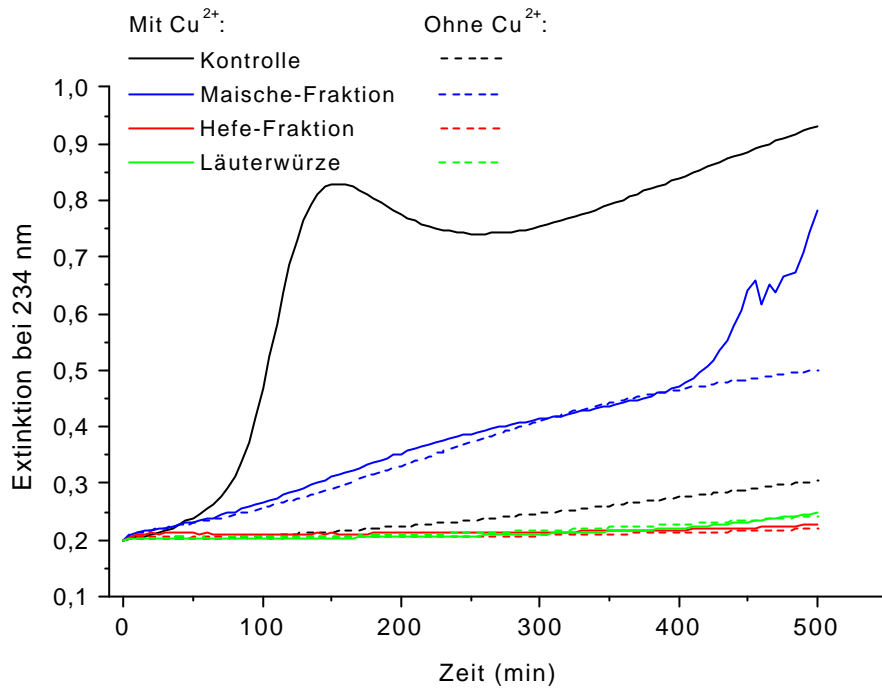


Abbildung 46: Einfluß der kupferkomplexierenden Maische-Fraktion, Hefe-Fraktion und Läuterwürze (jeweils 0,5% i.A.) auf die LDL-Oxidation bei Direktinkubation

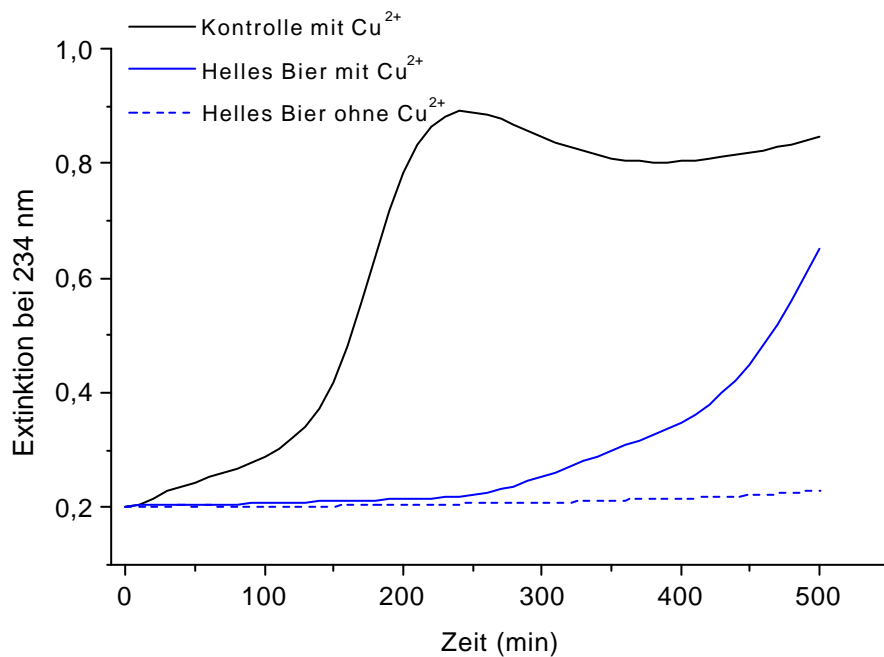


Abbildung 47: Einfluß von Hellem Bier (0,5% i.A.) auf die LDL-Oxidation bei Direktinkubation

3.1.7. Vollblut-System

Als Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr haben die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten die Aufgabe, durch Phagozytose sowie Sezernierung reaktiver Verbindungen und Enzyme eingedrungene Pathogene zu inaktivieren. Dazu werden durch die aktivierten Neutrophilen während des respiratory burst ROS wie $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 und OH^{\cdot} generiert und während der ablaufenden Degranulation unter anderem auch die Myeloperoxidase freigesetzt. Dieses Enzym katalysiert unter Verwendung von H_2O_2 und Cl^- die Bildung von Hypochloriger Säure (HOCl), die indirekt über einen spezifischen Zerfall des zugesetzten ACC zu Ethen detektiert werden kann. Damit ist die Möglichkeit gegeben, eine Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten durch applizierte Testsubstanzen zu überprüfen, wobei die durch HOCl bedingte Freisetzung von Ethen als Indikator für die Stärke der ablaufenden Reaktion und damit für die Aktivität der neutrophilen Granulozyten dient. Aktiviert werden die Neutrophilen mit Hilfe von Zymosan, einer Hefezellwandpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*, die nach automatischer Opsonierung im Vollblut den Phagozytose-Prozeß mit dem respiratory burst und der Degranulation auslöst. Auf diese Weise kann eine entzündliche Reaktion im Minimalmaßstab im Reagenzglas simuliert werden.

Alle untersuchten Bierfraktionen wurden auf eine mögliche Zytotoxizität gegenüber den Leukozyten im Blut überprüft. Dazu wurden aus zusätzlich inkubierten Vollblut-Ansätzen mit den Testsubstanzen, denen jedoch kein Zymosan zugesetzt wurde, durch Dextran-Sedimentation leukozytenreiche Überstände gewonnen. Die darin enthaltenen Zellen wurden mit Trypanblau vermischt und mikroskopisch auf eine Blaufärbung als Anzeichen nicht vitaler Zellen untersucht. Dieser Vitalitätstest wurde für jeweils die beiden höchsten Konzentrationsstufen (0,5% und 5,0% i.A.) der verwendeten Konzentrationsreihen durchgeführt, wobei keinerlei Anzeichen einer Zytotoxizität durch das Bier und die Bierinhaltsstoffe festzustellen war.

Die Konzentrationsreihen der im Vollblut-System getesteten Bierinhaltsstoffe wurden mindestens zweifach und an verschiedenen Tagen durchgeführt, um den Einfluß auf die Neutrophilen von verschiedenen Probanden mit einem unterschiedlichen Aktivierungsstatus zu testen. In **Abbildung 48** und **Tabelle 37** ist diese individuelle Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten deutlich an den unterschiedlich hohen Ethenmengen in der jeweiligen Grundreaktion ohne Testsubstanz zu erkennen, die zwischen 1000 pmol und 7500 pmol Ethen lag. Hierbei spielen natürlich auch die Anzahl der Neutrophilen pro ml Vollblut und eine eventuelle Vorstimulation durch entzündliche Reaktionen im Körper des jeweiligen Probanden eine Rolle.

Durch den Zusatz der wässrigen Maische-Fraktion zu den aktivierten neutrophilen Granulozyten zeigte sich bei den Probanden 1 und 3 mit den niedrigeren Konzentrationen bis 0,1% i.A. eine deutliche Stimulierung der Aktivität, die bei den höheren Konzentrationen von 0,5 und 5,0% Maische i.A. wieder abnahm. Bei Proband 2 war eine stetige konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivität zu beobachten, die sich in einer Hemmung der Ethenbildung äußerte und bei 5% i.A. nur noch 33% der ursprünglichen Ethenmenge erreichte. Bei Proband 3 bewirkte eine Konzentration von 5% i.A. ebenfalls eine Aktivitätsabnahme der Neutrophilen auf 60% Restaktivität.

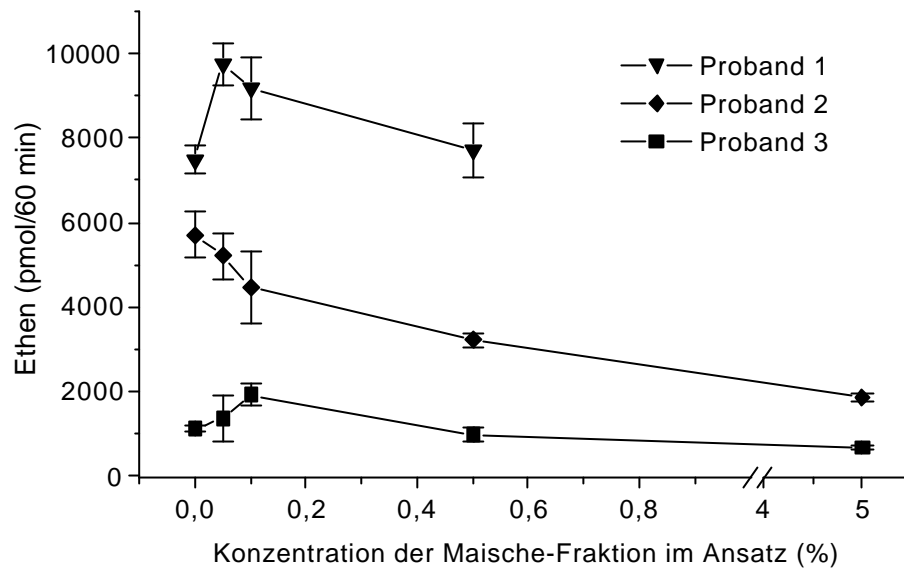


Abbildung 48: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 37: Einfluß der Maische-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Maische-Fraktion (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,00	7477 ± 333	5703 ± 531	1128 ± 80
0,05	9744 ± 514	5202 ± 535	1366 ± 558
0,10	9186 ± 738	4468 ± 859	1918 ± 272
0,50	7698 ± 635	3209 ± 172	984 ± 149
5,00	-	1859 ± 78	670 ± 46

Auch bei der Hefe-Fraktion war bei beiden Probanden ein deutlicher Abfall der Aktivierbarkeit bei der höchsten Konzentration mit 5% i.A. zu verzeichnen (**Tab. 38, Abb. 49**). Die produzierten Ethenmengen sanken bei dieser Konzentration um 45% beziehungsweise 30%. Bei den niedrigeren Konzentrationen änderte sich die Ethenfreisetzung nicht wesentlich.

Tabelle 38: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Hefe-Fraktion (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)	
	Proband 1	Proband 2
0,00	7168 ± 784	5297 ± 734
0,025	-	4648 ± 496
0,05	6536 ± 346	5239 ± 694
0,10	6358 ± 769	4386 ± 474
0,50	6666 ± 544	4170 ± 807
5,00	3986 ± 828	3657 ± 588

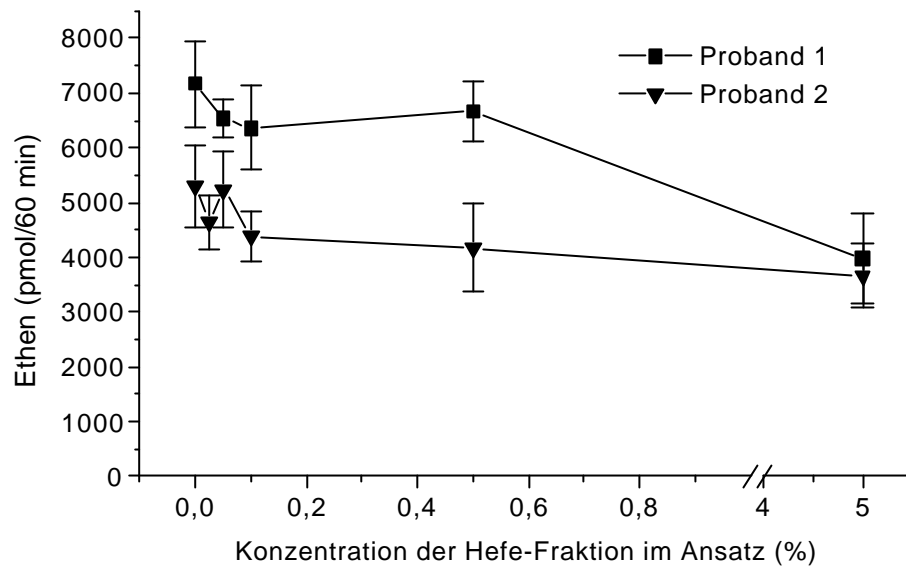


Abbildung 49: Einfluß der Hefe-Fraktion auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Durch den Zusatz von Läuterwürze konnte ebenfalls eine abnehmende Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten bei 5% i.A. bei beiden Probanden beobachtet werden (**Abb. 50, Tab. 39**), die eine Abnahme in der Ethenfreisetzung um ca. 40% im Vergleich zur Kontrolle bewirkte.

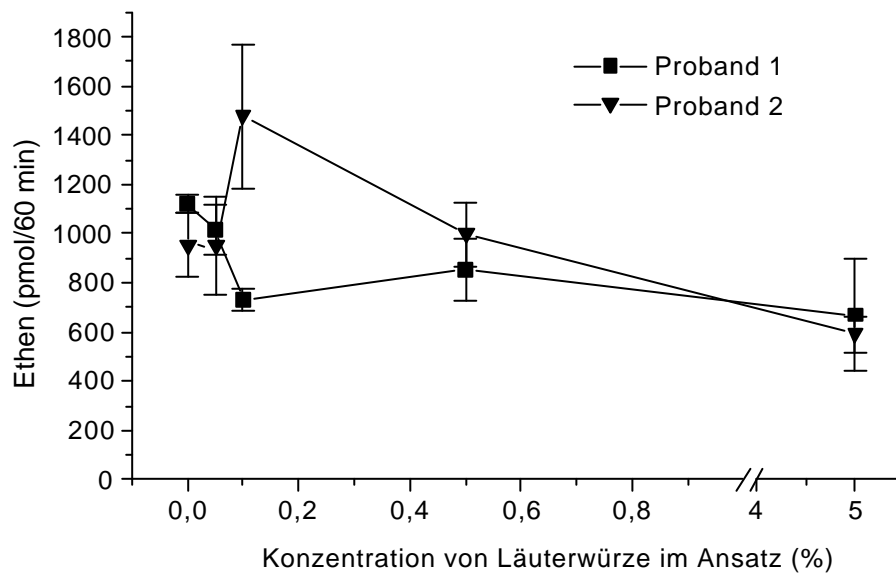


Abbildung 50: Einfluß der Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 39: Einfluß der Läuterwürze auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Läuterwürze (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)	
	Proband 1	Proband 2
0,00	1121 ± 38	954 ± 130
0,05	1018 ± 101	949 ± 200
0,10	731 ± 42	1477 ± 295
0,50	854 ± 127	996 ± 130
5,00	669 ± 229	592 ± 74

Im Gegensatz dazu führten die Anwesenheit des Bieres (**Abb. 51, Tab. 40**) und der bei pH 4 extrahierten Hopfenextrakt-Lösung (**Abb. 52, Tab. 41**) bei 5% i.A. nicht zu einer signifikanten Hemmung der Ethenfreisetzung. Allerdings zeichneten sich, vor allem beim Hopfenextrakt, entsprechende Tendenzen im Niedrigkonzentrationsbereich von 0,1% i.A. ab. Durch das Bier konnte dagegen bei 0,05% i.A. eine leichte Stimulierung der Aktivität beobachtet werden, die auch in späteren Versuchen reproduzierbar war (siehe **3.2.1.2.1.**).

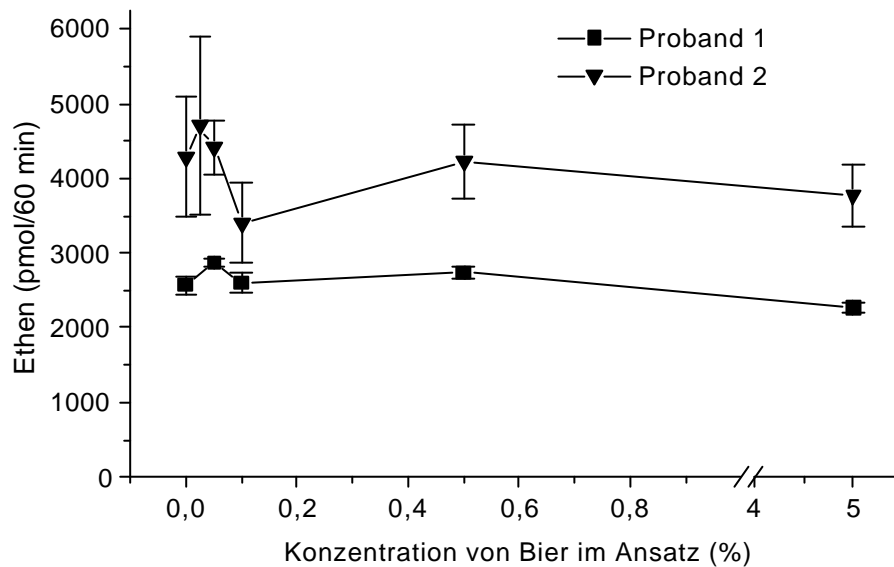


Abbildung 51: Einfluß von Hellem Bier auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 40: Einfluß der Hellem Bier auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Helles Bier (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)	
	Proband 1	Proband 2
0,00	2571 ± 117	4282 ± 803
0,025	-	4705 ± 1201
0,05	2872 ± 64	4417 ± 364
0,10	2608 ± 137	3410 ± 539
0,50	2739 ± 84	4226 ± 508
5,00	2271 ± 68	3768 ± 427

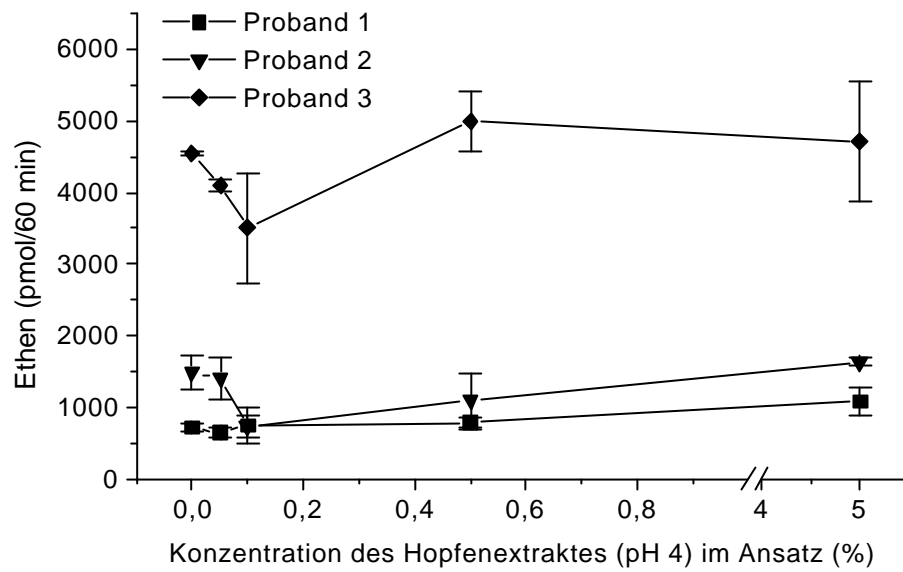


Abbildung 52: Einfluß des Hopfenextraktes, extrahiert bei pH 4, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 41: Einfluß des Hopfenextraktes, extrahiert bei pH 4, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Hopfenextrakt pH 4 (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3
0,00	713 ± 57	1480 ± 230	4551 ± 18
0,05	639 ± 67	1400 ± 286	4100 ± 96
0,10	744 ± 259	727 ± 160	3501 ± 770
0,50	780 ± 84	1083 ± 374	5005 ± 419
5,00	1081 ± 186	1630 ± 63	4703 ± 841

Die bei pH 10 extrahierte Hopfenextrakt-Lösung zeigte bei den höher aktivierten Neutrophilen des Probanden 2 eine abnehmende Aktivierbarkeit, die sich in einer um 27% niedrigeren Ethenmenge bei 5,0% i.A. im Vergleich zur Kontrolle äußerte (**Tab. 42**). Dies war bereits bei der Maische-Fraktion, Hefe-Fraktion und Läuterwürze zu beobachten. Bei Proband 1 dagegen war bei dessen weniger aktivierbaren Granulozyten keine signifikante Änderung in der Ethenbildung zu erkennen (**Abb. 53**).

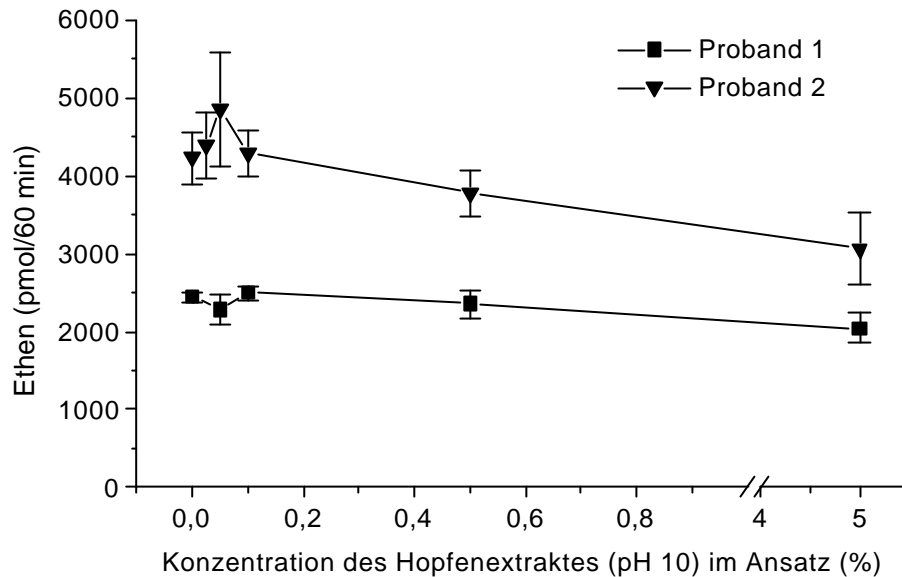


Abbildung 53: Einfluß von Hopfenextrakt, extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 42: Einfluß von Hopfenextrakt, extrahiert bei pH 10, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Hopfenextrakt pH 10 (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)	
	Proband 1	Proband 2
0,00	2446 ± 63	4229 ± 341
0,025	-	4396 ± 424
0,05	2288 ± 194	4851 ± 725
0,10	2497 ± 90	4293 ± 287
0,50	2356 ± 177	3780 ± 294
5,00	2045 ± 197	3070 ± 472

Die wasserlöslichen Inhaltsstoffe der Hopfenpellets führten in den niedrigeren Konzentrationen von 0,05 und 0,10% i.A. zu einer signifikanten Downregulierung der Stimulierbarkeit der neutrophilen Granulozyten. Die maximale Hemmung wurde mit einer Konzentration von 0,1% erreicht, bei der die Ethenmenge um 40% beziehungsweise 25% abnahm (**Tab. 43**). Mit 5% des Hopfenpellet-Extraktes stieg die Ethenbildung wieder auf die Ausgangswerte an und führte so zu einer reproduzierbaren U-förmigen Kurve (**Abb. 54**).

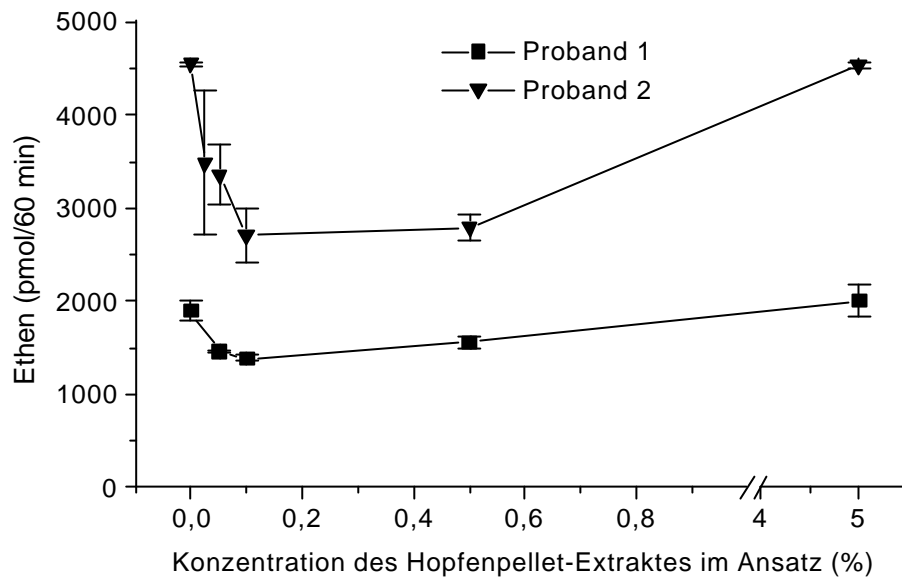


Abbildung 54: Einfluß der Hopfenpellet-Lösung, extrahiert bei pH 4, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 43: Einfluß der Hopfenpellet-Lösung, extrahiert bei pH 4, auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Hopfenpellet pH 4 (% im Ansatz)	Ethen (pmol /60 min)	
	Proband 1	Proband 2
0,00	1895 ± 104	4551 ± 18
0,025	-	3489 ± 780
0,05	1464 ± 10	3364 ± 317
0,10	1390 ± 27	2706 ± 299
0,50	1556 ± 68	2792 ± 148
5,00	2008 ± 171	4536 ± 28

3.1.8. Zusammenfassung

Die antioxidativen Eigenschaften von verschiedenen Bierinhaltsstoffen und von Hellem Bier wurden in mehreren biochemischen Testsystemen (Xanthin/Xanthinoxidase-, NADH/Diaphorase- und Hydroxylaminoxidation-System) untersucht. Aufgrund der in den Systemen bestimmten IC-Werte zeigte sich die Maische-Fraktion als potentester Radikalfänger, gefolgt von der Hefe-Fraktion, der Läuterwürze und der Anstellwürze mit ähnlicher Wirksamkeit. Das Helle Bier besaß im Vergleich zu den untersuchten

Ausgangsstoffen eine deutlich geringere antioxidative Kapazität, wobei der Effekt des Ethanols als antioxidativer Scavenger durch den Bezug auf eine EtOH-Kontrolle ausgeschaltet wurde. Auch die wässrigen Extrakte aus den Hopfenprodukten zeigten antioxidative Eigenschaften, wobei der Hopfenpellet-Extrakt besser abschnitt als das Bier und der Extrakt aus dem lipophilen Hopfenextrakt eine geringere antioxidative Kapazität aufwies. In Gegenwart von Blutplasma wurden sowohl die antioxidativ wirksamen Substanzen im Bier als auch die wirksamen Inhaltsstoffe aus dem Hopfen wesentlich stärker beeinträchtigt als die der Maische-/Hefe-Fraktion oder der Würze.

Im Rose Bengal-System konnte die Lipidperoxidation durch die Hopfenpellets und den Hopfenextrakt gehemmt werden, wobei in diesem Testsystem eine weitere antioxidative Schutzwirkung des Bieres und seiner Inhaltsstoffe in Form einer effektiven Kupferkomplexierung zum Tragen kam. Die Maische-Fraktion zeigte die höchste Kapazität zur Kupferkomplexierung, während nach der Hefe-Fraktion und der Würze das Bier geringere komplexierende Eigenschaften aufwies. Diese abnehmende Reihenfolge in der Kupferkomplexierung im Verlauf des Brauprozesses konnte im DHF/Cu-System bestätigt werden.

Aufgrund der Fähigkeit zur Metall-Komplexbildung konnte auch die kupferinduzierte LDL-Oxidation durch eine Direktinkubation mit der wässrigen Maische- und Hefe-Fraktion, der Läuterwürze und dem Hellen Bier gehemmt, beziehungsweise innerhalb des Beobachtungszeitraumes sogar komplett verhindert werden. Ein direkter LDL-Schutz durch eine Anreicherung von Bierinhaltsstoffen im LDL-Partikel konnte durch Vorinkubationen von Plasma mit den Bierinhaltsstoffen und dem Bier jedoch nicht erreicht werden. Allerdings befanden sich Substanzen im lipophilen Hopfenextrakt, die einen signifikanten Oxidationsschutz bewirkten und auch die maximale Dienbildung reduzierten. Anreicherungsversuche mit den Hauptkomponenten der Hopfenöle (α -Humulen, β -Caryophyllen, Myrcen und Ocimen) als mögliches wirksames Prinzip des LDL-Schutzes zeigten zwar einen gewissen Oxidationsschutz dieser Komponenten, aber der lipophile Hopfenextrakt erwies sich als effektiver als die getesteten Einzelsubstanzen, die damit nicht oder nur in geringem Maß für die beobachtete Oxidationshemmung verantwortlich sind. Besonders Humulen zeigte eine hohe Affinität zum LDL, wobei jedoch physiologisch relevante Konzentrationen bei der Vorinkubation deutlich überschritten wurden.

Hinsichtlich einer Immunmodulation bewirkten alle Bierinhaltsstoffe eine Hemmung der HOCl-Produktion stimulierter neutrophiler Granulozyten im Vollblut, wobei die Maische- und die Hefe-Fraktion, die Läuterwürze und der bei pH 10 extrahierte Hopfenextrakt zu einer deutlichen Immunsuppression bei höheren Konzentrationen und die bei pH 4 extrahierten Hopfenprodukte (Hopfenpellets und Hopfenextrakt) ihre maximale Aktivitätshemmung im Niedrigkonzentrationsbereich zeigten.

Mit diesen Untersuchungen wurde das Ziel gesetzt, unter den Bierinhaltsstoffen geeignete Komponenten zu finden, die durch eine Anreicherung die antioxidative Wirksamkeit von Bier erhöhen sollten. Hier bot sich vor allem die Maische als eine geeignete Komponente an, da sie das höchste antioxidative Potential unter den Rohstoffen aufwies. Außerdem zeigte die Maische-Fraktion die höchste Kapazität zur Kupferkomplexierung und in höheren Konzentrationen immunsuppressive Eigenschaften. In dieser Hinsicht erwiesen sich auch die Hopfenprodukte [im Sauren extrahiert] als interessant, da auch sie neben ihren Eigenschaften als Radikalfänger eine Aktivitätshemmung der neutrophilen Granulozyten bewirkten. Desweiteren könnte hinsichtlich eines LDL-Schutzes der Hopfenextrakt einen geeigneten Rohstoff darstellen.

Um die physiologische Wirksamkeit dieser drei Komponenten zu testen, wurden diese in Form von Zusätzen in einem Hellen Bier angereichert und von den Probanden in Trinkstudie 1 konsumiert. Dabei stand der Vergleich der Wirkungen des Hellen Bieres mit denen des Bieres mit den Zusätzen (= Testbier 1) in vivo im Vordergrund.

3.2. ERGEBNISSE DER TRINKSTUDIEN

Die verschiedenen Bierfraktionen zeigten in den bisher dargestellten Testsystemen vielversprechende Ergebnisse bezüglich ihrer antioxidativen Kapazitäten und ihrer immunmodulierenden Wirkung auf neutrophile Granulozyten. Aber es stellt sich die Frage, ob die untersuchten Inhaltsstoffe im Bier auch bioverfügbar sind und die antioxidativ wirkenden Substanzen nach dem Genuß von Bier das antioxidative Potential des Blutplasmas im Menschen steigern können. Aus diesem Grund wurde Plasma vor und nach dem Trinken von Bier in ausgesuchten Testsystemen hinsichtlich seiner antioxidativen Aktivität untersucht und im Vollblut der Probanden immunmodulatorische Effekte durch die Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten überprüft. Insgesamt wurde der Einfluß von sechs verschiedenen Bieren in vier Trinkstudien an einer unterschiedlichen Zahl von Probanden getestet. Aufgrund der geringen Probandenzahlen pro Studie wurde auf eine übergreifende statistische Berechnung verzichtet und die erhaltenen Einzelwerte dargestellt. Die Ergebnisse dieser vier Studien sind im folgenden dargestellt.

Die Untersuchungen des Vollblutes, des Plasmas und des daraus isolierten LDL der Probanden aus den Trinkversuchen werden dabei im folgenden als „in vivo“-Untersuchungen definiert, d.h. eine mögliche Beeinflussung durch das Bier fand im Körper statt. Die „ex vivo“-Versuche beinhalten Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung der Testbiere in Kombination mit Plasma aus einem Plasmapool, der aus dem Plasma von ca. zehn gesunden Probanden bestand. Dieser Plasmapool ist als „unbeeinflusst“ anzusehen und die Biere wurden zusammen mit diesem gepoolten Plasma (und des daraus isolierten LDL) außerhalb des Organismus getestet. Das Vollblut für die ex vivo-Untersuchungen stammte von einzelnen freiwilligen Spendern. Für die „in vitro“-Untersuchungen wurden keine biologischen Materialien aus dem Organismus verwendet.

3.2.1. Trinkstudie 1

In dieser ersten als Pilotstudie ausgelegten Untersuchung wurden die antioxidativen Wirkungen eines Hellen Bieres mit denen eines mit Zusätzen aus Bierrohstoffen angereicherten Bieres hinsichtlich ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften in vivo verglichen. Die Rezeptur des ersten Testbieres wurde, basierend auf den bereits vorgestellten in vitro Ergebnissen, entwickelt.

Helles Bier (500 ml) mit einem Alkoholgehalt von 4,9% (v/v) wurde mit folgenden Komponenten, die sich in vitro unter anderem durch gute Radikalfängereigenschaften auszeichneten, angereichert (siehe auch **2.1.4.**):

- i) 125 mg Hopfenextrakt (in EtOH gelöst, der Gesamt-Alkoholgehalt erhöhte sich damit auf 5,0%) aus Gründen eines möglichen LDL-Oxidationsschutzes
- ii) 75 mg Lyophilisat eines sauren Hopfenpellet-Extraktes aufgrund einer potentiellen Down-Regulation der neutrophilen Granulozyten im Vollblut
- iii) 40 g Lyophilisat des wässrigen Maischeanteils, der einen potenten Kupferkomplexator enthält. Eine Überprüfung im DHF/Cu-System ergab, daß durch das Kochen des Maischeüberstandes, das Abzentrifugieren der denaturierten Proteine und das anschließende Lyophilisieren der Kupferkomplexator in seiner Aktivität nicht beeinträchtigt wurde.

Bei der Auswahl der verwendeten biochemischen Testsysteme zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Plasma spielte der IC_{50} -Wert von Kontrollplasma aus dem Plasmapool eine Rolle. Im X/XOD-System konnten 300 μ l Kontrollplasma und im Fenton-System 100 μ l Kontrollplasma eingesetzt werden, um eine ca. 50%ige Hemmung des Testsystems zu erreichen. In anderen Modellsystemen für eine Bestimmung der antioxidativen Kapazität waren die IC_{50} -Werte des Kontrollplasmas weitaus geringer (Janisch

et al., 2002). Sinnvoll erschien der Einsatz einer möglichst großen Menge an Plasma, um durch das Trinken der Testtiere zusätzlich vorhandene Effekte aufdecken zu können.

Im DHF/Cu-System hemmten bereits 4 µl Kontrollplasma die maximale ROS-Bildung um 50%. Aber dieses System wurde trotzdem eingesetzt, um eine möglicherweise erhöhte kupferkomplexierende Fähigkeit von Plasma untersuchen zu können.

Folgende Testsysteme wurden in Trinkstudie 1 verwendet:

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität des Plasmas:

- Xanthin/Xanthinoxidase-System
- Fenton-System
- Dihydroxyfumarsäure-System

Zur Bestimmung immunmodulierender Wirkungen:

- Vollblut-System

Zur Bestimmung eines Oxidationsschutzes des aus dem Plasma isolierten LDL:

- Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Neben der Bestimmung der Blutwerte durch ein medizinisches Labor wurden für eine weitere Charakterisierung des Plasmas der Probanden der Proteingehalt bestimmt.

3.2.1.1. In vivo-Untersuchungen

Wie bereits unter **2.2.3.1.** ausführlicher beschrieben, nahmen insgesamt sechs Probanden (Probanden A – F) an dieser Trinkstudie teil, welche das Trinken von 500 ml Kontrollbier (EtOH-Gehalt 5,0%) an Versuchstag 1 und eine Woche später das Trinken von 500 ml des Testbieres 1 (EtOH-Gehalt 5,0%) an Versuchstag 2 beinhaltete. Um ernährungsbedingte Einflüsse möglichst auszuschließen, wurde von den Probanden jeweils innerhalb von 24 h vor Beginn des Trinkversuches eine festgelegte Diät eingehalten. Nach der ersten Abnahme von Blut wurde das Bier innerhalb von höchstens 10 min getrunken. Weitere Blutabnahmen folgten nach 30, 60, 90, 120 und 180 min an beiden Tagen dieser Studie.

Unmittelbar nach den Blutabnahmen wurde das Vollblut der Probanden auf immunmodulierende Wirkungen durch den Biergenuß untersucht und das Plasma für die weiteren Untersuchungen gewonnen und bei – 70 °C eingefroren. Leider konnten einige Plasmaproben aufgrund einer defekten Gefriertruhe nicht mehr analysiert werden, weshalb einige Datenreihen unvollständig sind.

Erwähnenswert ist das subjektive Empfinden aller sechs Probanden hinsichtlich einer schlaffördernden Wirkung nach Genuß des Testbieres 1.

3.2.1.1.1. Blutwerte

Als Beispiel für die durch ein medizinisches Labor gemessenen Blutwerte werden in der nachfolgenden **Tabelle 44** die Meßwerte eines Probanden für den ersten Versuchstag (Trinken von Hellem Bier als Kontroll- beziehungsweise Vergleichsbier) und für den zweiten Versuchstag (Trinken von Testbier 1) gezeigt. Eine signifikante Beeinflussung der Blutwerte (großes Blutbild, Blutfettwerte und Harnsäure) durch das Trinken von Kontrollbier oder Testbier 1 über den Versuchszeitraum von 180 min war bei keinem der Probanden gegeben.

Tabelle 44: Blutwerte eines Probanden aus Trinkstudie 1

Blutparameter	Bier	Einheit	Normalwert	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Erythrozyten	Kontrollbier	/pl	4,1 – 5,9	5,12	4,95	4,28	5,14	4,63	4,82
	Testbier 1			4,72	4,56	4,65	4,08	4,00	4,11
Hämoglobin	Kontrollbier	g/dl	14 - 18	16,0	15,4	13,5	16,0	14,5	15,3
	Testbier 1			14,9	14,4	14,8	13,0	11,8	13,0
HBE (MCH) = mean corpuscular haemoglobin	Kontrollbier	pg	27 - 32	31,3	31,0	31,6	31,1	31,4	31,8
	Testbier 1			31,6	31,6	31,9	31,8	29,5	31,7
MCV = mean corpuscular volume	Kontrollbier	fl	82 - 101	92,8	92,5	92,7	92,3	92,9	92,0
	Testbier 1			92,6	92,1	92,2	91,7	91,2	92,3
Hämatokrit	Kontrollbier	%	36 - 52	47,5	45,8	39,6	47,5	43,1	44,4
	Testbier 1			43,7	42,0	42,8	37,4	36,5	38,0
MCHC = mean corpuscular haemo- globin concentration	Kontrollbier	g/dl	32 - 36	33,7	33,5	31,1	33,7	33,8	34,5
	Testbier 1			34,2	34,3	34,6	34,6	32,4	34,3
Thrombozyten	Kontrollbier	Tsnd	140 - 400	313	281	251	287	277	270
	Testbier 1	/µl		279	275	273	253	253	264
Leukozyten, unterteilt in:	Kontrollbier	/nl	4,0 – 10,0	8,3	7,4	6,9	7,9	8,2	7,0
	Testbier 1			5,1	4,4	5,3	4,6	4,2	5,3
• Segmentkernige	Kontrollbier	%	40-80	65	73	72	74	70	72
	Testbier 1			56	60	60	61	60	62
• Lymphozyten	Kontrollbier	%	20-52	21	15	15	16	17	17
	Testbier 1			29	24	25	26	27	25
• Monozyten	Kontrollbier	%	2-12	9	8	9	7	9	8
	Testbier 1			11	10	10	10	10	10
• Basophile	Kontrollbier	%	bis 1	1	1	1	0	1	0
	Testbier 1			0	1	1	0	0	0
• Eosinophile	Kontrollbier	%	bis 5	4	3	3	3	3	3
	Testbier 1			4	5	4	3	3	3
Cholesterin	Kontrollbier	mg/dl	120 - 200	189	154	173	170	189	176
	Testbier 1			167	149	151	162	166	164
Triglyceride	Kontrollbier	mg/dl	74 - 172	64	78	72	58	63	72
	Testbier 1			107	101	91	91	90	90
HDL-Cholesterin	Kontrollbier	mg/dl	> 55	63	52	57	60	64	57
	Testbier 1			47	46	47	50	48	52
LDL-Cholesterin	Kontrollbier	mg/dl	< 135	127	101	116	115	128	102
	Testbier 1			88	77	80	89	93	86
LDL/HDL	Kontrollbier		< 3,5	2,0	1,9	2,0	1,9	2,0	1,8
	Testbier 1			1,9	1,7	1,7	1,8	1,9	1,7
Harnsäure	Kontrollbier	mg/dl	3,5 – 7,0	5,55	5,37	5,8	5,24	5,62	5,56
	Testbier 1			4,18	4,01	4,08	4,36	4,13	4,21

3.2.1.1.2. Vollblut-System

Um die immunmodulatorischen Effekte von Bier auf die neutrophilen Granulozyten im Vollblut der Probanden untereinander vergleichen zu können, wurden die im Testsystem produzierten Ethenmengen auf jeweils 10^6 neutrophile Granulozyten umgerechnet. Die dafür zugrunde liegenden Zahlen sind in **Tabelle 45** aufgeführt und wurden aus dem prozentualen Anteil der Segmentkernigen an der Gesamt-Leukozytenzahl der jeweiligen Blutwertanalysen berechnet. Auffallend waren hierbei die Tendenzen einer Granulozyten-Abnahme 60 min nach Genuß des Kontrollbieres um $0,32 (\pm 0,15) \times 10^6$ Neutrophile/ml Vollblut und einer Granulozyten-Zunahme 60 min nach Genuß des Testbieres um $0,36 (\pm 0,31) \times 10^6$ Neutrophile/ml Vollblut bei jeweils fünf der sechs Probanden. Diese Tendenz war nach 3 h immer noch bei vier der sechs Probanden zu beobachten: eine durchschnittliche Granulozyten-Abnahme 180 min nach Genuß des Kontrollbieres um $0,45 (\pm 0,31) \times 10^6$ Neutrophile/ml Vollblut und eine Granulozyten-Zunahme 180 min nach Genuß des Testbieres um $0,75 (\pm 0,24) \times 10^6$ Neutrophile/ml Vollblut im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 45: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 1

Proband	Bier	Anzahl neutrophiler Granulozyten ($\times 10^6$ /ml Vollblut)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	3,2	3,0	3,1	3,0	3,0	3,2
	Testbier 1	2,3	2,3	2,6	2,2	3,0	3,2
B	Kontrollbier	5,4	5,4	5,0	5,8	5,7	5,0
	Testbier 1	2,9	2,6	3,2	2,8	2,5	3,3
C	Kontrollbier	4,3	3,8	3,8	3,3	3,4	3,2
	Testbier 1	3,4	3,7	3,6	3,3	2,9	2,9
D	Kontrollbier	5,2	6,3	6,3	6,2	7,0	6,3
	Testbier 1	6,4	7,9	7,3	7,1	7,3	7,2
E	Kontrollbier	3,2	2,8	2,9	3,0	3,5	3,0
	Testbier 1	2,9	3,0	3,0	3,1	3,2	2,8
F	Kontrollbier	3,1	2,7	2,8	2,8	2,9	2,8
	Testbier 1	3,6	3,6	3,6	3,8	3,5	4,5

In **Abbildung 55** beziehungsweise in **Tabelle 46** ist die Beeinflussung der Aktivität der neutrophilen Granulozyten der sechs Probanden nach dem Genuß des Kontrollbieres und des Testbieres 1 dargestellt.

Das Trinken des Hellen Bieres (= Kontrollbier) führte bei Proband A zu einer tendenziellen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die während des Beobachtungszeitraumes auf etwa dem gleichen Niveau blieb. Durch das Trinken von Testbier 1 wurden bei den ersten vier Zeitpunkten keine signifikanten Änderungen in der Stimulierung gemessen, jedoch bei 120 und 180 min verringerte sich die Ethenfreisetzung um 14 – 22% im Vergleich zur Kontrolle (0 min).

Generell läßt sich bei allen Probanden die Tendenz einer Stimulierung in der Aktivität der Neutrophilen bis 60 min nach dem Trinken sowohl von Testbier 1 als auch des Kontrollbieres feststellen mit Ausnahme der Probanden C und D nach Konsum von Testbier 1. Während die neutrophilen Granulozyten von Proband A auf das Testbier 1 mit einer signifikanten Hemmung bezüglich der Aktivität reagierten, zeigten die anderen Probanden beim Vergleich der Werte 0 min und 180 min nach der anfänglichen Aktivierung eine Hemmung zurück auf das Ausgangsniveau. Eine Ausnahme bildet Proband E, dessen Neutrophile sowohl bei Testbier 1 als auch beim Kontrollbier nach dem gleichen Muster reagieren und nach 180 min ein signifikant höheres Aktivierungsniveau im Vergleich zu 0 min erreichen. Auch bei den Probanden A, B, C und F ist diese Tendenz einer Aktivierung 180 min nach Genuß des Kontrollbieres zu beobachten.

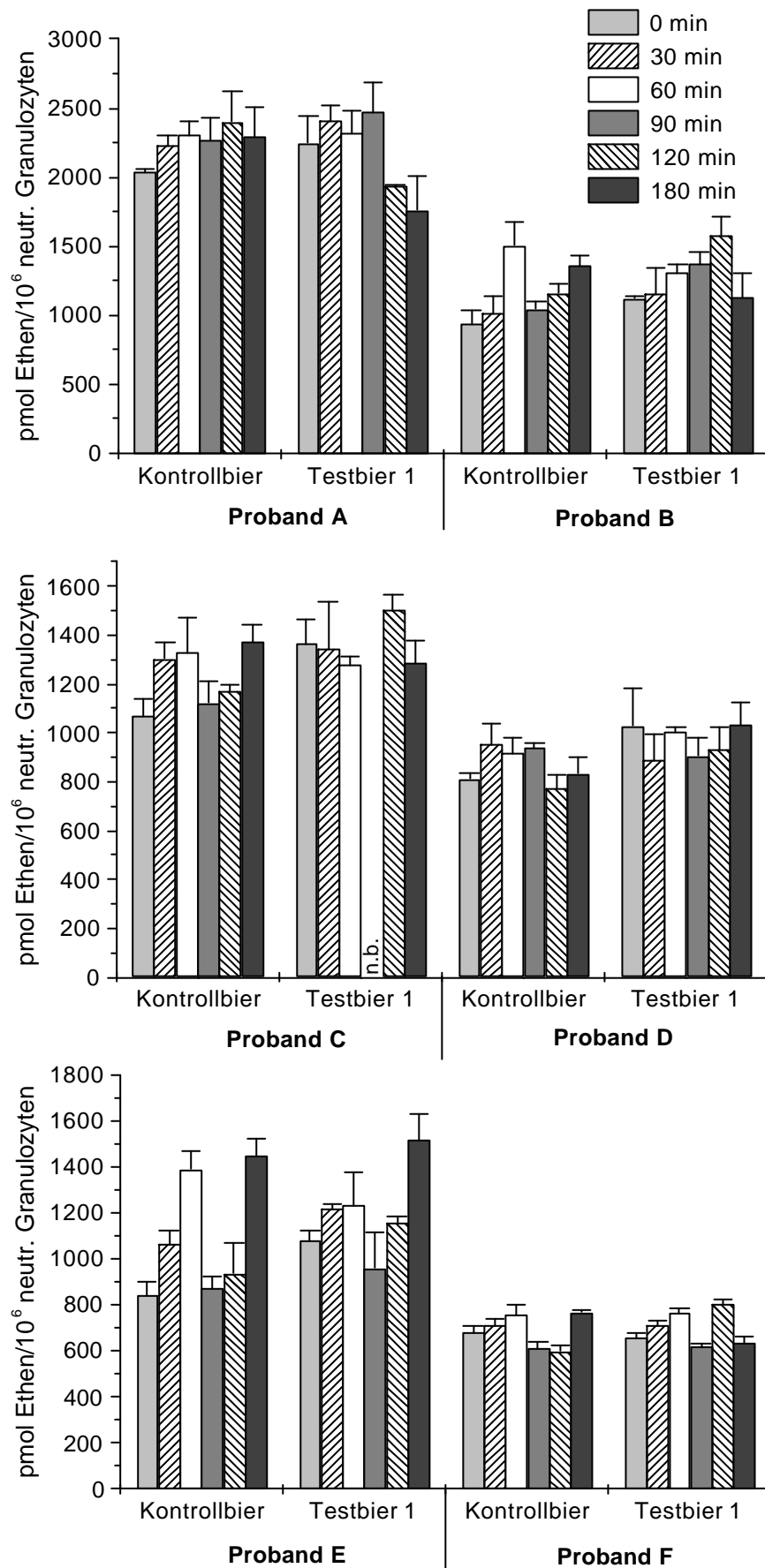


Abbildung 55: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten der Probanden aus Trinkstudie 1 im Vollblut-System

Tabelle 46: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten der Probanden aus Trinkstudie 1 im Vollblut-System

Proband	Bier	pmol Ethen/10 ⁶ neutrophile Granulozyten					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	2037 ± 26	2230 ± 78	2306 ± 105	2267 ± 163	2399 ± 220	2289 ± 216
	Testbier 1	2249 ± 198	2405 ± 110	2317 ± 162	2467 ± 218	1929 ± 11	1760 ± 243
B	Kontrollbier	934 ± 107	1013 ± 126	1505 ± 174	1045 ± 58	1160 ± 66	1356 ± 75
	Testbier 1	1121 ± 15	1150 ± 196	1307 ± 60	1371 ± 83	1577 ± 139	1129 ± 171
C	Kontrollbier	1070 ± 70	1304 ± 63	1328 ± 144	1122 ± 87	1168 ± 27	1374 ± 68
	Testbier 1	1365 ± 97	1342 ± 196	1277 ± 34	n.b.	1501 ± 62	1287 ± 91
D	Kontrollbier	812 ± 21	952 ± 85	917 ± 64	938 ± 18	774 ± 55	832 ± 72
	Testbier 1	1027 ± 155	889 ± 103	1005 ± 16	906 ± 73	933 ± 88	1033 ± 93
E	Kontrollbier	842 ± 54	1062 ± 60	1388 ± 75	871 ± 53	936 ± 130	1445 ± 73
	Testbier 1	1077 ± 48	1215 ± 22	1232 ± 141	957 ± 157	1154 ± 28	1512 ± 112
F	Kontrollbier	680 ± 31	706 ± 35	758 ± 42	611 ± 29	598 ± 24	766 ± 14
	Testbier 1	655 ± 19	707 ± 28	765 ± 21	616 ± 12	800 ± 20	632 ± 34

3.2.1.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Die Freisetzung von Ethen aus dem Indikatormolekül KMB korreliert mit der Bildung der in diesem Testsystem produzierten ROS. Die maximale ROS-Bildung wurde in der Kontrollreaktion ohne den Zusatz von Plasma bestimmt und entspricht 100%. In **Abbildung 56** beziehungsweise **Tabelle 47** ist die antioxidative Kapazität des Plasmas der sechs Probanden in Form der gemessenen Ethenwerte prozentual zur Kontrollreaktion dargestellt, wobei eine niedrigere Ethenmenge eine höhere antioxidative Aktivität bedeutet. Es zeigte sich eine individuelle Aktivität des Plasmas sowohl zwischen den einzelnen Probanden als auch zwischen den einzelnen Versuchstagen bei den gleichen Probanden. So wies das Plasma von Proband A am zweiten Versuchstag ein von Haus aus schlechtes antioxidatives Potential auf. Die dem Testsystem zugesetzten 300 µl Plasma hemmten die Grundreaktion nur um etwa 10%. Das Plasma von Proband E zeigte ebenfalls eine geringe Aktivität in diesem System und wirkte zu Beginn des Kontrollbier-Studientages sogar leicht prooxidativ, d.h. die Reaktion wurde durch den Zusatz des Plasmas sogar etwas stimuliert.

Eine stark orange bis rote Färbung der Plasmaproben wiesen auf eine Hämolyse bei der Blutabnahme hin. Durch die Zerstörung von Erythrozyten wird Hämoglobin freigesetzt, welches das X/XOD- und Fenton-System hemmt, indem es unter Bildung einer sogenannten Pseudo-Peroxidase H₂O₂ bindet. Dadurch wird die Freisetzung von Ethen aus KMB gehemmt und es würde sich eine falsch positive Erhöhung des antioxidativen Potentials ergeben. Deshalb wurden die Werte der Probanden A 120 min und C 180 min (Kontrollbier) und C 90 min, C 120 min und D 120 min (Testbier 1) herausgenommen.

Generell besteht bei allen Plasmaproben eine mehr oder weniger starke Zunahme des antioxidativen Potentials nach dem Trinken des Kontrollbieres sowie des Testbieres 1 nach 30 min, spätestens nach 60 min. Außer bei den Probanden B und C, die nach einer Erhöhung der antioxidativen Aktivität 180 min nach dem Trinken von Testbier 1 wieder das Ausgangsniveau erreichen, ist das antioxidative Potential in den übrigen Plasmaproben im Vergleich zum 0 min-Wert (soweit vorhanden) nach 180 min definitiv erhöht. Dabei scheint diese Erhöhung um so größer zu sein, je geringer die antioxidative Kapazität des Plasmas vor dem Trinken war. So war bei den Probanden A, E und F mit den niedrigsten gemessenen antioxidativen Potentialen (Ausgangswerte 91% [A Testbier], 108%

[E Kontrollbier] und 88% Ethen [F Testbier]) die Reduktion der Ethenmenge um jeweils 26%, 19% und 18% nach 180 min am größten.

Im Gegensatz dazu erreichten die Plasmaproben der Probanden B, D und C mit dem höchsten antioxidativen Potential (51% [B Testbier], 53% [D Kontrollbier] und 59% Ethen [C Testbier]) nach 180 min wieder den Level der Ausgangswerte mit 53%, 50% und 59% Ethen. Eine maximale Erhöhung der Aktivität um ca. 15% war bei den Probanden C und D 120 min nach dem Trinken des Kontrollbieres zu beobachten.

Insgesamt ergab sich ein relativ uneinheitliches Bild, wobei über den gesamten Beobachtungszeitraum gesehen die antioxidative Kapazität bei vier (Proband A, D, E und F) der sechs Probanden nach dem Trinken von Testbier 1 zunahm, während bei vier Probanden (A, B, D und F) die antioxidative Kapazität nach dem Trinken des Kontrollbieres unverändert blieb.

Tabelle 47: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 1 im X/XOD-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	-	-	59 ± 3	55 ± 3	Hämolyse	55 ± 4
	Testbier 1	91 ± 3	80 ± 4	87 ± 5	76 ± 5	65 ± 10	65 ± 4
B	Kontrollbier	63 ± 5	64 ± 5	60 ± 3	65 ± 3	71 ± 4	53 ± 5
	Testbier 1	51 ± 0	44 ± 3	75 ± 3	51 ± 5	52 ± 2	53 ± 4
C	Kontrollbier	52 ± 2	46 ± 3	40 ± 1	36 ± 3	37 ± 2	Hämolyse
	Testbier 1	59 ± 5	57 ± 1	45 ± 2	Hämolyse	Hämolyse	59 ± 3
D	Kontrollbier	53 ± 3	54 ± 4	43 ± 1	49 ± 2	36 ± 2	50 ± 2
	Testbier 1	72 ± 2	69 ± 4	71 ± 6	64 ± 5	Hämolyse	60 ± 2
E	Kontrollbier	108 ± 4	103 ± 4	97 ± 5	90 ± 3	90 ± 7	89 ± 1
	Testbier 1	96 ± 9	98 ± 10	94 ± 3	101 ± 1	88 ± 10	88 ± 3
F	Kontrollbier	64 ± 1	47 ± 3	56 ± 5	63 ± 3	51 ± 2	58 ± 5
	Testbier 1	88 ± 6	87 ± 3	73 ± 6	75 ± 5	78 ± 9	70 ± 7

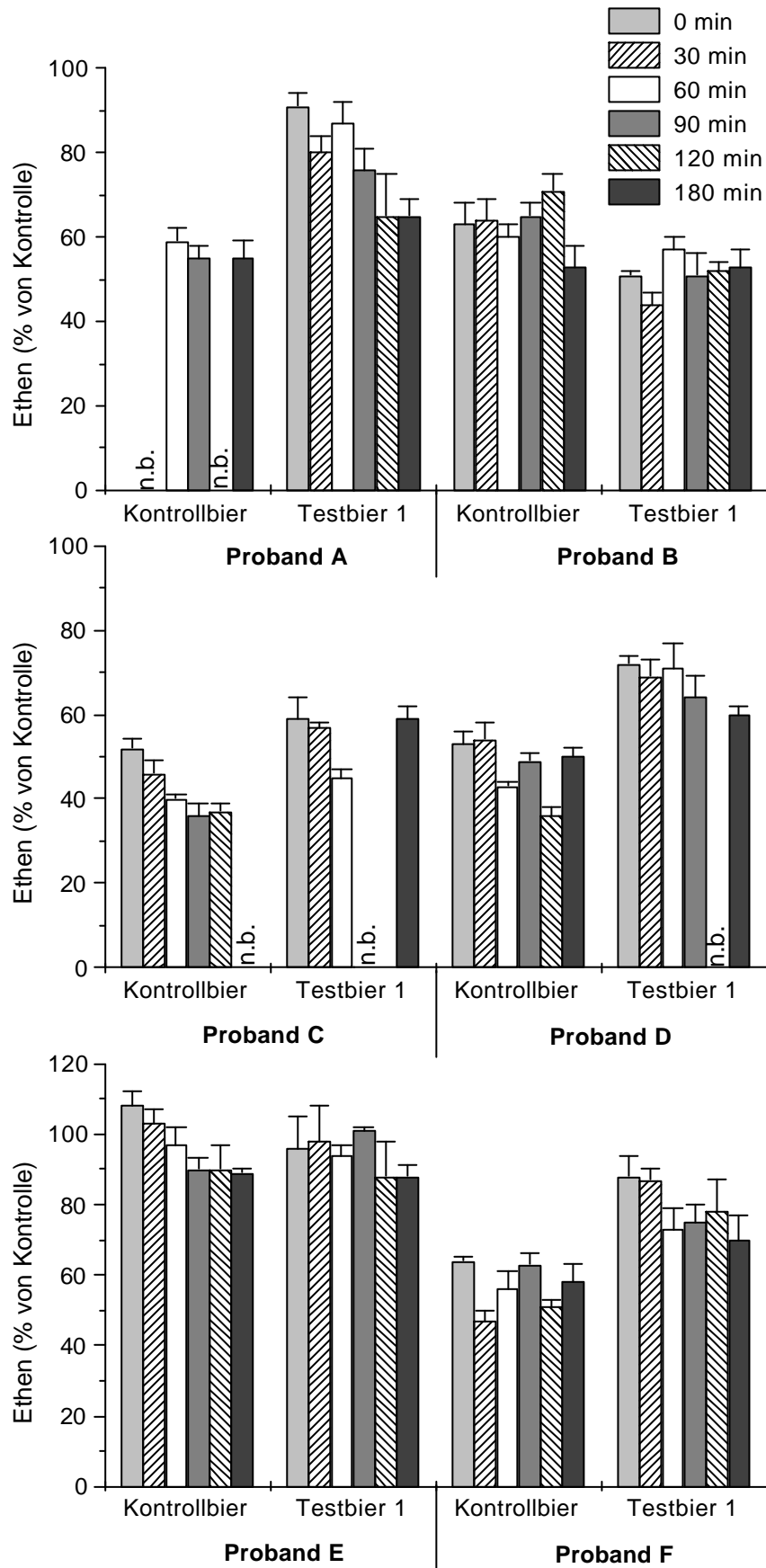


Abbildung 56: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 1 im X/XOD-System

3.2.1.1.4. Fenton-System

In diesem Testsystem wird H₂O₂ in Gegenwart von Eisen unter Generierung von Hydroxylradikalen reaktiv gespalten. Gemäß des ermittelten IC₅₀-Wertes wurden jeweils 100 µl Plasma der sechs Probanden eingesetzt und die Produktion von Ethen aus KMB als Maß für die antioxidative Kapazität des Plasmas gemessen. Auch hier gilt, daß ein niedrigerer Ethenwert eine höheres antioxidatives Potential bedeutet. Die ermittelten Ethenwerte sind in **Abbildung 57** beziehungsweise in **Tabelle 48** dargestellt.

Wie schon im X/XOD-System mußten die Werte der Probanden A 120 min und C 180 min (Kontrollbier) sowie C 90 min, C 120 min und D 120 min (Testbier 1) herausgenommen werden, weil die Plasmaproben hämolytisch waren.

Mit Ausnahme der Zeitreihe von Proband A nach dem Genuß des Kontrollbieres zeigt sich bei allen anderen Probanden sowohl nach dem Trinken des Kontrollbieres als auch des Testbieres eine mehr oder weniger starke Zunahme der antioxidativen Kapazität des Plasmas im Vergleich zur Kontrolle (0 min). Es läßt sich aber aus den vorliegenden Werten kein generelles Schema bezüglich des Zeitpunktes, zu welchem die maximale antioxidative Kapazität erreicht wird, ableiten. Die maximalen Zunahmen der antioxidativen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle bewegen sich zwischen 2% bei Proband F (Testbier 1) und 20% bei Proband C (Testbier 1).

Tabelle 48: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 1 im Fenton-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	45 ± 5	47 ± 5	47 ± 2	54 ± 9	Hämolyse	60 ± 4
	Testbier 1	51 ± 7	50 ± 9	46 ± 10	45 ± 9	47 ± 9	43 ± 10
B	Kontrollbier	57 ± 7	54 ± 2	54 ± 9	50 ± 6	51 ± 6	55 ± 9
	Testbier 1	65 ± 10	48 ± 7	67 ± 10	53 ± 8	49 ± 6	52 ± 6
C	Kontrollbier	49 ± 1	36 ± 4	33 ± 2	34 ± 3	36 ± 10	Hämolyse
	Testbier 1	66 ± 6	64 ± 5	46 ± 3	Hämolyse	Hämolyse	54 ± 4
D	Kontrollbier	38 ± 4	35 ± 2	24 ± 4	25 ± 3	27 ± 2	36 ± 3
	Testbier 1	73 ± 7	68 ± 6	63 ± 4	61 ± 7	Hämolyse	69 ± 6
E	Kontrollbier	57 ± 6	49 ± 4	51 ± 3	48 ± 3	49 ± 3	51 ± 5
	Testbier 1	60 ± 8	51 ± 4	53 ± 2	49 ± 3	42 ± 6	51 ± 4
F	Kontrollbier	52 ± 7	49 ± 2	57 ± 6	55 ± 4	46 ± 2	52 ± 6
	Testbier 1	48 ± 6	46 ± 4	52 ± 1	53 ± 10	46 ± 7	48 ± 6

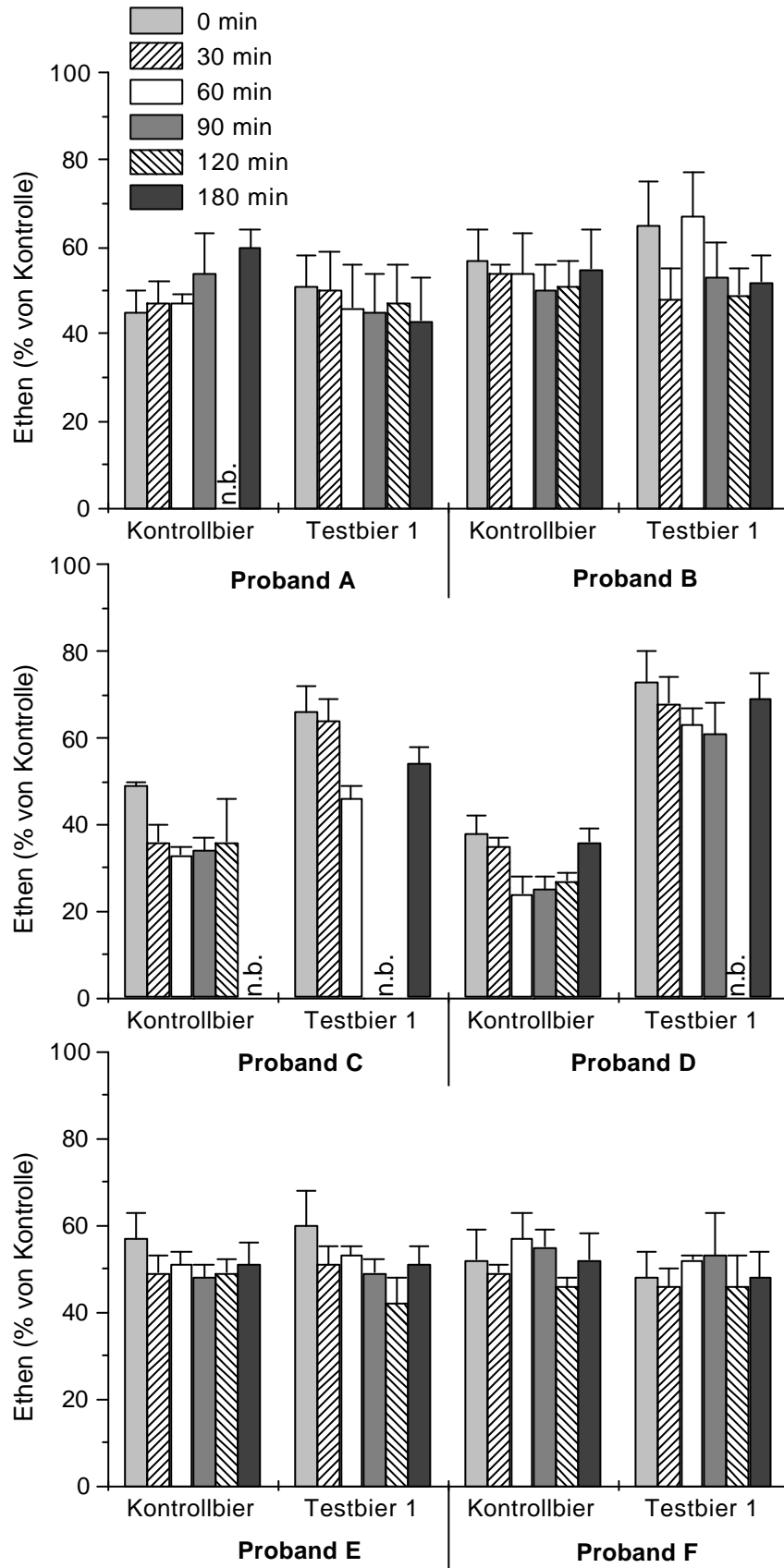


Abbildung 57: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 1 im Fenton-System

3.2.1.1.5. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System

Das Plasma der sechs Probanden wurde im DHF/Cu-System zur Untersuchung möglicher kupferkomplexierender Eigenschaften eingesetzt, die durch die Anreicherung der Maische-Fraktion in Testbier 1 erzielt werden sollte. Die in **Tabelle 49** aufgelisteten Prozent-Ethen-Werte zeigen jedoch innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 180 min keine signifikanten Änderungen, die auf eine erhöhte Kupferkomplexierung durch das Trinken des Bieres schließen läßt.

Tabelle 49: Einfluß des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 1 nach dem Genuß von Kontrollbier und Testbier 1 auf das DHF/Cu-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	-	-	51 ± 4	44 ± 3	42 ± 3	44 ± 4
	Testbier 1	43 ± 2	42 ± 5	47 ± 3	43 ± 2	48 ± 2	43 ± 3
B	Kontrollbier	41 ± 3	43 ± 2	41 ± 2	41 ± 3	42 ± 2	47 ± 3
	Testbier 1	45 ± 3	44 ± 2	44 ± 2	44 ± 3	46 ± 3	43 ± 4
C	Kontrollbier	45 ± 2	45 ± 4	47 ± 3	48 ± 2	46 ± 2	42 ± 4
	Testbier 1	47 ± 4	49 ± 4	51 ± 5	49 ± 3	44 ± 4	46 ± 3
D	Kontrollbier	44 ± 2	46 ± 3	40 ± 4	41 ± 3	41 ± 2	40 ± 4
	Testbier 1	45 ± 5	45 ± 4	44 ± 3	46 ± 4	45 ± 4	45 ± 7
E	Kontrollbier	43 ± 3	44 ± 6	45 ± 4	46 ± 4	41 ± 4	45 ± 3
	Testbier 1	52 ± 10	52 ± 7	55 ± 4	45 ± 3	46 ± 7	44 ± 4
F	Kontrollbier	41 ± 3	44 ± 4	46 ± 3	46 ± 5	43 ± 4	39 ± 6
	Testbier 1	47 ± 7	44 ± 6	48 ± 4	44 ± 6	45 ± 4	44 ± 6

3.2.1.1.6. Proteingehalt im Plasma

Es ist bekannt, daß auch Proteine wie das Serumalbumin zum antioxidativen Potential des Plasmas beitragen. Um mögliche Effekte bezüglich der antioxidativen Kapazität auf veränderte Proteingehalte im Plasma ausschließen zu können, wurde mit Hilfe des Bradford-Assays die Konzentration der Proteine in den einzelnen Plasmaproben bestimmt. Wie aus **Tabelle 50** ersichtlich ist, blieben die Werte der Plasmaproteine innerhalb der Standardabweichungen konstant.

Tabelle 50: Proteingehalt im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 1

Proband	Bier	Proteingehalt im Plasma (mg/ml)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	n.b.	n.b.	58,3 ± 1,4	59,3 ± 1,2	63,6 ± 2,2	60,3 ± 0,8
	Testbier 1	53,0 ± 0,8	55,6 ± 1,7	54,0 ± 3,5	53,0 ± 2,2	55,2 ± 2,0	53,4 ± 4,5
B	Kontrollbier	61,8 ± 0,5	58,3 ± 2,6	60,1 ± 3,7	58,7 ± 2,1	61,8 ± 1,8	56,8 ± 1,0
	Testbier 1	49,0 ± 2,4	48,0 ± 4,7	52,1 ± 3,4	49,0 ± 5,3	51,6 ± 2,4	52,5 ± 1,5
C	Kontrollbier	54,8 ± 2,9	57,3 ± 1,5	55,7 ± 0,8	53,0 ± 3,1	58,5 ± 2,8	59,0 ± 1,2
	Testbier 1	50,8 ± 2,3	49,0 ± 1,3	53,3 ± 1,1	48,5 ± 1,6	48,6 ± 1,4	51,1 ± 1,6
D	Kontrollbier	58,0 ± 1,5	59,0 ± 3,0	60,1 ± 1,7	59,8 ± 2,3	58,3 ± 3,7	59,6 ± 2,9
	Testbier 1	49,9 ± 1,8	47,2 ± 1,2	49,8 ± 1,9	51,4 ± 1,4	50,1 ± 1,4	49,6 ± 2,4
E	Kontrollbier	56,8 ± 0,3	56,2 ± 3,8	56,7 ± 1,7	55,2 ± 2,8	59,5 ± 2,4	57,2 ± 0,4
	Testbier 1	50,1 ± 1,7	49,4 ± 1,7	50,1 ± 2,1	51,3 ± 4,0	47,9 ± 1,4	51,9 ± 3,1
F	Kontrollbier	61,3 ± 3,5	57,8 ± 0,7	60,8 ± 1,9	62,9 ± 1,8	61,1 ± 2,0	57,3 ± 2,4
	Testbier 1	53,5 ± 2,8	46,2 ± 0,8	52,4 ± 2,8	51,4 ± 2,0	50,2 ± 1,0	53,1 ± 0,8

3.2.1.1.7. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

In diesem Testsystem konnte kein signifikanter LDL-Oxidationsschutz in vivo festgestellt werden. Das LDL wurde jeweils aus dem Plasma der Probanden isoliert und einer kupferinduzierten Oxidation unterzogen. In **Tabelle 51** sind die Lag-Phasen dieser LDL-Oxidationen aufgelistet. Auch bezüglich der maximalen Dienbildungsrate konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

Tabelle 51: Einfluß von Kontrollbier und Testbier 1 auf die Lag-Phasen des aus dem Plasma der sechs Probanden aus Trinkstudie 1 extrahierten LDL bei der kupferinduzierten Oxidation

Proband	Bier	Lag-Phase (min)					
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
A	Kontrollbier	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Testbier 1	91	106	105	93	106	93
B	Kontrollbier	89	99	96	96	102	105
	Testbier 1	106	101	101	112	105	105
C	Kontrollbier	109	113	107	110	107	107
	Testbier 1	83	84	84	85	83	94
D	Kontrollbier	71	71	71	71	69	71
	Testbier 1	79	79	79	81	84	79
E	Kontrollbier	106	108	106	115	113	106
	Testbier 1	99	109	95	105	105	117
F	Kontrollbier	88	88	95	100	88	97
	Testbier 1	93	93	85	85	85	92

3.2.1.2. Ex vivo-Untersuchungen

Analog zu den „in vivo“-Untersuchungen des Vollblutes, des Plasmas und des LDL der Probanden aus Trinkstudie 1 wurde das Bier mit Kombinationen aus den verschiedenen Zusätzen „ex vivo“ getestet. Das dabei verwendete Plasma bzw. LDL stammte aus einem Plasmapool; das Vollblut wurde von einem Studien-unabhängigen Probanden gespendet.

3.2.1.2.1. Vollblut-System

Diese Untersuchungen wurden mit dem Blut eines Spenders durchgeführt. Da sich hierbei die Anzahlen der neutrophilen Granulozyten nicht ändern können, wurde auf eine Bestimmung der Anzahl der Neutrophilen im Vollblut verzichtet.

In **Abbildung 58** beziehungsweise **Tabelle 52** sind die Ethenbildungsraten der Konzentrationsreihen des Bieres mit den jeweils verschiedenen Zusätzen dargestellt. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,05% im Ansatz kam es tendenziell, jedoch innerhalb der Standardabweichungen, zu einer leichten Stimulierung durch das Bier in An- und Abwesenheit der Zusätze, die bereits unter 3.1.7. zu beobachten war. Die anderen Konzentrationen zeigten keinen Effekt.

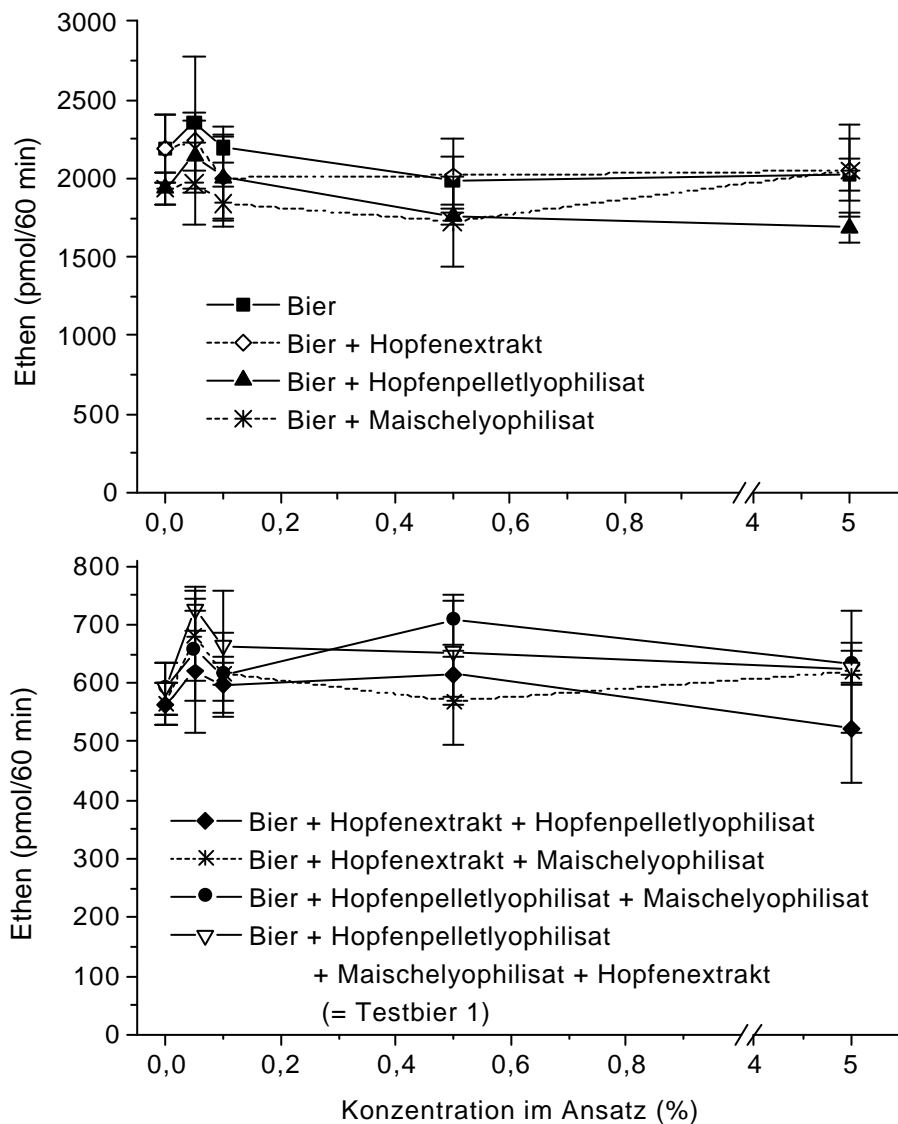


Abbildung 58: Einfluß von Bier und Bierzusätzen auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

Tabelle 52: Einfluß von Bier und Bierzusätzen auf die Ethenfreisetzung im Vollblut-System

	pmol Ethen/60 min				
	0,00 % i.A.	0,05 % i.A.	0,10 % i.A.	0,50 % i.A.	5,00 % i.A.
Bier	2189 ± 212	2359 ± 420	2196 ± 90	1989 ± 150	2027 ± 106
Bier + Hopfenextrakt	2189 ± 212	2237 ± 181	2006 ± 262	2018 ± 230	2052 ± 298
Bier + Hopfenpellettyophilisat	1938 ± 101	2144 ± 231	2008 ± 320	1756 ± 46	1689 ± 97
Bier + Maischelyophil.	1938 ± 101	1969 ± 259	1840 ± 103	1726 ± 281	2054 ± 194
Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpellettyophilisat	564 ± 36	619 ± 104	597 ± 48	616 ± 39	522 ± 92
Bier + Hopfenextrakt + Maischelyophil.	564 ± 36	680 ± 76	616 ± 20	569 ± 75	619 ± 104
Bier + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophil.	591 ± 44	657 ± 86	615 ± 73	709 ± 43	634 ± 35
Bier + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophil. + Hopfenextrakt (= Testbier 1)	591 ± 44	727 ± 39	663 ± 93	652 ± 90	625 ± 30

3.2.1.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Unbeeinflusstes Plasma aus dem Plasmapool wurde mit Hellem Bier und den Bierzusätzen in den Konzentrationen, wie sie in Testbier 1 vorlagen, in verschiedenen Kombinationen ([1] – [8], siehe **Tabelle 53**) für 90 min bei 37 °C vorinkubiert (jeweils 2,5 ml Plasma + 0,5 ml Bier bzw. 5,0%ige EtOH-Lösung) und in die Testsysteme X/XOD, Fenton und DHF/Cu eingesetzt. Dabei wurde die EtOH-Konzentration in den Vorinkubationsansätzen ohne den ethanolisch gelösten Hopfenextrakt durch Zugabe von EtOH konstant gehalten.

In dieses Testsystem wurden jeweils 300 µl der vorinkubierten Plasma-Bier-Gemische [1] – [8] eingesetzt. Wie aus **Tabelle 53** ersichtlich ist, wurde alleine durch das aus dem Plasmapool stammende Plasma die Ethenfreisetzung auf 38% der Kontrollreaktion gehemmt. Durch den Zusatz von Hellem Bier zum Plasma erhöhte sich das antioxidative Potential um weitere 12% auf eine niedrigere Restaktivität von 26%. Bei den Biervarianten, die das Maischelyophilisat enthielten, waren niedrigere Ethen-Bildungsraten zwischen 16 und 19% Ethen zu messen (**Abb. 59**). Diese Erhöhung der antioxidativen Kapazität ist demnach eindeutig auf das Maischelyophilisat zurückzuführen, welches durch den Zusatz von Hopfenextrakt oder Hopfenpellettyophilisat nicht wesentlich in seiner Aktivität beeinflusst wurde.

Tabelle 53: Einfluß des vorinkubierten Plasma-Bier-Gemisches auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Kontrolle	100 ± 9
Plasma + ethanolische Lösung (5,0%)	38 ± 3
Plasma + Bier [1]	26 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt [2]	26 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenpellettyophilisat [3]	26 ± 2
Plasma + Bier + Maischelyophilisat [4]	19 ± 1
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpellettyophilisat [5]	22 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Maischelyophilisat [6]	16 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophilisat [7]	19 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophilisat (= Testbier 1) [8]	18 ± 1

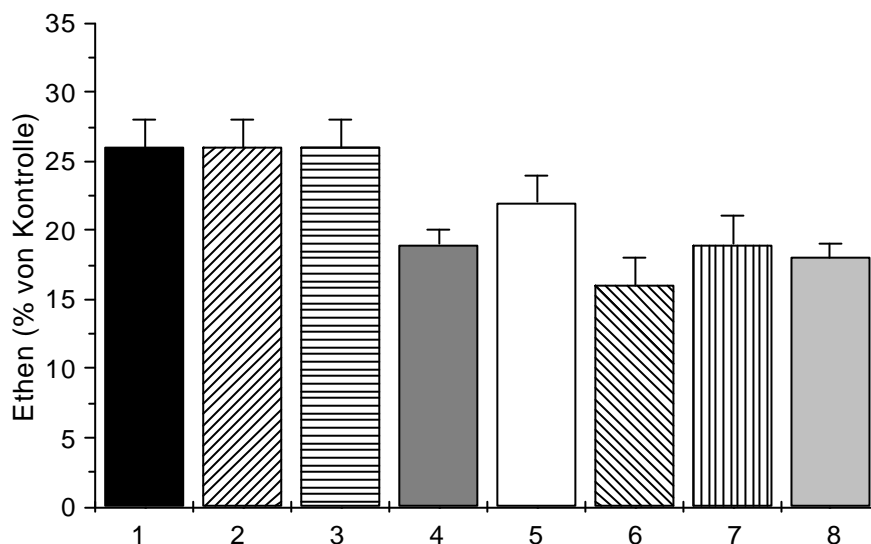


Abbildung 59: Einfluß der vorinkubierten Plasma-Bier-Gemische auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

3.2.1.2.3. Fenton-System

Im Fenton-System zeigten sich nach Zugabe von 100 µl der vorinkubierten Plasma-Bier-Gemische keine signifikanten Unterschiede in der Ethenfreisetzung (**Tab. 54**).

Tabelle 54: Einfluß des vorinkubierten Plasma-Bier-Gemisches auf die Ethenfreisetzung im Fenton-System

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Kontrolle	100 ± 5
Plasma + ethanolische Lösung (5,0%)	23 ± 1
Plasma + Bier	23 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt	21 ± 1
Plasma + Bier + Hopfenpelletlyophilisat	22 ± 1
Plasma + Bier + Maischelyophilisat	19 ± 1
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpelletlyophilisat	22 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Maischelyophilisat	21 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenpelletlyophilisat + Maischelyophilisat	23 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpelletlyophilisat + Maischelyophilisat (= Testbier 1)	23 ± 1

3.2.1.2.4. Dihydroxyfumarsäure/Kupfer-System

Durch eine Komplexierung des Kupfers im System wird die Autoxidation der Dihydroxyfumarsäure und damit auch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies vermindert und dementsprechend weniger Ethen aus KMB freigesetzt. Im DHF/Cu-System wurden 4 µl des mit Bier angereicherten Plasmas eingesetzt. In **Tabelle 55** sind die den verschiedenen Bierkombinationen zugehörigen Ethenwerte aufgelistet. Innerhalb der Standardabweichungen lagen alle Werte auf einem Niveau und es waren keine Unterschiede festzustellen, die auf eine Kupferkomplexierung hinweisen würden. Offensichtlich ist die Konzentration des vor allem in der Maische enthaltenen Kupferkomplexators zu gering. Eine Überprüfung des Maische-Lyophilisats im Vorfeld ergab keinen Aktivitätsverlust hinsichtlich der Kupferkomplexierung durch die Herstellung (10minütiges Kochen und Lyophilisieren).

Tabelle 55: Einfluß des vorinkubierten Plasma-Bier-Gemisches auf die Ethenfreisetzung im DHF/Cu-System

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Kontrolle	100 ± 5
Plasma + ethanolische Lösung (5,0%)	48 ± 5
Plasma + Bier	46 ± 2
Plasma + Bier + Hopfenextrakt	46 ± 4
Plasma + Bier + Hopfenpelletlyophilisat	48 ± 3
Plasma + Bier + Maischelyophilisat	45 ± 6
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpelletlyophilisat	47 ± 4
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Maischelyophilisat	44 ± 4
Plasma + Bier + Hopfenpelletlyophilisat + Maischelyophilisat	45 ± 4
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpelletlyophilisat + Maischelyophilisat (= Testbier 1)	44 ± 2

3.2.1.2.5. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Aus dem mit Bier und Bierzusätzen vorinkubierten Plasma wurde ebenfalls LDL isoliert und einer kupferinduzierten LDL-Oxidation unterworfen. Mit Ausnahme des mit Bier/Hopfenextrakt inkubierten Plasmas konnte in keinem dieser Ansätze ein Oxidationsschutz des LDL anhand einer signifikant verlängerten Lag-Phase festgestellt werden (**Tab. 56**). Mit der Kombination Bier/Hopfenextrakt wurde eine Verlängerung der Lag-Phase um 15 min auf 112 min im Vergleich zur Kontrolle mit 97 min erreicht.

Tabelle 56: Lag-Phasen des extrahierten LDL aus dem mit Bier und Bierzusätzen vorinkubierten Plasma bei der kupferinduzierten Oxidation

Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Plasma + ethanolische Lösung (5,0%)	97
Plasma + Bier	102
Plasma + Bier + Hopfenextrakt	112
Plasma + Bier + Hopfenpellettyophilisat	102
Plasma + Bier + Maischelyophilisat	97
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpellettyophilisat	100
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Maischelyophilisat	100
Plasma + Bier + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophilisat	105
Plasma + Bier + Hopfenextrakt + Hopfenpellettyophilisat + Maischelyophilisat (= Testbier 1)	99

3.2.1.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 1

In dieser Studie sollte getestet werden, ob eine Anreicherung von Rohstoffkomponenten, die sich *in vitro* durch ihre antioxidativen und immunmodulierenden Eigenschaften hervorgehoben haben, im Bier nach dessen Konsum auch eine physiologische Wirkung zeigen. Dazu wurde Hellem Bier ein Maischelyophilisat, ein Hopfenpellet-Lyophilisat und Hopfenextrakt zugesetzt (= Testbier 1) und dieses Bier im Vergleich zum Kontrollbier ohne diese Zusätze konsumiert. Der Beobachtungszeitraum nach dem Trinken erstreckte sich dabei über 180 min.

Hinsichtlich der Wirkung des Testbieres 1 auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut und deren Aktivität war nach dem Konsum des Kontrollbieres eher eine Abnahme der Neutrophilenanzahlen im Blut zu beobachten, während nach dem Konsum von Testbier 1 eher ein leichter Anstieg der Immunzellen zu verzeichnen war. Bezüglich der Aktivität der neutrophilen Granulozyten zeigte sich eine tendenzielle Stimulierung bis 60 min nach dem Trinken beider Biere, die auch im „*ex vivo*“-Versuch durch das Helle Bier mit und ohne den Zusätzen im Niedrigkonzentrationsbereich ausgelöst wurde. Diese Stimulierung hielt nach dem Konsum des Kontrollbieres etwas länger an, während nach dem Konsum von Testbier 1 die Aktivität der Neutrophilen bei den meisten Probanden nach 180 min wieder auf das Ausgangsniveau zurückfiel.

Sowohl nach dem Konsum des Kontrollbieres als auch des angereicherten Testbieres 1 war im X/XOD-System nach 30 min, spätestens aber nach 60 min, ein tendenzieller bis deutlicher Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas zu messen. Nach 180 min war diese Erhöhung nach mehr oder weniger starken Schwankungen bei fast allen Probanden immer noch deutlich meßbar. Über den gesamten Versuchszeitraum von 180 min gesehen zeigte das antioxidative Potential des Plasmas durch die zugesetzten Bierinhaltsstoffe in Testbier 1 eher die Tendenz einer gleichmäßigen Erhöhung im Vergleich zum Kontrollbier.

Auch im Fenton-System konnte eine tendenzielle Zunahme des antioxidativen Potentials des Plasmas beobachtet werden, wobei sich auch hier zwischen den beiden Biere kein Unterschied in der Wirkung zeigte. In diesen beiden Testsystemen waren „*ex vivo*“ auch nur die Plasma-Bier-Gemische, die das Maischelyophilisat enthielten, in geringem Maße wirksamer als das Kontrollbier.

Trotz des angereicherten Maischelyophilisats mit seinen kupferkomplexierenden Eigenschaften war bis 180 min nach dem Trinken von Testbier 1 im DHF/Cu-System keine höhere Kupferkomplexierung im Plasma nachzuweisen. Auch das vorinkubierte Plasma-Bier-Gemisch führte „*ex vivo*“ zu keiner signifikanten Änderung der Ethenfreisetzung in diesem System.

Weiterhin waren keine Veränderungen der Blutwerte oder des Plasma-Proteingehaltes sowohl durch das Testbier 1 als auch durch das Kontrollbier zu beobachten.

Durch den einmaligen Konsum von 500 ml Bier war kein kurzfristig aufgebauter LDL-Schutz nachzuweisen, auch nicht durch die Zusätze in Testbier 1. Aus den „*ex vivo*“-Untersuchungen mit dem aus den Plasma-Bier-Gemischen isoliertem LDL konnte ebenfalls kein direkter Oxidationsschutz beobachtet werden.

Die Maische- und Hopfenzusätze im Bier entsprachen damit in ihren Wirkungen nicht ganz den Erwartungen. Die beiden einzigen Unterschiede zwischen dem Testbier 1 mit seinen Zusätzen und dem Kontrollbier konnten tendenziell im X/XOD-System und bezüglich der Anzahl der Neutrophilen im Blut festgestellt werden (siehe oben).

Um die physiologischen Wirkungen von gebrauten Bier mit einem höheren Rohstoffgehalt untersuchen zu können, wurden in einer nächsten Stufe von der Paulaner Brauerei Testbiere nach dem Reinheitsgebot gebraut. Dabei wies ein Bier einen höheren Stammwürzegehalt auf (Testbier 2, Salvator), während Testbier 3 mit einem höheren Hopfenanteil hergestellt wurde. Diese beiden Testbiere sollten im Vergleich zum Kontrollbier in Trinkstudie 2 getestet werden und über einen längeren Zeitraum von 14 Tagen getrunken werden, um möglicherweise längerfristige Effekte, wie zum Beispiel Anreicherungen im Plasma oder im LDL, beobachten zu können.

3.2.2. Trinkstudie 2

In den ursprünglichen in vitro-Untersuchungen hoben sich die Hopfen- und Maischeinhaltsstoffe als Komponenten mit antioxidativen und immunmodulierenden Eigenschaften hervor.

In dieser Trinkstudie sollten nun, im Gegensatz zu Trinkstudie 1 mit den selbst hergestellten Bierzusätzen, die Effekte von gebrauten Bieren in vivo unter normalen Trinkgewohnheiten getestet werden. Dabei zeichnete sich Testbier 2 (Alkoholgehalt 5,0%) durch einen höheren Stammwürzegehalt aus, während Testbier 3 (Alkoholgehalt 5,4%) einen erhöhten Hopfengehalt aufwies. Diese von der Paulaner Brauerei gebrauten Biere wurden hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf das antioxidative Potential von Plasma sowie auf die Immunmodulation von neutrophilen Granulozyten im Vollblut mit der Wirksamkeit von Hellem Bier als Kontrollbier (Alkoholgehalt 4,9%) verglichen.

An der Studie nahmen sechs Probanden teil, wobei je zwei Probanden über einen Zeitraum von 14 Tagen jeden Abend 500 ml eines der drei Bieres tranken, um eine mögliche Anreicherung von antioxidativ wirksamen Substanzen im Plasma oder im LDL untersuchen zu können. Da diese Studie als eine Pilotstudie betrachtet wurde, die erst bei augenfälligen Ergebnissen eine Überprüfung an einer höheren Zahl von Probanden unter geregelten Bedingungen nach sich ziehen sollte, wurde über den Versuchszeitraum nur ein genaues Ernährungsprotokoll geführt und keine besondere Diät eingehalten.

Am ersten Tag der Studie wurde vormittags unmittelbar vor dem Trinken des jeweiligen Bieres Blut als Kontrollwert abgenommen und sowohl 30 min als auch 60 min nach Beginn des Trinkens weitere Blutabnahmen durchgeführt. Nach 24 h folgte eine weitere Blutabnahme am Vormittag und ab dem Abend dieses zweiten Studientages wurde jeweils ein Bier pro Tag getrunken. Die Studie wurde am Vormittag mit einer Blutabnahme nach 14 Tagen Biertrinken beendet (Studiendesign siehe **2.2.3.2.**).

3.2.2.1. In vivo-Untersuchungen

Wie in Trinkstudie 1 wurden auch hier bei jeder Blutabnahme die Blutwerte der Probanden durch ein medizinisches Labor bestimmt. Unmittelbar nach den Blutabnahmen wurden jeweils die Versuche im Vollblut-System zur Bestimmung der Aktivität der zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Das gewonnene Plasma wurde biochemisch im X/XOD- und im Fenton-System auf seine antioxidative Kapazität getestet sowie auf den Proteingehalt und den lipophilen Antioxidantiengehalt untersucht. Das aus dem Plasma isolierte LDL wurde einer kupferinduzierten Oxidation unterzogen und die endogenen Antioxidantiengehalte in diesem LDL bestimmt.

3.2.2.1.1. Blutwerte

Unabhängig davon, welches Bier konsumiert wurde, war der LDL/HDL-Quotient am Ende der Studie bei vier der sechs Probanden gesunken, was wohl auf einen EtOH-Effekt zurückzuführen ist. Bei Proband A [Testbier 2] verbesserte sich dieser Wert von 1,8 auf 1,3 (hauptsächlich durch einen niedrigeren LDL-Level), bei Proband E [Testbier 3] von 2,1 auf 1,6 (durch eine Erhöhung von HDL und Erniedrigung von LDL) und bei Proband F [Testbier 3] von 1,8 auf 1,6 (durch eine Erhöhung von HDL). Aufgrund des höheren LDL-Levels und des sehr niedrigen HDL-Wertes ergab sich bei Proband B [Kontrollbier] ein relativ ungünstiger LDL/HDL-Quotient von 3,6 zu Beginn der Studie. Nach 14 Tagen mit regelmäßigem Konsum des Kontrollbieres verbesserte sich dieser Wert auf 3,0 vorwiegend durch eine Erhöhung des HDL. Bei Proband C [Kontrollbier] blieb der LDL/HDL-Level durch eine Erhöhung des HDL und des LDL konstant, während Proband D [Testbier 2] einen niedrigeren Level von HDL und LDL am Ende der Studie aufwies.

Die entsprechenden Blutfettwerte und die Werte der Harnsäure, die als endogenes Plasmaantioxidans im Blut vorkommt, sind in **Tabelle 57** zusammengefasst. Dabei war bezüglich der Harnsäure bei allen Probanden, unabhängig vom Testbier, nach 14 Tagen ein

Tabelle 57: Cholesterin- und Triglyceridwerte der Probanden in Trinkstudie 2

Analyse	Einheit	Normalwert	0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
			Kontrollbier				
Proband B							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	258	237	250	248	252
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	126	162	170	124	149
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	48	43	45	44	53
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	175	159	162	174	157
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	3,6	3,7	3,6	4,0	3,0
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	5,99	6,32	6,16	5,59	6,80
Proband C							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	160	141	159	157	166
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	118	123	119	125	112
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 35	36	31	36	37	40
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	98	86	96	92	107
LDL/HDL-Quotient		< 3,5	2,7	2,8	2,7	2,5	2,7
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 7,0	6,04	5,54	5,81	5,38	7,07
			Testbier 3				
Proband E							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	170	165	113	163	155
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	144	173	146	96	61
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 35	47	47	47	47	53
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	97	95	80	96	85
LDL/HDL-Quotient		< 3,5	2,1	2,0	1,7	2,0	1,6
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 7,0	5,14	5,49	5,38	4,78	6,51
Proband F							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	185	187	182	173	183
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	84	99	86	70	63
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	58	59	58	56	62
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	107	109	107	102	102
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	3,71	4,00	4,13	4,04	4,22
			Testbier 2				
Proband A							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	196	179	127	176	173
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	52	101	61	51	49
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	65	58	62	61	67
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	115	103	98	101	87
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,8	1,8	1,6	1,7	1,3
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	4,48	5,13	4,85	4,80	n.b.
Proband D							
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	168	162	160	158	144
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	88	88	73	66	91
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	60	58	56	56	51
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	92	88	88	85	82
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	3,81	4,31	4,28	3,89	4,45

höherer Wert im Blut vorhanden als zu Beginn der Studie. Offensichtlich wurden durch das Biertrinken weitere antioxidative Regelungsmechanismen aktiviert. Bei den übrigen Blutwerten (Erythrozytenanzahl, Hämoglobingehalt, MCH-Wert [mean corpuscular haemoglobin], MCV-Wert [mean corpuscular volume], Hämatokritwert, MCHC-Wert [mean corpuscular haemoglobin concentration], Thrombozytenanzahl, Leukozytenanzahl) zeigten sich im Laufe der Studie keine wesentlichen Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.1.2. Vollblut-System

Zur Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Granulozyten wurden die aus ACC produzierten Ethenmengen im Vollblut-System auf 10^6 Neutrophile umgerechnet. Die dafür zugrunde liegenden Zahlen wurden aus den Blutanalysen berechnet und sind aus **Tabelle 58** zu ersehen. Innerhalb von 60 min stellte sich als ein kurzfristiger Effekt bei den Probanden B und C, die das Kontrollbier getrunken haben, eine Erhöhung der Granulozyten-Anzahlen ein (im Gegensatz zur Wirkung des gleichen Kontrollbieres in Trinkstudie 1). Bei den anderen Probanden können für diesen Zeitpunkt keine einheitlichen Aussagen getroffen werden.

Bei den Probanden A [Testbier 2], B [Kontrollbier] und E [Testbier 3] war, unabhängig von der Art des konsumierten Testbieres, eine Abnahme der Anzahl der Neutrophilen innerhalb von 24 h zu beobachten, wobei dies bei Proband A mit einer Reduktion um 50% besonders deutlich war. Bei den Probanden C [Kontrollbier], D [Testbier 2] und F [Testbier 3] lagen dagegen ungefähr die gleichen Werte wie am vorherigen Tag vor. Nach 14 d war, ebenfalls unabhängig von der Art des Testbieres, die Zahl der neutrophilen Granulozyten bei allen Probanden um durchschnittlich $0,9 (\pm 0,4) \times 10^6$ Neutrophile/ml Blut gesunken.

Tabelle 58: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 2

Proband	Bier	Anzahl neutrophiler Granulozyten ($\times 10^6$ /ml Vollblut)				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	6,1	7,4	8,2	5,1	4,6
C	Kontrollbier	4,3	4,7	5,0	4,8	3,6
E	Testbier 3	3,6	3,6	3,7	3,0	2,7
F	Testbier 3	2,2	2,4	2,5	2,6	1,5
A	Testbier 2	11,0	10,4	10,6	5,5	9,7
D	Testbier 2	2,7	2,8	2,7	2,5	2,2

Bei den in **Abbildung 60** beziehungsweise in **Tabelle 59** dargestellten Ethenmengen zeigt sich, daß die Neutrophilen von Proband E wesentlich stärker durch Zymosan stimulierbar waren als die der anderen Probanden und damit auf eine mögliche Vorstimulierung im Körper hinweisen. Auffallend ist eine deutliche Down-Regulation in der Aktivität nach 24 h bei allen Probanden, unabhängig vom konsumierten Testbier. Diese Immunsuppression bewegte sich im Bereich von 38% bei Proband B bis zu 65% bei Proband C im Vergleich zu den Kontrollwerten (0 min). Der Rückgang erscheint besonders drastisch bei Proband E mit einer Differenz von $1100 \text{ pmol Ethen}/10^6$ neutrophile Granulozyten, die 60% des Ausgangswertes entsprechen. Mit dem Aktivitätslevel von 756 pmol Ethen erreichte Proband E 24 h nach dem Trinken von Testbier 3 das Niveau der gesunden Probanden zu Beginn der Studie.

Nach 14 d zeigten sich die Neutrophilen der Probanden A [Testbier 2], B [Kontrollbier] und C [Kontrollbier], trotz ihrer reduzierten Anzahl im Blut, mit einer Zunahme der Aktivität um 42%, 79% und 24% deutlich stimulierter im Vergleich zum Anfangswert. Die segmentkernigen

Leukozyten der Probanden D [Testbier 2] und F [Testbier 3] blieben auf dem gleichen Aktivitätsniveau, während die des Probanden E nach dem Konsum von Testbier 3, welches mit einem erhöhten Hopfenanteil gebraut wurde, mit einer Reduktion um 30% reagierten. Die in Trinkstudie 1 festgestellte Tendenz einer Aktivierung der Neutrophilen innerhalb von 60 min nach dem Trinken des Kontrollbieres konnte bei den Probanden B und C nicht reproduziert werden, allerdings reagierten beide Probanden nach 14 d mit einem deutlich höheren Aktivitätslevel der Immunzellen als zu Beginn der Studie. Diese Tendenz zeigte sich auch in Trinkstudie 1 bei fünf der sechs Probanden 3 h nach dem Konsum des Hellen Bieres (Kontrollbier).

Anhand der Daten von nur zwei Probanden pro Testbier lassen sich keine Aussagen hinsichtlich der immunmodulierenden Eigenschaften machen, die eines der Biere in seiner Wirkung deutlich von den anderen absetzten würde. Bezüglich der Anzahlen im Blut bewirkten alle drei Biere einen Rückgang der Immunzellen nach 14tägigem Konsum. Durch den längerfristigen Konsum von Hellem Bier scheint eher die Tendenz einer Immunstimulierung gegeben zu sein, während Proband E mit einen deutlich immunsuppressiven Effekt nach dem längerfristigen Konsum des aufgehopften Bieres (Testbier 3) reagierte.

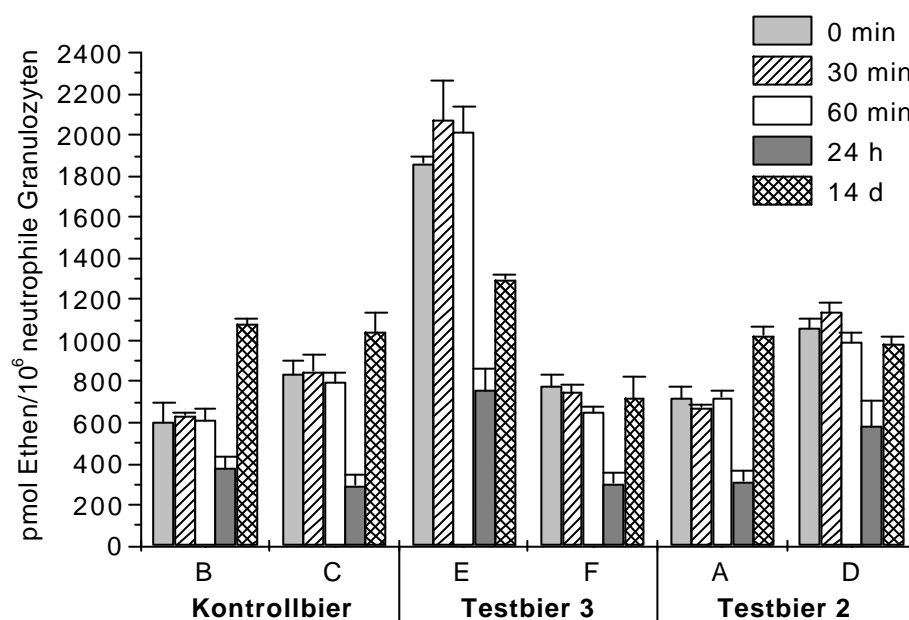


Abbildung 60: Einfluß der Biere auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten der Probanden aus Trinkstudie 2 im Vollblut-System

Tabelle 59: Einfluß der Biere auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten der Probanden aus Trinkstudie 2 im Vollblut-System

Proband	Bier	pmol Ethen/10 ⁶ neutrophile Granulozyten				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	602 ± 98	636 ± 9	613 ± 52	374 ± 58	1080 ± 30
C	Kontrollbier	836 ± 68	848 ± 86	796 ± 44	296 ± 55	1040 ± 98
E	Testbier 3	1861 ± 34	2070 ± 197	2009 ± 128	756 ± 106	1296 ± 28
F	Testbier 3	777 ± 52	749 ± 37	648 ± 33	304 ± 52	720 ± 107
A	Testbier 2	720 ± 58	672 ± 14	723 ± 34	312 ± 56	1024 ± 40
D	Testbier 2	1059 ± 51	1137 ± 43	988 ± 53	582 ± 126	980 ± 42

3.2.2.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System

In diesem System wurden die Plasmaproben auf ihr antioxidatives Potential gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies über die Freisetzung von Ethen gemessen. Dabei läßt sich um so weniger Ethen nachweisen, je besser die zugrunde liegende Reaktion durch die antioxidative Kapazität des Plasmas gehemmt wird. Dem Testsystem wurden jeweils 300 µl Plasma zugesetzt und es zeigten sich, abhängig vom Probanden, verschiedene Ethenbildung-Niveaus (**Abb. 61**). Im Vergleich zum Kontrollwert konnte 30 min nach dem Konsum aller drei Biere ein tendenziell höheres antioxidatives Plasmapotential bei allen Probanden festgestellt werden, wobei Proband C mit einer maximalen Erhöhung um 13% reagierte (**Tab. 60**). Außer bei den Probanden D und E wies das Plasma bei den 24 h-Werten der Probanden einen deutlichen Verlust der antioxidativen Kapazität zwischen 12 und 39% gegenüber dem Vortag auf.

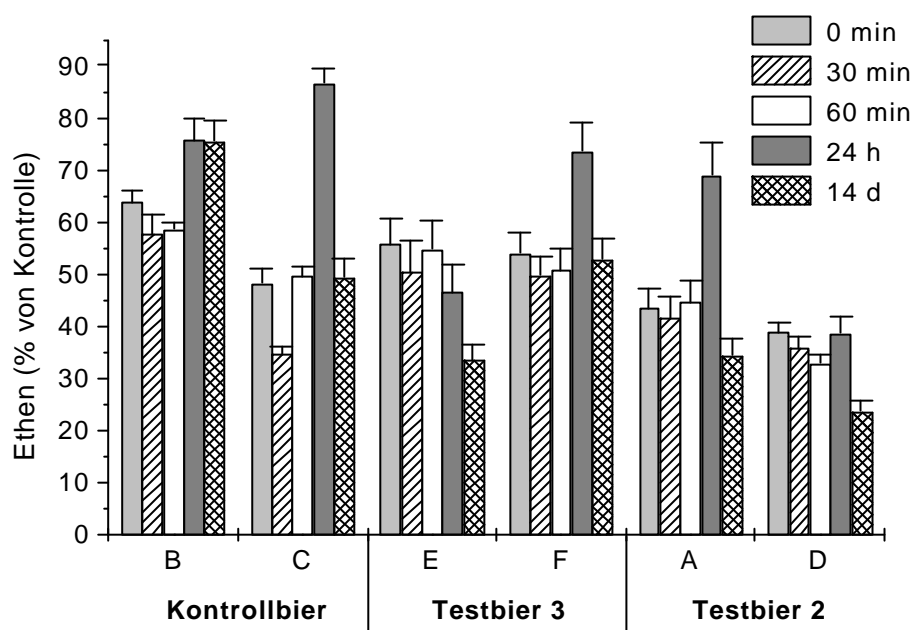


Abbildung 61: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 2 im X/XOD-System

Nach 14 d waren bei den Probanden B und C, die das Kontrollbier konsumierten, keine Erhöhung der antioxidativen Eigenschaften des Plasmas festzustellen. Bei Proband B verschlechterte sich diese sogar noch um 11% gegenüber des Ausgangswertes. Nach dem Trinken von Testbier 2 zeigten beide Probanden (A und D) eine Potentialerhöhung von 10 und 15%, während das Plasma von Proband E nach dem Konsum von Testbier 3 eine Erhöhung von 22% zeigte. Bei Proband F war keine Veränderung zu sehen.

Alle drei Biere bewirkten kurzfristig eine tendenzielle Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas, aber aufgrund der Zunahme des antioxidativen Potential nach dem 14tägigen Konsum erschien Testbier 2 interessant für eine weitere Trinkstudie, um diesen Effekt genauer überprüfen zu können.

Tabelle 60: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 2 im X/XOD-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	64 ± 2	58 ± 4	58 ± 1	76 ± 4	75 ± 4
C	Kontrollbier	48 ± 3	35 ± 1	49 ± 2	87 ± 3	49 ± 4
E	Testbier 3	56 ± 5	50 ± 6	55 ± 6	47 ± 5	34 ± 3
F	Testbier 3	54 ± 4	50 ± 4	51 ± 4	74 ± 5	53 ± 4
A	Testbier 2	44 ± 4	42 ± 4	45 ± 4	69 ± 6	34 ± 3
D	Testbier 2	39 ± 2	36 ± 2	33 ± 2	39 ± 3	24 ± 2

3.2.2.1.4. Fenton-System

Für eine weitere Messung des antioxidativen Potentials wurde das Plasma der Probanden im Fenton-System getestet, wobei 100 µl eingesetzt wurden. Hier bestätigte sich die im X/XOD-System beobachtete Tendenz einer erhöhten antioxidativen Kapazität des Plasmas 30 min nach dem Trinken der Biere, die in diesem System auch noch nach 60 min meßbar war. Eine Ausnahme bildet Proband D, bei dem sich das antioxidative Niveau zu keinem der gemessenen Zeitpunkte änderte (**Tab. 61, Abb. 62**). Im Gegensatz zum X/XOD-System läßt sich im Fenton-System ein Verlust des antioxidativen Potentials nach 24 h nicht bestätigen, denn die Werte liegen im Bereich der Ausgangswerte vom Vortag. Auch nach 14 Tagen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Ethenbildung im Vergleich zu den Kontrollwerten.

Dabei kann keines der drei Biere als wirksamer gegenüber den anderen bezeichnet werden.

Tabelle 61: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 2 im Fenton-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	69 ± 3	54 ± 4	60 ± 4	68 ± 3	65 ± 3
C	Kontrollbier	60 ± 3	55 ± 3	56 ± 4	65 ± 5	71 ± 6
E	Testbier 3	54 ± 7	50 ± 5	48 ± 4	54 ± 5	59 ± 6
F	Testbier 3	82 ± 9	69 ± 8	73 ± 8	74 ± 9	79 ± 9
A	Testbier 2	74 ± 8	69 ± 3	70 ± 2	80 ± 7	78 ± 7
D	Testbier 2	68 ± 6	69 ± 4	68 ± 7	69 ± 5	67 ± 3

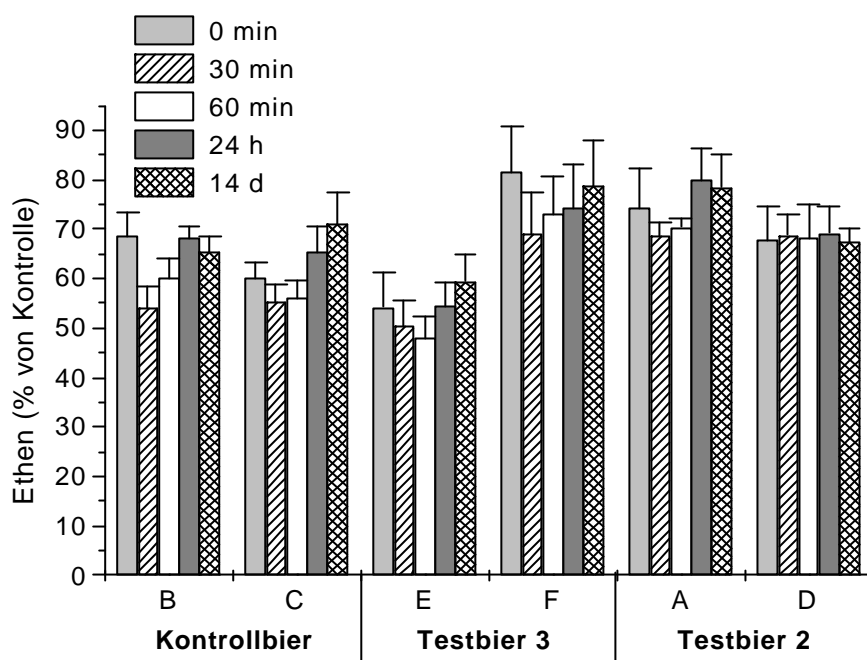


Abbildung 62: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 2 im Fenton-System

3.2.2.1.5. Proteingehalt im Plasma

Um mögliche Effekte bezüglich der antioxidativen Kapazität auf veränderte Proteingehalte im Plasma ausschließen zu können, wurde mit Hilfe des Bradford-Tests die Konzentration der Proteine in den einzelnen Plasmaproben bestimmt. In **Tabelle 62** sind die berechneten Werte der Plasmaproteine aufgelistet, die keine wesentlichen Veränderungen aufwiesen.

Tabelle 62: Proteingehalt im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 2

Proband	Bier	Proteingehalt im Plasma (mg/ml)				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	69,8 ± 5,0	67,0 ± 2,3	67,9 ± 3,5	68,7 ± 2,3	72,5 ± 2,9
C	Kontrollbier	68,4 ± 1,6	63,9 ± 2,0	66,6 ± 2,0	64,3 ± 1,7	72,5 ± 2,9
E	Testbier 3	80,7 ± 1,7	81,0 ± 1,4	75,1 ± 2,3	80,5 ± 2,0	79,0 ± 2,5
F	Testbier 3	76,3 ± 3,5	74,6 ± 2,9	74,3 ± 3,7	77,9 ± 2,6	75,2 ± 3,1
A	Testbier 2	74,0 ± 5,1	71,9 ± 4,0	72,8 ± 2,6	72,4 ± 2,6	78,6 ± 5,5
D	Testbier 2	77,4 ± 4,4	73,4 ± 3,9	73,4 ± 3,1	77,7 ± 2,9	78,5 ± 4,0

3.2.2.1.6. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Weder durch das Trinken der Testbiere 2 und 3 noch durch das Helle Bier (Kontrollbier) war eine Verschiebung der Lag-Phase zu beobachten, die auf einen signifikanten Oxidationsschutz hindeuten würde. **Tabelle 63** zeigt die gemessenen Lag-Phasen während der kupferinduzierten LDL-Oxidation. Auch nach 14 d blieben die Lag-Phasen im Bereich der Anfangswerte.

Tabelle 63: Einfluß der Biere auf die Lag-Phasen des aus dem Plasma der Probanden aus Trinkstudie 2 extrahierten LDL bei der kupferinduzierten Oxidation

Proband	Bier	Lag-Phase (min)				
		0 min	30 min	60 min	24 h	14 d
B	Kontrollbier	104	n.b.	100	100	100
C	Kontrollbier	110	112	111	114	111
E	Testbier 3	104	103	96	110	109
F	Testbier 3	92	92	102	102	108
A	Testbier 2	92	102	87	90	91
D	Testbier 2	107	112	103	107	112

3.2.2.1.7. Extraktion der lipophilen Antioxidantien aus LDL

Die aus den LDL-Proben aller Probanden extrahierten lipophilen Antioxidantien sind in **Tabelle 64** aufgelistet. Die quantifizierten Mengen pro mol LDL bewegten sich bei den normal ernährten Probanden im Bereich von 12,00 – 18,00 mol für α -Tocopherol, für Lycopin 0,40 – 1,15 mol, β -Carotin 0,30 – 1,40 mol, Ubichinol (reduziertes Q₁₀) 0,30 – 1,40 mol und Ubichinon (Q₁₀) 0,00 – 0,45 mol. Im Verlauf der Studie waren keine wesentlichen Änderungen im Antioxidantiengehalt des LDL feststellbar.

3.2.2.1.8. Extraktion der lipophilen Antioxidantien aus Plasma

Tabelle 65 zeigt die aus den Plasmaproben der Trinkstudie 2 extrahierten lipidlöslichen Antioxidantien. Die im Plasma der sechs untersuchten Probanden (bei normaler Ernährung) quantifizierten Konzentrationen lagen für α -Tocopherol im Bereich von 24,50 – 51,00 μ M, für Lycopin 0,40 – 1,20 μ M, β -Carotin 0,22 – 1,70 μ M, Ubichinol (reduziertes Q₁₀) 0,40 – 2,70 μ M und Ubichinon (Q₁₀) 0,10 – 0,60 μ M. Dabei hatte das Trinken der verschiedenen Biere keinen signifikanten Einfluß auf die Antioxidantienghalte im Plasma.

Tabelle 64: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien im LDL der Probanden aus Trinkstudie 2

Zeitpunkt	mol/mol LDL				
	a-Tocopherol	Lycopin	b-Carotin	Ubichinol	Ubichinon
Kontrollbier					
Proband B					
0 min	18,38 ± 0,02	0,76 ± 0,06	0,60 ± 0,04	0,56 ± 0,14	0,08 ± 0,04
30 min	16,47 (n = 1)	0,74 (n = 1)	0,50 (n = 1)	0,29 (n = 1)	0,11 (n = 1)
60 min	16,56 ± 0,09	0,70 ± 0,07	0,60 ± 0,09	0,76 ± 0,13	0,15 ± 0,05
24 h	17,60 ± 0,09	0,67 ± 0,12	0,58 ± 0,06	0,55 ± 0,03	0,13 ± 0,19
14 d	16,77 ± 0,23	0,82 ± 0,01	0,59 ± 0,08	1,38 ± 0,32	0,13 (n = 1)
Proband C					
0 min	16,85 ± 1,48	1,01 ± 0,05	0,75 ± 0,36	0,42 ± 0,11	0,17 ± 0,23
30 min	15,81 ± 1,18	1,07 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,52 ± 0,07	0,16 ± 0,09
60 min	13,87 ± 2,75	0,93 ± 0,11	0,71 ± 0,32	0,35 ± 0,50	0,20 ± 0,03
24 h	15,63 ± 0,30	0,95 ± 0,09	0,89 ± 0,26	0,60 ± 0,40	0,05 ± 0,07
14 d	14,64 ± 0,77	0,77 ± 0,09	0,73 ± 0,15	0,37 ± 0,53	0,02 ± 0,03
Testbier 3					
Proband E					
0 min	15,48 ± 2,17	1,10 ± 0,04	0,31 ± 0,11	0,83 ± 0,35	0,33 ± 0,13
30 min	15,76 ± 0,08	1,11 ± 0,06	0,40 ± 0,15	0,39 (n = 1)	0,32 (n = 1)
60 min	14,86 ± 0,25	1,08 ± 0,15	0,30 ± 0,11	0,93 ± 0,21	0,18 ± 0,00
24 h	16,10 ± 0,66	0,94 ± 0,03	0,29 ± 0,12	1,25 ± 0,08	0,32 ± 0,06
14 d	16,05 ± 0,11	1,07 ± 0,14	0,31 ± 0,17	1,13 ± 0,43	0,34 ± 0,05
Proband F					
0 min	16,65 ± 0,52	0,61 ± 0,05	0,51 ± 0,10	0,38 ± 0,04	0,21 (n = 1)
30 min	16,37 (n = 1)	0,51 (n = 1)	0,46 (n = 1)	0,88 (n = 1)	0,45 (n = 1)
60 min	16,65 ± 0,95	0,64 ± 0,07	0,71 ± 0,00	0,43 ± 0,06	0,29 ± 0,24
24 h	17,19 ± 0,20	0,56 ± 0,03	0,70 ± 0,14	0,29 ± 0,13	0,00 ± 0,00
14 d	18,01 ± 1,15	0,74 ± 0,01	0,76 ± 0,11	1,41 ± 0,07	0,17 ± 0,09
Testbier 2					
Proband A					
0 min	14,14 ± 0,63	0,40 ± 0,01	0,88 ± 0,15	0,31 ± 0,05	0,21 ± 0,00
30 min	12,69 ± 0,72	0,43 ± 0,06	0,92 ± 0,06	0,43 ± 0,12	0,22 ± 0,00
60 min	13,42 ± 1,16	0,45 ± 0,03	0,90 ± 0,29	0,52 ± 0,35	0,33 ± 0,15
24 h	14,49 ± 0,62	0,42 ± 0,03	0,77 ± 0,11	0,42 ± 0,20	0,37 ± 0,28
14 d	13,05 ± 1,34	1,01 ± 0,14	0,87 ± 0,03	0,50 ± 0,00	0,36 ± 0,25
Proband D					
0 min	17,77 ± 0,30	0,66 ± 0,04	1,16 ± 0,04	0,93 ± 0,11	0,07 (n = 1)
30 min	17,18 ± 0,33	0,84 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,36 ± 1,45	0,17 ± 0,01
60 min	16,53 ± 0,55	0,66 ± 0,04	1,37 ± 0,13	0,75 ± 0,25	0,15 ± 0,02
24 h	16,68 ± 0,90	0,59 ± 0,02	1,23 ± 0,28	0,76 ± 0,19	0,21 (n = 1)
14 d	15,60 ± 0,50	0,40 ± 0,03	0,74 ± 0,02	0,30 (n = 1)	0,00 ± 0,00

Tabelle 65: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 2

Zeitpunkt	µM im Plasma				
	a-Tocopherol	Lycopin	b-Carotin	Ubichinol	Ubichinon
Kontrollbier					
Proband B					
0 min	51,07 ± 0,12	1,24 ± 0,04	0,99 ± 0,10	1,72 ± 0,18	0,50 ± 0,09
30 min	46,76 ± 0,65	1,16 ± 0,10	0,85 ± 0,18	1,87 ± 0,19	0,20 ± 0,09
60 min	50,97 ± 0,62	1,14 ± 0,00	1,03 ± 0,24	1,31 ± 0,39	0,34 ± 0,08
24 h	45,90 ± 1,59	0,95 ± 0,24	0,81 ± 0,45	1,33 ± 0,27	0,29 ± 0,09
14 d	48,87 ± 0,03	1,21 ± 0,09	1,07 ± 0,01	2,69 ± 0,27	0,39 (n = 1)
Proband C					
0 min	37,55 ± 0,12	1,19 ± 0,19	0,79 ± 0,10	1,19 ± 0,47	0,37 ± 0,03
30 min	35,78 ± 0,48	1,23 ± 0,30	0,85 ± 0,06	0,50 ± 0,39	0,26 (n = 1)
60 min	38,15 ± 0,19	1,21 ± 0,01	0,98 ± 0,21	1,19 ± 0,12	0,27 (n = 1)
24 h	35,93 ± 0,65	1,01 ± 0,00	0,88 ± 0,05	1,33 ± 0,11	0,24 ± 0,06
14 d	34,65 ± 1,93	0,92 ± 0,20	0,69 ± 0,30	1,11 ± 0,44	0,40 ± 0,03
Testbier 3					
Proband E					
0 min	34,69 ± 1,00	1,11 ± 0,07	0,42 ± 0,11	1,72 ± 0,10	0,20 ± 0,03
30 min	35,17 ± 0,80	1,12 ± 0,05	0,35 ± 0,12	1,79 ± 0,53	0,27 ± 0,01
60 min	33,29 ± 1,35	1,13 ± 0,11	0,31 ± 0,13	1,46 ± 0,72	0,12 ± 0,05
24 h	34,57 ± 0,33	1,04 ± 0,09	0,41 ± 0,08	2,18 ± 0,22	0,14 (n = 1)
14 d	28,85 ± 0,68	0,91 ± 0,07	0,22 ± 0,02	1,18 ± 0,18	0,09 ± 0,05
Proband F					
0 min	37,17 ± 0,23	0,49 ± 0,04	0,55 ± 0,02	0,79 ± 0,27	0,52 ± 0,13
30 min	36,89 ± 0,26	0,53 ± 0,04	0,58 ± 0,21	0,39 ± 0,01	0,21 ± 0,03
60 min	37,47 ± 0,20	0,51 ± 0,08	0,62 ± 0,12	0,39 ± 0,11	0,24 (n = 1)
24 h	38,36 ± 2,05	0,51 ± 0,06	0,69 ± 0,04	0,56 ± 0,15	0,08 ± 0,02
14 d	38,58 ± 0,50	0,59 ± 0,05	0,98 ± 0,01	1,38 ± 0,74	0,28 ± 0,02
Testbier 2					
Proband A					
0 min	29,95 ± 0,25	0,39 ± 0,09	0,87 ± 0,11	0,37 ± 0,14	0,47 ± 0,02
30 min	27,98 ± 0,33	0,63 ± 0,08	0,90 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,30 ± 0,16
60 min	27,63 ± 0,27	0,49 ± 0,11	0,84 ± 0,08	0,62 ± 0,14	0,51 ± 0,06
24 h	29,04 ± 0,44	0,42 ± 0,01	0,89 ± 0,00	0,44 ± 0,15	0,47 ± 0,19
14 d	24,53 ± 0,03	1,08 ± 0,08	1,29 ± 0,06	0,73 ± 0,09	0,15 ± 0,12
Proband D					
0 min	34,17 ± 0,68	0,79 ± 0,16	1,67 ± 0,07	1,18 ± 0,30	0,32 ± 0,10
30 min	32,31 ± 0,51	0,63 ± 0,04	1,36 ± 0,14	0,88 ± 0,16	0,32 ± 0,18
60 min	31,18 (n = 1)	0,64 (n = 1)	1,47 (n = 1)	0,92 (n = 1)	0,65 (n = 1)
24 h	35,27 ± 0,63	0,58 ± 0,02	1,28 ± 0,15	0,94 ± 0,12	0,30 ± 0,09
14 d	29,87 ± 0,98	0,37 ± 0,02	1,00 ± 0,09	0,48 ± 0,45	0,28 (n = 1)

3.2.2.2. In vitro- und ex vivo-Untersuchungen der Biere aus Trinkstudie 2

Analog zu den mit dem Probandenplasma durchgeführten in vivo-Untersuchungen wurden die drei verwendeten Biere ebenfalls im Vollblut-, X/XOD-, Fenton-System und im System der kupferinduzierten LDL-Oxidation getestet. Dabei wurden die verschiedenen Biere in vitro in Form von Konzentrationsreihen untersucht, weil diese Daten für die gebrauten Testbiere noch ausstehen. Die ex vivo-Untersuchungen wurden mit dem Vollblut eines freiwilligen Spenders beziehungsweise mit Plasma aus einem Plasmapool durchgeführt.

3.2.2.2.1. Vollblut-System

Das Helle Bier (Kontrollbier) zeigte, wie bereits in 3.1.7. festgestellt wurde, im Niedrigkonzentrationsbereich von 0,05% i.A. eine deutliche immunsuppressive Wirkung auf die neutrophilen Granulozyten (**Abb. 63**), die sich jedoch im in vivo-Versuch bei den beiden Probanden in Trinkstudie 2 nicht bestätigte (siehe 3.2.2.1.2.). Auch das Testbier 3 mit dem erhöhten Hopfenanteil wirkte ab einer Konzentration von 0,10% i.A. hemmend auf die Ethenbildung (ca. 20% im Vergleich zur Kontrolle) und damit auf die Aktivität der Neutrophilen im Vollblut. Im Trinkversuch reagierte ebenfalls einer der beiden Probanden mit einer deutlichen Aktivitätsreduktion, die auf den 14tägigen Konsum von Testbier 3 zurückgeführt werden könnte. Durch das Testbier 2 wurden bei 5% i.A. eine Hemmung der Neutrophilenaktivität um ca. 20% wie bei den beiden anderen Bieren erreicht (**Tab. 66**).

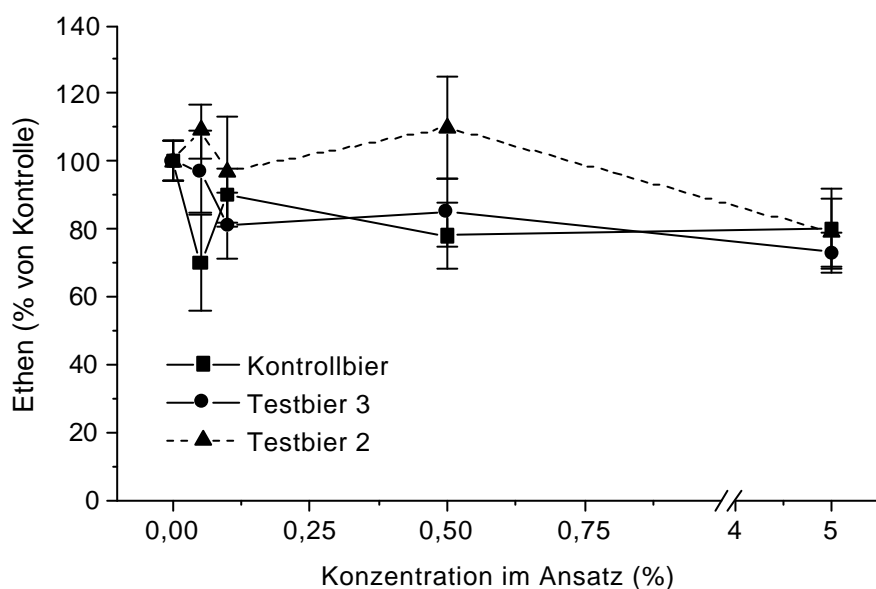


Abbildung 63: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Tabelle 66: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)		
	Kontrollbier	Testbier 3	Testbier 2
0,00	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 6
0,05	70 ± 14	97 ± 12	109 ± 8
0,10	90 ± 8	81 ± 10	97 ± 16
0,50	78 ± 10	85 ± 10	110 ± 15
5,00	80 ± 12	73 ± 6	79 ± 10

3.2.2.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Abbildung 64 stellt den Einfluß der in Trinkstudie 2 verwendeten Biere auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System dar (in vitro). Da dieses System relativ empfindlich auf EtOH als Radikalfänger reagiert, enthielten die Kontrollreaktionen der jeweiligen Konzentrationsreihe die dem Bier entsprechende EtOH-Konzentration, die auch in den Verdünnungsreihen der Biere konstant gehalten wurde. Im Niedrigkonzentrationsbereich bis 0,1% im Ansatz zeigten die drei Biere nahezu identische Wirkungen. Bei den höheren Konzentrationen von 0,50 und 0,83% im Ansatz hemmte das Testbier 2 mit dem höheren Polyphenolgehalt die Ethenfreisetzung mit einer Restaktivität von 35 und 24% am stärksten. Im Vergleich zu den beiden anderen Biere (**Tab. 67**) besitzt es damit ein höheres antioxidatives Potential. Testbier 3 wirkte ebenfalls stärker hemmend auf die X/XOD-Reaktion als das Kontrollbier. Die beobachteten Unterschiede sind bei einer Konzentration von 5% im Ansatz nicht mehr gegeben; alle drei Biere erreichten eine Hemmung der Grundreaktion um ca. 90%.

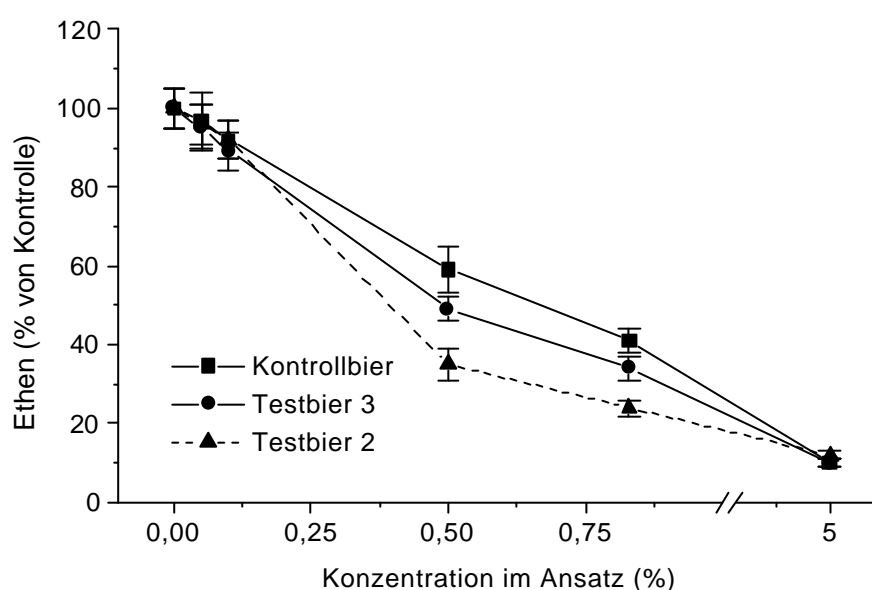


Abbildung 64: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System (in vitro)

Tabelle 67: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System (in vitro)

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)		
	Kontrollbier	Testbier 3	Testbier 2
0,00	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5
0,05	97 ± 7	95 ± 6	96 ± 5
0,10	92 ± 5	89 ± 5	92 ± 5
0,50	59 ± 6	49 ± 3	35 ± 4
0,83	41 ± 3	34 ± 3	24 ± 2
5,00	10 ± 1	10 ± 1	12 ± 1

Mit den verschiedenen Bieren vorinkubiertes Poolplasma (2,5 ml Plasma + 0,5 ml Bier) wurde ebenfalls mit 300 µl in das X/XOD-System eingesetzt, um das Verhalten der antioxidativ wirksamen Bierinhaltsstoffe in Gegenwart von Plasmaproteinen zu testen (ex vivo). Die Plasma/Bier-Kombination entsprach damit einer Konzentration von 0,83% Bier im Ansatz. **Abbildung 65** beziehungsweise **Tabelle 68** zeigen eine zunehmende Hemmung der Ethenbildung durch das Kontrollbier (18% Restaktivität), das Testbier 3 (15% Restaktivität) und das Testbier 2 (12% Restaktivität). Damit war das Testbier 2 trotz des etwas niedrigerem EtOH-Gehalt auch in Anwesenheit von Plasma antioxidativ wirksamer als das Testbier 3 und dieses war wiederum wirksamer als das Kontrollbier. Das Plasma mit der höheren EtOH-Konzentration von 5,4% (Testbier 3 entsprechend) erreichte im X/XOD-System eine Restaktivität von 25% bezogen auf die Grundreaktion. Demnach ist die Hemmung des Systems in Gegenwart der Plasmabestandteile um ca. 10% auf die Bierinhaltsstoffe zurückzuführen und nicht auf den EtOH-Gehalt. Auch im Trinkversuch konnte bei allen Probanden 30 min nach dem Konsum der drei Biere ein tendenziell höheres antioxidatives Potential des Plasmas festgestellt werden (siehe **3.2.2.1.4.**).

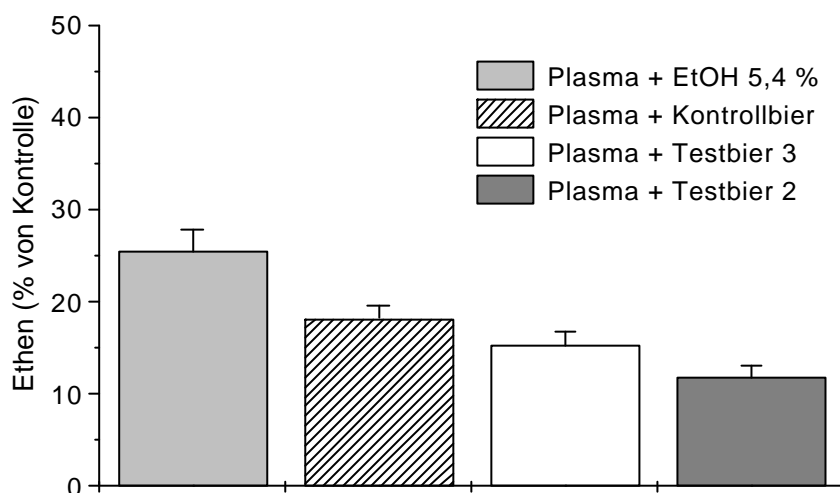


Abbildung 65: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System (ex vivo)

Tabelle 68: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System (ex vivo)

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Kontrolle	100 ± 7
Plasma + ethanolische Lösung (5,4%)	25 ± 2
Plasma + Kontrollbier (4,9%)	18 ± 1
Plasma + Testbier 3 (5,4%)	15 ± 1
Plasma + Testbier 2 (5,0%)	12 ± 1

3.2.2.2.3. Fenton-System

Beim Einsatz der Biere im Fenton-System (in vitro) war eine starke Stimulierung der Fenton-Reaktion bei den höheren Konzentrationen von 0,50 und 0,83% i.A. vor allem bei Testbier 2 mit dem höheren Stammwürzegehalt festzustellen (**Abb. 66**). Eine Erklärung für diese zunächst als prooxidativ einzustufende Reaktion könnte in der Verwendung von EDTA im Testsystem liegen. Durch den Überschuß an EDTA wäre ein Herauslösen von Übergangsmetallen aus dem Bier denkbar. Eine andere Möglichkeit wäre eine Reduktion des Fe^{3+} im EDTA-Komplex zurück zu Fe^{2+} durch die Bierinhaltsstoffe. Dadurch würden weitere aktive Komplexe gebildet werden, die wiederum die Generierung von Radikalen begünstigen (was in einer erhöhten Ethenentstehung zum Ausdruck kommt). Allerdings wurde die Fenton-Reaktion nicht in Abwesenheit von EDTA durchgeführt, was einer Überprüfung dieses Artefakts dienlich gewesen wäre.

Im physiologisch relevanten Niedrigkonzentrationsbereich von 0,05 und 0,1% i.A. zeigte das Testbier 3 mit einer Hemmung des Systems um 10% und 19% (**Tab. 69**) die beste antioxidative Kapazität von den drei Bieren, während Testbier 2 auch bei diesen Konzentrationen „prooxidative“ Tendenzen zeigt.

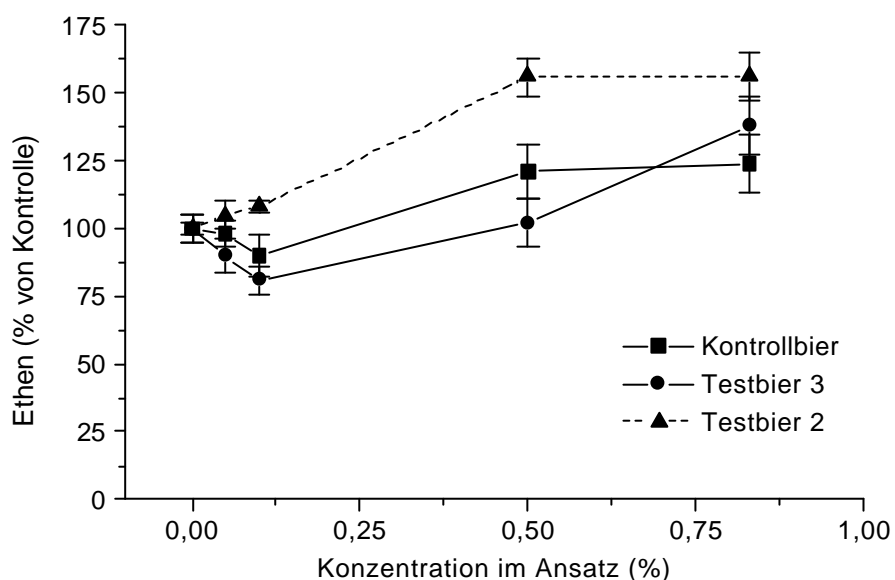


Abbildung 66: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im Fenton-System (in vitro)

Tabelle 69: Einfluß der Biere aus Trinkstudie 2 auf die Ethenentstehung im Fenton-System (in vitro)

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)		
	Kontrollbier	Testbier 3	Testbier 2
0,00	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 2
0,05	98 ± 5	90 ± 6	105 ± 5
0,10	90 ± 8	81 ± 5	108 ± 2
0,50	121 ± 10	102 ± 9	156 ± 7
0,83	124 ± 11	138 ± 11	156 ± 9

Vorinkubiertes Plasma mit einer ethanolischen Lösung (5,4%, Ethanolgehalt von Testbier 3) bzw. den drei Bieren wurde ebenfalls in das Fenton-System eingesetzt (ex vivo). Das Plasma/EtOH-Gemisch hemmte die normale Fenton-Reaktion (mit EDTA) um 79%. Im Vergleich dazu zeigten die Plasma/Bier-Kombinationen analog zu den zuvor dargelegten in vitro-Konzentrationsreihen eine leicht stimulierende Tendenz (**Abb. 67, Tab. 70**).

Das im Fenton-System in Gegenwart von EDTA getestete Probandenplasma (in vivo, **3.2.2.1.5.**) wies dagegen keinen Verlust des antioxidativen Potentials auf. Bei den 30 min- und 60 min-Proben konnten sogar etwas erhöhte Plasmapotentiale gemessen werden.

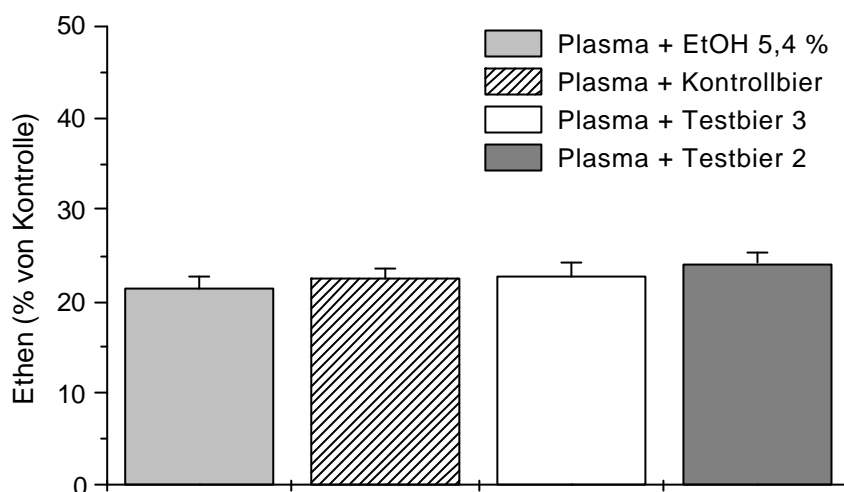


Abbildung 67: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im Fenton-System (ex vivo)

Tabelle 70: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im Fenton-System (ex vivo)

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Kontrolle	100 ± 2
Plasma + ethanolische Lösung (5,4%)	21 ± 1
Plasma + Kontrollbier (4,9%)	23 ± 1
Plasma + Testbier 3 (5,4%)	23 ± 1
Plasma + Testbier 2 (5,0%)	24 ± 1

3.2.2.2.4. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Aus dem mit den Testbieren 2 und 3 und dem Kontrollbier vorinkubierten Plasma (2,5 ml Plasma mit 0,5 ml Bier) wurde das LDL isoliert. Im Laufe der kupferinduzierten LDL-Oxidation konnte kein Oxidationsschutz durch die Biere festgestellt werden.

Bei der Direktinkubation der drei Biere mit dem isolierten LDL aus dem Plasmapool war hingegen eine signifikante Verschiebung der Lag-Phasen bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (**Abb. 68**). Diese Lag-Phasen-Verlängerung ist sehr wahrscheinlich auf eine Kupferkomplexierung durch die Bierinhaltsstoffe zurückzuführen. Die Biere wurden zuerst mit der Kupferlösung für 5min inkubiert und die Oxidation durch den Zusatz des LDL gestartet. Wie aus **Tabelle 71** zu ersehen ist, konnte durch die Zugabe von 5 µl Hellem Bier (= 0,5% i.A.) die Lag-Phase bis auf 450 min und durch das Testbier 3 sogar bis auf 667 min verlängert werden. Bei Testbier 2 begann eine zögerliche Oxidation nach ca. 600 min, aber es kam nicht, wie bei Testbier 3, zu einer typischen LDL-Oxidationskurve. Dieser Anstieg der Extinktion war nicht kupferinduziert, da im Ansatz ohne Cu²⁺ die gleiche Reaktion ablief. Auch die Kontrollen ohne Cu²⁺ für das Helle Bier und Testbier 3 begannen nach dieser Zeit anzusteigen. Die Testbiere unterscheiden sich vom Hellen Bier unter anderem durch einen höheren Anteil an Stammwürze, der vermutlich für die kupferkomplexierenden Eigenschaften verantwortlich ist. Die ethanolische Lösung (5,4%) als Kontrolle zum EtOH-Gehalt der Biere hatte keinen Einfluß auf die Oxidation.

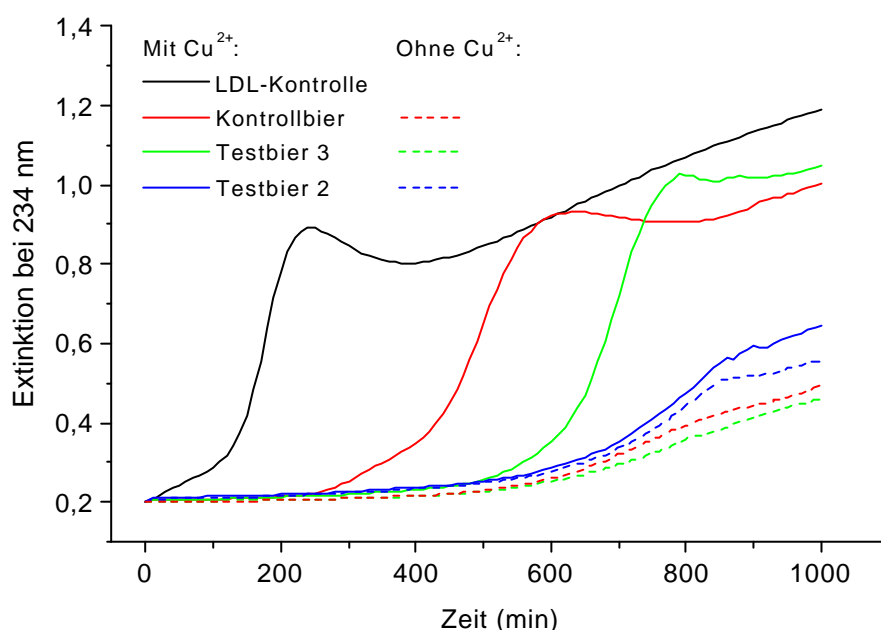


Abbildung 68: Einfluß der Testbiere 2 und 3 und des Kontrollbieres (jeweils 0,5% i.A.) auf die LDL-Oxidation bei Direktinkubation

Tabelle 71: Lag-Phasen der kupferinduzierten LDL-Oxidation in Gegenwart verschiedener Biere bei Direktinkubation

Testsubstanz	Lag-Phase (min)
Kontrolle	107
EtOH 5,2%	105
Helles Bier	450
Testbier 3	667
Testbier 2	Nicht bestimmbar

3.2.2.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 2

In Trinkstudie 2 wurde ein Vergleich zwischen drei gebrauten Bieren hinsichtlich ihrer physiologischen Wirkungen *in vivo* durchgeführt. Dabei handelte es sich bei Testbier 2 um ein Bier mit einem erhöhten Stammwürzeanteil (Salvator, Alkoholgehalt 5,0%) und bei Testbier 3 um ein Bier mit einem erhöhten Hopfenanteil (Alkoholgehalt 5,4%), die im Vergleich zu einem Hellen Bier als Kontrollbier (Alkoholgehalt 4,9%) regelmäßig unter normalen Trinkgewohnheiten über 14 Tage konsumiert wurden.

Hinsichtlich der Blutwerte ergab sich, unabhängig von der Art des konsumierten Testbieres, bei vier der sechs Probanden ein günstigerer LDL/HDL-Quotient am Ende der Studie, der offensichtlich auf einen EtOH-Effekt zurückzuführen ist. Auch der Harnsäure-Level war durch das Biertrinken bei allen Probanden nach 14 Tagen im Vergleich zu den Anfangswerten gestiegen. Auf die übrigen Blutparameter, auf die lipophilen Antioxidantien sowie auf den Proteingehalt des Plasmas wurde durch das Trinken der Testbiere kein signifikanter Einfluß ausgeübt.

Nach 14tägigem Bierkonsum sanken die Anzahlen der Neutrophilen im Blut bei allen Probanden, ebenfalls unabhängig vom Testbier. Nach einmaligem Konsum von 500 ml Bier zeigten sich die kurzfristigen Effekte in Bezug auf die Granulozyten-Anzahlen bei den je zwei Probanden pro Testbier nicht einheitlich.

Den Aktivitätsstatus der Immunzellen betreffend war nach dem 14tägigen Konsum des Hellen Bieres eher die Tendenz einer Stimulierung zu beobachten, die „*ex vivo*“ nicht festzustellen war. Eindeutige Aussagen über die Testbiere 2 und 3 können, auch bezüglich eines Kurzzeiteffektes, nicht gemacht werden: Ein Proband reagierte nach 14 Tagen Testbier 2 indifferent, während der andere Proband eine Zunahme der Aktivität zeigte, die auch „*ex vivo*“ im Niedrigkonzentrationsbereich durch das Testbier 2 ausgelöst werden konnte. Nach dem längerfristigen Konsum von Testbier 3 reagierte einer der beiden Probanden mit einem deutlichen immunsuppressiven Effekt, der auch „*ex vivo*“ ausgelöst werden konnte. Möglicherweise sind Hopfeninhaltsstoffe dafür verantwortlich zu machen.

Sowohl im X/XOD-System als auch im Fenton-System konnte das antioxidative Potential des Plasmas durch das Trinken von Bier gesteigert werden. Eine Bewertung bezüglich der Wirksamkeit kann aufgrund der wenigen Daten von nur zwei Probanden pro Testbier nicht erfolgen, aber alle drei Biere zeigten gleichermaßen die Tendenz zur kurzfristigen Erhöhung der antioxidativen Kapazität 30 min nach dem Trinken im X/XOD-System. Im Fenton-System war diese Tendenz sogar noch bei 60 min bei allen drei Testbieren festzustellen. Nach 14 d war im X/XOD-System bei beiden Probanden, die das Testbier 2 konsumierten, das antioxidative Plasmapotential definitiv höher als zu Beginn der Studie, während bei den Probanden mit Testbier 3 nur ein Proband mit einem gesteigertem Potential reagierte und nach dem 14tägigem Konsum des Kontrollbieres bei beiden Probanden ein schlechteres antioxidatives Potential zu beobachten war als zu Beginn der Studie. Damit erscheint das Testbier 2 als relativ interessant hinsichtlich einer möglichen längerfristigen Wirkung und auch in den zugehörigen *in vitro/ex vivo*-Untersuchungen erwies sich das Testbier 2 als das antioxidativ wirksamste Bier unter den drei getesteten Bieren im X/XOD-System.

Wie auch in Trinkstudie 1 war in dieser Studie *in vivo* kein LDL-Oxidationsschutz im isolierten LDL festzustellen. Auch durch eine Vorinkubation der Biere mit gepooltem Plasma-LDL (*ex vivo*) konnte keine Anreicherung oxidationshemmender Bierinhaltsstoffe im LDL nachgewiesen werden. Aber aufgrund der kupferkomplexierenden Eigenschaften der Biere zeigten sich *ex vivo* bei der Direktinkubation der Biere mit isoliertem LDL aus dem Plasmapool enorme Lag-Phasen-Verzögerungen, die um so größer waren, je höher der Stammwürzeanteil im Bier war.

Aufgrund der positiven Tendenzen von Testbier 2 *in vivo* im X/XOD-System und der höheren antioxidativen Kapazitäten dieses Bieres mit seinem höheren Stammwürzegehalt in den *in vitro*- und *ex vivo*-Untersuchungen im X/XOD-System und bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation wurden für eine weitere Trinkstudie von der Paulaner Brauerei Biere gebraut, die ebenfalls einen höheren Stammwürzegehalt aufwiesen. Um dabei einen möglichen Effekt des Alkohols bei der Absorption der Bierinhaltsstoffe untersuchen zu können, wurde für das Testbier 5 der Alkoholgehalt auf 1,4% reduziert, während das Testbier 4 einen normalen Gehalt von 5,2% aufwies.

3.2.3. Trinkstudie 3

Die Auswirkungen von Bier mit einem höheren Stammwürzegehalt auf das antioxidative Potential von Plasma beziehungsweise auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Vollblut der Probanden wurde in Trinkstudie 3 überprüft, die mit den Testbieren 4 und 5 (Salvator) durchgeführt wurde. Die beiden Biere unterschieden sich im wesentlichen nur durch ihren Alkoholgehalt, wobei das Testbier 4 einen Ethanolgehalt von 5,2% und für das Testbier 5 der Ethanolgehalt auf 1,4% reduziert wurde. Eine Gruppe von sechs Probanden trank über einen Zeitraum von 13 Tagen jeweils abends 500 ml eines der beiden Testbiere (drei Probanden pro Bier). Am ersten Tag dieser Studie wurde am Vormittag das erste Bier nach der Entnahme von Kontrollblut getrunken und 30 min nach Beginn des Trinkens erfolgte eine zweite Blutabnahme. Die dritte Blutentnahme wurde am Vormittag des zweiten Studientages als 24 h-Wert durchgeführt und ab diesem Tag wurde jeden Abend jeweils ein Bier (500 ml) getrunken. Mit einer Blutabnahme am Vormittag des Tages 13 wurde die Studie beendet (Studiendesign siehe 2.2.3.3.).

Auch diese Studie wurde als Pilotstudie betrachtet, die erst bei augenfälligen Ergebnissen eine Überprüfung an einer höheren Zahl von Probanden unter geregelten Bedingungen nach sich ziehen sollte. Über den Zeitraum des Versuches wurde von den Probanden keine besondere Diät eingehalten, aber ein genaues Ernährungsprotokoll geführt.

Proband E beendete die Studie bereits nach 6 Tagen; die entsprechenden Ergebnisse sind als 6 d-Werte gekennzeichnet.

3.2.3.1. In vivo-Untersuchungen

Bei jeder Blutabnahme wurden die Blutwerte der Probanden durch ein medizinisches Labor bestimmt. Neben den Vollblut-Versuchen zur Bestimmung der Aktivität der zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde das gewonnene Plasma auf seine antioxidative Kapazität im X/XOD-System und im Fenton-System getestet. Desweiteren wurde das isolierte LDL in der kupferinduzierten Oxidation auf einen möglichen Oxidationsschutz untersucht.

3.2.3.1.1. Blutwerte

Von den Blutwerten sind in der nachfolgenden **Tabelle 72** neben der Harnsäure, die als ein körpereigenes Antioxidans im Plasma fungiert (Halliwell und Gutteridge, 1999), die Blutfettwerte der Probanden aufgelistet.

Mit Ausnahme der Probanden B und C waren die Harnsäure-Werte 30 min nach dem Bierkonsum um 0,30 – 0,58 mg/dl höher als die Ausgangswerte. Bezüglich der anderen Zeitpunkte lassen sich keine einheitlichen Aussagen treffen.

Bezüglich der Cholesterinwerte zeigte sich, daß sich bei den Probanden B, D und F, die das alkoholreduzierte Testbier 5 tranken, der LDL/HDL-Quotient nach 13 d nicht änderte. Bei den Probanden A und C, die das Testbier 4 mit dem höheren Alkoholgehalt von 5,2% über 13 Tage konsumierten, sank der LDL/HDL-Quotient bei A von 1,0 auf 0,8 und bei C von 2,1 auf 1,8, wobei diese Abnahme einerseits auf einen höheren HDL-Level und andererseits auf einen niedrigeren LDL-Level im Blut im Vergleich zu den Ausgangswerten zurückzuführen ist. Bei Proband E zeigte sich bei einer Blutabnahme nach bereits sechs Tagen keine Veränderung bezüglich des HDL-Wertes.

Tabelle 72: Cholesterin-, Triglycerid- und Harnsäure-Werte der Probanden in Trinkstudie 3

Analyse	Einheit	Normalwert	0 min	30 min	24 h	13 d
Testbier 4 (5,2%)						
Proband A						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	180	168	174	181
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	88	83	98	94
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	84	76	75	72
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,0	0,9	0,8	0,8
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	59	66	47	40
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	4,60	4,90	4,27	4,78
Proband C						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	172	154	183	173
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	57	53	63	59
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	120	106	117	105
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	2,1	2,0	1,9	1,8
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	38	37	82	74
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	4,41	4,26	4,29	4,43
Proband E						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	151	138	142	157 (6 d)
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	49	46	54	49 (6 d)
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	89	82	84	91 (6 d)
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,8	1,8	1,6	1,9 (6 d)
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	76	89	100	96 (6 d)
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	4,13	4,62	3,41	3,59 (6 d)
Testbier 5 (1,4%)						
Proband B						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	166	147	162	172
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 35	50	46	53	47
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	115	103	101	111
LDL/HDL-Quotient		< 3,5	2,3	2,2	1,9	2,4
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	50	38	84	117
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 7,0	6,12	6,08	6,31	5,65
Proband D						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	246	236	249	257
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	49	48	51	47
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	198	190	180	186
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	4,0	4,0	3,5	4,0
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	112	114	161	140
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	6,52	7,10	6,79	6,38
Proband F						
Cholesterin	mg/dl	120 – 200	137	135	134	147
HDL-Cholesterin	mg/dl	> 45	47	47	52	51
LDL-Cholesterin	mg/dl	< 135	77	76	81	84
LDL/HDL-Quotient		< 2,5	1,6	1,6	1,6	1,6
Triglyceride	mg/dl	74 – 172	92	106	79	86
Harnsäure	mg/dl	2,0 – 5,7	4,24	4,68	4,11	4,23

3.2.3.1.2. Vollblut-System

Die Anzahlen der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probanden sind aus **Tabelle 73** zu entnehmen. Hierbei zeigt sich, daß die Probanden A, C und E direkt nach dem Konsum von Testbier 4 mit einem leichten Rückgang der Immunzellen reagierten, während nach 24 h wieder die Ausgangswerte (Proband A) beziehungsweise sogar noch höhere Werte erreicht wurden (Probanden C und E). Nach 13tägigem Bierkonsum war, im Gegensatz zu Trinkstudie 2, bei den Probanden A und C eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten meßbar als zu Beginn der Studie.

Mit dem Konsum von Testbier 5 (niedrigerer EtOH-Gehalt von 1,4%) reagierten die Probanden B und D nach 24 h mit einer Abnahme der neutrophilen Granulozyten um $0,8 \times 10^6$ Neutrophile/ml Vollblut und nach 13 d lagen die Werte immer noch unterhalb der Ausgangswerte. Bei Proband F änderte sich die Zahl der Immunzellen innerhalb der ersten 24 h nicht wesentlich, aber nach 13 d war die Anzahl leicht erhöht im Vergleich zum 0min-Wert. Somit läßt sich kein eindeutiger Einfluß der Testbiere 4 und 5 auf die Zahl der Neutrophilen im Blut feststellen.

Tabelle 73: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 3

Proband	Bier	Anzahl neutrophiler Granulozyten ($\times 10^6$ /ml Vollblut)			
		0 min	30 min	24 h	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	3,0	2,6	3,1	3,7
C	Testbier 4 (5,2%)	1,6	1,5	2,1	4,4
E	Testbier 4 (5,2%)	9,4	8,4	14,7	8,6 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	2,9	2,9	1,8	2,3
D	Testbier 5 (1,4%)	5,8	7,4	5,0	5,5
F	Testbier 5 (1,4%)	3,1	2,9	3,1	3,4

Die Testbiere 4 und 5 zeigten bei den gemessenen Zeitpunkten auch keinen deutlichen Effekt auf die Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Bei den Probanden A, B und D war zwar nach 30 min eine deutliche Reduktion in der Ethenfreisetzung zu verzeichnen, ansonsten war innerhalb der Standardabweichungen ein relativ einheitliches Aktivitätsniveau der Neutrophilen zu den verschiedenen Zeitpunkten zu beobachten (**Abb. 69, Tab. 74**). Der in Trinkstudie 2 festgestellte erhebliche Rückgang des Aktivierungsstatus nach 24 h wurde nur tendenziell, dafür aber bei allen Probanden, durch das Testbier 4 ausgelöst. Nach dem Konsum von Testbier 5 reagierte nur Proband B in dieser Weise.

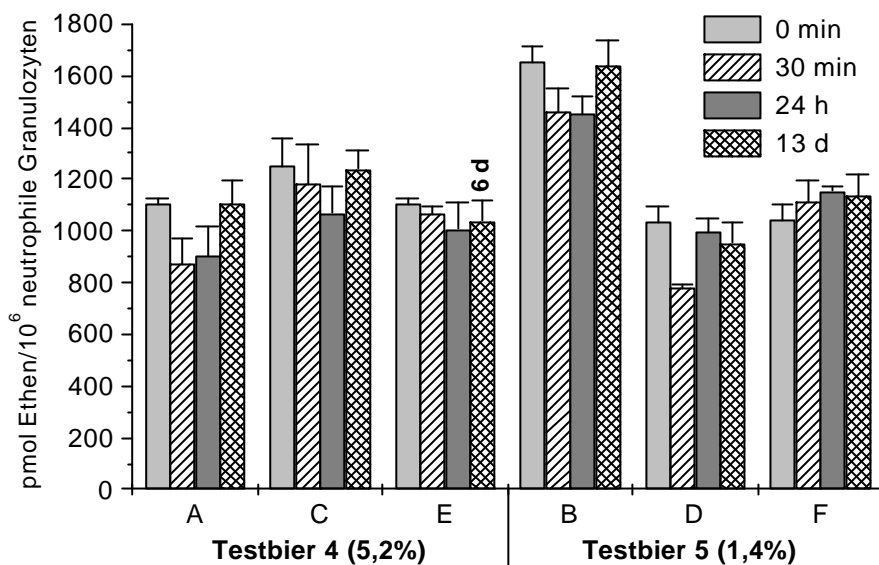


Abbildung 69: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 3

Tabelle 74: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 3

Proband	Bier	pmol Ethen/10 ⁶ neutrophile Granulozyten			
		0 min	30 min	24 h	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	1103 ± 25	874 ± 98	905 ± 109	1102 ± 96
C	Testbier 4 (5,2%)	1251 ± 108	1184 ± 153	1068 ± 105	1239 ± 77
E	Testbier 4 (5,2%)	1102 ± 21	1066 ± 29	1007 ± 101	1037 ± 84 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	1654 ± 60	1460 ± 91	1454 ± 65	1636 ± 104
D	Testbier 5 (1,4%)	1032 ± 62	779 ± 15	996 ± 50	954 ± 76
F	Testbier 5 (1,4%)	1041 ± 63	1113 ± 85	1155 ± 14	1137 ± 80

3.2.3.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Dem Testsystem wurden jeweils 300 µl Plasma zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität zugesetzt. Dabei erhöhte sich das antioxidative Potential tendenziell um 4 – 7% 30 min nach Beginn des Trinkens von Testbier 4 sowie von Testbier 5. Eine Ausnahme bildet Proband B, dessen Plasmapotential bei den ersten drei gemessenen Zeitpunkten auf einem Level blieb (**Abb. 70**). Nach 24 h wurden wieder die Ausgangswerte erreicht beziehungsweise konnte bei den Probanden A und C eine im Vergleich zu den Anfangswerten verringerte antioxidative Kapazität des Plasmas gemessen werden (**Tab. 75**), die in einer erhöhten Ethenfreisetzung zum Ausdruck kommt. Außer bei Proband A konnte ebenfalls die in Trinkstudie 2 möglicherweise durch den 14tägigen Konsum von Testbier 2 (Bier mit höherem Stammwürzegehalt) erreichte Hemmung der X/XOD-Reaktion reproduziert werden. Im Vergleich zu den Kontrollwerten zeigte das 13 d-Plasma der fünf Probanden ein um 13 – 37% erhöhtes antioxidatives Potential.

Damit ergaben sich in diesem Testsystem keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Bieren.

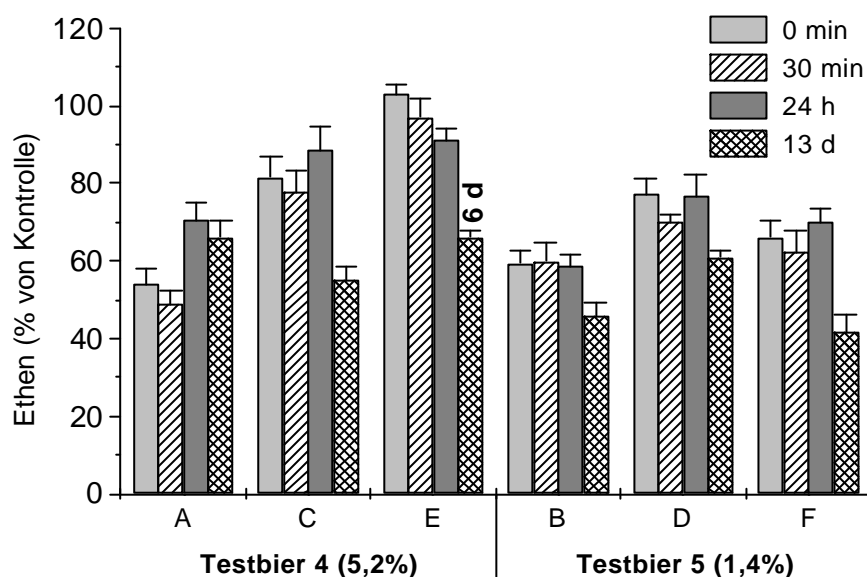


Abbildung 70: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 3 im X/XOD-System

Tabelle 75: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 3 im X/XOD-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)			
		0 min	30 min	24 h	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	54 ± 4	49 ± 4	71 ± 4	66 ± 5
C	Testbier 4 (5,2%)	82 ± 5	78 ± 6	89 ± 6	55 ± 4
E	Testbier 4 (5,2%)	103 ± 2	97 ± 5	91 ± 3	66 ± 2 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	59 ± 3	60 ± 5	59 ± 3	46 ± 3
D	Testbier 5 (1,4%)	77 ± 4	70 ± 2	77 ± 5	61 ± 2
F	Testbier 5 (1,4%)	66 ± 4	62 ± 5	70 ± 4	42 ± 5

3.2.3.1.4. Fenton-System

Die im X/XOD-System beobachteten Effekte, vor allem die Erhöhung des antioxidativen Potentials nach 13 d, zeigten sich im Fenton-System nicht (**Abb. 71**, **Tab. 76**). Dementsprechend scheint im Plasma durch das Trinken der Testbiere 4 und 5 in vivo kein erhöhtes Potential zum Abfangen der in der Fenton-Reaktion generierten Hydroxylradikale zu bestehen.

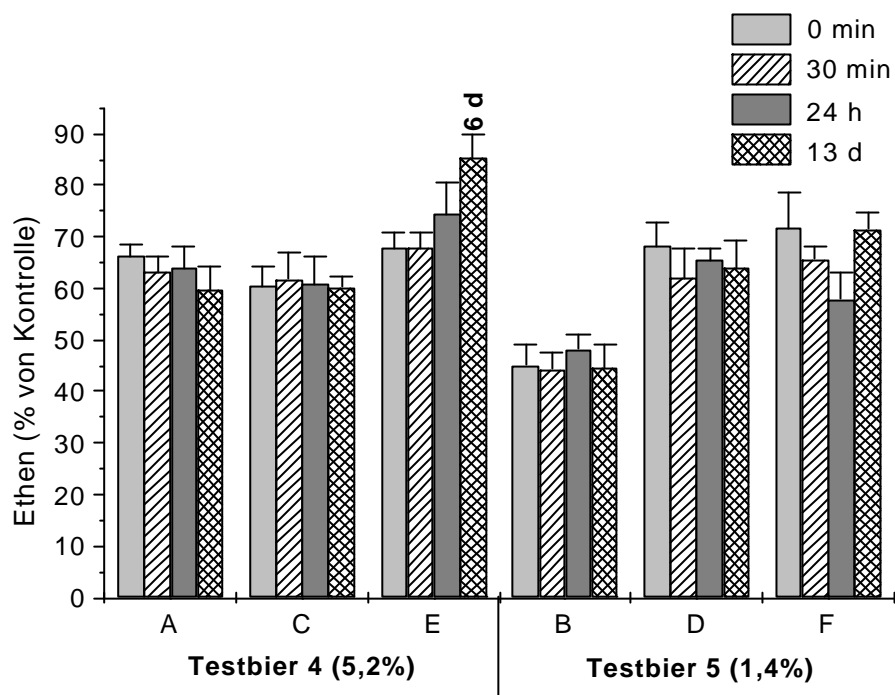


Abbildung 71: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 3 im Fenton-System

Tabelle 76: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 3 im Fenton-System

Proband	Bier	Ethen (% von Kontrolle)			
		0 min	30 min	24 h	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	66 ± 2	63 ± 3	64 ± 4	60 ± 5
C	Testbier 4 (5,2%)	61 ± 4	62 ± 5	61 ± 6	60 ± 2
E	Testbier 4 (5,2%)	68 ± 3	68 ± 3	75 ± 6	85 ± 5 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	45 ± 4	44 ± 3	48 ± 3	44 ± 5
D	Testbier 5 (1,4%)	68 ± 5	62 ± 6	65 ± 2	64 ± 5
F	Testbier 5 (1,4%)	72 ± 7	66 ± 2	58 ± 5	72 ± 3

3.2.3.1.5. Proteingehalt im Plasma

Tabelle 77 zeigt die berechneten Werte der Plasmaproteine, die keine wesentlichen Veränderungen aufweisen.

Tabelle 77: Proteingehalt im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 3

Proband	Bier	Proteingehalt im Plasma (mg/ml)			
		0 min	30 min	24 h	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	70,1 ± 1,2	71,5 ± 3,3	68,2 ± 0,4	73,6 ± 3,7
C	Testbier 4 (5,2%)	70,7 ± 2,6	72,0 ± 1,4	75,2 ± 1,5	70,9 ± 2,1
E	Testbier 4 (5,2%)	74,5 ± 1,7	69,4 ± 1,3	76,1 ± 1,6	75,0 ± 1,6 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	74,3 ± 2,0	72,5 ± 2,4	70,6 ± 2,9	75,0 ± 1,5
D	Testbier 5 (1,4%)	74,1 ± 1,8	73,9 ± 0,7	72,4 ± 1,8	72,0 ± 2,9
F	Testbier 5 (1,4%)	70,8 ± 2,6	70,5 ± 0,4	72,4 ± 3,4	72,0 ± 2,0

3.2.3.1.6. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation wies das aus dem Probandenplasma isolierte LDL keinen erhöhten Oxidationsschutz auf; die in **Tabelle 78** dargestellten Lag-Phasen befinden sich alle im gleichen Bereich.

Tabelle 78: Lag-Phasen des LDL der Probanden aus Trinkstudie 3 in der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Proband	Bier	Lag-Phase (min)		
		0 min	30 min	13 d
A	Testbier 4 (5,2%)	112	112	112
C	Testbier 4 (5,2%)	104	104	108
E	Testbier 4 (5,2%)	109	104	91 (6 d)
B	Testbier 5 (1,4%)	107	107	95
D	Testbier 5 (1,4%)	108	108	113
F	Testbier 5 (1,4%)	111	111	111

3.2.3.2. In vitro- und ex vivo-Untersuchungen der Biere aus Trinkstudie 3

Analog zu den durchgeführten in vivo-Untersuchungen wurden die Testbiere 4 und 5 ebenfalls im Vollblut-, X/XOD-, Fenton-System und im System der kupferinduzierten LDL-Oxidation getestet. Dabei wurden Konzentrationsreihen der Biere sowohl in vitro als auch ex vivo mit dem Vollblut eines freiwilligen Spenders beziehungsweise in Anwesenheit von Plasma aus einem Plasmapool untersucht.

3.2.3.2.1. Vollblut-System

Bei einer ex vivo getesteten Konzentrationsreihe von Testbier 5 wirkte dieses bei einer Konzentration von 5% i.A. deutlich immunsuppressiv auf die neutrophilen Granulozyten, wobei die Ethenentstehung um 50% abnahm (**Abb. 72, Tab. 79**). Die niedrigeren Konzentrationen zeigten keinen Effekt. Bei Testbier 4 dagegen konnte bei 0,1% i.A. eine leichte Stimulierung der Aktivität der Immunzellen um 18% festgestellt werden. Bei 5% i.A. wurde im Vollblut dieses Spenders ebenfalls eine deutliche Reduktion der Aktivität um 40% im Vergleich zur Kontrolle registriert. Dabei kann es sich nicht um einen Ethanol-Effekt handeln, da in allen Ansätzen, einschließlich der Kontrolle, die EtOH-Konzentration konstant auf 1,4% bzw. 5,2% gehalten wurde.

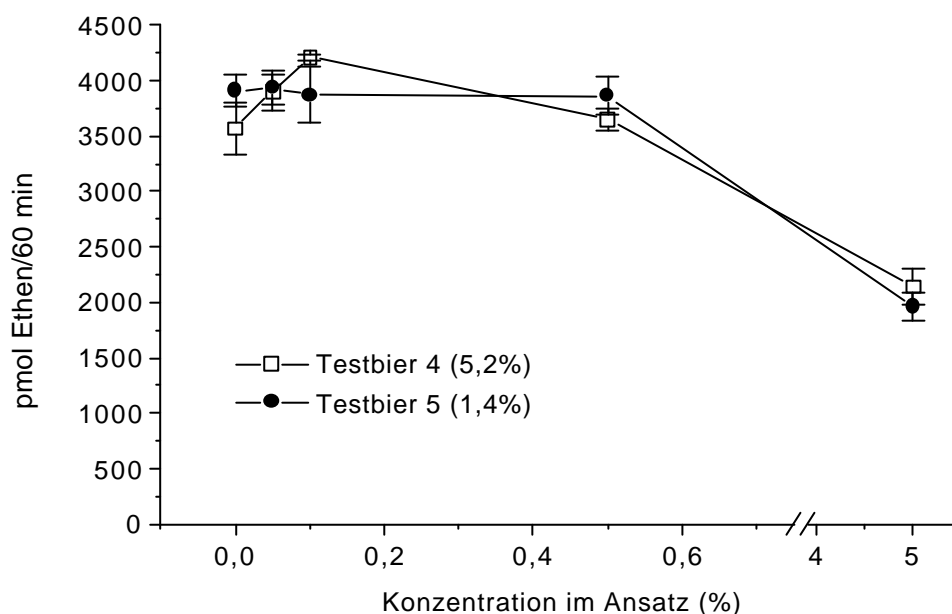


Abbildung 72: Einfluß der Testbiere 4 und 5 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Tabelle 79: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Konzentration (% im Ansatz)	pmol Ethen/60 min	
	Testbier 4 (5,2%)	Testbier 5 (1,4%)
0,00	3566 ± 231	3911 ± 153
0,05	3898 ± 166	3937 ± 158
0,10	4210 ± 25	3871 ± 254
0,50	3653 ± 95	3863 ± 169
5,00	2141 ± 167	1960 ± 129

3.2.3.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Die Testbiere 4 und 5 wurden in Form von Konzentrationsreihen auf ihre antioxidative Kapazität im X/XOD-System untersucht, wobei der jeweilige EtOH-Gehalt konstant gehalten wurde. Die konzentrationsabhängigen Abnahmen der Ethenfreisetzung sind in **Abbildung 73** und **Tabelle 80** gezeigt. Bei Testbier 5 bewirkten die Bierinhaltsstoffe unter der geringeren Menge an EtOH im Ansatz eine etwas bessere Hemmung der Ethenfreisetzung als das Testbier 4 mit dem höheren EtOH-Gehalt. Da sich die Biere nur in ihrem EtOH-Gehalt voneinander unterscheiden und der EtOH-Effekt durch Zugabe der entsprechenden Menge an EtOH zur Kontrolle ausgeschaltet wurde, sollten erwartungsgemäß die beiden Kurven aufeinander liegen. Möglicherweise werden antioxidativ wirksame Verbindungen durch den höheren EtOH-Gehalt in Testbier 4 maskiert.

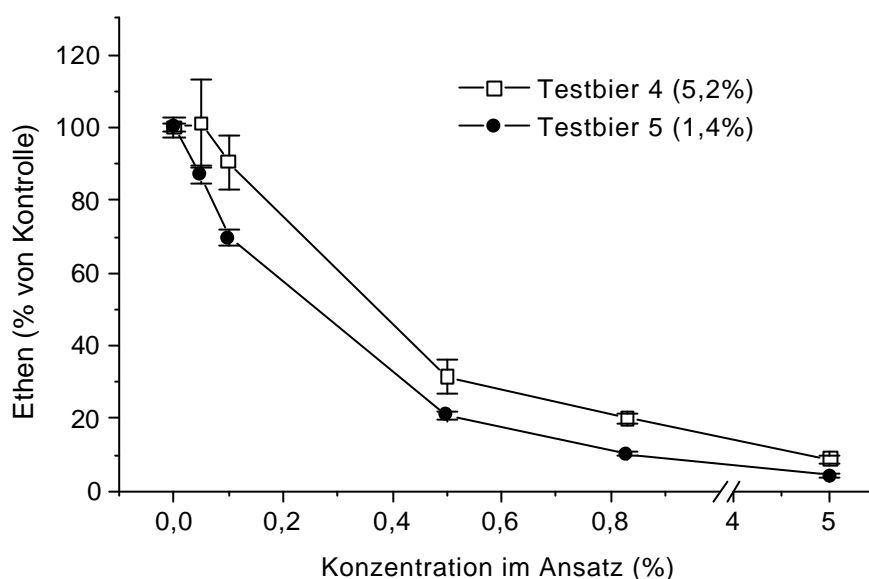


Abbildung 73: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System (in vitro)

Tabelle 80: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System (in vitro)

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)	
	Testbier 4 (5,2%)	Testbier 5 (1,4%)
0,00	100 ± 3	100 ± 1
0,05	101 ± 12	87 ± 3
0,10	91 ± 7	70 ± 2
0,50	32 ± 5	21 ± 1
0,83	20 ± 2	10 ± 1
5,00	9 ± 1	4 ± 0

Die Testbiere 4 und 5 wurden auch in Gegenwart von Plasma in einer Konzentration durch den Einsatz von 300 µl der vorinkubierten Plasma-Bier-Gemische getestet (ex vivo). Dazu wurden die Biere jeweils 1:6 in Plasma verdünnt; dies entspricht einer Bierkonzentration von 0,83% i.A.

Abbildung 74 zeigt, daß das Plasma selbst eine Hemmung des Systems um 31% bewirkte. Der Zusatz einer 1,4%igen EtOH-Lösung zum Plasma (entsprechend des EtOH-Gehaltes von Testbier 5) führte zu einer weiteren Hemmung auf 47%, während die 5,2%ige EtOH-Lösung im Plasma (entsprechend des EtOH-Gehaltes von Testbier 4) eine Restaktivität von 27% erreichte (**Tab. 81**) und damit den Einfluß von EtOH auf das X/XOD-System deutlich macht. Beide Plasma-Bier-Kombinationen zeigten dagegen, unabhängig vom EtOH-Gehalt, eine Verringerung der Ethenentstehung bis auf 13% beziehungsweise 15% Restaktivität. Damit weisen die beiden Biere das gleiche antioxidative Potential auf. Die um 14% erhöhte antioxidative Kapazität von Testbier 4 ist im Vergleich zur EtOH-Kombination mit 5,2% auf die Bierinhaltsstoffe zurückzuführen, während bei Testbier 5 die Erhöhung des antioxidativen Potentials durch die Inhaltsstoffe im Gegensatz zur Plasma-EtOH-Kombination 32% ausmacht.

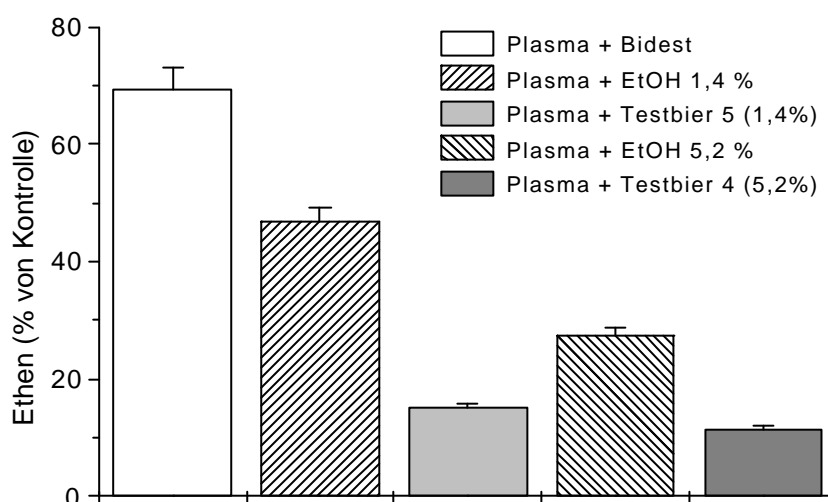


Abbildung 74: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System (ex vivo)

Tabelle 81: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System (ex vivo)

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Plasma + Bidest	69 ± 4
Plasma + ethanolische Lösung 1,4%	47 ± 2
Plasma + Testbier 5 (1,4%)	15 ± 1
Plasma + ethanolische Lösung 5,2%	27 ± 1
Plasma + Testbier 4 (5,2%)	13 ± 1

3.2.3.2.3. Fenton-System

Wie bereits bei der Untersuchung der Biere aus Trinkstudie 2 festgestellt wurde, bewirkten die Biere im Testsystem mit EDTA eine Stimulierung der Reaktion, d.h. es wurden im Vergleich zur Kontrollreaktion mehr Radikale gebildet, die das Indikatormolekül KMB oxidativ spalten können (in vitro, **Abb. 75, Tab. 82**). Sowohl Testbier 4 als auch Testbier 5 reagierten gleichermaßen, was damit nicht auf einen EtOH-Einfluß hinweist.

Dabei handelt es sich bei dieser Reaktionsstimulierung wahrscheinlich um ein Artefakt, das auf die Verwendung von EDTA zurückzuführen ist (siehe auch **3.2.2.2.3.**). Je höher der Stammwürzegehalt der getesteten Biere war, desto stärker wurde diese Reaktion stimuliert. Dementsprechend bewirkten auch die vorinkubierten Plasma-Bier-Kombinationen (ex vivo) eine minimal höhere Ethenausbeute im Vergleich zu den EtOH-Kontrollen im Plasma (**Abb. 76, Tab. 83**). Die Reaktionsstimulierungen von ca. 100% im in vitro-System bei 0,83% Bier i.A. (**Tab. 82**) werden durch Bestandteile des Plasmas fast vollständig gehemmt.

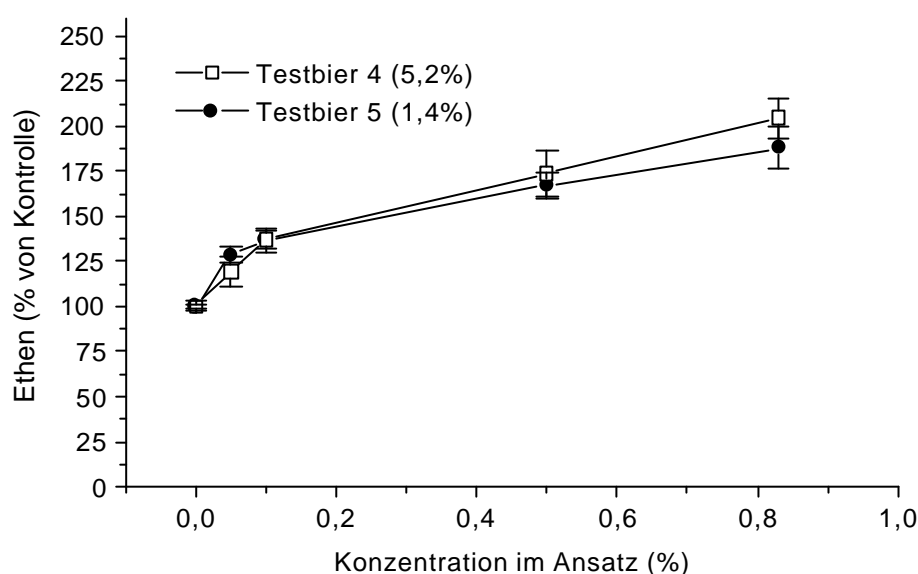


Abbildung 75: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Ethenentstehung im Fenton-System (in vitro)

Tabelle 82: Einfluß von Testbier 4 und 5 auf die Ethenentstehung im Fenton-System (in vitro)

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)	
	Testbier 4 (5,2%)	Testbier 5 (1,4%)
0,00	100 ± 1	100 ± 3
0,05	119 ± 9	129 ± 5
0,10	137 ± 5	137 ± 7
0,50	174 ± 12	167 ± 7
0,83	205 ± 11	188 ± 12

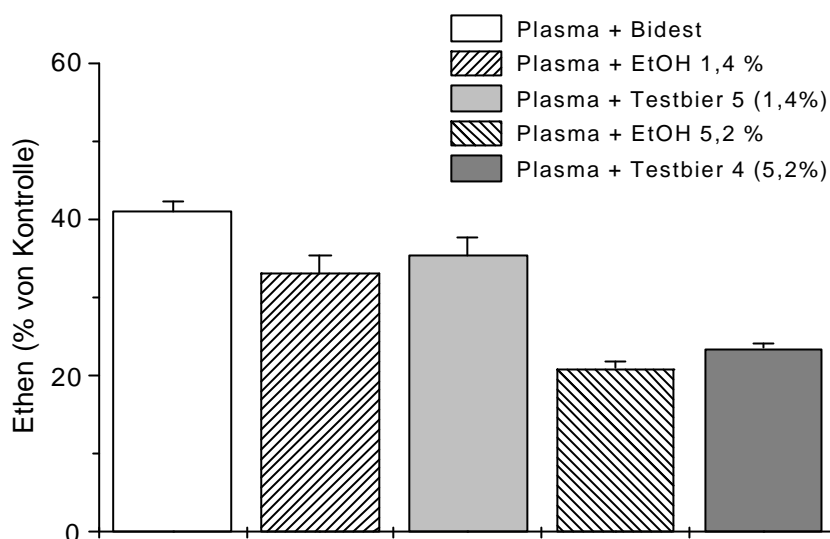


Abbildung 76: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im Fenton-System (ex vivo)

Tabelle 83: Einfluß von mit Bier vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im Fenton-System (ex vivo)

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Plasma + Bidest	41 ± 1
Plasma + ethanolische Lösung 1,4%	33 ± 2
Plasma + Testbier 5 (1,4%)	35 ± 2
Plasma + ethanolische Lösung 5,2%	21 ± 1
Plasma + Testbier 4 (5,2%)	24 ± 1

3.2.3.2.4. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

In Gegenwart der Testbiere 4 und 5 in einer Verdünnung von 1:200 i.A. wurde eine kupferinduzierte LDL-Oxidation ausgelöst (Direktinkubation). Dabei unterblieb, wie bei der Inkubation mit dem stammwüchzereichen Testbier 2 in Trinkstudie 2, eine typische Kurve der Dienkonjugation. Ab etwa 700 min begann eine Zunahme der Extinktion, die jedoch bei den Kontroll-Inkubationen ohne Kupfer in gleichem Maße auftrat (**Abb. 77**). Damit zeigten die Testbiere 4, und 5, die sich durch einen hohen Stammwürzegehalt auszeichnen, eine höhere Kapazität der Kupferkomplexierung als das Testbier 3 oder das Helle Bier aus Trinkstudie 2.

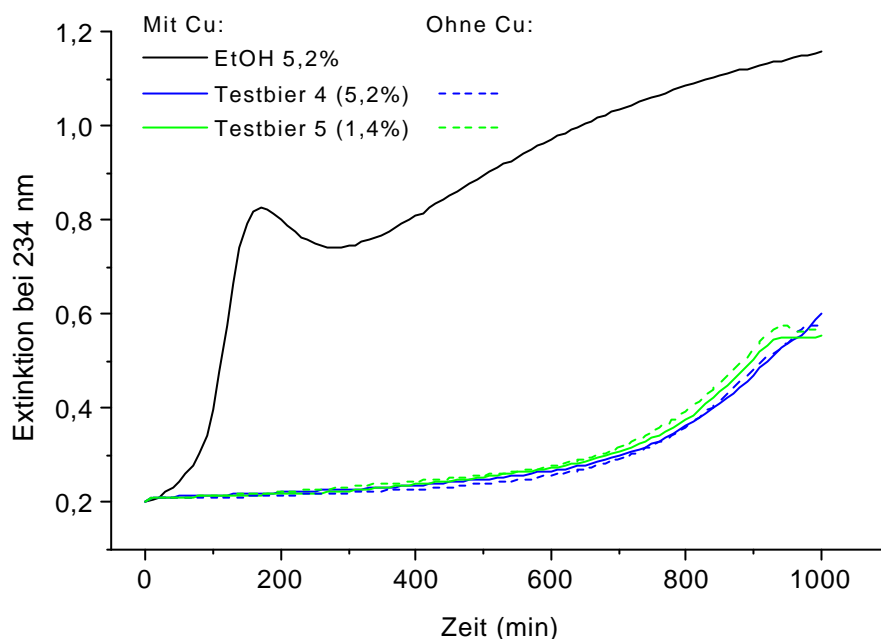


Abbildung 77: Einfluß der Testbiere 4 und 5 (jeweils 0,5% i.A.) auf die LDL-Oxidation bei Direktinkubation

Die beiden Testbiere 4 und 5 wurden ebenfalls mit Plasma aus dem Plasmapool (2,5 ml Plasma + 0,5 ml Bier) vorinkubiert mit einer anschließenden LDL-Isolation. Bei einer kupferinduzierten LDL-Oxidation konnte für dieses vorinkubierte LDL kein Oxidationsschutz festgestellt werden.

3.2.3.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 3

In dieser Trinkstudie wurden die physiologischen Wirkungen zweier Biere in vivo untersucht, die mit einem hohen Anteil an Stammwürze gebraut wurden (Salvator). Im Vordergrund stand hierbei die Frage, ob der EtOH-Gehalt von Bier die Wirkungen effektiv beeinflusst.

Dazu wurde jeweils das Testbier 4 mit einem normalen Alkoholgehalt von 5,2% und das alkoholreduzierte Testbier 5 mit einem Alkoholgehalt von 1,4% über die Dauer von 13 Tagen regelmäßig konsumiert.

Der einzige wesentliche Unterschied zwischen den Bieren lag bei den in vivo-Untersuchungen in einer Verbesserung der LDL/HDL-Quotienten der Probanden nach dem 13tägigen regelmäßigen Konsum von Testbier 4, welches einen normalen Alkoholgehalt von 5,2% aufwies. Das alkoholreduzierte Testbier zeigte diesbezüglich keinerlei Einfluß. Außerdem fiel im Zusammenhang mit den Blutwerten eine leichte Erhöhung des Harnsäurespiegels 30 min nach dem Bierkonsum auf; dieser Effekt trat aber unabhängig vom EtOH-Gehalt des Bieres auf. Die Erhöhung der Harnsäure als endogenes Plasma-Antioxidans korrelierte nicht mit dem Anstieg der antioxidativen Kapazität im X/XOD-System beziehungsweise zeigte auch im Fenton-System keinen Einfluß.

Bezüglich der Anzahlen der Neutrophilen im Blut ließen sich in vivo keine eindeutigen Tendenzen feststellen, aber in ihrer Aktivität wurden die Immunzellen leicht gehemmt. Dieser Effekt trat bei den „ex vivo“-Untersuchungen nur bei der höchsten getesteten Konzentration von 5% i.A. bei beiden Bieren, d.h. unabhängig vom EtOH-Gehalt, auf.

Durch den Konsum von 500 ml Bier konnte das antioxidative Potential des Plasmas angehoben werden, wobei ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Testbieren festzustellen war. Dabei zeigten fünf der sechs Probanden 30 min nach dem Trinken von Testbier 4 beziehungsweise von Testbier 5 (alkoholreduziert) die Tendenz einer erhöhten antioxidativen Plasmakapazität. Nach 13 d war, unabhängig vom Alkoholgehalt des konsumierten Bieres, ein deutlich erhöhtes antioxidatives Potential festzustellen, welches die Ergebnisse aus Trinkstudie 2 nach 14tägigem Bierkonsum des Testbieres 2, das ebenfalls einen höheren Anteil an Stammwürze enthielt, zu bestätigen scheint. Auch in den ex vivo-Untersuchungen in der Kombination mit Plasma wiesen die beiden Biere das gleiche antioxidative Potential auf.

Im Fenton-System konnte dagegen in vivo keine höhere antioxidative Kapazität beobachtet werden.

Weiterhin bewirkten die Testbiere 4 und 5 in vivo keinen LDL-Oxidationsschutz des aus dem Plasma isolierten LDL. Auch Vorinkubationen von LDL aus dem Plasmapool mit den Testbieren führten nicht zu einer Hemmung der LDL-Oxidation durch eine Anreicherung von Bierinhaltsstoffen. Bei der direkten Inkubation von isoliertem LDL mit den Testbieren kam dagegen deren kupferkomplexierende Eigenschaft zum Tragen, indem sie die kupferinduzierte LDL-Oxidation erheblich inhibierten.

Die günstigen Wirkungen des Alkoholgehaltes von 5,2% auf die Blutfettwerte der Probanden und die positiven in vivo-Effekte im X/XOD-System, die unabhängig vom EtOH-Gehalt des Bieres als „Salvator-Effekt“ auftraten, gaben den Ausschlag für die Rezeptur von Testbier 6, dessen physiologische Wirkungen in einer weiteren Trinkstudie untersucht werden sollten. Dabei sollte das Bier mit einem hohen Stammwürzegehalt, einem hohen Gehalt an Hopfen und einem normalen EtOH-Gehalt von mindestens 5,0% gebraut werden.

Diese Trinkstudie 4 sollte mit einer größeren Anzahl an Probanden über eine Dauer von drei Tagen durchgeführt werden, wobei die zu konsumierende Biermenge auf 1l angehoben wurde, um nach Möglichkeit deutlichere Effekte als in den vorherigen Studien zu bewirken.

3.2.4. Trinkstudie 4

In dieser Studie wurde das Testbier 6, das sich durch einen hohen Stammwürzegehalt, einen hohen Hopfengehalt und einen Alkoholgehalt von 5,6% auszeichnete, von einer größeren Gruppe von Probanden konsumiert und dessen Wirkung auf das antioxidative Potential von Plasma beziehungsweise auf die neutrophilen Granulozyten untersucht werden. Insgesamt nahmen 17 Probanden an dieser dreitägigen Studie teil, wobei am ersten Tag abends, nach der Entnahme von Kontrollblut, 1 l des Testbieres innerhalb von 30 min getrunken wurde und 45 min nach Beginn des Trinkens eine zweite Blutentnahme stattfand. An den folgenden zwei Abenden tranken die Probanden jeweils 1 l Bier und nach einer Blutabnahme (nüchtern) am darauffolgenden Morgen ($t = 3$ d) wurde die Studie beendet (Studiendesign siehe 2.2.3.4.).

3.2.4.1. In vivo-Untersuchungen

Neben den Blutwerten bei jeder Blutabnahme wurde die Aktivität der zymosan-stimulierten neutrophilen Granulozyten im Vollblut der Probanden bestimmt. Desweiteren wurde das gewonnene Plasma zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität im X/XOD-System eingesetzt und das aus den Plasmaproben isolierte LDL einer kupferinduzierten Oxidation unterzogen, um weitere Daten über einen möglichen Oxidationsschutz des LDL zu gewinnen. Eine Untersuchung im Fenton-System wurde nicht durchgeführt.

3.2.4.1.1. Blutwerte

Bezüglich der Blutwerte waren nach drei Tagen keine signifikanten Veränderungen durch das Trinken von 1 l Bier im Blut der Probanden festzustellen. Aufgrund der marginalen Veränderungen wird auf eine Darstellung der Werte verzichtet.

Erwähnenswert erscheinen allerdings die Harnsäure-Werte, die nach dem dreitägigen Bierkonsum bei 12 Probanden um durchschnittlich $0,72 (\pm 0,35)$ mg/dl höher waren als zu Beginn der Studie. Ebenso war bei allen Probanden eine durchschnittliche Erhöhung der Harnsäure von $0,54 (\pm 0,15)$ mg/dl und der Triglyceride um $47 (\pm 24)$ mg/dl im Blut bei den 45 min-Werten zu beobachten. Im Vergleich zu den Ausgangswerten zeigten die Hämatokritwerte des Blutes nach 45 min bei 14 der 17 Probanden eine leichte Abnahme von durchschnittlich $2,05 (\pm 0,76)\%$, was sicherlich auf einen Verdünnungseffekt durch die Flüssigkeitsaufnahme von 1 l Bier zurückzuführen ist.

3.2.4.1.2. Vollblut-System

Die für die Umrechnung der im Vollblut-System produzierten Ethenmengen auf 10^6 Neutrophile zugrundeliegenden Anzahlen der neutrophilen Granulozyten im Blut sind in **Tabelle 84** dargelegt. Hierbei zeigte sich bei 14 der 17 Probanden (außer Proband L, M und P) am Tag 3 eine deutliche Abnahme der neutrophilen Granulozyten um $1,10 (\pm 0,74) \times 10^6$ Neutrophile/ml Blut im Vergleich zu den Ausgangswerten. Gleichzeitig war nach 3 Tagen eine signifikante Reduktion der Neutrophilen-Aktivität bei den gemessenen zwölf Vollblutproben der Probanden A bis M festzustellen, die sich im Bereich von 15 – 64% bewegt (**Abb. 78, Tab. 85**). Bereits 15 min nach dem Trinken von 1 l Bier deutet sich diese Aktivitätsabnahme bei neun der zwölf Probanden an, wobei der größte Aktivitätsverlust von 28% bei Proband B zu beobachten war. Die Daten der fünf Probanden N – T aus der letzten Versuchsgruppe konnten im Vollblut-System nicht ausgewertet werden.

Tabelle 84: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 4

Proband	Anzahl neutrophiler Granulozyten ($\times 10^6$ /ml Vollblut)		
	0 min	45 min	3 d
A	4,6	4,6	3,3
B	3,1	3,7	2,7
C	5,8	5,6	3,4
D	4,4	4,6	3,4
E	2,5	3,7	2,4
F	4,6	4,4	3,7
G	3,1	3,1	1,8
H	6,2	6,2	4,4
I	4,1	4,0	3,9
K	2,0	2,2	1,7
L	5,0	4,9	7,2
M	3,8	4,4	4,2
N	6,1	6,2	3,7
O	5,5	6,2	4,3
P	5,1	5,0	5,2
S	4,5	4,9	3,2
T	3,8	4,1	2,9

Tabelle 85: Einfluß von Testbier 6 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 4

Proband	pmol Ethen/ 10^6 neutrophile Granulozyten			Differenz zu 0 min	
	0 min	45 min	3 d	45 min	3 d
A	1244 \pm 103	1105 \pm 97	449 \pm 29	- 11%	- 64%
B	1050 \pm 21	859 \pm 34	437 \pm 50	- 28%	- 58%
C	1043 \pm 44	920 \pm 25	385 \pm 28	- 12%	- 63%
D	988 \pm 26	1066 \pm 62	605 \pm 43	+ 8%	- 39%
E	1052 \pm 70	1099 \pm 30	475 \pm 24	+ 4%	- 55%
F	1002 \pm 36	923 \pm 99	488 \pm 34	- 8%	- 51%
G	1677 \pm 114	1449 \pm 49	1135 \pm 77	- 14%	- 32%
H	1077 \pm 26	887 \pm 21	683 \pm 62	- 18%	- 37%
I	1016 \pm 74	819 \pm 56	633 \pm 30	- 19%	- 38%
K	1247 \pm 89	1259 \pm 23	999 \pm 92	+ 1%	- 20%
L	1224 \pm 42	1184 \pm 51	911 \pm 59	- 3%	- 25%
M	1488 \pm 70	1395 \pm 75	1271 \pm 8	- 6%	- 15%
N	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
O	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
P	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
S	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
T	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

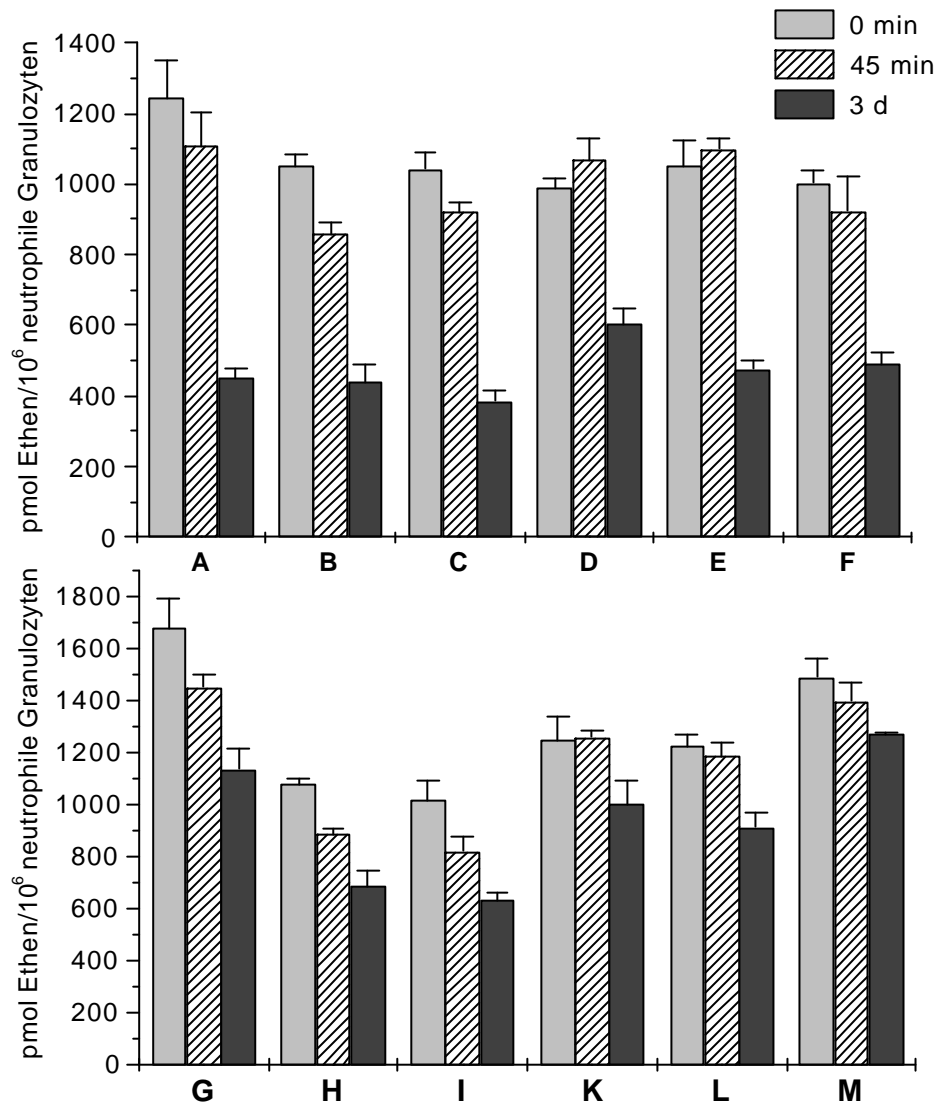


Abbildung 78: Einfluß von Testbier 6 auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Blut der Probanden aus Trinkstudie 4

3.2.4.1.3. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Bei allen Probanden war im X/XOD-System eine erhöhte antioxidative Kapazität des Plasmas zum Zeitpunkt 45 min zu beobachten (**Abb. 79, Tab. 86**). Dabei bewegte sich die Abnahme in der Ethenfreisetzung zwischen 2% (Probanden T und E) und 18% (Proband H) mit einer durchschnittlichen Reduktion von 9,4 ($\pm 4,4$)% bei allen Probanden. Bei den 3d-Werten zeigte sich kein einheitlicher Trend. Außer bei den Probanden D, F, M, N und P war bei den übrigen Probanden im Vergleich zu den 0 min-Werten eine erhöhte Ethenfreisetzung festzustellen, die auf ein niedrigeres antioxidatives Potential als zu Beginn der Studie hinweist. Demnach sind die bei den 45 min-Werten gemessenen positiven Effekte nicht längerfristig im Plasma vorhanden. Die Verminderung der antioxidativen Kapazität des Plasmas nach 3 d ist nicht mit den gemessenen Harnsäure-Werten im Blut zu erklären, denn bei 12 der 17 Probanden konnten sogar höhere Werte als zu Beginn der Studie festgestellt werden.

Die beobachtete Zu- oder Abnahme des Proteingehaltes im Plasma der Probanden (**3.2.4.1.4.**) läßt, bezüglich des Vergleichs der 0 min-Werte mit den 45 min-Werten, keine Proteineffekte in diesem System erkennen, da auch die Plasmaproben mit einem etwas niedrigeren Proteingehalt zum Zeitpunkt 45 min, wie zum Beispiel Proband H, eine deutliche Erhöhung des antioxidativen Potentials aufweisen.

Tabelle 86: Einfluß der Biere auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden aus Trinkstudie 4 im X/XOD-System

Proband	Ethen (% von Kontrolle)		
	0 min	45 min	3 d
A	32 \pm 2	24 \pm 1	42 \pm 3
B	36 \pm 1	27 \pm 1	62 \pm 5
C	62 \pm 3	50 \pm 2	68 \pm 3
D	60 \pm 6	46 \pm 5	54 \pm 4
E	43 \pm 3	41 \pm 3	50 \pm 2
F	51 \pm 3	40 \pm 3	48 \pm 4
G	33 \pm 2	28 \pm 2	71 \pm 5
H	75 \pm 4	57 \pm 4	91 \pm 6
I	43 \pm 3	35 \pm 3	62 \pm 4
K	43 \pm 3	30 \pm 3	49 \pm 3
L	45 \pm 3	35 \pm 2	87 \pm 4
M	36 \pm 3	32 \pm 3	31 \pm 2
N	47 \pm 2	33 \pm 2	35 \pm 3
O	50 \pm 3	38 \pm 3	66 \pm 3
P	52 \pm 2	41 \pm 3	51 \pm 4
S	58 \pm 3	51 \pm 2	62 \pm 3
T	37 \pm 1	35 \pm 2	58 \pm 4

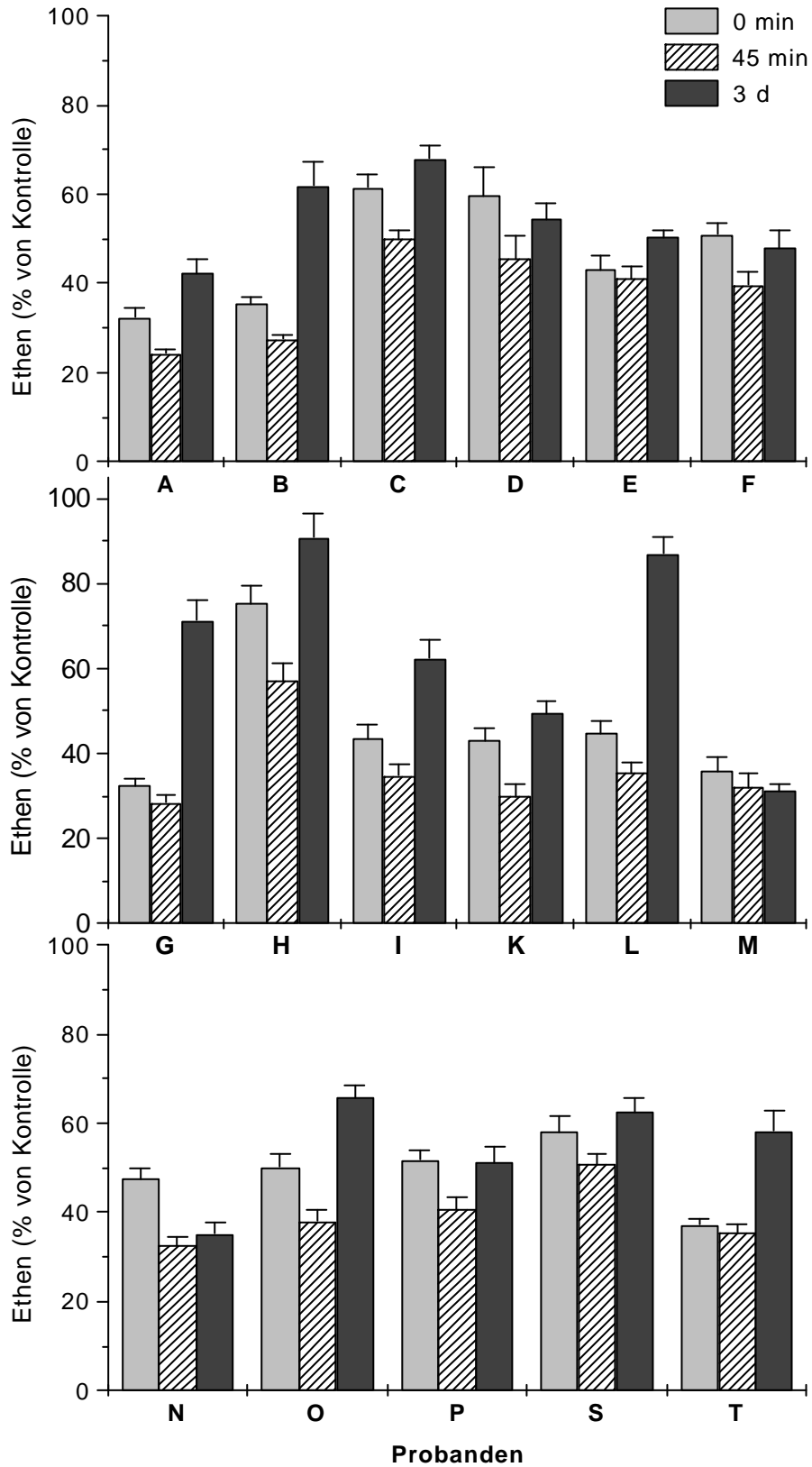


Abbildung 79: Einfluß von Testtier 6 auf die antioxidative Kapazität des Plasmas der Probanden in Trinkstudie 4 im X/XOD-System

3.2.4.1.4. Proteingehalt im Plasma

Tabelle 87 zeigt die Proteingehalte im Plasma, bei denen zum Zeitpunkt 45 min Erniedrigungen bis zu 7mg/ml (bei Proband H) im Vergleich zu den Anfangswerten zu beobachten waren. Dies könnte auf einem Verdünnungseffekt durch die Flüssigkeitsaufnahme beruhen.

Tabelle 87: Proteingehalt im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 4

Proband	Proteingehalt im Plasma (mg/ml)		
	0 min	45 min	3 d
A	71,1 ± 3,2	70,4 ± 0,5	70,6 ± 0,7
B	74,2 ± 1,1	67,1 ± 0,7	71,7 ± 0,9
C	68,1 ± 0,9	67,5 ± 0,3	69,8 ± 0,7
D	72,4 ± 0,5	64,4 ± 1,6	64,5 ± 0,6
E	73,2 ± 0,8	73,1 ± 0,9	74,8 ± 1,9
F	80,8 ± 1,7	74,4 ± 0,7	74,0 ± 1,2
G	74,0 ± 1,6	69,0 ± 0,7	76,0 ± 1,6
H	65,6 ± 0,2	58,0 ± 2,6	66,6 ± 0,5
I	71,2 ± 0,5	75,1 ± 0,5	65,7 ± 1,4
K	69,8 ± 2,1	71,2 ± 1,2	67,0 ± 2,7
L	67,0 ± 0,3	69,0 ± 0,6	71,1 ± 2,0
M	71,1 ± 1,2	66,6 ± 1,9	74,2 ± 1,5
N	69,3 ± 1,5	68,2 ± 0,3	72,4 ± 0,7
O	68,4 ± 0,2	69,0 ± 0,7	71,6 ± 0,8
P	63,4 ± 1,2	66,3 ± 0,3	65,7 ± 0,4
S	68,9 ± 0,5	63,1 ± 0,7	63,2 ± 0,5
T	64,7 ± 0,7	64,8 ± 0,6	61,6 ± 0,2

3.2.4.1.5. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Nach dem Konsum von 1 l Testbier 6 fanden teilweise größere Unterschiede in den Lag-Phasen statt als in den vorhergehenden Trinkstudien. Dabei waren jedoch keine einheitlichen Tendenzen festzustellen. Bei acht der 17 Probanden könnte zum Zeitpunkt 45 min von einer tendenziell reduzierten LDL-Resistenz gegenüber der Oxidation durch Kupferionen gesprochen werden.

Auch nach drei Tagen ergaben sich keine signifikanten Anzeichen einer Lag-Phasenverlängerung, die auf eine erhöhte Oxidationsresistenz des LDL durch das Trinken von Bier schließen lässt

Tabelle 89: Lag-Phasen des LDL der Probanden aus Trinkstudie 3 in der kupferinduzierten LDL-Oxidation

Proband	Lag-Phase (min)		
	0 min	45 min	3 d
A	135	114	122
B	123	109	111
C	107	102	111
D	120	109	111
E	110	100	113
F	113	116	113
G	101	104	111
H	116	116	116
I	105	92	92
K	90	100	114
L	103	100	112
M	99	99	110
N	108	111	124
O	121	110	143
P	113	113	112
S	80	87	85
T	102	107	107

3.2.4.2. In vitro- und ex vivo-Untersuchungen des Bieres aus Trinkstudie 4

Neben dem Vollblut-System wurde das Testbier 6 analog zu den in vivo-Untersuchungen ebenfalls im X/XOD-System getestet, wobei das Bier neben einer Konzentrationsreihe in vitro auch in Gegenwart von Plasma untersucht wurde. Bezüglich der kupferkomplexierenden Eigenschaften wurde das Testbier 6 bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation direkt mit isoliertem LDL inkubiert und die Bildung der konjugierten Diene verfolgt.

3.2.4.2.1. Vollblut-System

Anhand einer Konzentrationsreihe von Testbier 6 zeigte sich im Vollblut eines freiwilligen Blutspenders eine leichte Stimulierung der Aktivität der neutrophilen Granulozyten um ca. 10% bei einer Konzentration von 0,1% im Ansatz im Vergleich zum Kontrollwert (**Abb. 80, Tab. 89**). Bei einer Konzentration von 0,5% i.A. wurden dagegen die Ausgangsmengen an Ethen produziert, während bei einer Konzentration von 5% i.A. eine deutliche Reduktion der Aktivität um 34% im Vergleich zur Kontrolle erreicht wurde. Damit verhält sich dieses Bier bezüglich der Immunmodulation von neutrophilen Granulozyten wie das Testbier 4 (**3.2.3.2.1.**).

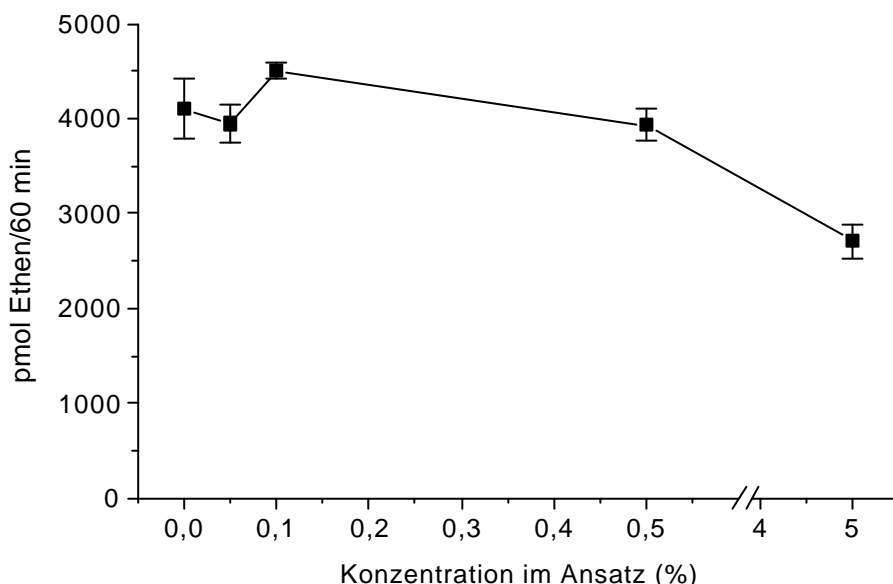


Abbildung 80: Einfluß von Testbier 6 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Tabelle 89: Einfluß von Testbier 6 auf die Ethenentstehung im Vollblut-System

Konzentration (% im Ansatz)	pmol Ethen/60 min Testbier 6
0,00	4101 ± 318
0,05	3946 ± 208
0,10	4508 ± 91
0,50	3932 ± 165
5,00	2712 ± 179

3.2.4.2.2. Xanthin/Xanthinoxidase-System

Auch im X/XOD-System zeigte das Testbier 6 ungefähr die gleiche antioxidative Kapazität wie das Testbier 4 (3.2.3.2.2.). **Abbildung 81** und **Tabelle 90** stellen die aus KMB freigesetzten Ethenmengen dar, die mit steigender Konzentration des Bieres abnehmen, wobei die höchste getestete Konzentration von 5% Bier i.A. eine Hemmung der Grundreaktion (in Anwesenheit von EtOH wie im Testbier) um ca. 86% bewirkte.

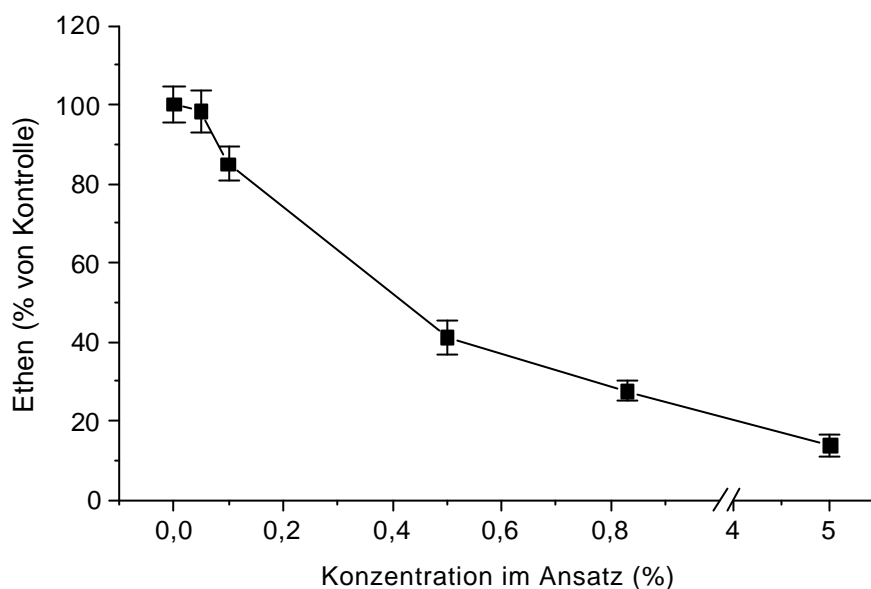


Abbildung 81: Einfluß von Testbier 6 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System

Tabelle 90: Einfluß von Testbier 6 auf die Ethenentstehung im X/XOD-System

Konzentration (% im Ansatz)	Ethen (% von Kontrolle)
	Testbier 6
0,00	100 ± 5
0,05	98 ± 5
0,10	85 ± 4
0,50	41 ± 4
0,83	28 ± 2
5,00	14 ± 3

Wie bei der Untersuchung der anderen Testbiere wurde ein vorinkubiertes Plasma/Bier-Gemisch in einer Verdünnung von 1:6 mit Plasma in das System eingesetzt, was einer Konzentration von 0,83% Bier im Ansatz entspricht. Wie **Abbildung 82** und **Tabelle 91** zeigen, hemmte der Zusatz von 300 µl des mit Bidest verdünnten Plasmas aufgrund der eigenen antioxidativen Kapazität der Plasmabestandteile das X/XOD-System um 31%. Durch den Ethanolgehalt des Bieres von 5,6% wurde die Grundreaktion aufgrund der Radikalfängereigenschaften von EtOH um weitere 45% auf 24% inhibiert. Die zusätzliche Verbesserung des antioxidativen Potentials des Plasma/Bier-Gemisches um 7% auf eine Restaktivität von 17% sind somit auf die im Bier enthaltenen Stoffe zurückzuführen. Damit liegt das Testbier bezüglich seiner antioxidativen Eigenschaften in der untersuchten Konzentration im Plasma im Bereich der anderen Testbiere 2 – 5, die eine Restaktivität des X/XOD-Systems von 12 – 15% im Plasma aufwiesen (3.2.2.2.2. und 3.2.3.2.2.).

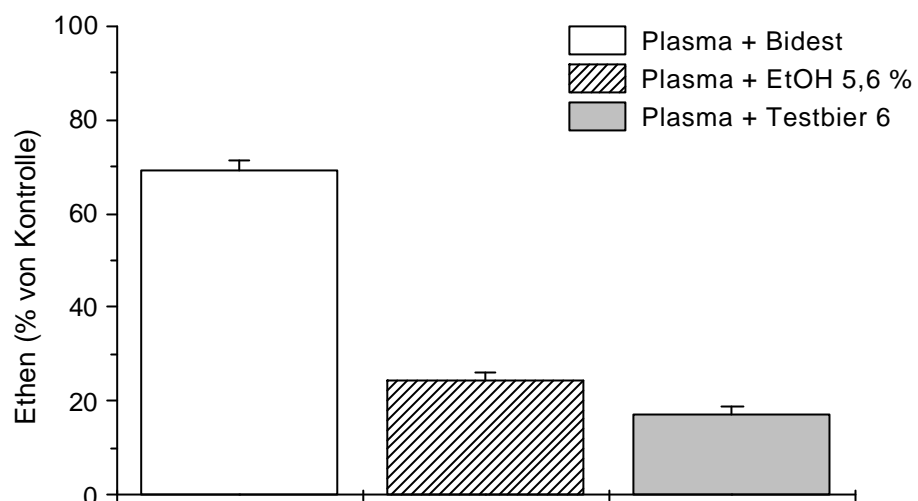


Abbildung 82: Einfluß von vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Tabelle 91: Einfluß von vorinkubiertem Plasma auf die Ethenfreisetzung im X/XOD-System

Testsubstanz	Ethen (% von Kontrolle)
Plasma + Bidest	69 ± 2
Plasma + ethanolische Lösung 5,6%	24 ± 2
Plasma + Testbier 6	17 ± 2

3.2.4.2.3. Kupferinduzierte LDL-Oxidation

Bei der direkten Inkubation von Testbier 6 mit isoliertem LDL aus dem Plasmapool konnte die Lag-Phase der LDL-Oxidation aufgrund der Komplexbildung der induzierenden Kupferionen stark verzögert werden. Bei einer Verdünnung von 1:200 i.A. (= 0,5% i.A.) begann erst nach ca. 750 min ein Anstieg der Extinktion, der im Beobachtungszeitraum bis 1000 min weiter zunahm (**Abb. 83**). Damit zeigte dieses Bier ähnliche Eigenschaften wie die Testbiere 4 und 5 aus Trinkstudie 3.

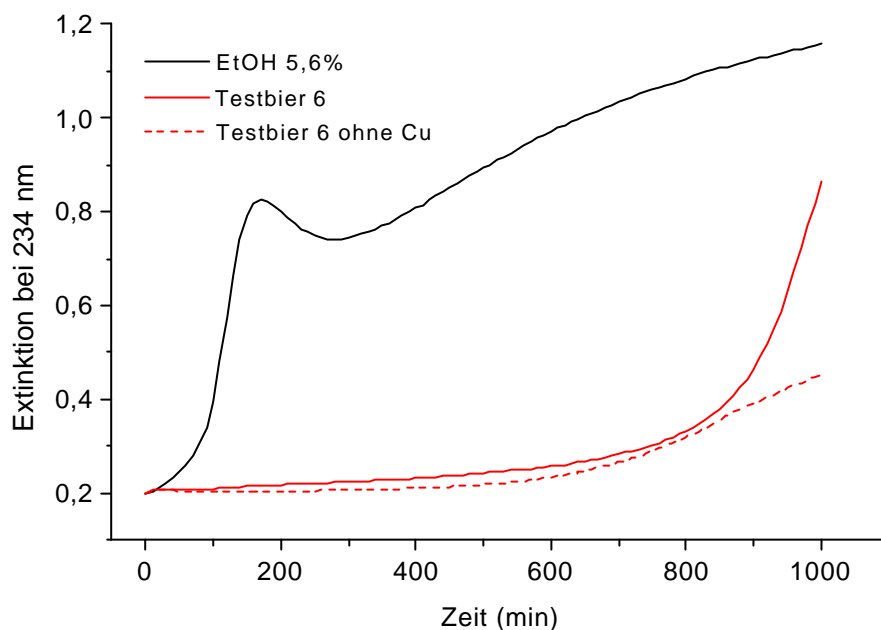


Abbildung 83: Einfluß von Testbier 6 (0,5% i.A.) auf die LDL-Oxidation bei Direktinkubation

3.2.4.3. Zusammenfassung von Trinkstudie 4

In dieser Trinkstudie wurde das Testbier 6, das sich durch einen hohen Stammwürzegehalt, einen hohen Hopfengehalt und einen Alkoholgehalt von 5,6% auszeichnete, auf seine antioxidativen und immunmodulierenden Wirkungen in vivo getestet. Hierbei wurde dieses Bier von 17 Probanden über die Dauer von drei Tagen konsumiert.

Wie in Trinkstudie 3 bewirkte der Konsum von Testbier 6 einen leichten Anstieg der Harnsäure im Blut der Probanden. Im Zusammenhang mit der Flüssigkeitsaufnahme von 1 l (im Gegensatz zu den anderen Studien mit 500 ml Trinkvolumen) sank der Hämatokritwert nach 45 min im Blut der meisten Probanden und dementsprechend auch der Proteingehalt im Plasma etwas ab.

Hinsichtlich einer Immunmodulation zeigte sich das getestete Bier eindeutig wirksam. Bei 14 Probanden sank nach drei Tagen die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut. Auch die Aktivität dieser Immunzellen nahm nach diesen drei Tagen im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ab. Dieser immunsuppressive Effekt stellte sich bereits innerhalb kurzer Zeit zum Zeitpunkt 45 min bei neun der zwölf untersuchten Probanden ein. Auch in den „ex vivo“-Untersuchungen zeigte das Testbier 6 bei 5% im Ansatz eine deutliche immunsuppressive Wirkung.

Eine signifikante Steigerung der antioxidativen Kapazität des Plasmas in vivo konnte nach dem Konsum von 1 l Testbier 6 zum Zeitpunkt 45 min bei allen 17 Probanden im X/XOD-System beobachtet werden. Auch in den ex vivo bzw. in vitro-Untersuchungen zeigte das Testbier 6 sehr gute antioxidative Eigenschaften.

Allerdings war nach dem dreitägigen Bierkonsum *in vivo* kein höheres antioxidatives Potential im Sinne einer Anreicherung antioxidativ wirksamer Substanzen festzustellen, sondern es war sogar eine dramatische Zunahme in der Ethenbildung zu erkennen, die mit einer geringeren antioxidativen Kapazität gleichzusetzen ist. Offensichtlich sind in diesen Plasmaproben Verbindungen enthalten oder es haben sich Veränderungen im Plasma ergeben, wodurch dieses Plasma die X/XOD-Reaktion nicht mehr in dem Maße modulieren kann wie das Kontroll-Plasma zu Beginn der Studie. Im Zusammenhang damit fehlen Untersuchungen in weiteren Testsystemen, in denen ein tatsächlicher Verlust der antioxidativen Kapazität überprüft werden könnte. Eine weitere Untersuchung zum antioxidativen Status des Plasmas im Fenton-System wurde jedoch nicht durchgeführt.

Wie bereits in den Studien zuvor konnte auch in dieser Trinkstudie kein Oxidationsschutz des isolierten Probanden-LDL *in vivo* beobachtet werden. Aber bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation in der direkten Gegenwart des Bieres mit isoliertem LDL aus dem Plasmapool konnte eine erhebliche Lag-Phasen-Verzögerung beobachtet werden, die sehr wahrscheinlich auf einer Komplexierung des Kupfers beruht.

Da Bier aus sehr polyphenolreichen Rohmaterialien wie dem Hopfen und dem Malz hergestellt wird, kann davon ausgegangen werden, daß auch das Bier sehr polyphenolhaltig ist. Auch Hydroxycimtsäuren, die sowohl im Hopfen (de Keukeleire et al., 1999) als auch im Braugetreide vorkommen, sind im Bier in quantitativen Mengen vorhanden (Bourne et al., 2000). Im Getreide liegen diese phenolischen Säuren hauptsächlich als veresterte Bestandteile der Zellwand vor. Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit dieser veresterten Zellwandkomponenten existieren bis jetzt noch keine Daten in Form von Absorptionsstudien im Menschen.

Im nachfolgenden Teil werden die Ergebnisse einer Humanstudie präsentiert, die sich mit der Absorption von Hydroxycimtsäuren und ihren Dimeren aus Weizenkleie-Zerealien befaßte.

3.3. ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN IM MENSCHEN

In dieser Humanstudie wurde die Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren und Diferulaten aus kommerziell erhältlichen Frühstückszerealien mit einem Anteil von 85% Weizenkleie untersucht. Nach dem Verzehr von 100 g dieser Zerealien mit fettarmer Milch wurden sowohl Plasmaproben (1, 3, 6, 9, 12 und 24 h) als auch 24 h-Urinproben von sechs Probanden auf den Gehalt der in den Zerealien vorkommenden Hydroxyzimtsäuren beziehungsweise auf mögliche Metaboliten analysiert.

3.3.1. Analyse der Zerealien

Die verwendeten Zerealien wurden mit Hilfe von HPLC/DAD auf den wasserlöslichen und, nach alkalischer Hydrolyse, auf den gesamten Gehalt an Hydroxyzimtsäuren untersucht. **Tabelle 92** zeigt die Zusammensetzung der Zerealien, wobei für die wasserlösliche Fraktion sowohl die wasserlöslichen freien als auch die gesamt-wasserlöslichen Komponenten, welche die freien und veresterten Hydroxyzimtsäuren umfassen, angegeben sind. Insgesamt enthielten 100 g der Zerealien (bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 3%) ca. 325 mg Hydroxyzimtsäuren.

Hauptsächlich war die *trans*-Ferulasäure (FA) vertreten, die mit 259,1 mg ca. 80% der quantifizierten phenolischen Komponenten ausmachte. Als zweithäufigste Hydroxyzimtsäure wurde die *trans*-Sinapinsäure (SA) mit 19,6 mg (= 6% des Gesamtgehaltes an phenolischen Säuren) detektiert. Vanillin, *p*-Cumarsäure und *cis*-Ferulasäure waren ebenfalls, zum größten Teil verestert, in geringeren Mengen vorhanden.

In der wasserlöslichen Fraktion wurden etwa 7% der gesamten FA gefunden, die ebenfalls hauptsächlich verestert war und nur mit 2,45 mg als Wasser-extrahierbare freie Säure vorlag. Von der Sinapinsäure konnte fast die Hälfte der Gesamtmenge im wasserlöslichen Extrakt gefunden werden, aber nur 0,19 mg lagen unverestert vor.

Die Diferulate (diFA) wurden nur im Gesamtextrakt der Zerealien detektiert, was darauf hinweist, daß diese ausschließlich als veresterte Bestandteile in der wasserunlöslichen Fraktion vorkommen. Das am häufigsten vorkommende Dimer war die 8-O-4-diFA, die mit 14,46 mg ungefähr 50% der gesamt-detektierten Diferulate ausmachte. 8-5-diFA, sowohl in der offenen Form als auch als Benzofuran-Form, war mit 27% und die 5-5-diFA mit 22% vertreten.

Tabelle 92: Zusammensetzung der konsumierten Zerealien bezüglich der Hydroxyzimtsäuren und Diferulate (mg/100 g Frischgewicht)

Substanz	Wasserlöslich		Gesamt (wasserlöslich und -unlöslich) Frei und verestert
	Frei	Frei und verestert	
Vanillin	1,35 ^a ± 0,12	1,39 ± 0,02	2,72 ± 0,40
<i>trans-p</i> -Cumarsäure	0,14 ± 0,06	0,47 ± 0,11	5,44 ± 0,45
<i>trans</i> -Sinapinsäure	0,19 ± 0,04	9,00 ± 1,41	19,60 ± 1,73
<i>trans</i> -Ferulasäure	2,45 ± 0,64	18,54 ± 4,40	259,10 ± 15,63
<i>cis</i> -Ferulasäure	0,12 ± 0,16	0,84 ± 0,71	9,22 ± 4,96
8-5-diFA (offene Form)	-	-	4,94 ± 0,18
5-5-diFA	-	-	6,43 ± 0,24
8-O-4-diFA	-	-	14,46 ± 1,92
8-5-Benzofuran-diFA	-	-	2,85 ± 0,75

^a Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung zweier unabhängiger Analysen in Dublikaten

3.3.2. Plasma-Analyse

Die Plasmaproben wurden alle mit β -Glucuronidase und Sulfatase behandelt. Nach anschließender Ethylacetat-Extraktion konnte im Plasma aller sechs Probanden nach dem Verzehr von 100 g der Zerealien *t*-Ferulasäure (FA) durch HPLC-Analysen nachgewiesen und durch LC/MS-Analysen bestätigt werden. Die Berechnungen der Konzentrationen basieren dabei auf LC/MS-Analysen im SIM-Mode (selected ion monitoring), wobei die Wiederfindungsrate des internen Standards 90 – 110% betrug.

Bei fünf Probanden wurde ein maximaler Plasmaspiegel von 150 – 210 nM FA zwischen 1 h und 3 h erreicht, welcher relativ schnell nach 6 h auf unter 90 nM absank und im weiteren Verlauf nach 24 h wieder auf die Ausgangswerte zurückging (**Abb. 84, Tab. 93**). Bei Proband D zeigte sich ein etwas anderer Verlauf, denn das Plasmamaximum wurde erst nach 6 h erreicht. Sowohl zu den Zeitpunkten 0 h als auch 24 h wurden FA-Konzentrationen zwischen 5 und 30 nM gemessen. Das Vorkommen von FA vor Beginn der Studie kann von einer nicht vollständigen Auswaschphase während der polyphenolarmen Diät herrühren. Allerdings ist es fast unmöglich, FA als pflanzliche Komponente nicht mit der Nahrung zu sich zu nehmen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß niedermolekulare Plasmakomponenten mit ähnlichen massenspektralen Eigenschaften wie FA fälschlicherweise als FA identifiziert wurde.

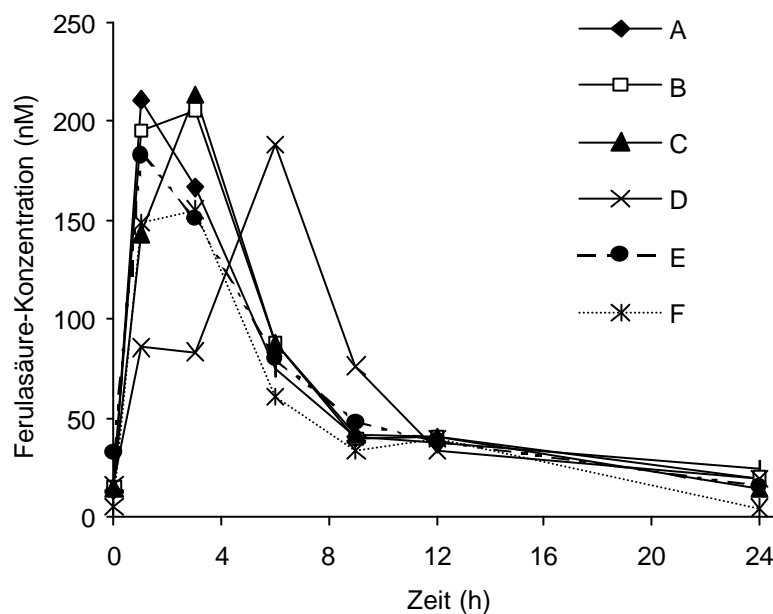


Abbildung 84: Konzentration der freien *trans*-Ferulasäure im enzymbehandelten Plasma der Probanden vor (0 h) und nach dem Verzehr (1 – 24 h) von 100 g Frühstückszerealien

Tabelle 93: Konzentration der freien Ferulasäure im enzymbehandelten Plasma der Probanden nach Verzehr von 100 g Frühstückszerealien

Zeitpunkt	Ferulasäure (nM)					
	A	B	C	D	E	F
0 h	13,4	15,0	15,1	16,4	32,2	5,1
1 h	210,8	194,6	142,9	85,6	182,5	148,6
3 h	166,2	205,3	213,0	83,4	150,7	154,9
6 h	75,1	88,0	87,7	187,9	80,0	60,6
9 h	40,0	39,7	41,8	76,2	47,8	34,0
12 h	37,2	40,0	40,8	33,7	38,4	39,7
24 h	24,2	19,8	14,4	19,3	15,2	4,6

Der Nachweis von Hydroxycimtsäuren im Plasma beruht auf der Detektion der freien Säuren nach einer Enzymbehandlung mit β -Glucuronidase und Sulfatase. Um genauere Erkenntnisse über den Konjugationstyp von FA im Plasma zu gewinnen, wurden zusätzliche Plasma-Aliquots von zwei Probanden (E und F) zu den Zeitpunkten 1 h und 3 h jeweils i) ohne Enzymbehandlung, ii) nur mit β -Glucuronidase behandelt, und iii) mit einer Kombination aus β -Glucuronidase und Sulfatase behandelt, analysiert. In den Plasmaproben 1 h nach dem Verzehr der Zerealien konnten für beide Plasmaproben ohne Enzymbehandlung im Mittel eine FA-Konzentration von 56 nM festgestellt werden. Bei den mit der Glucuronidase inkubierten Proben stieg die Konzentration der freien FA auf 190 nM an; die mit beiden Enzymen behandelten Plasmaproben zeigten mit 199 nM keinen nennenswerten Anstieg. Ähnliche Ergebnisse waren bei den 3 h-Plasmaproben zu beobachten: 31 nM FA im unbehandelten Plasma, 172 nM FA nach Glucuronidase-Behandlung und 177 nM FA nach Glucuronidase- und Sulfatase-Behandlung. Damit zeigt sich, daß zumindest bei zwei der sechs Probanden die im Plasma detektierte FA nach dem Verzehr der Zerealien hauptsächlich in Form von Glucuronid-Konjugaten vorkommt. Eine Überprüfung der verwendeten Sulfatase mit einem synthetisierten FA-Sulfat ergab, daß dieses Enzym durchaus in der Lage ist, vorhandenes FA-Sulfat zu hydrolisieren.

Mit Hilfe der SIM LC/MS-Analyse konnte im (enzymbehandelten) Plasma von vier der sechs Probanden ebenfalls Sinapinsäure identifiziert werden. Allerdings konnte diese nur in den 1 h-Proben nach dem Zerealienverzehr detektiert werden, wobei die Quantifizierung wegen vorhandener Störpeaks problematisch war. Die Plasma-Level in diesen Proben betragen zwischen 10 und 40 nM.

In keiner der Plasmaproben konnten die selektierten Ionen für die Diferulate nachgewiesen werden beziehungsweise zeigten sich in den HPLC-Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks, die auf eine Absorption hinweisen würden.

3.3.3. Urin-Analyse

Die mit Enzymen (β -Glucuronidase und Sulfatase) behandelten Urinproben wurden mit Hilfe einer SPE-Methode extrahiert. In den 24 h-Sammelproben vom Studientag konnten nach dem Verzehr der Frühstückszerealien Ferulasäure (FA), Sinapinsäure (SA) sowie ein Glycin-Konjugat der Ferulasäure detektiert und durch LC/MS im SIM-Mode beziehungsweise durch Full-scan-Analysen bestätigt werden. Eine Bestätigung für das Vorhandensein von Diferulaten im Urin konnte dagegen nicht erbracht werden.

Das als Metabolit identifizierte Feruloylglycin wurde synthetisch hergestellt, um einerseits der Absicherung durch Retentionszeit und Absorptionsspektrum und andererseits der Erstellung einer HPLC-Kalibrationsgeraden zur Quantifizierung zu dienen.

Der im Vergleich zum Vortag (= zweiter Tag der Auswaschphase mit phenolarmer Ernährung) signifikante Anstieg von FA und Feruloylglycin im Urin der sechs Probanden nach dem Verzehr der Zerealien ist in **Abbildung 85 (Tab. 94)** dargestellt. Da die Proben sowohl mit β -Glucuronidase als auch mit Sulfatase inkubiert wurden, kann die detektierte FA im Urin in freier Form und/oder als Glucuronid- oder Sulfat-Konjugat vorliegen. **Abbildung 86** zeigt die Strukturformeln der in vivo Metaboliten.

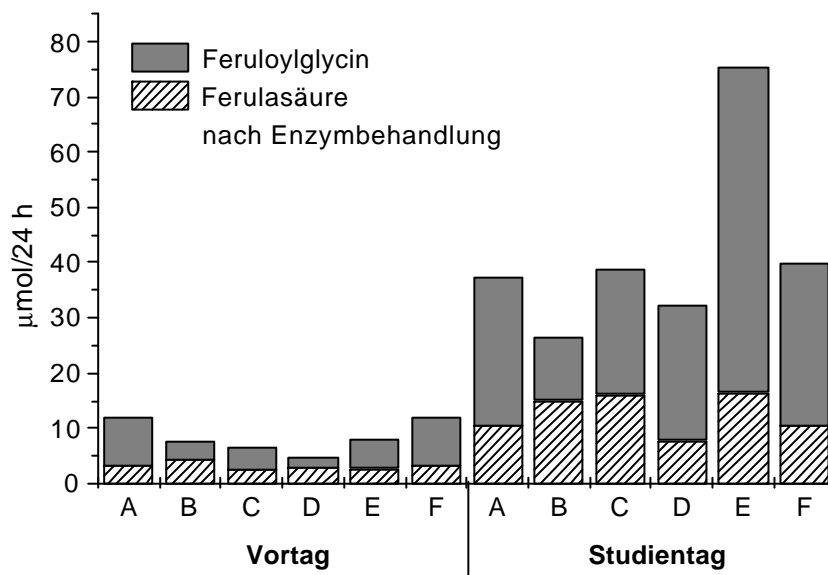


Abbildung 85: Menge an Feruloylglycin und Ferulasäure in den enzymbehandelten 24 h-Urinproben der Probanden am Vortag und am Tag der Studie

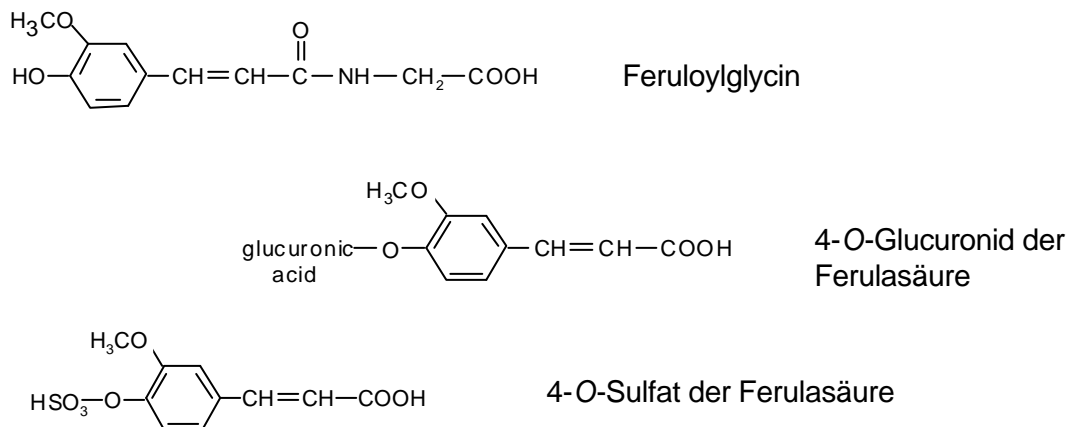


Abbildung 86: Strukturformeln der Ferulasäure-Metaboliten in vivo.

Auch am Tag vor der Studie konnten im Urin der sechs Probanden geringe Mengen an FA und Feruloylglycin detektiert werden (**Abb. 85**). Im Vergleich zum Vortag stiegen durch den Zerealienkonsum die ausgeschiedenen Mengen von FA von 3,17 μmol (Mittelwert der sechs Probanden) auf 12,26 μmol an. Die Feruloylglycin-Menge wurde von durchschnittlichen 5,33 μmol auf 28,99 μmol angehoben, was ca. 70% der Gesamtmenge der ausgeschiedenen FA am Studientag entspricht. Dabei zeigten sich individuelle Unterschiede in der Menge und im Konjugationstyp der im Urin ausgeschiedenen FA. Während die auf Sulfat- und Glucuronid-Konjugate zurückzuführende FA bei allen Probanden zwischen 7 und 16 μmol beträgt, wurde Feruloylglycin von vier Probanden im Bereich von 20 – 30 μmol , von Proband B mit 10 μmol und von Proband E mit fast 60 μmol ausgeschieden (**Tab. 94**).

Tabelle 94: Ausgeschiedene Gesamtmengen von Ferulasäure, Feruloylglycin und Sinapinsäure im 24 h-Urin der Probanden vor und nach dem Verzehr von Zerealien

Probanden	Ferulasäure ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)				Sinapinsäure ($\mu\text{mol}/24\text{ h}$)	
	Freie Säure, Glucuronid und Sulfat		Feruloylglycin		Freie Säure, Glucuronid und Sulfat	
	Vortag	Studientag	Vortag	Studientag	Vortag	Studientag
A	3,19	10,45	8,94	26,81	1,24	1,88
B	4,40	15,09	3,20	11,42	1,20	2,74
C	2,60	16,07	3,78	22,61	0,54	2,78
D	2,80	7,77	2,03	24,68	2,62	1,48
E	2,69	13,79	5,19	58,89	0,78	2,94
F	3,32	10,39	8,83	29,55	1,96	2,63
Mittelwert \pm Std	3,17 \pm 0,67	12,26 \pm 3,22	5,33 \pm 2,94	28,99 \pm 15,92	1,39 \pm 0,77	2,41 \pm 0,59

Analog zu den Plasmaproben wurden zusätzliche Urinproben der Probanden E und F zur Untersuchung des Konjugationstyps i) ohne Enzyme, ii) nur mit β -Glucuronidase und iii) mit einer Kombination aus β -Glucuronidase und Sulfatase vor der Extraktion behandelt und analysiert (LC/MS, SIM-Mode). Dabei ergab sich ein Anstieg der detektierten freien FA von 2,2 μmol (als Mittelwert der beiden Proben) in den unbehandelten Proben auf 9,7 μmol FA durch die Glucuronidase-Inkubation. Die zugefügte Sulfatase erbrachte eine weitere, wenngleich nicht signifikante Erhöhung auf 14,4 μmol (Daten nicht gezeigt). Demnach ist in den Urinproben dieser zwei Probanden neben einem hohen Anteil an Feruloylglycin hauptsächlich das Glucuronid-Konjugat von FA vorhanden, wobei das Vorhandensein geringerer Mengen des Sulfat-Konjugats nicht ausgeschlossen werden kann.

Wie bereits erwähnt, wurden auch geringe Mengen der in den Zerealien enthaltenen Sinapinsäure mit dem Urin ausgeschieden. Die in **Tabelle 94** aufgelisteten SA-Mengen in den enzymbehandelten 24 h-Sammelproben basieren ebenfalls auf LC/MS-Analysen im SIM-Mode und sind in **Abb. 87** dargestellt. Bei fünf Probanden zeigte sich eine Zunahme an SA im Vergleich zu den Proben des Vortages, wobei bei Proband C eine Zunahme an SA um das fünffache gemessen werden konnte. Bei Proband D dagegen ist eine Abnahme im Vergleich zum Vortag zu erkennen.

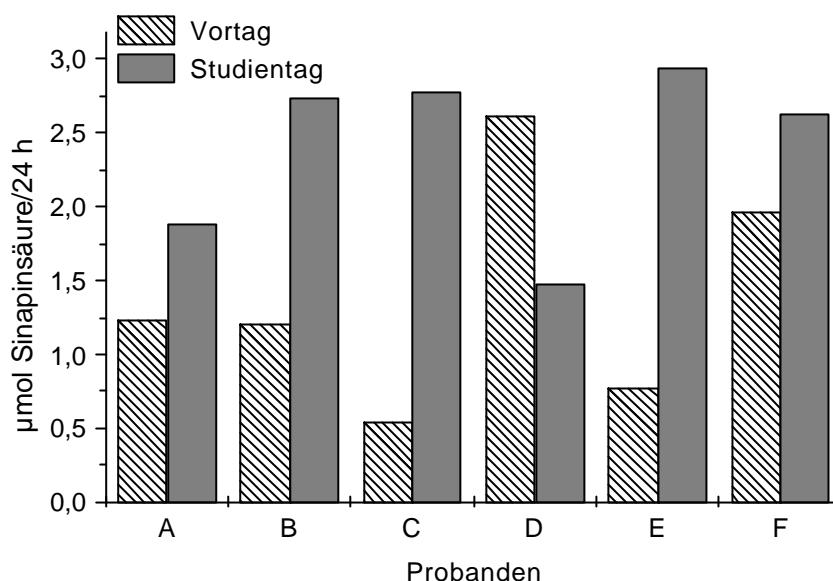


Abbildung 87: Sinapinsäuregehalt im 24 h-Urin der Probanden vor und am Tag der Studie

Durch den Vergleich der in den Zerealien enthaltenen Mengen an FA und SA, die durch den Verzehr zugeführt wurden, und der Ausscheidung in den Urin innerhalb von 24 h lassen sich Wiederfindungsraten berechnen, die in **Tabelle 95** aufgeführt sind. Für die Bestimmung der Exkretion von FA wurde die als Feruloylglycin ausgeschiedene FA mit der nach der Enzymbehandlung freien FA addiert.

Die Ausscheidung von FA und SA übersteigt die Menge der zugeführten freien wasserlöslichen Säuren (2,54 mg für FA und 0,19 mg für SA) ungefähr um das Dreifache. Damit ergibt sich zwingend, daß auch ein Teil der in den Zerealien ursprünglich veresterten FA und SA absorbiert und als FA- beziehungsweise SA-Konjugate wieder mit dem Urin ausgeschieden wurden. Im Fall der FA ergeben die Berechnungen eine Wiederfindungsrate von ca. 44% der in der wasserlöslichen Fraktion als freie und verestert vorkommende FA und ca. 3% der gesamt vorhandenen FA. Bei der SA konnten 6% von der wasserlöslichen Fraktion und knapp 3% der gesamt vorhandenen SA im Urin wiedergefunden werden.

Tabelle 95: Zuführung, Exkretion und Wiederfindungsraten von Ferulasäure und Sinapinsäure im Urin nach dem Konsum von Zerealien

	Zuführung (mg)			Exkretion (mg/24 h)	Wiederfindung = Anteil der Exkretion an der Zuführung (%)	
	Gesamt	Wasserlös.	Frei		Gesamt	Gesamt
FA	259,10	18,54	2,45	8,10 ^a ± 3,34 [5,15 – 14,63] ^b	3,13 ± 1,29 [1,99 – 5,65]	43,68 ± 18,02 [27,77 – 78,92]
SA	19,60	9,00	0,19	0,54 ± 0,13 [0,33 – 0,66]	2,76 ± 0,67 [1,69 – 3,36]	6,00 ± 1,46 [3,69 – 7,32]

^a Mittelwerte ± Std der sechs Probanden

^b Datenbereich der Werte

3.3.4. Zusammenfassung

Durch den Verzehr der Zerealien konnte im enzymbehandelten Plasma der Probanden ein Anstieg von Ferulasäure detektiert werden, die bei mindestens zwei der sechs Probanden hauptsächlich als Glucuronid-Konjugat zirkulierte. Dabei wurden bereits 1 h und 3 h nach dem Zerealienkonsum maximale Plasmalevel der Ferulasäure von 200 nM gemessen, die im weiteren Verlauf immer mehr abnahmen. Eine Ausnahme war Proband D, dessen maximaler FA-Spiegel im Plasma nach 6 h zu beobachten war. Außerdem wurden bei vier der sechs Probanden geringe Mengen von Sinapinsäure in den 1h-Plasmaproben identifiziert, die jedoch nicht mehr als 40 nM betragen.

Neben einem signifikanten Anstieg von FA und geringeren Mengen von SA konnte in allen enzymbehandelten 24 h-Urinproben des Studientages ein weiteres Konjugat von FA, nämlich Feruloylglycin, quantifiziert werden. Im Durchschnitt machte das Feruloylglycin 70% der gesamten ausgeschiedenen FA aus. Die restliche FA kam im Urin ebenfalls hauptsächlich als Glucuronid-Konjugat vor, wobei geringe Mengen von FA-Sulfat nicht ausgeschlossen werden können.

Aus den im Urin befindlichen Metabolitmengen lassen sich Wiederfindungsraten der zugeführten Ferulasäure- und Sinapinsäure-Mengen berechnen, die jeweils ca. 3% der gesamt konsumierten Menge betrug. Da die ausgeschiedene Menge an FA und SA die Menge der in der wasserlöslichen Fraktion frei vorliegenden Säuren in den Zerealien überstieg, scheint eine teilweise Hydrolyse der veresterten Komponenten im Darm sehr wahrscheinlich zu sein.

Eine Absorption von intakten Diferulaten aus den Zerealien konnte weder im Plasma noch im Urin nachwiesen werden.

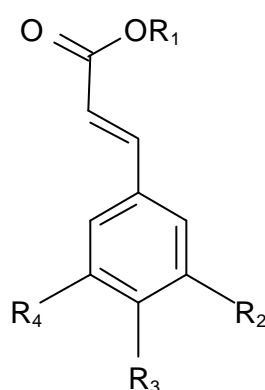
Diese Studie zeigte, daß nach dem Konsum von Zerealien Ferulasäure und Sinapinsäure vom Körper aufgenommen werden können. Allerdings waren weder im Plasma noch im Urin Anzeichen einer Absorption von Diferulaten festzustellen. Aus diesem Grund wurden Studien zum Metabolismus von diätetisch vorkommenden Hydroxyzimtsäuren (Kaffeensäure, Ferulasäure, Cumarsäure und Sinapinsäure) und von Diferulaten durchgeführt, wobei Caco-2 Zellen als Dünndarmmodell dienten. Mit Hilfe dieser Studien sollten Aussagen über die Bioverfügbarkeit und den präsystemischen Metabolismus der untersuchten Substanzen getroffen werden.

3.4. HYDROXYZIMTSÄURE-METABOLITEN IN CACO-2

Der Beitrag des Dünndarmepitheliums zum sogenannten „first pass metabolism“ und zur Bioverfügbarkeit von Hydroxyzimtsäuren und Diferulaten wurde mit Hilfe eines in vitro-Modelles mit Caco-2 Zellen untersucht, die nach spontaner Differenzierung sehr viele Eigenschaften von Enterozyten aufweisen.

3.4.1. Metabolit-Identifizierung durch HPLC- und LC/MS-Analysen

Für die metabolischen Untersuchungen wurden jeweils differenzierte Caco-2 Zellen mit 50 µM Ferulasäure (FA), Sinapinsäure (SA), *p*-Cumarsäure (PA), Kaffeesäure (CA) und deren synthetischen Derivaten Methylferulat (MFA), Methylsinapat (MSA), Methyl-*p*-Cumarat (MPA) und Methylkaffeat (MCA) (**Abb. 88**) inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellmedien sowohl per HPLC/DAD als auch LC/MS analysiert.



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ferulasäure (FA)	H	OCH ₃	OH	H
Sinapinsäure (SA)	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>p</i> -Cumarsäure (PA)	H	H	OH	H
Kaffeesäure (CA)	H	OH	OH	H
Methylferulat (MFA)	CH ₃	OCH ₃	OH	H
Methylsinapat (MSA)	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
Methyl- <i>p</i> -Cumarat (MPA)	CH ₃	H	OH	H
Methylkaffeat (MCA)	CH ₃	OH	OH	H

Abbildung 88: Strukturformeln der verwendeten Hydroxyzimtsäuren und ihrer Methylester

Alle untersuchten Hydroxyzimtsäuren und ihre Methylester wurden von den Caco-2 Zellen metabolisiert. Die resultierenden zusätzlichen Peaks in den HPLC-Chromatogrammen sind in **Abbildung 89** dargestellt und stellen sowohl Konjugationen der Testsubstanzen mit Glucuronsäure als auch mit Sulfat dar.

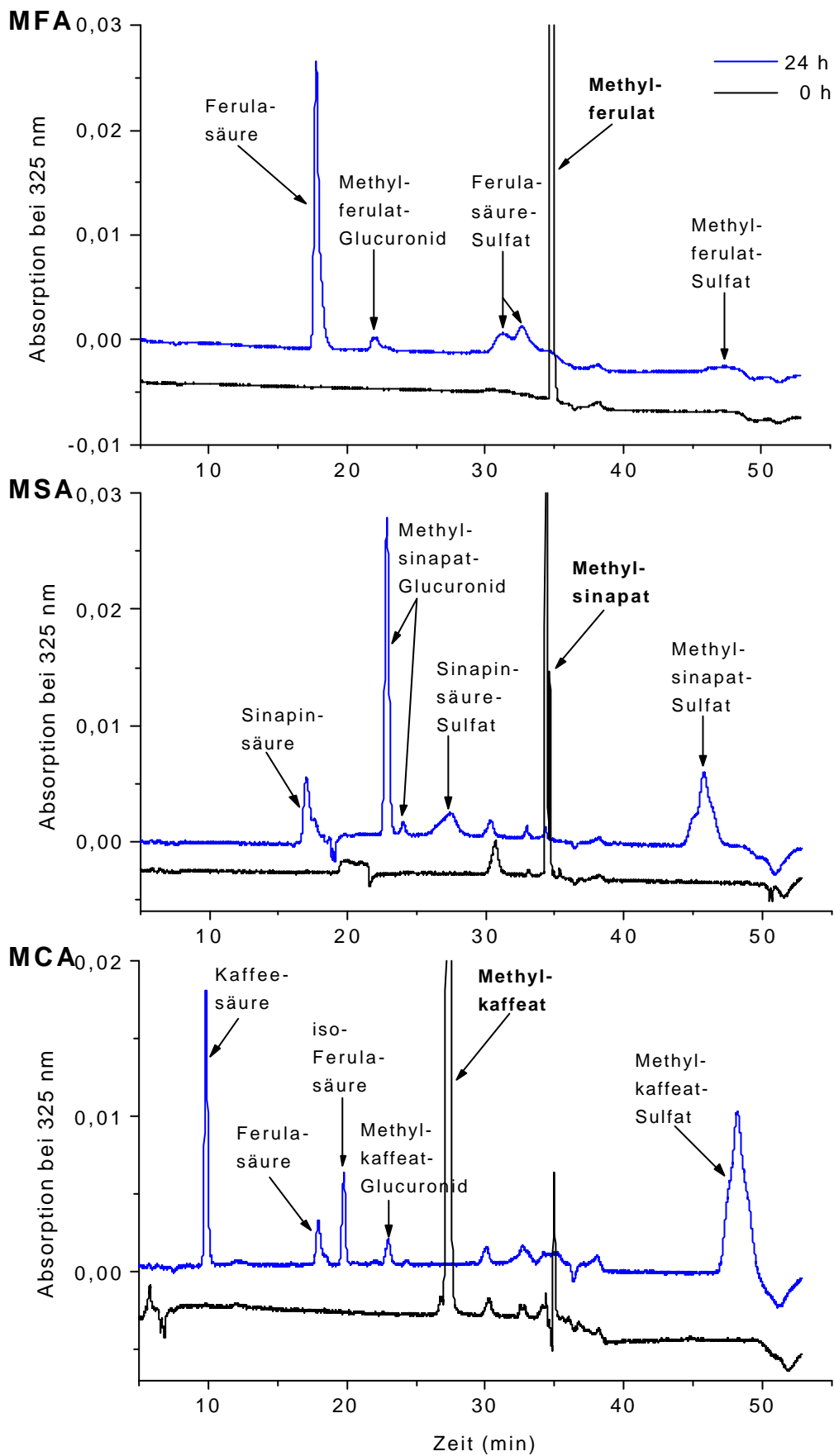
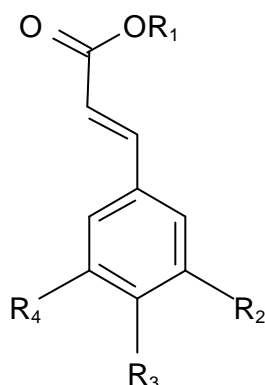


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramme der Caco-2 Kulturmedien nach einer 24 h Inkubation (blaue Linie) mit Methylferulat (oben), Methylsinapat (Mitte) und Methylkaffeat (unten). Das jeweilige Ausgangsmedium (0 h) ist schwarz dargestellt.

Das Chromatogramm der Inkubation mit MPA wird an dieser Stelle nicht gezeigt, weil die Metabolit-Peaks bei den verwendeten Wellenlängen von 325 nm und 280 nm relativ klein (siehe Methylferulat-Sulfat in **Abb. 89**) und von der Basislinie so gut wie nicht zu unterscheiden waren.

Die Retentionszeiten für die identifizierten Methylester-Glucuronide lagen zwischen 20 und 25 min und für die Methylester-Sulfate zwischen 45 und 50 min. Dabei muß es sich jeweils um 4-O-Glucuronide beziehungsweise 4-O-Sulfate handeln, da die Hydroxygruppe in der 4-Position als einzige funktionelle Gruppe für eine Konjugation in Frage kommt (**Abb. 90**).



Metaboliten	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ferulasäure (FA)	H	OCH ₃	OH	H
Iso-Ferulasäure (iso-FA)	H	OH	OCH ₃	H
Ferulasäure-Sulfat	H	OCH ₃	OSO ₃ H	H
Sinapinsäure-Sulfat	H	OCH ₃	OSO ₃ H	OCH ₃
<i>p</i> -Cumarsäure-Sulfat	H	H	OSO ₃ H	H
Methylferulat-Sulfat	CH ₃	OCH ₃	OSO ₃ H	H
Methylsinapat-Sulfat	CH ₃	OCH ₃	OSO ₃ H	OCH ₃
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Sulfat	CH ₃	H	OSO ₃ H	H
Methylkaffeat-Sulfat	CH ₃	OH	OSO ₃ H	H
	CH ₃	OSO ₃ H	OH	H
Methylferulat-Glucuronid	CH ₃	OCH ₃	GlcA	H
Methylsinapat-Glucuronid	CH ₃	OCH ₃	GlcA	OCH ₃
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Glucuronid	CH ₃	H	GlcA	H
Methylkaffeat-Glucuronid	CH ₃	OH	GlcA	H
	CH ₃	GlcA	OH	H

Abbildung 90: Strukturformeln der identifizierten Metaboliten der Hydroxyzimtsäuren und ihrer Methylester

Bei der Inkubation mit MSA konnte sogar ein zweites MSA-Glucuronid festgestellt werden, bei dem es sich möglicherweise um ein cis-Isomer handelt (**Abb. 89**, MSA).

Nach 24 h waren die Methyl-Derivate der Hydroxyzimtsäuren als eingesetzte Testsubstanzen im Medium nicht mehr detektierbar. Jedoch konnten die freien Säuren nachgewiesen werden, die offensichtlich durch Hydrolyse der Esterbindung entstanden sind. Im Laufe der Inkubation mit MFA, MSA und MPA konnten ebenfalls Sulfat-Konjugate der jeweilig produzierten freien Hydroxyzimtsäuren (FA, SA und PA) identifiziert werden.

Bei Zusatz der freien Säuren FA, SA und PA zum Medium waren Sulfat-Konjugate der betreffenden Hydroxyzimtsäuren jedoch die einzigen Metaboliten, die im Kulturmedium identifiziert werden konnten. Auffallend sind die relativ breiten Peaks der Sulfate unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen. Diese Sulfat-Metaboliten (FA-Sulfat und SA-Sulfat) sind in den in **Abbildung 89** dargestellten Chromatogrammen (MFA und MSA) der Kulturmedien nach der Inkubation von Caco-2 mit den Methylderivaten bereits enthalten, weshalb auf eine weitere Darstellung der Chromatogramme der freien Hydroxyzimtsäuren verzichtet wurde.

Eine Inkubation mit CA dagegen resultierte in der Bildung von FA und iso-Ferulasäure als O-Methyl-Derivate von CA, die ebenfalls bereits in **Abbildung 89** als Metaboliten von MCA dargestellt sind. Ein CA-Sulfat konnte nicht detektiert werden.

Die Sulfat- und Glucuronid-Metaboliten wurden in erster Linie mit Hilfe von LC/Electrospray MS im negativen Ionen Mode (ES-) aufgrund ihrer Massen identifiziert. Die dabei beobachteten $[M-H]^-$ Ionen sind in **Tabelle 96** aufgelistet. Hierbei zeigten die Sulfat-Metaboliten als schwefelhaltige Moleküle ein typisches Schwefel-Isotopen-Muster. Die Hydroxyzimtsäuren als Produkte einer Ester-Hydrolyse der entsprechenden Methylester wurden, zusätzlich zur HPLC/DAD-Analyse mit dem Vergleich von Retentionszeiten und Absorptionsspektren (**Tab. 97**), durch LC/MS-Analysen (ES+) im positiven Mode bestätigt (**Tab. 96**). Neben den $[M+H]^+$ sind auch die $[M-H_2O+H]^+$ Ionen angegeben, die für Hydroxyzimtsäuren nach Verlust eines Wassermoleküls charakteristisch sind.

Tabelle 96: LC/MS-Daten für die Metaboliten im Kulturmedium von Caco-2 nach Inkubation mit Hydroxyzimtsäuren und den entsprechenden Methylestern

Metabolit	MS mode	$[M - H]^-$ m/z	$[M - SO_3 - H]^-$ m/z	$[SO_3]^-$ m/z
Ferulasäure-Sulfat	ES -	273 (100%)	193 (10%)	80 (1%)
Sinapinsäure-Sulfat	ES -	303 (100%)	223 (14%)	80 (1%)
<i>p</i> -Cumarsäure-Sulfat	ES -	243 (100%)	163 (1%)	80 (4%)
Methyl-Ferulat-Sulfat	ES -	287 (86%)	207 (5%)	-
Methyl-Sinapat-Sulfat	ES -	317 (100%)	237 (10%)	-
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Sulfat	ES -	257 (18%)	177 (1%)	-
Methyl-Kaffeeat-Sulfat	ES -	273 (100%)	193 (4%)	-
		$[M - H]^-$ m/z	$[M - GlcA - H]^-$ m/z	$[GlcA - H]^-$ m/z
Methyl-Ferulat-Glucuronid	ES -	383 (100%)	207 (1%)	175 (18%)
Methyl-Sinapat-Glucuronid	ES -	413 (100%)	237 (7%)	175 (10%)
Methyl-Kaffeeat-Glucuronid	ES -	369 (100%)	193 (1%)	175 (1%)
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Glucuronid		n.d.	n.d.	n.d.
Hydroxyzimtsäure		$[M + H]^+$ m/z	$[M - H_2O + H]^+$ m/z	
Ferulasäure	ES +	195 (46%)	177 (100%)	
Iso-Ferulasäure	ES +	195 (23%)	177 (100%)	
Sinapinsäure	ES +	225 (23%)	207 (100%)	
<i>p</i> -Cumarsäure	ES +	165 (55%)	147 (100%)	
Kaffeesäure	ES +	181 (34%)	163 (100%)	

Tabelle 97: Retentionszeiten und Charakterisierung der Absorptionsspektren der Hydroxyzimtsäuren und einiger Metaboliten im Kulturmedium von Caco-2 bei der HPLC-Analyse

Metabolit	RT (min)	I _{max1} (nm)	I _{max2} (nm)	I _{min} (nm)
Ferulasäure-Sulfat	32,0	283	311	252
Sinapinsäure-Sulfat	26,4	300	-	254
<i>p</i> -Cumarsäure-Sulfat	28,0			
Methyl-Ferulat-Sulfat	47,4			
Methyl-Sinapat-Sulfat	45,6	303	-	262
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Sulfat	47,4			
Methyl-Kaffeat-Sulfat	48,0	312	-	262
Methyl-Ferulat-Glucuronid	22,5			
Methyl-Sinapat-Glucuronid	23,2	300	-	255
Methyl-Kaffeat-Glucuronid	22,8			
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Glucuronid	20,5			
Hydroxyzimtsäure				
Ferulasäure	18,0	323	299	262
Iso-Ferulasäure	19,5	323	296	262
Sinapinsäure	17,4	324	-	264
<i>p</i> -Cumarsäure	15,8	310	299	266
Kaffeensäure	9,8	323	296	248

Die Peaks einiger Metaboliten (PA-Sulfat, MFA-Sulfat, MPA-Sulfat, MFA-Glucuronid, MCA-Glucuronid und MPA-Glucuronid) erwiesen sich als zu klein für ein zufriedenstellendes Absorptionsspektrum und eine Aufkonzentrierung der Metaboliten wurde nicht durchgeführt. Mit Hilfe der synthetisierten Sulfate von FA und SA konnten dagegen die beiden Absorptionsspektren dieser Sulfate genau charakterisiert werden. Erwartungsgemäß zeigte sich durch die Konjugation eine Verschiebung (Absorptionsshift) der Maxima und Minima der Spektren. So liegt zum Beispiel das Absorptionsmaximum (λ_{max}) des FA-Sulfats bei 283 nm und das Minimum (λ_{min}) bei 252 nm im Vergleich zu FA mit $\lambda_{\text{max}} = 323$ nm und $\lambda_{\text{min}} = 262$ nm (Tab. 97).

3.4.2. Identifizierung durch enzymatische Behandlung

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Glucuroniden und Sulfaten im Medium liegt in der enzymatischen Hydrolyse der Metaboliten mit β -Glucuronidase und Sulfatase. Die aufgrund der LC/MS-Messungen als mögliche Glucuronide von MFA, MSA, MPA und MCA identifizierten Peaks konnten durch Inkubation des Mediums mit β -Glucuronidase als solche bestätigt werden. Die mit PBS-Puffer inkubierten Caco-2 Kulturmedien (Abb. 91 und 92, schwarze Linie), die als Kontrolle zu den mit Enzymen behandelten Medien dienen, weisen die bereits dargestellten Metaboliten auf. Eine Inkubation mit β -Glucuronidase führte zum „Verschwinden“ aller vier Methylester-Glucuronide und zu einer Zunahme des jeweiligen Hydroxyzimtsäure-methylester (Abb. 91 und 92, blaue Linie). Die Metaboliten von MPA, die bei 280 nm besser absorbieren, wurden bei dieser Wellenlänge detektiert; allerdings ist durch die bei dieser Wellenlänge ebenfalls absorbierenden Störpeaks der MPA-Peak nicht zu erkennen.

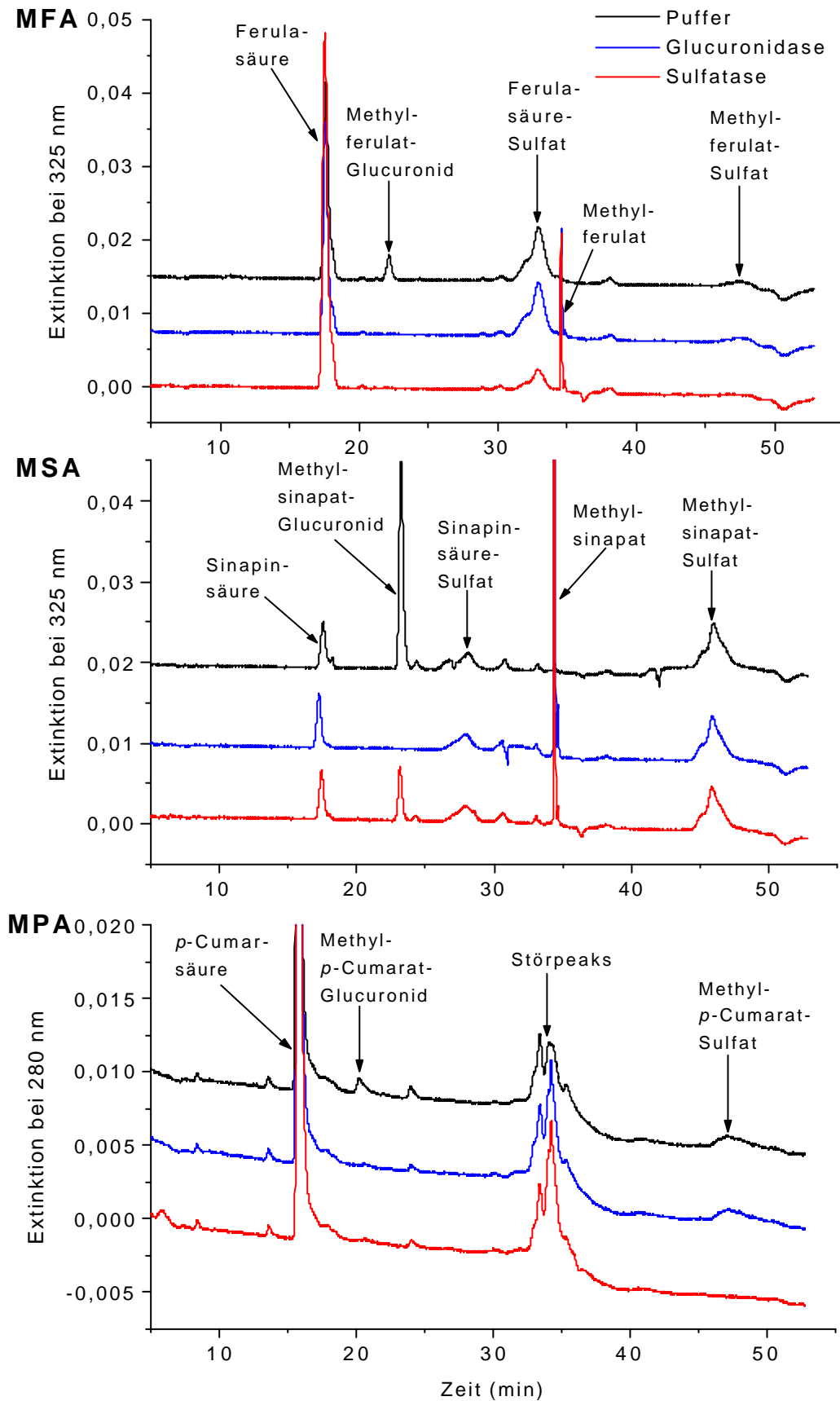


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramme der mit β -Glucuronidase oder Sulfatase behandelten Zellkulturmedien nach 24 h Inkubation mit MFA (oben), MSA (Mitte) und MPA (unten) im Vergleich zur Kontrolle (Puffer)

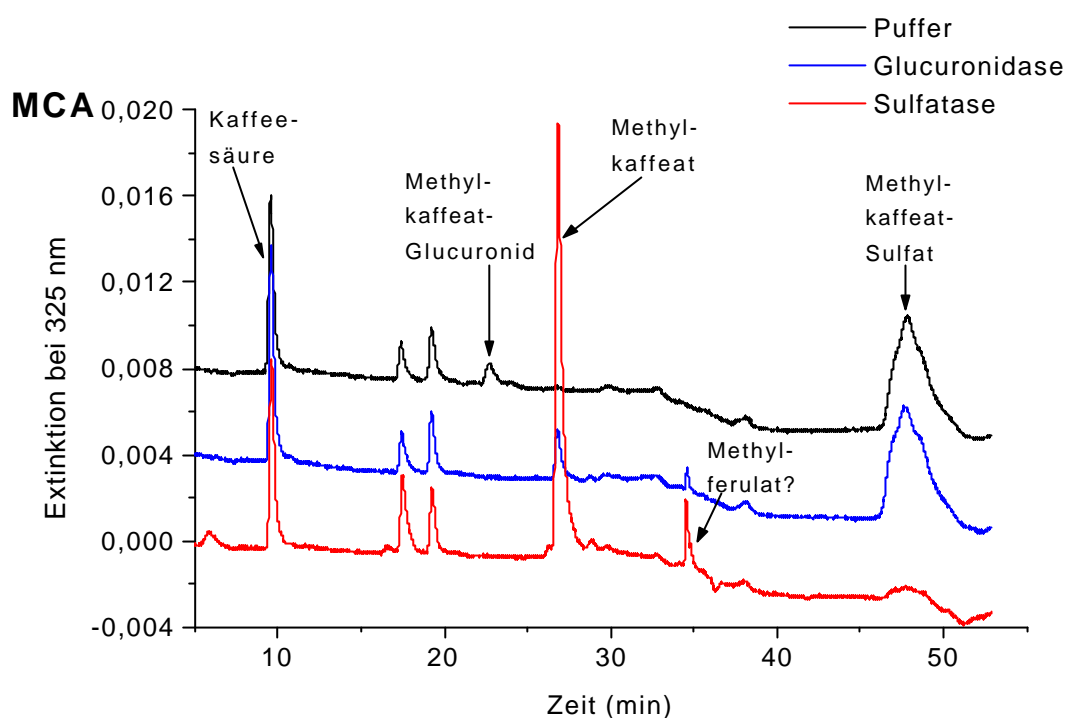


Abbildung 92: HPLC-Chromatogramme des mit β -Glucuronidase oder Sulfatase behandelten Zellkulturmediums nach 24 h Inkubation mit MCA im Vergleich zur Kontrolle (Puffer)

Durch eine Behandlung mit Sulfatase konnten die Sulfat-Konjugate von FA, MFA, MPA und MCA als Beweis ihres Vorhandenseins hydrolysiert werden (**Abb. 91** und **92**, rote Linie). Allerdings wurden auch die Glucuronide von MFA, MSA, MPA und MCA (teilweise) gespalten. Aufgrund dieser Glucuronidase-Aktivität, von der auch Rondini et al. (2002) berichtete, läßt sich schließen, daß die verwendete Sulfatase nicht völlig aufgereinigt ist. Die Sulfate von SA und MSA wurden jedoch nicht durch die Sulfatase hydrolysiert. Analog wurde auch das synthetisch hergestellte SA-Sulfat untersucht. Dieses wurde ebenfalls nicht als Substrat verwendet, während das synthetische FA-Sulfat hydrolysiert werden konnte. Offenbar spielen sterische Gründe eine Rolle für die beobachtete Substratspezifität, da die Sulfat-Konjugation als einzige Möglichkeit an der 4-Position des Phenolringes stattfinden muß und diese im Fall von SA und MSA mit zwei Methoxygruppen in 3- und 5- Position benachbart ist.

In **Abb. 92** erscheint sowohl durch die β -Glucuronidase- als auch durch die Sulfatase-Behandlung des MCA-Mediums ein zusätzlicher kleiner Peak mit einer Retentionszeit von 34,5 min. Dabei könnte es sich aufgrund der Retentionszeit und des Metabolismus von CA (O-Methylierung!) um Methylferulat handeln. Dies wiederum würde bedeuten, daß bei der Inkubation von MCA auch ein MFA-Glucuronid und möglicherweise auch ein MFA-Sulfat als Metaboliten entstanden sind, diese aber wegen nahezu identischer Retentionszeiten zusammen mit dem MCA-Glucuronid und MCA-Sulfat eluieren. Der Anteil der MFA-Metaboliten kann jedoch nicht außerordentlich hoch sein, da sich bei den massenspektrometrischen Full scan- Analysen die entsprechenden Ionen nicht auffällig hervorhoben.

Neben den Hydroxyzimtsäuren wurden auch Diethylester dreier Diferulate, 5–5-diFA, 8–5-Benzofuran-diFA und 8–O–4-diFA, für 16 h mit Caco-2 Zellen inkubiert. Allerdings bildete sich nach Zugabe dieser Diester aufgrund der geringen Löslichkeit im Medium ein leichter Niederschlag. Trotzdem konnte im Medium eine Ester-Hydrolyse beobachtet werden (siehe **3.4.3.**), aber weder die Diethylester noch das zugesetzte freie 5–5-diFA oder das durch eine Hydrolyse beider Ethylester entstandene freie 8–O–4-diFA wurden metabolisiert.

3.4.3. Esterase-Aktivität im Zellmedium

Während der Inkubation der Methylester der Hydroxyzimtsäuren wurde eine Hydrolyse des Esters bei diesen Substanzen beobachtet (siehe 3.4.1.). Einem mit Caco-2 Zellen vorinkubierten Medium (22 h) wurde, unter Abwesenheit von Caco-2 Zellen, MFA, MSA, MPA und MCA zugesetzt und inkubiert. Die Analyse des Mediums nach 18 h Inkubation zeigte, daß im Medium eine Esterase-Aktivität gegenüber MFA, MPA und MCA, aber nicht gegenüber MSA vorlag, die sich durch Zunahme der freien Säuren FA, PA und CA im Medium auszeichnete. Allerdings wurden dazu keine weiteren Kinetiken oder Zeitverläufe durchgeführt. Die Esterase-Aktivität war nicht im Medium an sich vorhanden und hatte ihren Ursprung eindeutig in den Zellen. Jedoch kann aufgrund der Tatsache, daß das Medium nach der Vorinkubation mit Caco-2 nur abpipettiert wurde, nicht ausgeschlossen werden, daß sich einige abgelöste intakte Zellen im Medium befanden oder desintegrierte Zellen ihre Enzyme entlassen haben. Aber eine Sezernierung eines oder mehrerer Enzyme, die zu einer Ester-Hydrolyse fähig sind, von den am Boden adhäsierten Caco-2 Zellen in das Medium ist sehr wahrscheinlich.

Eine Esterase-Aktivität gegenüber den Diethylestern von 5–5-diFA, 8–5-Benzofuran-diFA und 8–O–4-diFA während einer Inkubation mit Caco-2 konnte, trotz einer gewissen Unlöslichkeit im Medium, ebenfalls beobachtet werden. Dabei zeigten sich Unterschiede im Grad der Aktivität gegenüber den verschiedenen Diethylestern: eine hohe Aktivität war gegenüber dem 8–O–4-Diester zu verzeichnen, wobei innerhalb von 16 h die zugesetzten 35 µM und 200 µM komplett zum freien 8–O–4-diFA hydrolysiert wurden. Eine geringere Aktivität zeigte sich während der Inkubation mit dem 8-5-Benzofuran-Diester (60 µM) mit einem Monoester als Produkt. Keine Esterase-Aktivität war beim 5–5-Diester festzustellen. Die Massen der Diethylester und ihrer Produkte (Monoester und 8–O–4-diFA) wurden mit LC/MS fullscan-Analysen bestätigt: Diethylester Ionen mit m/z 443 $[M + H]^+$, Monoester Ionen mit m/z 415 $[M - C_2H_4 + H]^+$ und diFA Ionen mit m/z 387 $[M - 2 C_2H_4 + H]^+$ und m/z 369 $[M - 2 C_2H_4 - H_2O + H]^+$.

3.4.4. Metabolismus in Abhängigkeit von der Zeit

Die Konzentrationsabnahme der vier untersuchten Hydroxyzimtsäuren und ihrer jeweiligen Methylester im Kulturmedium während einer Inkubation mit Caco-2 und die Bildung der identifizierten Metaboliten wurden in Abhängigkeit von der Zeit untersucht ($n = 2$). Allerdings ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß die Berechnungen der dargestellten Konzentrationen der Glucuronid- und Sulfat-Metaboliten auf den Kalibrationsgeraden der entsprechenden Hydroxyzimtsäuren beziehungsweise ihrer Methylester basieren, da authentische beziehungsweise reine Standardsubstanzen für eine Kalibrationskurve nicht zur Verfügung standen. Von den Responsefaktoren der Konjugate werden bei der verwendeten Wellenlänge von 325 nm niedrigere Werte erwartet und damit wird die wirkliche Konzentration der Metaboliten im Medium bei der hier verwendeten Vorgehensweise eher unterschätzt. So wurde bei den synthetisch hergestellten Sulfaten von FA und SA, wie zuvor erwähnt, eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 325 nm für die Zimtsäuren auf 280 nm für das FA-Sulfat und 300 nm für das SA-Sulfat festgestellt.

Eine Inkubation mit 45 µM FA resultierte in einer Abnahme um 55% auf 22 µM innerhalb von 24 h (**Abb. 93. Tab. 98**). Die ersten Spuren des FA-Sulfats waren nach 6 h detektierbar und stiegen weiter deutlich an. Bei Zugabe von 45 µM MFA konnte eine Abnahme von 90% innerhalb der ersten 2 h beobachtet werden. Zeitgleich erschien FA im Medium mit bereits 10 µM nach 30 min und dem höchsten Level von 32 µM zwischen 2 und 6 h. Aufgrund der metabolischen Aktivitäten sank die FA-Konzentration auf 17 µM nach 24 h ab. Die ersten detektierbaren Metaboliten im Medium waren das MFA-Glucuronid nach 1 h und die Sulfate von MFA und FA nach 2 h, wobei nur das FA-Sulfat im weiteren Verlauf noch erkennbar anstieg.

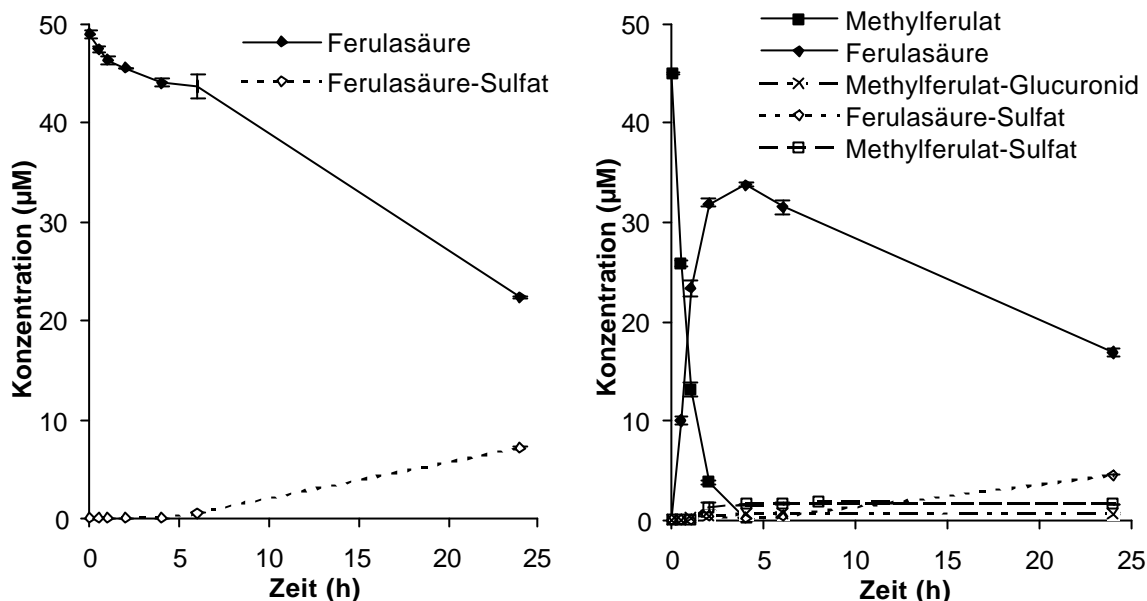


Abbildung 93: Zeitabhängiger Metabolismus von Ferulasäure (links) und Methylferulat (rechts) durch Caco-2

Tabelle 98: Metabolismus von Ferulasäure und Methylferulat durch Caco-2 in Abhängigkeit von der Zeit

Testsubstanz/ Metaboliten	Konzentration (µM)						
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Ferulasäure	49,0 ± 0,5	47,4 ± 0,4	46,4 ± 0,4	45,5 ± 0,0	44,0 ± 0,4	43,7 ± 1,2	22,4 ± 0,1
Ferulasäure-Sulfat ^a	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,1	7,1 ± 0,1
Methyl-Ferulat	45,0 ± 0,0	25,9 ± 0,3	13,1 ± 0,8	3,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1	-	-
Ferulasäure	-	10,1 ± 0,4	23,4 ± 0,8	31,9 ± 0,4	33,8 ± 0,2	31,5 ± 0,6	16,9 ± 0,5
Methylferulat-Glucuronid ^b	-	-	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0
Ferulasäure-Sulfat ^a	-	-	-	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1
Methylferulat-Sulfat ^b	-	-	-	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0

^a Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Ferulasäure

^b Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Methylferulat

Abbildung 94 zeigt die Zeitverläufe für SA und MSA. Innerhalb von 24 h nahm SA um 42% von den anfänglichen 48 µM auf 28 µM ab; das SA-Sulfat konnte nach 4 h detektiert werden (**Tab. 99**). Die Inkubation mit 40 µM MSA ergab, daß MSA länger im Medium verfügbar war als MFA. Nach 6 h waren noch 10 µM und nach 24 h Spuren von MSA zu finden. Dies entspricht den zuvor gemachten Beobachtungen, daß MSA offenbar kein Substrat für die extrazelluläre(n) Esterase(n) im Medium ist oder nur sehr langsam umgesetzt wird. Nur geringe Mengen von 2–3 µM SA als Produkt einer Esterase-Aktivität waren im Medium nachweisbar. Die Glucuronid- sowie Sulfat-Konjugate von MSA waren nach 2 h präsent. Nach 4 h konnten Spuren eines zweiten MSA-Glucuronids festgestellt werden, wobei es sich um ein cis-Isomer handeln könnte. Das Sulfat von SA war erst nach 24 h im Medium zu detektieren.

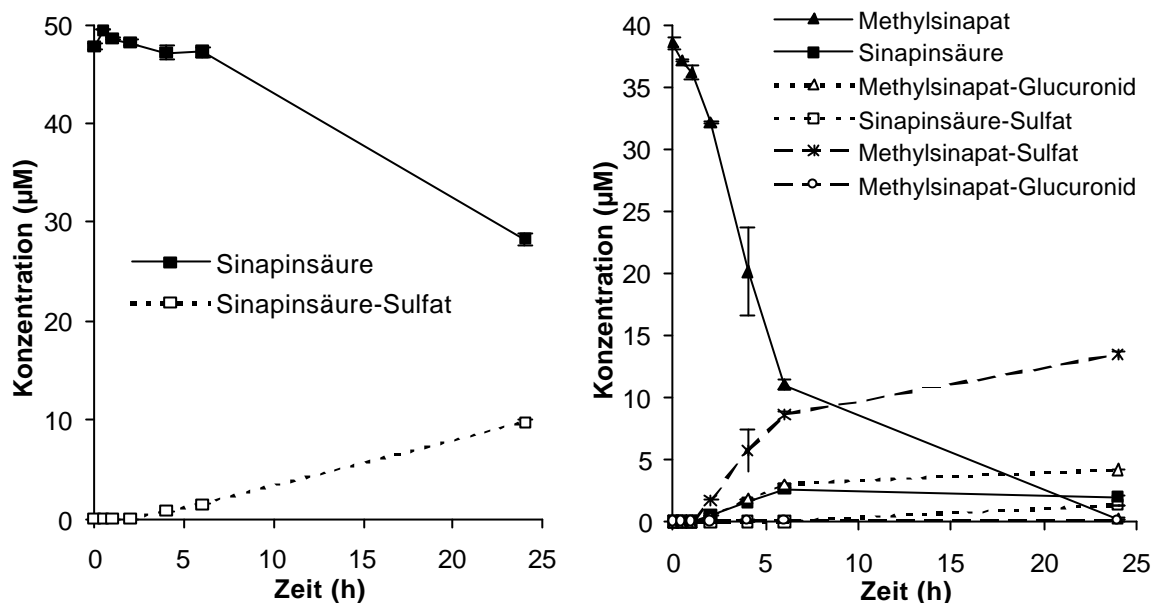


Abbildung 94: Zeitabhängiger Metabolismus von Sinapinsäure (links) und Methylsinapat (rechts) durch Caco-2

Tabelle 99: Metabolismus von Sinapinsäure und Methylsinapat durch Caco-2 in Abhängigkeit von der Zeit

Testsubstanz/ Metaboliten	Konzentration (µM)						
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Sinapinsäure	47,7 ± 0,3	49,5 ± 0,0	48,6 ± 0,2	48,2 ± 0,3	47,1 ± 0,7	47,3 ± 0,5	28,3 ± 0,5
Sinapinsäure-Sulfat ^c	-	-	-	-	0,8 ± 0,0	1,5 ± 0,1	9,8 ± 0,2
Methylsinapat	38,5 ± 0,5	37,1 ± 0,1	36,1 ± 0,6	32,2 ± 0,1	20,1 ± 3,5	11,0 ± 0,4	0,2 ± 0,0
Sinapinsäure	-	-	-	0,5 ± 0,0	1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,0	2,0 ± 0,1
Methylsinapat-Glucuronid 1 ^d	-	-	-	0,4 ± 0,0	1,8 ± 0,0	3,0 ± 0,0	4,2 ± 0,0
Sinapinsäure-Sulfat ^c	-	-	-	-	-	-	1,3 ± 0,0
Methylsinapat-Sulfat ^d	-	-	-	1,7 ± 0,0	5,7 ± 1,7	8,6 ± 0,2	13,4 ± 0,2
Methylsinapat-Glucuronid 2 ^d	-	-	-	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0

^c Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Sinapinsäure

^d Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Methylsinapat

Während der Inkubation mit CA nahm die Konzentration im Medium von 43 µM innerhalb von 24 h auf 32 µM ab und sowohl FA als auch iso-FA wurden als O-methylierte Metaboliten der CA nach 24 h in niedrigen Konzentrationen von 1,3 µM produziert (**Abb. 95, Tab. 100**). Auch während der Inkubation mit MCA wurden FA und iso-FA in vergleichbar geringen Mengen von den Zellen gebildet. In höheren Konzentrationen war das MCA-Sulfat vorhanden, welches bereits nach 1 h im Medium festzustellen war. Ein MCA-Glucuronid war ebenfalls nach 1 h detektierbar. Als demethyliertes Produkt war CA nach 30 min nachzuweisen. Das höchste Mediumslevel wurde nach 2 bis 6 h mit 8 µM erreicht. Dagegen war MCA nach 4 h im Medium nicht mehr zu detektieren.

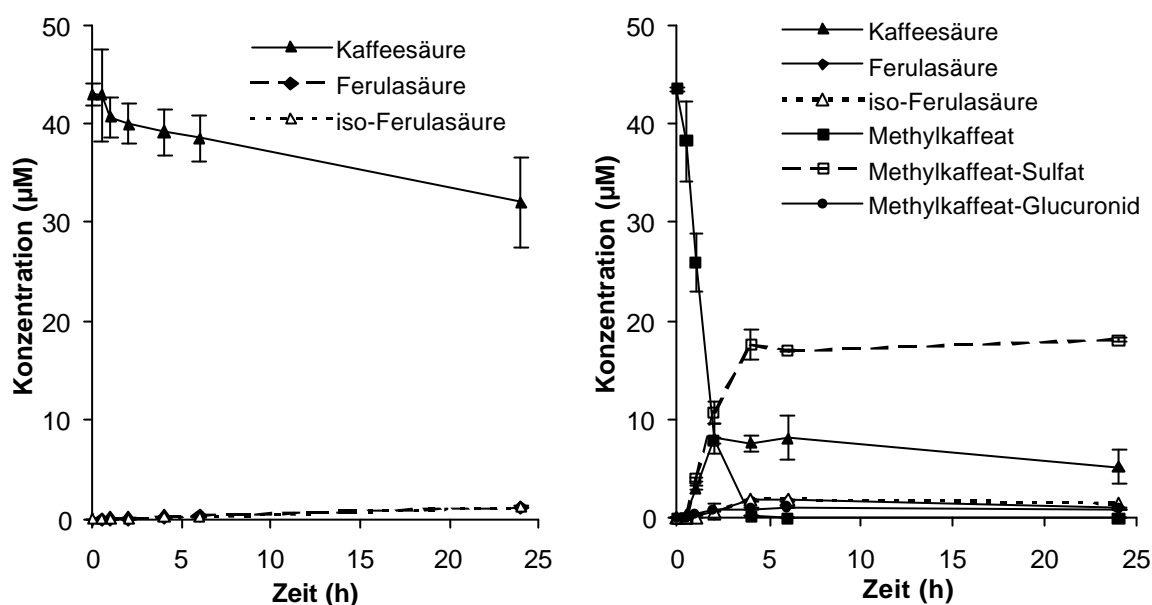


Abbildung 95: Zeitabhängiger Metabolismus von Kaffeensäure (links) und Methylkaffeat (rechts) durch Caco-2

Tabelle 100: Metabolismus von Kaffeensäure und Methylkaffeat durch Caco-2 in Abhängigkeit von der Zeit

Testsubstanz/ Metaboliten	Konzentration (µM)						
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Kaffeensäure	43,0 ± 1,1	42,9 ± 4,6	40,7 ± 2,0	40,0 ± 2,0	39,2 ± 2,4	38,5 ± 2,3	32,1 ± 4,6
Ferulasäure	-	-	-	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,3 ± 0,1
Iso-Ferulasäure	-	-	-	-	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1
Methylkaffeat	43,5 ± 0,2	38,2 ± 4,1	25,8 ± 2,9	7,8 ± 0,3	0,2 ± 0,0	-	-
Kaffeensäure	-	0,3 ± 0,0	3,0 ± 0,1	8,1 ± 1,5	7,5 ± 0,7	8,1 ± 2,2	5,2 ± 1,8
Ferulasäure	-	-	0,2 ± 0,3	0,6 ± 0,8	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1
Iso-Ferulasäure	-	-	-	0,6 ± 0,9	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,0	1,4 ± 0,1
Methylkaffeat-Sulfat ^e	-	-	3,9 ± 0,2	10,7 ± 1,1	17,5 ± 1,5	16,9 ± 0,1	18,1 ± 0,3
Methylkaffeat-Glucuronid ^e	-	-	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0

^e Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Methylkaffeat

Neben den Zell-Inkubationen wurden auch „Mediumskontrollen“ mit den zu untersuchenden Testsubstanzen ohne Zellen über den selben Versuchszeitraum inkubiert. Diese Kontrollen zeigten einen Verlust von CA von anfangs 45 μM auf 15 μM innerhalb von 24 h und von MSA von 45 μM auf 25 μM . CA und MCA sind aufgrund ihrer Catechol-Struktur oxidationsanfälliger als die anderen Hydroxycimtsäuren. Offensichtlich sind diese Komponenten während der Inkubation oxidiert. Allerdings scheinen CA und MCA im Medium mit Caco-2 Zellen stabiler zu sein, weil die Verluste von CA während der 24 h Inkubation wesentlich geringer sind und zusätzlich noch ein Metabolismus durch die Zellen stattfand (**Abb. 95**).

Für PA und MPA ist der Zeitverlauf in **Abbildung 96** und **Tabelle 101** dargestellt. Ein konstanter Level ohne Bildung von Metaboliten zeigte sich auch bei der Inkubation mit PA; das in vorhergehenden Versuchen durch LC/MS identifizierte Sulfat befand sich auch hier vermutlich unterhalb des Detektionsgrenze.

Auch MPA wurde innerhalb von 4 h fast vollständig zur freien Säure hydrolysiert. Nach 30 min waren bereits 2 μM PA im Medium festzustellen und der höchste Level wurde nach 4 h mit 38 μM erreicht, wobei sich diese Konzentration während der weiteren Inkubation kaum änderte. Sowohl ein Glucuronid- als auch ein Sulfat-Konjugat von MPA konnten nach spätestens 2 h im Medium nachgewiesen werden, wobei die Metabolitmengen im weiteren Inkubationsverlauf aber keine wesentliche Zunahme zeigten. Sobald die Ester-Hydrolyse von MPA zu PA vollständig abgelaufen war, fand offensichtlich kein weiterer Metabolismus von PA statt. Für das produzierte PA konnten im Verlauf dieses Experiments keine Metaboliten identifiziert werden oder die Konzentrationen befanden sich unterhalb des Detektionslimits.

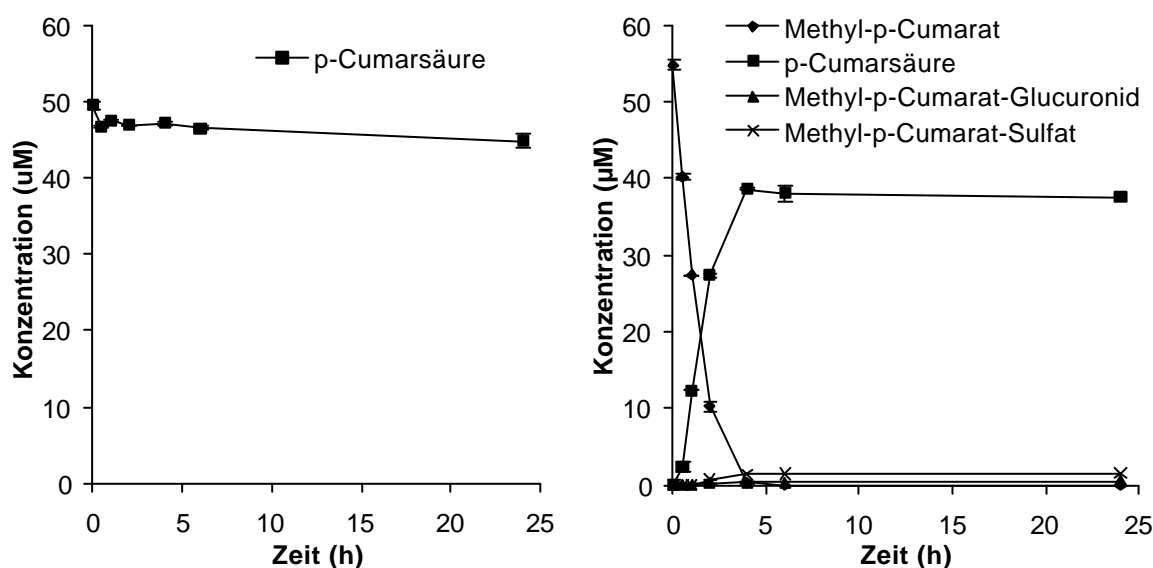


Abbildung 96: Zeitabhängiger Metabolismus von *p*-Cumarsäure (links) und Methyl-*p*-Cumarat (rechts) durch Caco-2

Tabelle 101: Metabolismus von *p*-Cumarsäure und Methyl-*p*-Cumarat durch Caco-2 in Abhängigkeit von der Zeit

Testsubstanz/ Metaboliten	Konzentration (µM)						
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
<i>p</i>-Cumarsäure	49,5 ± 0,6	46,6 ± 0,1	47,5 ± 0,2	46,8 (n=1)	47,2 ± 0,3	46,5 ± 0,2	44,8 ± 0,9
Methyl-<i>p</i>-Cumarat	54,7 ± 0,7	40,2 ± 0,5	27,4 (n=1)	10,2 ± 0,7	0,4 ± 0,1	-	-
<i>p</i> -Cumarsäure	-	2,4 ± 0,6	12,5 ± 0,6	27,4 (n=1)	38,7 ± 0,3	38,0 ± 0,2	37,6 ± 1,1
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Sulfat ^f	-	-	-	0,8 ± 0,0	1,4 (n=1)	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Methyl- <i>p</i> -Cumarat-Glucuronid ^f	-	-	0,2 (n=1)	0,3 ± 0,0	0,4 (n=1)	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0

^f Berechnung beruht auf dem Responsefaktor von Methyl-*p*-Cumarat

3.4.5. Zusammenfassung

Außer den Diferulaten wurden alle untersuchten Hydroxyzimtsäuren (FA, SA, PA, und CA) und ihre Methylderivate von den Caco-2 Zellen metabolisiert. Das bedeutet, daß für den intrazellulären Metabolismus eine Aufnahme der Substanzen in die Zellen stattgefunden haben muß.

Inkubationen der Zellen mit Ferulasäure, Sinapinsäure und *p*-Cumarsäure resultierten in der Bildung der jeweiligen Sulfat-Metaboliten. Kaffeesäure wurde aufgrund der *ortho*-Dihydroxygruppe von der Catechol-O-Methyltransferase zur Ferulasäure beziehungsweise zu iso-Ferulasäure transformiert. Auch die als Modellsubstanzen für veresterte Hydroxyzimtsäuren eingesetzten Methylderivate unterlagen einer Sulfat-Konjugation, aber zusätzlich konnten auch Glucuronid-Metaboliten mit Hilfe von LC/MS-Analysen und Enzymbehandlungen der Zellmedien identifiziert werden. Die eingesetzte Sulfatase konnte jedoch das Sinapinsäure-Sulfat sowie das Methylsinapat-Sulfat nicht hydrolysieren.

Neben den intrazellulär stattfindenden Metabolit-Konjugationen mit Sulfat und Glucuronsäure konnten auch Esterase-Aktivitäten im Zellmedium beobachtet werden. Dabei wurden die Methylderivate von Ferulasäure, *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure zu den jeweiligen freien Hydroxyzimtsäuren hydrolysiert, wobei die hierfür verantwortlichen Enzyme in das Zellmedium sezerniert worden sein müssen. Diese Hydrolyse konnte besonders gut bei den Untersuchungen zum zeitabhängigen Metabolismus verfolgt werden. Allerdings wurde das Methylsinapat von der Caco-2 produzierten Esterase nicht hydrolysiert.

Weiterhin konnten Esterase-Aktivitäten gegenüber den Diethylestern dreier verschiedener Diferulasäuren festgestellt werden. Die Diethylester selbst beziehungsweise die aus der Hydrolyse der Ester resultierenden Diferulate wurden von Caco-2 jedoch nicht metabolisiert.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob durch eine besondere Auswahl der Rohstoffe eine Anreicherung von Substanzen im Bier im Sinne des Reinheitsgebotes erreicht werden kann, die nach dem Konsum dieses Bieres zu positiven antioxidativen und immunmodulierenden Effekten *in vivo* führen.

Aus diesem Grund wurden die antioxidativen Kapazitäten von Hellem Bier und seinen Inhaltsstoffen beurteilt. Anschließend wurden verschiedene Testbiere, die mit erhöhten Rohstoffgehalten gebraut wurden, auf ihre physiologische Wirksamkeit *in vivo* in Form von Trinkstudien untersucht, um Empfehlungen über geeignete Inhaltsstoffe hinsichtlich eines gesundheitsfördernden Bieres ableiten zu können.

4.1. ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT VON BIER UND BIERINHALTSSTOFFEN

4.1.1. Eigenschaften als Radikalscavenger

Um sich ein generelles Bild von den antioxidativen Eigenschaften von Bier und seinen Inhaltsstoffen machen zu können, wurden Helles Bier (mit einem Alkoholgehalt von 4,9%) und verschiedene Bierfraktionen in mehreren biochemischen Modellsystemen getestet. Bei den untersuchten Fraktionen handelte es sich um die wässrigen Überstände des geschroteten Braugetreides, Maische-Fraktion genannt, und der untergärigen Hefe, Hefe-Fraktion genannt. Letztere befand sich unter Vermehrungsbedingungen in Läuterwürze als Nährmedium und beinhaltet damit auch Stoffwechselprodukte der Hefe. Desweiteren wurden die Läuterwürze und die Anstellwürze als nächste Stufe im Brauprozess untersucht. Als Hopfenprodukte wurden sowohl Hopfenpellets als auch ein Hopfenextrakt zur Verfügung gestellt, die entweder als ethanolische Lösungen oder, in Anlehnung an das Würzekochen, als wässrige Extrakte eingesetzt wurden. Die Evaluierung der Bierinhaltsstoffe und des untersuchten Bieres bezüglich ihrer Radikalfängereigenschaften wurde auf der Basis von sogenannten Inhibitionscoeffizienten (IC-Werte) durchgeführt, bei denen es sich um eine Angabe der Konzentrationen des jeweiligen Extraktes handelt, die die ROS generierende Modellreaktion um 25%, 50% beziehungsweise 75% hemmen.

Dabei erwies sich die Maische-Fraktion im X/XOD- und NADH/Diaphorase-System als potentester Radikalfänger unter den getesteten Extrakten. Die Hefe-Fraktion und die Läuterwürze zeigten fast identische IC-Werte im Vergleich zur Maische. Offensichtlich werden die in der Läuterwürze aktiven Substanzen von der Hefe aus dem Nährmedium nicht metabolisiert oder, falls ein solcher Metabolismus stattfinden würde, müßten genauso potente Stoffwechselprodukte entstehen. Das Helle Bier dagegen fungierte als schlechterer Radikal-Scavenger, da das Bier (bezogen auf eine Ethanolkontrolle, um den Ethanoleinfluß auszuschließen) ungefähr fünf bis achtfach höhere IC-Werte aufwies als die untersuchten Fraktionen der Maische, Hefe und Läuterwürze. Wahrscheinlich beruht dies auf einen Verdünnungseffekt der aktiven Substanzen im Verlauf des Brauprozesses bis hin zum fertigen Bier. Auch bei den Hopfenpellet- und Hopfenextrakt-Extrakten war die Fähigkeit zum Abfangen von Radikalen zu beobachten, wobei die Hopfenpellet-Extrakte in den verwendeten Konzentrationen ein höheres antioxidatives Potential zeigten als das fertige Bier. Der aus dem lipophilen Hopfenextrakt hergestellte wässrige Extrakt hatte die geringste Aktivität, was einerseits auf einer beschränkten Löslichkeit der Inhaltsstoffe beziehungsweise auf einen schlechteren Übergang der Substanzen aus der lipophilen Matrix in das wässrige Medium beruhen kann. Auch die Konzentration der aktiven Substanzen im Ausgangsmaterial ist dabei in Betracht zu ziehen, wobei es sich bei diesen Verbindungen aus dem Hopfenextrakt nicht unbedingt um die gleichen wirksamen Substanzen wie aus dem Hopfenpellet handeln muß.

Diese Reihenfolge bezüglich der antioxidativen Kapazitäten der verschiedenen Extrakte konnte in den zwei enzymkatalysierten Testsystemen übereinstimmend festgestellt werden. Allerdings kann eine Hemmung der Ethenfreisetzung aus den Grundreaktionen dieser

Systeme neben einem Abfangen der generierten Radikale auch auf einer Hemmung der Enzyme, Xanthinoxidase und Diaphorase, beruhen. Es ist bekannt, daß Flavonoide die XOD hemmen können (Middleton Jr und Kandaswami, 1994). Ein von S. Hippeli durchgeführter „Harnsäure-Test“, bei dem durch eine Inkubation der Xanthinoxidase mit Xanthin als Substrat und in Gegenwart der Proben die Harnsäureproduktion als Indikator für die Aktivität des Enzyms photometrisch bei 295 nm gemessen wurde, ergab jedoch keinerlei Hinweise auf eine Enzymhemmung durch das Bier oder die Bierinhaltsstoffe. Damit ist das gemessene antioxidative Potential auf ein reines Abfangen der generierten ROS durch die Inhaltsstoffe zurückzuführen. Neben dem Abfangen von $O_2^{\bullet-}$ wäre auch eine Modulation der X/XOD-Reaktion durch eine Komplexierung von Übergangsmetallen, die für den Zyklus der Haber-Weiss-Reaktion notwendig sind, durch die Bierinhaltsstoffe denkbar. Phenolische Verbindungen sind auch bekannt für ihre metallkomplexierenden Eigenschaften (Rice-Evans et al., 1996), die hier eine Rolle spielen könnten.

Auch der Ethanol im Bier ist ein effektiver Radikalfänger und einige Modellreaktionen, wie im Fenton-, X/XOD- und NADH/Diaphorase-System, werden signifikant durch die Ethanolmengen in der Probe gehemmt. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der antioxidativen Kapazitäten der Biere in Bezug auf Kontrollen, die den dem Bier entsprechenden Ethanolgehalt enthielten. Bei dem System der Hydroxylaminoxidation handelt es sich um ein weiteres XOD-katalysiertes System, das aber nicht wesentlich sensitiv auf Ethanol reagierte. Die anhand der IC-Werte bestimmte Reihenfolge der untersuchten Bierfraktionen bezüglich ihrer antioxidativen Kapazitäten bestätigte die Ergebnisse aus dem X/XOD- und NADH/Diaphorase-Testsystem dahingehend, daß die Maische, Läuter- und Anstellwürze am besten abschnitten, die Hefe-Fraktion eine etwas geringere Aktivität aufwies, und das Bier die geringste ROS abfangende Eigenschaft besaß. Diese Resultate hinsichtlich einer abnehmenden antioxidativen Kapazität im Bier im Vergleich zur Würze stimmen mit den Beobachtungen von Fantozzi et al. (1998) überein, die von einer Korrelation zwischen der Abnahme der Phenol-Konzentration von der Würze zum Bier im Laufe des Brauprozesses und einer Abnahme der antioxidativen Aktivität berichteten. Diese Abnahme wurde mit einem Verlust von Tanninen und nicht-Tannin Flavonoiden während des technischen Prozesses erklärt.

Um das Verhalten der antioxidativ wirksamen Verbindungen bezüglich ihrer Bioaktivitäten abschätzen zu können, wurden in einer nächsten Stufe die antioxidativen Kapazitäten der Bierfraktionen in Gegenwart von Plasma getestet. Dabei bestätigte sich erneut die zuvor festgestellte Reihenfolge hinsichtlich der abnehmenden Radikalfängereigenschaften, allerdings konnte vor allem beim Hellen Bier und bei den Hopfenpellet-Extrakten ein relativ starker Verlust ihrer antioxidativen Wirksamkeit beobachtet werden. Im X/XOD-System wurde ca. die vierfache Menge des Hopfenpellet-Extraktes und die fünf bis sechsfache Menge an Bier benötigt, um die gleiche Hemmung der Modellreaktion zu erreichen, wobei in Anwesenheit von Plasma eine 75%ige Inhibition in beiden Fällen überhaupt nicht mehr erreicht wurde. Im NADH/Diaphorase-System wurde mehr als die elffache Bierkonzentration benötigt, um die Grundreaktion wenigstens um 25% zu hemmen. Offensichtlich kommt es zu einer teilweisen Inaktivierung oder Neutralisierung der aktiven Verbindungen durch die Bestandteile des Plasmas. Dies würde hinsichtlich der Bioverfügbarkeit bedeuten, daß diese wirksamen Hopfenverbindungen, falls sie in ihrer ursprünglichen Form absorbiert und dadurch in den Blutkreislauf gelangen, sehr wahrscheinlich mit den Bestandteilen der komplizierten Plasmamatrix interagieren und damit primär ihre antioxidativen Eigenschaften verlieren können. Andererseits könnte diese Bindung aber auch einen Oxidationsschutz der betreffenden Verbindung bewirken. Denkbar wären dabei Interaktionen mit den Serumalbuminen (Dangles et al., 2001), welche die größte Fraktion der Plasmaproteine darstellen, und neben der Harnsäure als wichtige endogene Antioxidantien angesehen werden. Eine Überprüfung dieser These bezüglich eines Schutzes der Serumproteine vor Oxidation durch bioaktive Substanzen würde sicherlich neue Erkenntnisse, besonders hinsichtlich zukünftiger Humanstudien, erbringen.

4.1.2. Hemmung der Lipidperoxidation

Untersuchungen zur Peroxidation von Fettsäuren sind besonders im Hinblick auf einen möglichen Schutz der Zellmembranen wie auch der Lipoproteinpartikel wichtig. Sowohl das Bier als auch die getesteten Bierfraktionen waren in der Lage, die α -Linolensäure vor einer durch Singulett-Sauerstoff ausgelösten Lipidperoxidation zu schützen. Hier traten vor allem Inhaltsstoffe aus den Hopfenprodukten in den Vordergrund, die, als ethanolische Lösungen getestet, die Lipidperoxidation konzentrationsabhängig inhibierten. Laut Tagashira et al. (1995) besitzen Humulone und Lupulone als Hopfenbitterstoffe ein sehr gutes Potential als Radikalscavenger und zur Hemmung der Lipidperoxidation, die hier als wirksame Substanzen der Hopfenprodukte aktiv sein könnten. Auch die im Hopfen vorkommenden Polyphenole können durch ihre H-Donor-Funktion als Radikalscavenger (Rice-Evans et al., 1996) dienen.

An dem beobachteten Lipidperoxidationsschutz können verschiedene Wirkmechanismen beteiligt sein. Zum einen kann der Singulett-Sauerstoff als Initiator der Lipidperoxidation durch die Testsubstanzen abgefangen werden, wobei durch die Reaktion mit konjugierten Doppelbindungen in den Testsubstanzen Endoperoxide oder mit isolierten Doppelbindungen Hydroperoxide entstehen (Elstner, 1990). Andererseits kann durch das Abfangen der Lipidradikale ein Kettenabbruch erzeugt und damit ein Übergangsmetallkatalysierter Zerfall der Lipidhydroperoxide verhindert werden, in dessen weiterem Verlauf die quantifizierten Endprodukte Ethan, Ethen und MDA entstehen würden. Da es sich bei den Testsubstanzen unter anderem auch um einen lipophilen Hopfenextrakt handelt, ist ein oxidativer Schutz der Fettsäuremoleküle durch eine Maskierung der Doppelbindungen aufgrund von angelagerten lipophilen Komponenten ebenso denkbar. Außerdem besteht ein wesentlicher oxidativer Schutz, nicht nur im Hinblick auf die Fettsäureperoxidation, in der Komplexbildung von Übergangsmetallen.

Bei beiden Hopfenpräparationen wird eine Hemmung der Lipidperoxidation in Form einer Reduktion der Endproduktmengen, das heißt sowohl in der Summe der Ethen- und Ethanmengen als auch der Aldehydmengen, angezeigt, die neben eines möglichen Schutzes des Substrats sehr wahrscheinlich auf das Abfangen generierter ROS und der Zwischenproduktradikale zurückzuführen ist. Beim Hopfenextrakt ist zusätzlich durch eine leichte Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses die Tendenz einer Kupferkomplexbildung vorhanden. Die anderen Bierfraktionen zeigten ihre Schutzwirkung in einer relativ starken Kupferkomplexbildung, wobei die Maische-Fraktion die höchste Kapazität aufwies, gefolgt von der Anstellwürze und der Hefe-Fraktion und schließlich dem Hellen Bier. Die dem System zugesetzten Kupferionen katalysieren die Disproportionierung des entstehenden Ethylradikals zu Ethen und Ethan, während ohne Kupfer ausschließlich Ethan entsteht (Heiser et al., 1998). Damit führt eine Kupferkomplexbildung zu der beobachteten Verschiebung des Ethan/Ethen-Verhältnisses zugunsten des Ethans, dessen Entstehung kupferunabhängig ist. Eine gehemmte Lipidperoxidation wurde bei diesen vier Bierfraktionen durch eine Abnahme der Summe von Ethan und Ethen als eine Hemmung der Endprodukte angezeigt.

4.1.3. Kupferkomplexbildung

Das Vorhandensein eines kompetenten Kupferkomplexators konnte auch im DHF/Cu-System bestätigt werden, wobei die Aktivität im System in der gleichen Reihenfolge Maische, Hefe, Läuterwürze, Anstellwürze und Bier abnahm. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß der Komplexator (i) ursprünglich aus der Maische stammt, (ii) von den Hefezellen unter Vermehrungsbedingungen nicht metabolisiert wird und (iii) beim Würzekochen nicht zerstört wird. Hinsichtlich der Aktivitätsabnahme im Laufe des Brauprozesses wäre eine Inaktivierung durch das Kochen der Würze beziehungsweise durch Komponenten aus der Hopfung oder der Vergärung denkbar. Der Komplexator erwies sich als hitzeresistent, da bei der Herstellung des Maischelyophilisats für Testbier 1 der wässrige Maische-Überstand 10 min gekocht, denaturierte Proteine abzentrifugiert und dieser Überstand schließlich lyophilisiert wurde. Eine anschließende Überprüfung des Lyophilisats im DHF/Cu-System ergab, daß der

Kupferkomplexator im Laufe dieser Prozedur im Überstand in Lösung blieb und nicht an Aktivität verlor.

Phenolische Verbindungen sind für ihre Fähigkeit zur Komplexierung bekannt, wobei im Flavonoid-Molekül die 3',4'-Dihydroxy-Position am B-Ring und die Ketol-Struktur 4-oxo, 3-OH oder 4-oxo, 5-OH als mögliche Bindungsstellen für Übergangsmetalle denkbar wären (Rice-Evans et al., 1996). Etwa 80% der phenolischen Verbindungen im Bier stammen dabei aus der Maische (Goupy et al., 1999), während 20% aus dem Hopfen kommen. Daher liegt die Vermutung nahe, phenolische Substanzen für die kupferkomplexierenden Eigenschaften im Bier verantwortlich zu machen. Aber in der Literatur sind auch Hinweise auf Metallkomplexatoren aus anderen Stoffgruppen erwähnt. Wiechmann (1999) isolierte zum Beispiel einen metallkomplexierenden „Schutzfaktor“ aus Spinat, bei dem es sich um ein Peptid handeln könnte.

Metallkomplexierende Eigenschaften sind von besonderem Interesse, weil neben der Katalyse der sehr reaktiven Hydroxylradikale (Haber-Weiss-Reaktion) durch Kupferionen einerseits die Autoxidation von Zuckern erheblich beschleunigt werden kann (ein wichtiger Faktor in Bezug auf Diabetes), und die Oxidation von Fettsäureperoxiden (zum Beispiel in Zellmembranen) sowie eine Oxidation des LDL ausgelöst werden kann (Initialreaktion der Atherosklerose). Bei der kupferinduzierten LDL-Oxidation führte jeweils eine 200fache Verdünnung der getesteten Biere sowie der Maische-Fraktion, der Hefe-Fraktion und der Läuterwürze zu einer erheblichen Verlängerung der Lag-Phase bei einer Direktinkubation, die sehr wahrscheinlich auf eine Komplexierung der auslösenden Kupferionen zurückzuführen ist. Dadurch wird der primäre Schritt, eine Oxidation der Tryptophanreste im Proteinteil (ApoB-100) und die anschließende Initiation der Lipidperoxidation durch Tryptophanperoxyradikale und Übergangsmetall-Komplexe aus Kupfer und den Peroxylradikalen (Gießauf et al., 1995) unterbunden. Dabei war ein Zusammenhang zwischen dem Stammwürzeanteil der Biere gegeben. Die untersuchten Testbiere unterschieden sich hinsichtlich ihrer Eigenschaft, die Oxidation des LDL zu verzögern, indem die Biere mit einem höheren Stammwürzeanteil (Testbiere 4, 5 und 6) auch die Lag-Phase entsprechend verlängerten beziehungsweise komplett inhibierten. Das Helle Bier mit dem geringsten Stammwürzeanteil zeigte auch die geringste Wirkung, während die Läuterwürze und die Hefe-Fraktion die LDL-Oxidation im Beobachtungszeitraum komplett inhibierten. Diese Tatsache untermauert wiederum den Ursprung des Metallkomplexators aus der Maische. Diese Beobachtungen stimmen mit den Versuchen von Fantozzi et al. (1998) überein, bei denen sich die Würze in der Hemmung der LDL-Oxidation ebenfalls effizienter erwies als das fertige Bier, was auf eine Chelatisierung der Kupferionen zurückgeführt wurde. Aber auch Maillard-Produkte, die durch chemische Reaktionen von Kohlenhydraten mit Aminosäuren oder Proteinen während des Herstellungsprozesses oder während der Lagerung von Lebensmitteln entstehen, sind in der Lage, die kupferinduzierte LDL-Oxidation zu hemmen, wobei der genaue Mechanismus (Abfangen von ROS oder Kupferkomplexierung) noch nicht geklärt ist (Dittrich et al., 2003). Diese Reaktionsprodukte, die während der Würzebereitung entstehen (Narziß, 1995), könnten somit im Zusammenhang mit der erhöhten Lag-Phasen-Verzögerung der dunkleren Biere (Testbiere 2, 4, 5 und 6) ebenfalls eine Rolle spielen.

4.1.4. LDL-Oxidationsschutz

Neben einer Komplexierung der induzierenden Kupferionen im umgebenden Milieu kann die LDL-Oxidation auch durch eine Anreicherung von lipophilen Antioxidantien im LDL gehemmt werden, die dort eine direkte Schutzfunktion wie zum Beispiel das endogene α -Tocopherol, wahrnehmen können. Durch Vorinkubationen von Plasma mit Bier und einer anschließenden LDL-Isolierung konnte jedoch kein Oxidationsschutz durch eine Anreicherung von Bierinhaltsstoffen im LDL beobachtet werden. Dies bedeutet, daß der Kupferkomplexator und andere radikalabfangende Komponenten im Bier strikt hydrophil sind und nicht in die lipophile Phase des LDL übergehen. Dabei muß aber auch die Möglichkeit eines Verlustes von eventuell angelagerten Substanzen während der LDL-Isolierung in Betracht gezogen

werden. Aus dem lipophilen Hopfenextrakt konnten jedoch durch eine Vorinkubation von Plasma mit diesem Extrakt antioxidativ wirkende Substanzen im LDL angereichert werden, die konzentrationsabhängig einen Oxidationsschutz boten. Bei dem Versuch, diese Verbindung/en zu analysieren, ergab eine Reextraktion des LDL eine Anreicherung des Monoterpens Myrcen sowie der Sesquiterpene α -Humulen und β -Caryophyllen, die als vorwiegende Bestandteile des etherischen Hopfenöls in diesem Hopfenextrakt vorhanden waren und die durch einen Vergleich der gaschromatographischen Analyse des Hopfenextraktes mit den Reinsubstanzen anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert wurden. Eine Untersuchung mit den Einzelsubstanzen Myrcen, α -Humulen und β -Caryophyllen ergab, daß Myrcen im Vergleich zum α -Humulen nicht so stark angereichert wurde und einen schlechteren Oxidationsschutz als das Humulen bot, wobei jedoch eine normale Oxidationskurve auftrat. Eine Vorinkubation mit Humulen (in nicht physiologischen Konzentrationen von 14,7 mM im Plasma) zeigte eine hohe Affinität des Humulen zu LDL, die in einer Anlagerung von ca. 2000 Mol/Mol LDL resultierte. Bei der kupferinduzierten Oxidation dieses LDL ergab sich eine deutliche Verlängerung der Lag-Phase, aber die auf der Basis konjugierter Diene erhaltene Oxidationskurve wies eine flachere Propagationsphase, eine Reduktion der maximalen Dienbildung sowie eine nicht eindeutig bestimmbare Dekompositionsphase auf. Wahrscheinlich kann durch die starke Anlagerung von Humulen an der Oberfläche des LDL-Partikels ein Angriff des Kupfers verhindert werden. Eine Komplexierung des Kupfers durch das Humulen ist dagegen unwahrscheinlich, denn eine mögliche Kupferkomplexierung sowie mögliche Radikalfängereigenschaften von Humulen wurden im DHF/Cu-System überprüft und erbrachten keine Hemmung dieses Systems. Daß die Bestimmung antioxidativer Eigenschaften lipophiler etherischer Öle trotz einer Micellenbildung in den wässrigen Testsystemen möglich ist, wurde von Graßmann (2000) gezeigt. Durch die enorme Anreicherung von Humulen konnte außerdem eine Hemmung der α -Tocopherolaufnahme des LDL beobachtet werden. Auch eine Kombination von Myrcen und Humulen im Vorinkubationsansatz führte nicht zu einem synergistischen Schutz des LDL. Damit erwies sich der Gesamtextrakt als deutlich wirkungsvoller hinsichtlich eines Oxidationsschutzes, wobei dieser Effekt wohl nur bedingt auf eine Kombination mit Humulen und Myrcen zurückzuführen ist, sondern hauptsächlich auf noch nicht identifizierte Verbindungen im angereicherten LDL.

4.1.5. Immunmodulierende Eigenschaften

Durch die Simulation einer Entzündung konnte im Vollblut-System eine reduzierte Aktivität der neutrophilen Granulozyten durch die einzelnen Bierinhaltsstoffe festgestellt werden. Dabei wirkten vor allem die wasserlöslichen Inhaltsstoffe beider Hopfenprodukte, bei pH 4 extrahiert, in niedrigeren Konzentrationen immunsuppressiv, während vor allem die Maische-Fraktion, die Hefe-Fraktion und die Läuterwürze die Aktivität der Immunzellen bei jeweils der höchsten der untersuchten Konzentrationen hemmten. Mehrere Wiederholungen der durchgeführten Konzentrationsreihen erwiesen sich bei den „ex vivo“ Versuchen als sinnvoll, um dadurch einerseits den individuellen Variabilitäten im Ausmaß der Reaktion der verschiedenen Blutspender entgegenzuwirken, andererseits legen die Ergebnisse den Schluß nahe, daß bei einem erhöhten Aktivitätsniveau der Neutrophilen die Reaktionen in Form von Hemmungen oder Stimulierungen stärker ausfallen und damit zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen. So zeigten die Bierinhaltsstoffe bei weniger stimulierbaren Granulozyten so gut wie keinen Einfluß. Diese Tatsache ist insofern als positiv zu bewerten, da die Neutrophilen in Zuständen einer erhöhten Aktivität (zum Beispiel im Krankheitsfall oder bei Streß) durch die Bierinhaltsstoffe auf ein „normales“ Level herunterreguliert werden. Die durch die Degranulation und den respiratory burst verursachten „überschießenden“ Reaktionen können dadurch verhindert werden und ebenso eine Schädigung des umliegenden Gewebes als mögliche Folge dieser erhöhten Aktivität. Dabei erfolgt offensichtlich nur eine Down-Regulation und keine komplette Hemmung der Aktivität, was bei der unspezifischen Abwehr einen wichtigen Faktor darstellt.

Es ist bekannt, daß Flavonoide einen hemmenden Effekt auf die ROS-Freisetzung menschlicher Neutrophiler ausüben können, wobei als Wirkmechanismen unter anderem eine Hemmung der Proteinkinase C und der Myeloperoxidase sowie Flavonoide als HOCl-Scavenger in Frage kommen (Middleton und Kandaswami, 1994). Möglicherweise handelt es sich bei den immunmodulierenden Komponenten in den Bierrohstoffen um Substanzen aus dieser Stoffgruppe.

4.2. TRINKSTUDIEN

Bei den durchgeführten Trinkstudien wurde die Aufmerksamkeit nicht der Aufnahme bestimmter Inhaltsstoffe aus dem Bier gewidmet, wie zum Beispiel in einer Studie von Bourne et al. (2000) im Hinblick auf die Absorption von Ferulasäure aus Bier, sondern es stand primär die Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas als gesundheitsfördernder Faktor im Vordergrund der Untersuchungen. Aufgrund der in vitro-Ergebnisse wurde versucht, durch Anreicherungen der antioxidativ und immunmodulierend wirksamen Rohstoffe im Bier Effekte in vivo zu bewirken. Dazu zählten (i) die lyophilisierte Maische-Fraktion wegen ihrer kupferkomplexierenden und immunmodulierenden Eigenschaften, (ii) der sauer extrahierte, lyophilisierte Hopfenpellet-Extrakt aufgrund der Beeinflussung der neutrophilen Granulozyten und (iii) der Hopfenextrakt wegen eines Oxidationsschutzes des LDL, die in Form eines Hellen Bieres mit Zusätzen (Testbier 1) in Trinkstudie 1 über einen Zeitraum von 3 h getestet wurden. Untersuchungen hinsichtlich einer Anreicherung von Bierinhaltsstoffen im Plasma oder LDL durch einen längeren, regelmäßigen Bierkonsum führten zu den Trinkstudien 2 und 3, bei denen über die Dauer von zwei Wochen jeweils eines der Testbiere, die unter Einhaltung des Reinheitsgebotes von der Paulaner Brauerei gebraut wurden, pro Abend unter normalen Trinkgewohnheiten getrunken wurde. In der vierten Studie wurde dann das Testbier 6, welches einen hohen Stammwürzengehalt mit einem hohen Hopfengehalt (Alkoholgehalt 5,6%) aufwies, von 17 Probanden konsumiert, um die in vivo Wirkungen, die sich in den vorhergehenden Studien herauskristallisiert haben, an einer größeren Gruppe von Probanden zu bestätigen. Damit sind die Studien 1, 2 und 3 eher als Pilotstudien einzuordnen, da die Biere nur an einer kleinen Gruppe von Probanden (mitunter nur zwei Probanden pro Testbier) getestet wurden, um die Effekte eines höheren Stammwürzeanteils oder des Alkoholgehaltes im Bier abschätzen zu können. Die verschiedenen Trinkstudien betreffend lassen sich die folgenden Aussagen ableiten.

4.2.1. Antioxidative Kapazität des Plasmas in vivo

Bei allen getesteten Bieren konnte die Tendenz einer kurzfristigen Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas zwischen 30 und 60 min nach den Trinken von Bier im X/XOD-System nachgewiesen werden. Dies war in Studie 4 nach dem Konsum von 1 l Bier bei allen 17 Probanden deutlicher zu sehen als in den vorhergehenden Trinkstudien, bei denen nur 500 ml Bier konsumiert wurden und daher nur von tendenziellen Zunahmen gesprochen werden kann, die aber bei (fast) allen Probanden auftraten. Bei den Studien 2 und 3 über eine 14tägige Periode zeigten fast alle Probanden, die Biere mit einem höheren Stammwürzeanteil getrunken hatten, am Ende der Studie ein erhöhtes Plasmapotential im X/XOD-System (drei von vier Probanden in Trinkstudie 2 und fünf von sechs Probanden in Trinkstudie 3), während die beiden Probanden mit 14tägigem Konsum des Kontrollbieres ein niedrigeres antioxidatives Potential aufwiesen. In wieweit sich die 14 d- und 13 d-Werte tatsächlich auf das Biertrinken beziehen lassen, läßt sich nicht sagen, da einige Probanden aus den Trinkstudien 2 und 3 nüchtern zur letzten Blutabnahme antraten, andere zuvor ihr regelmäßiges Frühstück, wie auch zu Beginn der Studie, zu sich genommen hatten. Aber diese Untersuchungen sollten in erster Linie als Pilotstudien zeigen, ob der Bierkonsum bei normal ernährten Menschen aus der Bevölkerung Effekte verursacht, die dann im Vordergrund von genaueren Untersuchungen stehen sollten, wobei damit natürlich der

Aussagefaktor dieser beiden Studien im Gegensatz zu Studie 1 aufgrund der variablen Ernährung der Probanden sinkt. Deshalb wurden die Probanden der Studie 4 gebeten, nüchtern zur letzten Blutabnahme zu erscheinen, die ca. 10 h nach dem letzten Bierkonsum, wie bei den anderen Studien, durchgeführt wurde.

Hier zeigte sich, daß im Vergleich zu den Kontrollwerten das antioxidative Potential des Plasmas im X/XOD-System bei fast allen Probanden erheblich abnahm. Interessanterweise ergab sich genau der gleiche Effekt bei einer anderen Humanstudie hier am Lehrstuhl für Phytopathologie, bei der ein phenolreicher Extrakt in Form von Kapseln von 20 Probanden über die Dauer von 14 Tagen eingenommen wurden. Hierbei kam es am Ende der Studie, analog zu den Ergebnissen aus der Trinkstudie 4, zu einer scheinbar dramatischen Abnahme der antioxidativen Kapazität in diesem System, wobei dieser Verlust nicht in anderen antioxidativen Modellsystemen zu messen war (Daten bis jetzt noch nicht veröffentlicht). Möglicherweise stehen diese Ergebnisse im Zusammenhang mit einer spezifischen Reaktion von (absorbierten) Plasmakomponenten mit der XOD, die mit diesem Testsystem äußerst sensitiv gemessen werden kann. Wenn es sich dabei um Substanzen handelt, die auf eine polyphenolreiche Ernährung zurückzuführen sind, könnte diese Reaktion als eine sensitive Marker-Reaktion für eine Aufnahme dieser Substanzen in das Blutplasma verwendet werden, auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist. Hierzu bedarf es unbedingt noch genauerer Untersuchungen.

Allerdings war dieser Effekt nur in Trinkstudie 4 zu messen. In Trinkstudie 2 und 3 war durch den Konsum der Testbiere mit dem hohen Stammwürzegehalt eher eine Zunahme der antioxidativen Kapazität nach 14 Tagen zu beobachten. Demnach könnten möglicherweise auch Phenole aus dem Hopfen, mit dem Testbier 6 unter anderem angereichert wurde, für diesen Effekt verantwortlich sein.

Damit können auch keine Aussagen getroffen werden, wodurch die Hemmung der X/XOD-Reaktion zustande kommt, die einem erhöhten antioxidativen Potential gleichgesetzt wird und die als kurzfristiger Effekt durch das Trinken von Bier bei allen Trinkstudien (bis 60 min) im X/XOD-System gemessen werden konnte. Da der bereits erwähnte Harnsäuretest mit den Testbieren nicht durchgeführt wurde, könnte neben einer radikalabfangenden Wirkung der aufgenommenen Inhaltsstoffe auch eine Hemmung der XOD vorliegen. Auch der Ethanolgehalt im Plasma könnte zum Teil zur Hemmung des Systems beitragen, allerdings erwies sich auch das Fenton-System als sensitiv gegenüber EtOH und in Trinkstudie 3 zeigte sich kein Unterschied in der antioxidativen Kapazität des Plasmas nach dem Konsum des gehaltvolleren und des alkoholreduzierten Bieres.

Eine Erhöhung des antioxidativen Potentials konnte auch im Fenton-System in den Trinkstudien 1 und 2 bestätigt werden, allerdings nicht in Studie 3. Möglich ist, daß die Tendenz einer verbesserten antioxidativen Kapazität im Fenton-System eher auf das Trinken von Hellem Bier (Kontrollbier, Testbier 1 oder Testbier 3) zurückzuführen ist. Bei den in vitro-Untersuchungen der Testbiere war eine deutliche Stimulierung der zugrundeliegenden Reaktion zu beobachten. Dabei waren das Kontrollbier und das Testbier 3 nur in höheren Konzentrationen prooxidativ, während die übrigen Testbiere 2, 4 und 5 mit ihrem höheren Stammwürzeanteil die Modellreaktion immer mehr stimulierten. Offensichtlich lagen bei der Zugabe der Bierproben zum Fenton-System eine größere Menge an aktiven EDTA-Komplexen vor, die die Generierung von Radikalen begünstigten. Die prooxidative Aktivität einiger Polyphenole, die in Gegenwart von Metallionen in hohen Konzentrationen die Hydroxylradikal-Bildung durch Eisen-EDTA beschleunigten, ist bekannt (Rice-Evans et al., 1996). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß durch den Überschuß von EDTA Übergangsmetalle, die möglicherweise auch als Polyphenol-Komplexe in den Bierproben vorliegen, aus dem Probenmaterial herausgelöst werden und damit vermehrt aktive Eisen-EDTA-Komplexe für die OH^\bullet -Generierung zur Verfügung stehen. Andererseits wäre auch ein Recycling des Eisen-EDTA-Komplexes durch eine Reduktion des Eisens im EDTA-Komplex von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch eine Autoxidation von bestimmten Inhaltsstoffen (Phenolen) im Bier denkbar, wodurch wieder aktive Eisen-EDTA-Komplexe entstehen würden, die wiederum zu einer vermehrten Radikalbildung führen würden (meßbar als Ethen als KMB-Spaltprodukt). Wahrscheinlich ist dieses prooxidative Verhalten der Biere ein Artefakt aufgrund der Verwendung von EDTA im Testsystem.

Diese Modulation in der Radikalbildung wurde durch das Plasma in den getesteten Plasma/Bier-Kombinationen kompensiert und könnte, auch bei einer Absorption dieser Inhaltsstoffe aus dem Bier, zu dem Ergebnis in Trinkstudie 3 geführt haben, bei der im Fenton-System bei allen Zeitpunkten so gut wie keine Veränderung in der antioxidativen Kapazität des Plasmas beobachtet wurde. Eine weitere Testung der Biere und des Probandenplasmas im System ohne EDTA würde sicherlich weitere Erkenntnisse erbringen, ob sich dieser stimulierende Effekt generell durch aktive Komplexe oder nur als Artefakt in Anwesenheit von EDTA zeigt.

Auch Ghiselli et al. (2000) konnten eine kurzfristige Erhöhung der antioxidativen Kapazität von Plasma 1 h nach dem Bierkonsum feststellen, der mit einem gleichzeitigen Anstieg von phenolischen Säuren korrelierte. Desweiteren konnte diese Gruppe zeigen, daß die Absorption der phenolischen Säuren von entalkoholisierendem Bier beeinträchtigt ist und der im Bier vorhandene Ethanol alleine die antioxidative Kapazität von Plasma nicht beeinflusste. Hier stellt sich die Frage, ob der Ethanol einerseits als „carrier“ für die bioaktiven Inhaltsstoffe und andererseits als Geschmacksträger einen wesentlichen Faktor eines Gesundheitsbieres ausmacht. In Trinkstudie 3 konnte dagegen bei einem Vergleich der Effekte von Testbier 4 (5,2%) mit denen von Testbier 5 (alkoholreduziert, 1,4%) hinsichtlich des Alkoholgehaltes kein eindeutiger Unterschied in den in vivo-Wirkungen festgestellt werden mit Ausnahme des Effektes eines günstigeren LDL/HDL-Quotienten durch das Testbier 4.

4.2.2. Kupferkomplexierung in vivo

Bezüglich der Aufnahme eines Kupferkomplexators war im Plasma der Probanden aus Trinkstudie 1 keine erhöhte Aktivität im DHF/Cu-System nachweisbar. Dies kann bedeuten, daß die für die Kupferkomplexierung verantwortliche/n Substanz/en aus der Maische nicht bioverfügbar sind oder zu den Zeitpunkten, zu denen die Blutabnahmen stattfanden, noch nicht absorbiert wurden beziehungsweise dem Blutkreislauf bereits wieder entzogen worden waren. Auch ein Metabolismus durch die Leber und/oder das Darmepithel wäre möglich, wobei die für die Komplexierung benötigten funktionellen Gruppen transformiert werden könnten. Es konnten allerdings auch nur 4 µl Plasma, dem IC₅₀-Wert von Plasma entsprechend, in das DHF/Cu-System mit 20 µM Cu²⁺ eingesetzt werden und möglicherweise war, falls eine intakte Absorption des Kupferkomplexators stattgefunden hat, die Konzentration im Plasma zu gering für sichtbare Effekte. Das Rose Bengal-System als weiteres Testsystem zur Untersuchung kupferkomplexierender Eigenschaften erwies sich als unbrauchbar, da offensichtlich durch das im Plasma vorhandene Caeruloplasmin, ein als Kupferspeicher und -transportprotein wirksames Plasmaprotein, das im System vorhandene Kupfer gebunden wurde (und damit kein Ethen produziert wurde) und sich die Herstellung eines Gleichgewichtes in der Ethen- und Ethanproduktion durch eine Erhöhung der Kupferkonzentration als äußerst diffizil und plasmaabhängig herausstellte.

4.2.3. Immunmodulation in vivo

Bei den „ex vivo“-Untersuchungen der Bierfraktionen und der verschiedenen Testbiere bezüglich ihrer Immunmodulation aus dem Vollblut von mehreren Spendern war eine Bestimmung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Vollblut nicht erforderlich, da sich die Zellzahlen nicht ändern können. Aber aufgrund der veränderlichen Anzahlen im Körper erwies es sich für die korrekte Aktivitätsbestimmung als erforderlich, die bei den „in vivo“-Untersuchungen der Trinkstudien im Vollblut-System produzierten Ethenmengen auf 10⁶ Neutrophile/ml Blut umzurechnen.

Bei allen getesteten Bieren außer bei den Testbieren 1 und 4 ergaben sich jeweils am Ende der Studie bei den meisten Probanden die Tendenz einer reduzierten Anzahl an segmentkernigen Granulozyten im Blut. Dies war besonders deutlich in Trinkstudie 4 bei 14 der 17 Probanden nach dreitägigem Bierkonsum von jeweils 1 l Testbier 6 pro Tag zu sehen. Neutrophile Granulozyten bleiben durchschnittlich nur sechs bis acht Stunden im Blutkreislauf, wobei die Hälfte dieser Immunzellen an der Innenseite der Gefäße, vor allem in

Lunge und Milz, haftet, um in Stressituationen schnell mobilisiert zu werden (Larisch, 2003). Offensichtlich bewirken die Bierinhaltsstoffe oder der Alkohol eine vermehrte Sedierung der Neutrophilen im Gewebe.

Gleichzeitig mit dieser Tendenz einer abnehmenden Anzahl im Vollblut zeigten vor allem die dunkleren Biere mit einem erhöhten Stammwürzeanteil eine Tendenz in Richtung Immunsuppression, die sich wiederum in Trinkstudie 4 nach dem Konsum von 1 l Bier kurzzeitig nach 45 min bei neun der zwölf Probanden und nach drei Tagen bei allen zwölf untersuchten Probanden durch einen deutlichen Aktivitätsverlust abzeichnete. Auch bei den ex vivo-Untersuchungen konnte eine suppressive Immunmodulation sowohl bei den Hopfenprodukt-Extrakten, der Maische-Fraktion, Hefe-Fraktion und Läuterwürze als auch den Testbieren 2 und 3, und besonders gut bei den Testbieren 4, 5 und 6 mit dem höheren Stammwürzegehalt beobachtet werden (siehe 4.1.5.).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte dagegen, daß Rotwein keinen Kurzzeit-Effekt auf Neutrophile und Monozyten ausübte, obwohl Wein-Komponenten wie Ethanol und Polyphenole für ihre immunsuppressive Aktivität bekannt sind (Watzl et al., 2002).

Ob der Effekt der hier beobachteten Aktivitätshemmung in vivo nun auf die im Bier befindlichen Polyphenole aus der Maische oder dem Hopfen oder auf andere Inhaltsstoffe zurückzuführen ist, kann im Rahmen dieser Studien nicht beantwortet werden. Ein Zusammenhang mit dem Stammwürzegehalt der Biere erscheint jedoch sehr wahrscheinlich. Nach dem Konsum von Hellem Bier in Trinkstudie 1 ergab sich bis 60 min nach dem Beginn des Trinkens eher die Tendenz einer Aktivierung der Neutrophilen sowohl bei dem Kontrollbier als auch dem Hellen Bier mit Zusätzen (= Testbier 1) und auch die beiden Probanden in Trinkstudie 2, die das Helle Bier über eine 14 Tage-Periode konsumierten, reagierten am Ende der Studie mit einem höheren Aktivierungsstatus der Neutrophilen als zu Beginn der Studie. Wodurch allerdings der signifikante Aktivitätsverlust bei allen Probanden von Trinkstudie 2 nach dem Konsum der Testbiere 2 und 3 und dem Hellen Bier nach 24 h verursacht wurde, ist unklar. Mit den Testbieren 4 und 5, die einen höheren Stammwürzeanteil aufwiesen, konnte dies in Trinkstudie 3 nach 24 h nicht reproduziert werden und hängt damit wohl auch nicht mit einer möglichen Nachwirkung durch die Blutabnahme zusammen.

4.2.4. Blutparameter in vivo

Während der beiden längerfristig dauernden Trinkstudien mit einem regelmäßigen Bierkonsum über 14 Tage konnte in Studie 2 bei vier der sechs Probanden eine Erhöhung des HDL-Spiegels im Blut festgestellt werden, die einen günstigeren LDL/HDL-Quotienten bewirkte. In Studie 3 zeigte sich bei zwei der drei Probanden mit dem Testbier 4 ebenfalls ein Anstieg des HDL am Ende der Studie, wobei der dritte Proband vorzeitig die Studie abbrach. Alle getesteten Biere hatten einen Alkoholgehalt von mindestens 4,9%. Bei den drei Probanden, die das alkoholreduzierte Bier mit 1,4% Alkohol konsumierten, konnte dagegen kein verbesserter LDL/HDL-Quotient beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen das bekannte Phänomen, daß regelmäßiger, maßvoller Alkoholkonsum sich günstig auf den Fettstoffwechsel auswirkt (van der Gaag et al., 2001), wobei von einer Erhöhung des HDL um 4,4% durch den täglichen Genuß von einem Bier berichtet wird (Denke, 2000).

Auch hinsichtlich der Harnsäure als metabolischer Parameter im Blut konnte bei vier der sechs Probanden in Trinkstudie 3 eine leichte Zunahme der Konzentration nach 30 min im Blut beobachtet werden, während in Trinkstudie 4 alle 17 Probanden nach 45 min mit einer Erhöhung reagierten. Die Harnsäure wird als ein wichtiges endogenes Plasmaantioxidans (Halliwell und Gutteridge, 1999) betrachtet, allerdings konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität im X/XOD-System und einem höheren Plasmalevel der Harnsäure beobachtet werden. So zeigten zum Beispiel in Trinkstudie 4 nach 3 Tagen zwölf der 17 Probanden einen höheren Harnsäurespiegel im Blut im Vergleich zur Kontrolle, während das Plasma im X/XOD-System eine deutlich geringere antioxidative Kapazität als zu Beginn der Studie zeigte. Deshalb müssen andere Substanzen die beobachteten Effekte im Plasma bewirken. Auch van der Gaag et al. (2000) fanden erhöhte Serumkonzentrationen von Harnsäure nach dem Bierkonsum, die auch keinen Effekt auf den antioxidativen Status des Serums, bestimmt mit dem TEAC-Test,

zeigten. In diesem klinischen Versuch wurden auch keine Effekte auf die Plasmakonzentrationen von α - und γ -Tocopherol, Lycopin, α -Carotin u.a. gefunden, mit Ausnahme einer Abnahme von β -Carotin nach dreiwöchigem Rotwein-, Bier- und Spirituosenkonsum. Die in Trinkstudie 2 extrahierten lipophilen Antioxidationsgehalte aus Plasma und LDL lassen ebenfalls keinen signifikanten Einfluß durch das Biertrinken erkennen, weder bei α -Tocopherol, Lycopin, β -Carotin, Ubichinol oder Ubichinon.

4.2.5. LDL-Oxidation

Die beiden längerfristig dauernden Trinkstudien 2 und 3 zielten in erster Linie auf die Beantwortung der Frage, ob sich durch einen regelmäßigen Bierkonsum in vivo ein LDL-Schutz und damit eine antiatherogene Wirkung aufbauen läßt. Bei den durchgeführten kupferinduzierten LDL-Oxidationen mit dem aus dem Probandenplasma isolierten LDL war jedoch kein Oxidationsschutz im LDL-Partikel aufgrund einer verlängerten Lag-Phase zu beobachten. Offensichtlich sind die für den LDL-Schutz in vitro verantwortlichen Hopfeninhaltsstoffe zu gering konzentriert, nicht bioverfügbar oder zu anderen Produkten metabolisiert worden. Aber es besteht trotzdem die Möglichkeit, daß im wässrigen Milieu des Plasmas Inhaltsstoffe aus dem Bier zum Einsatz kommen, die wie bei den in vitro durchgeführten Direktinkubationen das LDL schützen können. Eine erhöhte Oxidationsanfälligkeit des LDL, die in anderen Studien nach einem zwei- bis vierwöchigen Weißwein- oder Bierkonsum erwähnt wurden (Puddey et al., 1998), konnte in den Trinkstudien nach dem (längerfristigen) Konsum von 0,5 l Bier nicht festgestellt werden. Aber nach dem Konsum von 1 l zeigten sich entsprechende Tendenzen als ein kurzfristiger Effekt bei der Hälfte der Probanden. Möglicherweise spielt in dieser Beziehung die Menge des aufgenommenen Alkohols eine Rolle.

4.2.6. Zusammenfassende Bemerkungen

Aufgrund der unterschiedlichen Designs der Trinkstudien kann keinem der getesteten Biere, die eine entsprechende Rohstoffanreicherung erfuhren, eine Wertung als das am besten antioxidativ wirkende Bier zugesprochen werden, da zum Beispiel in Trinkstudie 2 und 3 die Biere an zu wenigen Probanden getestet wurden und bei Trinkstudie 4 im Gegensatz zu den anderen Studien 1 l des Testbieres getrunken wurden mit dem Resultat einer signifikanten Erhöhung des antioxidativen Plasmapotentials, deren Dauer nicht bestimmt wurde wie zum Beispiel in Studie 1. Aber aus den durchgeführten Untersuchungen lassen sich für die Entwicklung eines Bieres, welches vermehrt gesundheitsfördernde Eigenschaften besitzen soll, folgende Punkte ableiten:

- Erstrebenswert ist eine Erhöhung der Hopfeninhaltsstoffe und der Stammwürze, die neben ihren potenten Eigenschaften als Radikalscavenger auch deutliche Effekte auf die Immunmodulation von stimulierten neutrophilen Granulozyten aufweisen.
- Neben seiner antioxidativen Wirkung als Radikalfänger wirkt der im Bier enthaltene Ethanol modulierend auf den Fettstoffwechsel und sollte deshalb nicht wesentlich reduziert werden. Dies wäre, unter der Voraussetzung eines moderaten Bierkonsums, durchaus mit dem gesundheitlichen Nutzen vereinbar, aber auch die Tatsache einer möglichen Generierung freier Radikale im Verlauf des Metabolismus von Ethanol (Situnayake et al., 1990) sollte in diesem Zusammenhang bedacht werden.
- Ein direkter LDL-Schutz konnte durch das Trinken von Bier nicht festgestellt werden, aber durch die nach dem Biertrinken definitiv erhöhte antioxidative Kapazität des Plasmas ist ein erhöhter Schutz durch das umgebende Medium denkbar.
- Auch wenn ein erhöhtes kupferkomplexierendes Potential des Plasmas in vivo in der dreistündigen Trinkstudie 1 nicht nachzuweisen war (sei es aufgrund des verwendeten Testsystems, der gewählten Zeitpunkte oder einer Nichtabsorption), sollten weitere Untersuchungen zu der metallkomplexierenden Eigenschaft von Bier durchgeführt werden.
- Die Aussage aller Probanden in Trinkstudie 1 bezüglich einer guten schlaffördernden Wirkung von Testbier 1 mit dem angereicherten Hopfenpellet-Extrakt im Gegensatz zum

Kontrollbier wurde als Hinweis auf eine Absorption der Hopfeninhaltsstoffe, die für einen sedativen Effekt (Wichtl, 1997) bekannt sind, gewertet. Auch wenn, wie in den in vitro-Untersuchungen beobachtet, die Inhaltsstoffe des Hopfens durch eine mögliche Bindung an Plasmabestandteile oder an das proteinreiche Maischelyophilisat hinsichtlich einer antioxidativen Wirksamkeit an Aktivität zu verlieren scheinen, sind sie offensichtlich in vivo dennoch bioaktiv. Inwieweit dieser schlaffördernde Effekt bei der Entwicklung eines vermehrt gesundheitsfördernden Bieres zu verfolgen ist, hängt sicherlich vom Zweck und der angestrebten Zielgruppe der Konsumenten ab.

Hydroxyzimtsäuren stehen aufgrund ihrer chemoprotektiven und antioxidativen Eigenschaften in vitro im Mittelpunkt zahlreicher Absorptionsstudien mit dem Ziel, Daten für eine mögliche gesundheitsfördernde Wirkung in vivo zu sammeln.

Auch das Bier stellt eine Quelle für Hydroxyzimtsäuren dar, die sowohl im Hopfen (de Keukeleire et al., 1999) als auch im Braugetreide vorhanden sind. Dabei liegen die Zimtsäuren vor allem im Getreide hauptsächlich zellwandgebunden vor. Bezüglich der Bioverfügbarkeit dieser veresterten Zellwandkomponenten existieren bis jetzt noch keine Daten in Form von Absorptionsstudien im Menschen. In der durchgeführten Humanstudie wurde speziell die Aufnahme und die Art möglicher in vivo Metaboliten dieser phenolischen Säuren aus der relativ komplexen Matrix von Zerealien untersucht.

4.3. ABSORPTION VON HYDROXYZIMTSÄUREN AUS ZEREALIEN

Laut Watzl und Rechkemmer (2001) existieren bisher keine Angaben über den Phenolsäuregehalt von Zerealien. Damit werden in dieser Arbeit erste Anhaltspunkte geliefert, inwieweit sich kommerziell erhältliche Frühstückszerealien hinsichtlich der phenolischen Säuren zusammensetzen. Die verwendeten Zerealien bestanden zu 85% aus Weizenkleie, welche signifikante Mengen an Hydroxyzimtsäuren enthält (Clifford, 2000). Die in dieser Studie konsumierten Kellogg's All-bran enthielten pro 100 g insgesamt 325 mg Hydroxyzimtsäuren und Diferulate, wobei erwartungsgemäß der überwiegende Anteil der detektierten Hydroxyzimtsäuren (**Abb. 2**) und die Dehydrodimere der Ferulasäure (**Abb. 3**) sogar ausschließlich in veresteter Form präsent waren. Nach dem Verzehr der Zerealien konnten erhöhte Mengen an Ferulasäure (FA) und Sinapinsäure (SA) im enzymbehandelten Plasma und Urin der Probanden festgestellt werden, die eindeutig auf den Zerealienkonsum zurückzuführen sind. Der im Blut zirkulierende maximale Level an Ferulasäure, der 1 h beziehungsweise 3 h nach dem Konsum beobachtet wurde, betrug ca. 200 nM im Plasma der Probanden. Diese maximale Plasmakonzentration wurde für einzelne Hydroxyzimtsäuren auch in anderen Studien angegeben (Watzl und Rechkemmer, 2001). Weiterhin weist das relativ frühe zeitliche Erscheinen des FA-Maximums im Plasma darauf hin, daß die Absorption vorwiegend im Dünndarm stattfindet.

Während die im Plasma detektierte FA zu den untersuchten Zeitpunkten hauptsächlich als Glucuronid im Blutkreislauf vorzufinden ist (was bei zwei der sechs Probanden durch verschiedene Enzymbehandlungen genauer untersucht wurde), war im Urin der Probanden vorwiegend Feruloylglycin als Metabolit festzustellen. Dabei traten individuelle Unterschiede in der Menge der absorbierten FA sowie im Konjugationstyp auf. So enthielt die Urinprobe von Proband E zum Beispiel signifikant höhere Mengen an Feruloylglycin im Vergleich zu den anderen Probanden. Dies könnte einerseits auf einer unterschiedlichen Enzymausstattung der Probanden beruhen, andererseits könnte auch das Ausmaß des Kauens der Zerealien eine Rolle für den Grad der Aufspaltung der komplexen Matrix spielen und damit für den Zugang zu FA, die dann absorbiert werden kann.

Bei den Metabolismusstudien mit Caco-2 hatte sich herausgestellt, daß die verwendete Sulfatase nicht in der Lage war, das von Caco-2 produzierte SA-Sulfat zu spalten. Dies bedeutet im Zusammenhang mit der in den enzymbehandelten Plasma- und Urinproben

detektierten SA, daß eventuell vorhandenes SA-Sulfat, welches durch die Sulfatase nicht zu SA hydrolysiert wurde, auch nicht detektiert werden konnte.

Da die mit dem Urin ausgeschiedene Menge die in den Zerealien enthaltene Menge an wasserlöslicher freier FA und SA übersteigt, muß eine Hydrolyse der Esterbindungen stattgefunden haben. Andreasen et al. (2001a, 2001b) konnten eine Spaltung von Ferulat und Diferulaten aus Modellsubstanzen und Zerealien durch zellfreie Extrakte der Zwölffingerdarm-, Dünndarm- und Dickdarm-Mucosa aufzeigen. Demnach ist eine Freisetzung der veresterten FA und SA durch Hydrolyse aus der Zerealienmatrix mit einer anschließenden Absorption im Darm denkbar. Eine weitere Freisetzung von veresterten Hydroxyzimtsäuren, sowohl von der löslichen als auch von der unlöslichen Fraktion der Zerealien, ist im Dickdarm durch die Aktivität bakterieller Enzyme ebenso möglich (Kroon et al., 1997, Andreasen et al., 2001b). Aufgrund der Tatsache, daß 6 h nach dem Verzehr der Zerealien und bei den nachfolgenden Zeitpunkten nur noch geringe Mengen an FA im Plasma gefunden wurden, werden die Hydroxyzimtsäuren vom Dickdarm offensichtlich nur im geringen Maß oder gar nicht absorbiert. Falls nun eine Freisetzung der Phenolsäuren aus den Zerealien im Dickdarm stattfindet, werden sie wahrscheinlich durch die vorhandene Mikroflora metabolisiert (Scheline, 1991, Rechner et al., 2002) oder mit dem Fäzes ausgeschieden. Aber auch wenn keine Absorption in den Blutkreislauf erfolgt, können trotzdem gesundheitsfördernde Effekte durch die freigesetzten Hydroxyzimtsäuren im Darmlumen ausgeübt werden.

Die Wiederfindungsraten für die beiden absorbierten Phenolsäuren FA und SA im Urin der Probanden betragen jeweils ungefähr 3% der gesamten verzehrten Menge und hinsichtlich der wasserlöslichen Komponenten, die sowohl freie als auch veresterte Säuren enthalten, 44% für FA und 6% für SA. Auch in einer kürzlich publizierten Bioverfügbarkeitsstudie mit Ratten zeigte sich, daß die Absorption von FA aus einer komplexen Zerealienmatrix in Vergleich zu frei verfügbarer FA deutlich reduziert ist, wobei dies auf einen möglicherweise limitierten Zugang der Verdauungsenzyme zum phenolischen Substrat zurückgeführt wurde (Adam et al., 2002).

In der bereits erwähnten Studie von Andreasen et al. (2001b) konnte gezeigt werden, daß freie Diferulate über den Gastrointestinaltrakt von Ratten absorbiert werden können. Weiterhin konnten sie feststellen, daß Esterasen aus dem menschlichen Darm *in vitro* dazu in der Lage waren, Diferulate aus Zerealien/Kleie freizusetzen und damit die Möglichkeit einer Entlassung dieser Komponenten in das Darmlumen gegeben war. Allerdings konnte in der durchgeführten Humanstudie im Plasma und im Urin der Probanden keine Absorption von intakten Diferulaten nachgewiesen werden. Demnach befanden sich die Diferulat-Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze, die im Plasma 10 nM und im Urin 25 nM betrug. Allerdings kann eher davon ausgegangen werden, daß die Dimere der Ferulasäure kovalent gebunden bleiben und mit dem Fäzes ausgeschieden werden.

Bei den im Blut zirkulierenden FA-Konzentrationen von maximal 200 nM stellt sich die Frage, ob die chemoprotektiven und antioxidativen Effekte auch bei diesen physiologisch relevanten Konzentrationen meßbar sind und ob vor allem die *in vivo* vorkommenden Konjugate noch genauso wirksam sind oder in ihrer Aktivität einbüßen. Ein wichtiges Kriterium für eine effektive Schutzwirkung von Radikalfängern und antioxidativer Systeme lautet, daß der Scavenger zur richtigen Zeit am richtigen Ort eine geeignete Konzentration erreicht (Elstner, 1993). In *in vitro*-Untersuchungen zeigten Hydroxyzimtsäuren und Diferulate antioxidative Eigenschaften, indem sie die Lipidperoxidation und LDL-Oxidation hemmen konnten (Andreasen et al., 2001c, Garcia-Conesa et al., 1999a), wobei allerdings Konzentrationen von 1 – 100 µM eingesetzt wurden. Demnach erscheint eine effektiver Schutz bei den erreichten Maximalkonzentrationen von 200 nM *in vivo* und dem relativ schnellen Abzug aus dem Plasma eher als unwahrscheinlich.

Nachdem eine Absorption von FA und SA aus der Zerealienmatrix stattgefunden hat, aber keine intakten Diferulate im Plasma oder im Urin der Probanden zu finden waren, wurden anhand von Zellstudien mit Caco-2 der Metabolismus von diätetisch häufig vorkommenden Hydroxyzimtsäuren sowie von Diferulaten untersucht, um Aussagen über die Bioverfügbarkeit und den präsystemischen Metabolismus treffen zu können.

4.4. HYDROXYZIMTSÄURE-METABOLITEN IN CACO-2

Anhand der Caco-2 Zellstudien konnte gezeigt werden, daß das Dünndarmepithel zum präsystemischen Metabolismus von Hydroxyzimtsäuren beiträgt und damit eine Aufnahme der Testsubstanzen in die Enterozyten stattfindet.

Die verwendeten differenzierten Caco-2 Zellen, die aufgrund der Produktion von Phase I und Phase II Enzymen zum Metabolismus fähig sind, wiesen eine Hydrolase-Aktivität gegenüber den Modellsubstanzen für veresterte Hydroxyzimtsäuren und Diferulaten auf. Dabei handelte es sich bei diesen Modellsubstanzen um die Methylester (MFA, MSA, MPA, MCA) der Hydroxyzimtsäuren Ferulasäure (FA), Sinapinsäure (SA), *p*-Cumarsäure (PA) und Kaffeesäure (CA) sowie um die Diethylester der 5–5-Diferulasäure (diFA), 8–5-Benzofuran-diFA und 8–O–4-diFA.

Die Methylgruppe von MFA, MPA und MCA wurde während der Zeitverläufe schneller als die von MSA abgespalten und auch bei den Diethyl-Diferulaten gab es Unterschiede in der Hydrolase-Aktivität je nach Art der Bindung der Monomere. So wurde zum Beispiel der Diethylester der 8–O–4-diFA komplett zur freien Diferulasäure hydrolysiert, während der 5–5-Diethylester nicht hydrolysiert wurde. Dies alles deutet auf die Präsenz von substratspezifischen Esterasen in Caco-2 hin. Andreasen et al. (2001a, 2001b) konnten zeigen, daß sich in der Dünndarm-Mucosa Esterase/n befinden, die eine Aktivität gegenüber FA und diFA besitzen. Offensichtlich können auch Caco-2 Zellen Enzyme mit einer ähnlichen Aktivität produzieren. Bei den Enzymen, die gegenüber den Methylderivaten der Hydroxyzimtsäuren aktiv waren, könnte es sich um Carboxylesterasen handeln, die sowohl im menschlichen Dünndarm als auch in Caco-2 identifiziert wurden (Prueksaritanont et al., 1996).

Mit Hilfe von HPLC/DAD-, LC/MS- und Enzymbehandlungs-Methoden konnten im Kulturmedium von Caco-2 Zellen Konjugate der Hydroxyzimtsäuren mit Sulfat und mit Glucuronsäure (GlcA) als Produkte eines stattfindenden Metabolismus identifiziert werden. Eine Übersicht zu diesem Metabolismus ist in **Abbildung 97** dargestellt. Dabei traten bei der Inkubation mit FA, SA und PA ausschließlich Sulfat-Konjugate auf, während für die Methylderivate sowohl Sulfat als auch Glucuronid-Metaboliten und aufgrund der Esterase-Aktivität zusätzlich das jeweilige Sulfat der freien Säure detektiert werden konnten. Nach Mulder (1984) ist fast jedes Phenol, das Substrat für eine Sulfatierung ist, auch Substrat für eine Glucuronidierung, wobei die Affinität der cytosolischen Sulfotransferase/n (ST) höher ist als die der membrangebundenen UDP-Glucuronosyl-Transferase/n (UGT). Aus diesem Grund ist bei niedrigen Konzentrationen die Sulfatierung die bevorzugte Route des Metabolismus, während bei höheren Konzentrationen die Glucuronidierung stattfindet. Da die Hydroxyzimtsäuren im Kulturmedium von Caco-2 nur langsam abnahmen, scheint auch ihre intrazelluläre Konzentration relativ niedrig zu sein, was die Sulfatierung der Substanzen erklären würde. Eine passive Diffusion durch die Zellmembran erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da bei dem vorliegenden pH-Wert des Mediums von ca. 6,5 die Hydroxyzimtsäuren vorwiegend in ionisierter Form vorliegen dürften (Garcia-Conesa et al., 1997b).

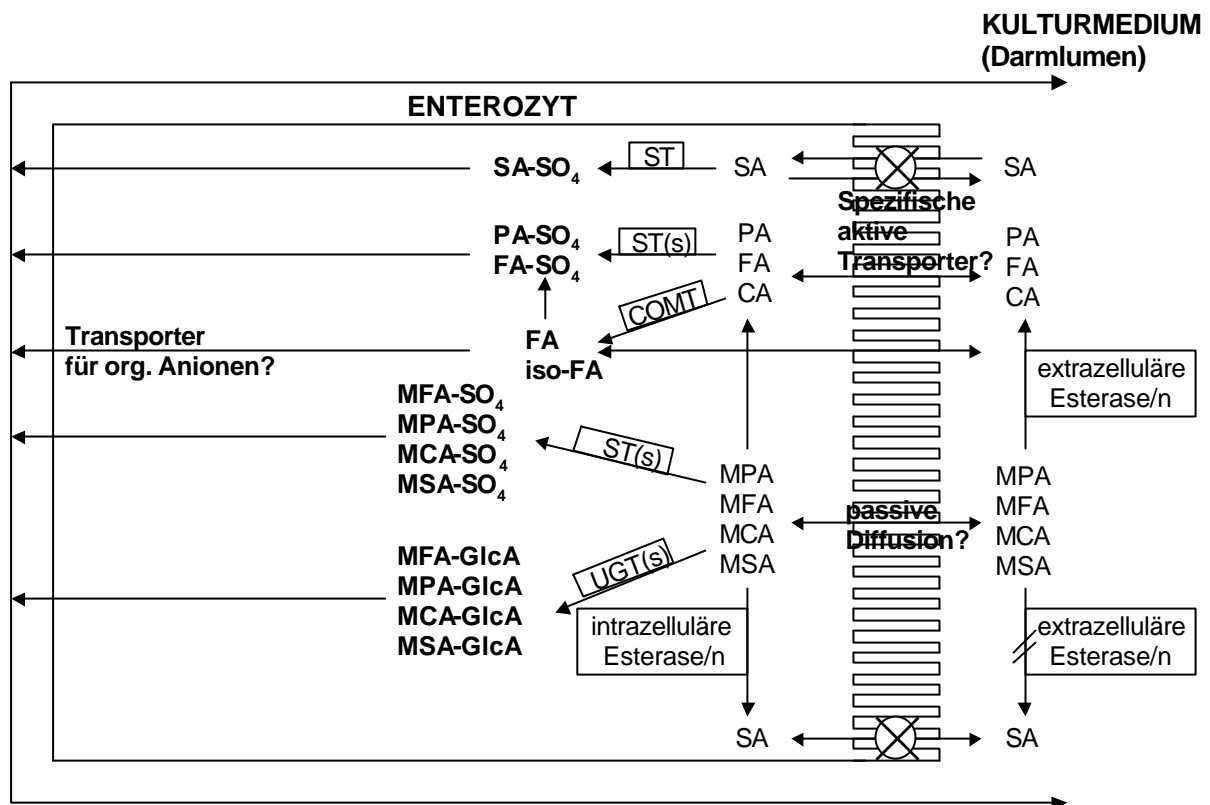


Abbildung 97: Schema des Hydroxyzimtsäure-Metabolismus in Caco-2 (Abkürzungen siehe Text)

Wolffram et al. (1995) berichteten von einem Na⁺-abhängigen aktiven Transporter bei der Absorption von Zimtsäure. Kürzlich zeigten Konishi und Shimizu (2003, 2002), daß beim transepithelialen Transport von FA und Fluorescein in Caco-2 Monocarbonsäure-Transporter involviert sind. Diese Hypothese wurde von der Tatsache untermauert, daß die Permeation konzentrations- und pH-abhängig sowie saturierbar war. Außerdem konnte der Transport durch weitere Substrate wie zum Beispiel durch die Benzoesäure kompetitiv gehemmt werden. Die lipophileren Methyl-derivate dagegen gelangen möglicherweise eher passiv in die Enterozyten, wodurch aufgrund der höheren Konzentrationen in den Zellen eine Verschiebung zum Glucuronidierungsweg stattfindet. In diesem Zusammenhang ist auch ein besserer Zugang zu den in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierten UGTs denkbar (Mulder, 1984), während die polareren Hydroxyzimtsäuren wohl eher von den cytosolischen STs umgesetzt werden.

Scheline (1991) faßte die früheren Studien zum Metabolismus von phenolischen Säuren zusammen, in denen über die O-Methylierung von Kaffeesäure durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) der Darmflora und der Leber zu Hydroxymethoxy-Derivaten berichtet wurde. Auch in neueren Studien konnten nach dem Konsum von Kaffee oder von Nahrungsmitteln, die reich an Kaffeesäure-Estern (Chlorogensäuren) waren, FA- und iso-FA-Konjugate identifiziert werden (Rechner et al., 2001, Cremin et al., 2001, Nardini et al., 2002). Moridani et al. (2002) konnten den Kaffeesäure-Metabolismus ebenfalls anhand von Ratten-Leberzellen beobachten. Auch Caco-2 Zellen sind zur O-Methylierung phenolischer Substrate fähig, wie Manna et al. (2000) zeigen konnten, und die Anwesenheit von COMT in

Caco-2 konnte durch die Fähigkeit, eine der *o*-Dihydroxygruppen der Kaffeesäure zu FA beziehungsweise iso-FA zu methylieren, bestätigt werden.

Nachdem die metabolischen Reaktionen auf die Cosubstrate (3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat [PAPS] und Uridindiphosphat-Glucuronsäure [UDPGA]) in den Zellen angewiesen sind und auch das Medium, welches mit Caco-2 vorinkubiert und anschließend wieder entfernt wurde, nach Zugabe der Methylderivate keine Metabolit-Konjugate aufwies, müssen die Konjugations-Reaktionen intrazellulär stattgefunden haben. Das bedeutet wiederum, daß die produzierten Metaboliten (zum Beispiel SA aus MSA) und Konjugate wieder in das Medium entlassen werden, wobei wahrscheinlich spezifische Transporter für organische Anionen beteiligt sind (Suzuki und Sigiyama, 2000).

Sowohl die Esterase/n im vorinkubierten Zellmedium als auch die zur Identifizierung der Metaboliten verwendete Sulfatase waren nicht dazu in der Lage, MSA beziehungsweise das SA-Sulfat und MSA-Sulfat zu hydrolysieren. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt der Substratspezifität auf der Anordnung der Substituenten am Phenolring. Mulder (1984) berichtete von einer niedrigeren Hydrolyse-Rate von Sulfatasen, deren Substrat zwei Substituentengruppen in *ortho*-Stellung zu der Position der Sulfat-Estergruppe aufwies, was auf das SA-Sulfat mit den beiden Methoxygruppen in der 3- und 5-Position zuträfe. Das synthetisch hergestellte als auch das von Caco-2 produzierte FA-Sulfat mit nur einer Methoxygruppe in der 3-Position konnte dagegen als Substrat genutzt werden. Die unterschiedliche Esterase-Aktivität gegenüber den Methylderivaten konnte auch von Andreasen et al. (2001a) festgestellt werden, die, wie hier bei den Caco-2 Studien, eine Abnahme der Aktivität in der Reihenfolge MPA > MFA = MCA > MSA in der Darmmucosa von Ratten beobachteten.

Außer einer (teilweisen) Hydrolyse der Esterbindungen der Diethylester der Diferulasäuren war kein Metabolismus der Diferulate zu beobachten. Dies weist darauf hin, daß die Diferulate von die Zellen unter den gegebenen Umständen nicht aufgenommen werden oder, falls eine solche Absorption stattfindet, diese Dimere offenbar nicht vom Dünndarmepithel metabolisiert werden. Es wurden aber bereits intakte Diferulate bei einer Fütterungsstudie mit Ratten im Plasma der Tiere nach einer Administration von aufgereinigten Dimeren identifiziert (Andreasen et al., 2001b), wobei die Testsubstanzen allerdings in Sonnenblumenöl gelöst wurden, was eine völlig andere Aufnahmesituation schafft. Eine Möglichkeit, eine (Nicht)Absorption von Diferulaten in Caco-2 aufzuzeigen, bestünde in der Durchführung von Transwell-Experimenten, bei der die Dimere durch eine geschlossene Monolayer-Schicht von Caco-2, die sich auf einer mikroporösen Membran befindet, transportiert werden müßten. Mit Hilfe dieser Absorptionsstudien könnte weiterhin im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit und dem Metabolismus durch die Leber gezeigt werden, ob und inwieweit die freien Hydroxyzimtsäuren von den Enterozyten absorbiert werden, ohne dabei metabolisiert zu werden.

Für eine erhöhte Absorption von gesundheitsfördernden Substanzen müssen diese einerseits in genügender Konzentration und andererseits auch in bioverfügbarer Form in den Nahrungsmitteln vorliegen, wie in der Studie bezüglich der Absorption von Hydroxyzimtsäuren aus Zerealien festzustellen war. Weiterhin konnte mit dieser Absorptionsstudie und mit den Caco-2 Zellstudien bestätigt werden, daß im menschlichen Darm Esterasen aktiv sind, die zur Bioverfügbarkeit veresterter Substanzen beitragen können.

In diesem Zusammenhang wäre auch eine Erhöhung des Hydroxyzimtsäuregehaltes im Bier denkbar, indem zum Beispiel durch den Einsatz von zusätzlichen Esterasen bei der Herstellung der Maische diese Zellwandkomponenten verfügbar gemacht werden würden. Ein Ansatz, um ein gesundheitsförderndes Bier mit antioxidativ wirksamen Substanzen anzureichern, läge in einer besseren Ausnutzung der Rohstoffe, wobei dies natürlich im Sinne des Reinheitsgebotes geschehen müßte. Allerdings wird aus Gründen der Haltbarkeit des Bieres immer noch ein niedriger Polyphenolgehalt angestrebt, der damit in Konflikt mit einer Anreicherung von bioaktiven Substanzen steht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hinsichtlich der Entwicklung eines gesundheitsfördernden Bieres stellte sich die Frage, ob es durch eine besondere Auswahl der Rohstoffe möglich ist, unter Einhaltung des Reinheitsgebotes Substanzen im Bier anzureichern, die nach dem Bierkonsum positive antioxidative und immunmodulierende Effekte *in vivo* bewirken können.

Aus diesem Grund wurden zunächst die antioxidativen Kapazitäten von Hellem Bier und seinen Inhaltsstoffen in verschiedenen Modellsystemen evaluiert, um geeignete Komponenten für eine Anreicherung zu finden. Alle untersuchten Bierinhaltsstoffe erwiesen sich als antioxidativ wirksam. Besonders die wässrige Maische-Fraktion zeigte neben der Hefe-Fraktion, der Läuterwürze und der Anstellwürze sehr gute Eigenschaften als Radikalfänger. Auch hinsichtlich einer effizienten Kupferkomplexierung und Immunsuppression war die Maische-Fraktion ein geeigneter Kandidat für eine Anreicherung. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften und einer effektiven Hemmung der Lipidperoxidation erwiesen sich auch die Hopfenprodukte als wirkungsvolle Komponenten für eine Anreicherung. Im Vergleich zu den Ausgangsstoffen zeigte das Helle Bier ein deutlich geringeres antioxidatives und immunmodulierendes Potential.

In Form von Trinkstudien wurden verschiedene Testbiere auf ihre physiologische Wirksamkeit *in vivo* untersucht, um Empfehlungen über geeignete Inhaltsstoffe hinsichtlich eines gesundheitsfördernden Bieres ableiten zu können.

Eine erste Trinkstudie mit selbst hergestellten Bierzusätzen aus Hopfenprodukten und der Maische-Fraktion, die im Vergleich zu einem Kontrollbier durchgeführt wurde, erbrachte nicht den erwünschten Effekt. Deshalb wurden in den folgenden Trinkstudien gebraute Biere mit diversen höheren Rohstoffgehalten eingesetzt, die unter Einhaltung des Reinheitsgebotes hergestellt wurden.

In Trinkstudie 2 (Dauer 14 Tage) wurden Biere mit einem erhöhten Stammwürzegehalt und einem erhöhten Hopfengehalt im Vergleich zum Hellen Bier als Kontrollbier getestet, während in Trinkstudie 3 (Dauer 13 Tage) Biere mit einem erhöhten Stammwürzegehalt, aber mit einem unterschiedlichen Alkoholgehalt von 5,2% und 1,4% miteinander verglichen wurden. Aufgrund der beobachteten Tendenzen in diesen Studien ergab sich die Rezeptur für das Testbier 6, das sich durch einen hohen Stammwürzeanteil, einen hohen Hopfenanteil und einem EtOH-Gehalt von 5,6% auszeichnete und in Trinkstudie 4 über drei Tage konsumiert wurde. Aus den vier Trinkstudien ergaben sich folgende Erkenntnisse:

Bei einem längerfristigen und regelmäßigen Bierkonsum bewirkte der Genuß von Bier mit einem normalen Alkoholgehalt von ca. 5% bei den meisten Probanden einen günstigeren LDL/HDL-Quotienten. Außerdem waren leichte Erhöhungen der Harnsäure im Blut zu beobachten, die als endogenes Antioxidans betrachtet wird.

Die getesteten Biere wirkten *in vivo* hauptsächlich immunsuppressiv. Sowohl die Anzahlen der neutrophilen Granulozyten als auch deren Aktivität im Blut der Probanden nahmen vor allem durch den Konsum von Testbier 6 deutlich ab.

Alle untersuchten Biere bewirkten zumindest tendenziell eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas kurzzeitig nach dem Trinken, die nicht auf einen EtOH-Effekt beruhen. Nach einem längerfristigen Konsum der stammwürzehaltigeren Biere war ein verbessertes antioxidatives Potential des Plasmas zu messen, wobei nach dem Konsum von Testbier 6 ein scheinbarer Verlust der antioxidativen Wirksamkeit im X/XOD-System zu messen war. Dieser Effekt bedarf noch eingehender Untersuchungen im Zusammenhang mit einer Prüfung des einwandfreien Ablaufes der Modellreaktion und darf vorerst nicht negativ zu sehen sein.

Ein direkter LDL-Oxidationsschutz des aus der Plasmaphase isolierten LDL-Partikels ist *in vivo* durch das Trinken von Bier nicht gegeben. Aber bei Direktinkubationen von LDL mit den Bieren (*ex vivo*) konnte die kupferinduzierte LDL-Oxidation durch die metallkomplexierenden Eigenschaften der Biere je nach Stammwürzegehalt erheblich gehemmt werden.

Innerhalb dieser Arbeit lassen sich keine Wertungen aussprechen, die eines der Testbiere als das am besten antioxidativ und immunmodulierend wirkende Bier darstellt, da hierfür sowohl die unterschiedlichen Studiendesigns, die teilweise geringen Probandenzahlen als auch die Trinkmenge berücksichtigt werden muß.

Generell aber läßt sich aussagen, daß Bier antioxidative und immunmodulierende Verbindungen enthält, deren weitere Anreicherung über den Stammwürze- und Hopfengehalt möglich ist.

In einer weiteren Humanstudie wurde die Absorption von Hydroxyzimtsäuren aus Weizenkleie-Zerealien untersucht.

Hinsichtlich des Phenolsäuregehaltes ergab die Analyse der Zerealien eine Gesamtmenge von 325 mg Hydroxyzimtsäuren pro 100 g Zerealien, die 80% *trans*-Ferulasäure, 9% Diferulate, und 6% *trans*-Sinapinsäure neben geringen Mengen an Vanillin, *para*-Cumarsäure und *cis*-Ferulasäure aufwiesen.

Ein bis drei Stunden nach dem Konsum dieser Zerealien konnte im enzymbehandelten Plasma der Probanden ein maximaler Level von ca. 200 nM Ferulasäure festgestellt werden, die hauptsächlich als Glucuronid-Konjugat zirkulierte. Sinapinsäure wurde ebenfalls im Plasma, aber nur 1 h nach dem Verzehr und in relativ geringen Konzentrationen (< 40 nM) detektiert. Das zeitliche Auftreten der Ferulasäure und Sinapinsäure im Plasma weist auf eine Absorption im Dünndarm hin.

Im enzymbehandelten Urin des Studientages war neben der Ferula- und Sinapinsäure auch ein Anstieg eines Glycin-Konjugats der Ferulasäure zu verzeichnen, welches durchschnittlich ca. 70% der insgesamt ausgeschiedenen Ferulasäure ausmachte. Dabei gab es in der Menge der ausgeschiedenen Ferulasäure und im Konjugationstyp individuelle Unterschiede zwischen den Probanden.

Basierend auf den Wiederfindungsraten im Urin ist eine Hydrolyse der zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren im Darm sehr wahrscheinlich, da mit dem Urin höhere Mengen an Ferulasäure und Sinapinsäure ausgeschieden wurden als freie wasserlösliche Säuren mit den Zerealien aufgenommen wurden. Eine Absorption von intakten Diferulaten konnte weder im Plasma noch im Urin nachgewiesen werden. Offensichtlich sind diese Substanzen aus der Zerealienmatrix nicht bioverfügbar oder sie werden von der Mikroflora im Darm metabolisiert.

Mit Hilfe von Caco-2 Zellen als Dünndarm-Modell konnte der Beitrag von Enterozyten zum präsystemischen Metabolismus diätetisch vorkommender Hydroxyzimtsäuren gezeigt werden. Nach einer Inkubation von Ferulasäure, Sinapinsäure und *p*-Cumarsäure konnten jeweils deren Sulfat-Konjugate als Produkte einer Phase II-Reaktion in den Zellmedien identifiziert werden. Kaffeesäure wurde durch *O*-Methylierung zu Ferula- und iso-Ferulasäure metabolisiert. Die als Modellsubstanzen für veresterte Hydroxyzimtsäuren eingesetzten Methylderivate unterlagen neben einer Sulfatierung auch einer Konjugation mit Glucuronsäure. Alle Metaboliten wurden durch LC/MS-Analysen und/oder Enzymbehandlungen der Zellmedien mit Sulfatase und β -Glucuronidase identifiziert.

Desweiteren konnte eine Esterase-Aktivität gegenüber den Methylderivaten von Ferulasäure, *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure im Medium von Caco-2 beobachtet werden, die in einer Produktion der freien Hydroxyzimtsäuren resultierte. Das Methylsinapat wurde dabei nicht hydrolysiert, was auf eine Substratspezifität dieser Esterase/n schließen läßt.

Aufgrund der Metabolisierung der Hydroxyzimtsäuren und ihrer Derivate kann davon ausgegangen werden, daß diese Substanzen bioverfügbar sind, weil eine Aufnahme in die Enterozyten erfolgt ist. Die Diferulate und deren Diethylester wurden dagegen von Caco-2 nicht metabolisiert. Im Zuge dieser Studien und der fehlenden Absorption dieser Substanzen aus den Zerealien ist es sehr wahrscheinlich, daß die Diferulate nicht bioverfügbar sind. Weitere Studien zur Absorption von Diferulaten müßten in Form von Transwell-Versuchen durchgeführt werden, um diese These der Nichtabsorption zu bestätigen.

6. LITERATUR

- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr.* **2002**, 132:1962-1968
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Esterase activity able to hydrolyse dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J Agric Food Chem.* **2001**, 49:5679-5684 **a**
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Rad Biol Med.* **2001**, 31(3):304-314 **b**
- Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Hansen A, Meyer AS. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem.* **2001** 49:4090-4096 **c**
- Bamforth CW. Nutritional aspects of beer – a review. *Nutrition Research.* **2002**, 22:227-237
- Bartolome B, Pena-Neira A, Gomez-Cordoves C. Phenolics and related substances in alcohol-free beers. *Eur Food Res Technol.* **2000**, 210:419-423
- Baublis AJ, Lu C, Clydesdale FM, Decker EA. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition.* **2000**, 19(3):308S-311S
- Blaurock B, Hippeli S, Metz A, Elstner EF. Oxidative destruction of biomolecules by gasoline engine exhaust products and detoxifying effects of the three-way catalytic converter. *Archives of Toxicology.* **1992**, 66:681-687
- Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice-Evans C. Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Rad Res.* **2000**, 32, 273-280
- Bourne LC, Rice-Evans C. Bioavailability of ferulic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**, 253:222-227 **a**
- Bourne LC, Rice-Evans CA. Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit. *Free Rad Res.* **1998**, 28:429-438 **b**
- Choudhury R, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med.* **1999**, 27(3/4):278-286
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* **1999**, 79:362-372
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric.* **2000**, 80:1033-1043
- Cremin P, Kasim-Karakas S, Waterhouse AL. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. *J Agric Food Chem.* **2001**, 49:1747-1750
- Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Remesy C. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol.* **2001**, 335:319-333
- De Keukeleire D, De Cooman L, Rong H, Heyerick A, Kalita J, Milligan SR. Functional properties of hop polyphenols. In: Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology,

Pharmacology, Ecology. Edited by Gross et al. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, **1999**

- Denke MA. Nutritional and health benefits of beer. *Am J Med Sci.* **2000**, 320(5):320-326
- Dittrich R, El-Massry F, Kunz K, Rinaldi F, Peich CC, Beckmann MW, Pitschetsrieder M. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51:3900-3904
- Elstner EF, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem.* **1976**, 70:616-620
- Elstner EF. Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1990**
- Elstner EF. Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1993**
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* **1992**, 13:341-390
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms.* **1989**, 6(1):67-75
- Fantozzi P, Montanari L, Mancini F, Gasbarrini A, Addolorato G, Simoncini M, Nardini M, Ghiselli A, Scaccini C. *In vitro* antioxidant capacity from wort to beer. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* **1998**, 31:221-227
- Faulds CB, Williamson G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J Sci Food Agric.* **1999**, 79:393-395
- Ferguson LR, Harris PJ. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cancer Prev.* **1999**, 8:17-25
- Gan LSL, Thakker DR. Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **1997**, 23:77-98
- Garcia-Conesa MT, Plumb GW, Waldron KW, Ralph J, Williamson G. Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: Isolation, purification and antioxidant properties of 8-O-4'-diferulic acid. *Redox Rep.* **1997**, 3:319-323 **a**
- Garcia-Conesa MT, Plumb GW, Kroon PA, Wallace G, Williamson G. Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox Rep.* **1997**, 3(4):239-244 **b**
- Garcia-Conesa MT, Wilson PD, Plumb GW, Ralph J, Williamson G. Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy- β,β' -bicycinnamic acid (8-8'-diferulic acid, non-cyclic form). *J Sci Food Agric.* **1999**, 79:379-384 **a**
- Garcia-Conesa MT. Ferulic acid dehydrodimers: Biological activity and enzymatic release by esterases. Thesis at The University of East Anglia, IFR, Norwich, **1999** **b**
- Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11(10):1176-1183
- Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem.* **2000**, 11(2):76-80

- Gießauf A, Steiner E, Esterbauer H. Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E independent process during copper-mediated oxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta*. **1995**, 1256:221-232
- Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J Sci Food Agric*. **1999**, 79:1625-1634
- Gräfe EU, Veith M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*. **1999**, 6:239-246
- Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med*. **1992**, 13(4):435-448
- Graßmann J. Antioxidative Eigenschaften etherischer Öle. Dissertation an der Technischen Universität München, **2000**
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, Third edition, **1999**
- Heiser I, Oßwald WF, Elstner EF. Photodynamic ethane and ethene formation from α -linolenic acid catalyzed by cytokines and copper ions. *J. Plant Physiol*. **1998**, 152:230-234
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*. **1988**, 48:5941-5946
- Janisch K, Hippeli S, Dornisch K, Kern S, Elstner EF. Determination of the antioxidative potential of human plasma after supplementation with pycnogenol and whey. *Food Research International*. **2002**, 35:257-266
- Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett*. **2000**, 157:15-21
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem*. **2002**, 50:2161-2168
- Konishi Y, Hagiwara K, Shimizu M. Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in in vitro evaluation of phenolic acid availability. *Biosci Biotechnol Biochem*. **2002**, 66(11):2449-2457
- Konishi Y, Shimizu M. Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*. **2003**, 67(4):856-862
- Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA, Williamson G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in human colon. *J Agric Food Chem*. **1997**, 5:661-667
- Kroon PA, Williamson G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J Sci Food Agric*. **1999**, 79:355-361
- Kruedener S v, Schempp H, Elstner EF. Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and fenton-type oxidants. *Free Rad Biol Med*. **1995**, 19:141-146
- Kruedener S v, Schneider W, Elstner EF. Effects of extracts from *Populus tremula* L., *Solidago virgaurea* L. and *Fraxinus excelsior* L. on various myeloperoxidase systems. *Arzneim Forsch/ Drug Res*. **1996**, 46(2):809

- Larisch K. **2003**. www.netdoctor.de/laborwerte/fakten/blutbild/granulozyten_neutrophile.htm
- Madigan D, McMurrough I. Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst*. **1994**, 119:863-868
- Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Lett*. **2000**, 470:341-344
- Meyer B, Schneider W, Elstner EF. Antioxidative properties of alcoholic extracts from *Fraxinus excelsior*, *Populus tremula* and *Solidago virgaurea*. *Arzneim Forsch/ Drug Res*. **1995**, 45(I):174
- Middleton Jr E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: The Flavonoids: advances in research since 1986. Herausgeber: Harborne JB. Chapman & Hall, London, **1994**:619-652
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. **1999**, 37:271-285
- Miranda CL, Yang YH, Henderson MC, Stevens JF, Santana-Rios G, Deinzer ML, Buhler DR. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-F]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2, *Drug Metabolism and Disposition*. **2000**, 28(11):1297-1302
- Momose T, Tsubaki T, Iida T, Nambara T. An improved synthesis of taurine- and glycine-conjugated bile acids. *Lipids*. **1997**, 32:775-778
- Moridani MY, Scobie H, O'Brien PJ. Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicology Letters*. **2002**, 133:141-151
- Mulder GJ. Sulfation – metabolic aspects. In: Progress in drug metabolism, Vol. 8. Edited by JW Bridges and LF Chasseaud. Taylor & Francis Ltd., **1984**, 35-100
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem*. **2002**, 50:5735-5741
- Narziß L. Abriß der Bierbrauerei. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, **1995**
- Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. *J Agric Food Chem*. **1999**, 47:1453-1459
- Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*. **2001**, 131:66-71
- Piendl A, Biendl M. Über die physiologische Bedeutung der Polyphenole und Hopfenbitterstoffe des Bieres. *Brauwelt*. **2000**, 13/14:526,539-544
- Pruexsaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, human small intestine, and in Caco-2 cells. *Drug Metabol Dispos*. **1996**, 24(6):634-642
- Puddey IB, Croft KD, Abdu-Amsha Caccetta R, Beilin LJ. Alcohol, free radicals and antioxidants. *Novartis Found Symp*. **1998**, 216:51-62, discussion 63-7, 152-158
- Radke J, Linseisen J, Wolfram G. Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss*. **1998**, 37:190-197

- Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J Chem Soc Perkin Trans 1*. **1994**, 3485-3498
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med*. **2002**, 33(2):220-235
- Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*. **2001**, 30:1213-1222
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. **1996**, 20:933-956
- Rohnert U, Schneider W, Elstner EF. Superoxide-dependent and -independent nitrite formation from hydroxylamine: inhibition by plant extracts. *Z Naturforsch*. **1998**, 53c:241-249
- Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, Berset C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J Agric Food Chem*. **2002**, 50(10):3037-3041
- Russell WR, Provan GJ, Scobbie L, Richardson AR, Steward CS, Chesson A. Plant cell-wall phenylpropanoid dimers and their metabolites as potential phyto-oestrogens (abstract). *Polyphenol Communications 2000*, Freising-Weihenstephan, Germany. **2000**, 1:311-312
- Scheline RR. Metabolism of acids, lactones and esters. In: Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. Scheline RR Eds, Boca Raton, FL: CRC Press. **1991**, 139-196
- Simonetti P, Gardana C, Pietta P. Plasma levels of caffeic acid and antioxidative status after red wine intake. *J Agric Food Chem*. **2001**, 49:5964-5968
- Situnayake RD, Crump BJ, Thurnham DI, Davies JA, Gearty J, Davis M. Lipid peroxidation and hepatic antioxidants in alcoholic liver disease. *Gut*. **1990**, 31:1311-1317
- Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*. **1999**, 458:224-230
- Suzuki H, Sigiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux of transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Pharm Sci*. **2000**, 12:3-12
- Tagashira T, Watanabe M, Uemitsu N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. *Biosci Biotechnol Biochem*. **1995**, 59(4):740-742
- Todd JS, Zimmerman RC, Crews P, Alberte RS. The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate esters. *Phytochemistry*. **1993**, 34(2):401-404
- Van der Gaag MS, van den Berg R, van den Berg H, Schaafsma G, Hendriks HF. Moderate consumption of beer, red wine and spirits has counteracting effects on plasma antioxidants in middle-aged men. *Eur J Clin Nutr*. **2000**, 54(7):586-591
- Van der Gaag MS, van Tol A, Vermunt SH, Scheek LM, Schaafsma G, Hendriks HF. Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. **2001**, 42(12):2077-2083

- Virgil F, Paganga G, Bourne L, Rimbach G, Natella F, Rice-Evans C, Packer L. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a french maritime pine (*pinus maritima*) bark extract. *Free Radic Biol Med.* **2000**, 28:1249-1256
- Waldron KW, Parr AJ, Ng A, Ralph J. Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by reversed phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochem Anal.* **1996**, 7:305-312
- Watzl B, Bub A, Briviba K, Rechkemmer G. Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol has no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Nutr.* **2002**, 41(6):261-270
- Watzl B, Rechkemmer G. Phenolsäuren. *Ernährungsrundschau.* **2001**, 48:413-416
- Wichtl M. Lupuli strobulus, Lupuli glandula. In: Teedrogen und Phytopharmaka. Herausgeber: Wichtl M. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1997**:356-359
- Wiechmann F. Charakterisierung eines Schutzfaktors aus Spinat (*Spinachia oleracea*) in kupfer- und zinkabhängigen biochemischen Modellreaktionen und dessen Nachweis als Metallkomplexator. Doktorarbeit an der Universität Hannover, Fachbereich Biologie, **1999**
- Wolffram S, Weber T, Grenacher B, Scharrer E. A Na⁺-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr.* **1995**, 125(5):1300-1308
- Yilmazer M, Stevens JF, Buhler DR. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS.* **2001**, 491:252-256
- Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *J Nutr.* **2003**, 133:1355-1361

DANKSAGUNG

An dieser Stelle sei all denen recht herzlich gedankt, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Vor allem Herrn Prof. E.F. Elstner für die Möglichkeit zur Bearbeitung des Themas am Lehrstuhl für Phytopathologie.

Susanne Hippeli und Kerstin Dornisch als „IsarLab'er“, die einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit tragen, für ihre Anregungen, ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung des ‚Bierprojektes‘.

Harri Schempp für seine stete Hilfsbereitschaft (vor allem bei technischen Problemen, bei denen man immer viel lernen kann).

Frau Dr. Reinhard für den ärztlichen Beistand bei der Durchführung der Trinkstudien und dafür, daß sie ihre Räumlichkeiten zur Verfügung gestellt hat, für den „Daumen-Muskelkater“ vom Blutabnehmen, und das gelassene Ertragen der mitunter recht heiteren Atmosphäre bei den Trinkversuchen.

Kerstin Janisch für ihre bereitwillige Hilfe im Labor und ihre Anregung, mich nach England zu bewerben.

Allen Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Allen Institutskollegen für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die vielen sportlichen und kulinarischen Unternehmungen außerhalb der Arbeit.

Der Paulaner Brauerei GmbH & Co. KG, München, für die Finanzierung, vor allem Herrn Dr. Hellich und Herrn Winter für ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Treutter für die Einführung in die Chromatographie.

Der Phytochemical Group in der Nutrition Division am Institute for Food Research in Norwich für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft aller, insbesondere

Paul Kroon als Team leader.

Maria Garcia-Conesa als Betreuerin.

Richard Bennett für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe bei der Bewältigung aller größeren und kleineren Probleme.

Sue Dupont für ihre Hilfe und für das Heranführen an die typisch englische Lebensweise außerhalb des Labors.

Fred Mellon und John Eagles für die LC/MS-Messungen und die Einführung in die Massenspektrometrie.

Geoff Plumb und Andi Goldson für die Bereitstellung der Zellen und die kompetente Einführung in deren Zellkultur.

Paul Needs für die Synthese der Sulfat-Metaboliten und die Einführung in die Prep-HPLC, Aliceon Blair, Lesley Malloney und Yvonne Clements von der Human Nutrition Unit des IFR für die kompetente Hilfe bei der Durchführung der Humanstudie in Norwich.

Allen Probanden vom IFR und der UEA, die an der „cereal study“ teilgenommen haben.

Der EU für die Finanzierung des Marie Curie Trainingsite Fellowship durch das fünfte Rahmenprogramm (Quality of Life, QLK5-1999-50512).

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle, die mir besonders in der letzten Phase dieser Arbeit, dem Zusammenschreiben, so geholfen haben, mich motiviert und mit allen erdenklichen Mitteln unterstützt haben. Dies gilt vor allem Dir, Susanne, für die Korrekturarbeit und die konstruktive Kritik, und Euch, Richard und Dieter.

Ein ganz besonderes Danke an Gundi und Edmund Theiß für die liebe Gastfreundschaft und für ein kühles Dach über dem Kopf in der „heißen Phase“ des Zusammenschreibens.

Ein großes DANKE an meine Familie.

Lebenslauf

Name	Kern Sandra Monika
Geburtsdatum	24.05.1972
Geburtsort	Karlstadt
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

Sept. 1978 – Juli 1982	Grundschule Eussenheim
Sept. 1982 – Juli 1991	Johann-Schöner-Gymnasium, Karlstadt
Nov. 1991 – März 1993	Studium der Biologie an der Julian-Maximilian-Universität, Würzburg
April 1993 – Okt. 1993	Sachbearbeiterin im Einkauf bei Adelmann AG, Gössenheim
Nov. 1993 – Aug. 1999	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München – Weihenstephan Abschluß: Dipl.-Ing. agr. Univ.
Sept. 1999 – Dez. 1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei IsarLabSystems Dr. Hippeli & Dr. Dornisch GBR, Freising
Jan. 2000 – Jan. 2002	Promotion als wissenschaftliche Angestellte bei IsarLabSystems Dr. Hippeli & Dr. Dornisch GBR, Freising in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München – Weihenstephan
Jan. 2002 – Jan. 2003	Marie Curie Training Site Fellowship am Institute of Food Research (IFR), Norwich, UK
Feb. 2003 – Aug. 2003	Zusammenfassung der Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München – Weihenstephan