

Untersuchung zu neuroprotektiven Effekten mediterraner Pflanzenextrakte auf  
oxidative Stress-Parameter *in vitro* und *in vivo*.

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. phil. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Diplom Biologin

Stephanie Schmitt-Schillig

aus Salzgitter

Frankfurt 2005

(DF1)<sup>2</sup>

<sup>2</sup> (DF1: D = Dissertation / F1 = Bibliothekskennzeichen)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Gutachter: Prof. Dr. Walter E. Müller  
Prof. Dr. Manfred Schubert- Zsilavec  
Datum der Disputation: 10.11.2005

## Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungen .....	1
1 Einleitung .....	3
1.1 Mediterrane Ernährung.....	4
1.1.1 Traditionelle mediterrane Ernährungsweise .....	4
1.1.2 Bestandteile der Mediterranen Ehnährungsweise und ihre Quellen .....	6
1.2 Altern .....	15
1.2.1 Demographie .....	15
1.2.2 Theorie des Alterns.....	16
1.3 Oxidativer Stress.....	17
1.4 Zentrale und periphere Alterserscheinungen .....	18
1.4.1 Periphere Erkrankungen .....	18
1.4.1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	18
1.4.1.2 Diabetes .....	20
1.4.2 Zentrale Auswirkung des Alterns auf das ZNS .....	20
1.4.2.1 Neurodegeneration/Gehirnalterung .....	21
1.5 Entstehung von ROS .....	23
1.5.1 ROS-Schäden.....	25
1.5.1.1 Membranen .....	25
1.5.1.2 Mitochondrien .....	26
1.5.1.3 Proteine .....	28
1.5.1.4 DNA.....	28
1.6 Antioxidative Abwehrmechanismen .....	30
1.6.1 Enzymatische Abwehr .....	31
1.6.2 Nicht-enzymatische Abwehr .....	33
1.7 Einfluss der Nahrung auf die Gesundheit.....	34
1.7.1 Herz-Kreislauf-Krankheiten .....	35
1.7.2 Krebs.....	37
1.7.3 Neuroprotektion durch mediterrane Ernährung.....	39
1.8 Novel/Functional Foods .....	40
1.8.1 Supplements (Nahrungsergänzungsmittel).....	42
1.8.2 Nutraceuticals .....	42
1.8.3 Ernährungswissenschaft und Pharmakologie .....	43
2 Zielsetzung .....	44
3 Material und Methoden .....	46

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1	Material.....	47
3.1.1	Geräte und Materialien .....	47
3.1.2	Chemikalien.....	48
3.1.3	Puffer, Lösungen und Kits.....	49
3.1.4	Tiere.....	51
3.1.4.1	Fütterungsstudien.....	51
3.2	Methoden.....	53
3.2.1	Präparationen und Gewebeaufarbeitungen für <i>in vitro</i> Tests.....	53
3.2.1.1	Gewebeaufarbeitung zur Bestimmung der Lipidperoxidation und der Membranfluidität im Gehirn von NMRI Mäusen ( <i>in vitro</i> ).....	53
3.2.1.2	Präparation der dissoziierten Neuronen zur Bestimmung der Reaktiven Sauerstoff Spezies ( <i>in vitro</i> ).....	53
3.2.2	Bestimmung antioxidativer Parameter <i>in vitro</i> .....	54
3.2.2.1	Bestimmung der Lipidperoxidation aus Hirnhomogenaten junger NMRI Mäuse ( <i>in vitro</i> ).....	54
3.2.2.1.1	Malondialdehyd.....	55
3.2.2.1.2	4-Hydroxynonenal.....	58
3.2.2.2	Bestimmung der Membranfluidität als Anisotropie.....	60
3.2.2.3	Detektion der Mitochondrien- und Cytosol-assoziierten Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in dissoziierten Neuronen (Vorversuche).....	61
3.2.2.3.1	Messung der Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR).....	64
3.2.2.3.2	Messung der Cytosol-assoziierten ROS (DCF).....	64
3.2.3	Aufarbeitung der Gehirnproben der beiden Fütterungsstudien zur Messung der antioxidativen Parameter ( <i>ex vivo</i> ).....	64
3.2.3.1	Homogenisation des Maushirns zur Bestimmung der Lipidperoxidation und der Aktivität der antioxidativen Enzyme ( <i>ex vivo</i> ).....	64
3.2.3.2	Präparation und Aufarbeitung des murinen Gehirnmaterials der Fütterungsstudie II ( <i>ex vivo</i> ).....	65
3.2.3.3	Gewebeaufarbeitung und Aufreinigung zur Bestimmung der oxidativen DNA-Schädigung ( <i>ex vivo</i> ).....	65
3.2.3.4	Blutabnahme zur Bestimmungen der initialen Hydroperoxid-Spiegel.....	66
3.2.3.5	Serumgewinnung zur Bestimmungen der Antioxidativen Kapazität (OAT) und der oxidativen Schädigung von Proteinen.....	67
3.2.4	Bestimmung der antioxidativen Parameter <i>ex vivo</i> .....	67

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.4.1	<i>Ex vivo</i> Bestimmung der Lipidperoxidation in behandelten und unbehandelten Tieren (Fütterungsstudie I).....	67
3.2.4.2	Bestimmung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten in behandelten und unbehandelten Tieren ( <i>ex vivo</i> ) der Fütterungsstudie I.....	67
3.2.4.2.1	Bestimmung der Glutathion Peroxidase Aktivität (GPx).....	67
3.2.4.2.2	Bestimmung der Glutathion Reduktase Aktivität (GR) .....	69
3.2.4.2.3	Bestimmung der Cu/Zn-Superoxid Dismutase Aktivität (SOD).....	71
3.2.4.3	Messung der oxidative Schäden der DNA: 8-OHdG- Bestimmung.....	73
3.2.4.4	Messungen der Mitochondrien- und Cytosol-assoziierten ROS, des mitochondrialen Membranpotentials und der NO-Spiegel in dissoziierten Neuronen behandelte und unbehandelte Tiere der Fütterungsstudie II ( <i>ex vivo</i> ).....	76
3.2.4.4.1	Messung der Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR).....	76
3.2.4.4.2	Messung der Cytosol-assoziierten ROS (DCF).....	76
3.2.4.4.3	Messung des transmembranären mitochondrialen Potentials ( $\Psi$ M).....	76
3.2.4.4.4	NO-Spiegel .....	77
3.2.5	Determination der Hydroperoxid-Spiegel und der antioxidativen Kapazität aus dem Vollblut bzw. Serum.....	79
3.2.5.1	Bestimmung der oxidativen Schädigung (Hydroperoxid-Level) .....	79
3.2.5.2	Bestimmung der Trolox Equivalenten Antioxidativen Kapazität (TEAC) ..	81
3.2.5.3	Bestimmung der Antioxidativen Kapazität aus dem Serum (Oxi Adsorbent Test) ..	82
3.2.6	Messung der Proteinschädigung durch oxidativen Stress .....	83
3.2.6.1	Detektion der oxidativen Schädigungen von Proteinen mittels ELISA .....	83
3.2.6.2	Detektion oxidativ veränderter Proteine mittels OxyBlot™ .....	85
3.2.6.3	Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry .....	87
4	Ergebnisse.....	89
4.1	Verlauf des EU-Projektes .....	90
4.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Vorauswahltests in Hirnhomogenaten von jungen NMRI Mäusen.....	93
4.2.1	Bestimmung der Lipidperoxidation nach Inkubation mit unterschiedlichen Extrakten	93
4.3	Vergleich der Ergebnisse der Vorauswahl-Parameter und Zusammenstellung der Krakau Rangliste .....	96

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.1	Ergebnisse der zusätzlich gemessenen antioxidativen Parameter für die Pflanzenextrakte der Krakau Rangliste. ....	96
4.3.1.1	Potential der Extrakte, Mitochondrien- und Cytosol-assoziierte ROS abzufangen.....	97
4.3.1.2	Einfluss der Extrakte auf die Membranfluidität .....	99
4.3.1.3	Auswahl der drei Extrakt für die in vivo Untersuchungen.....	100
4.4	Durchführung und Ergebnisse der Fütterungsstudien an weiblichen NMRI Mäusen mit mediterranen Pflanzenextrakten ( <i>ex vivo</i> ).....	101
4.4.1	Auswertung der Fütterungsstudien.....	101
4.4.2	Effekt der mediterranen Pflanzenextrakte auf antioxidative Parameter junger und alter NMRI Mäuse.....	105
4.4.2.1	Messung der antioxidativen Parameter aus murinem Hirnhomogenat ( <i>ex vivo</i> )	106
4.4.2.1.1	Lipidperoxidation .....	106
4.4.2.1.2	Enzymatische antioxidative Abwehr in jungen und alten Maushirnen	111
4.4.2.2	Messung des ROS-Metabolismus in dissoziierten Neuronen.....	116
4.4.2.2.1	Mitochondrien assoziierte ROS (DHR).....	116
4.4.2.2.2	Cytosol-assoziierte ROS (DCF) .....	119
4.4.2.2.3	Mitochondriales Membranpotential .....	123
4.4.2.2.4	NO-Spiegel .....	129
4.4.2.3	Messungen der oxidativen Schäden der DNA ( <i>ex vivo</i> ).....	136
4.4.2.4	Messungen aus dem Vollblut .....	136
4.4.2.4.1	Zelluläre oxidative Schädigung (Hydroperoxid-Spiegel).....	136
4.4.2.4.2	Antioxidative Kapazität (TEAC).....	140
4.4.2.5	Messungen aus dem Serum .....	143
4.4.2.5.1	Antioxidative Kapazität (Oxy Adsorbent Test).....	143
4.4.2.5.2	Oxidative Schädigung der Proteine (Carbonylierungs ELISA) .....	144
5	Diskussion .....	146
5.1	Alterseffekte auf oxidative Stress-Parameter in weiblichen NMRI Mäusen.....	147
5.1.1	Lipidperoxidation im Gehirn von NMRI-Mäusen.....	148
5.1.2	Veränderung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten im Alter .....	150
5.1.3	Alterseffekte auf oxidative Stress-Parameter in dissoziierten Neuronen .....	151
5.1.3.1	Altersbedingte Veränderungen der ROS-Spiegel in NMRI Mäusen.....	152

## Inhaltsverzeichnis

---

5.1.3.2	Altersabhängige Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in NMRI-Mäusen.....	152
5.1.3.3	Altersabhänge Veränderungen der NO-Spiegel in NMRI-Mäusen.....	153
5.1.3.4	Radikalfängereigenschaften in Neuronen alter NMRI-Mäuse .....	154
5.1.4	Einfluss des Alters auf die DNA-Schädigung .....	156
5.1.5	Oxidative Veränderungen im peripheren System.....	158
5.1.5.1	Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Spiegel.....	158
5.1.5.2	Bestimmung der Antioxidativen Kapazität .....	159
5.1.5.3	Altersabhängige Veränderungen der Proteine .....	160
5.1.6	Zusammenfassung der Alterseffekte in weiblichen NMRI-Mäusen .....	163
5.2	Extrakteffekte auf oxidative Parameter in weiblichen NMRI Mäusen .....	164
5.2.1	Nicht-kultivierte Pflanzen in den mediterranen Ländern .....	164
5.2.2	Reichardia picroides (1014).....	164
5.2.2.1	Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 1014 .....	165
5.2.3	Urospermum picroides (1020).....	172
5.2.3.1	Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 1020 .....	173
5.2.4	Thymus piperella (2025) .....	174
5.2.4.1	Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 2025 .....	175
5.2.5	Positive Wirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen.....	177
5.2.5.1	Zusammenfassung der Effekte einzelner Extrakte auf Lipidperoxidation und antioxidativen Enzyme auf junge und alte NMRI-Mäuse .....	179
5.2.5.2	Zusammenfassung der Extrakteffekte auf das mitochondriale Membranpotential und verschiedene ROS-Spiegel.....	181
5.2.5.3	Zusammenfassung der Extrakteffekte auf die Oxidative Schädigung und die Antioxidative Kapazität im Vollblut bzw. Serum von weiblichen NMRI-Mäusen ...	183
5.3	Gesundheitspotential mediterraner Nahrungsbestandteile .....	184
5.3.1	Bioverfügbarkeit der Bestandteile der mediterranen Ernährung im Gehirn... 184	
5.3.2	Neuroprotektion durch mediterrane Nahrungskomponenten .....	185
5.3.2.1	Verbesserung kognitiver Fähigkeiten durch bioaktive Nahrungsbestandteile	187
5.3.3	Ist eine Supplementation mit Nutraceuticals sinnvoll? .....	187
6	Zusammenfassung .....	190
6.1	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Screenings .....	191
6.2	Alterseffekte in NMRI-Mäusen.....	191

## Inhaltsverzeichnis

---

6.3	Extrakteffekte in jungen und alten NMRI-Mäusen .....	192
6.3.1	Reichardia-Effekte .....	192
6.3.2	Urospermum-Effekte .....	193
6.3.3	Thymus-Effekte .....	193
7	Abbildungen .....	195
8	Tabellenverzeichnis .....	200
9	Literaturverzeichnis .....	202
10	Bibliographie .....	216
10.1	Publikationen .....	217
10.2	Poster .....	217
11	Danksagung .....	219
12	Appendix .....	221
12.1	Partner des EU-Projektes .....	221
13	Lebenslauf .....	222



**Abkürzungen**

ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonisäure) Diammoniumsalz
BSA	Bovines Serum Albumin
DAF-2-DA	Diaminofluorescein Diacetat
DCF	Dichlorofluorescein
DEPPD	N,N-Diethyl-p-Phenylen-Diamin
DHR	Dihydrorhodamin123
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Diphenylhydrazin
DPH	Diphenylhexatrien
DTPA	Diethylentriamin Pentansäure
DTT	Dithiotreithol
ECL	enhanced chemiluminescence (Farbstoff)
EDTA	Ethylendiamintetraacetische Säure
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
FeCl <sub>3</sub>	Eisen (III) chlorid
GPx	Glutathion Peroxidase
GR	Glutathion Reduktase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSSG	Oxidiertes Glutathion
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HNE	4-Hydroxynonenal
HOCl	Hypochlorische Säure
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
ml	Milliliter
MTT	3,2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid
NADPH	Nicotinamiddiphosphat
NMRI	Naval Medical Research Institute
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidanion

---

OH•	Hydroxylradikal
PAPA-NONOate	1-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolate
PC12	Pheochromocytoma-Zellen
R123	Rhodamin123
ROS	Reaktive Oxygene Spezies
SEM	Standard Error of Mean
SNP	Natrium Nitroprussid
SOD	Superoxid Dismutase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute

**1 Einleitung**

## 1.1 Mediterrane Ernährung

Die Gesundheit der Menschen ist das Ergebnis einer Kombination von genetischen Vorgaben und verschiedener Umweltfaktoren. Die Ernährung nimmt dabei einen der wichtigsten Plätze unter den exogenen Faktoren ein. Schon seit längerem ist bekannt, dass mittels einer gesunden Ernährungsweise viele schadhafte Prozesse im Körper aufgehalten oder sogar wieder umgekehrt werden können. Zum Beispiel ist das Risiko koronarer Herzerkrankungen durch eine gesunde Ernährung signifikant vermindert (vergleiche 1.7.1). Die Hinweise häufen sich, dass bestimmte „traditionelle Diäten“ sogar positive Ergebnisse bei der Bekämpfung und Verhinderung von Krebs oder neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer Demenz zeigen. Der Vorgang des gesunden Alterns spielt in einer anhaltend älter werdenden Gesellschaft eine immer wichtigere Rolle. Schon seit den 60er Jahren gibt es diesbezüglich wissenschaftliche Belege. Zum Beispiel hatten die Menschen auf Kreta die weltweit höchste Lebenserwartung und haben sich bedingt durch ihre ländliche Struktur sehr ausgewogen ernährt: viel Obst und Gemüse und wenig Fleisch. Neben der Ernährung als exogener Faktor ist die körperliche Ertüchtigung eine weitere wichtige Größe, die zur positiven Wirkung der mediterranen Ernährung beiträgt. In einer groß angelegten Studie haben Ancel Keys et al. die Zusammenhänge zwischen der auf Kreta und einigen anderen ausgewählten Gegenden in sieben Ländern vorherrschenden Ernährungsweisen und dem Risiko an Koronaren Herzerkrankungen zu erkranken untersucht (siehe 1.7.1). Dabei haben sie den für uns heute geläufigen Begriff der mediterranen Diät geprägt (siehe 1.1.1).

### 1.1.1 Traditionelle mediterrane Ernährungsweise

Die mediterrane Diät wird als eine gesunde Ernährungsweise propagiert. Sie kombiniert die Anwendung bestimmter natürlicher Nahrungsmittel mit dem Klima, den Traditionen und der Kultur der mediterranen Länder. Aus diesem Grund gibt es auch nicht nur eine mediterrane Ernährung sondern eine Vielzahl spezieller Ernährungsweisen, die sich in landesspezifischen Gegebenheiten unterscheiden. Weiterhin hat sich diese traditionelle Ernährungsweise auch in den mediterranen Ländern bis heute verändert. Vor allem die junge Generation hat ihren Fett- und Zuckerkonsum zu Ungunsten von Früchten und Gemüse erhöht (Kafatos et al., 2000, Tur et al., 2004). In dieser Arbeit bezieht sich der Terminus „Mediterrane Diät“ aber auf die traditionelle Ernährung wie sie in den 60er Jahren in den Olivenregionen um das Mittelmeer vorherrschte und die im Folgenden erläutert wird.

Olivenöl, Pasta, Obst, Gemüse, Fisch, rotes sowie weißes Fleisch, Hülsenfrüchte und Wein sind die wesentlichen Elemente dieser mediterranen Diät. Diese Komponenten wurden mehr oder minder häufig verzehrt, woraus sich ein bestimmtes Ernährungsmuster ableiten lässt, das heute häufig in Form einer Ernährungspyramide dargestellt wird (Abbildung 1-1). Getreideprodukte, Kartoffeln, Obst, Gemüse, Joghurt und Käse wurden täglich, Fisch, Geflügel, Eier und Süßigkeiten wöchentlich und rotes Fleisch nur einmal im Monat konsumiert. Zusätzlich sind tägliche Bewegung, der Genuss von 2-3 Litern Wasser am Tag und nur moderater Rotweinkonsum weitere Grundsäulen der gesunden mediterranen Ernährung. Der tägliche Konsum von Olivenöl und damit einfach ungesättigten Fettsäuren spielt ebenfalls eine wichtige Rolle.

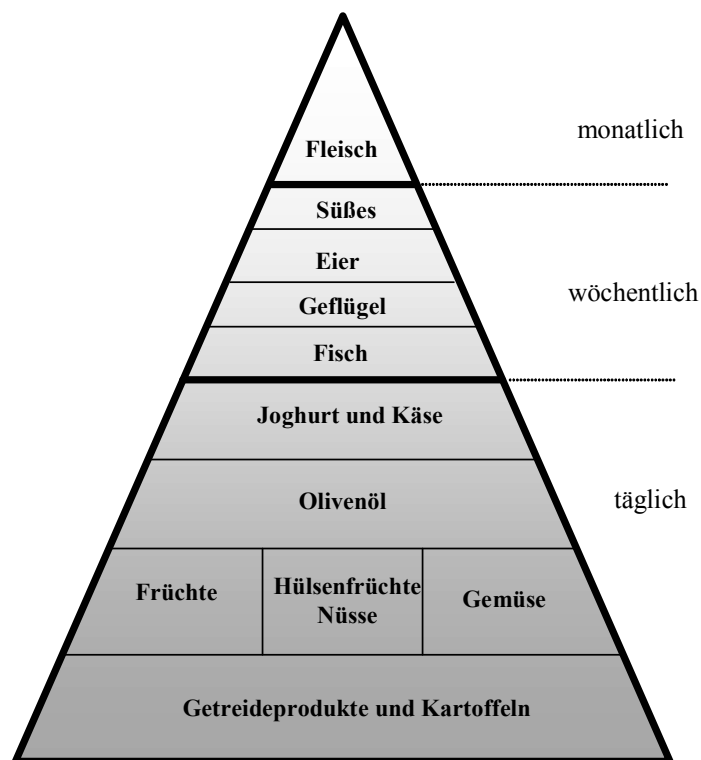


Abbildung 1-1: Mediterrane Ernährungspyramide

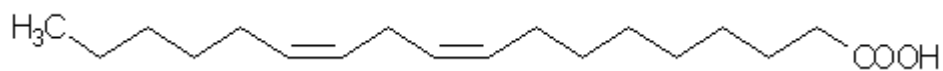
### 1.1.2 Bestandteile der mediterranen Ernährungsweise und ihre Quellen

Die mediterrane Ernährung ist eine Kombination vieler verschieden wirkender Substanzen, die insgesamt eine optimale Versorgung des menschlichen Körpers mit allen essentiellen Nahrungsbestandteilen gewährleisten. Dabei wird angenommen, dass es zu einer Potenzierung der positiven Wirkungen der einzelnen Komponenten und Inhaltsstoffen, der hauptsächlich pflanzlichen Diät kommt.

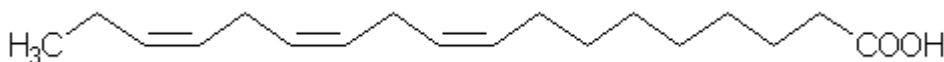
#### Fette

Einen großen Anteil an dem gesundheitlich positiven Einfluss einer mediterranen Ernährungsweise wird dem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben. Fettsäuren sind natürliche Bestandteile von Fetten und Ölen, die mit der täglichen Nahrung aufgenommen werden. Sie lassen sich aufgrund ihrer Zusammensetzung in drei Gruppen unterteilen. Man unterscheidet allgemein "**gesättigte**", "**einfach ungesättigte**" und "**mehrfach ungesättigte**" Fettsäuren. Gesättigte Fette findet man hauptsächlich in tierischen Lebensmitteln, z.B. in Fleisch, Schweineschmalz, Wurst, Butter und Käse, aber auch in Palmkern- und Kokosfett. Einfach ungesättigte Fettsäuren (monounsaturated fatty acids, MUFAs) finden sich vor allem in Olivenöl. Innerhalb der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) gibt es nochmals zwei verschiedene Gruppen, die so genannten Omega-3- und die Omega-6-Fettsäuren (n-3 und n-6). (n-6)-Fettsäuren sind in vielen pflanzlichen Ölen zu finden. Die Linolsäure, der wichtigste Vertreter dieser Familie, kommt beispielsweise in Sonnenblumen-, Soja-, Mais- und Weizenkeimöl vor. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren vom Typ Omega-3 (Linolensäure) sind dagegen vor allem in bestimmten fetten Fischarten wie Sardinen und Makrelen, aber auch in bestimmten Gemüsearten wie Portulak, Spinat oder Nüssen enthalten (Abbildung 1-2).

a)



b)



**Abbildung 1-2: Struktur wichtiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren**

a) Linolensäure (18:2, n-6-Fettsäure), b) Linolensäure (18:3, n-3-Fettsäure)

Der Hauptanteil des aufgenommenen Fettes in einer typisch mediterranen Ernährung macht Olivenöl aus. Olivenöl ist durch einen hohen Anteil an Ölsäure, einen geringen Anteil gesättigter und einen moderaten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren charakterisiert (Sanders, 2001). Nicht kultivierte Pflanzen sind ebenfalls eine wichtige Quelle für (n-3)-Fettsäuren. Zum Beispiel Sommerspinat (*Portulaca oleracea*), ein Gemüse, das in Nord- und Mitteleuropa für längere Zeit vom Speiseplan verschwunden war, wird in der mediterranen Ernährung viel und häufig konsumiert und hat nachweislich einen hohen Anteil an gewünschten Fettsäuren (Simopoulos et al., 1986, Simopoulos et al., 1992). Auch andere pflanzliche Öle, abgesehen vom Olivenöl, sind wichtige Quellen für Linolensäure (Crawford et al., 2000).

Unabhängig von der Art können alle Fette zur Energiegewinnung, als Energiereserve oder auch als Wärmeschutz genutzt werden. Zusätzlich gibt es weitere spezielle Aufgaben im menschlichen Körper, die nur von den mehrfach ungesättigten Fettsäuren erfüllt werden können. Da unser Körper diese im Gegensatz zu den gesättigten nicht selber herstellen kann, ist eine ausreichende Zufuhr mit der täglichen Nahrung lebensnotwendig. Man spricht daher bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch von "essentiellen" Fettsäuren.

(n-3)- und (n-6)-Fettsäuren sind wesentliche Bestandteile aller Körperzellen und bestimmen wesentlich die Fluidität von Membranen. Diese ist für die Funktion von Zellen essentiell. Erst bei einem ausreichenden Anteil ungesättigter Fettsäuren ist eine optimale Funktionalität und Integrität der Zellmembranen gewährleistet. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind außerdem das Ausgangsmaterial für die so genannten Eicosanoide, die ähnlich den Hormonen, verschiedene lebensnotwendige Vorgänge im Körper regulieren (Gewebshormone). Dazu gehören der Blutdruck, die Blutgerinnung und die Blutfettspiegel. Eicosanoide aus (n-6)- und (n-3)-Fettsäuren haben oft entgegengesetzte Wirkungen. Die Balance zwischen diesen Botenstoffen ist daher für die Erhaltung der Gesundheit sehr wichtig. Dies kann nur über ein ausgewogenes Verhältnis der beiden Fettsäuren-Familien in der Nahrung erfolgen. Aus (n-3)-Fettsäuren werden vorwiegend gegen Arteriosklerose protektive Botenstoffe gebildet. Daher sollte verstärkt auf einen ausreichenden Verzehr von (n-3)-Fettsäuren aus Seefischen und pflanzlichen Quellen geachtet werden, insbesondere dann, wenn viele (n-6)-Fettsäuren aus pflanzlichen Fetten und Ölen verzehrt werden. PUFAs können weiterhin auch die Zusammensetzung und damit die Fluidität neuronaler Membranen beeinflussen und sind damit in der Lage die neuronale Transmission zu regulieren (Jones et al., 1997).

## Vitamine

Eine weitere Grundsäule der gesunden Ernährung in den mediterranen Ländern sind die mit der Nahrung aufgenommenen Vitamine. Vitamine sind organische Verbindungen, die vom menschlichen Körper nicht synthetisiert werden können, aber essentiell sind für den Zellstoffwechsel. Prinzipiell lassen sich die Vitamine in fett- (A, E, D, K) und wasserlösliche Vitamine (C, B, H und Folsäure) einteilen und sind in bestimmten Konzentrationen in einer gesunden Ernährungsweise enthalten.

### *Fettlösliche Vitamine*

**Vitamin A** kommt in der Natur in zwei Formen vor. Einmal rein tierischen Ursprungs als Retinol und in Form von Provitaminen als bestimmte Carotinoide in Pflanzen, die im Körper in Retinol umgebaut werden. Besonders gelbe und dunkelgrüne Blattgemüse wie z.B. Karotten, Spinat und Brokkoli enthalten viel Beta-Carotin, das bekannteste Carotinoid. Retinol ist vor allem in Leber, Eidotter Fisch und Vollmilch enthalten. Vitamin A ist für das Sehvermögen und die Gewebedifferenzierung von essentieller Bedeutung. Bei Retinolmangel kann es zu Nachtblindheit oder Hautveränderungen kommen.

**Vitamin D**, oder Calciferol, ist der Sammelbegriff für eine Reihe von Verbindungen die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Mineralstoffhaushaltes im Körper spielen. Die wichtigsten Vertreter dieser Vitaminfamilie sind das Vitamin D 2 (Ergocalciferol), welches aus pflanzlicher Herkunft stammt und das Vitamin D 3 (Cholecalciferol), welches tierischen Ursprungs ist. Die reichhaltigsten Vitamin-D-Quellen sind Fischleberöle und Salzwasserfische. Eier, Butter, Fleisch und Milch enthalten ebenfalls geringe Mengen.

Unter dem Begriff **Vitamin E** fasst man acht natürliche Stoffe zusammen, Vier davon sind Tocopherole, bei den anderen handelt es sich um Tocotrienole. Alpha-Tocopherol ist die häufigste und biologisch aktivste Form von Vitamin E. Pflanzliche Öle, kaltgepresste Samenöle wie z.B. Mais und Sonnenblumenöl und Weizenkeime sind die wichtigsten Vitamin-E-Lieferanten. An zweiter Stelle stehen Nüsse, Samen, Vollkorn und grünes Blattgemüse. Vitamin E ist eines der wichtigsten körpereigenen Antioxidantien. Es schützt alle lebenswichtigen Zellbestandteile wie Membranen vor der schädlichen Oxidation.

**Vitamin K** kommt in zahlreichen verschiedenen Formen vor. Vitamin K1 ist natürlicherweise in Pflanzen enthalten. Vitamin K2 ist weniger wirksam und wird im Intestinaltrakt des Menschen und einiger Tiere durch Bakterien gebildet. Hauptquelle für Vitamin K sind unter anderem grüne Blattgemüse, Rinderleber, Soja, Tee oder Tomaten. Für die Blutgerinnung ist Vitamin K ein wesentlicher Faktor. Er ist essential für die Prothrombinbiosynthese, welches



bei einer Verletzung in Thrombin umgewandelt wird und dann für die Reaktion von löslichem Fibrinogen in seine unlösliche Form (Fibrin) verantwortlich ist.

Die Oxidation von Fetten und Ölen kann fettlösliche Vitamine zerstören. Die Gegenwart von Antioxidantien wie Vitamin E kann helfen z.B. Vitamin A zu schützen.

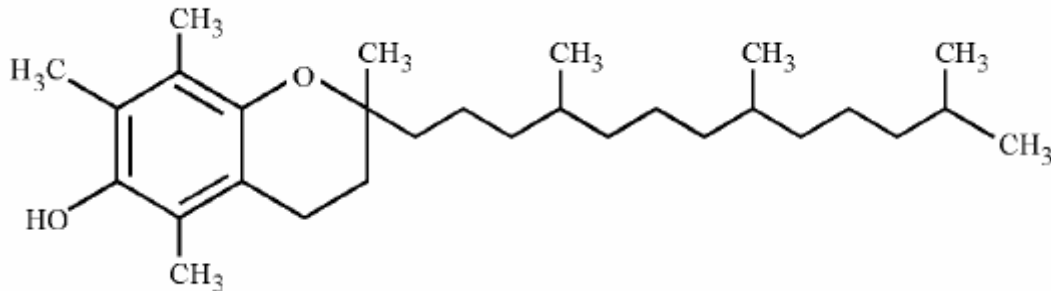


Abbildung 1-3: Chemische Struktur von Tocopherol

### *Wasserlösliche Vitamine*

**Vitamin C** (L-Ascorbinsäure) (Abbildung 1-4) ist vor allem in Zitrusfrüchten, schwarzen Johannesbeeren, Kiwis, Sanddorn und Hagebutten enthalten. Aber auch Gemüse wie Paprika, Blumenkohl, Petersilie oder Kartoffeln weisen einen hohen Vitamin C-Anteil auf. Vitamin C ist für die Bildung der Bindegewebsubstanz Kollagen für Knochen oder Knorpel erforderlich. Auch auf die Gesundheit von Zähnen und Zahnfleisch und die Resorption von Eisen übt es positiven Einfluss aus. Es schützt in Kooperation mit Vitamin E intra- und extrazelluläre Membranen vor Peroxidation.

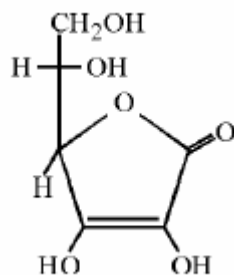


Abbildung 1-4: chemische Struktur von Ascorbinsäure

**Vitamin B** ist ebenfalls ein Sammelbegriff für mehrere verschiedene Vitamine. **Vitamin B 1** (Thiamin) kommt in kleinen Mengen in vielen Nahrungsmitteln vor und ist als Coenzym im Kohlenstoffzyklus wichtig. **Vitamin B 2** (Riboflavin) ist eines der am weitesten verbreiteten Vitamine und kommt quasi in allen Nahrungsmitteln vor. Die besten Quellen sind allerdings

Hefe und Leber. Riboflavin spielt auch als Coenzym bei einer Vielzahl von Redoxmechanismen im Körper eine wichtige Rolle. Z.B. ist es an zahlreichen Reaktionen des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels beteiligt und über die Atmungskette auch für die Energiegewinnung wichtig. Die Riboflavin-Coenzyme sind sowohl für die Umwandlung von Pyridoxin (Vitamin B 6) und Folsäure in ihre Coenzymformen erforderlich als auch für die Niacinsynthese aus Tryptophan. **Niacin** (Vitamin B 3) ist ein Sammelbegriff für eine Reihe von verschiedenen vitaminaktiven Substanzen. In tierischen Lebensmitteln ist Niacin in Form von Nicotinamid und den coenzymatisch wirkenden Substanzen  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) und  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) enthalten. In pflanzlichen Geweben ist es in großen Mengen in Vollkornprodukten enthalten. Dort überwiegt die Niacin-aktive Form Nicotinsäure. Vitamin B3 ist an über 200 Reaktionen im Stoffwechsel beteiligt. Eine wichtige Aufgabe erfüllt es dadurch, dass es den beim Abbau der Nährstoffe anfallenden Wasserstoff für die Atmungskette zur Verfügung stellt. **Vitamin B 5** (Panthothensäure) kommt relativ reichhaltig in vielen Nahrungsmitteln vor. Beste Quellen sind Leber oder Vollkornprodukte. Obst hingegen ist ein schlechter B 5-Lieferant. Pantothenensäure ist an vielen Stoffwechselfvorgängen im Körper beteiligt und übernimmt hier häufig Aufgaben enzymatischen Charakters z.B. als Teil der Fettsäuresynthese. Hinter dem Begriff **Vitamin B 6** steht eine Gruppe metabolisch untereinander austauschbarer Substanzen, nämlich: Pyridoxol, Pyridoxal und Pyridoxamin. Hervorragende Lieferanten von Pyridoxin sind Hühnerfleisch sowie Rinds-, Schweine und Kalbsleber. Pflanzen enthalten in der Regel wenig Pyridoxin mit Ausnahme von Bohnen, Blumenkohl, Kartoffeln, Weizenkeime sowie Bananen und Rosinen, die relativ große Mengen an Pyridoxin aufweisen. Als hauptsächliche Stoffwechselfunktion des Vitamin B 6 ist seine Rolle als Coenzym verschiedener Enzymsysteme zu nennen. In dieser Eigenschaft übt es wichtige Funktionen sowohl im Protein- als auch im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel aus. **Vitamin B 12** (Cobalamin) wird ausschließlich von Mikroorganismen gebildet. Cobalamin ist eng mit dem Folsäure-Stoffwechsel verknüpft. Es macht hier die Bereitstellung von Folsäure für andere folsäureabhängige Reaktionen möglich. Steht kein Cobalamin zur Verfügung, kommt es indirekt zu einem Mangel an Folsäure.

Hinter dem Begriff der **Folsäure** verbirgt sich eine große Gruppe von Substanzen. Es gibt etwa 100 verschiedene Folsäure-aktive Stoffe, die man Folate nennt. Folsäure ist überwiegend in Blattgemüse und in Rinder-, Schweine- und Kalbsleber enthalten. Im Gemüse finden sich besonders hohe Konzentrationen in Bohnen Kopfsalat, Spargel, Spinat und Weißkohl.

Folsäure wirkt vorwiegend als Coenzym. Die Beteiligung an der Synthese zu einem Vorstufenprodukt der DNS gehört zu den wichtigsten Aufgaben des Vitamins.

Weiterhin ist es neben Vitamin B 6 und B 12 ein wichtiger Gegenspieler von Homocystein, welches in langfristig hohen Dosen zu arteriosklerotischen Gefäßschäden beitragen kann, indem es die Fetteinlagerung in die Gefäßwände und die Oxidation von schädlichem LDL-Cholesterin erleichtert.

**Vitamin H** (Biotin) ist in fast allen Nahrungsmitteln, in meist kleinen Mengen vorhanden. Spitzenreiter sind Leber und Lachs. Nennenswert hohe Biotinkonzentrationen treten in Pflanzen in Sojabohnen, Erdnüssen, Blumenkohl und Haferflocken auf. Im menschlichen Stoffwechsel beschränken sich die Aufgaben von Biotin auf wenige Reaktionen: den Abbau der Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, die Biosynthese und Verwertung der Fettsäure und die Gluconeogenese.

Generell sind Vitamin C und E und Beta-Carotin die wichtigsten essentiellen Vitamine, die direkt auf die Radikalbildung Einfluss nehmen können oder diese abfangen können

### **Polyphenole**

Neben den Vitaminen rücken die polyphenolischen Bestandteile einer stark pflanzlich orientierten Diät immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und repräsentieren eine Sammelbezeichnung für Verbindungen mit meist zwei Phenol- oder Phenoethergruppen am aromatischen Grundgerüst. Pflanzen synthetisieren Polyphenole zur Abwehr von Strahlung und Fressfeinden (Harborne et al., 2000). Neben den Polyphenolen gehören noch Carotinoide, Chlorophyll, Glucosinolate, Monoterpene, Phenolsäuren, Phytinsäuren, Phytoöstrogene, Saponine und Sulfide zu den sekundären Pflanzenstoffen. Quellen für Polyphenole sind folglich hauptsächlich Obst Gemüse, Wein und Olivenöl. Polyphenole lassen sich durch Unterschiede im Grundgerüst in drei verschiedene Gruppen (Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren und Flavonoide) einteilen (Abbildung 1-5) einteilen. Gerade den Flavonoiden wird eine positive Wirkung auf die Gesundheit zugeschrieben, die schon eingehend untersucht worden ist (vergleiche 1.7).

Polyphenole zählen zu den potentesten Antioxidantien und können z.B. das Krebsrisiko verringern, in dem sie oxidative Schädigung der DNA verhindern und damit verbunden das Mutationsrisiko senken (Feng et al., 2001). Die starken antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole beruhen größtenteils auf ihrer Radikal-Scavenging-Aktivität (Cotelle, 2001,

Yang et al., 2001), allerdings sind sie ebenfalls in der Lage mit schädlichen Metallionen Chelatkomplexe zu bilden und diese somit unschädlich zu machen (Brown et al., 1998). Aus den genannten Gründen ist der Polyphenolgehalt, also die quantitative Zusammensetzung der Extrakte, bei einer Untersuchung der Effekte auf gesundheitliche Parameter von besonderer Bedeutung.

### *Hydroxybenzoesäuren*

Zur ersten Gruppe mit einem C<sub>6</sub>C<sub>1</sub>-Grundkörper gehören hauptsächlich die Hydroxybenzoesäuren mit Hauptvertretern wie z.B. 4-Hydroxybenzoesäure und Salizylsäure (2-Hydroxybenzoesäure), die ubiquitär in Pflanzen vorkommen.

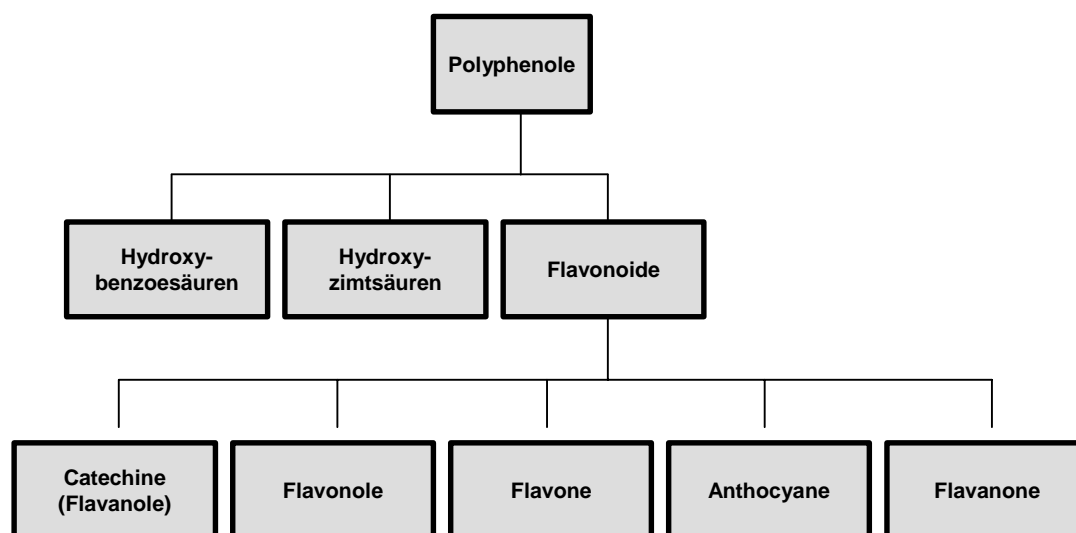


Abbildung 1-5: Einteilung der Polyphenole mit einigen Nebenklassen

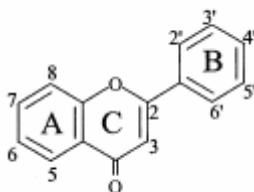
### *Hydroxyzimtsäuren*

Typische Vertreter der zweiten Gruppe mit einem C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-Grundgerüst sind die Hydroxyzimtsäuren wie z.B.: 4-Hydroxyzimtsäure oder die Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure). Diese Art phenolische Substanzen kommt in der Natur häufig als Ester oder aber auch als o-Glykoside vor.

### *Flavonoide*

Flavonoide sind die in der Nahrung, vor allem in Obst und Gemüse, am häufigsten vorkommenden Polyphenole. Die Anzahl der natürlich vorkommenden Flavonoide ist enorm groß. Bisher wurden schon weit über tausend verschiedene Substanzen nachgewiesen und identifiziert (Harborne et al., 2000). Grundsätzlich bestehen sie aus einem C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>-

Grundgerüst (drei Kohlenstoffringe mit zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) (Abbildung 1-6) und lassen sich auf Grund von strukturellen Unterschieden in mehrere verschiedene Hauptklassen (Flavanole, Flavanone, Flavone, Flavonole, Anthocyane etc.) einteilen (Abbildung 1-7).



**Abbildung 1-6: Grundgerüst der Flavonoide**

Flavonoide kommen meist als Glykoside in der Natur vor und sind wie die Hydroxycimtsäuren vor allem in den Blättern, Blüten und Früchten enthalten. Die wichtigsten Vertreter der **Flavanole** sind die Catechine und Gallocatechine. Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon) und Hesperidin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) sind die bekanntesten Mitglieder der **Flavonon**-Gruppe. Diese Flavonoid-Klasse kommt am häufigsten in Zitrusfrüchten vor. Die beiden bekanntesten **Flavone**, die für pharmazeutische Zwecke schon als Spasmolytikum bzw. Antihämorrhagikum eingesetzt werden, sind 5,7,4'-Trihydroxyflavon (Apigenin) und 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (Luteolin). Zur größten Gruppe der Flavonoide gehören die **Flavonole** wie z.B. 5,7,4'-Trihydroxyflavonol (Kaempferol) und 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavonol (Quercetin). Die Anthocyanidine kommen in der Natur häufig als 3-o-Glykoside vor und werden dann als **Anthocyane** (Anthocyanine) bezeichnet. Letztere sind für die bläulich-violette Färbung vieler Blüten und Blätter verantwortlich, sind aber auch in Kartoffeln, Leguminosen und Kakao enthalten. **Isoflavone** sind gelblich gefärbte Pflanzeninhaltsstoffe, deren Strukturen sich vom Isoflavon ableiten. Zu dieser Gruppe zählen z.B. Genistein und Daidzein.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Hauptgruppen existieren diverse Untergruppen, die sich durch Abwandlungen des Flavan-Grundmoleküls, die einzelnen Verbindungen der Untergruppen, durch die Zahl und Verteilung der Hydroxygruppen (-OH) sowie durch die Methylierung (-OH zu -OCH<sub>3</sub>) und/oder Glykosidierung (Reaktion mit Zuckern) einzelner Hydroxylgruppen unterscheiden. Durch die Tatsache, dass Polyphenole zusätzlich zur Molekülvielfalt auch untereinander und mit anderen Molekülen Bindungen eingehen, ist das Gebiet enorm schwer zu überschauen (Harborne, 1975).

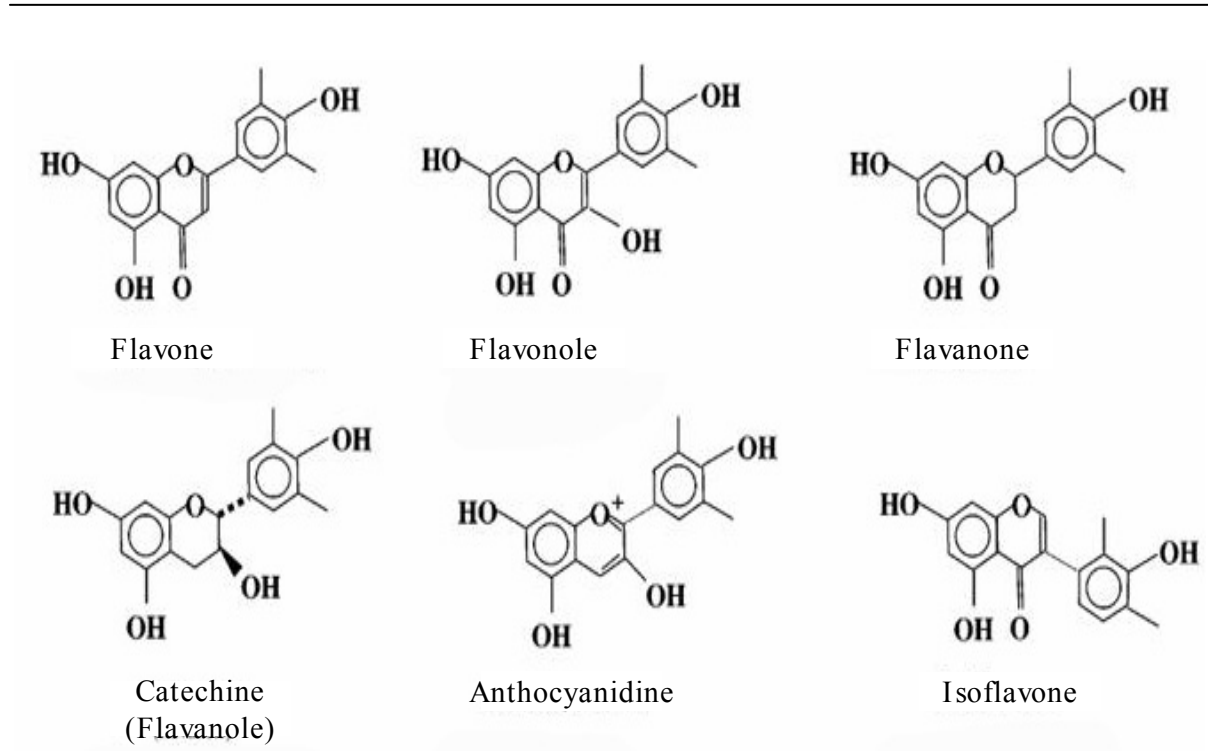


Abbildung 1-7: Flavonoid-Hauptgruppen

Obwohl die verschiedenen Flavonoide sich bezüglich ihrer Struktur stark ähneln, bedingen kleine Strukturdifferenzen große Unterschiede der biochemischen Eigenschaften. Dabei entscheiden z.B. die Anzahl der phenolischen Hydroxylgruppen, das Ausmaß und die Art der Substitution und deren spezifische Position am Ring, ob das Molekül Enzymaktivitäten beeinflusst oder als Antioxidanz bzw. als antimutagenes Agens wirkt (Rice-Evans, 2004). Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Untersuchung der Wirkung von Flavonoiden ist die Bioverfügbarkeit. Bis heute ist nicht genau geklärt, wie die Absorption aus der Nahrung von statten geht. Flavonoid-Glykoside (FG), sind relativ lange und hoch polare Moleküle, die zu hydrophil sind, um passiv durch biologische Membranen zu diffundieren. Die Absorption der FGs war deshalb lange Zeit umstritten (Ross et al., 2002). Neue Erkenntnisse weisen auf ein komplexes Zusammenspiel von Absorptions-, metabolischen- und Transportprozessen hin, um die Bioverfügbarkeit von FG zu determinieren. (Nemeth et al., 2003, Sesink et al., 2003, Vaidyanathan et al., 2003, Walgren et al., 2000). Trotz hoher Absorptionsraten ist die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden vergleichsweise niedrig. Für Quercetin ist z.B. eine Konzentration von 0.1 - 10  $\mu\text{mol/L}$  im Blutkreislauf gefunden worden. Diese war hauptsächlich abhängig von der Anwesenheit von Quercetin-Metaboliten und nicht der Aglykone, wie kürzlich von Murota und Terao beschrieben wurde (Murota et al., 2003). Aus diesem Grund zieht die Untersuchung von Flavonoid-Metaboliten immer mehr Aufmerksamkeit auf sich (Sesink et al., 2003, Spencer et al., 2004).

## 1.2 Altern

### 1.2.1 Demographie

Im Rahmen der Alterungsprozesse, denen alle lebendigen Organismen unterliegen, kommt es zu einer zunehmenden Einschränkung physiologischer Funktionen und zu einer erhöhten Inzidenz für bestimmte Erkrankungen. So treten degenerative Erkrankungen des neuromuskulären Gewebes und Krebserkrankungen mit steigendem Lebensalter gehäuft auf. Die hohe Relevanz des Themas Alterung für die Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Medizin ergibt sich aus der demographischen Entwicklung, auf Grund derer mit einem erheblich steigenden Anteil alter Menschen an der Gesamtbevölkerung und den damit verbundenen medizinischen Konsequenzen zu rechnen ist. In der heutigen Zeit werden die Menschen schon deutlich älter als noch vor ein paar Jahren. Die neusten Zahlen des Statistischen Bundesamts zeigen einen Anstieg der mittleren Lebenserwartung für neugeborene Jungen von 75,1 und für Mädchen von 81,1 Jahre in 1999 und 2001 auf 75,6 bzw. 81,3 Jahre in 2001 und 2003. Zurzeit leben in der Bundesrepublik Deutschland ca. 82 Millionen Menschen, von denen 13 Millionen 65 Jahr oder älter sind und bis 2025 wird mit einer Lebenserwartung von 83 Jahren für Frauen und 76 Jahren für Männern gerechnet (Kruse et al., 2005). Zusätzlich werden zumindest in Deutschland immer weniger Kinder geboren, wodurch sowohl der Altersdurchschnitt als auch die Anzahl der Älteren und deren Anteil an der Gesamtbevölkerung stetig ansteigen. Im Jahre 2050 wird mit einem Durchschnittsalter der Deutschen von 57 Jahren gerechnet (Abbildung 1-8).

Da nicht nur Deutschland sondern alle Industrienationen von diesem Effekt betroffen sind, ist die Frage nach der Gesundheit im Alter von erheblicher individueller und gesellschaftlicher Bedeutung. Im Alter treten zwar zunehmend gesundheitliche Probleme auf, dennoch ist der generelle Vorgang jedoch nicht mit Krankheit gleichzusetzen. Deshalb spielt das so genannte „gesunde Altern“ eine immer wichtigere Rolle.



**Abbildung 1-8: Entwicklung des Altersaufbaus von 1950-2050 und die Geschlechtsverteilung (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2005)**

### 1.2.2 Theorie des Alterns

Im Zuge der demographischen Entwicklung ist die Erforschung des Alterns erheblich intensiviert worden. Es handelt sich hierbei um einen komplexen Vorgang, der viele verschiedene Gründe und Auslöser haben kann und sich durch unterschiedliche morphologische und funktionale Veränderungen im Organismus äußert. Dabei gilt es verschiedene Formen des Alterns zu unterscheiden. Zum Beispiel das mechanische Altern, welches durch einen Verschleiß durch kontinuierlichen Gebrauch wie beispielsweise den Wasserleitbahnen von Bäumen gekennzeichnet ist. Begrenzte Zellteilung oder reduzierte Proliferation sind weitere Faktoren, die einen Altersvorgang definieren können. Im Folgenden soll allerdings das zelluläre Altern weiter beleuchtet werden. Die dabei auftretenden Veränderungen sind durch Funktionsverluste und erhöhte Vulnerabilität der Zellen oder Gewebe gekennzeichnet. Zum Beispiel kann es zu einer Abnahme der Anzahl und der Aktivität der Mitochondrien kommen (Zarchin et al., 2002). Im Gegensatz dazu sind die mit dem Altern verbundenen Veränderungen des Wissens, der Erfahrung und der Persönlichkeit eher mit weiterer Differenzierung und weiterem Wachstum verbunden. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Erklärungsversuchen für das Phänomen des zellulären Alterns. Neben den genetischen Ansätzen, die Mutationen oder die Verkürzung der Telomere umfassen, wird bereits seit den Sechziger Jahren der Einfluss von altersbedingt akkumulierten Radikalen, also oxidativem Stress, als schwerwiegender Faktor im Alterungsprozess diskutiert. Laut Harmans Theorie kommt es zu einer Abnahme der protektiven Faktoren in der Zelle und folglich zu einem Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abwehr von aggressiven freien Radikalen (Beckman et al., 1998, Harman, 1968) (Abbildung 1-9).



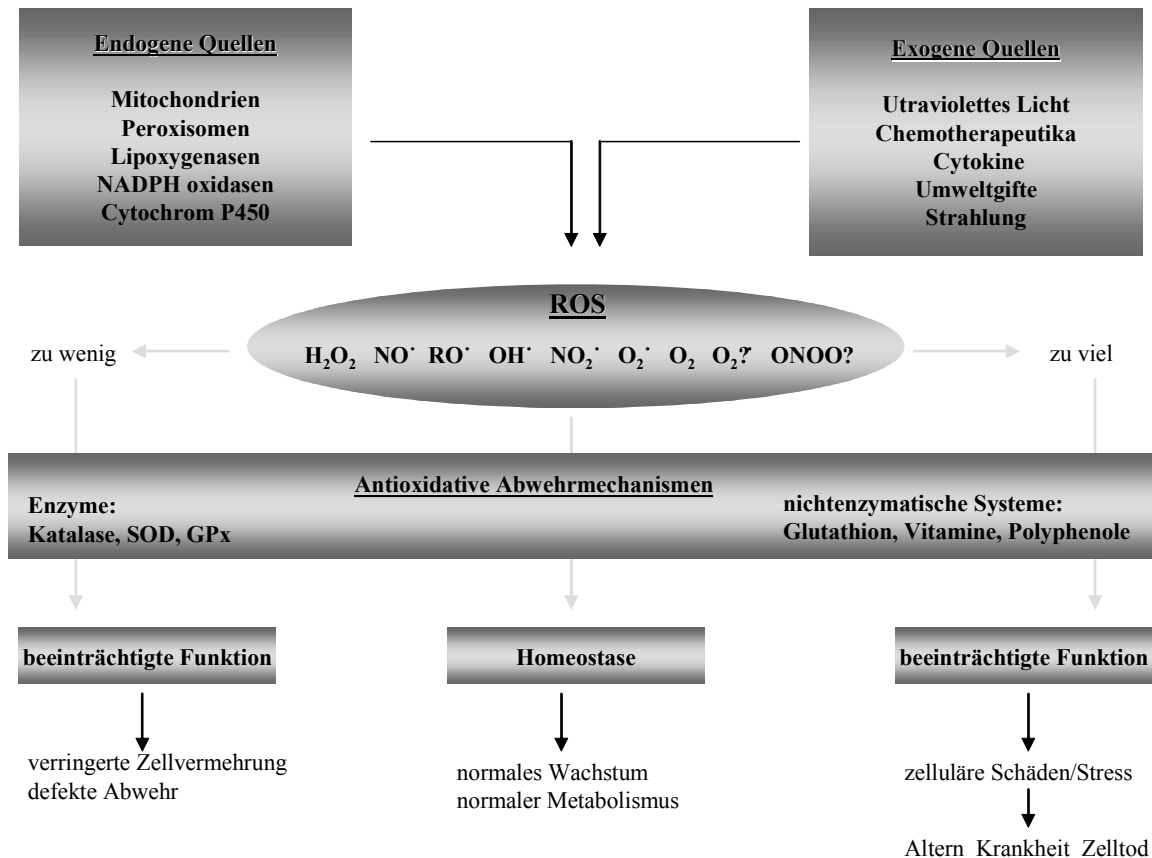


Abbildung 1-9: Entstehung und Abwehr von oxidativem Stress

### 1.3 Oxidativer Stress

In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahrzehnte ist eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. oxidativem Stress sowohl beim Alterungsvorgang selbst als auch in der Pathophysiologie der damit assoziierten Erkrankungen nachgewiesen worden (Wallace, 1992). Auf Grund dessen nimmt die Untersuchung der reaktiven Sauerstoffspezies und ihrer Auswirkungen auf die Zellen bzw. den Organismus eine zentrale Rolle in der molekularen Alterungsforschung ein. Oxidativer Stress beschreibt einen Zustand des Ungleichgewichtes zwischen der Produktion und Entgiftung von reaktiven oxygenen Spezies. Die dabei erhöhte Akkumulation von ROS kann entweder aus einer vermehrten Produktion, einer verminderten Abwehr oder einer Kombination aus beidem resultieren.

Der Mensch ist während seines Lebens vielen verschiedenen radikalerzeugenden Angriffen ausgesetzt. Die wichtigsten leiten sich aus endogenen Quellen wie zum Beispiel der Atmungskette in den Mitochondrien oder Reaktionen der Lipoxygenasen ab. Andere stammen aus exogenen Quellen, dabei werden aggressive Moleküle durch ultraviolettes Licht, Chemotherapeutika, Umweltgifte oder Strahlung erzeugt (vergleiche Abschnitt 1.5). Kleine

Mengen an ROS können von Zellen gut verkraftet werden. Sie spielen sogar eine wichtige Rolle bei manchen physiologischen Funktionen. Sie dienen z.B. der Steuerung des Blutgefäßtonus oder der Leukozytenaktivität. Die Tatsache, dass erhöhte ROS-Spiegel jedoch für fast alle Zellbestandteile inklusive DNA, Proteinen und Lipiden schädlich sind, macht oxidativen Stress so gefährlich. Dabei kann es z.B. zur verstärkten Proteindegradation (Davies et al., 1987a) und zur Akkumulation von oxidierten Proteinen (Grune et al., 2001, Stadtman, 1992) kommen bzw. zur Mutationen nukleärer oder mitochondrialer DNA (Berneburg et al., 1999, Wallace, 1992). Auf hochgradig oxidativen Stress können Zellen auf zwei Arten reagieren. Entweder wird die adaptive Zellantwort angestoßen und dadurch Reparaturmechanismen ausgelöst oder bei zu starkem Stress der Zelltod induziert.

#### **1.4 Zentrale und periphere Alterserscheinungen**

Obwohl der Zusammenhang von oxidativem Stress und zellulärem Alterungsvorgang durch zahlreiche Studien nahe gelegt wurde (Beckman et al., 1998), sind wesentliche Aspekte der oben genannten Hypothese von Harman noch unbekannt. Generell beeinflusst das Alter den Gesundheitszustand des Körpers in vielerlei Hinsichten. Es kommt häufig zu erhöhtem Blutdruck und erhöhten Cholesterinspiegeln oder zur Abnahme der geistigen Fähigkeiten. Kommt zu diesen Faktoren noch eingeschränkte Bewegung, Altersdiabetes und eine unausgewogene Ernährung hinzu, kann es schnell zu schwerwiegenderen Symptomen und Krankheiten kommen. Hierbei unterscheidet man zwischen zentralen, das Nervensystem und Gehirn betreffenden Auswirkungen sowie peripheren Erscheinungen, die auf das Herz und das Blutsystem bezogen sind. Weiterhin gibt es eine gewisse Anzahl an Krebs- und Tumorerkrankungen, die durch krankhaftes Wachstum oder Wucherungen einzelner Zellen und Organe entstehen können und verschiedene Arten von Demenzen, die bis zu einem kompletten Verlust der Eigenständigkeit der Betroffenen führen können. Im Folgenden werden periphere und zentrale Auswirkungen genauer betrachtet.

##### **1.4.1 Periphere Erkrankungen**

###### **1.4.1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen in Deutschland an der Spitze der Todesursachenstatistik. Jährlich sterben weltweit 16,7 Millionen Menschen an kardiovaskulären Krankheiten (MacKay et al., 2005). Damit sind diese Erkrankungen die häufigste Todesursache sowohl in

Deutschland, anderen europäischen Ländern, als auch den USA. Die hohe Mortalität und Morbidität aufgrund von Herz-Kreislauf-Krankheiten macht den Bedarf an primärer und sekundärer Prävention deutlich.

Hinter diesem Sammelbegriff verbergen sich verschiedene Krankheitsbilder wie Koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, plötzlicher Herztod, Schlaganfälle und rheumatische und entzündliche Herzerkrankungen (Abbildung 1-10). Die gemeinsame Ursache all dieser häufigen Erkrankungen ist eine Verdickung der inneren Arterienwand durch Einwanderung von Monozyten, die durch Umwandlung in aktive Makrophagen und die Einlagerungen von LDL-Cholesterin in der Entstehung von Plaques resultiert, die sich über viele Jahre unbemerkt weiterentwickelt. Nach und nach verengen sich dadurch die Blutgefäße, das Blut kann nicht mehr ungehindert fließen und das Herz wird nicht optimal durchblutet. Im schlimmsten Fall kommt es zu einer plötzlichen Verstopfung eines Gefäßes, einer Thrombose, wodurch die Blut- und Sauerstoffversorgung des Herzens komplett unterbrochen wird. Die Folge ist ein Herzinfarkt. Das Ausmaß einer Arteriosklerose und der Zeitpunkt, an dem der Betroffene durch gesundheitliche Beschwerden darauf aufmerksam wird, hängen von zusätzlichen Risikofaktoren ab. Dazu gehören vor allem Bluthochdruck, Übergewicht, zu hohe Blutfettspiegel, Zuckerkrankheit und Rauchen.

### ***Koronare Herzerkrankungen***

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist häufig eine Folge arteriosklerotischer Veränderungen an den Herzkranzarterien (Arnold et al., 2003). Laut WHO sterben jährlich 7,2 Millionen Menschen an koronaren Herzerkrankungen, meist durch einen Herzinfarkt, was 10 % aller Todesfälle entspricht (MacKay et al., 2005). Auch hier sind neben dem Alter, hoher Blutdruck, hohe Cholesterinwerten, Rauchen und eine ungesunde Ernährung wichtige Risikofaktoren.

### ***Schlaganfall***

Eine akute Unterversorgung des Gehirns mit Blut führt zu einem Schlaganfall. Dabei kann der Auslöser entweder eine Blockade (Ischaemie) oder eine Verletzung eines Blutgefäßes (Haemorrhagischer Anfall) sein. Nach Herzinfarkt und Krebs ist der Schlaganfall (Apoplex) die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und 5,5 Millionen Menschen sterben weltweit jährlich an einem Schlaganfall (Abbildung 1-10).

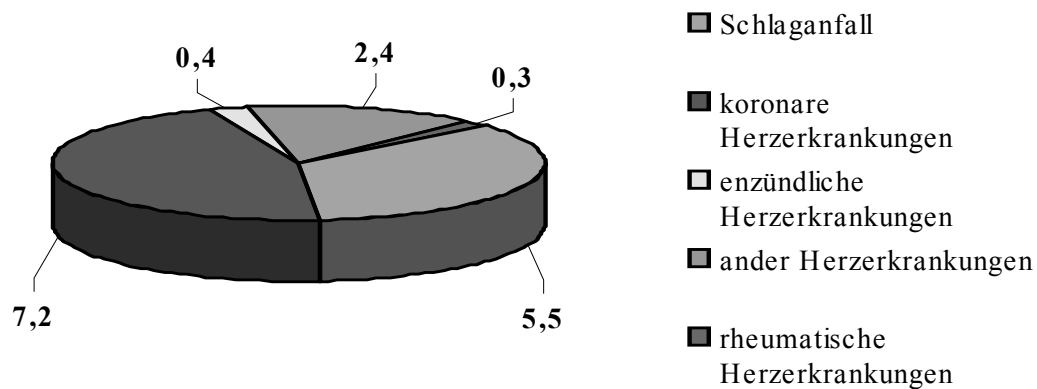


Abbildung 1-10: Globale Todesfälle durch Kardiovaskuläre Erkrankungen (MacKay et al., 2005)

#### 1.4.1.2 Diabetes

Unter der Bezeichnung "Diabetes mellitus" werden Störungen des Glucosestoffwechsels zusammengefasst, die zu einer dauerhaften Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut (Hyperglykämie) führen (Brückel, 2002). Es werden hauptsächlich zwei Diabetesformen unterschieden: Typ-1-Diabetes beginnt meist in der Jugend und hat seine Ursache in einer Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen. Typ-2-Diabetes betrifft dagegen meist ältere Menschen, beginnt langsam und beruht auf einer zunehmenden Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber dem Insulin, deren Hauptursache Übergewicht ist. Daneben gibt es noch einige seltenere Diabetes-Sonderformen und den Schwangerschaftsdiabetes. Beim Alters-Diabetes (Typ-2-Diabetes) kann zu Beginn der Erkrankung durch eine Umstellung des Lebensstils mit mehr körperlicher Bewegung, der Reduktion von Übergewicht und einer Ernährungsumstellung der Krankheit begegnet werden. In späteren Stadien ist die Einnahme von Medikamenten zur Blutzuckerregulierung und eine Insulintherapie wie bei Typ-1-Diabetes allerdings lebensnotwendig.

#### 1.4.2 Zentrale Auswirkung des Alterns auf das ZNS

Zentrale Auswirkungen des Alterns wären vielseitige kognitive Einschränkungen. Dabei reicht die Palette von leichter Altersvergesslichkeit bis hin zu starken Beeinträchtigungen der geistigen Fähigkeiten, wobei das Syndrom wird unter dem Begriff Demenz zusammengefasst wird. Dabei verlieren die Betroffenen die Fähigkeit abstrakt zu denken, zu planen und sich zu

orientieren und haben Probleme Sachverhalte zu beurteilen und zu behalten. Sie erkennen Personen oft nur schwer und unregelmäßig und leiden unter Vergesslichkeit und eingeschränkter Merkfähigkeit. Zurzeit leben in Deutschland etwa 1 Millionen Patienten mit einer mittleren oder schweren Demenz. Da das Alter einer der größten Risikofaktoren für eine demenzielle Erkrankung darstellt, wird mit einer steigenden Demenzzahl in den kommenden Jahren gerechnet (Heyn, 2005).

#### 1.4.2.1 Neurodegeneration/Gehirnalterung

Im Vergleich zur Alzheimer Demenz und anderen neurodegenerativen Krankheiten verläuft der normale Alterungsprozess im Gehirn oft mit einer geringeren Atrophie. Die Gehirne alter Menschen sind zwar insgesamt kleiner, haben ein geringeres Gewicht und vergrößerte Liquorbereiche, allerdings schrumpft z.B. der Bereich des medialen Temporallappens bei einer Demenz jährlich um 0,7 % seines Volumens und bei der normalen Alterung nur um weniger als die Hälfte (Rusinek et al., 2003). Alterbedingte Schädigungen des Gehirns wie zum Beispiel eine Verlangsamung der Informationsverarbeitung können auch schon in relativ jungem Alter, beim Menschen im Alter von 35-65 Jahren und bei Mäusen im Alter von 12-24 Monaten, detektiert werden (Finch, 2003). Während des Alterungsprozesses differiert die Beeinträchtigung der neuronalen Aktivität in unterschiedlichen Gehirnarealen signifikant (Rutten et al., 2003). Die Hirnalterung wird von einem Anstieg der Schädigung von Proteinen und Lipiden und der Schädigung der mitochondrialen DNA begleitet (Mecocci et al., 1993). Speziell das Gehirn ist extrem anfällig für oxidativen Stress, da es mit einem relativ geringen Gewicht einen Großteil des vom Organismus benötigten Sauerstoffs umsetzt. Dabei können vermehrt ROS gebildet werden und die Entgiftung der schädlichen Radikale muss im Gehirn besonders effektiv und sorgfältig von statten gehen (Halliwell, 1992). Ein weiterer Grund für die extreme Anfälligkeit des Gehirns ist der besonders hohe Anteil an vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) (Floyd, 1999). Diese sind besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress und resultieren in einer vermehrten Bildung der schädlichen Lipidperoxidationsprodukte Malondialdehyd (MDA) oder Hydroxynonenal (HNE) (Smith et al., 1999). Auch führt eine ungenügende Versorgung mit Nährstoffen durch eine verschlechterte cerebromikrovaskuläre Funktion zu einer erniedrigten neuronalen Kapazität im alternden Gehirn (Smith et al., 1999, Zarchin et al., 2002).

### **Alzheimer Demenz**

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung auf der Welt. Zurzeit leiden etwa 4 Mio. Amerikaner und mehr als 60 % der Demenzkranken in Deutschland an einer Demenz vom Alzheimer Typ. Gekennzeichnet ist diese Krankheit durch starken Gedächtnisverlust und der progressiven Abnahme der kognitiven Fähigkeiten. 1907 wurde diese Krankheit durch den Psychiater Alois Alzheimer das erste Mal beschrieben. Die 50-jährige Patientin Auguste D. war durch progredienten Gedächtnisverlust und gestörte kognitive Fähigkeiten aufgefallen. Ihr Gehirn zeigte zwei histopathologische Charakteristika: Fibrillen innerhalb der Neurone und Ablagerungen in Form von Plaques. Diese Befunde werden auch heute noch als Hauptcharakteristika der Alzheimer-Demenz beschrieben: extrazelluläre Plaques, bestehend aus dem Amyloid-beta-Peptid (A $\beta$ ) (Hardy et al., 1992) und neurofibrilläre Bündel (Tangles), bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau (Garcia et al., 2001). Ein schleichender Beginn und eine allmähliche Verschlechterung des Zustandes sind typisch für die AD. Weitere Charakteristika sind eine Abnahme der Gehirnmasse, vergrößerte Liquorbereiche und mangelnde Durchblutung. Da das Risiko an AD zu erkranken sich ab einem Alter von 65 Jahren alle fünf Jahre verdoppelt, wird mit einer Vervierfachung der AD-Patienten in den nächsten Jahren gerechnet (Brookmeyer et al., 1998). Das Alter stellt folglich einen der größten Risikofaktoren für eine Erkrankung an AD dar und kann eventuell durch eine gesunde Ernährung und ein „Jungbleiben“ des Körpers reduziert werden. Weitere Risikofaktoren sind Bluthochdruck, zu hohe Cholesterinwerte, Diabetes mellitus, Alkoholismus und Rauchen oder die Homozygotie des APoE-4-Allels. Auch eine Kopfverletzung kann der erste Schritt zur Hirndegeneration sein.

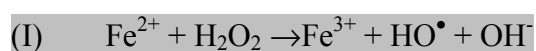
### **Vaskuläre Demenz**

Die Vaskuläre Demenz wird ebenfalls durch Durchblutungsstörungen im Gehirn ausgelöst. Früher wurde sie auch Multi-Infarkt-Demenz genannt, da angenommen wurde dass, mehrere territoriale Infarkte zum Untergang einer kritischen Anzahl von Neuronen führen. Diese Theorie ist heute umstritten. Eher wird eine chronische Schädigung der Gefäße als Ursache vermutet. Im Verlauf einer Vaskulären Demenz (VD) kann es entweder zur abrupten oder zu einer schleichenden Verschlechterung der kognitiven Leistung kommen. Weiterhin ist ihr Auftreten zeitlich eng mit einer Schädigung des Gehirns durch einen cerebrovaskulären Vorfall verknüpft. Nach der AD ist die VD die zweithäufigste Demenz in Deutschland. Etwa 15 % der Demenzpatienten in Deutschland leiden an einer Vaskulären Demenz. Ist dies der Fall sind auch nur noch wenige neurodegenerative Veränderungen zur Manifestation einer

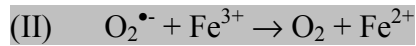
AD nötig (Heyn, 2005). Auch bei dieser Form der Demenz spielt das Alter eine wichtige Rolle. Die Abhängigkeit der Prävalenz vom Alter wird durch die Untersuchung von Skoog et al. deutlich (Skoog et al., 1993), hier zeigte sich bei über 85jährigen eine Prävalenz von rund 14% für VD.

## 1.5 Entstehung von ROS

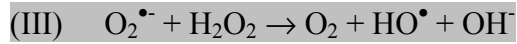
Freie Radikale werden definiert als Spezies, die in der Lage sind unabhängig (frei) zu existieren und ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen z.B.  $O_2^{\bullet-}$  (Superoxidradikal),  $OH^{\bullet}$  (Hydroxylradikal). Unter dem Terminus der reactive oxygen species (ROS) werden zusätzlich zu den Sauerstoffradikalen noch die nicht radikalischen Derivate  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid) und  $HOCl$  (Hypochlorische Säure) und die Alkoxy- ( $RO^{\bullet}$ ), Peroxid- ( $HOO^{\bullet}$ ) und Hydroxylradikale zusammengefasst. Der Begriff ROS bezieht sich also auf Radikale und Moleküle, die sich wie Radikale ebenfalls hoch reaktiv verhalten und andere Moleküle oxidieren. Bei der ROS-Entstehung werden im ersten Schritt Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei das Superoxidradikalanion entsteht. Unter physiologischen Bedingungen ist die Atmungskette in den Mitochondrienmembranen die Hauptquelle für dieses Radikal (Beckman et al., 1998). Beim Elektronentransfer dieser Reaktionen kann es zu einem Austreten von Elektronen kommen, die anschließend durch sofortige Übertragung auf molekularen Sauerstoff zur Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  führen. Schätzungsweise werden 1-3 % des von den Mitochondrien verarbeiteten Sauerstoffs zu Superoxid transformiert. Superoxidradikale werden auch von weiteren Quellen wie z.B. den NO-Synthase-Enzymen und den NADPH-Oxidasen generiert. Zusätzlich bildet das Immunsystem bei Kontakt mit schädlichen Viren, Bakterien und Fremdstoffen ebenfalls  $O_2^{\bullet-}$  in den Leukozyten und Makrophagen, um die körperfremden Stoffe zu eliminieren. Aus dem Superoxidradikal entsteht in einem weiteren Schritt Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion wird von dem Enzym Superoxid Dismutase katalysiert, das spezifisch für diese Entgiftungsreaktion ist.  $H_2O_2$  selber ist relativ reaktionsträge, kann aber durch die Reaktion mit Transitionsmetallen wie Kupfer oder Eisen aktiviert werden, wodurch neue hochreaktive Radikale entstehen. Diese Reaktion ist bekannt als Fenton-Reaktion (I).



Das entstandene Eisenion kann z.B. mit Superoxidradikalen weiterreagieren, wodurch es über eine Kettenreaktion zu einer Potenzierung des Schadens kommen kann.



Die Nettoreaktion von I und II ist als Haber-Weiss Reaktion bekannt (III).



Weiterhin gibt es diverse Radikale, die kein Sauerstoffatom besitzen und als „reactive species“ (RS) bezeichnet werden. Hier sind vor allem die reactive nitrogen species (RNS) zu nennen, zu denen  $NO^{\bullet}$  (Stickstoffoxidradikal) und  $ONOO^-$  (Peroxynitrit) gehören, die von den NO-Synthasen aus Stickstoffoxid generiert werden.

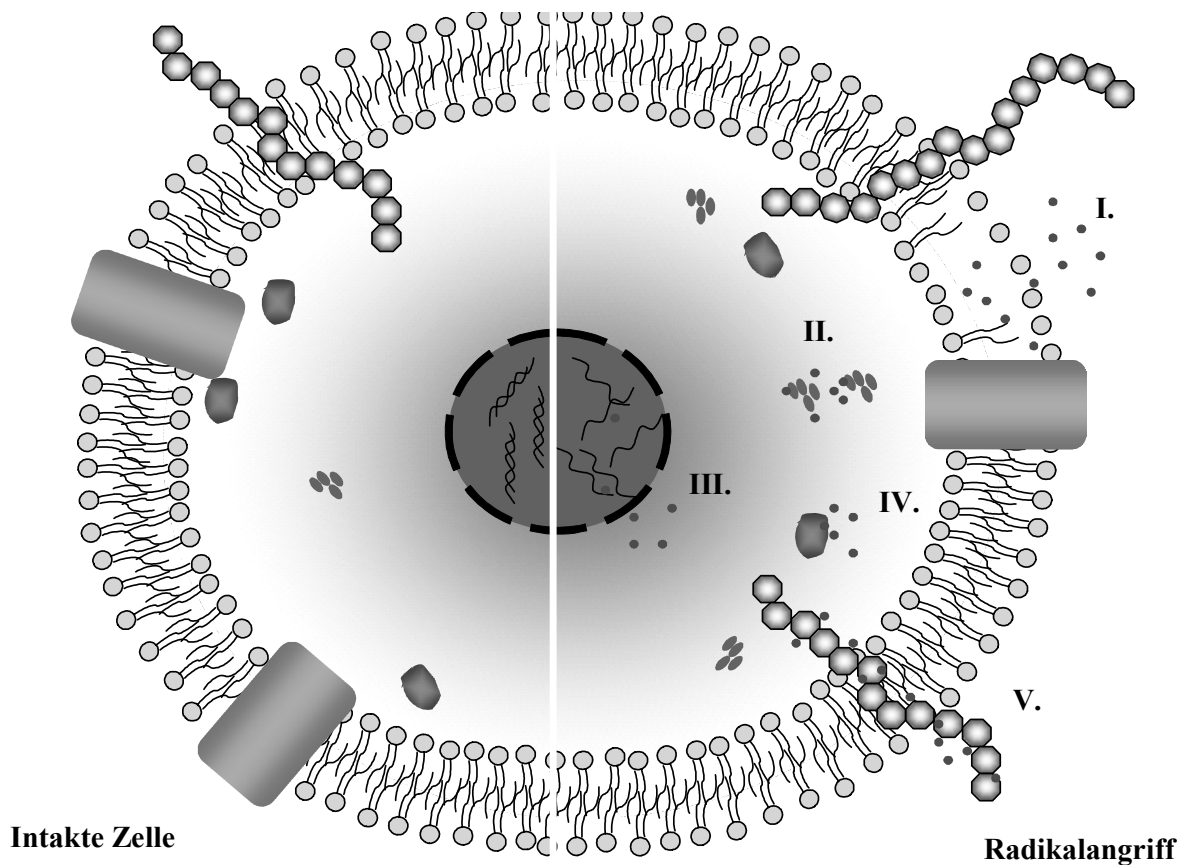


Abbildung 1-11: Durch ROS verursachte Schäden in der Zelle

I. Lipidperoxidation verursacht die Zerstörung der Membran-Bilayer und der Zellintegrität, II. Die Akkumulation von LDL führt zur Bildung von Schaumzellen (Arteriosklerose), III. Der Angriff der DNA führt zur Aufspaltung der Einzelstränge und zu Mutationen der Basenpaare, IV. Das mitochondriale Membranpotential wird durch Depolarisation geschädigt, V. Proteindegradation führt zu Aktivitätsverlust bestimmter Proteine und durch Oxidationen können bestimmte Enzyme aktiviert werden z.B. Proteinkinasen



### 1.5.1 ROS-Schäden

Physiologische Konzentrationen von ROS sind nicht schädlich für die Zelle oder den Organismus. Viele ROS sind kleine kompakte Moleküle mit einer guten Zelldiffundierbarkeit. D.h. sie können schnell transportiert werden und sind in der Lage die Zellmembranen zu durchdringen. Deshalb fungieren manche ROS sogar als sekundäre Botenstoffe. So kann Wasserstoffperoxid die Wirkung des Hormons Insulin simulieren, sowie antioxidative Enzyme und die Proteinphosphorylierung aktivieren. NO ist ferner ein sehr potentes Vasorelaxans der glatten Muskelzellen z.B. der Blutgefäßmuskulatur (Müller et al., 2000). Zu hohe Konzentration an ROS können hingegen vielfältige Schäden an diversen Zellkompartimenten und Bestandteilen verursachen. Dabei werden die Membranen, Proteine und Enzyme, die Mitochondrien und die DNA zum Teil irreparabel beschädigt (Abbildung 1-11).

#### 1.5.1.1 Membranen

Alle tierischen Zellen sind von einer doppelten Membran (Bilayer) umgeben. Diese Membranen grenzen das Zellinnere gegen die interstitielle Flüssigkeit ab und sind von lebenswichtiger Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus. Schon lange ist bekannt, dass diese Membranen aus Phospholipiden aufgebaut sind, die einer Polarität unterworfen sind. Ein Lipidmolekül besteht aus einem Kopf und zwei langen Fettsäureketten. Der polare Kopf besteht aus einem Glycerol-Molekül mit einer veresterten Phosphatgruppe, welche über eine Etherbrücke z.B. mit Cholin verknüpft ist. Die hydrophilen Köpfe ordnen sich in den Membran-Bilayern nach außen und betten so die lipophilen Fettsäureketten im Inneren der Membran ein. Die wichtigsten Membranphospholipide sind Phosphoglyceride, Sphingomyeline und Glykolipide (Alberts et al., 1999). Die Membranlipide sind asymmetrisch zwischen den beiden Einzelschichten verteilt. Sphingomyeline und Phosphatidylcholine vorwiegend in der äußeren Membran (exofacial) und Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine in der inneren Membran (cytofacial). Die Glykolipide sind ausschließlich exofacial lokalisiert (Graham M.E. et al., 1998). Neben den Lipiden bestehen Membranen aus Proteinen und Kohlenhydraten. Proteine übernehmen dabei eine Vielzahl physiologischer Aufgaben. Als integrale Bestandteile bilden sie z.B. Poren und Kanäle oder üben als in eine Einzelschicht eingelagerte Proteine Enzymfunktionen aus. Die Membranlipide gehen zum Teil spezifische Wechselwirkungen mit bestimmten Membranproteinen ein und sind für deren Funktion möglicherweise notwendig. Seit den

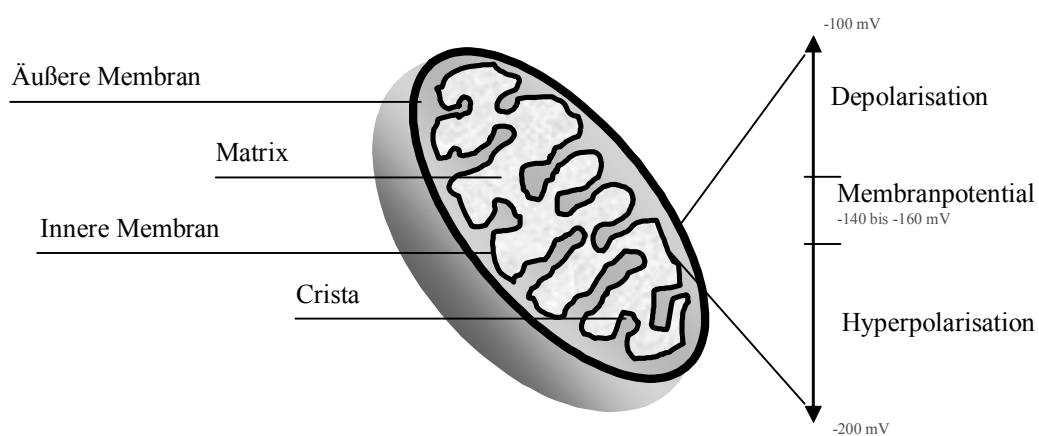
Siebziger Jahren ist das Flüssig-Mosaik-Modell die anerkannte Vorstellungsweise der Membranen (Singer et al., 1972a). Dabei können sich die Proteine in der Lipidmatrix lateral bewegen. Diese Beweglichkeit ist jedoch durch die Fluidität der Membran reguliert. Je größer der Anteil an ungesättigten Fettsäuren und je geringer der Anteil an starrem Cholesterol, desto fluidier ist die Membran (Singer, 2004). ROS sind in der Lage, durch oxidativen Angriff der Membranbestandteile sowohl die Integrität als auch die Fluidität der Membranen zu stören (Beckman et al., 1998). Sie greifen dabei die ungesättigten Fettsäurereste der Membranlipide an und oxidieren diese. Es entstehen reaktive Peroxylradikale, die mit Sauerstoff zu typischen Produkten wie Malondialdehyd und Hydroxynonenal reagieren. Diesen Vorgang nennt man Lipidperoxidation und kann durch spektrometrische Detektion der stabilen Endprodukte quantifiziert werden. Im Alter nimmt der Betrag an ungesättigten Fettsäuren durch Lipidperoxidation stark ab (Harman, 1988). Ferner verändert sich das Verhältnis der Lipidzusammensetzung der Zellmembranen im Alter. Der Cholesterolanteil steigt zu Ungunsten der Phospholipide stark an, was zu einer Versteifung, einer Rigidisierung der Membranen und zum Funktionsverlust membrangebundener Proteine führen kann (Tappel, 1975). Beide Effekte tragen dazu bei, dass die Zellmembranen ihre Aufgabe als Diffusionsbarriere und Vermittler von lebenswichtigen Signalen nicht mehr im vollen Umfang gerecht werden können.

### 1.5.1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind die Organellen der Zellatmung. Diese sind von einer doppelten Membran umgeben, wobei ihre innere Membran stark eingefaltet ist und die Enzymkomplexe für Atmungskette und oxidative Phosphorylierung enthält (Abbildung 1-12). Für ihre Funktionalität, der Umwandlung der bei der Glykolyse und dem Zitrat-Zyklus angefallenen Energie-Equivalente in ATP während der so genannten Atmungskette, ist das an sich negative Mitochondrienpotential (-140 bis -160 mV) von entscheidender Wichtigkeit. Neben der für alle Wachstums- und Differenzierungsprozesse notwendigen ATP-Produktion sind die Mitochondrien auch der Hauptsyntheseort für ROS. Während der Reaktionen der Atmungskette kommt es zum Austritt von Elektronen, die auf molekularen Sauerstoff übertragen werden und so das hochreaktive Superoxidradikal bilden. Obwohl sich diese Reaktion in der inneren Mitochondrienmembran abspielt, werden Mitochondrien selbst durch zu viele reaktive Radikale in ihrer Funktionalität geschädigt. Als Energielieferanten für alle physiologischen Vorgänge, kommt der Mitochondrienschädigung eine Schlüsselrolle in der Zellalterung zu. Dies hat auch Denham Harman, der Wissenschaftler, der die oxidative-

Stress-Theorie des Alterns verfasst hat, so gesehen und seine These dahingehend verfeinert. Er vermutet, dass die Mitochondrien der Hauptangriffsort für freie Radikale sind und durch diese mitochondrialen Attacken Alterungsprozesse im Menschen ausgelöst werden (Harman, 1972, Harman, 1981). Diese Theorie ist im Laufe der Jahre bestätigt worden. Unter der Bezeichnung „mitochondriale Theorie des Alterns“, versteht man heute vermehrte oxidative Angriffe und die Akkumulation von Mutationen der mitochondrialen DNA durch die Radikale, die zur humanen Zellalterung beitragen (Linnane et al., 1989, Miquel, 1992). Dabei sind alle Stimuli, die zur vermehrten ROS-Produktion führen in der Lage, die Öffnung von Membranporen in der Mitochondrienmembran zu induzieren und apoptotische Faktoren wie Cytochrom C freizusetzen (Tatton et al., 1999). Weiterhin ist die respirative Funktionalität der Mitochondrien im Alter reduziert (Cooper et al., 1992, Yen et al., 1989) und die Anzahl der Mutationen in der mitochondrialen DNA durch oxidativen Stress in verschiedenen humanen Geweben erhöht (Lee et al., 1997, Wei, 1998).

Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde die altersabhängige Reduktion des Membranpotentials untersucht. Eine Verringerung des negativen Potentials (Depolarisation) ist eine Störung der treibenden Kraft zur oxidativen Phosphorylierung. Diese Beeinträchtigung konnte sowohl in Gewebezellen gealterter Tiere als auch in den Lebermitochondrien von Mäusen nachgewiesen werden (Hagen et al., 1997, Harper et al., 1998). Eine zusätzliche Negativierung des Membranpotentials, eine so genannte Hyperpolarisation, kann ein möglicher gegenregulativer Abwehrmechanismus der Mitochondrien sein.



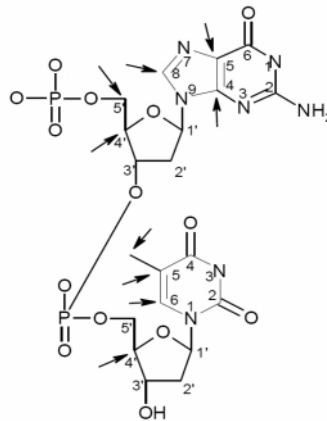
**Abbildung 1-12: Aufbau eines Mitochondriums und sein Membranpotential**

### 1.5.1.3 Proteine

Die Oxidation von Proteinen spielt eine essentielle Rolle in der Pathogenese einer Vielzahl degenerativer Krankheiten und dem Altern. Mittlerweile gibt es viele experimentelle Hinweise, dass oxidierte Proteine verstärkt in geschädigten Geweben von Tieren und Menschen vorkommen, die an Alzheimer Demenz, rheumathoider Arthritis, Arteriosklerose o. ä. leiden (Requena et al., 2003). Ebenfalls schon seit einigen Jahren bekannt ist die Tatsache, dass in alten Organismen mehr oxidierte Proteine zu finden sind als in jungen (Oliver et al., 1987). Proteine können durch Akkumulation von reaktiven Spezies auf unterschiedliche Weise geschädigt werden. Entweder reagieren ROS hierbei indirekt über Molekülen wie z. B. Zuckern oder Fetten, wobei die daraus entstehenden Produkte dann mit den Proteinen reagieren oder sie reagieren direkt mit den Proteinen (Levine et al., 2001). Bei diesem als Maillard-Reaktion bekannten Mechanismus können entweder die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren oder die verschiedenen Seitenketten angegriffen werden. Viele der ROS-vermittelten Reaktionen betreffen die Seitenketten und sind zusätzlich durch die Anwesenheit von Kupfer- oder Eisenionen beeinflusst. Bei diesen Reaktionen werden die Proteine entweder zu niedermolekularen Produkten gespalten oder zu hochmolekularen Aggregaten verknüpft, wobei sich die Eigenschaften und häufig die Funktion der Eiweiße stark verändern (Degradation). Eine häufig auftretende Veränderung ist die Einführung von Carbonylgruppen in Proteinseitenketten, welche durch Oxidation fast aller Moleküle oder durch Reaktion mit primären Oxidationsprodukten wie z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal entstehen kann (Stadtman et al., 2000). Neben Degradation ist auch die Aktivierung inaktiver Proteine durch Oxidation möglich. Geschieht dies, kommt es vermehrt zu ungewollten Reaktionen in den Zellen, die erneut kleinere oder größere Schäden anrichten oder zum Zelltod führen können.

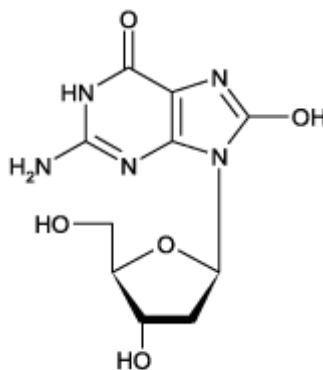
### 1.5.1.4 DNA

Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht nur für die Oxidation von Proteinen, sondern auch für die Schädigung der DNA von zentraler Bedeutung (Grune et al., 2001). Es ist bekannt, dass ROS in der Lage sind, direkt DNA-Moleküle zu schädigen. Dabei können sie zur Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, DNA-Addukten und verschiedenen Crosslinks führen (Lombard et al., 2005). wobei sie hauptsächlich die Nucleinbasen hydroxylieren (Abbildung 1-13).



**Abbildung 1-13: Stellen der radikalische Angriffe an der DNA**

Unter den Basen ist Guanosin die anfälligste für diese radikalischen Angriffe. Das hieraus resultierende Produkt ist 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) (Abbildung 1-14) (Chiou et al., 2003). Der Anteil dieser speziell veränderten Base lässt sich mittels ELISA bestimmen und erlaubt so Rückschluss auf den Grad der oxidativen Schädigung der DNA. Mittlerweile ist bekannt, dass die mitochondriale DNA stärker von Mutationen durch oxidativen Stress betroffen ist als die genomische DNA (Richter et al., 1988). Sowohl in tierischem (Takasawa et al., 1993) als auch in verschiedenen humanen Geweben ist bisher eine altersabhängige Erhöhung der 8-OHdG-Level gefunden worden (Hayakawa et al., 1991, Hayakawa et al., 1993).



**Abbildung 1-14: Strukturformel von 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin**

Zusätzlich zu Abwehrkomponenten, die die Akkumulation oder Entstehung reaktiver Radikale verhindern, besitzen Zellen ein breites Repertoire an Mechanismen zur Reparatur der DNA. So können falsche Basen durch bestimmte Enzyme (z.B. DNA-Polymerasen) gegen die richtigen ausgetauscht werden und Mutationen korrigiert werden. Einzelne Mutationen

sind daher nicht krankhaft. Es ist allerdings bekannt, dass die Effektivität der Zellreparatur mit dem Alter nachlässt und sich dadurch Mutationen und Fehler anhäufen. Diese Akkumulation ist dann wieder schädlich und kann den Zelltod induzieren.

## 1.6 Antioxidative Abwehrmechanismen

Da unter physiologischen Bedingungen immer kleine Mengen ROS und RNS gebildet werden, besitzen Zellen verschiedene Entgiftungsmechanismen (Brigelius-Flohe, 1999). Substanzen, die die schädlichen Oxidationen in der Zelle verhindern, dem durch Radikale erzeugten Schaden entgegenwirken oder diesen verzögern, nennt man Antioxidantien. Der Körper besitzt ein Netzwerk aus verschiedenen antioxidativ wirksamen Mechanismen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihre Wirkung entfalten: Auf der einen Seite primäre (präventive) Antioxidantien, die die Entstehung von schädlichen ROS verhindern und auf der anderen Seite sekundäre (abfangende) Antioxidantien, die bei der Entgiftung bereits gebildeter Radikale helfen. Zur ersten Gruppe gehören die Plasmaproteine, die oxidationsauslösende Metallionen wie Kupfer- und Eisenionen binden können. (Albumin, Ferritin, Myoglobin). Die andere Gruppe besteht aus den so genannten Scavengern. Es handelt sich um Substanzen, die in der Lage sind die schädlichen Kettenreaktionen durch Abfangen der Radikale zu unterbrechen und somit oxidativen Stress zu mindern. Diese Gruppe lässt sich noch weiter in antioxidative Enzyme wie z.B. die Katalase, Glutathion Peroxidase und Reduktase oder Superoxid Dismutase und kleinere Moleküle wie Glutathion, Vitamin C und E, Harnsäure und Bilirubin aufteilen. Insgesamt ist das antioxidative Netzwerk dafür verantwortlich, dass die pro- und antioxidativen Prozesse im Gleichgewicht sind. Überwiegen die prooxidativen Vorgänge, kommt es zu oxidativem Stress durch vermehrte ROS-Produktion.

Um das Übermaß der schädlichen oxidativen Reaktionen zu kontrollieren hat die Zelle neben den Enzymen und körpereigenen Molekülen auch die Möglichkeit, bei genügendem Angebot von außen, Vitamine und Polyphenole als exogene Antioxidantien einzusetzen. Dabei reagieren diese Moleküle mit den hochreaktiven Spezies und verhindern so die schädliche Oxidation lebenswichtiger Strukturen wie z. B. den Zellmembranen. Alle diese zelleigenen Abwehrreaktionen können gleichzeitig nebeneinander ablaufen und treten häufig in einem komplexen Zusammenspiel auf. Deshalb ist es schwierig wissenschaftlich zu belegen, welche Abwehrfunktion durch welchen Reiz ausgelöst wird.

Im Alter funktionieren die körpereigenen Abwehrmechanismen nicht mehr im vollen Ausmaß. Der Körper wird dem oxidativen Stress folglich vermehrt ausgesetzt und dadurch

geschädigt. Um die resultierenden Schädigungen im Alter zu verhindern sind seit ein paar Jahren zusätzlich zu Vitaminen so genannte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Gespräch. Dabei handelt es sich meist um Vertreter der Polyphenole (vergleiche 1.1.2: Polyphenole), die viele Pflanzen als Abwehr gegen feindliche Umweltsituationen bilden und die auf die gleiche Art und Weise wie Vitamine oxidative Vorgänge im Körper verhindern können (Schmitt-Schillig et al., 2005).

### 1.6.1 Enzymatische Abwehr

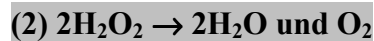
Aerobe Zellen bilden unter physiologischen Bedingungen permanent Peroxide. Diese können durch Akkumulation gefährliche Kettenreaktionen auslösen und müssen vorher von den Zellen entsorgt oder entgiftet werden. Die wichtigsten Abwehrenzyme des Körpers für oxidativen Stress durch Peroxide wie z.B. Superoxid sind die Enzyme Superoxid Dismutase (SOD), Katalase, Glutathion Reduktase (GR) und Glutathion Peroxidase (GPx) (Abbildung 1-15). Der Schutzmechanismus durch Enzyme bietet den Vorteil, dass die „steady-state“-Konzentration von Peroxiden den herrschenden zellulären Gegebenheiten schnell angepasst werden kann. Unterschiedliche antioxidative Enzyme können dabei durch endogene Effektoren induziert, gehemmt oder aktiviert werden (Harris, 1992). Enzyme wirken sehr effektiv und können selektive antioxidative Eigenschaften haben, wie z.B. das Wiederherstellen der DNA-Struktur, die Reparatur von Phospholipiden und die Reparatur bzw. Resynthese von Proteinen.

Es gibt vier verschiedene SOD-Familien, die sich durch ihr Schwermetallion im aktiven Zentrum unterscheiden (Cu/Zn-, Fe-, Mn-, Ni-SOD). Die SODs sind hauptsächlich im Cytosol, den Lysosomen und dem intermediären Raum zwischen den Mitochondrienmembranen lokalisiert (Slot et al., 1986) und katalysieren die Umsetzung des hochreaktiven Superoxidanions ( $O_2^{\bullet-}$ ) zu Wasserstoffperoxid (Reaktionsgleichung 1) (McCord et al., 1969). Zusätzlich schützen SODs andere Enzyme wie die Katalase und die GPx vor der Inaktivierung durch zu hohe Superoxidanion-Konzentrationen, in dem sie eine hohe Umsatzrate aufweisen und ihre intrazelluläre Konzentration ebenfalls meist hoch ist (Blum et al., 1985).

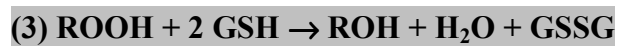


Das bei dieser Reaktion entstehende, ungleich reaktionsträgere Wasserstoffperoxid, kann entweder durch die Katalase direkt zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden (Reaktionsgleichung 2) oder durch die GPx entgiftet werden. Die Katalase und die Superoxid

Dismutase sind Dismutasen und benötigen daher für ihre enzymatischen Reaktionen keine Energie oder Kofaktoren. Der hauptsächliche Wirkungsort der Katalase sind die Peroxisomen.



Die Glutathion Peroxidasen haben die Aufgabe hauptsächlich Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide (ROOH) zu eliminieren. Dies geschieht, indem sie ROOH zu Alkoholen (ROH) reduzieren (Reaktionsgleichung 3) (Chance et al., 1979). Das Wasserstoffperoxid wird von der Reduktase-Funktion der GPx entgiftet (Reaktionsgleichung 4). Bei der GPx-Reaktion werden allerdings zwei Moleküle Glutathion (GSH) oxidiert (GSSG), welche in einem weiteren Schritt durch Reaktion mit der GR unter Umsetzung eines Energieäquivalentes (NADPH) wieder zu GSH regeneriert werden müssen.



In Säugetieren gibt es mindestens fünf Isoformen der GPx, die in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. Z.B. im Cytosol, den Membranen und den Mitochondrien. Die GPx ist zwar in der Lage neben  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch Hydroperoxide zu reduzieren (Chance et al., 1979), allerdings können nur freie Fettsäurehydroperoxide, peroxidierte Phospholipide und Cholesterolperoxide als freie Bestandteile von Membranen und Lipiden reduziert werden. So muss zur Reparatur von peroxidierten Fettsäuren in Membranen erst die Phospholipase A<sub>2</sub> die geschädigten Fettsäuren aus dem Membranverband rauslösen und so für die GPx zugänglich machen.

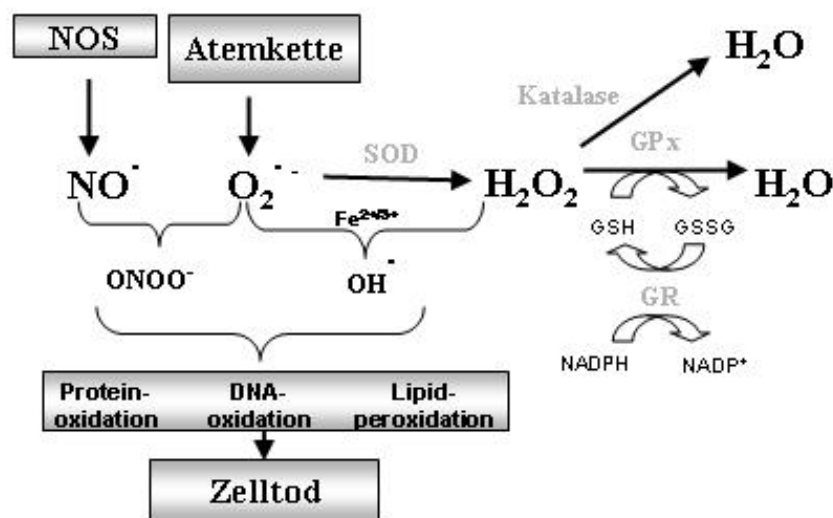


Abbildung 1-15: Aufgaben der antioxidativen Enzyme



### 1.6.2 Nicht-enzymatische Abwehr

Nicht-enzymatische Antioxidantien sind essentiell für den Schutz der Zelle gegen die meisten reaktiven Sauerstoffverbindungen. Ihre antioxidativen Wirkungen können entweder durch chemische Reaktionen der freien Radikale und aktivierten Sauerstoffverbindungen oder durch physikalische „Radikalfänger“ erreicht werden. Durch physikalisches „Abfangen“ der Radikale bleibt die Struktur des Antioxidationsmittels (z. B. des Vitamins) intakt, so dass keine Regenerationsreaktionen nötig werden. Die Kinetik dieser nicht-enzymatischen Reaktionen ist sehr viel höher als die der meisten anderen biologischen Reaktionen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen hydrophilen nicht-enzymatischen Antioxidantien und hydrophoben nicht-enzymatischen Antioxidantien.

Hydrophobe Antioxidantien finden sich in Lipoproteinen und Membranen, wo sie entweder die Lipidperoxidation hemmen, indem sie Peroxidradikale (ROO<sup>•</sup>) zerstören (Halliwell et al., 1993), oder sie blockieren die Hydroperoxidbildung aus Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Zu den hydrophoben Antioxidantien zählen u. a. das Tocopherol, die Carotinoide, und möglicherweise Ubiquinol, die reduzierte Form vom Koenzym Q. Alpha-Tocopherol gilt als wirksamster Peroxid-Radikalfänger in Membranen und in Lipoproteinen (LDL) (Esterbauer et al., 1991). Es entfaltet seine antioxidative Wirkung, indem es z. B. Peroxidradikale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden in Membranen oder in Lipoproteinen reduziert (Abbildung 1-16). Das dabei entstehende Radikal wird anschließend wieder zu Tocopherol reduziert (Chaudiere et al., 1999).  $\alpha$ -Tocopherol ist im Plasma und in roten Blutzellen (Burton et al., 1983) das wichtigste lipidlösliche Antioxidationsmittel, welches Lipide gegen peroxidative Schäden zu schützen vermag.

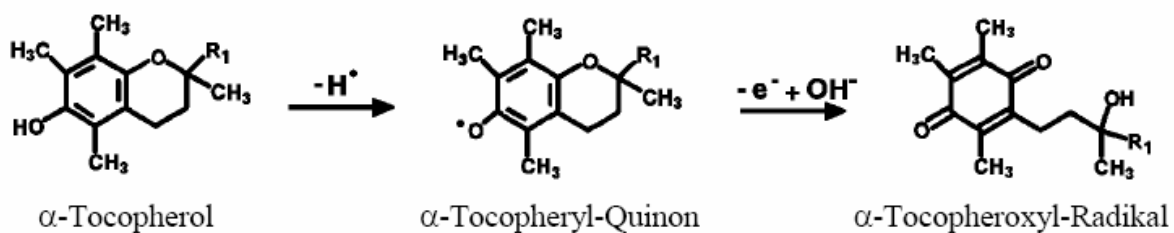


Abbildung 1-16: Abfangen von Lipidperoxidradikalen durch Tocopherol

Unter den hydrophilen Antioxidantien, welche sich im Zytosol, in Mitochondrien und in hydrophilen Kernkompartimenten befinden, gelten Ascorbinsäure und Glutathion als die bedeutendsten natürlichen „Radikalfänger“. Ihre intrazelluläre Konzentration ist sehr viel höher als die der meisten anderen nukleophilen und reduzierenden Biomoleküle und beträgt typischerweise 1 mM bis 10 mM (Chaudiere et al., 1999). Vitamin C ist für den Menschen

essentiell, da er nicht in der Lage ist es selber zu synthetisieren und es eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Reaktionen in der Zelle spielt. Zusätzlich zu seinen antioxidativen Eigenschaften, kann Ascorbinsäure ein „Recycling“ von  $\alpha$ -Tocopherol bewirken (Abbildung 1-17), indem es die radikale Form von  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert (Beyer, 1994).

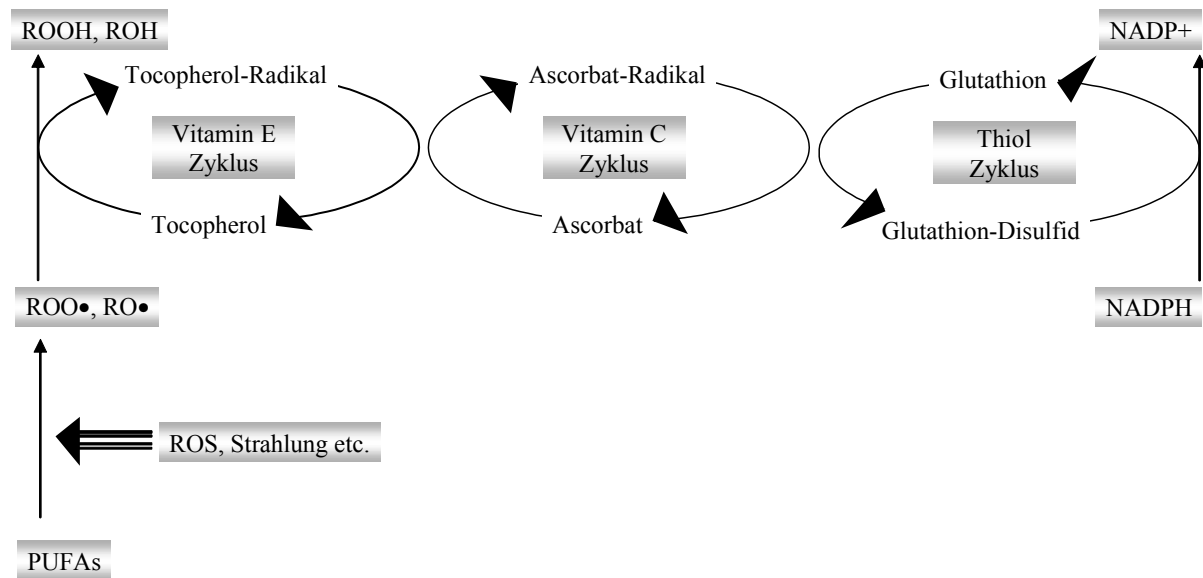


Abbildung 1-17: Recycling von Tocopherol

Die durch die Nahrung aufgenommenen Polyphenole und insbesondere die Flavonoide wirken in der Zelle ebenfalls als Antioxidantien. Sie können also entweder entstandene Radikal abfangen und/oder deren Entstehung verhindern.

## 1.7 Einfluss der Nahrung auf die Gesundheit

Der positive Einfluss einer mediterranen Ernährungsweise auf die Gesundheit hat mehrere mögliche Gründe. Die heutigen Gesellschaften in industrialisierten Nationen zeichnen sich durch eine erhöhte Energiezufuhr und einen verringerten Energieverbrauch, eine erhöhte Aufnahme an gesättigten Fetten wie z.B. *trans*-Fetten und eine verringerte Aufnahme von einfach ungesättigten (n-3)-Fettsäuren, einer verringerten Aufnahme von komplexen Kohlenhydraten und Ballaststoffen, eine Zunahme des Getreideverzehr verknüpft mit einer Abnahme des Obst- und Gemüsekonsums und eine Verringerung der Aufnahme von Proteinen, Antioxidantien und Calcium. Folgen einer so gekennzeichnete Ernährung sind häufig erhöhter Blutdruck und zu hohe Cholesterinwerte. Gerade diese Faktoren sind aber durch eine gezielt ausgewogene Ernährung positiv zu verändern.

Weiterhin wird durch die richtige Ernährung eine schon begonnene Krankheit z.T. wieder regeneriert oder die Alterung lebenswichtiger Organe wie z.B. des Gehirns aufgehalten.

Neben der anticancerogenen, antidiabetischen, antimikrobiellen und vielen anderen Wirkungen ist die antioxidative Wirkung der Mediterranen Diät die am besten untersuchte.

### 1.7.1 Herz-Kreislauf-Krankheiten

Wie unter 1.4.1.1 beschrieben ist eine krankhafte Sklerotisierung der Blutgefäße eine der wichtigsten Voraussetzungen für KHK. Das Ausmaß der Arteriosklerose und der Zeitpunkt, an dem der Betroffene durch gesundheitliche Beschwerden darauf aufmerksam wird, hängen von zusätzlichen Risikofaktoren ab. Dazu gehören vor allem Bluthochdruck, Übergewicht, zu hohe Blutfettspiegel, Zuckerkrankheit und Rauchen. Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen haben nachgewiesen, dass falsche Ernährungsgewohnheiten eine der Hauptursachen für diese Risikofaktoren sind. Dies bedeutet, dass durch eine entsprechende Umstellung der Ernährung die Entstehung einer Arterienverkalkung hinausgezögert oder sogar ganz verhindert werden kann. Im Zusammenhang mit der Ernährung spielen neben den Vitaminen vor allem die Menge und Art der verzehrten Fette eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und das Fortschreiten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die richtige Balance zwischen gesättigten Fettsäuren tierischen Ursprungs und ungesättigten Fettsäuren aus Pflanzen und Fisch gewinnt dabei zunehmend an Bedeutung. Von besonderem Interesse sind die so genannten Omega-3-Fettsäuren. Bereits 1950 stellten Kromann und Green in einer ersten epidemiologischen Studie den positiven Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die kardiovaskuläre Mortalität fest (Kromann et al., 1980). Die Inuit hatten trotz erhöhter Gesamtfettaufnahme eine signifikant niedrigere Rate an akuten Myokardinfarkten. Dies so genannte „Inuit-Paradoxon“ erschien auf den ersten Blick paradox, da Eskimos extrem fettreich essen und wenig frisches Obst und Gemüse zu sich nahmen. Heute ist bekannt, dass der große Anteil an Omega-3-Fettsäuren in der Ernährung der Eskimos für den positiven Effekt verantwortlich war. Sie hatten im Gegensatz zur Kontrollgruppe ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von n-3 zu n-6 Fettsäuren. In einer weiteren Studie wurde der positive Einfluss von Eikosanoiden auf KHK-Risiko untersucht. Die **GISSI-Studie** zeigte bei regelmäßiger Einnahme von einem Gramm Eikosanoiden pro Tag über einen Zeitraum von 3 Jahren, dass sich das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses um 15 % verringerte. Die Mortalität war um 20 % geringer als in der Placebo-Gruppe (Marchioli et al., 2002).

Doch die positiven Wirkungen der Omega-3-Fettsäuren gehen noch über den Schutz von Herz und Gefäßen hinaus. Es ist bekannt, dass sie in der Lage sind die Blutfettwerte deutlich zu

senken. Den größten Einfluss haben sie dabei auf die Triglyceride, aber auch das Gesamtcholesterin wird gesenkt. Dabei wird vor allem das schädlichen LDL-Cholesterin und nicht das schützende HDL-Cholesterin gesenkt (Sanders, 2001). Sogar kurzzeitige Veränderungen des Ernährungsmusters für 8 Wochen zeigten einen positiven Einfluss einer mediterranen Ernährung auf Fett-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-Parameter, die eine Schlüsselfunktion in der Entstehung von Arteriosklerose spielen (Avellone et al., 2003).

In einer Vielzahl von klinischen und epidemiologischen Studien ist der Einfluss einer mediterranen Ernährung auf das KHK-Risiko hinsichtlich Insidenz und Mortalität untersucht worden. Schon seit den 60er Jahren belegen wissenschaftliche Studien, dass sich die mediterranen Völker im Vergleich zu nordeuropäischen Völkern besseren Gesundheitskonditionen erfreuen. Dabei wurden in der prospektiven Sieben Länder Studie (**Seven Countries Study**) 16 verschiedene Kohorten aus sieben verschiedenen Ländern (Italien, Griechenland, USA, Niederlande, Japan, Finnland und dem früheren Jugoslawien) bezüglich ihres Essverhaltens und dem Risiko von koronaren Herzerkrankungen, Krebs oder einigen anderen ernährungsbedingten chronischen Erkrankungen untersucht. Aus anderen Studien war der Zusammenhang zwischen einer traditionellen Ernährung mit gemeinsamen Kennzeichen und einer erhöhten Lebenserwartung bereits bekannt und diese in den mediterranen Ländern weltweit am Höchsten. In der **Lion-Heart-Study**, einer randomisierten Einfachblindstudie zur Sekundärprävention nach Myokardinfarkt, wurde eine Linolensäure-reiche mediterrane Diät über vier Jahre mit einer so genannten „Western-Diet“ verglichen. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der kardialen Mortalität (de Lorgeril et al., 1999). Weiterhin wurde in der **Cardio2000 Study** in Griechenland der Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Obst und Gemüse und dem Risiko an KHK zu erkranken untersucht. Dabei zeigte die Aufnahme von drei Portionen Obst oder Gemüse in der Woche ein 70 %-ig reduziertes KHK-Risiko im Gegensatz zu Menschen, die kein Gemüse verzehrten (Hercberg et al., 2004, Panagiotakos et al., 2003). Diverse Studien beziehen sich auch auf bestimmte Substanzen der mediterranen Ernährung und untersuchen deren positive Einflüsse auf die Gesundheit. Die **Zuphten-Elderly Studie**, die 1985 in Dänemark durchgeführt wurde, zeigte z.B. einen Zusammenhang zwischen Flavonoid-Aufnahme und der KHK-Sterblichkeit. Die Grundaufnahme der 805 Männer zwischen 65 und 84 Jahren betrug 25,9 mg/Tag, wobei Tee und Zwiebeln die Hauptquelle für die sekundären Pflanzenstoffe waren. Die KHK-Mortalität war in dieser Studie signifikant verringert durch höchste Aufnahme von Flavonoiden im Gegensatz zu niedrigem Flavonoidverzehr (Hertog et al., 1993). Auch in finnischen Frauen und Männern wurde ein erniedrigtes Risiko der KHK-Mortalität für eine erhöhte

Flavonoidzufuhr gefunden (Knekt et al., 1996). Dagegen konnte 1986-1990 in einer Studie an männlichen Amerikanern keine signifikante Assoziation zwischen KHK und der Aufnahme von Flavonoiden festgestellt werden (Rimm et al., 1996). Allerdings beeinflusste der Verzehr von Früchten und Gemüse, vor allem grünem Gemüse wie Brokkoli, das KHK-Risiko positiv (Joshiyura et al., 2001). In einer weiteren follow-up-Studie an 3400 postmenopausalen Frauen in Iowa war die Gesamtflavonoid-Aufnahme mit einem verringerten KHK-Risiko verbunden (Yochum et al., 1999). Nach Justierung für Alter und Energieaufnahme war das relative Risiko (RR) für die höchste Flavonoid-Aufnahme 0,62 (95 % CI = 0,44 – 0,87). 2003 haben Huxley und Neil eine Metaanalyse der Studien durchgeführt, die bis 2001 den Zusammenhang zwischen KHK und Flavonoid-Aufnahme untersucht haben. Auch hier war das Ergebnis eine negative Korrelation von KHK und einer vermehrte Flavonoid-Aufnahme (Huxley et al., 2003).

### 1.7.2 Krebs

Der Entstehung von Krebserkrankungen liegen fundamentale biologische Prozesse zugrunde. Diese führen zu einer Entgleisung der Zellvermehrung und haben eine gestörte Funktion der betroffenen Organe zur Folge. Einige Krebsformen haben einen genetisch vererbaren Hintergrund. Den größten Beitrag zur Krebsinzidenz haben aber nach neusten Erkenntnissen verhaltens- und umweltbedingte Faktoren (1999). Schon 1981 haben Doll und Peto in einer Metaanalyse von epidemiologischen Studien die Beteiligung von Ernährung an der Krebsinzidenz untersucht. Sie stellten fest, dass die Ernährung eine ebenso wichtige Rolle wie das Rauchen für die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken spielt und damit zumindest teilweise für ungefähr ein Drittel aller Krebsvorkommen verantwortlich ist (Doll et al., 1981). Unter dem Titel "Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective" haben der World Cancer Research Fund und das American Institute for Cancer Research eine Zusammenfassung und Bewertung des Forschungsstandes zum Thema Ernährung und Krebsvorsorge 1997 veröffentlicht. Danach könnte schätzungsweise 30-40 % der Krebsfälle durch Vermeidung von Übergewicht und eine ausgewogene Ernährung verhindert werden. In Deutschland sterben jährlich etwa 340.000 Menschen an Krebs und über 210.000 Patienten an den Folgen einer Krebserkrankung. Damit Stellen maligne Neubildungen in Deutschland nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Dabei sterben Männer am häufigsten an Lungen- und Frauen an Brustkrebs. Der Einfluss der Ernährung oder

spezieller Nahrungsbestandteile auf das Risiko an Krebs zu erkranken ist in einigen Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen untersucht worden.

Zum Beispiel senkt der Verzehr von Obst und Gemüse nicht das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (van Gils et al., 2005). Dies zeigten neuste Ergebnisse der europaweiten **EPIC-Studie** (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). In der Studie wurde der Einfluss des Obst- und Gemüseverzehr auf das Brustkrebsrisiko bei 285.526 Frauen zwischen 25 und 70 Jahren aus acht von zehn beteiligten europäischen Ländern prospektiv untersucht. Dazu wurden Daten aus Ernährungserhebungen der Jahre 1992-1998 mit dem Auftreten von Brustkrebs bis zum Jahr 2002 ausgewertet. Bis dahin waren 3659 Brustkrebsfälle diagnostiziert worden. Die untersuchten Aufnahmekategorien reichten bei Gemüse von bis zu 110 g/Tag bis über 245 g/Tag und bei Obst von bis zu 115 g/Tag bis über 370 g/Tag. In Deutschland verzehren Frauen im Durchschnitt etwa 200 g Gemüse und 190 g Obst pro Tag (Erhebung des Robert-Koch-Instituts). Allerdings ermittelte die gleiche Studie ein signifikant verringertes Risiko bei hoher Ballaststoffzufuhr an Kolonkarzinomen zu erkranken (Bingham et al., 2003). Dieser Zusammenhang war zwar vermutet worden, konnte aber bis dahin nicht belegt werden. So hatte sich z.B. in der amerikanischen **Nurses Health Study**, einer großen Kohortenstudie mit Frauen, kein protektiver Effekt nach Aufnahme von 25 g Ballaststoffe pro Tag gezeigt (Fuchs et al., 1999). Allerdings war die tägliche Aufnahme der faserreichen Kost in der EPIC Studie mit 32 g wesentlich höher als in der Nurses Health Study. In einer weiteren Studie, die zwischen 1994 und 2002 in Frankreich durchgeführt wurde, senkte eine Supplementation mit niedrig dosierten Antioxidantien das Krebsrisiko zwar in Männern aber nicht in Frauen (Hercberg et al., 2004). Die Teilnehmer erhielten über 7,5 Jahre täglich eine Kapsel mit 120 mg Vitamin C, 30 mg Vitamin E, 6 mg Beta-Karotin, 100 µg Selen und 20 mg Zink.

Bezogen auf Darmkrebs gibt es gesicherte Daten, dass sich neben physischer Aktivität der vermehrte Verzehr von Gemüse bei gleichzeitiger Reduktion von rotem Fleisch präventiv auf das Erkrankungsrisiko auswirkt. Zum Beispiel haben La Vecchia et al. bei der Analyse von Studien, die zwischen 1983 und 1999 in Norditalien durchgeführt worden sind und den Zusammenhang zwischen Obst- und Gemüseverzehr und dem relativen Risiko an Darmkrebs zu erkranken untersucht haben, ein RR von 0.92 (95% CI: 0.8-1.1) für eine mittlere und für die höchste Gemüseaufnahme ein RR von 0.56 (95% CI: 0.5-0.7) im Vergleich zur Kontrollgruppe an Kolonkrebs zu erkranken gefunden. Für das Risiko an Rektalkrebs zu erkranken war das RR in der Gruppe mit mittlerem Gemüseverzehr 0.99 (95% CI: 0.8-1.2) und in der Gruppe mit hohem Gemüsekonsum 0.68 (95% CI: 0.6-0.9) (La Vecchia et al.,

2001). Chen et al. haben in einer Metaanalyse von drei chinesischen Fall-Kontroll-Studien ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Gemüse und Kolonkrebs mit einer OR von 1.86 (95% CI: 1.67-2.07) gefunden (Chen et al., 2003).

Insgesamt kommt es nach den derzeitig vorliegenden Befunden bei der Beeinflussung des Erkrankungsrisikos für Krebs stark auf das Ernährungsmuster, d.h. der Auswahl, Zubereitung und der Menge der Nahrung an. Dabei können sich die positiven gesundheitlichen Effekte einzelner Nahrungsbestandteile addieren. Welches die relevanten Wirkmechanismen beim Menschen sind, ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt.

### 1.7.3 Neuroprotektion durch mediterrane Ernährung

Die verschiedenen Bestandteile einer mediterranen Diät sind ebenfalls auf ihr neuroprotektives Potential hin untersucht worden. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Hinweisen, dass z.B. Flavonoide in der Lage sind ROS-Abwehrreaktionen in verschiedenen Zellmodellen und tierischen Geweben zu ermöglichen. Quercetin und andere strukturverwandte Flavonoide zeigten z.B. einen erhöhten cytoprotektiven Effekt in PC12 Zellen, einem gängigen neuronalen Model, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgesetzt wurden (Dajas et al., 2003). Weiterhin unterdrückte die Zugabe von Flavonoiden oder flavonoidreichen Extrakten in PC12 Zellen den Hydroperoxid-induzierten ROS-Anstieg und führte so zu verbessertem Überleben der Zellen (Horakova et al., 2003, Sasaki et al., 2003). Die Lipidperoxidation konnte in Hirnhomogenaten von Ratten ebenfalls durch die Behandlung mit Flavonoiden signifikant verringert werden (Yoon et al., 2004). Auch *in vivo* konnten die positiven Effekte der Nahrungssubstanzen bestätigt werden. So war das Volumen des Lipidperoxidations-Markers Lipofuscin in erwachsenen Ratten nach chronischer Ethanol-Induktion durch Traubenkern-Flavonoide signifikant erniedrigt (de, V et al., 2004). Eine ebenfalls signifikante Abnahme der ROS-Spiegel beobachteten Joseph et al. im Striatum alter Ratten nach 8-wöchiger Supplementation mit Blaubeer-, Erdbeer- oder Spinatextrakten (Joseph et al., 1999).

Die Abnahme der kognitiven Fähigkeiten ist ein altersbedingter Vorgang und die Hauptkomponente der Demenzerkrankungen. Sie schränkt die Betroffenen häufig extrem in ihrer Möglichkeit unabhängig zu handeln ein. Deswegen sind die Einflüsse bestimmter Nahrungsbestandteile speziell auf die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten untersucht worden. Eine mit bestimmten Fettsäuren supplementierte Nahrung verbesserte z. B. die Maze-Lernfähigkeit alter Mäuse (Lim et al., 2002).

Auch am Menschen sind schon einige *in vivo*-Studien durchgeführt worden. So konnte zum Beispiel in der **Paquid Studie** gezeigt werden, dass die Aufnahme von Flavonoiden mit einer verringerten Wahrscheinlichkeit an Demenz zu erkranken assoziiert ist (Commenges et al., 2000). In der Kohorten Studie wurden 1376 Menschen über 65 Jahre hinsichtlich ihres Flavonoidkonsums befragt und das relative Risiko an Demenz zu erkranken mit Hilfe eines Cox-Modells berechnet. Dabei zeigte sich die Aufnahme von Flavonoiden (14,4 mg/Tag) invers signifikant mit dem Risiko einer Demenz verknüpft. Auch in Italien konnte in einer Studie ein positiver Einfluss zwischen der Aufnahme von MUFAs und kognitiven Fähigkeiten gezeigt werden. Dabei wurde ein signifikant inverser Effekt von MUFA-Aufnahme (> 2400kJ pro Tag; odds ratio 0,69) auf die Mini Mental State Examination (MMSE) und (odds ratio 0,99) auf den Digital Cancellation Test (DCT) beobachtet (Panza et al., 2004). Auch eine andere Longitudinal-Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen dem Ernährungsstatus und kognitiven Fähigkeiten in gesunden älteren Menschen in Mexiko (La Rue et al., 1997).

## 1.8 Novel/Functional Foods

Antioxidantien sind also nicht nur Bestandteile des endogenen Metabolismus, sondern finden sich in Form von Carotinoiden, Flavonoiden, Vitamin E u. a. in verschiedenartigen Nahrungsmitteln. Die protektiven Effekte derartiger Antioxidantien eröffnen die Möglichkeit eines präventiven und therapeutischen Einsatzes der antioxidativen Nahrungsbestandteile (Sies et al., 1995).

Die vorrangige Aufgabe von Nahrung ist es, ausreichend Nährstoffe zu liefern um die Ernährungsbedürfnisse zu befriedigen. Seit ein paar Jahren gibt es zunehmend wissenschaftliche Beweise, die die Hypothese unterstützen, dass einige Nahrungsmittel und Nahrungsmittelbestandteile einen zusätzlichen nützlichen physiologischen und psychologischen Effekt haben, der über die reine Versorgung des Körpers mit Grundnährstoffen hinausgeht. Die Ernährungswissenschaft ist in jüngster Zeit von dem klassischen Konzept, Nahrungsdefizite zu vermeiden und eine grundlegende Angemessenheit der Ernährung zu empfehlen, abgerückt und verfolgt Konzepte einer "positiven" oder "optimalen" Ernährung. Der Forschungsschwerpunkt hat sich mehr auf die Identifikation biologisch aktiver Nahrungsmittelbestandteile verlagert, die das Potenzial haben, körperliches und geistiges Wohlbefinden zu optimieren und das Krankheitsrisiko zu minimieren. Es wurde herausgefunden, dass viele traditionelle Nahrungsmittelprodukte, einschließlich Früchten, Gemüse, Soja, Vollkorngetreide und Milch, Bestandteile enthalten, die möglicherweise gesundheitliche Vorteile bieten. Zusätzlich zu diesen Lebensmitteln wurden neue Stoffe



entwickelt, um Anteile gesundheitlicher Inhaltsstoffe zu vergrößern und auf diese Weise gesundheitliche Vorteile zu vermehren oder einen erwünschten physiologischen Effekt zu erzielen. Diese Lebensmittel werden „Novel oder Functional Foods“ genannt und lassen sich weiterhin in Supplements und Nutraceuticals untergliedern. Hier gibt es jedoch einige Schwierigkeiten mit den unterschiedlichen Begrifflichkeiten und den gesetzlichen Vorgaben, wie diese Präparate beworben werden dürfen und was sie enthalten müssen oder dürfen. Unterschiedlich zu traditionellen Lebensmitteln sind Nahrungsergänzungsmittel nicht für die normale Ernährung oder den Genuss gedacht, sondern können nur zusätzlich zur normalen Nahrung konsumiert werden. Weiterhin müssen diese Produkte zumindest in Deutschland ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen darstellen, welches ernährungsspezifische oder physiologische Wirkung zeigt. Zusätzlich müssen sie in dosierter Form in den Handel gebracht werden (Glökler, 2004).

Zusätzlich zum erhöhten Interesse der Bevölkerung an einer gesunden Ernährung weisen auch demografische Trends in der Bevölkerung und sozioökonomische Veränderungen auf die Notwendigkeit hin, Nahrungsmittel mit einem zusätzlichen Gesundheitsnutzen zu versehen. Der Anstieg der Lebenserwartung, der eine steigende Anzahl älterer Menschen nach sich zieht und deren Wunsch nach einer verbesserten Lebensqualität, aber auch die ansteigenden Kosten der Gesundheitsvorsorge haben die Regierungen, Forscher, Gesundheitsberufe und die Nahrungsmittelindustrie angespornt, darauf zu achten, diese Veränderungen möglichst wirkungsvoll zu bewerkstelligen. Schon heute gibt es ein großes Sortiment an Lebensmitteln, die für den Konsumenten in Form von Kapseln, Tabletten, Pillen oder als Zusätze z.B. in Joghurts (Pro- und Prebiotika) verfügbar sind. Jetzt besteht die Notwendigkeit, jene funktionellen Lebensmittel zu identifizieren, die wirklich das Potential haben, die Gesundheit und das Wohlbefinden zu verbessern und das Risiko bzw. die Entstehung bedeutender Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Osteoporose zu verhindern oder zu verzögern. In Verbindung mit einem gesunden Lebensstil können funktionelle Lebensmittel einen positiven Beitrag zu Gesundheit und Wohlbefinden leisten.

Im Hinblick auf die immer besser werdende Versorgung der Bevölkerung mit frischem Obst und Gemüse ist laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DFG) eine über den Bedarf hinausgehende Aufnahme von Vitaminen und Mineralstoffen nicht mit einem zusätzlichen gesundheitlichen Nutzen verbunden. Die Zufuhr von lebenswichtigen Nahrungsinhaltsstoffen ist bei einer ausgewogenen und abwechslungsreichen Ernährung für einen gesunden Menschen in der Regel ausreichend. Bei bestimmten Personengruppen wie beispielsweise

Schwangeren, stillenden Müttern und älteren Menschen wird eine Nahrungsergänzung hingegen empfohlen.

### **1.8.1 Supplements (Nahrungsergänzungsmittel)**

Laut DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act) ist ein Supplement ein Produkt, welches die Ernährung durch einen der folgenden Inhaltsstoffe ergänzt und mindestens einen oder mehrere enthält: Vitamine, Mineralien, Kräuter oder Gewürze, Aminosäuren oder Konzentrate, Metabolite, Extrakte oder die Kombination dieser Substanzen zur Erhöhung der täglichen Aufnahme. Weiterhin sind Supplemente zur Aufnahme in Form von Kapseln, Pillen, Tabletten oder in flüssiger Form gedacht und dürfen nicht als konventionelle Nahrung oder einzigen Bestandteil einer Mahlzeit dienen (Kalra, 2003).

### **1.8.2 Nutraceuticals**

Der Begriff Nutraceutical wurde ca. 1989 von Dr. Stephan DeFelice (Brower, 1998) geprägt und setzt sich aus den englischen Worten nutrition (Ernährung) und pharmaceutical (pharmazeutisch) zusammen. Gemäß DeFelice wurde der Terminus wie folgt definiert: Ein Nutraceutical ist jede Substanz, die entweder ein Nahrungsmittel oder Teil eines solchen ist und dessen Einnahme entweder medizinischen oder gesundheitlichen Nutzen bringt, wozu auch die Verhinderung oder Behandlung von Krankheiten gehört. Ein Nutraceutical unterscheidet sich also von einem Supplement dadurch, dass es die Ernährung nicht nur ergänzen soll, sondern auch bei der Verhinderung und Behandlung von Krankheiten helfen soll. Beispiele sind z.B. Pflanzenhormone, die das Immunsystem stärken sollen oder Bakterienkulturen, die Krebs verhindern sollen.

Generell bieten funktionelle Lebensmittel folglich ein großes Potential, die Gesundheit zu verbessern und/oder bestimmte Krankheiten vorzubeugen, wenn sie als Teil einer ausgewogenen Ernährung und eines gesunden Lebensstils verwendet werden. Da die Erforschung der Beziehung eines Lebensmittels oder eines Lebensmittelbestandteils und einem verbesserten Gesundheitszustand oder der Verringerung einer Krankheit eine große Herausforderung für die Wissenschaft ist, muss auf diesem Gebiet noch viel Grundlagen- und spezielle Forschung getätigt werden.

### 1.8.3 Ernährungswissenschaft und Pharmakologie

Nahrungsergänzungsmittel haben eine Berechtigung, wenn sie helfen, Ernährungsfehler zu korrigieren oder wenn sie präventiv wirksam sind. Dazu sind klare gesetzliche Regelungen notwendig und die Qualität der Produkte sollte definiert sein. Zusätzlich sollte der Konsum der Produkte unbedenklich sein und die Aussagen der Produkte hinsichtlich der gesundheitsverbessernden Wirkung wissenschaftlich belegt sein. Die Frage nach der richtigen Dosierung von Nahrungsergänzungsmitteln ist abhängig von der Fragestellung. Je nach dem, ob das Ziel eine Mangelvermeidung, eine optimale Funktion des Organismus, eine Reduktion von Risikofaktoren oder die Krankheitsminimierung selbst ist, muss die tägliche Zufuhr des Nährstoffes variiert werden. In Abbildung 1-18 ist eine Dosis-Wirkungskurve von Nährstoffen gezeigt. Dabei stellt die halbmaximale Wirkung einen Zustand frei von Mangelerscheinungen und voller Leistungsfähigkeit dar. Alle Wirkungen, die oberhalb dieses Bereiches liegen, lassen sich besser als Pharmakotherapie beschreiben. Dabei darf eine strikte Abgrenzung zu Arzneimitteln, ob nun freiverkäuflich oder apothekenpflichtig nicht vergessen werden, was in vielen Fällen schwierig umzusetzen ist, da Nahrungsmittel ebenfalls positiven Einfluss auf die Gesundheit haben können und es so zu einer Überlappung der Begrifflichkeiten kommen kann.

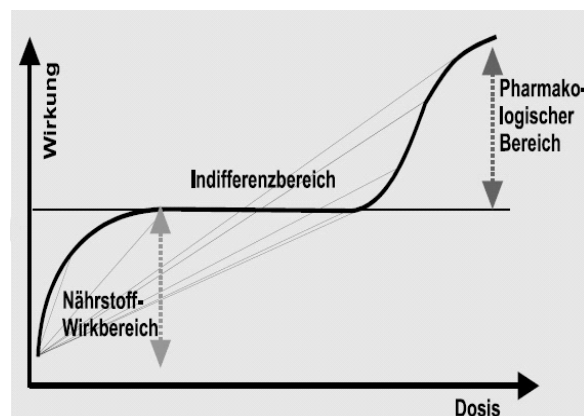


Abbildung 1-18: Dosis-Wirkungskurve von Nährstoffen

## 2 Zielsetzung

In den mediterranen Ländern ist der Konsum von Gemüse und Obst generell höher als in den meisten Europäischen Ländern und den USA. Voran gegangene Studien der mediterranen Ernährungsweise haben zu einem guten Verständnis der biochemischen Mechanismen und der auf die Gesundheit positiven Wirkweise geführt. Diese vorteilhaften Effekte werden speziellen Gruppen von natürlichen Produkten zugeschrieben. Dennoch ist eher wenig über die Rolle der lokalen Nahrungsprodukte wie z.B. saisonelle Gemüse hinsichtlich ihres Beitrags zur Gesundheit bekannt. 2002 wurde daher ein Konsortium aus sieben Forschungsgruppen gegründet, das dieser Fragestellung in einem von der EU geförderten Projekt mit dem Namen „Local Food Nutraceuticals“ nachgehen sollte. Die Aufgabe bestand darin, Pflanzen, die traditionell in ländlichen Gebieten Italiens, Spaniens und Griechenlands konsumiert werden, zu identifizieren und hinsichtlich ihrer für die Gesundheit förderlichen Aktivitäten zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es, durch *in vitro*-Screenings aller identifizierten und extrahierten Pflanzenextrakte und durch den Vergleich mit ebenfalls kompletten Screenings der anderen beteiligten pharmakologischen Gruppen solche Extrakte zu finden, die ein mögliches Potential als Nutraceutical aufweisen und diese dann *in vivo* weiter zu charakterisieren. Dazu wurden durch pharmakologische Tests die Zahl der interessanten Extrakte zunächst eingegrenzt und mit den drei aus diesem Vorgehen resultierenden Extrakten zwei *in vivo* Fütterungsstudien über jeweils 3 Monate an weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Zur Identifikation eventueller Altersunterschiede wurden zwei verschiedene Alterstufen eingesetzt. Es dienten zum Ende der Studien 6 Monate alte Tiere als Modell für junge Tiere und 21 Monate alte Mäuse als Modell für alte Tiere.

Die Extrakte wurden im Verlauf des Projektes hinsichtlich ihres Potentials untersucht, die Lipidperoxidation und eine Rigidisierung der Zellmembranen zu verhindern, die Bildung cytosolischer und mitochondrialer ROS zu unterbinden, die NO-Spiegel zu beeinflussen, Auswirkungen auf das mitochondriale membranpotential zu besitzen, antioxidative Enzymreaktionen zu fördern und oxidative DNA- und Protein-Schädigung zu verringern.

### **3 Material und Methoden**

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Materialien

Combitips plus®, versch. Größen, VWR International, Darmstadt  
Einmalküvetten, Plastibrand®, VWR, Darmstadt  
Eismaschine Ziegler, Bader, Frankfurt  
Falcons, Polypropylen, 15 und 50 ml, Firma Greiner, Frickhausen  
Feinwaage, AB204, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz  
Fluoreszenzspektrometer SLM Aminco Bowman II, Firma SLM Instruments, Urbana, USA  
Free System, Firma EuroMedix, Heustenstamm  
Gelelektrophorese System, Invitrogen, Karlsruhe  
Glasreagenzgläser mit Schraubverschluß  
Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences, Freiburg  
Kühlschrank, (4-8°C), Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen  
Kühlzentrifuge Model J2-21 mit JA-20 oder JA-20.1 Rotor, Firma Beckman, München  
Microliter Syringe, Glas, 50 µl, Hamilton, Bonaduz, Schweiz  
Mikro-Kühlzentrifuge, Mikrofuge B, Firma Beckmann, München  
Mikrotiterplatten unsteril (96-well), Firma Greiner, Frickhausen  
Mikrotiterplatten Photometer, Modell Digiscan, Firma Asys Hightech, Eugendorf  
Mikrotiterplatten steril (48-well), Firma Greiner, Frickhausen  
Mikrotiterplattenreader, Wallace 1420 Victor® Multilabel Counter, Perkin Elmer, Rodgau  
Milliporesystem, Milli Q Plus PF, Millipore, Eschborn  
Multipette, Firma Eppendorf, Hamburg  
Nitrocellulosemembrane Hybond ECL, Amersham Biosciences, Freiburg  
Orbitalschüttler, Promax 1020, Firma Heidolph, Kelkheim  
Parafilm®, Firma Roth, Karlsruhe  
pH-Meter, Modell Multical® pH 526, WTW, Weilheim  
Photometer, Genesys 5 Spectrometer, Sctronic Instruments Inc., Rochester, USA  
Pipetten, verschiedene Modelle, Firma Gilson,  
Pipettenspitzen, versch. Größen, Greiner, Frickhausen  
Potter, Galshomogenisator mit Teflonpistill, Firma Braun, Melsungen  
PVDF Membran, Hybond-P 0,45 µM, Amersham Biosciences, Freiburg  
Quarzküvetten, Hellma GmbH&Co KG, Müllheim  
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml, Firma Greiner, Frickhausen  
Schüttler, IKA HS 250 basic, IKA Labortechnik, Staufen  
Spektralphotometer, U-2000, Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan  
Tiefkühltruhe (-20°C), Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen  
Tiefkühltruhe (-80°C), Heraeus Instruments, Hanau  
Transferpetten Modell 10-100 µl und 100-300 µl, Firma Brand, Wertheim  
Ultraschallbad, Sonorex RK105H, Firma Bandelin, Berlin  
Ultra-Turrax, Modell T25, Firma Janke und Kunkel GmbH, Staufen  
Vortexer, Modell REAX 2000, Heidolph, Kelkheim  
Wasserbad, Modell GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
Zentrifuge für Mikrotiterplatten und Falcons, GS-6R, Beckman, München

### 3.1.2 Chemikalien

Natriumacetat	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eisen(III)chlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
4,5-Diamminofluorescein-diacetat	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Dihydrorhodamin123	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Dimethylsulfoxid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Diphenylhexatrien	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
EDTA	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eisen(II)sulfat	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	VWR International, Darmstadt, Deutschland
HBSS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DEPPD	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ABTS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Methansulfonsäure	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Glucose	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Trolox	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIS	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Quercetin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rhodamin 123	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Magnesiumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1N	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Tert. Butylhydroperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders spezifiziert im analytischen Reinheitsgrad verwendet.



### 3.1.3 Puffer, Lösungen und Kits

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reagenzien in analytischer Reinheit und gereinigtem Wasser (Millipore Milli-QPlus) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer Einstabmeßkette eingestellt. Das pH-Meter wurde in regelmäßigen Abständen neu kalibriert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist bei den einzelnen Methoden oder im Folgenden beschrieben.

#### *Allgemeine Puffer und Lösungen:*

TRIS-Puffer (pH 7,4): 20 mM TRIS  
pH mit HCl eingestellt

#### *Puffer und Lösungen für Versuche mit dissoziierten Neuronen*

Medium I (pH 7,35): 138 mM NaCl  
5,4 mM KCl  
0,17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5 mM Glucose  
58,4 mM Saccharose

Medium II (pH 7,4): 110 mM NaCl  
5,3 mM KCl  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM Glucose  
70 mM Saccharose  
20 mM HEPES

Medium III (pH 7,4): 110 mM NaCl  
5,3 mM KCl  
1,8 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM Glucose

	40 mM Saccharose
	20 mM Hepes
	2 mM L-Glutamin
<u>HBSS (pH 7,4 Pulver):</u>	6 mM Glucose
In 1 L H <sub>2</sub> O gelöst	1 mM MgSO <sub>4</sub>
	137 mM NaCl
	5 mM KCl
	0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
unter Zusatz von:	0,1 mM CaCl <sub>2</sub> (Dihydrat)
	1 mM MgSO <sub>4</sub> (Hexahydrat)
	10 mM HEPES

### *Puffer und Lösungen für die Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Spiegel*

Acetatpuffer: 130 mM NaCl (3,8g/500ml Dest. Wasser)  
10 mM Na Acetat (410 mg/500 ml)  
290 mM Eisessig (10 mM (290 µl) in 500 ml)

FeSO<sub>4</sub>-Lösung: 2,8 mM Eisensulfat in Wasser  
(38 mg in 50 ml)

DEPPD-Lösung: 3,7 mM DEPPH in Wasser  
(30,4 mg in 50 ml)

BHP-Lösung: 3,3 mM in Acetatpuffer  
(1:2212,243)

### *Gele und Lösungen für Elektrophorese-Technik*

12%ige Acrylamidgele	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lauf-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***Puffer und Lösungen für Western Blot-Technik***

Transfer-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TBS-T	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchlösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau Rot-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SimplyBlue Safestain	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

***Kits***

Cellular Glutathion Peroxidase Assay Kit	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Glutathion Reductase Assay Kit	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Lipid Peroxidation Assay Kit	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Superoxide Dismutase Kit	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon, Boronia, Australien
8-OHdG ELISA Kit	Genox Corporation, Baltimore
Protein Carbonyl Enzyme Immuno-Assay KIT	Zentech, Dunedin, Neuseeland
D <sub>C</sub> Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

**3.1.4 Tiere**

Weibliche NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäuse wurden bei der Firma Harlan & Winkelmann (Borchen, Deutschland) gekauft und bis zum Erreichen des adäquaten Alters im Tierstall des Pharmakologischen Institutes gehalten. Die Haltung erfolgte in Altromin Käfigen und die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter bei konstanter Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 25°C. Der Hell/Dunkelzyklus erfolgte im 12-stunden-Rhythmus

**3.1.4.1 Fütterungsstudien**

Es wurden zwei jeweils dreimonatige (90 Tage) Fütterungen mit weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Dabei wurden drei, durch Vorversuche getestete und durch Vergleich mit den Ergebnissen der anderen teilnehmenden Partner des EU-Projektes bestimmte, mediterrane Pflanzenextrakte in Pellets gepresst und gefüttert. Die tägliche Futtermenge von 5 g wurde ebenso wie ein durchschnittliches Gewicht von 32 g für 3 Monate alte und ein Gewicht von

ca. 50 g für 21 Monate alte Tiere vor Versuchsbeginn bestimmt und die Extraktaufnahme mit 100 mg Extrakt pro kg Körpergewicht pro Tag festgelegt. Die für alte und junge Tiere unterschiedlich konzentrierten Futterpellets wurden bei der ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) hergestellt und gekauft.

### **Fütterungsstudie I**

Fütterungsperiode: 90 Tage (3 Monate)

Extraktkonzentration: 100 mg Extrakt/kg KG · d

Parameter: Lipidperoxidation, antioxidative Enzyme, HPO

	<b>18 Monate (alt)</b>	<b>3 Monate (jung)</b>
<b>Extrakt 1020</b>	8	8
<b>Extrakt 1014</b>	8	8
<b>Extrakt 2025</b>	8	8
<b>Kontrolle</b>	8	8

Tabelle 3-1: Anzahl der Tiere in Fütterungsstudie

### **Fütterungsstudie II**

Fütterungsperiode: 90 Tage (3 Monate)

Extraktkonzentration: 100 mg Extrakt/kg KG · d

Parameter: ROS, Membranpotentialveränderungen, NO-Spiegel, TEAC, oxidative Protein- und DNA-Modifikationen, Oxi Adsorbent Test

	<b>18 Monate (alt)</b>	<b>3 Monate (jung)</b>
<b>Extrakt 1020</b>	10	8
<b>Extrakt 1014</b>	10	8
<b>Extrakt 2025</b>	10	8
<b>Kontrolle</b>	10	10

Tabelle 3-2: Anzahl der Tiere in Fütterungsstudie II

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparationen und Gewebeaufarbeitungen für *in vitro* Tests

#### 3.2.1.1 Gewebeaufarbeitung zur Bestimmung der Lipidperoxidation und der Membranfluidität im Gehirn von NMRI Mäusen (*in vitro*)

Junge (2-3 Monate), weibliche Mäuse wurden zervikal überstreckt und anschließend dekapitiert. Das Cerebellum und der Hirnstamm wurden nach der Entnahme des Hirns auf Eis entfernt und das Cerebrum sofort weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der Lipidperoxidation und der Membranfluidität aus einem Ansatz (Vorversuche) wurden die bekannten Methoden der Gewinnung der Crude Fraction für die Malondialdehyd (MDA) -Messung und die Aufarbeitung zur Bestimmung der Membranfluidität (Anisotropie) kombiniert. Jeweils 3 der wie oben beschrieben präparierten Hirne wurden mit 6 ml eiskaltem TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) gepottert und a 1 ml in verschließbare Glasröhrchen aliquotiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Extrakten, Puffer als Leerwert und den Stressoren (1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 150 µM FeCl<sub>3</sub>) im Wasserbad bei 37°C für 4 Stunden. Nach der Inkubation wurden 700 µl der Proben für die MDA- und HNE-Messung abgenommen und bei 3000 g für 10 Minuten in einer gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Vom Überstand werden jeweils 200 µl pro Probe pro Test benötigt und bei -20 °C eingefroren.

Das Pellet wurde resuspendiert und mit dem Rest der Inkubationsproben bei 20.000 U/min für 20 Minuten in einer gekühlten Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurde nach Zugabe von 6 ml TRIS-Puffer mittels Ultraturrax homogenisiert und jeweils 50 µl für die Proteinbestimmung abgenommen. Nachfolgend wurde erneut für 20 Minuten bei 20.000 U/min zentrifugiert und die Pellets für die Anisotropiebestimmung mittels Diphenylhexatrien (DPH)-Bestimmung bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.1.2 Präparation der dissoziierten Neuronen zur Bestimmung der Reaktiven Sauerstoff Spezies (*in vitro*)

Um dynamische Prozesse wie die ROS-Messung zu determinieren wurden lebende Zellen (dissoziierte Neuronen) benötigt. Dazu wurde eine Präparation nach Stoll (Stoll et al., 1992) durchgeführt, wobei das entnommene Hirn in ca. 5 ml eiskaltem Medium I gewaschen und in einem Becherglas mit 2 ml Medium I mittels eines Skalpell grob zerkleinert wurde. Nach der

Überführung in ein vorgekühltes Zentrifugenglas wurde das Gewebe mit einer Einmal-1ml-Pasteurpipette 20-mal aufgezogen. Dabei wurde die Entstehung von Luftblasen vermieden. Der Schritt wurde nach Zugabe von weiteren 2 ml Medium I wiederholt, wodurch die Dissoziation der Zellen erfolgte. Die Zellsuspension wurde durch Filtration durch zwei Siebe mit unterschiedlichen Maschengrößen (200 µm und 102 µm) weiter dissoziiert und in 16 ml Medium I überführt. Die Lösung mit einem Endvolumen von 20 ml wurde anschließend bei 500 g (2000 U/min) für 3 Minuten in einer gekühlten Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml kaltem Medium II resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und das letzte Pellet entsprechend der Messmethode in Medium III aufgenommen und in 4,6 ml Medium III (37°C) resuspendiert. Die Proben wurden nun zu 0,8 ml in sechs im Wasserbad vorgewärmten Glasröhrchen aliquotiert und zur ROS-Bestimmung der mitochondrialen und cytosolischen ROS mittels Dihydrorhodamin 123 (DHR) und Dichlorofluorescein Diacetat (DCFH-DA) bzw. zur Detektion der Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential und der NO-Spiegel der Zellen verwendet (LeBel et al., 1992, Oyama et al., 1994, Rothe et al., 1988).

### **3.2.2 Bestimmung antioxidativer Parameter in vitro**

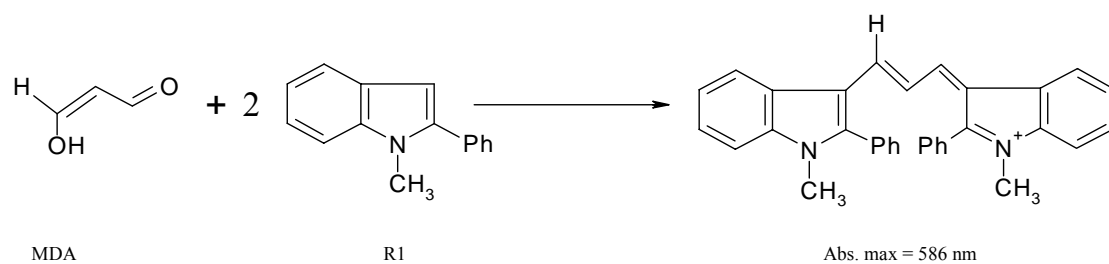
#### **3.2.2.1 Bestimmung der Lipidperoxidation aus Hirnhomogenaten junger NMRI Mäuse (in vitro)**

Der Begriff Lipidperoxidation steht für einen Mechanismus der zellulären Zerstörung der sowohl in Pflanzenzellen also auch in tierischen Zellen festzustellen ist. Es handelt sich hierbei um den radikalischen Angriff von freien Radikalen auf die Zellmembranen, wobei mehrfach ungesättigte Fettsäuremoleküle und deren Ester aufoxidiert werden. Im Verlauf dieses Prozesses entstehen Lipidperoxide, die weiter zu Endprodukten wie z.B. Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2(E)nonenal (HNE) zerfallen. Hierdurch werden die Fettmoleküle der Membranen angegriffen, was schließlich zum Verlust von Funktion und Integrität führt.

Zur Messung der Lipidperoxidation werden in der Regel die oben genannten niedermolekularen Verbindungen MDA und/oder HNE auf unterschiedliche Weise bestimmt. Da die klassische Detektionsmethode der Thiobarbitursäuretest durch eine Vielzahl von Substanzen und hohen Reaktionstemperaturen gestört wird, wurde hier eine neuere, modifizierte kolorimetrische Methode zur Bestimmung der MDA-Level gewählt.

**3.2.2.1.1 Malondialdehyd**

Für diese Nachweismethode wurde das Lipid Peroxidation Assay Kit der Firma Calbiochem (San Diego, CA, USA) genutzt, welches die spektrometrisch detektierbare Umsetzung eines Reagenz (R1) mit MDA zum blauen Endprodukte bei 45°C nutzt (Esterbauer et al., 1990). Dabei reagiert 1 Molekül MDA in Anwesenheit von HCl mit 2 R1-Molekülen zu einem stabilen Chromophor mit einer maximalen Absorption bei 586 nm. Ebenfalls in der Probe enthaltenes HNE wird in Anwesenheit von HCl auf Grund von irreversibler Cyclisierung des HNEs nicht detektiert (Gerard-Monnier et al., 1998).



**Abbildung 3-1: MDA Reaktion mit R1-Molekül zum detektierbaren Chromogen**

**Gebrauchslösungen (Kit):**

MDA-Standard: 1:100 mit TRIS-Puffer verdünnt

R1-Lösung: (N-methyl-2-phenylindol):  
1:4 mit Methanol verdünnt

Verdünnungs-Lösung für R1: Methanol mit Eisen-Ionen

**Gebrauchslösungen zusätzlich zum Kit:**

TRIS-Puffer

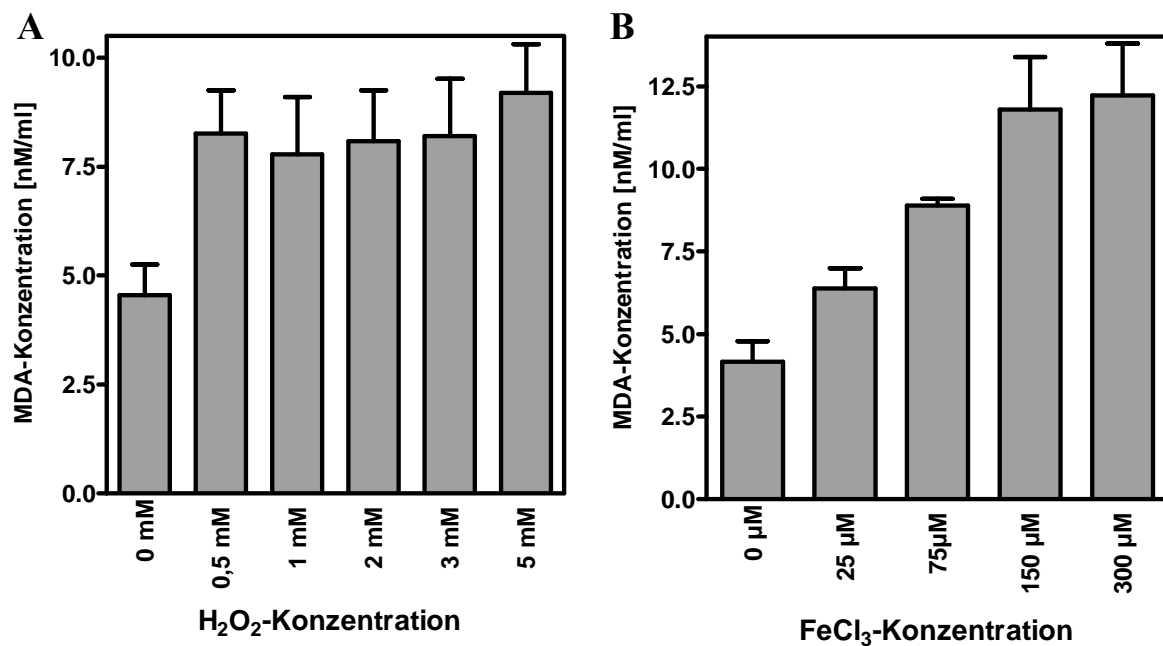
**Durchführung**

Dazu wurden 200 µl Probe (Aufarbeitung siehe 3.2.1.1) bzw. Standardlösung in verschließbare Glasröhrchen überführt und mit 650 µl R1 versetzt. Anschließend wurden jeweils 150 µl HCl (konz.) zugegeben und für eine Stunde bei 45°C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Wärmebehandlung wurden die Proben zur Entfernung der Trübung bei 15000 g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgläser überführt.

Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette mit 10 mm Schichtdicke und einem Volumen von 1 ml bei 586 nm. Der Nullabgleich erfolgte mit TRIS-Puffer und die qualitative Bestimmung der MDA-Werte anhand einer mitgeführten Standardreihe mit Konzentrationen von 0 bis 20 µM MDA. Nach Standardreihe wurden die Proben in aufsteigender und absteigender Reihenfolge gemessen, um den Zeitfaktor zu minimieren.

Die Absorptionen wurden gemittelt und die Konzentration an MDA an Hand der Standardgerade ermittelt. Anschließend wurden die Werte in einer GraphPad Prism (Version 3.0) Tabelle gegen die eingesetzten Extrakt- bzw. Antioxidanzkonzentrationen aufgetragen und graphisch ausgewertet.



**Abbildung 3-2: Bestimmung des MDA-Gehaltes [nM/ml] bei unterschiedlichen Stressoren und unterschiedlichen Stressorkonzentrationen im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate).**

- a) MDA-Messung mit unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Mittelwert und SEM.  
b) MDA-Messung mit unterschiedlichen FeCl<sub>3</sub>-Konzentrationen. Mittelwert und SEM.



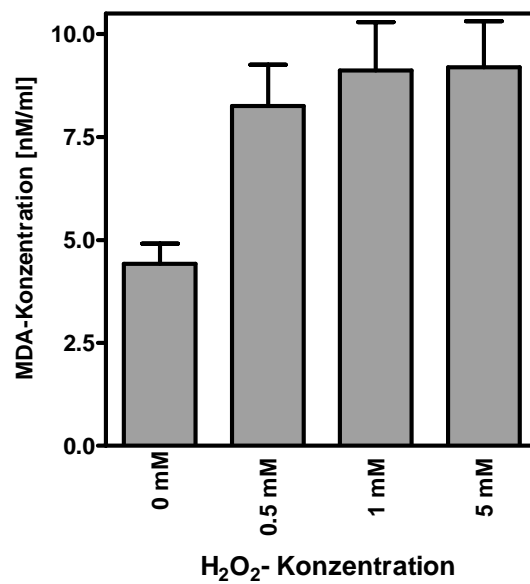


Abbildung 3-3: MDA-Gehalt [nm/ml] bei verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen und einer FeCl<sub>3</sub>-Konzentration von 150 µM im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate).

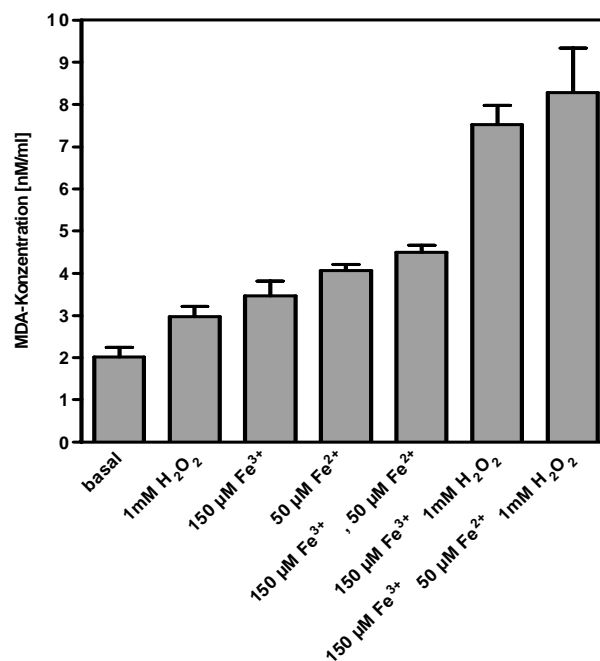


Abbildung 3-4: Vergleich der MDA-Ergebnisse bei Bestimmung mittels Fenton-Reagenz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>2+</sup>), dessen Einzelkomponenten und den von uns gewählten Stressoren (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>3+</sup>) im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate). Balken zeigen Ergebnisse aus 6 einzelnen Versuchen und SEM.

In der Literatur (Braugher et al., 1986) wurde die Kombination von Eisen-2 und Eisen-3-Ionen mit Wasserstoffperoxid als Mittel der Wahl dargestellt. Deshalb wurde noch ein Vergleich der von uns gewählten Stressorenkombination gegen das Fenton Reagenz und die oben genannte Kombination beider Eisenionen durchgeführt. Wie in Abbildung 3-4 zu erkennen ist, gab es keinen nennenswerten Unterschied zwischen unseren Stressoren und den beiden anderen Kombinationen. In den folgenden Versuchen wurde die Kombination aus Wasserstoffperoxid und Eisenchlorid eingesetzt.

### 3.2.2.1.2 4-Hydroxynonenal

Das Lipid Peroxidation Assay Kit der Firma Calbiochem (San Diego, CA, USA) wurde zusätzlich genutzt, um neben den MDA- auch die HNE-Level zu detektieren. In Anwesenheit von Methansulfonsäure reagieren sowohl MDA als HNE mit Reagenz R1 bei 45°C zum rötlich-voioletten Endprodukt, welches ebenfalls spektrometrisch detektiert werden kann. Dabei reagiert 1 Molekül HNE mit 2 R1-Molekülen zu einem stabilen Chromophor mit einer maximalen Absorption bei 586 nm. Die Absorptionen wurden gemittelt und die HNE- und MDA-Konzentration an Hand der Standardgerade ermittelt. Die Konzentration an MDA, die alleinig im vorangegangenen Versuch bestimmt worden war, wurde zur Berechnung der HNE-Konzentration von den erhaltenen Werten subtrahiert. Anschließend wurden die Werte in einer GraphPad Prism (Version 3.0) Tabelle gegen die eingesetzten Extrakt- bzw. Antioxidanzkonzentrationen aufgetragen und graphisch ausgewertet.

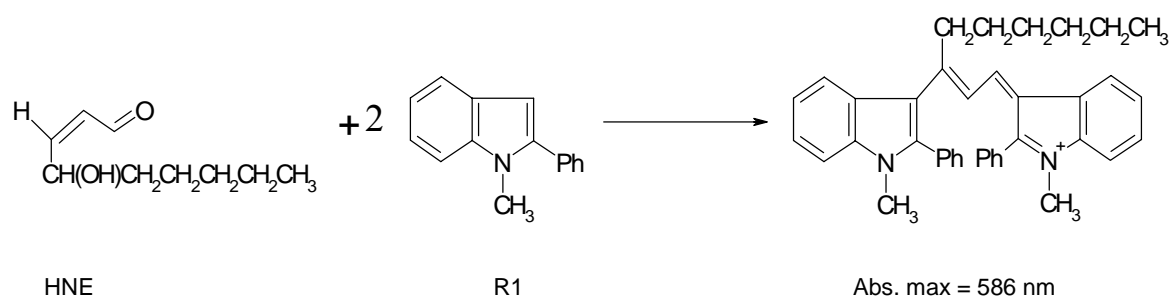


Abbildung 3-5: HNE-Reaktion mit 2 Molekülen Indol zum photometrisch detektierbaren Chromophor.

**Gebrauchslösungen (Kit):**

MDA-Standard: 1:100 mit TRIS-Puffer verdünnt

HNE-Standard: 1:100 mit TRIS-Puffer verdünnt

R1-Lösung: (N-methyl-2-phenylindol):  
1:4 mit Methanol verdünnt

Verdünnungs-Lösung für R1: Methanol mit Eisenionen

R2-Lösung: Methansulfonsäure

**Gebrauchslösungen zusätzlich zum Kit:**

TRIS-Puffer

**Durchführung**

200 µl Probe (Aufarbeitung siehe 3.2.1.1) bzw. Standardlösung wurden in verschließbare Glasröhrchen überführt und mit 650 µl R1 versetzt. Anschließend wurden jeweils 150 µl R2 zugegeben und für eine Stunde bei 45°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Wärmebehandlung wurden die Proben zur Entfernung der Trübung bei 15000 g bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt.

Die Messung erfolgte in einer Glasküvette mit 10 mm Schichtdicke und einem Volumen von 1 ml bei 586 nm. Der Nullabgleich erfolgte mit TRIS-Puffer und die qualitative Bestimmung der HNE-Werte anhand einer mitgeführten Standardreihe mit Konzentrationen von 0 bis 20 µM HNE. Nach Standardreihe wurden die Proben in aufsteigender und absteigender Reihenfolge gemessen, um den Zeitfaktor zu minimieren.

Die Absorptionen wurden gemittelt und durch die Steigung der Standardgerade geteilt. Um die Konzentration an HNE zu erhalten, wurden die für die MDA-Konzentration ermittelten Werte subtrahiert. Anschließend wurden die Werte in einer GraphPad Prism (Version 3.0) Tabelle gegen die eingesetzten Extrakt- bzw. Antioxidanzkonzentrationen aufgetragen und graphisch ausgewertet.

### 3.2.2.2 Bestimmung der Membranfluidität als Anisotropie

Nach dem bekannten Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson sind biologische Membranen keine starren Körper, sondern besitzen fluide Eigenschaften (Singer et al., 1972b). Das bedeutet, dass sich Lipidmoleküle lateral in diesen zweidimensionalen Flüssigkeiten bewegen können. Die Fluidität von Membranen ist physiologisch von großer Wichtigkeit, da sie eine entscheidende Rolle bei Fusionsvorgängen wie z.B. Endozytose spielt. Weiterhin ist eine Beweglichkeit von in die Membran eingelagerten Proteinen z.B. bei der Signaltransduktion bedeutsam, wie z.B. bei G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Membranfluidität lässt sich unter Zuhilfenahme von Markern fluorimetrisch detektieren. Diphenylhexatrien (DPH) ist ein lipophiles fluoreszierendes Molekül, welches tief in die hydrophobe Phase der Zellmembran inkorporiert. Dabei orientieren sich die DPH-Moleküle, vermutlich auf Grund ihrer Länge, hauptsächlich parallel zu den Fettsäureketten der Membranlipide (Kaiser et al., 1998). Wird eine DPH-markierte Probe in einem Fluoreszenzspektrometer mit monochromatischem Licht bestrahlt, wird die Probe in einen angeregten Energiezustand gebracht, der ca.  $10^{-9}$  bis  $10^{-6}$  Sekunden bestehen bleibt. Anschließend fallen die angeregten Moleküle unter Emission in ihren energetischen Grundzustand zurück. Je nach Beweglichkeit des fluoreszierenden Markers in der Membran ändert sich die Drehrichtung des emittierenden Lichtes. Obwohl diese Beweglichkeit eingeschränkt ist, kann sich der Marker bis zu einem gewissen Grad senkrecht oder parallel zur Membranoberfläche bewegen. Diese Beweglichkeit in bestimmte Richtungen wird als anisotrop bezeichnet. Die DPH-Anisotropie ist daher eine Möglichkeit, die Membranfluidität anzugeben (Lentz, 1993). Je höher die Anisotropie (Fluoreszenz) ist, desto weniger fluide ist die Membran. Dies würde auf eine Zellschädigung durch oxidative Reaktionen hinweisen, wie sie zum Beispiel bei zunehmendem Alter oder Alzheimer Demenz auftreten. Gemessen werden sollte, ob die Aufnahme von mediterranen Pflanzenextrakten eine signifikante Erhöhung der Membranfluidität, d. h. eine Erniedrigung der DPH-Anisotropie zur Folge hat im Gegensatz zur mit Eisen-3-chlorid und Wasserstoffperoxid stimulierten Positivkontrolle.

#### Gebrauchslösungen:

TRIS-Puffer:                    20 mM TRIS  
    pH 7,4 (mit HCl eingestellt)

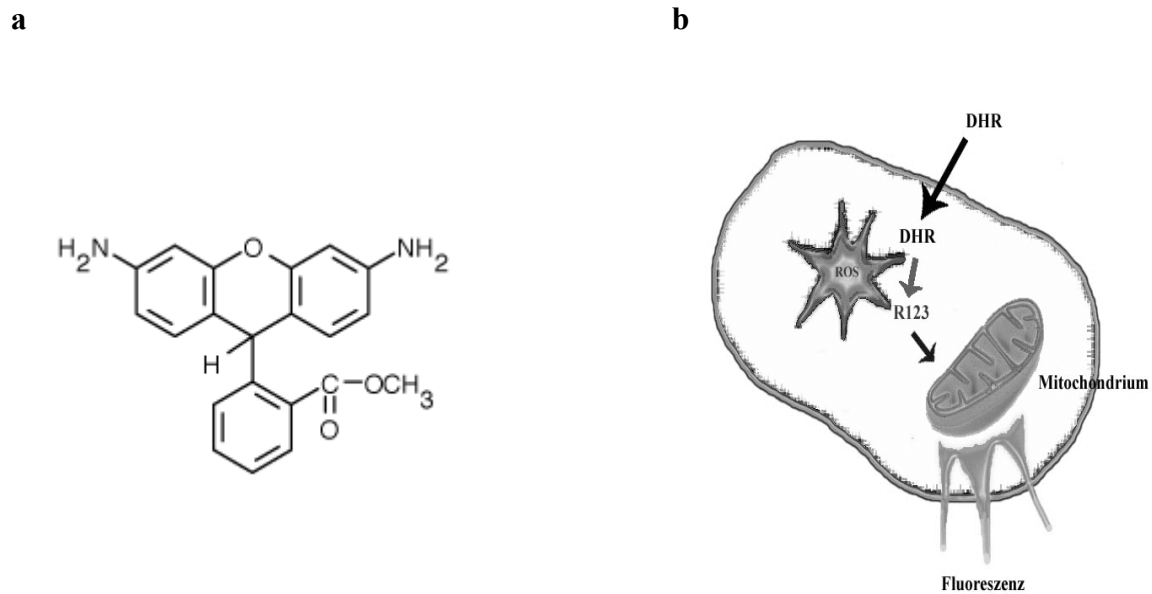
DPH-Lösung:                    Stammlösung 1:125 mit TRIS-Puffer verdünnt (40  $\mu$ M)

**Durchführung:**

Die wie unter 3.2.1.1 beschriebenen aufgearbeiteten Membranproben wurden aufgetaut und in jeweils 5 ml TRIS-Puffer (20 mM, pH 7,4) mit dem Ultraturrax homogenisiert. Zur Messung wurde eine definierte Proteinmenge (30 µg/100ml) benötigt, auf die die Proben durch Verdünnen mit TRIS-Puffer eingestellt wurden. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 1 ml. Zur Messung wurden jeweils 35 µl Probe plus 315 µl TRIS-Puffer und 350 µl DPH-Lösung in kleine Reagenzgläser (100 × 10 mm, Assistent, Fisher Scientific) pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Messung der Anisotropie wurde am SLM Aminco Bowman Polarisationspektrometer (SLM Aminco) bei einer Excitation von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm durchgeführt. Alle Proben wurden in Fünffachansätzen gemessen, der höchste und der niedrigste Wert wurden nicht berücksichtigt und die restlichen Werte wurden gemittelt. Die Mittelwerte wurden in eine Graphpad Prism-Tabelle überführt und die Auswertung erfolgte graphisch.

**3.2.2.3 Detektion der Mitochondrien- und Cytosol-assoziierten Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in dissoziierten Neuronen (Vorversuche)**

Die relativen Level der reaktiven oxygenen Spezies (ROS) lassen sich in neuronalen Zellen mittels fluoreszierender Farbstoffe detektieren (Mattson et al., 1995). Zur Bestimmung der ROS-Spiegel wurden jeweils 1 ml Probe (Aufarbeitung siehe 3.2.1.2) mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (10 µM) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Farbstoff Dihydrorhodamin123 (DHR) ist eine ungeladene nicht fluoreszierende Verbindung. Durchdringt er jedoch die Zellmembran, wird er im Zellinneren von verschiedenen ROS (Hempel et al., 1999) zum grün fluoreszierenden Rhodamin123 oxidiert, das die Zelle nicht mehr verlassen kann. Aufgrund der positiven Ladung lagert sich Rhodamin123 bevorzugt in der negativ geladenen Mitochondrienmatrix ein, wodurch mittels dieser Methode eine genaue Aussage über Mitochondrien-assoziierten ROS getroffen werden kann. Obwohl mehrere ROS in der Lage sind DHR zu oxidieren, ist die Reaktion für Wasserstoffperoxid am sensitivsten (Walrand et al., 2003).

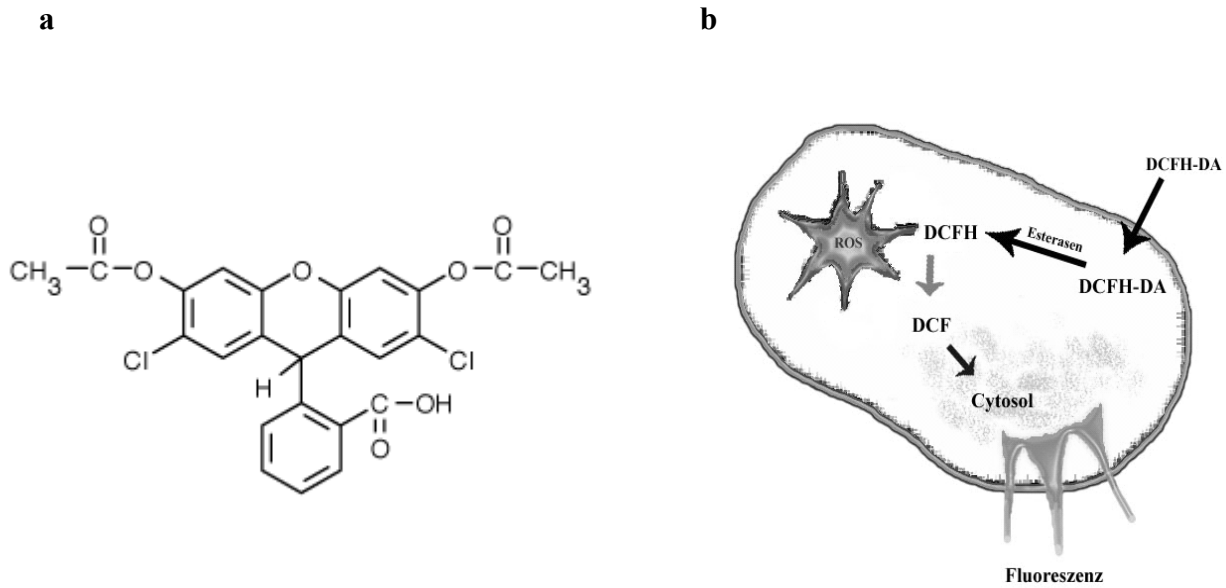


**Abbildung 3-6: DHR-Struktur und Reaktionsweg in der Zelle**

a) DHR-Struktur. b) Reaktionsweg in der Zelle und Umsetzung zum fluoreszierenden R123.

Als zweiter Farbstoff wurde Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) verwendet. Die unpolare Acetatverbindung durchdringt die Zellmembran und wird im Zellinneren durch Esterasen gespalten (DCFH) (Rothe et al., 1990). Durch Oxidation von verschiedenen ROS entsteht nun der fluoreszierende Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) (Hempel et al., 1999). Laut Walrand et al. ist aber hauptsächlich Wasserstoffperoxid in Kombination mit enzymatischer Peroxidaseaktivität für die Oxidation von DCFH verantwortlich (Walrand et al., 2003).

Da DCFH nicht die Mitochondrien anfärbt (Diaz et al., 2003), sondern von cytosolischen ROS oxidiert wird, eignet sich dieser Farbstoff zur Bestimmung der cytosolischen ROS-Level. Es ist zusätzlich bekannt, dass bei dieser Methode auch Peroxynitradikale detektiert werden (Calingasan et al., 2000, Possel et al., 1997). Peroxynitrit wird bei der Reaktion von Superoxidanionen mit Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, deswegen wurden in dieser Arbeit auch die NO-Level untersucht (siehe Abschnitt 3.2.4.4).



**Abbildung 3-7: Dichlorofluorescein-Diacetat-Struktur und Reaktionsweg in der Zelle**

a) DCFH-DA-Struktur. b) Reaktionsweg in der Zelle und Umbau zum fluoreszierenden Molekül.

### Gebrauchslösungen:

Medium I

Medium II

Medium III

HBSS

TRIS-HCl

### **Durchführung der Messung in einer Quarzküvette**

Das Pellet des letzten Waschschrtes wurde in 4,6 ml Medium III (37°C) resuspendiert und a 0,8 ml in sechs im Wasserbad vorgewärmten Glasröhrchen aliquotiert. Für die Vorversuche wurden die dissoziierten Neuronen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte (1 bzw. 0,2 mg/ml) oder Medium III als Leewert für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Durch mehrmaliges Zentrifugieren bei  $400 \times g$  für 3 Minuten wurde nach der Inkubation der überschüssige Extrakt entfernt und die Zellen anschließend in HBSS, pH 7,4 aufgenommen. Die eigentliche Messung wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10mm, einem Volumen von 1 ml und über 360 Sekunden am Aminco Bowman Spektrometer vorgenommen.

### **Durchführung der Messungen in einer Mikrotiterplatte**

Zum besseren Vergleich von mehreren Proben und weil weniger Probenmaterial benötigt wird, wurde die oben beschriebenen ROS-Messung von der Küvette auf eine 48-Well-Platte umgestellt. Dazu erfolgte die Aufarbeitung des Maushirns prinzipiell wie unter 3.2.1.2. beschrieben, allerdings wurden die Volumina der Puffer der 48-Well Platte angepasst. Das resultierenden Endvolumen betrug 0,5 ml pro Well. Die Messung der Platte wurde am Victor® Multilabel Counter (Perkin Elmer) durchgeführt.

#### **3.2.2.3.1 Messung der Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR)**

Zur Detektion der ROS-Level wurde 15 min mit 10  $\mu$ M DHR Farbstoff im Wasserbad inkubiert, die Hirnsuspension zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes zentrifugiert und die Proben bis zur Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 500 nm und einer Emissionswellenlänge von 536 nm.

#### **3.2.2.3.2 Messung der Cytosol-assoziierten ROS (DCF)**

Nach einer 30-minütigen Inkubation mit 10  $\mu$ M DCFH im Wasserbad wurde die Hirnsuspension durch Zentrifugation gewaschen und die Proben bis zur Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

### **3.2.3 Aufarbeitung der Gehirnproben der beiden Fütterungsstudien zur Messung der antioxidativen Parameter (*ex vivo*).**

#### **3.2.3.1 Homogenisation des Maushirns zur Bestimmung der Lipidperoxidation und der Aktivität der antioxidativen Enzyme (*ex vivo*)**

Mäuse der Fütterungsstudie I wurden wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt und die einzelnen Großhirnhemisphären in Eppendorf Gefäßen sofort für die später folgenden Bestimmungen bei -80°C eingefroren. Vor der Durchführung der Test wurden alle Proben einer Fütterungsstudie aufgetaut und im fünffachen Volumen an kaltem TRIS-Puffer bei 1200 rpm homogenisiert. Ein Teil der Proben wurde anschließend mit TRIS-Puffer 1:1 verdünnt und bei 3000  $\times$  g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden für die Bestimmung der Lipidperoxidation erneut bei -80°C gelagert. Der andere Teil der Proben



wurde für die Bestimmung der antioxidativen Enzyme bei  $8500 \times g$  für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert und die Überstände ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.2.3.2 Präparation und Aufarbeitung des murinen Gehirnmaterials der Fütterungsstudie II (*ex vivo*)**

Es wurden immer gleich viele Tiere aus jeder Fütterungsgruppe am selben Tag wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt. Das Großhirn wurde anschließend in Viertel zerteilt. 3 Viertel wurden für weitere Versuche bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und aus einem Viertel wurden sofort zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoff Spezies, des mitochondrialen Membranpotentials und der NO-Spiegel die dissoziierten Neuronen präpariert.

### **3.2.3.3 Gewebeaufarbeitung und Aufreinigung zur Bestimmung der oxidativen DNA-Schädigung (*ex vivo*)**

Zur Bestimmung der oxidativen Schäden auf DNA-Ebene war es nötig die DNA aus den eingefrorenen Hirnproben aufzureinigen. Dazu wurde das DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Hirnproben wurden aufgetaut und durch Inkubation über Nacht im Wasserbad bei  $55^{\circ}\text{C}$  mit Proteinase K lysiert. Am nächsten Tag, als sich die Proben komplett aufgelöst hatten, wurde dann über mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte die Gesamt-DNA (genomisch und mitochondrial) in  $100 \mu\text{l}$  Puffer eluiert.

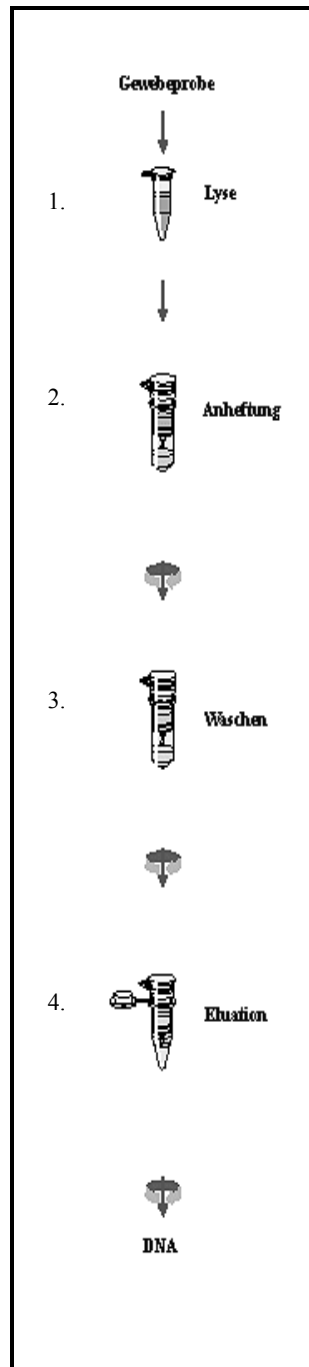


Abbildung 3-8: DNA-Aufreinigungsschritte des DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen

### 3.2.3.4 Blutabnahme zur Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Spiegel

Um die initialen Hydroperoxide als peripheren Marker der oxidativen Schädigung im Blut der Mäuse der ersten Fütterungsstudie zu bestimmen, wurde den Tieren nach der Behandlung mit den Extrakten bzw. dem Kontrollfutter retrobulbär Blut abgenommen. Zur Bestimmung der Antioxidativen Kapazität (TEAC und Oxi Adsorbent Test) und der oxidativen Schädigung der Proteine (ELISA) wurde auch den Tieren der zweiten Studie retrobulbär Blut entnommen und

für den Oxi Adsorbent Test und den Carbonylierungs-ELISA wie unter 3.2.3.5 beschrieben weiter bearbeitet.

### **3.2.3.5 Serumgewinnung zur Bestimmungen der Antioxidativen Kapazität (OAT) und der oxidativen Schädigung von Proteinen**

In den bei Ende der Fütterungsstudien II abgenommenen Blutproben wurde durch Zentrifugation bei  $3000 \times g$  für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  das Serum gewonnen und bis zur Bestimmung der einzelnen Parameter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **3.2.4 Bestimmung der antioxidativen Parameter ex vivo**

### **3.2.4.1 Ex vivo Bestimmung der Lipidperoxidation in behandelten und unbehandelten Tieren (Fütterungsstudie I)**

Die Lipidperoxidation der Maushirnhomogenate einer Fütterungsstudie wurden immer am gleichen Tag bestimmt. Dabei wurden jeweils die basalen Level und die Rate nach Stimulation mit  $\text{FeCl}_3$  detektiert. Die Durchführung erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.2.1.1 geschildert. Die Absorptionen wurden gemittelt und durch die Konzentration an MDA an Hand der Standardgerade bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden noch durch den Proteingehalt der Proben geteilt, um auf den Proteingehalt zu normieren. Anschließend wurden die Werte in einer GraphPad Prism (Version 3.0) Tabelle gegen die eingesetzten Extrakt- bzw. Antioxidanzkonzentrationen aufgetragen und graphisch ausgewertet.

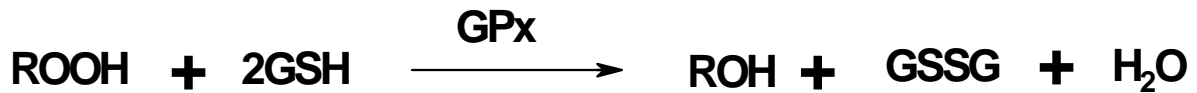
### **3.2.4.2 Bestimmung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten in behandelten und unbehandelten Tieren (ex vivo) der Fütterungsstudie I**

#### **3.2.4.2.1 Bestimmung der Glutathion Peroxidase Aktivität (GPx)**

Die zelluläre Glutathion Peroxidase (GPx) ist ein Mitglied der GPx-Enzymfamilie, deren Aufgabe die Entgiftung von Peroxiden in der Zelle ist. Peroxide können zu hochreaktiven schädliche Radikalen abgebaut werden, daher spielen die GPx-Enzyme eine wichtige Rolle bei der Zellprotektion vor z.B. Lipidperoxidation.

Die GPx katalysiert die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und von organischen Peroxiden zu den korrespondierenden stabilen Alkoholen unter Nutzung von Glutathion (GSH) als

Reduktionsäquivalent. In dem verwendeten Kit wird Tertiär-Butylhydroperoxid (t-BOOH) als Substrat verwendet.



Die GPx-Aktivität kann indirekt über die Recyclingreaktion des oxidierten Glutathion (GSSG) zu GSH bestimmt werden. Im Verlauf dieser von der Glutathion Reduktase katalysierten Reaktion wird NADPH zu NADP<sup>+</sup> oxidiert, was sich an Hand einer Absorptionsabnahme bei 340 nm photometrisch bestimmen lässt.



### Gebrauchslösungen (Kit):

Assay-Puffer: 50 mM TRIS-HCl, pH = 7,6, 5 mM EDTA

t-BHP (70 %-ig)

NADPH-Reagenz

Kontroll-Sample-Diluent: 50 mM TRIS-HCl, pH = 7,4, 5 mM EDTA, 1 mM Ergothionein,  
1 mg IgG

Cellular Glutathion Peroxidase-Kontrolle (2060 mU/ml)

### Durchführung:

Um die GPx-Aktivität zu bestimmen wurde das Cellular Glutathion Peroxidase Assay Kit von Calbiochem verwendet, welches eine Messung in einer Mikrotierplatte erlaubt. Dem Kit liegt eine Methode nach Paglia et al. zugrunde (Paglia et al., 1967). Dabei wird GSH (1mM), GR ( $\geq 0,4$  U/ml) und NADPH (0,2mM) zu den GPx-enthaltenden Proben gegeben und die durch Zugabe von t-Butylhydroperoxid (0,22 mM) gestartete Reaktion bei 340 nm mittels eines Multilabercounters (Victor<sup>2</sup> der Firma Wallace) detektiert. Die Abnahme der NADPH-Absorption ist dabei direkt proportional zur GPx-Aktivität in der Probe und kann durch Einsetzen in folgende Formel berechnet werden:

**GPx-Aktivität [U/l] = x  $\mu$ M NADPH / (min\*l) = Veränderung der Absorption bei 340 nm pro Minute und 1 cm Lichtweg [ $\Delta$  Abs / (min\*cm)] / 0,00622 [(Abs\*l) / ( $\mu$ M\*cm)].**

0,00622 [(Abs\*l) / ( $\mu$ M\*cm)] ist der Extinktionskoeffizient von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm. Um die spezifische Veränderung der Absorption bei 340 nm zu bestimmen, wurden Blanks für die Autoxidation von NADPH durch t-BOOH ohne Probe und Blanks für die unspezifische Oxidation von NADPH durch die Probe ohne t-BOOH bestimmt und von den Gesamtwerten subtrahiert. Alle GPx-Aktivitäten wurden in Duplikaten gemessen und durch Einsetzen der Werte in obige Formel in Microsoft Excel berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch den wie unter 3.2.6.3 beschrieben bestimmten Proteingehalt geteilt.

#### **3.2.4.2.2 Bestimmung der Glutathion Reduktase Aktivität (GR)**

Die Glutathion Reduktase (GR) ist eine Flavoproteindisulfidoxidoreduktase und besteht aus zwei gleich aufgebauten Untereinheiten mit jeweils einer FAD-, NADPH-, Zentral- und Interfacedomäne. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird in einer mehrschrittigen Reaktion oxidiert. Dabei wird GR durch NADPH reduziert und reagiert erst mit einem GSSG-Molekül zum GR<sub>red</sub>-SG-Komplex und GSH und anschließend zu GR und GSH.



Die GR-Aktivität kann nun über die Oxidationsrate von NADPH bestimmt werden, da die Reaktion durch eine Verminderung der Absorption bei 340 nm mittels Spektrometer detektiert werden kann und die NADPH Oxidationsrate dem GSSG-Umsatz entspricht.

#### **Gebrauchslösungen (Kit):**

NADPH-Lösung

GSSG-Lösung (2,4 mM)

Assay-Puffer: 125 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 7,5 , 2,5 mM EDTA

Sample-Diluent: 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 7,5 , 1 mM EDTA, 1 mg BSA  
Glutathion Reduktase Kontrolle (392 mU/ml)

### **Durchführung:**

Um die GR-Aktivität zu bestimmen wurde das Glutathion Reduktase Assay Kit der Firma Calbiochem verwendet, das auf eine von Mizuno entwickelten Methode beruht (Mizuno et al., 1986). Dazu wird bei 25 °C und einem pH von 7,5 zu der verdünnten Probe 1 mM GSSG gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 0,22 mM NADPH gestartet. Eine GR Unit ist definiert als die Aktivität, die 1 µmol NADPH pro Liter und Minute bei 25°C umsetzt. Die Enzymaktivität x ([U/l]) wurde durch Berechnung der NADPH-Absorption bei 340 nm in einem Intervall von 5 Minuten bestimmt und durch Einsetzen in folgende Formel in Microsoft Excel berechnet:

**GR-Aktivität [U/l] = x µM NADPH / (min\*1) = Veränderung der Absorption bei 340 nm pro Minute und 1 cm Lichtweg [ $\Delta \text{Abs} / (\text{min} \cdot \text{cm})$ ] / 0,00622 [(Abs\*1) / (µM\*cm)].**

0,00622 [(Abs\*1) / (µM\*cm)] ist der Extinktionskoeffizient von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Detektion der Absorption erfolgte in einer Mikrotiterplatte mittels eines Multilabelreaders (Victor, Wallace) mit 40 nm Bandbreite und einem 355 nm-Filter. Um die unbekannte Weglänge für Mikrotiterplatten, die mit 250 µl gefüllt sind im Gegensatz zu einer 1 cm Quarzküvette zu berechnen, war der Korrekturfaktor von 2,9704 durch 3 unterschiedliche Kontrollen an vier unterschiedlichen Tagen in der Arbeitsgruppe bestimmt worden.

Um die spezifische Veränderung der Absorption bei 340 nm zu bestimmen, wurden Blanks für die unspezifische Oxidation von NADPH durch die Probe ohne GSSG bestimmt und von den Gesamtwerten subtrahiert. Alle Enzym-Aktivitäten wurden in Duplikaten gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch den Proteingehalt geteilt.

### 3.2.4.2.3 Bestimmung der Cu/Zn-Superoxid Dismutase Aktivität (SOD)

Die SOD ist ein Metalloenzym, welches die Umwandlung von Superoxidanionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert (I) und in drei Varianten vorkommt (Cu/Zn-, Mn- und Fe-SOD). Bei der hier gewählten Methode wird durch Chloroform/Ethanolextraktion lediglich die Cu/ZN-SOD detektiert, da das Agens die beiden anderen SOD-Formen inaktiviert.

Die Bestimmung der SOD-Aktivität erfolgte anhand des „Superoxide Dismutase Kit“ der Firma Calbiochem, dem eine von Nebot et al. entwickelte Methode zugrunde liegt (Nebot et al., 1993). Dabei wird Tetrahydrotrihydroxybenzofluoren (Reagenz 1) in Anwesenheit von SOD oxidiert. Das entstehende, gefärbte Chromophor wird bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert.

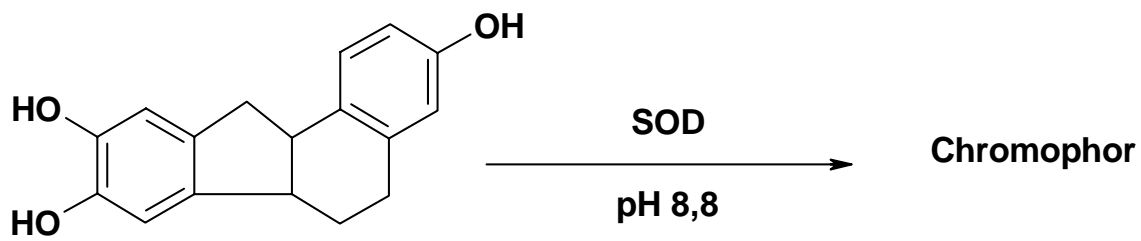


Abbildung 3-9: SOD katalysierte Reaktion von Tetrahydrotrihydroxybenzofluoren zum fluoreszierenden Chromophor.

Zusätzlich wird Trimethylvinylpyridinium (Reagenz 2) zugesetzt, welches die Störquellen wie Mercaptane (z.B. Glutathion) in der Probe abfängt.

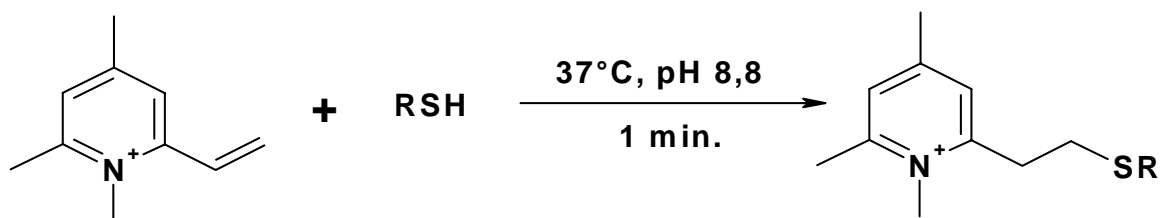


Abbildung 3-10: Entfernung von Störquellen der SOD-Reaktion wie z.B. Glutathion

**Gebrauchslösungen (Kit):****Reagenz R1(Chromogen):**

5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzofluoren (0,66 mM) in 32 mM HCl mit 0,5 mM DTPA und 2,5 % Ethanol

**Reagenz R2 (Scavenger):**

1,4,6-trimethyl-2-vinylpyridinium trifluoromethansulfonat (33,3 mM) in 1mM HCl

**Puffer-Lösung:**

2-amino-2-methyl-1,3-propandiol (50 mM) mit 3,3 mM Borsäure und 0,11 mM DTPA, pH = 8,8

**Gebrauchslösungen zusätzlich zum Kit:**

Chloroform/Ethanol-Mix

**Durchführung:**

Das zu untersuchende Material wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben aufgearbeitet und für den Test aufgetaut. Nach Zugabe eines Ethanol/Chloroform-Gemisches wurde für ein Minute geschüttelt und die obere Schicht der zwei Phasen nach einem Zentrifugationsschritt bei 3.000 x g für 10 Minuten und 4°C in Eppendorfgläser überführt. Die Extraktion dient der Entfernung von Hämoglobin, welches durch Eigenabsorption im Messbereich stört. Die Messung der oberen Phase erfolgte in einer Quarzküvette als Enzymkinetik bei 525 nm über einen Zeitraum von 120 Sekunden. Dazu wurden 450 µl Puffer in die Küvette gegeben und 20 µl Probe sowie 15 µl Reagenz 2 zugegeben und exakt 60 Sekunden im Wasserbad bei 37°C temperiert. Nach dem Einsetzen der Küvette in den Halter des Spektralphotometers wurden 15 µl Reagenz 1 hinzupipettiert und die Messung gestartet. Der Anstieg der Absorption wurde im 6-Sekundenintervall detektiert, um eine genaue Aussage über den linearen Bereich der Reaktion machen zu können. Da Autoxidation des Farbreagenzes in Anwesenheit von SOD von den gemessenen Werten abgezogen werden muss, wurden jeweils 4 Kontrollen mitgeführt, wobei statt der Probe destilliertes Wasser eingesetzt wurde. Zur Auswertung wurde die maximale Steigung der Kurve ermittelt, die die konzentrationsabhängige



Autoxidation von Reagenz 1 in SOD-Anwesenheit repräsentiert. Über die folgende Formel wurde die SOD-Aktivität berechnet:

$$V_s/V_c = 1 + [\text{SOD-525 Units} / (\alpha * \text{SOD-525 Units}) + \beta]$$

Die Konstanten  $\alpha$  und  $\beta$  sind von Nebot et al. empirisch bestimmte Konstanten mit folgenden Werten:  $\alpha = 0,073$  und  $\beta = 0,93$  (Nebot et al., 1993). Die SOD-Aktivität wurde durch Einsetzen der Werte in obige Formel in Microsoft Excel berechnet. Eine SOD-525 Unit ist definiert als die Aktivität, die den Autoxidationshintergrund ( $V_s/V_c = 2$ ) verdoppelt.

### **3.2.4.3 Messung der oxidative Schäden der DNA: 8-OHdG- Bestimmung**

Zur Detektion der oxidativen DNA-Schäden wurde das 8-OHdG-Kit des Japan Institute for Control of Aging (Fukuroi City, Japan) benutzt. Bei dem Kit handelt es sich um einen kompetitiven ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), der in der Lage ist quantitative 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) in tierischen Gewebe, Plasma, Serum oder Urin zu messen.

#### **Gebrauchslösungen (Kit):**

Primärantikörper

Rekonstitutionslösung für Primärantikörper

Sekundärantikörper

Rekonstitutionslösung für Sekundärantikörper

8-OHdG-Standard (0,5-200 ng/ml)

Waschlösung

Chromogen-Lösung

Stopplösung

96-Well-Platte (8-OHdG-gebunden)

**Durchführung:**

Bevor die Proben im ELISA vermessen werden konnten, musste die DNA aufgereinigt und verdaut werden (siehe 3.2.3.3).

Jeweils 50  $\mu$ l Probe oder Standard wurden in Wells pipettiert und mit dem frisch rekonstituierten Primärantikörper für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit jeweils 250  $\mu$ l Waschlösung zur Entfernung der nicht an die Platte gebunden Antikörpermoleküle gespült. Jetzt erfolgte die einstündige Inkubation bei 37 °C mit der ebenfalls frisch hergestellten Sekundärantikörperlösung. Der Zweitantikörper wurde auch durch 3 Waschschrte entfernt. Durch die im Folgenden zu gegebene Chromogenlösung entwickelt sich durch Reaktion mit an den Sekundärantikörper gekoppeltem Enzym eine Färbung, deren Intensität dem an die Platte gekoppelten Erstantikörper entspricht. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung angehalten und die Platte im Mikroplattenreader Victor (Perkin Elmer) bei 450 nm vermessen. Aus den erhaltenen Absorptionen wurde durch Auftragen der logarithmierten Werte gegen die bekannten Konzentrationen eine Standardkurve ermittelt und durch Einsetzen der Probenabsorptionen deren 8-OHdG-Konzentrationen berechnet.

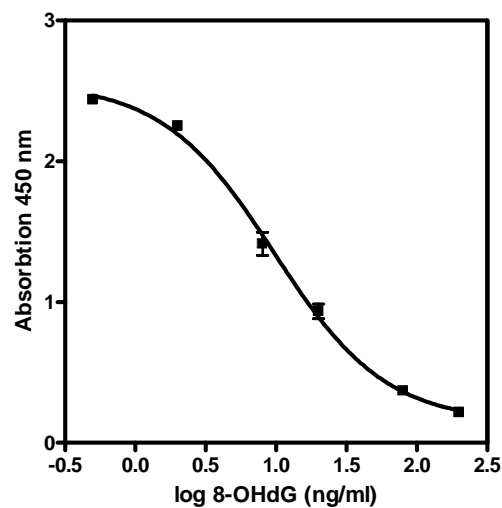


Abbildung 3-11: 8-OHdG-Standardkurve

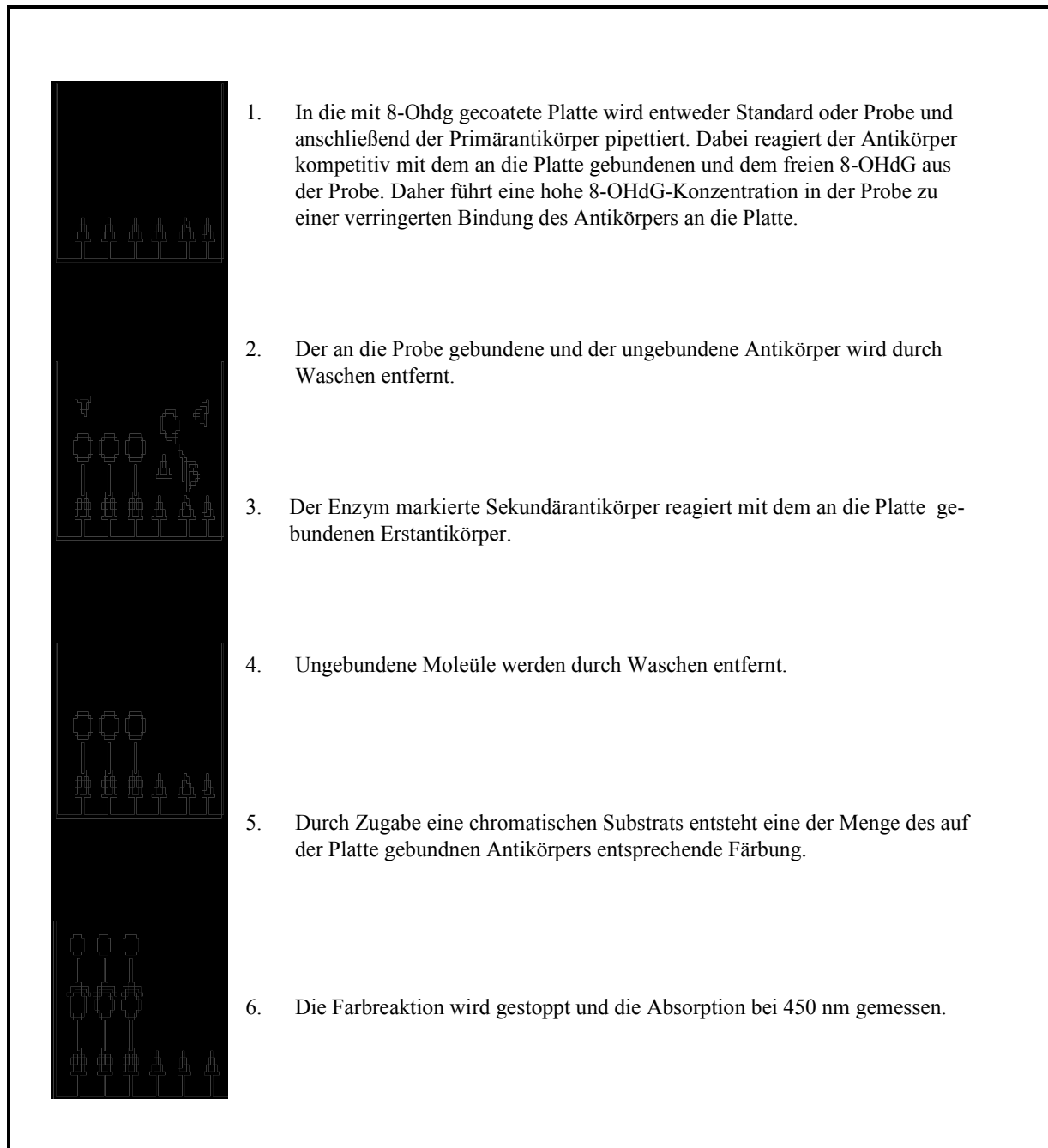


Abbildung 3-12: Schema des 8-OHdG-ELISAs zur Detektion oxidativer Schäden von DNA

### **3.2.4.4 Messungen der Mitochondrien- und Cytosol-assoziierten ROS, des mitochondrialen Membranpotentials und der NO-Spiegel in dissoziierten Neuronen behandelter und unbehandelter Tiere der Fütterungsstudie II (ex vivo)**

Die ex vivo-Messungen wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben in 48-Well-Platten ausgeführt und im Spektrometer (Victor® Multilabel Counter, Perkin Elmer) vermessen. Die Präparation der Gewebe ist unter 3.2.1.2 angegeben, allerdings wurden für alle vier Methoden insgesamt aus einem Viertelhirn die dissoziierten Neurone präpariert und dafür die Volumina der Puffer entsprechend angepasst. Das Endvolumen betrug 500 µl/Well.

#### ***3.2.4.4.1 Messung der Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR)***

Die Detektion der Mitochondrien-assoziierten ROS erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DHR wie unter 3.2.2.3.1 angegeben.

#### ***3.2.4.4.2 Messung der Cytosol-assoziierten ROS (DCF)***

Die Detektion der Cytosol-assoziierten ROS erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DCFH-DA wie unter 3.2.2.3.2 angegeben.

#### ***3.2.4.4.3 Messung des transmembranären mitochondrialen Potentials ( $\Psi_M$ )***

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin123 (Baracca et al., 2003). Hierbei handelt es sich um ein membranpermeables Kation (Abbildung 3-13: Rhodamin123-Molekül), welches sich abhängig vom Membranpotential (Johnson et al., 1980) in die negative mitochondriale Matrix einlagert. Verändert sich das Membranpotential und wird durch oxidativen Stress weniger negativ, verringert sich die Fluoreszenzintensität des Signals, da sich weniger geladenes Rhodamin123 in die Mitochondrienmatrix einlagern kann.

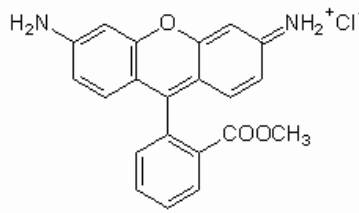


Abbildung 3-13: Rhodamin123-Molekül

### **Durchführung:**

Die Methode wurde erst in einer 48-Well-Platte am Victor® Multilabel Counter etabliert. Für die Durchführung wurden die Proben in Eppendorff-Gefäßen für 15 Minuten bei RT auf einem Orbitalschüttler (im Dunkeln) inkubiert und der überschüssige Farbstoff durch Zentrifugation anschließend ausgewaschen. Die Proben wurden nun in einer 48-Well-Platte (500 µl/Well) bei einer Exzitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm im Victor® Multilabel Counter vermessen. Zur akuten Stimulation wurde auch in diesem System eine in vitro-Stimulation durchgeführt. Dafür wurde nach Aufnahme des basalen mitochondrialen Membranpotentials Natriumnitroprussid zugegeben und die spontane Fluoreszenzveränderung über die nächsten 15 Minuten detektiert. Nach dem Anfärben mit R123 führte eine Stimulation mittels SNP zu stark erhöhten Fluoreszenzintensitäten. Vermutlich führt die Abnahme des Membranpotentials zu einem Austreten des Farbstoffes aus den Mitochondrien ins Cytosol. Dort ist die Fluoreszenz weniger gut abgeschirmt, was zu einem erhöhten Signal führt. Diese Reaktion ist in der Literatur für die akute Stimulation TMRE-gefärbter Zellen mit membranpotentialsenkenden Substanzen beschrieben (Krohn et al., 1999).

#### ***3.2.4.4 NO-Spiegel***

Der Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Diaminofluorescein-diacetat (DAF-DA) wurde zur Detektion der intrazellulären NO-Level genutzt (Chatton et al., 2002). Dabei handelt es sich um ein ungeladenes Molekül, welches durch die Zellmembran ins Innere der neuronalen Zellen diffundiert und dort durch Esterasen deacetyliert (DAF) wird. Durch Reaktion mit NO entstehen stark fluoreszierende Benzotriazolderivate, die mittels Fluoreszenzspektrometer detektiert werden können (Abbildung 3-15). Ein Vorteil ist, dass DAF nicht mit stabilen oxidierten Formen von NO, also Nitrat oder Nitrit, oder ROS wie zum Beispiel dem Wasserstoffperoxid oder Peroxynitrit reagiert. Die Reaktion ist folglich stark NO-sensitiv und

kann sehr niedrige NO-Spiegel in einem Bereich von 2-5 nM detektieren (Kojima et al., 2001). Um die NO-Kapazität der neuronalen Zellen zu bestimmen, wurde eine *in vitro*-Stimulation mit PAPA-NONOate durchgeführt.

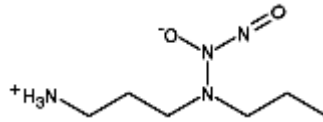


Abbildung 3-14: Struktur des NO-Donors PAPA-NONOate

Bei PAPA-NONOate handelt es sich um einen NO-Donor, der spontan pH-abhängig nach einer Reaktion der 1. Ordnung dissoziiert und 2 Moleküle NO freisetzt. PAPA-NONOate setzt NO bei 37 °C mit einer Halbwertszeit von 13 min frei (Keefer et al., 1996).

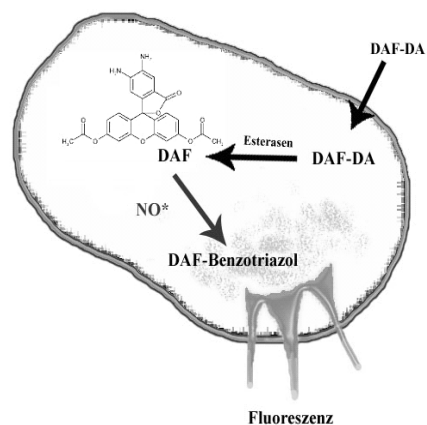
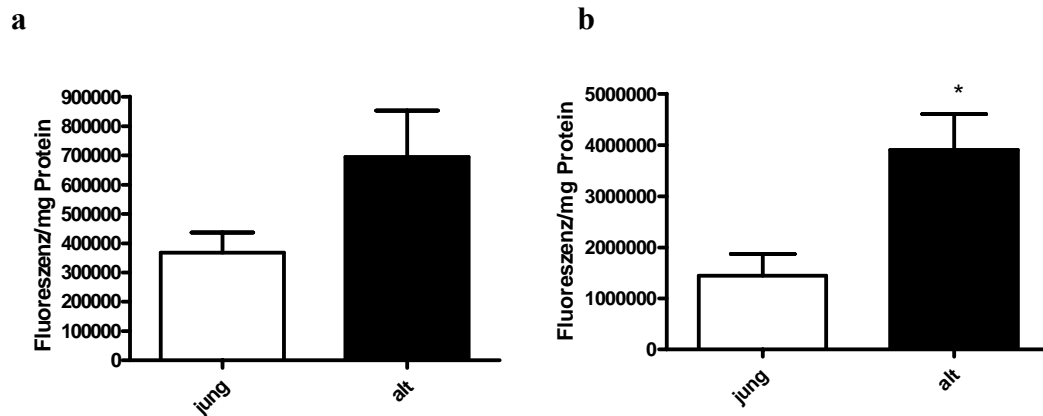


Abbildung 3-15: DAF-DA Reaktionsweg und Entstehung des fluoreszierenden Endproduktes

### **Durchführung:**

Nach 40-minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad (im Dunkeln), wurde der freie Farbstoff durch Zentrifugation ausgewaschen, die Proben in eine 48-Well-Platte pipettiert und bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm im Victor® Multilabel Counter vor und nach Stimulation mit PAPA-NONOate (Keefer et al., 1996) gemessen. In Abbildung 3-16 sind die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen zu den Unterschieden junge rund alter NMRI-Mäuse bezüglich ihrer basalen und stimulierten NO-Spiegel gezeigt. 21 Monate alte Tiere hatten höhere basale NO-Spiegel als 6 Monate alte und nach Stimulation war der Unterschied auch signifikant.



**Abbildung 3-16: Alterseffekt auf basale und stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

a) Alterseffekt auf basale NO-Spiegel (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen und alten NMRI Mäusen (n = 7) gemessen mittels H<sub>2</sub>DAF-DA (10 µM). Mittelwert und SEM.

b) Alterseffekt auf mit PAPANoate (0,5 mM) stimulierte NO-Spiegel (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen und alten NMRI Mäusen (n = 6). Mittelwert und SEM, p = 0,0137 \* vs. junge Tiere.

### 3.2.5 Determination der Hydroperoxid-Spiegel und der antioxidativen Kapazität aus dem Vollblut bzw. Serum

Die Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Level erfolgte im Blut der Tiere der ersten Fütterungsstudie und die Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität erfolgte im Blut der Tiere der zweiten Fütterungsstudie (vergl. Abschnitt 3.2.3.4).

#### 3.2.5.1 Bestimmung der oxidativen Schädigung (Hydroperoxid-Level)

Bei der Methode zur Bestimmung der Hydroperoxid-Level handelt es sich um eine indirekte Messmethode, die dem so genannten d-ROMs-Test nach Carratelli nachempfunden ist (Cornelli et al., 2001). Dabei wird die Entstehung des roten radikalischen Kations DEPPD<sup>+</sup> photometrisch gemessen, welches durch Reaktion von Alkoxy- bzw. Peroxyradikalen mit DEPPD entsteht. Die Farbreaktion wird bei 505 nm detektiert, wobei die Färbung während der ersten 6 Minuten relativ linear ansteigt. Zum Vergleich wird eine Standardgerade mit bekannten Konzentrationen an Tertiärem Butylhydroperoxid gemessen und die Steigung ermittelt. Die initiale Hydroperoxidkonzentration als µM t-Butylhydroperoxid lässt sich durch  $\Delta A_{505}$ /Steigung berechnen. Die Oxidative Schädigung wurde im Blut der Tiere der ersten Fütterungsstudie bestimmt.

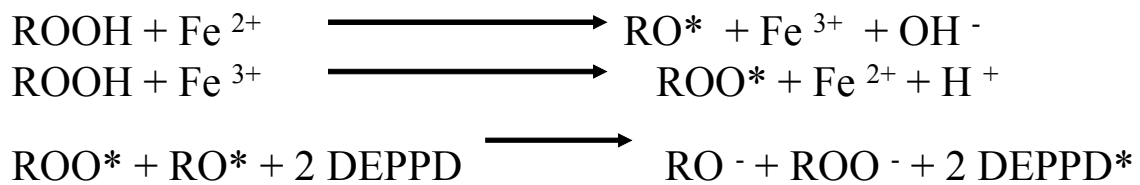


Abbildung 3-17: DEPPD-Reaktion zum photometrisch detektierbaren Radikal

**Gebrauchslösungen:**

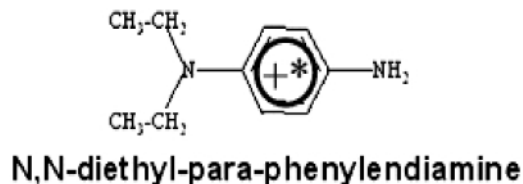
Acetatpuffer

FeSO<sub>4</sub>-Lösung

DEPPD-Lösung

t-BHP-Lösung

a



b

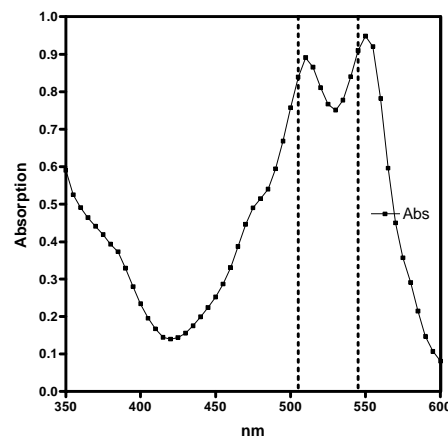


Abbildung 3-18: a) Struktur des DEPPD-Radikals und b) DEPPD-Absorptionsmaxima

**Durchführung:**

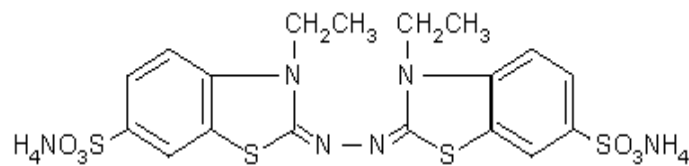
10 µl Blut wurden in 1ml Acetatpuffer (pH 4,8) gelöst, nach Zugabe von 10 µl (3,7 mM) DEPPD-Lösung zur Entfernung der Erythrozyten für 30 Sekunden bei 3000 U/min in einem Tischgerät zentrifugiert und in eine Quarzküvette überführt. Genau eine Minute nach Zugabe der DEPPD-Lösung wurde die Messung gestartet und die Absorption über 6 Minuten bei 505 nm alle 50 Sekunden gemessen. Als Leerwert wurden 10 µl destilliertes Wasser anstatt Probe im Puffer gelöst und das Photometer vor der Messung darauf geeicht. Als Standard diente tert-Butylhydroperoxid (BHP)-Lösung, die in Form einer Eichgerade mit Konzentrationen



von 0 – 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde. Dazu wurden zu 1 ml Acetat-Puffer 10  $\mu\text{l}$  DEPPD-Lösung 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Standardverdünnung und 10  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$ -Lösung geben und die Absorption bei 505 nm für 6 Minuten gemessen.

### 3.2.5.2 Bestimmung der Trolox Equivalenten Antioxidativen Kapazität (TEAC)

In dieser Arbeit wurde die TEAC aus dem Vollblut der Mäuse der zweiten Fütterungsstudie bestimmt. Dies ist eine Methode um die totale antioxidative Kapazität in Körperflüssigkeiten bzw. Hirnhomogenat spektrometrisch zu bestimmen. Hierbei macht man sich den konzentrationsabhängigen Entfärbungsprozess des ABTS-Radikals [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] in Anwesenheit von Antioxidantien zu Nutze. Im Gegensatz zum ursprünglichen ABTS-Test wird bei der hier verwendeten neueren Methode das Radikal vor Versuchsbeginn durch Reaktion mit Kaliumpersulfat im Dunkeln hergestellt und erst anschließend die Probe zugegeben. Die TEAC entspricht der millimolaren Konzentration von Trolox, die eine Antioxidative Kapazität equivalent zu 1 mM/l der zu untersuchenden Substanz besitzt.



2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

Abbildung 3-19: Struktur des ABTS-Radikals

#### Gebrauchslösungen:

Kaliumpersulfat-Lösung (70 mM)

ABTS-Lösung (2 mM)

Ethanol

Trolox-Lösung (2,5 mM)

**Durchführung:**

10 ml ABTS (2 mM in Wasser) mit 100 µl Kaliumpersulfat-Lösung (70 mM in Wasser) für 12-16 Stunden im Dunkeln bei RT reagieren lassen. Die dunkelblaue Radikal-Lösung ist für 2 Tage stabil bei RT. Die ABTS-Radikallösung wurde zum Gebrauch mit Ethanol verdünnt bis sie eine Absorption bei 734 nm von 0,7 aufwies. Zu 1ml Radikal-Lösung wurden 10 µl Probe (Blut) bzw. Blank oder Standard geben und ca. 30 sec. Mittels Vortexer gemischt. Nach 1 min bis 6 min wurde die Absorption bei 734 nm und 30 °C detektiert. Der Blank wird mit Ethanol gemessen. Trolox wird als 2,5 mM Stocklösung in EtOH gelöst und kann bei minus 20 °C für 6 Monate aufbewahrt werden. Die Standardkonzentrationen wurden vor Gebrauch durch Verdünnung mit EtOH hergestellt (0-25 µM Endkonzentration) und jeden Tag frisch vermessen. Abbildung 3-20 zeigt die Dosis-Wirkungskurve für 5 Experimente.

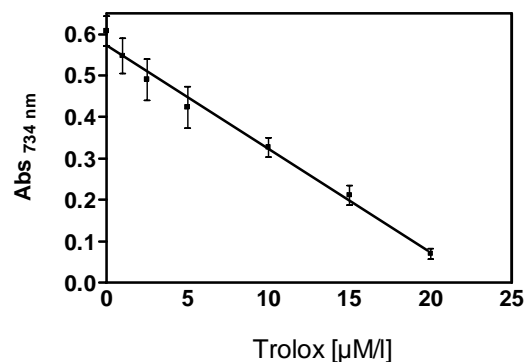


Abbildung 3-20: Trolox Standardkurve, Mittelwert und SEM (n = 5)

### 3.2.5.3 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität aus dem Serum (Oxi Adsorbent Test)

Im Blut wird das Abwehrvermögen gegenüber schädlichen Radikalen auch Plasma-Barriere genannt. Dieser standardisierte Test erlaubt die colorimetrische Detektion der Plasma-Barriere gegenüber hypochlorisch-induzierter Oxidation. Es wird folglich die Kapazität des Serums, mit oxidativem Stress umzugehen, bestimmt. Dieser Test wird in vielen Apotheken zur schnellen Detektion der Antioxidativen Kapazität in humanem Plasma oder Serum genutzt und beruht auf der Reaktion der Probe mit einer bekannten Menge an HOCl. Die Menge an HOCl, die von der Plasma-Barriere durch antioxidative Mechanismen nicht entgiftet werden kann, wird anschließend durch Reaktion von DEPPD (siehe Abbildung 3-18: a) Struktur des DEPPD-Radikals und b) DEPPD-Absorptionsmaxima) zum rotgefärbten Radikal photometrisch bei 505 nm detektierbar gemacht.

**Gebrauchslösungen und -Geräte:**

Free System Diacron

R1-Reagenz: Oxidations-Lösung

R2-Reagenz: Chromogen (DEPPD)

**Durchführung:**

10 µl Probe werden 1:100 in destilliertem Wasser in einem Reaktionsgefäß verdünnt. 1 ml R1-Reagenz wird in eine Küvette überführt, 10 µl der verdünnten Serumprobe zugegeben und für 10 im Thermoblock des Gerätes bei 30°C inkubiert. Anschließend werden 10 µl R2-Reagenz zugegeben und die Lösung gut vermischt. Nun wird die Küvette in die Halterung gestellt und der Messung gestartet. Das Gerät druckt das Ergebnis als µM HOCl, die von 1ml Probe absorbiert werden, aus (µM/ml).

**3.2.6 Messung der Proteinschädigung durch oxidativen Stress**

Auch auf Proteinebene ist oxidativer Stress in der Lage Schäden anzurichten. Dabei werden häufig die Seitenketten von bestimmten Aminosäuren wie Methionin, Histidin und Tyrosin modifiziert und an Cystein Disulfidbrücken gebildet. Bei durch Metallionen katalysierten Oxidationen werden ortsspezifisch Carbonylgruppen an Lysin, Arginin, Prolin oder Threonin angefügt. Ob es alters- bzw. fütterungsspezifische Veränderungen in der Carbonylierungsrate gab, wurde mit dem Protein Carbonyl Enzyme Immuno-Assay Kit der Firma Zentech (Neuseeland) detektiert. Anschließend sollte versucht werden mittels Oxiblot (Chemicon, Australien) oxidativ veränderte Proteine im Maushirn zu detektieren.

**3.2.6.1 Detektion der oxidativen Schädigungen von Proteinen mittels ELISA**

Dieser ELISA wurde zur Detektion der Proteincarbonylreste im Plasma der alten und jungen Kontroll- und 1014-Tiere aus der zweiten Fütterungsstudie benutzt. Dem Assay liegt eine Farbreaktion zugrunde, bei der durch Reaktion von Carbonylgruppen mit Diphenylhydrazin blaues spektrometrisch bestimmbares Hydrazon entsteht.

**Gebrauchslösungen (Kit):**

EIA-Puffer

Blocking-Puffer

Dinitrophenylhydrazin (DNP)

Guanidinhydrochlorid-Lösung

Anti-DNP-Biotin-Antikörper

Streptavidin gekoppelte Horseradish-Peroxidase

Chromatinreagenz

Stopp-Lösung

Standards

Carbonylkontrollproben

**Durchführung:**

Zuerst wurde der Proteingehalt der Proben mittels der Methode nach Lowry bestimmt und dementsprechend bei einem Proteingehalt zwischen 35-80 mg/ml die Standardprozedur zur Testdurchführung gewählt. Jeweils 5 µl der Proben, Standards und Carbonylkontrollen wurden mit 200 µl DNP-Lösung für 45 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl dieser Lösung zu jeweils 1 ml EIA-Puffer in neue Eppendorffgefäße gegeben. 200 µl der Carbonylierungsreaktion wurden zur Durchführung des ELISA wie in Abbildung 3-21 gezeigt in die 96-Well Platte pipettiert und zur Bindung an diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte zur Entfernung überschüssigen Proteins mehrmals mit jeweils 300 µl/Well EIA-Puffer gewaschen und 250 µL Blocking-Puffer pro Well hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde erneut mehrmals gewaschen, jeweils 200 µl Anti-DNP-Biotin-Antikörper-Lösung in die Wells pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneut wiederholtem Waschen der Platte erfolgte die Zugabe von 200 µl Streptavidin-HRP und eine erneute Inkubation für 1 h bei RT. Zur Farbreaktion wurde nach dem Waschen der Platte mit jeweils 200 µl Chromatin-Reagenz pro Well für 4-7 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung pro Well beendet. Jetzt konnte die Absorption bei 450 nm gemessen und die Carbonylierungsrate aus der Standardgerade berechnet werden.

### 3.2.6.2 Detektion oxidativ veränderter Proteine mittels OxyBlot™

Das OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit stellt eine sensitive Methode dar, bei der die durch oxidativen Angriff entstandenen Carbonylgruppen durch Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu 2,4-dinitrophenylhydrazon (DNP-Hydrazon) derivatisiert werden. Die derivatisierten Proteine werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese und einen anschließenden Western Blot getrennt und detektiert.

#### **Gebrauchslösungen (Kit):**

DNPH-Lösung

Neutralisationslösung

Proteinstandard mit DNP

Primärantikörper (Rabbit Anti-DNP)

Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit, HRP-conjugiert)

Derivatisierungskontroll-Lösung

#### **Gebrauchslösungen zusätzlich zum Kit:**

Transfer-Puffer

PBS

Blocking-Lösung

12 % SDS

Gel-Ladepuffer

SimplyBlue Safestain

Ponceau Rot-Lösung

ECL

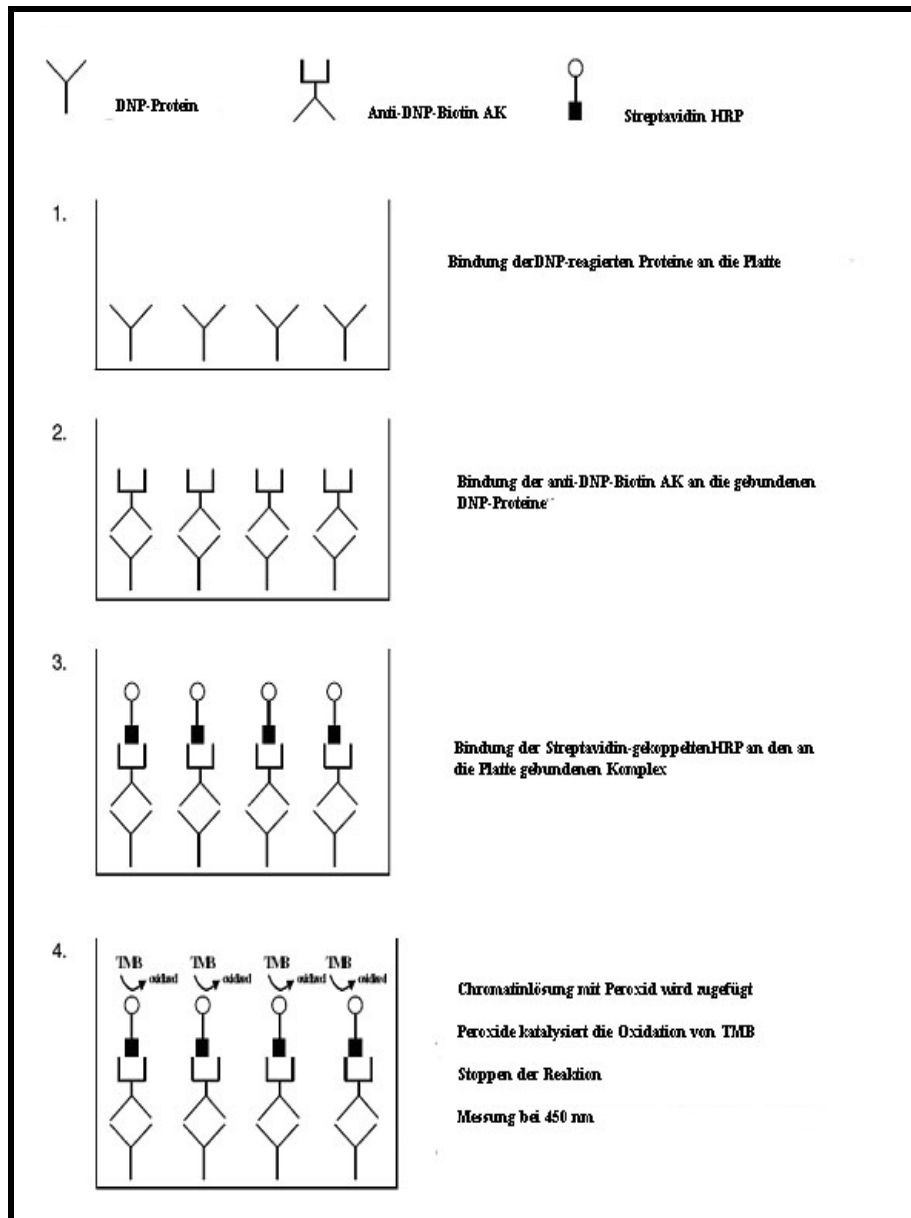


Abbildung 3-21: Schema des Proteincarbonylierungs-ELISA zur Detektion oxidativer Schäden an Proteinen

### Durchführung:

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Hirnviertel wurden unter Zugabe von Protease-Inhibitor (PMSF) mit Lyse-Puffer und TRIS-HCl auf Eis aufgetaut, bei 1200 rpm gepottet und zur endgültigen Lyse noch 10 min. auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei  $3.000 \times g$  10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abgetrennt, eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt und der Proteingehalt auf 5mg/ml eingestellt. Anschließend wurde den Proben ein Antioxidanz (DTT) bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. In den weiteren Schritten wurde jeweils mit zwei Ansätzen pro Probe gearbeitet, da für die Reaktion ein Positiv- und ein Negativwert nötig waren. Die Positivansätze wurden durch Zugabe von DNPH-Lösung derivatisiert, die Negativproben erhielten die gleiche Menge DNPH-Kontrolle. Die Reaktion

wurde nach 15 min. durch Neutralisation gestoppt. Nach Zugabe von Elektrophorese-Puffer wurden die Proben auf zwei 12%-ige NUPAGE<sup>®</sup> Novex BisTris Gele (Invitrogen) aufgetragen und die Elektrophorese nach einem Invitrogen-Protokoll durchgeführt. Nach ca. 45 Minuten konnte ein Gel zur Überprüfung der Elektrophorese mittels SimplyBlue Safestain (Invitrogen) gefärbt und eingescannt werden. Das zweite Gel wurde zum Proteintransfer auf PFDV-Membran in die Blottingkammer eingesetzt und bei konstanten 30 V für 1,5 h geblottet. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau-Färbung für 10 Minuten überprüft und die Membran anschließend wieder entfärbt. Die unspezifischen Bindungen wurden durch einstündige Inkubation in Milchlösung blockiert und die Membran nachfolgend mehrmals mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Rabbit Anti-DNP) erfolgte über Nacht auf einem Schüttler. Die Antikörperverdünnung betrug 1:150 in Milchlösung. Ungebundene Antikörper wurden am nächsten Morgen durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Membran daraufhin mit dem Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG) für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit Chemilumineszenzreagenz (ECL) behandelt und die Reaktion des an Merrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers genutzt, um die Bindung des Erstantikörpers an die Membran auf einem Film fototechnisch sichtbar zu machen.

### 3.2.6.3 Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry

Bei der Proteinbestimmung mittels des Proteinassays (Bio-Rad) nach Lowry (LOWRY et al., 1951) wird in alkalischer Lösung ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet. Dieser Komplex reduziert das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz), wodurch die Lösung eine intensiv blaue Färbung annimmt. Diese Färbung wird gegen eine BSA-Standardreihe mit bekannten Konzentrationen (0 – 1 mg/ml) bei 620 nm im Photometer detektiert und die Proteinkonzentration berechnet.

#### Gebrauchslösungen:

Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein Assay Reagenz A

Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein Assay Reagenz A

TRIS-HCL

BSA-Lösung 1 mg/ml

#### Durchführung:

5  $\mu$ l Probe bzw. Leerwert oder Standard wurden in eine (96-Well-) Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 25  $\mu$ l Reagenz A (Kupferratrlösung) und 200  $\mu$ l Reagenz B (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) wurde die Platte abgedeckt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 620 nm mittels eines Plattenreaders (ASYS Hitech Digiscan) detektiert und die Proteinkonzentration mittels des Programms Mikrowin 3.0 (Mikrotek Laborsysteme gmbH, Overath, Deutschland) berechnet. Die verwendete Standardgerade erstreckt sich von 0,1 bis 1 mg/ml BSA. Alle Standards und Proben wurden in Triplikaten gemessen.



## 4 Ergebnisse

#### 4.1 Verlauf des EU-Projektes

Generell ist in mediterranen Ländern der Konsum von Obst und Gemüse höher als in den meisten nord- und zentraleuropäischen Ländern und den USA. Einige der Hauptelemente dieser mediterranen Ernährungsweise wie z.B. Olivenöl und Rotwein sind hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirkung im Detail untersucht worden und haben unser Verständnis der positiven Effekte von speziellen pflanzlichen Inhaltsstoffen verbessert (Galli et al., 2001). Epidemiologische Studien haben ebenfalls die Auswirkungen verschiedener Elemente dieser mediterranen Traditionen auf die Lebensdauer und die Gesundheit klar demonstriert. Diese gesundheitlichen Effekte beinhalten die Prävention verschiedener Krankheiten, die kollektiv als altersbedingte Krankheiten (Aging Related Diseases, ARDs) bezeichnet werden. Die positiven Effekte beruhen auf den Wirkungen verschiedener Klassen natürlicher Produkte wie z.B. (n-6):(n-3) Fettsäuren (Simopoulos, 2004), Polyphenolen und einer Vielzahl von Vitaminen (besonders E and C) (Trichopoulou et al., 2003). Während ethnopharmakologische Ansätze intensiv zur Suche nach neuen Leitstrukturen für Medikamente genutzt worden sind (Heinrich et al., 2001), ist das Potential ähnlicher Ansätze im Bereich der Nutraceuticals nicht systematisch untersucht worden. Nützliche pharmakologische Ziele dieser Untersuchungen sollten inflammatorische Stoffwechselwege und die Gehirnfunktion positiv beeinflussen, und generell antioxidative Effekte aufweisen.

Traditionell konsumieren die mediterranen Völker eine Vielfalt an Pflanzen, die oft wildwachsend, also nicht kultiviert worden sind (Pieroni et al., 2002). Auf diese oft vergessenen Elemente der Mediterranen Diät ist das EU-Projekt "Local Food-Nutraceuticals" (LFN, QLK-CT-2001-00173) fokussiert, welches von Spezialisten aus vielen Arbeitsfeldern wie Ethnobotanik, Pharmakologie, Pharmakognosie und Ernährungswissenschaften zusammengesetzt ist.

Ziel des Projektes war es, auf der einen Seite die Entwicklung von Leitstrukturen für neue Nutraceuticals durch die Identifizierung von Pflanzen, die in ländlichen Dörfern in Süditalien, Griechenland und Südspanien konsumiert werden und positive Effekte auf die Gesundheit haben zu fördern, und auf der anderen Seite das Wissen dieser seit vielen Generationen konsumierten lokalen Nahrungsprodukte, das an den Rand des Vergessens gedrängt worden ist, zu erhalten. Deshalb wurde dieses Wissen in Form von Veröffentlichungen und Illustrationen (Nebel, 2005), (Rivera et al., 2005) konserviert und die beteiligten Regionen werden an einem eventuellen Erfolg des Projektes in Form kommerzieller Nutraceuticals finanziell beteiligt sein (Details siehe (Heinrich et al., 2005, Trichopoulou et al., 2003).

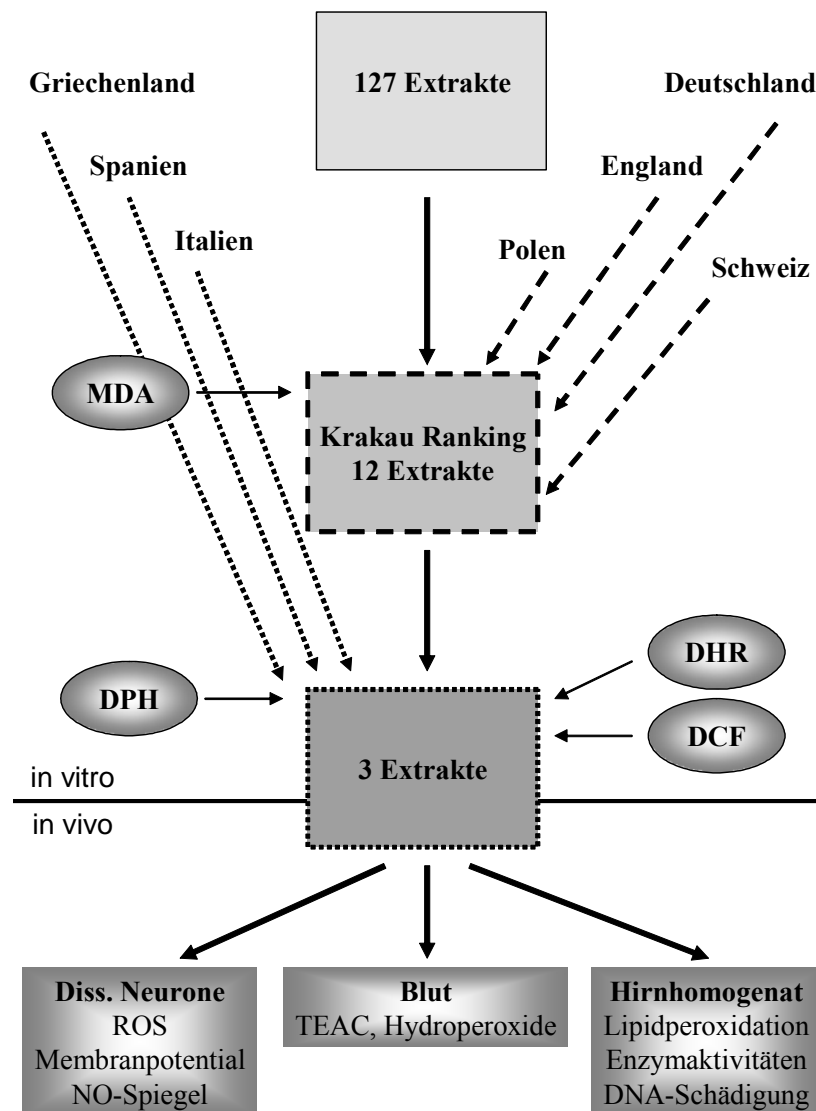


Abbildung 4-1: Verlauf des EU-Projektes und Einfluss der entscheidenden Parameter

In Abbildung 4-1 ist gezeigt, wie der Verlauf der Entscheidungsfindung während des Projektes war und dass nicht allein die Resultate der in dieser Arbeit vorgelegten Tests der Auswahl der Extrakte für die *in vitro* und *in vivo* Studien zu Grunde lagen. Es war im Gegenteil bei allen wichtigen weiterführenden Entscheidungen das ganze Konsortium beteiligt. Zu Beginn wurden von den (ethno-)botanischen Mitgliedern des EU-Konsortiums (England und Spanien) Erhebungen in verschiedenen ländlichen Regionen in Italien (Castelmezzano in Lucania und Galiciano in Südcalabrien) Spanien (Alicante, Valencia and Albacete) und Griechenland (Kreta) durchgeführt. Dabei wurde vorrangig die ältere Bevölkerung dieser Gebiete über ihre pflanzliche Nahrung, deren Form und Häufigkeit des Verzehr befragt. Wichtig waren hierbei auch die Angaben, ob dem Verzehr dieser wilden, nicht kultivierten Pflanzen eine medizinische Wirkweise zugesprochen wurde. Denn eine

weitere Aufgabe des Projektes war es dieses Wissen um die traditionell konsumierten Pflanzen und deren potentiellen gesundheitsfördernde Wirkung für nachkommende Generationen zu erhalten.

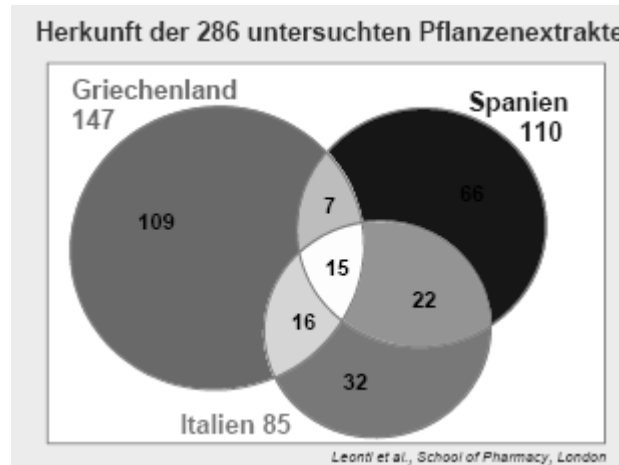


Abbildung 4-2: Herkunftsländer der gesammelten und untersuchten Pflanzen

Nach Auswertung der Fragebögen wurden 127 Pflanzen an zwei Terminen gesammelt und in England bzw. Spanien extrahiert (Abbildung 4-2). Die ethanolischen Extrakte wurden gefriergetrocknet und kleine Mengen der Lyophilisate an die pharmakologischen Gruppen (Deutschland, Polen, Italien und England) für die *in vitro* Vorauswahltests geschickt. Von allen Pflanzen wurde zusätzlich ein Vorrat an Extrakt und an trockenem Pflanzenmaterial angelegt. In Italien wurde ferner von allen Pflanzenextrakten mittels Folin-Ciocalteaus-Methode der Polyphenolgehalt bestimmt. Da Polyphenole z.B. eine breite antioxidative, anticancerogene, antimikrobielle Wirkungsweise haben, war der Gehalt dieser Substanzen ein wichtiges Kriterium bei der Charakterisierung der pflanzlichen Extrakte hinsichtlich ihres Potentials, als Nutraceuticals eingesetzt zu werden. In den vier pharmakologischen Gruppen wurden insgesamt 12 verschiedene Parameter in den Vorauswahltests untersucht. Darunter waren drei Methoden, mit denen die Fähigkeit der Extrakte, verschiedene für den Organismus schädliche Radikale abzufangen, untersucht wurden (DPPH, Oxyhämoglobin und Lipidperoxidation). In drei weiteren Tests wurde bestimmt, ob die Extrakte in der Lage waren Schlüsselenzyme von Oxidationsreaktionen zu inhibieren (Inhibition der Xanthineoxidase, Guaiacoloxidation und der Acetylcholinesterase). In vier zell-basierten Assays wurde der positive Einfluss der Extrakte auf die Proliferation von Endothelzellen (BrDU), auf die Oxidation von DNA (Comet Assay) und die Inhibition von zytokin-induzierter Zellaktivierung gemessen. Weiterhin wurde die Zytotoxizität in murinen Endothelzellen bestimmt (MTT). Der industrielle Partner (DSM) war zusätzlich an den die Aufnahme von

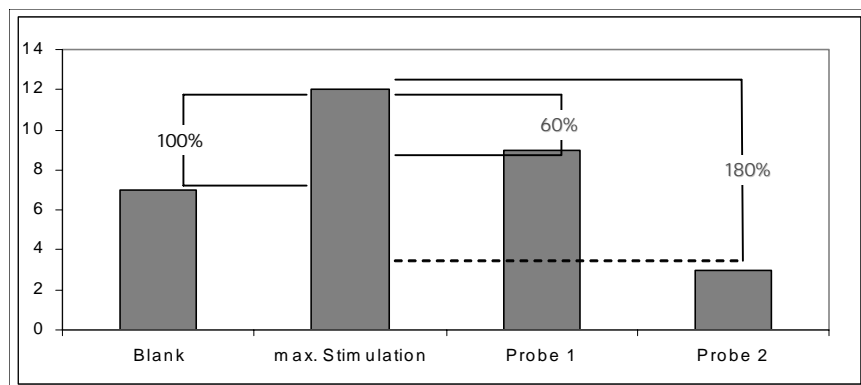
Serotonin modulierenden (hSERT) und antidiabetischen Parametern (PPAR $\gamma$ ) der Extrakte interessiert.

Nach der Auswertung der ersten Vorauswahldaten (Scening) wurde auf einem Treffen der Konsortiumsmitglieder in Krakau im Sommer 2003 eine Hitliste von 12 Pflanzen aufgestellt, die es weiter zu charakterisieren galt (Krakau Rangliste). Der nächste Schritt war nun die weitere Eingrenzung der potentiellen Extrakte auf 3 Favoriten die anschließend *in vivo* in 2 Fütterungsstudien auf ihre antioxidativen Parameter untersucht wurden. Hierbei spielten zusätzlich zu den pharmakologischen Untersuchungen botanische Faktoren eine wichtige Rolle. Es musste speziell darauf geachtet werden, dass genug Pflanzenmaterial gesammelt worden war, in welcher Form die Pflanzen traditionell konsumiert wurden oder ob unerwünschten Wirkungen bekannt waren. Die Früchte von *Arbutus unedo* (2017) sind beispielsweise in großen Mengen giftig. Weiterhin wurde bei der Auswahl darauf geachtet, Pflanzenextrakte zu untersuchen, die noch nicht ausreichend charakterisiert worden waren. Bei Extrakt 3007 (*Cynara cardunculus*) handelt es sich zum Beispiel um die bekannte Artischocke, die in weiten Teilen der Welt verzehrt wird und deren gesundheitsförderndes Potential schon lange bekannt ist. Extrakte dieser Pflanze sind in Form von Kapseln schon seit einigen Jahren in Apotheken käuflich zu erwerben.

## **4.2 Ergebnisse der *in vitro* Vorauswahltests in Hirnhomogenaten von jungen NMRI Mäusen**

### **4.2.1 Bestimmung der Lipidperoxidation nach Inkubation mit unterschiedlichen Extrakten**

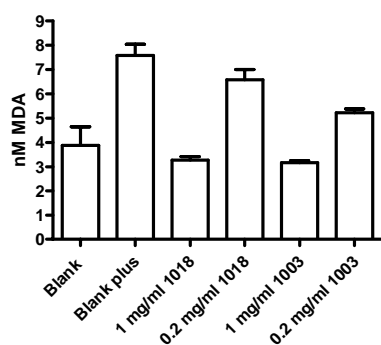
Hirnhomogenate von jungen (2-3 Monate) NMRI Mäusen wurden für vier Stunden bei 37 °C im Wasserbad mit 0,2 mg/ml Pflanzenextrakt in Anwesenheit von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 150  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> inkubiert. Zur Bestimmung der basalen und der maximalen Lipidperoxidation wurde immer eine Hirnprobe ohne Stimulantien (Blank) und eine mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Eisenchlorid (maximale Stimulation) inkubiert. Anschließend wurde die Inhibition der Bildung von Malondialdehyd (MDA) in % gegen entsprechende Negativkontrollen ohne Extrakt bestimmt und die einzelnen Extrakte hinsichtlich ihres Potentials, Lipidperoxidation zu verhindern, verglichen (Abbildung 4-3). Abbildung 4-4 zeigt am Beispiel von Extrakt 1018 und 1003 die Ergebnisse der Lipidperoxidation als nM Malondialdehyd (MDA) und als MDA Inhibition (%).



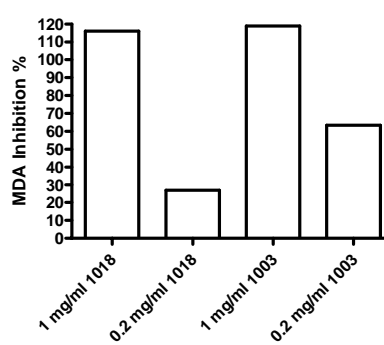
**Abbildung 4-3: Messung der Lipidperoxidation über die Hemmung der MDA-Bildung (MDA Inhibition %) in den Vorauswahltests in Hirnhomogenaten von jungen MNMRI Mäusen (2-3 Monate) in vitro.**

Die Differenz der maximalen und der basalen (Blank) Stimulation entspricht 100% Schädigung. Extrakt in Probe 1 reduziert folglich die Malondialdehydbildung um 40 %, was wiederum einer 60%-igen Inhibition entspricht. Ein anderer Extrakt in Probe 2 senkt den MDA-Spiegel sogar noch unter das Niveau des basalen Wertes, hat dementsprechend eine negative Schädigung bzw. entspricht einer MDA Inhibition von 180 %.

**a**



**b**



**Abbildung 4-4: Bestimmung der Lipidperoxidation und der Hemmung der MDA-Bildung (MDA Inhibition %) nach Inkubation mit Extrakt 1018 und 1003 in vitro.**

a) Bestimmung der Lipidperoxidation (nM MDA) nach Inkubation von Hirnhomogenaten junger (2-3 Monate) NMRI Mäuse für 4 Stunden bei 37 °C im Wasserbad.

b) Messung der Hemmung der MDA-Bildung als MDA Inhibition (%) für die Extrakte 1018 und 1003

Die Ergebnisse der Lipidperoxidations-Messung (MDA Inhibition %) für alle 125 gemessenen Extrakte sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Extrakte mit einer Aktivität von 75 % oder mehr gelten als sehr aktiv, mit einer Aktivität von 50-75 % als relativ aktive. Eine Aktivität von unter 50% weist auf eine eher niedrige Schutzfunktion vor Oxidation der Membranen hin. Von den 125 untersuchten Extrakten zeigten 47 Extrakte eine hohe Aktivität (über 75 %) Lipidperoxidation zu verhindern. 25 Extrakte zeigten mittlere Aktivitäten (25 - 50 %) und 25 eher niedrigere Aktivitäten (0 - 25 %). 15 Extrakte hatten sogar ein negatives Potential, wirkten also eher prooxidativ, in dem sie eine Peroxidation der Lipidmoleküle begünstigten. Dabei waren 5 Extrakte leicht, 7 mittel und 3 sogar stark prooxidativ.

Platz	CODE	MDA Inhibition %	Platz	CODE	MDA Inhibition %	Platz	CODE	MDA Inhibition %
1	1014	248,51	44	2005	76,28	87	1012	34,49
2	3013	198,75	45	2010	76,28	88	2047	31,91
3	1024	153,21	46	4008	75,61	89	2036	31,15
4	2015	149,65	47	2006	75,27	90	2031	31,02
5	2033	127,81	48	4004	73,89	91	3004	30,29
6	1020	126,96	49	1002	73,19	92	3010	29,32
7	4012	123,31	50	3021	73,12	93	3018	28,67
8	4013	120,06	51	2049	70,38	94	2009	27,66
9	4011	119,55	52	3005	66,83	95	1033	27,00
10	2048	118,03	53	4007	66,82	96	1018	26,92
11	1015	117,25	54	1007	66,48	97	3002	26,05
12	1005	116,40	55	1035	65,24	98	2044	19,94
13	2023	115,78	56	1006	64,12	99	1013	18,56
14	2008	114,27	57	1016	63,85	100	2020	16,84
15	1023	113,90	58	2007	63,83	101	3000	16,06
16	1017	112,02	59	1003	63,47	102	4005	16,05
17	4003	111,02	60	3003	61,82	103	1008	15,68
18	3022	108,85	61	1009	60,30	104	2024	15,24
19	4006	107,90	62	1001	59,19	105	2012	14,54
20	1032	106,68	63	4010	59,04	106	1030	14,17
21	1004	105,98	64	2001	57,7	107	3007	13,94
22	2043	105,80	65	2013	57,7	108	2026	10,21
23	3019	103,69	66	2041	56,37	109	3012	9,91
24	3011	102,53	67	3015	56,15	110	1034	1,34
25	4019	98,73	68	3016	54,29	111	2029	-6,42
26	2042	97,58	69	3023	52,48	112	2030	-8,02
27	1031	97,33	70	1010	52,27	113	2027	-8,29
28	4001	96,94	71	2040	51,78	114	2019	-18,45
29	1021	95,45	72	2028	50,53	115	1025	-20,59
30	4009	95,10	73	1029	49,73	116	2003	-26,93
31	2021	94,65	74	2014	49,58	117	2002	-28,34
32	2037	92,23	75	2032	48,93	118	1028	-28,61
33	2045	92,04	76	1019	48,13	119	1027	-30,48
34	3006	87,95	77	3009	48,03	120	1036	-40,64
35	2050	85,03	78	2011	46,42	121	2018	-47,06
36	4014	84,71	79	1022	45,99	122	2035	-74,07
37	3008	84,61	80	4015	45,80	123	1026	-128,08
38	2025	83,29	81	3014	44,42	124	2022	-141,18
39	2016	82,09	82	3017	39,94	125	2034	-147,86
40	4016	81,91	83	3001	37,74	126	3020	
41	2038	80,89	84	2017	36,11	127	3024	
42	1011	78,92	85	2004	35,23			
43	2039	77,39	86	2046	35,16			

Tabelle 4-1: Messung der Hemmung der MDA-Bildung als MDA Inhibition (%) aller 127 Extrakte

### 4.3 Vergleich der Ergebnisse der Vorauswahl-Parameter und Zusammenstellung der Krakau Rangliste

Durch Vergleich der Vorauswahl-Ergebnisse aller pharmakologischen Forschungsgruppen wurden die Pflanzenextrakte mit den vielversprechendsten Ergebnissen zusammengestellt (Krakau Rangliste). Eine Auswertung und Zusammenfassung aller Screening-Ergebnisse wird demnächst veröffentlicht (Understanding Local Mediterranean Diets: A Joint Ethnobotanical and Phyto-pharmacological Approach, Pharmacological Research, in press). Diese 12 interessanten Extrakte sind in Tabelle 4-2 mit ihren Pflanzennamen und den drei unterschiedlichen Herkunftsländern aufgelistet.

Code	Pflanzename	Herkunft
3012	<i>Reichhardia picroides</i>	Italien
1014	<i>Reichhardia picroides</i>	Griechenland
3018	<i>Urospermum dalechampi</i>	Italien
3007	<i>Cynara cardunculus</i>	Italien
1020	<i>Urospermum picroides</i>	Griechenland
2025	<i>Thymus piperella</i>	Spanien
1004	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Griechenland
2026	<i>Ziziphus jujuba</i>	Spanien
3017	<i>Thymus pulegioides</i>	Italien
2017	<i>Arbutus unedo</i>	Spanien
2009	<i>Scandix australis</i>	Spanien
1016	<i>Scandix pecten-veneris</i>	Griechenland

Tabelle 4-2: 12 Extrakte der Krakau Rangliste

#### 4.3.1 Ergebnisse der zusätzlich gemessenen antioxidativen Parameter für die Pflanzenextrakte der Krakau Rangliste.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die Extrakte der Krakau Rangliste zur weiteren Charakterisierung zusätzlich zu den oben aufgeführten Vorauswahl-Parametern auf ihr Potential, die Mitochondrien- und Cytosol-assoziierte ROS-Spiegel zu reduzieren (ROS-Inhibition %) und die Rigidisierung der Zellmembranen (DPH Inhibition %) zu verhindern, untersucht.



#### 4.3.1.1 Potential der Extrakte, Mitochondrien- und Cytosol-assoziierte ROS abzufangen

Zur Bestimmung des Potentials der Extrakte die in den Mitochondrien und im Cytosol gebildete ROS abzufangen, wurden dissoziierte Neuronen von jungen NMRI Mäusen mit 0,2 mg/ml Extrakt für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und nach dem Auswaschen überschüssigen Extrakts mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Zur Determinierung der Mitochondrien-assoziierten ROS wurden die Neurone für 15 Minuten mit Dihydrorhodamin 123 (DHR, 10  $\mu$ M) inkubiert und die Fluoreszenz bei 500 nm (Excitation) und 536 nm (Emission) im Multilablereader der Firma Perkin Elmer detektiert (Abbildung 4-6). Um die Cytosol-assoziierten ROS zu bestimmen, wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C mit 10  $\mu$ M Dichlorofluorescein (DCF) inkubiert und der überschüssige Farbstoff ebenfalls durch Waschen entfernt. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm (Excitation) and 530 nm (Emission) gemessen (Abbildung 4-7). Beide Farbstoffe durchdringen die Zellmembran und lagern sich im Inneren der Zellen, entweder im Cytosol oder an den Mitochondrien an und lassen so Rückschlüsse auf die spezifischen ROS zu. Alle ROS-Proben wurden nach der Aufnahme der basalen ROS-Spiegel durch Zugabe von 10  $\mu$ M Vitamin C und 1  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Quercetin in der halbmaximalen effektiven Konzentration (5  $\mu$ M) eingesetzt (Abbildung 4-5). Dieser EC<sub>50</sub>-Wert wurde in Vorversuchen ermittelt.

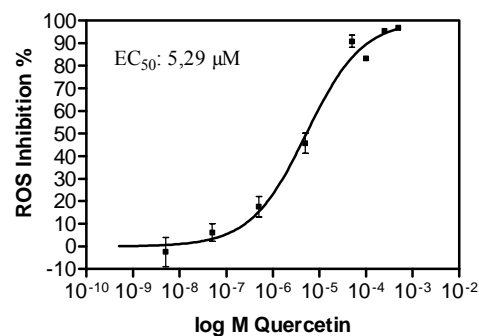
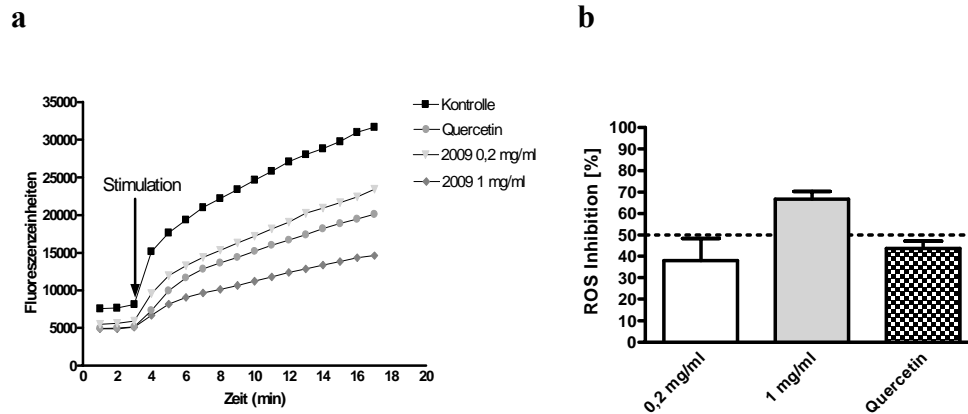


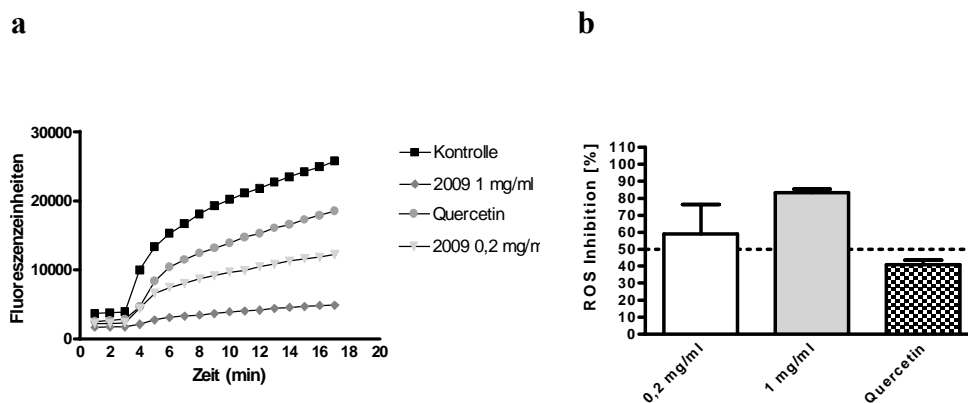
Abbildung 4-5: EC<sub>50</sub>-Bestimmung für Quercetin bei Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR)

Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentration von Quercetin, mitochondriale ROS-Spiegel zu verhindern (Inhibition %), Mittelwerte + SEM, n = 4.



**Abbildung 4-6:** Beispiel einer mitochondrialen ROS-Messung am Multilablereader (Victor) nach Stimulation mit Vitamin C und Eisenchlorid unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Extrakt 2009 in Fluoreszenzeinheiten und die Darstellung der Hemmung des maximalen Effekts als Inhibition %.

- a) basale und mit Vitamin C und Eisenchlorid stimulierte ROS-Messung für Extrakt 2009 und Quercetin (5 μM) am Multilablereader (Victor) in 2 verschiedene Konzentrationen (0,2 und 1 mg/ml).  
 b) Darstellung der ROS Inhibition in % für Extrakt 2009 und Quercetin als Positivkontrolle, Mittelwert + SEM, n = 5-8.



**Abbildung 4-7:** Beispiel einer cytosolischen ROS-Messung am Multilablereader (Victor) nach Stimulation mit Vitamin C und Eisenchlorid unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Extrakt 2009 in Fluoreszenzeinheiten und die Darstellung der Hemmung des maximalen Effekts als Inhibition %.

- a) basale und mit Vitamin C und Eisenchlorid stimulierte ROS-Messung für Extrakt 2009 und Quercetin (5 μM) am Multilablereader (Victor) in 2 verschiedene Konzentrationen (0,2 und 1 mg/ml).  
 b) Darstellung der ROS Inhibition in % für Extrakt 2009 und Quercetin als Positivkontrolle, Mittelwert + SEM, n = 5-8.

#### 4.3.1.2 Einfluss der Extrakte auf die Membranfluidität

Als Maß für die Membranfluidität wurde die Anisotropie nach Inkubation mit den Extrakten bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml in Hirnhomogenaten wie unter 3.2.2.2 beschrieben bestimmt. Dabei sind Extrakte mit einer DPH Inhibition von 5 % sehr aktiv.

In Tabelle 4-3 sind die Ergebnisse der weiterführenden *in vitro* Charakterisierung für alle Extrakte der Krakau-Rangliste angegeben.

Code	DPH Inhibition %	DHR Inhibition %	DCF Inhibition %
3012	0,68	18,68	39,47
1014	2,37	49,36	41,15
3018	0,05	38,37	67,43
3007	4,35	46,94	41,38
1020	0,26	39,24	50,56
2025	4,49	92,31	93,79
1004	3,39	11,01	36,65
2026	-9,18	31,81	18,90
3017	5,81	78,05	66,99
2017	-1,26	37,36	51,99
2009	0,66	37,96	59,05
1016	-0,08	46,75	37,32

**Tabelle 4-3: Ergebnisse der weiterführenden Charakterisierung der Krakau Rangliste.**

Die 12 untersuchten Extrakte wiesen bis auf Extrakt 3017 keine gute DPH-Inhibition auf (über 5 %). 3 Extrakte zeigten mittlere (2,5 – 5 %) und 5 Extrakte zeigten niedrige (0 – 2,5 %) Resultate. Extrakte 1016, 2017 und 2026 erwiesen sich sogar als prooxidativ, wobei 2026 den stärksten schädigenden Effekt aufwies. Die Extrakte 1004 und 3012 hatten die niedrigsten Ergebnisse bei der DHR-Inhibition (unter 25 %). 8 Extrakte zeigten mittlere und 3017 und 2025 hohe DHR-Inhibition. Extrakt 2026 zeigte auch ein eher niedriges Potential die cytosolischen ROS zu reduzieren (18,9 %). 5 Extrakte hatten mittlere (25 – 50 %) und 6 Extrakte gute Ergebnisse (über 50 %). Insgesamt war Extrakt 3017 in den drei Test der mit dem positivsten Potential.

### 4.3.1.3 Auswahl der drei Extrakt für die in vivo Untersuchungen

Auf der Basis der in vitro Ergebnisse sollten nun die drei interessantesten Extrakte herausgegriffen werden und in zwei Fütterungsstudien (*ex vivo*) auf ihr antioxidatives Potential untersucht werden. Nach Vergleich der Vorauswahl-Parameter aller pharmakologischen Gruppen und der zusätzlichen Faktoren, entschied sich das Konsortium für die folgenden drei Extrakte: **1014** (*Reichardia picroides*), **1020** (*Urospermum picroides*) und **2025** (*Thymus piperella*). In Tabelle 4-4 sind die Ergebnisse aller antioxidativen Tests für die in Krakau ausgewählten Extrakte abgebildet. Zum besseren Verständnis sind die Resultate in Form von Symbolen angegeben. Ein ausgefüllter Kreis bedeutet hohe Aktivität, ein Halbkreis mittlere Aktivität und ein unausgefüllter Kreis steht für keine bis wenig Aktivität. Die den Symbolen entsprechenden Zahlenwerte sind für jeden Test in Tabelle 4-5 angegeben.

CODE	DPPH <sup>1</sup>	Oxy-Hb <sup>2</sup>	MDA <sup>3</sup>	XO <sup>4</sup>	G-OH <sup>5</sup>	MTT <sup>6</sup>	DHR <sup>7</sup>	DCF <sup>8</sup>	DPH <sup>9</sup>
1004	◐	○	●	○	◐	○	○	◐	◐
1014	○	●	●	●	●	○	◐	◐	○
1016	○	◐	◐	○	◐	○	◐	◐	○
1020	○	◐	●	○	●	○	◐	●	○
2009	○	◐	○	●	●	○	◐	●	○
2017	●	○	○	◐	●	◐	◐	●	○
2025	◐	●	●	●	●	○	●	●	◐
2026	●	○	○	○	○	○	◐	○	○
3007	○	○	○	●	●	●	◐	◐	◐
3012	◐	○	○	●	●	○	○	◐	○
3017	○	◐	○	◐	●	◐	●	●	●
3018	◐	○	○	○	●	●	◐	●	○

Tabelle 4-4: Resultate der antioxidativen Vorauswahl-Parameter, der zusätzlichen Tests und des MTT-Tests der in der Krakau ausgewählten Extrakte.

Als zusätzliches Kriterium wurde die Zytotoxizität im MTT-Assay untersucht. Auf Grund der hohen Zytotoxizität wurden die Extrakte 2017, 3007, 3017 und 3018 für eine Fütterung ausgeschlossen. Extrakt 2016 zeigte ebenfalls wenig gute Ergebnisse und wurde deshalb abgelehnt. Extrakt 1014 und 2025 zeigten beide mindestens 6 gute oder mittlere Ergebnisse und wurden somit für eine weitere Untersuchung ausgewählt. Extrakte 1004 und 1016 hatten für eine Qualifikation eindeutig zu wenig gute Resultate. Aus den übrigen Kandidaten wurde der Extrakt 1020 ausgewählt, da er im Gegensatz zu Extrakt 2009 eine hohe MDA-Inhibition

aufwies. Alle drei Extrakte zeigten in mindestens fünf Assays sehr gute bis gute Ergebnisse. Extrakte 1014 erzielte sogar sechs sehr gute und ein mittleres Resultat und Extrakt 2025 sogar sechs sehr gute Aktivitäten und zwei mittlere Resultate.

TEST		HOCH		MEDIUM		NIEDRIG	KONZ.
<sup>1</sup> DPPH	●	≥ 50 %	◐	30%-49%	○	< 30 %	1mg/ml
<sup>2</sup> OxyHb	●	≥ 50%	◐	50%-25%;	○	< 25%	0,2 mg/ml
<sup>3</sup> MDA	●	≥ 75%	◐	50%-75%	○	< 50%	0,2 mg/ml
<sup>4</sup> XO	●	≥ 20%	◐	10%-19%	○	< 10%	0,1 mg/ml
<sup>5</sup> GOH	●	≥ 75%	◐	75%-50%	○	< 50%	0,2 mg/mL
<sup>6</sup> MTT	●	≤ 75%	◐	90%-75%	○	> 90%	0,1 mg/ml
<sup>7</sup> DHR	●	≥ 50%	◐	50%-25%;	○	< 25%	0,2 mg/ml
<sup>8</sup> DCF	●	≥ 50%	◐	50%-25%;	○	< 25%	0,2 mg/ml
<sup>9</sup> DPH	●	≥ 5%	◐	5%-2,5%;	○	< 2,5%	0,2 mg/ml

Tabelle 4-5: Legende zu Tabelle 4-4: Erläuterung der in Tabelle 4-4 verwendeten Symbole. Hemmung der Effekte in den jeweiligen Testsystemen als hohe, mittlere und niedrige Aktivität.

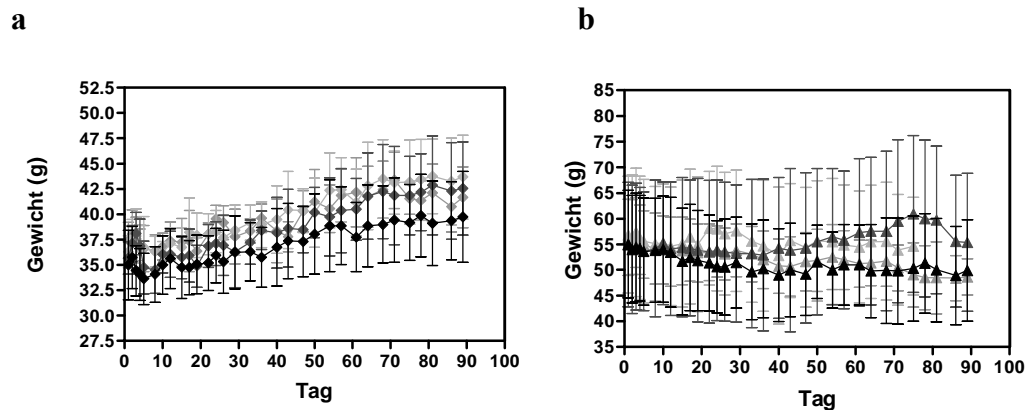
#### 4.4 Durchführung und Ergebnisse der Fütterungsstudien an weiblichen NMRI Mäusen mit mediterranen Pflanzenextrakten (*ex vivo*)

##### 4.4.1 Auswertung der Fütterungsstudien

Die drei Extrakte (1014, 1020 und 2025) wurden für die anschließenden Fütterungsstudien von der Firma ssniff Spezialdiäten (Soost, Deutschland) in Futterpellets gepresst. Dazu waren im Vorfeld das Gewicht und die tägliche Futteraufnahme in jungen (2-3 Monate) und alten (18 Monate) NMRI (Naval Medical Research Institute) Mäusen bestimmt worden. Die erste Alterstufe war ausgewählt worden, da die Tiere nach einer dreimonatigen Behandlung mit 6 Monaten noch zu den jungen Tieren gehören. 21 Monate alte Tiere sind, wie in vorher in der Arbeitsgruppe untersuchten Studien herausgefunden wurde, ein gutes Modell, um die Verhältnisse im Alter darzustellen. Bei einem noch höherem Alter würde auf Grund von altersselektiven Vorgängen die Kohorte nicht mehr einer normal gealterten Gruppe entsprechen.

Die Futteraufnahme entsprach bei beiden Alterstufen etwa 5g/Tag. Da sich die Gewichte aber deutlich unterschieden - junge Tiere wogen im Durchschnitt 32 g und alte Tiere 55 g - , wurden für jedes Alter Futterpellets mit der entsprechenden Extraktmenge hergestellt, um eine tägliche Extraktaufnahme von 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag zu erreichen. Die

Kontrolltiere erhielten während der Studien ebenfalls Pellets der gleichen Zusammensetzung, allerdings ohne Extraktzusatz. Beide Fütterungsstudien wurden über einen Zeitraum von 90 Tagen im institutseigenen Tierstall durchgeführt. Die Tiere erhielten täglich ihr Futter ad libitum, wobei die tatsächlich aufgenommene Menge durch Ein- und Auswaage des Futters festgestellt wurde (Abbildung 4-9). Das Gewicht der Tiere wurde durch kontinuierliches Wiegen protokolliert.

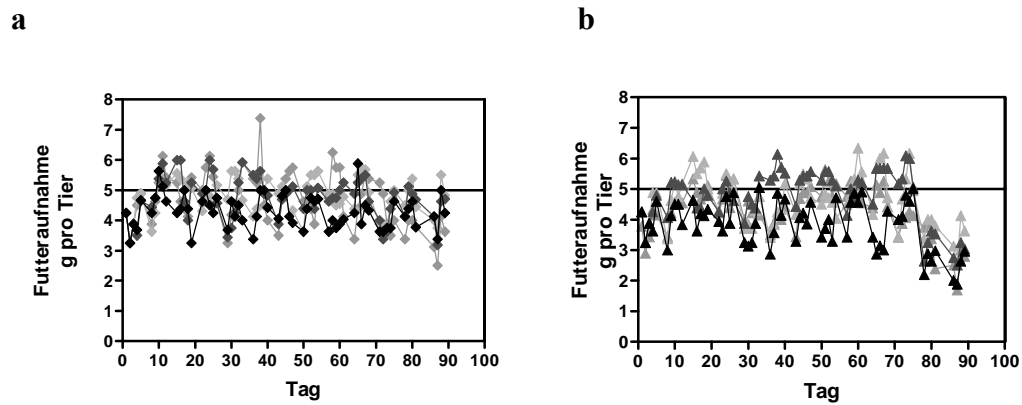


**Abbildung 4-8: Gewicht der jungen und alten Tiere in Fütterungsstudie I in g.**

a) Veränderung des Gewichts von jungen (3 Monate) NMRI Tieren im Verlauf der Fütterungsstudie (90 Tage) (Kontrollgruppe  $\blacklozenge$ , Extrakt 20215  $\blacktriangle$ , Extrakt 1014  $\blacklozenge$ , Extrakt 1020  $\blacktriangle$ ), Mittelwert und SD.

b) Gewicht von alten (18 Monate) NMRI Tieren im Verlauf der Fütterungsstudie (90 Tage) (Kontrollgruppe  $\blacklozenge$ , Extrakt 20215  $\blacktriangle$ , Extrakt 1014  $\blacklozenge$ , Extrakt 1020  $\blacktriangle$ ), Mittelwert und SD.

Wie in Abbildung 4-8a zu sehen ist, hat sich das Gewicht der jungen Tiere im Verlauf der Fütterungsstudie in allen vier Gruppen gesteigert. Das Gewicht der alten Tiere (Abbildung 4-8 b) hat sich bis auf die Gruppe, der Extrakt 1014 gefüttert wurde, leicht reduziert. Diese Tatsache könnte auf einen positiven Effekt des Extraktes hinweisen, da alte Tiere und auch Menschen in Alter tendenziell eher Gewicht verlieren. Die relativ großen Abweichungen vor allem bei den alten Tieren beruht auf einem großen Gewichtsunterschied der alten Gruppenmitglieder. Dasselbe Bild zeigte sich bei den Tieren der zweiten Fütterungsstudie (Graphen nicht gezeigt). Auch hier nahm das Gewicht der jungen Tiere kontinuierlich auf durchschnittlich 40 g zu und das Gewicht der alten Tiere verringerte sich bis zum Ende der Studie leicht. Die Abbildung 4-9 zeigt die tägliche Futteraufnahme junger und alter NMRI Tiere der ersten Studie über die 90 Tage der Behandlungsdauer. In jungen Tieren hat sich diese Aufnahme von 5 g pro Tag nicht verändert. Die alten Tiere aller Gruppen haben jedoch eine niedrigere Futteraufnahme pro Tag über die letzten 10 Tage als vorher. Allerdings hatte die Reduktion keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf, die Tiere haben also nicht gehungert.

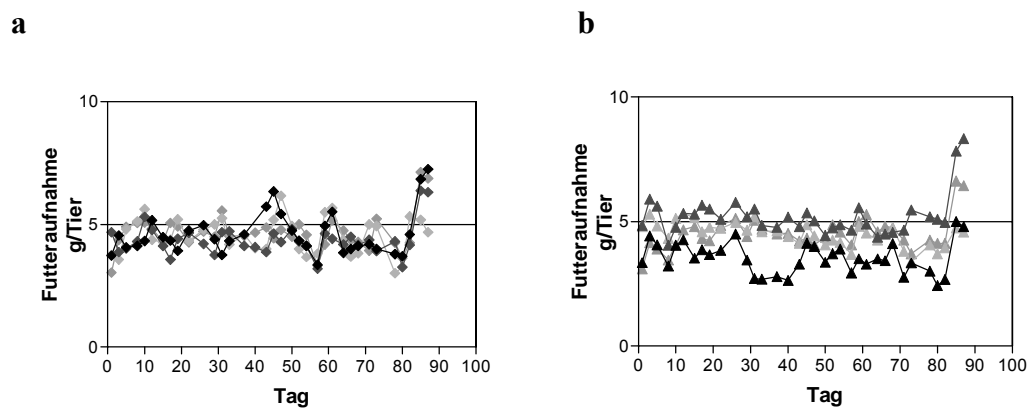


**Abbildung 4-9: Tägliche Futtermittelaufnahme junger und alter NMRI Mäuse in Fütterungsstudie I (g pro Tier)**

a) Futtermittelaufnahme der jungen NMRI Mäuse (3-6 Monate) in g pro Tier und Tag (Kontrollgruppe ♦, Extrakt 20215 ♦, Extrakt 1014 ♦, Extrakt 1020 ♦)

b) Futtermittelaufnahme alter NMRI Mäuse (18-21 Monate) in g pro Tier und Tag (Kontrollgruppe ♦, Extrakt 20215 ♦, Extrakt 1014 ♦, Extrakt 1020 ♦)

Abbildung 4-10 zeigt die gleichen Graphen für die zweite Fütterungsstudie. Hier nimmt die Futtermittelaufnahme in den letzten Tagen vor dem Ende der Studie in beiden Alterstufen in einigen Gruppen zu.

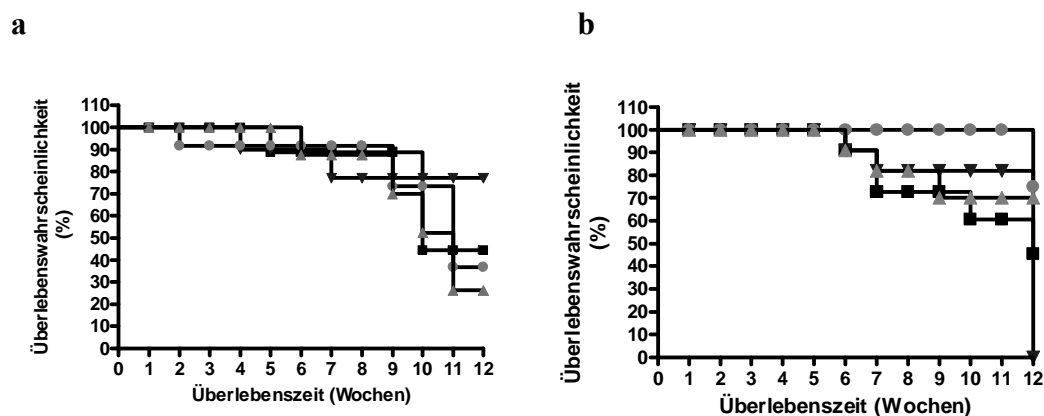


**Abbildung 4-10: Tägliche Futtermittelaufnahme junger und alter NMRI Mäuse in Fütterungsstudie II (g pro Tier)**

a) Futtermittelaufnahme der jungen NMRI Mäuse (3-6 Monate) in g pro Tier und Tag (Kontrollgruppe ♦, Extrakt 20215 ♦, Extrakt 1014 ♦, Extrakt 1020 ♦)

b) Futtermittelaufnahme alter NMRI Mäuse (18-21 Monate) in g pro Tier und Tag (Kontrollgruppe ♦, Extrakt 20215 ♦, Extrakt 1014 ♦, Extrakt 1020 ♦)

Bei den durchgeführten Studien handelt es sich um Studien mit definiertem Endpunkt. Alle Tiere haben für 90 Tage die mit den Extrakten angereicherten Pellets oder das Kontrollfutter bekommen. Dennoch gab es, wahrscheinlich auf Grund des Alters der Tiere und ihrem genetischen Hintergrund, Todesfälle, die zur Berechnung einer Überlebenskurve herangezogen wurden. In Abbildung 4-11 ist die Überlebenszeitwahrscheinlichkeit (%) der alten gefütterten Mäuse nach Kaplan-Meier aufgetragen. Die Graphen für die einzelnen Fütterungsgruppen sind nicht signifikant verschieden gegenüber den Kontrollgruppen. Das bedeutet, dass die Extraktaufnahme keinerlei Einfluss auf die Überlebenszeit der Tiere hatte. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug in der ersten Fütterungsstudie für die Kontrolltiere 10 und für die Extraktgruppen 11 Wochen und in der zweiten Studie für alle Gruppen 12 Wochen. Die Todesfälle in den alten Gruppen hängen wahrscheinlich nur mit dem fortgeschrittenen Alter und dem damit verbundenen verschlechterten Gesundheitszustand der Tiere zusammen. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in keiner der beiden Fütterungsstudien Todesfälle in den jungen Tieren zu verzeichnen waren. Würden die Extrakte nicht vertragen, sollte das aber der Fall sein. Insgesamt sind während der ersten Fütterungsstudie 12 und in der zweiten Studie 15 Tiere verstorben (Tabelle 4-6). Allerdings ist die Fallzahl in den beiden Studien zu niedrig für eine gesicherte Aussage.



**Abbildung 4-11: Überlebensanalyse nach Kaplan –Meier für die alten Tiere der Fütterungsstudien**

- a) Überlebenswahrscheinlichkeit (%) für die alten (21 Monate) NMRI Mäuse der ersten Fütterungsstudie, (Kontrollgruppe ■, Extrakt 20215 ▲, Extrakt 1014 ●, Extrakt 1020 ▼).
- b) Überlebenswahrscheinlichkeit (%) für die alten (21 Monate) NMRI Mäuse der zweiten Fütterungsstudie, (Kontrollgruppe ■, Extrakt 20215 ▲, Extrakt 1014 ●, Extrakt 1020 ▼).



a

Studie I	eingesetzte Tiere	überlebenden Tiere	eingesetzte Tiere	überlebenden Tiere
	18 Monate	21 Monate	3 Monate	6 Monate
<b>Extrakt 1020</b>	8	6	8	8
<b>Extrakt 1014</b>	8	3	8	8
<b>Extrakt 2025</b>	8	4	8	8
<b>Kontrolle</b>	8	5	8	8

b

Studie II	eingesetzte Tiere	überlebenden Tiere	eingesetzte Tiere	überlebenden Tiere
	18 Monate	21 Monate	3 Monate	6 Monate
<b>Extrakt 1020</b>	10	4	8	8
<b>Extrakt 1014</b>	10	9	8	8
<b>Extrakt 2025</b>	10	7	8	8
<b>Kontrolle</b>	10	5	10	10

Tabelle 4-6: Anzahl der in den Fütterungsstudien I und II eingesetzten und überlebenden Tiere

a) Anzahl der jungen und alten Tiere die ein Fütterungsstudie I eingesetzt wurden und die Zahl der Überlebenden  
 b) Anzahl der jungen und alten Tiere die ein Fütterungsstudie II eingesetzt wurden und die Zahl der Überlebenden

#### 4.4.2 Effekt der mediterranen Pflanzenextrakte auf antioxidative Parameter junger und alter NMRI Mäuse

Weiblichen NMRI Mäuse wurden genutzt um die Effekte einer dreimonatiger Fütterung mit den Extrakten 1014, 1020 und 2025 auf verschiedene antioxidative Parameter zu untersuchen. Dabei sollte auch ein eventueller Alterseinfluss untersucht werden. Es wurden dazu zwei verschiedene Alterstufen in den Studien eingesetzt wurden. 3 Monate alte Tiere dienten als Model für die junge Altersstufe und 18 Monate alte Tiere für die alte Gruppe. Nach Beendigung der Studien waren die Tiere 6 bzw. 21 Monate alt. Da NMRI Tiere eine durchschnittliche Lebenserwartung von 24 Monaten haben, waren 21 Monate ein gutes Alter, um Alterseffekte zu untersuchen, ohne zu viele Tiere an normaler Altersschwäche oder altersbedingten Erkrankungen zu verlieren.

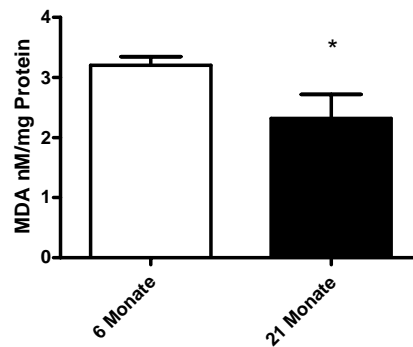
Hirnhomogenate der Mäuse aus der ersten Studie wurden auf Lipidperoxidation (MDA) und die Aktivitäten der antioxidativen Enzyme Glutathion Peroxidase (GPx), Glutathion Reduktase (GR) und Superoxid Dismutase (Cu/Zn-SOD) hin analysiert. Das Membranpotential, die NO-Spiegel und die mitochondrialen und cytosolischen ROS-Spiegel wurden in einer weiten Fütterungsstudie aus dissoziierten Neuronen bestimmt. Die Hydroperoxid-Spiegel wurden aus dem Vollblut der Tiere der ersten und die Antioxidative Kapazität aus dem Vollblut bzw. dem Serum von Fütterungsstudie II gemessen. Zusätzlich wurde die Rate der DNA- Schädigung aus Gehirngewebe und die Protein-Schädigung aus dem Serum der zweiten Studie für die Kontroll- und Extrakt 1014-Gruppe gemessen.

#### 4.4.2.1 Messung der antioxidativen Parameter aus murinem Hirnhomogenat (*ex vivo*)

##### 4.4.2.1.1 Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation stellt ein Maß für die Schädigung zellulärer Strukturen durch freie Radikale dar. Diese Schädigung lässt sich durch Bestimmung von Endprodukten der Lipidperoxidation z.B. von Aldehyden nachweisen. In dieser Arbeit wurde die Lipidperoxidation durch Messung der Malondialdehyd-Konzentration (MDA, nM/ mg Protein) bestimmt. Wie in vorhergehenden Versuchen in der Arbeitsgruppe festgestellt worden war (S. Hauptman und K.Schüssel, persönliche Kommunikation), sinkt der MDA-Gehalt in alten (21 Monate) Tieren im Gegensatz zu jungen (2-3 Monate) Tieren signifikant. Dieser Effekt auf die basale Lipidperoxidation konnte auch in den Kontrolltieren der Fütterungsstudie wieder gefunden werden (Abbildung 4-12). Neben der basalen Lipidperoxidation wurden die Proben noch für 30 Minuten mit Eisenchlorid (50  $\mu$ M) inkubiert, um die Kapazität der ROS-Detoxifikation in einem funktionalen Test zu analysieren und eine *in vitro*-Stimulation der Lipidperoxidation zu erreichen. Durch diese Stimulation werden vermehrt ROS via Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion gebildet und dadurch die Oxidation der Membranlipide zu Aldehyden begünstigt. Die mit Eisenchlorid stimulierte Lipidperoxidation wies nur einen Trend zu reduzierten MDA-Level auf. Vergleicht man den Grad der Stimulation mit den (*in vitro*) Vorversuchen ist deutlich zu erkennen, dass die Stimulation mit Eisenchlorid und Wasserstoffperoxid bei den *in vivo* Daten geringer ausfällt als bei den *in vitro* Experimenten. Dieser Effekt könnte auf der einen Seite mit dem erhöhten Alter der Tiere aus der Fütterungsstudie zusammenhängen, die ca. 3 Monate älter waren als die für die Vorversuche eingesetzten Tiere. Auf der anderen Seite kann das unterschiedliche Futter einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit haben, da die in der

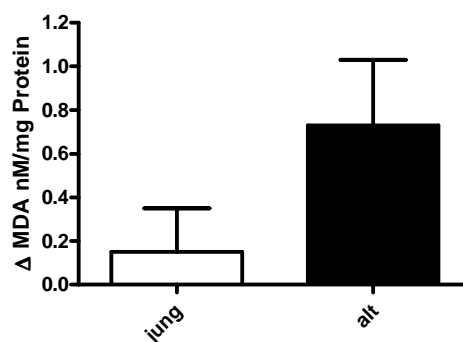
Studie eingesetzten Tiere während der der Dauer der Untersuchung ein anderes Futter erhalten haben als die Tiere in den Vorversuchen. Dieses Futter enthält deutlich mehr Vitamine. Zum Beispiel ist der Vitamin E-Anteil um 30 % höher als im früher verwendeten Futter und da viele Vitamine als Antioxidantien wirken, könnte die Zusammensetzung des Futters die unterschiedlichen Ergebnisse zur Folge haben.



**Abbildung 4-12: Alterseffekt auf basale Lipidperoxidation im Gehirn von jungen und alten NMRI-Mäusen.**

Die Lipidperoxidation wurde im Hirnhomogenat von jungen (6 Monate,  $n = 8$ ) und alten (21 Monate,  $n = 5$ ) Mäusen als Malondialdehyd (MDA) Level (nM/mg Protein) bestimmt. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0334$  Student's t-Test.

Wie in Abbildung 4-13 erkennbar, haben alte Tiere zwar niedrigere MDA-Level als junge Mäuse, jedoch zeigt die Stimulation mit Eisenchlorid einen deutlicheren Effekt ( $\Delta$  MDA).



**Abbildung 4-13: Scavenging-Aktivität in jungen (6 Monate,  $n = 8$ ) und alten (21 Monate,  $n = 5$ ) NMRI-Mäusen.**

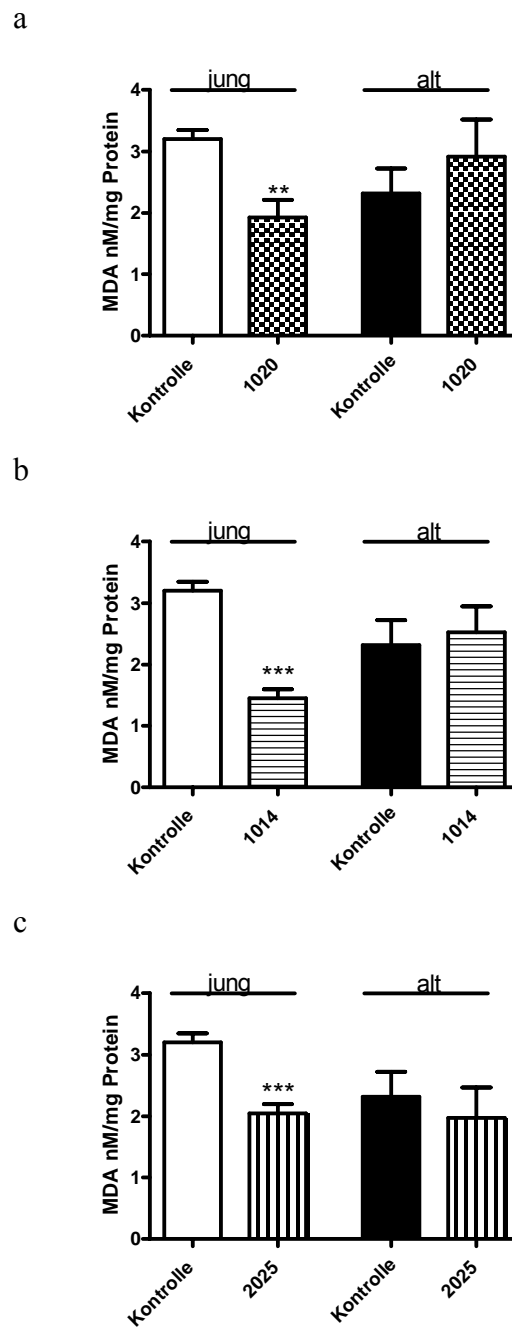
Scavenging-Aktivität ( $\Delta$  MDA nM/mg Protein) junger und alter NMRI Mäuse (Differenz Stimulation und basalen MDA-Spiegel).

Alte Tiere haben folglich eine erniedrigte Kapazität gegenüber exogen generiertem oxidativem Stress als junge Tiere (Abbildung 4-13). Das bedeutet alte Tiere sind nicht in der

Lage die exogen stimulierten ROS zum gleichen Ausmaß abzufangen wie junge Tiere. Im Weiteren wird diese Fähigkeit als Scavenging-Aktivität oder Radikalfangeigenschaft bezeichnet werden.

Weiterhin wurde der Einfluss der drei verschiedenen mediterranen Extrakte auf die basale und stimulierte Lipidperoxidation in jungen und alten NMRI Mäusen nach dreimonatiger Extraktfütterung bestimmt. Dabei zeigt der *Urospermum picroides*-Extrakt (1020) den schwächsten Effekt. Extraktaufnahme über 90 Tage senkt hier die basalen MDA-Spiegel in jungen Tieren. Jedoch war der Extrakt nicht in der Lage die basale MDA-Bildung in alten Tieren zu verringern (Abbildung 4-14 a). Extrakt 1014 (*Reichhardia picroides*) senkte die basalen MDA-Spiegel in jungen Tieren (Abbildung 4-14 b). Im Alter scheint die Aufnahme dieses Extrakts allerdings keinen positiven Einfluss zu haben. Der Extrakt aus *Thymus piperella* (2025) zeigt genau wie Extrakt 1020 eine Reduktion der basalen MDA-Spiegel in jungen Tieren. Die basale Lipidperoxidation in alten Tieren war nach Extraktaufnahme ebenfalls nicht verändert (Abbildung 4-14 c).

Nach *in vitro*-Stimulation mit Eisenchlorid zeigte Extrakt 1020 keinerlei positive Reduktion des Lipidperoxidations-Produktes (MDA), weder in jungen noch in alten Tieren (Abbildung 4-15 a). Eine Fütterung mit Extrakt 1014 reduzierte die Lipidperoxidation nach Stimulation jedoch stark in jungen Tieren (Abbildung 4-15 b). Auch Extrakt 2025 zeigte noch einen positiven Einfluss auf die MDA-Spiegel in jungen Tieren (Abbildung 4-15 c). Allerdings resultierte die *in vitro* Stimulation für Extrakt 2025 in signifikant erhöhten MDA-Level in alten Tieren.

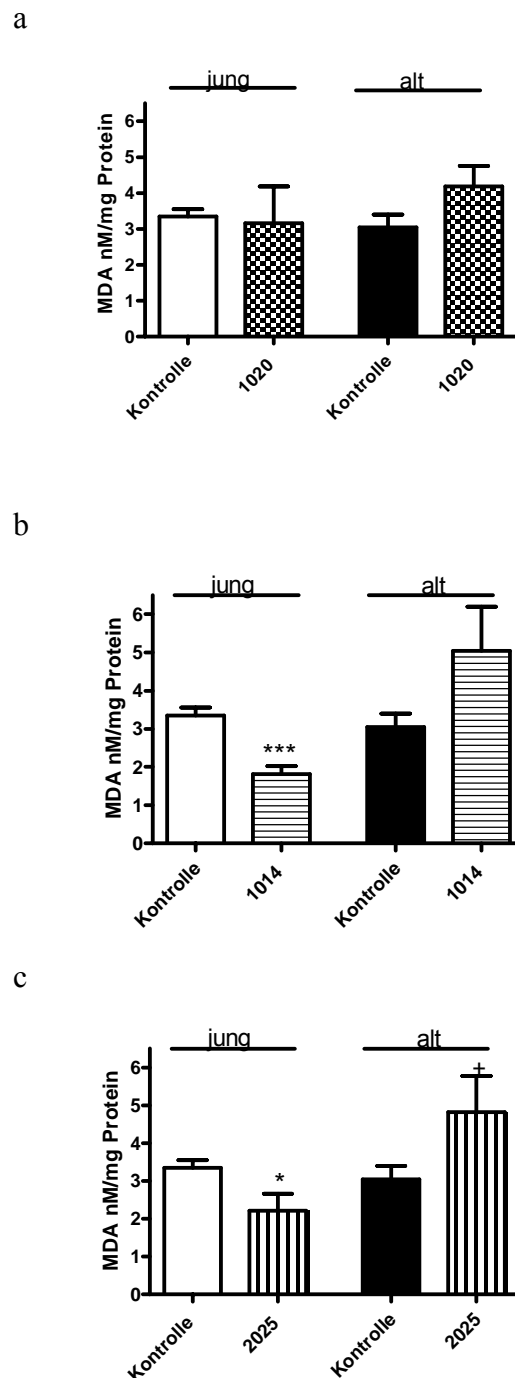


**Abbildung 4-14: Effekt von Extraktaufnahme auf basale Lipidperoxidation in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

a) Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in jungen (n = 6-8) und alten (n = 5-6) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM, p = 0,011 \*\* vs. unbehandelte junge Kontrolle.

b) Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in jungen (n = 7-8) und alten (n = 5) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM, p < 0,0001 \*\*\* vs. unbehandelte junge Kontrolle.

c) Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in jungen (n = 7-8) und alten (n = 5) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM, p = 0,0001 \*\*\* vs. unbehandelte junge Kontrolle.



**Abbildung 4-15: Effekt von Extraktaufnahme auf stimulierte Lipidperoxidation in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

a) Stimulierte Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in murinen Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakten 1020 in jungen (n = 5-8) und alten (n = 5-6) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

b) Stimulierte Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in murinen Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakten 1014 in jungen (n = 5-8) und alten (n = 5) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM, p = 0,0004 \*\*\* vs. behandelte junge Kontrolle.

c) Stimulierte Malondialdehyd (MDA) Level (NM/mg Protein) in murinen Hirnhomogenaten nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakten 1014 in jungen (n = 6-8) und alten (n = 5) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM, p = 0,0278\* vs. behandelte junge Kontrolle, p = 0,0306 + vs. behandelte alte Kontrolle.

#### ***4.4.2.1.2 Enzymatische antioxidative Abwehr in jungen und alten Maushirnen***

Zusätzlich zur Lipidperoxidation wurde die Aktivität einiger antioxidativen Enzyme als indirekter Marker für den ROS-Metabolismus gemessen. Diese Enzyme sind an der Entgiftung der schädlichen ROS in mehreren Reaktionen beteiligt. Die Cu/Zn-abhängige SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidanionradikalen, die hauptsächlich während der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Bei dieser Reaktion entstehen molekularer Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, die in hohen Konzentrationen von der Katalase oder bei eher niedrigeren Konzentrationen von der Glutathion Peroxidase (GPx) weiter abgebaut werden. Die Aktivität der Katalase ist im Gehirn eher von geringer Bedeutung (Marklund et al., 1982). Deshalb ist die Aktivität der GPx der wichtigere Faktor im Bezug auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entgiftung und wurde aus diesem Grund hier untersucht. Glutathion ist ein notwendiger Cofaktor der GPx und wird durch GR-Reaktionen generiert. Durch Bestimmung der Aktivitäten aller drei Enzyme sollte es folglich möglich sein die Entgiftung der ROS zu untersuchen.

Passend zu den erniedrigten Ergebnissen der Lipidperoxidation sind die Aktivitäten der GPx und der GR in alten Tieren (dunkle Balken) tendenziell erhöht. Die SOD-Aktivität ist dagegen unverändert (Abbildung 4-16).

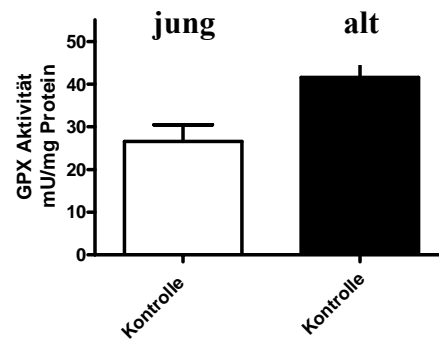
Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss der Extraktaufnahme auch auf die antioxidativen Enzym-Aktivitäten untersucht. Dabei zeigt der Verzehr von Extrakt 1020 relativ wenig Auswirkung auf die drei untersuchten Enzyme. Lediglich die Aktivität der SOD ist in jungen Tieren tendenziell erniedrigt (Abbildung 4-17 c). In alten Tieren ist ein Trend zur Reduktion nur bei der GPx-Aktivität zu erkennen. Auf die GR- und SOD-Aktivität war kein positiver Einfluss zu detektieren.

Extrakt 1014-Aufnahme resultierte in einer signifikanten Erniedrigung der GR-Aktivität in jungen Tieren. Auch die Aktivität in den alten Tieren schien tendenziell erniedrigt zu sein (Abbildung 4-18 c). Der Trend die SOD-Aktivität zu senken war in jungen Tieren auch tendenziell vorhanden. Die Standardabweichungen in den alten Tieren war allerdings zu hoch um eine klare Aussage treffen zu können (Abbildung 4-18 b). Die Fütterung mit Extrakt 1020 erhöhte die GPx-Aktivität tendenziell in jungen Tieren.

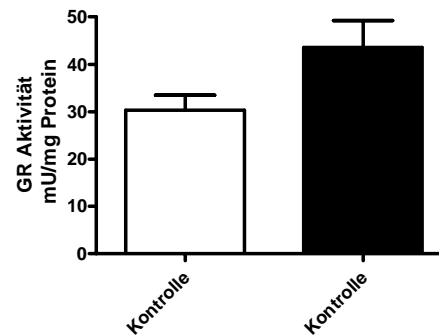
Für die Aufnahme von Extrakt 2025 ist es ebenfalls schwer, eine klare Aussage bezüglich ihres Einflusses auf die antioxidativen Enzym-Aktivitäten zu treffen. Die Aktivitäten aller drei untersuchten Enzyme waren in jungen Tieren tendenziell erhöht (Abbildung 4-19). Damit konform waren die SOD-Level in alten Mäusen ebenfalls erhöht. Auf die GR-Aktivität in

alten Tieren war keinerlei Beeinflussung durch Extraktaufnahme zu verzeichnen, die GPx-Aktivität war in alten Tieren sogar erniedrigt (Abbildung 4-19 a).

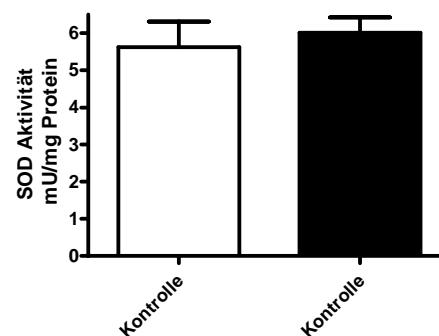
a



b



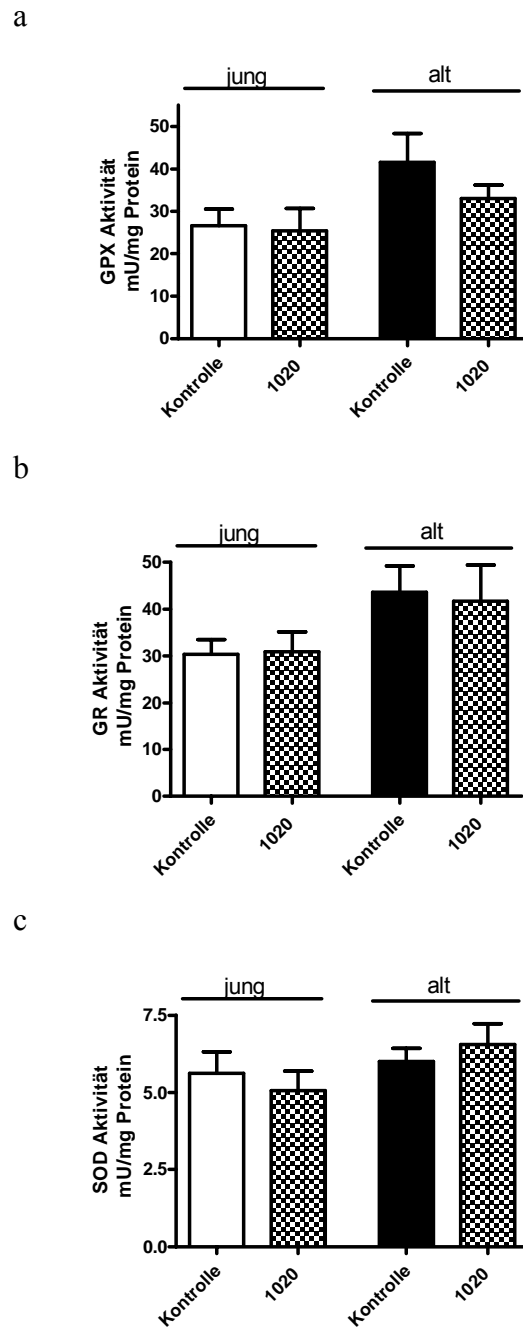
c



**Abbildung 4-16: Alterseffekt der Aktivität antioxidativer Enzyme in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

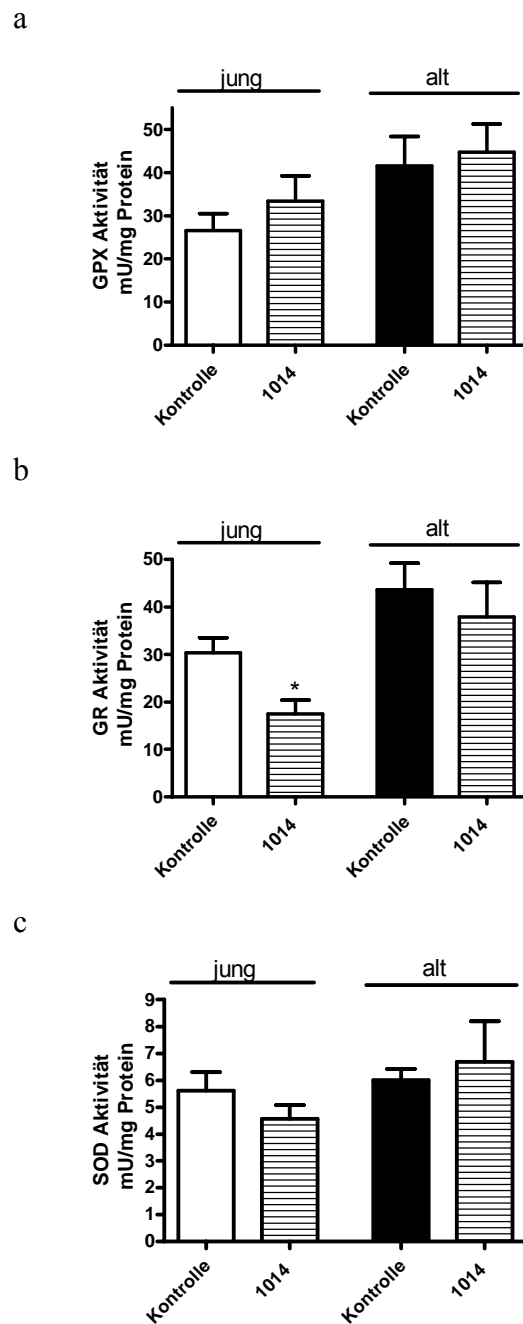
- a) Glutathion Peroxidase Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7$ , weiße Säule) und alten ( $n = 5$ , schwarze Säule) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- b) Glutathion Reduktase Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7$ , weiße Säule) und alten ( $n = 5$ , schwarze Säule) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- c) Superoxid Dismutase Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7$ , weiße Säule) und alten ( $n = 5$ , schwarze Säule) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.





**Abbildung 4-17: Aktivität der antioxidativen Enzyme nach dreimonatiger Extraktaufnahme (1020) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

- a) Glutathion Peroxidase (GPx) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5-6$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- b) Glutathion Reduktase (GR) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 6-7$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM
- c) Superoxid Dismutase (SOD) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5-6$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

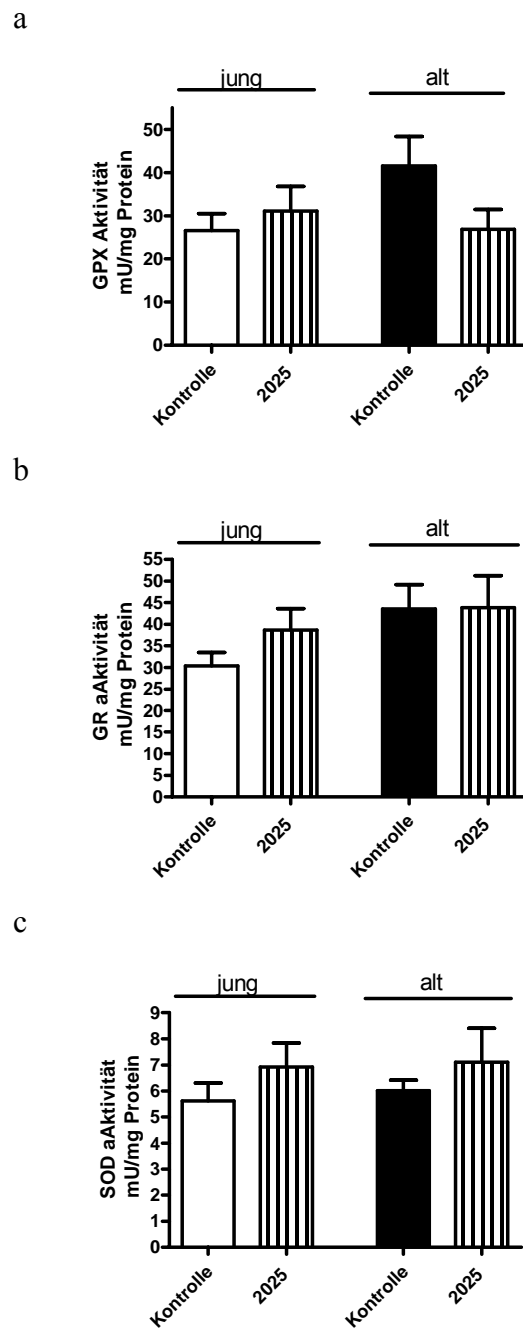


**Abbildung 4-18: Enzym-Aktivität nach dreimonatiger Extraktaufnahme (1014) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

a) Glutathion Peroxidase (GPx) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

b) Glutathion Reduktase (GR) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 5-7$ ) und alten ( $n = 3-5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0174$  \* vs. junge unbehandelte Kontrolle.

c) Superoxid Dismutase (SOD) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM



**Abbildung 4-19: Aktivität antioxidativer Enzyme nach dreimonatiger Extraktaufnahme (2025) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

- a) Glutathion Peroxidase (GPx) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2015 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- b) Glutathion Reduktase (GR) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2015 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- c) Superoxid Dismutase (SOD) Aktivität (mU/mg Protein) in Hirnhomogenaten von jungen ( $n = 7-8$ ) und alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.2 Messung des ROS-Metabolismus in dissoziierten Neuronen

Neben der Bestimmung der Lipidperoxidation und der antioxidativen Enzyme als indirekte Marker für oxidativen Stress wurden die mitochondrialen und cytosolischen ROS-Level in dissoziierten Neuronen weiblicher NMRI Mäuse aus Fütterungsstudie II bestimmt. Ferner wurde der Einfluss von Extraktfütterung auf das mitochondriale Membranpotential und die NO-Spiegel untersucht.

##### 4.4.2.2.1 Mitochondrien assoziierte ROS (DHR)

Die Untersuchung der mitochondrialen ROS in dissoziierten Neuronen von weiblichen NMRI Mäusen wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Dihydrorhodamin123 (DHR) durchgeführt. Dabei wird das nicht fluoreszierende Molekül in die Zelle aufgenommen und im Zellinneren zur fluoreszierenden Verbindung aufoxidiert. Durch die positive Ladung lagert DHR sich bevorzugt an der negativ geladenen Mitochondrienmembran ab und lässt so Rückschlüsse auf den Mitochondrien-assoziierten ROS-Metabolismus zu. Hier werden hauptsächlich Peroxynitrit und Superoxidradikalanionen detektiert (Possel et al., 1997). Bei der ROS-Messung in den dissoziierten Neuronen der gefütterten Tiere zeigte sich, dass die basalen ROS-Spiegel in alten (21 Monate) NMRI Mäusen gegenüber den jungen (6 Monate) Tieren nicht erhöht waren.

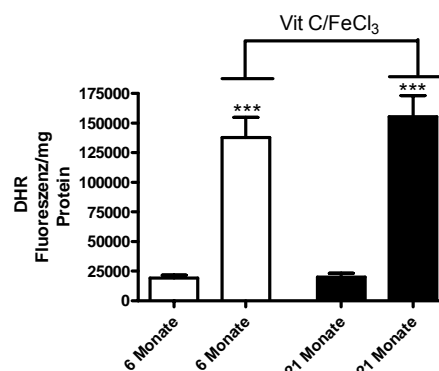
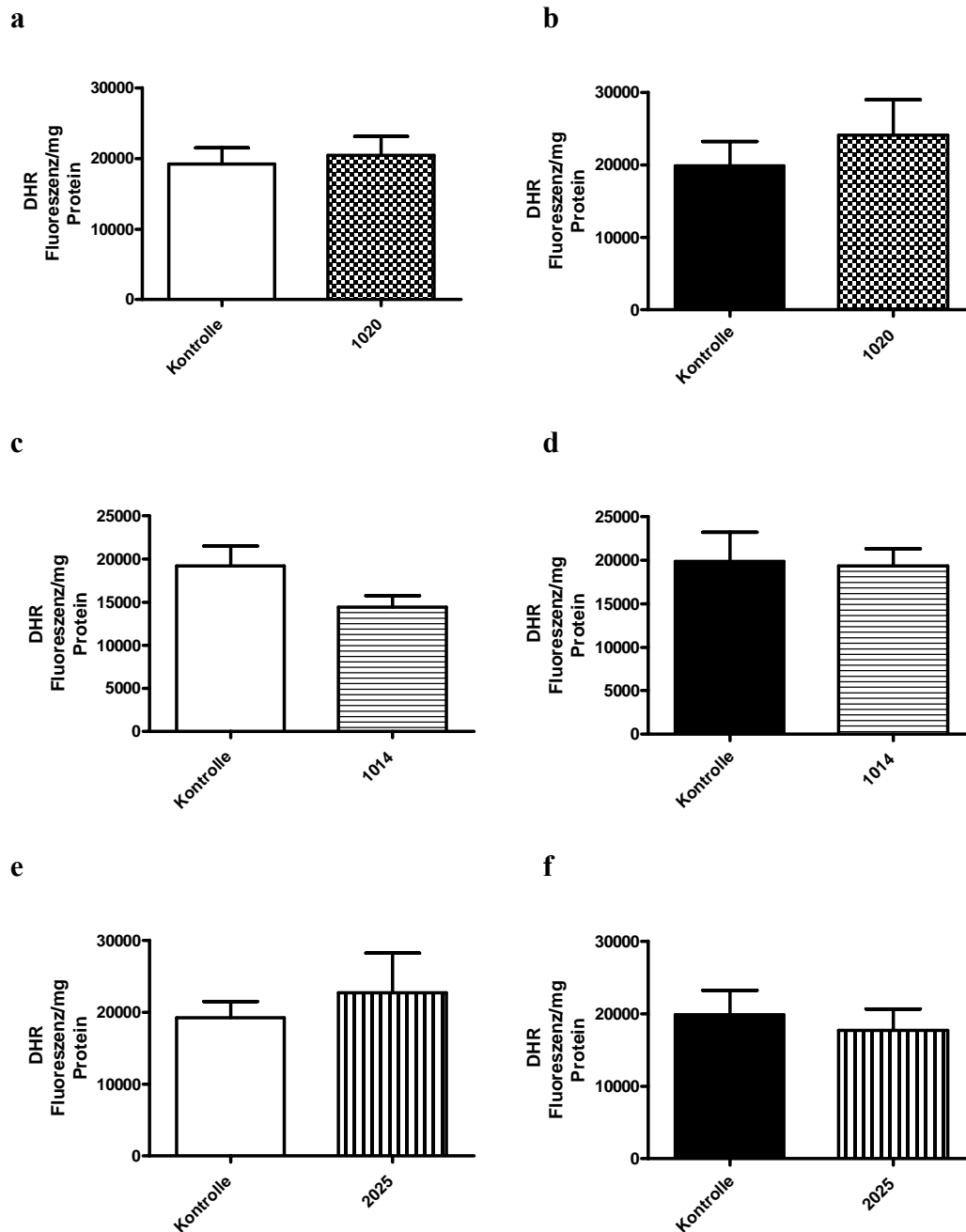


Abbildung 4-20: Effekt von Stimulation auf Mitochondrien-assoziierte ROS Bildung in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.

Basale und durch Vitamin C und FeCl<sub>3</sub> stimuliertes Membranpotential (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen (n = 9-10) und alten (n = 6-7) NMRI Mäusen gemessen mittels DHR. Mittelwert und SEM, p < 0,0001 \*\*\* vs. unbehandelte Kontrollen.

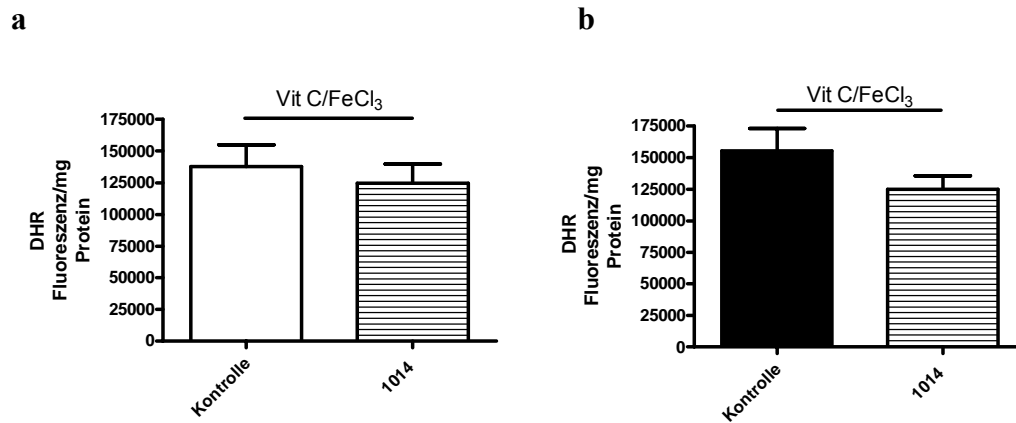
In diesem System galt es ebenfalls zu überprüfen, ob die einzelnen Fütterungs- oder Altersgruppen eine veränderte Scavenging-Aktivität gegenüber exogen erzeugten ROS aufwiesen. Dazu wurden die dissoziierten Neuronen nach Aufnahme der basalen ROS-Werte mit Vitamin C und Eisenchlorid stimuliert. In allen Gruppen ließ sich durch Vitamin C und Eisenchlorid-Zugabe die ROS-Bildung stimulieren. Die stimulierten Mitochondrien-assoziierten ROS in alten Mäusen waren tendenziell erhöht, im Gegensatz zu jungen Kontrolltieren.

Keiner der Extrakte hatte einen signifikanten Einfluss auf die mitochondriale ROS-Produktion. Einzig Extrakt 1014 zeigte eine tendenzielle Erniedrigung der basalen ROS-Konzentration in jungen Tieren (Abbildung 4-21). Auch auf die stimulierten ROS-Level zeigt einzig Extrakt 1014 tendenziell eine Reduktion (Abbildung 4-22).



**Abbildung 4-21: Extrakteffekt auf basale Mitochondrien-assoziierte ROS in jungen (6 Monate, weiße Balken) und alten (21 Monate, schwarze Balken) Mäusen.**

- a) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DHR ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- b) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 4-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- c) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DHR ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- d) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- e) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 8-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DHR ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- f) Basale ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 6-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.



**Abbildung 4-22: Extrakteffekt auf stimulierte Mitochondrien-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

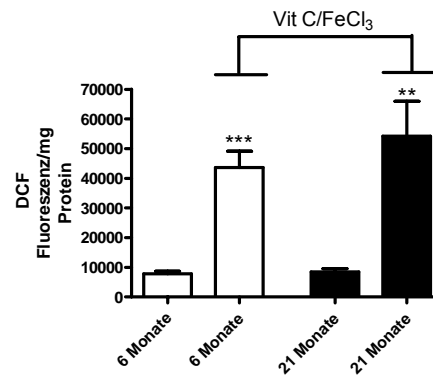
a) stimulierte ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen (n = 6-10) NMRI Mäusen gemessen mittels DHR (10  $\mu$ M) nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

b) stimulierte ROS (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten (n = 6-10) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.2 Cytosol-assoziierte ROS (DCF)

Mit DCFH-DA wurde ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff zur Messung der cytosolischen ROS eingesetzt. Hierbei wurden ebenfalls die basalen und durch Vitamin C und Eisenchlorid stimulierten ROS-Spiegel in dissoziierten Mausneuronen der zweiten Fütterungsstudie untersucht. Die basalen und stimulierten ROS-Level waren in alten Tieren in beiden Fällen tendenziell erhöht (Abbildung 4-23).

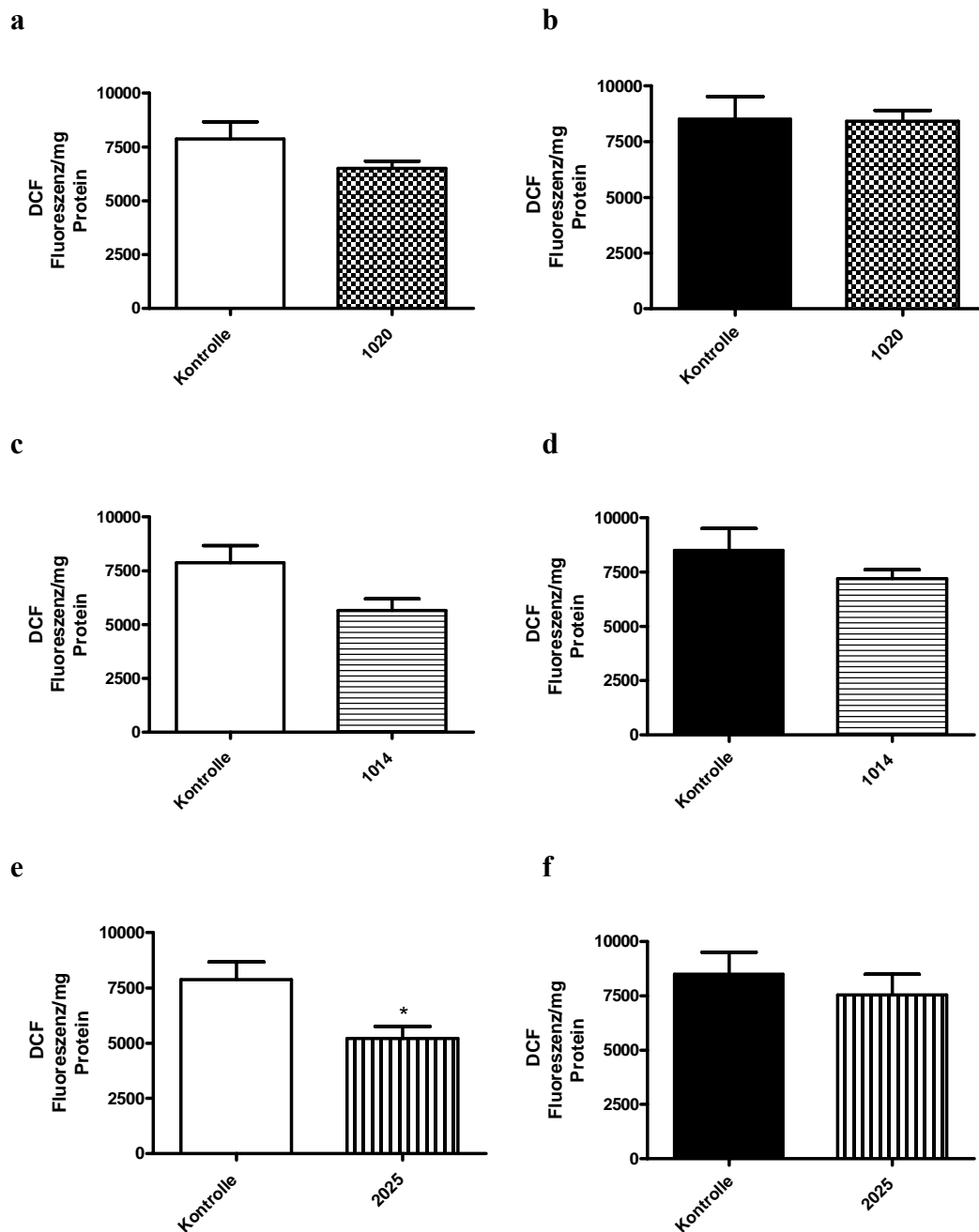
Sowohl in jungen als auch in alten Tieren waren durch die Stimulation die ROS-Spiegel hoch signifikant erhöht (Abbildung 4-23). Durch Fütterung mit allen drei Extrakten wurde in allen jungen Tieren eine Erniedrigung der cytosolischen ROS-Level erreicht, die jedoch nur für Extrakt 2025 signifikant war (Abbildung 4-24 a, c, e). In den alten Tieren war der Trend zur Reduktion der ROS im Cytosol für die Extrakte 1014 und 2025 zu sehen (Abbildung 4-24 b, d, f).



**Abbildung 4-23: Effekt von Stimulation auf Cytosol-assoziierte ROS Bildung in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

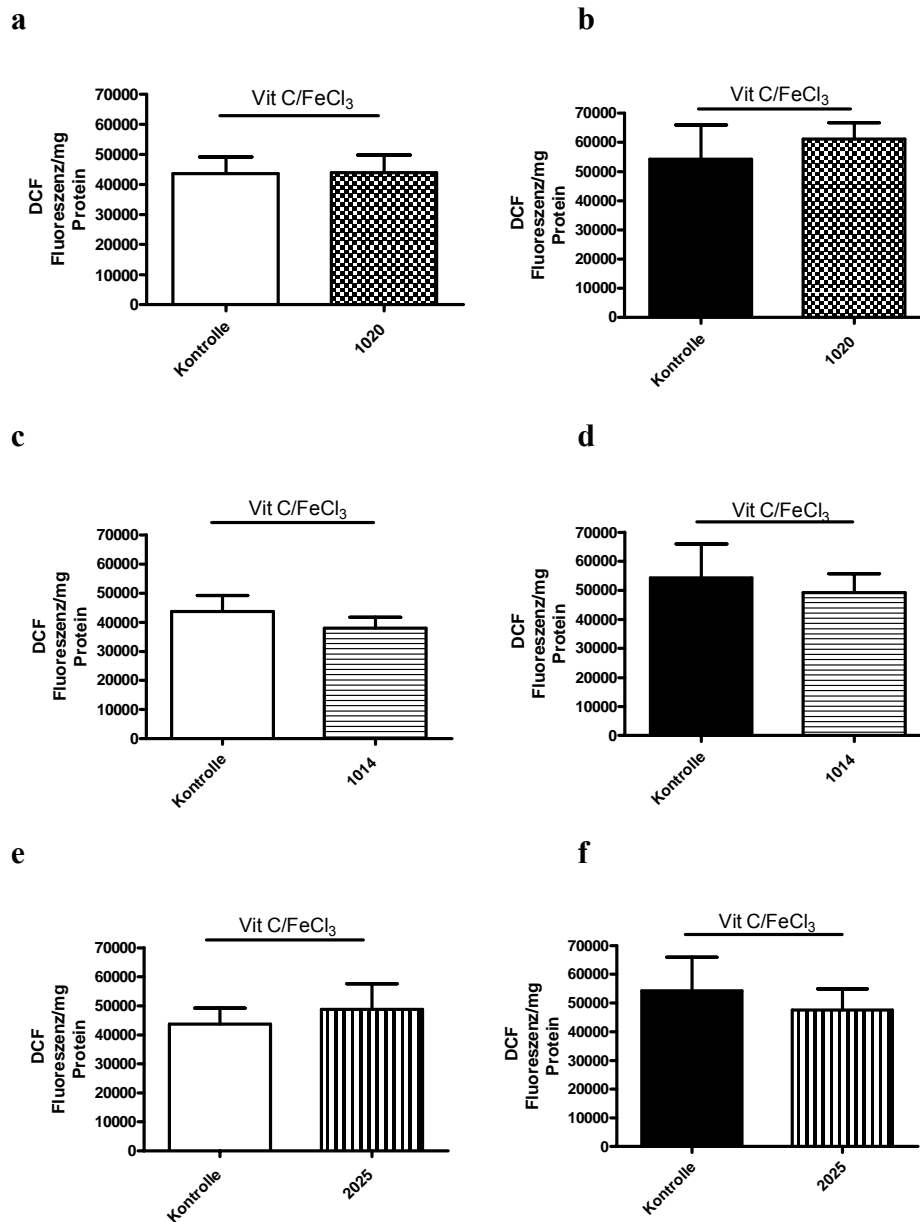
Basale und durch Vitamin C und FeCl<sub>3</sub> stimulierte Membranpotential (DHR Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen (n = 9-10) und alten (n = 6-7) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF. Mittelwert und SEM,  $p < 0,0001$  \*\*\* vs. unbehandelte Kontrolle,  $p = 0,0021$  \*\* vs. unbehandelte Kontrolle.





**Abbildung 4-24: Extrakteffekt auf Cytosol-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung.**

- a) Basale ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- b) basale ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 4-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- c) Basale und stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- d) Basale ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.
- e) Basale ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0344$  \* vs. unbehandelte Kontrolle.
- f) Basale ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 4-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.



**Abbildung 4-25: Extrakteffekt auf stimulierte Cytosol-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung.**

a) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

b) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 4-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0344$  \* vs. unbehandelte Kontrolle.

c) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

d) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

e) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 6-10$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels DCF ( $10 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM.

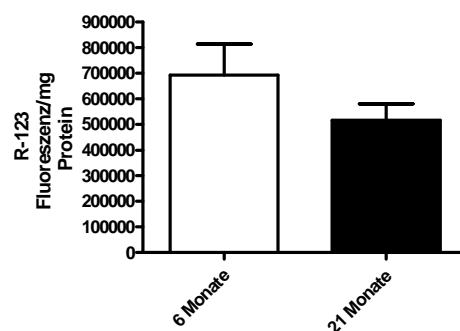
f) Stimulierte ROS (DCF Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 4-7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025 für drei Monate. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0344$  \* vs. unbehandelte Kontrolle.

Bei den *in vitro* stimulierten Proben waren nur die ROS-Spiegel der mit Extrakt 1014 gefütterten Gruppen in jungen und alten Tieren erniedrigt (Abbildung 4-25 c und d).

#### 4.4.2.2.3 Mitochondriales Membranpotential

Die Veränderung des Membranpotentials der Mitochondrien ist ein weiterer Hinweis, in wie weit die untersuchten Zellen oxidativ gestresst sind. Oxidativer Stress führt zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials (Depolarisation). In der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass alte Mäuse im Vergleich zu jungen Tieren ein erniedrigtes Membranpotential besitzen (S. Hauptman und I. Scherping, persönliche Kommunikation) und durch oxidativen Stress das Membranpotential von PC12-Zellen erhöht wird (Keil et al., 2004). Das Membranpotential der Mitochondrien lässt sich mittels spezifischer Farbstoffe messen. In dieser Arbeit wurde dafür der Farbstoff Rhodamin123 (R-123) verwendet, der sich auf Grund seiner positiven Ladung hauptsächlich in die negativ geladene Mitochondrienmatrix einlagert und so Rückschlüsse auf das Membranpotential erlaubt. Eine Erniedrigung der Fluoreszenz entspricht dabei einer Erniedrigung des Membranpotentials, also einer Schädigung der Membran (Depolarisation).

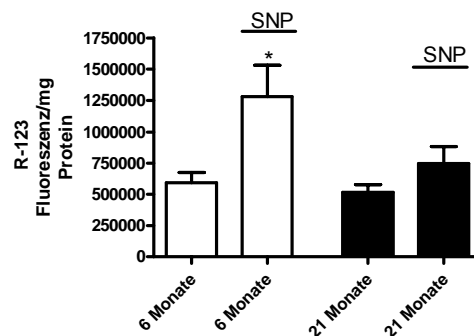
Das mitochondriale Membranpotential wurde in den dissoziierten Neuronen der jungen und alten Kontroll- und Fütterungsgruppen der zweiten Fütterungsstudie gemessen. Auch in diesem Assay zeigte sich eine Reduktion der Fluoreszenz in den alten Kontrolltieren gegenüber jungen Mäusen (Abbildung 4-26). Alte Tiere haben folglich ein erniedrigtes Membranpotential.



**Abbildung 4-26: Alterseffekt auf basales Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen (n = 9) und alten (n = 6) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 (0,4  $\mu$ M). Mittelwert und SEM.

Um die Radikalfangeigenschaften der Neurone zu detektieren, wurde auch hier wieder mit einem exogenen Stimulus gearbeitet. Die akute Stimulation mit 2 mM Natrium Nitroprussid nach Aufnahme der basalen Membranpotentials resultierte in einer signifikant erhöhten Fluoreszenz in jungen und einer Tendenz zur Erhöhung in alten NMRI Tieren (Abbildung 4-27), was gleichbedeutend mit einer Abnahme des Membranpotentials ist. Durch die Stimulation wird vermehrt NO in der Zelle freigesetzt, welches zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt. Die erhöhte Fluoreszenz wird auf die durch den Stimulus ausgelöste Abnahme des Membranpotentials zurückgeführt. Hierdurch ist der Farbstoff weniger stark in der Matrix der Mitochondrien gebunden und kann zum Teil aus der Zelle austreten (Krohn et al., 1999). Die negative Veränderung des Membranpotentials ist auch beim Vergleich der zwei Altersstufen nach der Stimulation mit SNP erhalten. Allerdings lassen sich alte Tiere weniger gut stimulieren, was durch ein im Alter bereits erniedrigtes Membranpotential erklärt werden könnte.



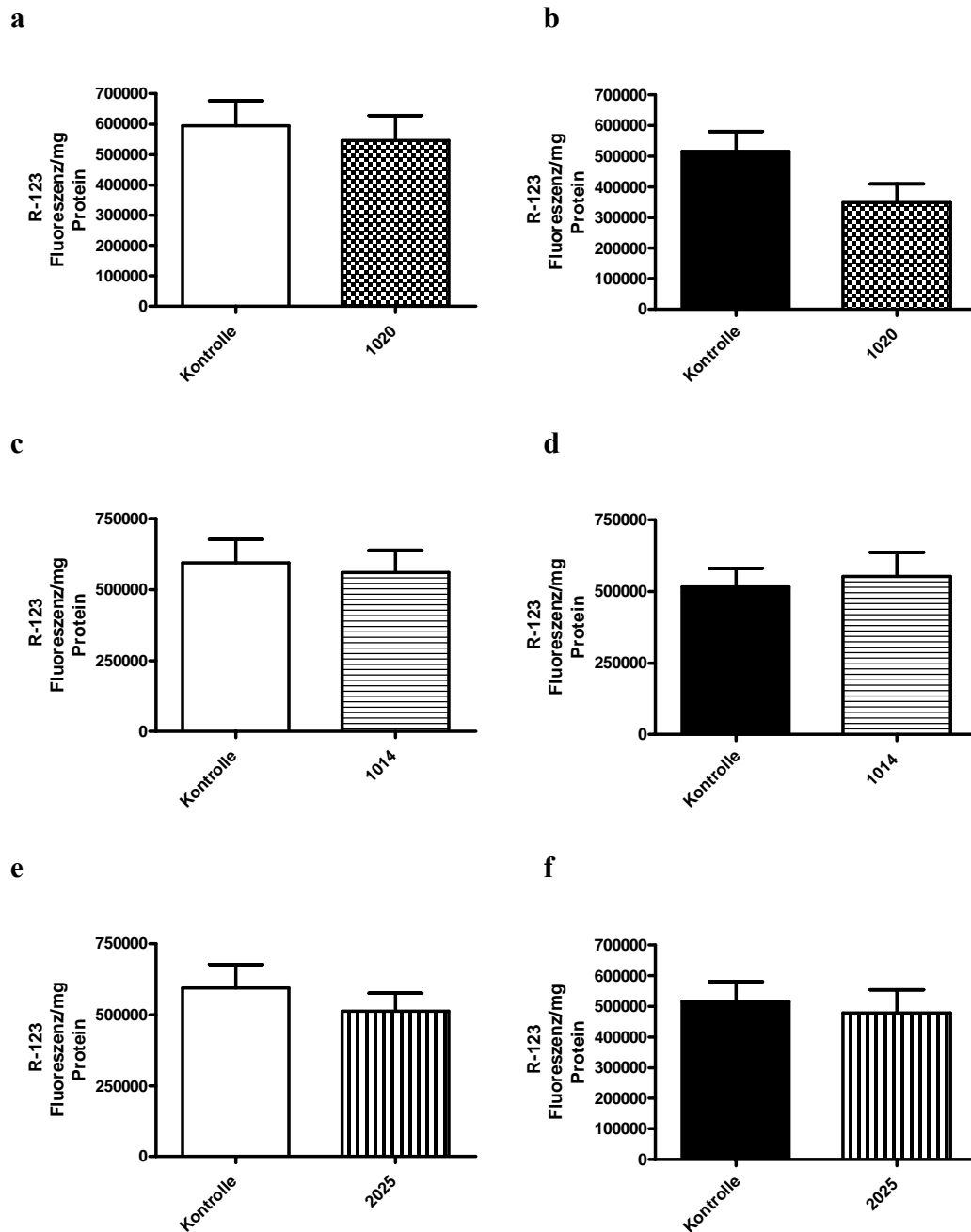
**Abbildung 4-27: Effekt von SNP-Stimulation auf Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

Basales und durch Natrium Nitroprussid (SNP) stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 9$ ) und alten ( $n = 6$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ). Mittelwert und SEM,  $p = 0,0184$  \* vs. basal jung.

Der Einfluss der Extraktfütterung auf das basale (Abbildung 4-28) und mit SNP stimulierte (Abbildung 4-29) mitochondriale Membranpotential ( $\Psi_m$ ) wurde ebenfalls in jungen und alten Mäusen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahme der drei Extrakte auf das basale Membranpotential in jungen NMRI Mäusen tendenziell eher erniedrigenden Einfluss hatte. Bei Extrakt 2025 war dabei die stärkste Tendenz zur Erniedrigung der Fluoreszenz (Depolarisation) durch die Fütterung zu beobachten (Abbildung 4-28 e). Die Fluoreszenz war für Extrakt 1020 und 1014 ebenfalls niedriger als in den gleichalten Kontrolltieren. Bei der Messung des basalen und stimulierten Membranpotentials in alten Mäusen zeigte sich, dass

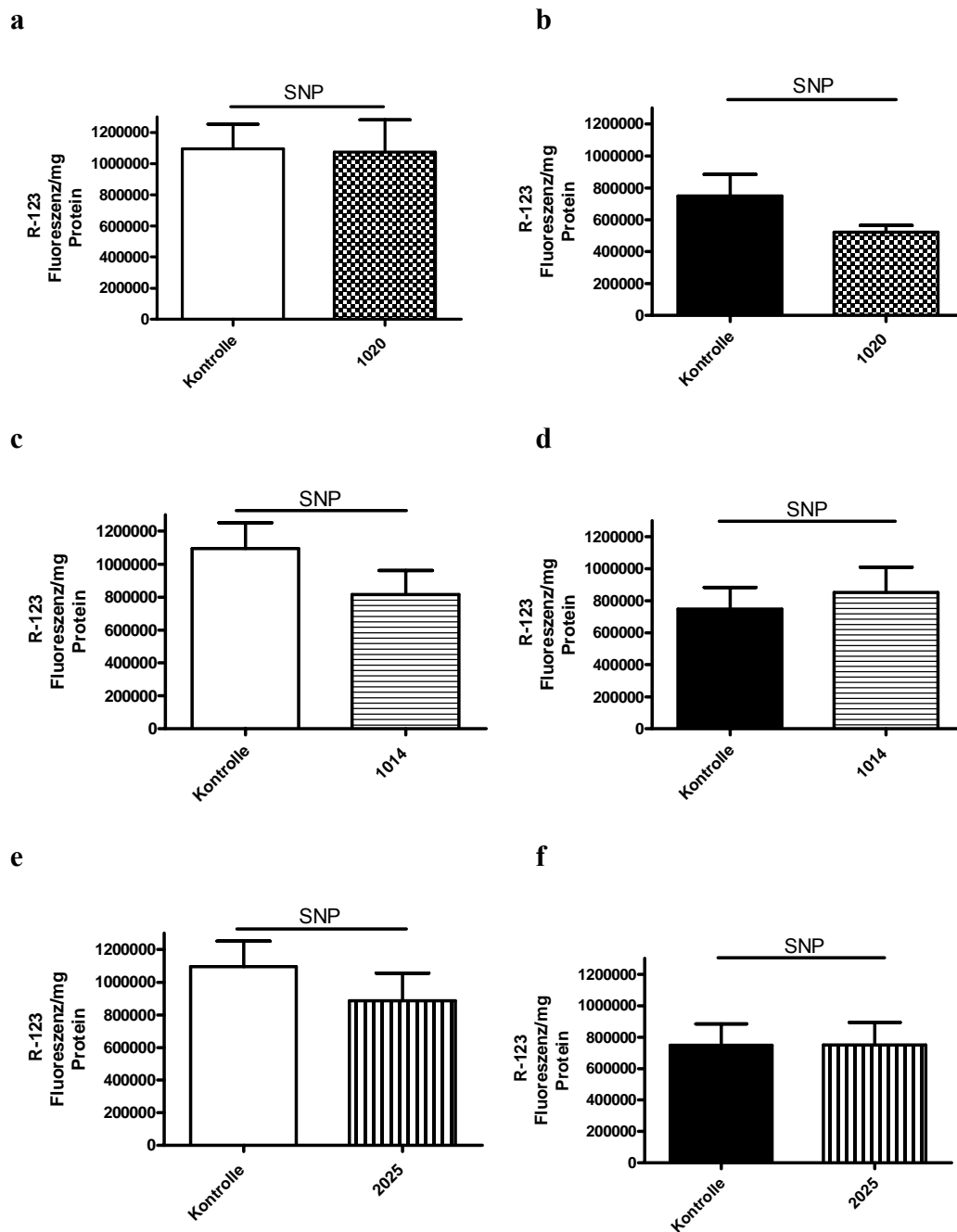
die Fütterung mit Extrakt 1020 tendenziell eher zu einer Depolarisation des basalen Membranpotentials führte (Abbildung 4-28 b). Extrakt 2025 hatte einen fast unveränderten Effekt auf das basale Membranpotential in alten Tieren (Abbildung 4-28 f) und bei den mit Extrakte 1014 gefütterten Tieren war eine leichte Hyperpolarisation des Membranpotentials zu erkennen (Abbildung 4-28 d).

Das mit SNP stimulierte mitochondriale Potential war in jungen Tieren nach Aufnahme von Extrakt 1014 und 2025 erniedrigt (Abbildung 4-29c und e). Extrakt 1020 zeigte nach akuter Stimulation in jungen NMRI Mäusen keinen Effekt auf das Membranpotential (Abbildung 4-29 a). Die Stimulation mittels NO-Donor in 21 Monate alten NMRI Mäusen hatte beim Vergleich von mit Extrakt 2025 gefütterten Tieren mit alten Kontrolltieren keinen Einfluss (Abbildung 4-29f). Im Falle von Extrakt 1020 gefütterten Tieren führte die Extraktaufnahme jedoch zu einer Reduzierung der Fluoreszenz, folglich zu einer Depolarisation der Membran (Abbildung 4-29 b). Der Verzehr von Extrakt 1014 führte in alten Tieren zu einer Hyperpolarisation.



**Abbildung 4-28: Extrakteffekt auf das basale Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung mit Extrakten.**

- a) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1020. Mittelwert und SEM.
- b) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 3-6$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1020. Mittelwert und SEM.
- c) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 8-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014. Mittelwert und SEM.
- d) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014. Mittelwert und SEM.
- e) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025. Mittelwert und SEM.
- f) Basales Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025. Mittelwert und SEM.

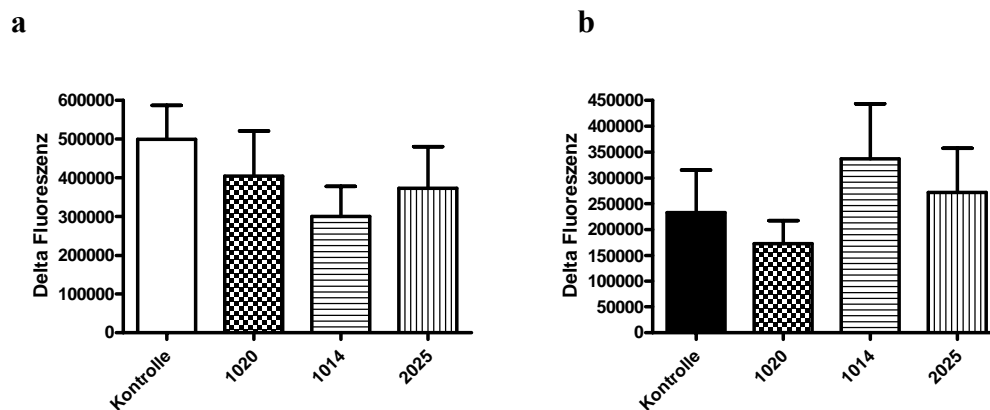


**Abbildung 4-29: Extrakteffekt auf das SNP-stimulierte Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung mit Extrakten.**

- a) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 8-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1020. Mittelwert und SEM.
- b) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 3-6$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1020. Mittelwert und SEM.
- c) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 1014. Mittelwert und SEM.
- d) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7-9$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 1014. Mittelwert und SEM.
- e) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen ( $n = 8-9$ ) NMRI Mäusen gemessen mittels R-123 ( $0,4 \mu\text{M}$ ) nach Aufnahme von Extrakt 2025. Mittelwert und SEM.
- f) Stimuliertes Membranpotential (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von alten ( $n = 7$ ) NMRI Mäusen nach Aufnahme von Extrakt 2025. Mittelwert und SEM.

In Abbildung 4-30 ist das Vermögen der dissoziierten Neurone der über drei Monate mit Extrakt behandelten NMRI-Mäuse mit exogen erzeugtem nitrosativem Stress umzugehen dargestellt, welche als Scavenging-Aktivität bezeichnet wird (Delta R123 Fluoreszenz). Der wahrscheinlichste Effekt ist hier eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials durch die Extraktaufnahme, wodurch eine akute Zugabe radikalerzeugender Substanzen (SNP) zu einer geringeren Schädigung führt. Durch die Fütterung der Extrakte ist tendenziell eine verbesserte Aktivität (erniedrigtes Delta) in jungen NMRI Mäusen zu beobachten. Extrakt 1020 wies eine um 19 %, Extrakt 1014 eine um 40 % und Extrakt 2025 eine um 25 % verbesserte Radikalfangeigenschaft auf (Abbildung 4-30 a).

In alten Mäusen war Extrakt 1014 für eine tendenziell verringerte Scavenging-Aktivität, der Neurone gegenüber oxidativem Stress verantwortlich (Abbildung 4-30 b). Die Aufnahme der beiden anderen Extrakte führte bei der 1020-Gruppe zu einer tendenziell verbesserten und für die 2025-Gruppe zu einer verringerten Aktivität in 21 Monate alten NMRI Mäusen. In alten Kontrolltieren war ebenfalls eine Erniedrigung der  $\Delta$  Fluoreszenz, folglich eine Erhöhung der Scavenging-Aktivität, zu erkennen (Abbildung 4-31).

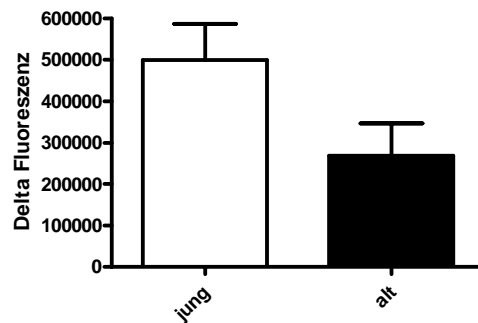


**Abbildung 4-30: Scavenging-Aktivität dissoziierter Neuronen von jungen und alten Tieren mit exogen erzeugtem Stress umzugehen (Delta R123 Fluoreszenz).**

a) Scavenging-Aktivität junger NMRI Mäuse mit exogen erzeugtem oxidativen Stress umzugehen (Delta Fluoreszenz) gemessen mittels Rhodamin123 (n = 7-9), Mittelwert und SEM.

b) Scavenging-Aktivität junger NMRI Mäuse mit exogen erzeugtem oxidativen Stress umzugehen (Delta Fluoreszenz) gemessen mittels Rhodamin123 (n = 3-8), Mittelwert und SEM.





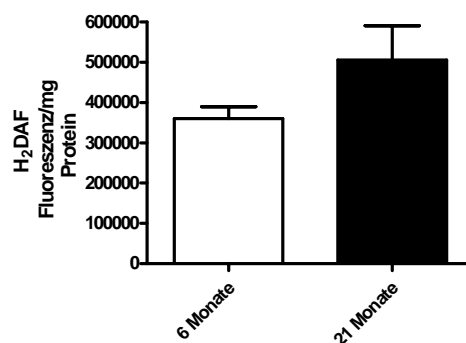
**Abbildung 4-31: Alterseffekt auf die Scavenging-Aktivität der Mitochondrien.**

Effekt des Alterns auf die Scavenging-Aktivität von Neuronen junger ( $n = 7$ ) und alter ( $n = 9$ ) NMRI Mäuse aus der zweiten Fütterungsstudie. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.2.4 NO-Spiegel

Neben dem Membranpotential der Mitochondrien wurden auch die basalen und stimulierten Stickstoffmonoxid-Level (NO) in den dissoziierten Neuronen der NMRI Mäuse bestimmt. Diese Messung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 4,5-Diaminofluorescein-diacetat ( $H_2DAF-DA$ , vergleiche Abschnitt 3.2.4.4.4). Dieser Farbstoff dringt in die Zelle ein und wird dort durch Reaktion mit NO zu einem fluoreszierenden Molekül umgesetzt.

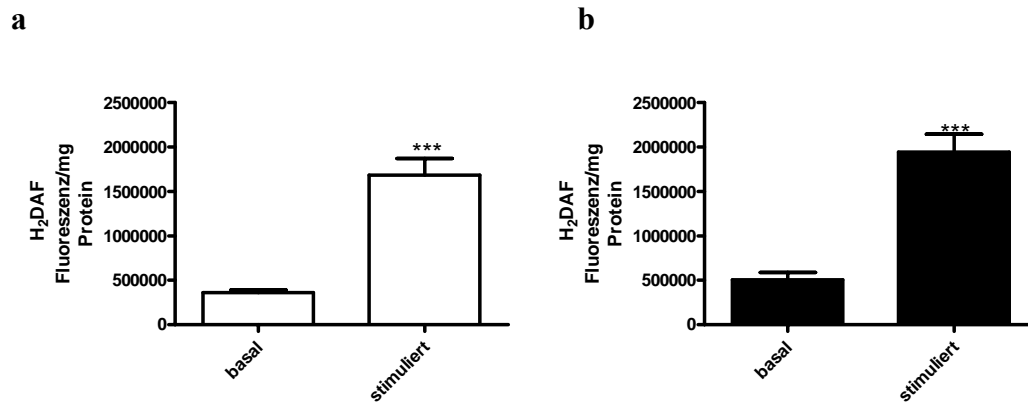
Es konnte beim Vergleich der unterschiedlichen Alterstufen in der Fütterungsstudie ebenfalls eine Tendenz zu erhöhten basalen NO-Spiegeln in alten NMRI Mäusen beobachtet werden (Abbildung 4-32).



**Abbildung 4-32: Alterseffekt auf basale NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

Alterseffekt auf basale NO-Spiegel (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen und alten NMRI Mäusen ( $n = 7$ ) gemessen mittels  $H_2DAF-DA$  ( $10 \mu M$ ). Mittelwert und SEM.

Durch direkte Zugabe des NO-Donors PAPANoate (0,5 mM), nach der Messung der basalen NO-Spiegel, konnte eine Aussage über die Sensitivität der dissoziierten Neurone gegenüber exogen erzeugtem oxidativen Stress gemacht werden. Sowohl in jungen als auch in alten Tieren waren die stimulierten NO-Level stark erhöht (Abbildung 4-33 a und b).



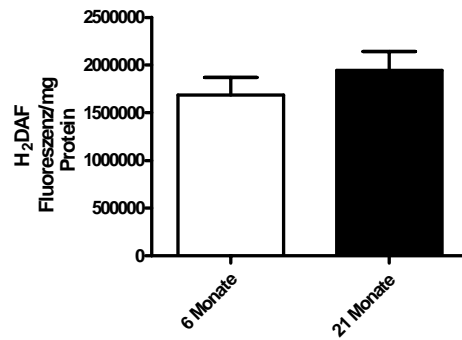
**Abbildung 4-33: Effekt von Stimulation auf NO-Spiegel in jungen und alten NMRI Mäusen**

a) Effekt der Stimulation mit PAPA-NONOate (0,5 mM) auf die basalen NO-Spiegel in jungen NMRI Mäusen (n = 9-10, weiße Balken), Mittelwert + SEM,  $p < 0,0001$  \*\*\* vs. unbehandelte jung Kontrolle.

b) Effekt der Stimulation mit PAPA-NONOate (0,5 mM) auf die basalen NO-Spiegel in alten NMRI Mäusen (n = 7, schwarze Balken), Mittelwert + SEM,  $p < 0,0001$  \*\*\* vs. unbehandelte alte Kontrolle.

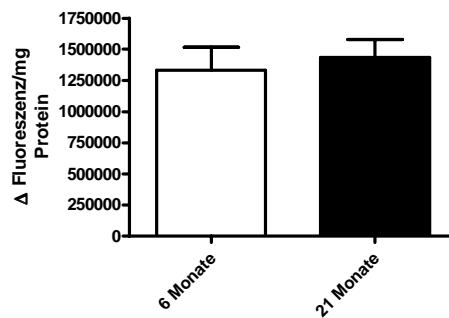
Wie in Abbildung 4-34 zu erkennen ist, wiesen auch die stimulierten NO-Spiegel einen Altersunterschied auf. Die NO-Level nach Zugabe von PAPA-NONOate waren ebenfalls in alten Tieren angehoben. Daraus resultiert, dass alte Tiere eine leicht erhöhte Sensitivität ( $\Delta$  Fluoreszenz) gegenüber exogen erzeugtem Stress besitzen (Abbildung 4-35).

Die Fütterung mit den drei mediterranen Extrakten hatte keinen signifikanten Effekt auf die NO-Spiegel junger NMRI Tiere. Einzig die ROS-Spiegel der jungen Extrakt 1020 Gruppe wiesen eine Tendenz zur Erhöhung auf (Abbildung 4-36), die anderen beiden Extrakte zeigten keinerlei Effekt. In alten Tieren ist allerdings der Trend zu erniedrigten NO-Spiegeln nach Extraktaufnahme für alle Pflanzen zu erkennen (Abbildung 4-37).



**Abbildung 4-34: Alterseffekt auf stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.**

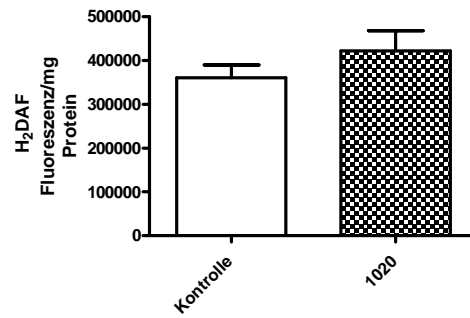
Alterseffekt auf mit PAPA-NONOate (0,5 mM) stimulierte NO-Spiegel (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen von jungen (n = 9) und alten NMRI Mäusen (n = 7). Mittelwert und SEM.



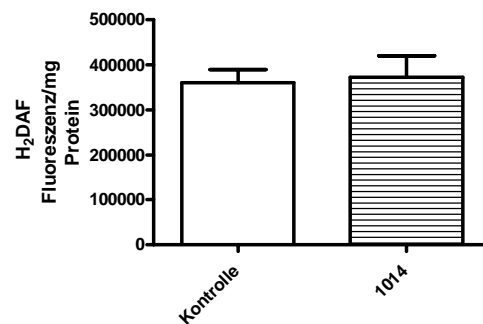
**Abbildung 4-35: Sensitivität der dissoziierten Neurone gegenüber Stimulation der basalen NO-Spiegel in jungen und alten NMRI Mäusen**

Sensitivität der Neurone gegenüber Stimulation mit PAPA-NONOate (0,5 mM) in jungen (n = 9) und alten (n = 7) Mäusen, Mittelwert + SEM.

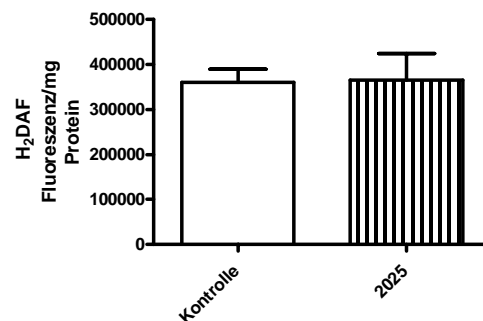
a



b



c

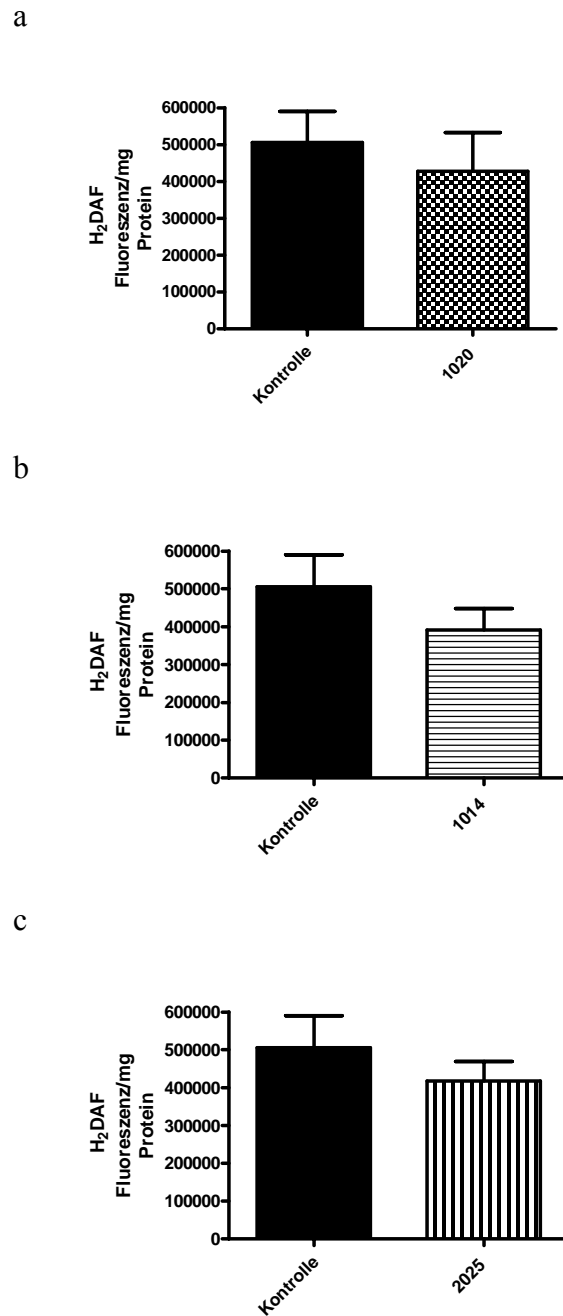


**Abbildung 4-36: Effekt von Extraktaufnahme auf basale NO-Spiegel in jungen (6 Monate) Mäusen.**

a) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in jungen (n = 8-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

b) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in jungen (n = 8-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

c) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in jungen (n = 7-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.



**Abbildung 4-37: Effekt von Extraktaufnahme auf basale NO-Spiegel in alten (21 Monate) Mäusen.**

a) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in alten (n = 4-7) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

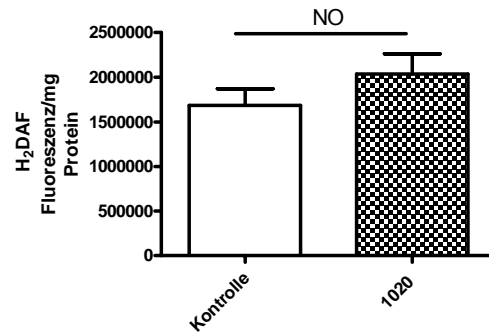
b) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in alten (n = 7-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

c) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in alten (n = 7) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

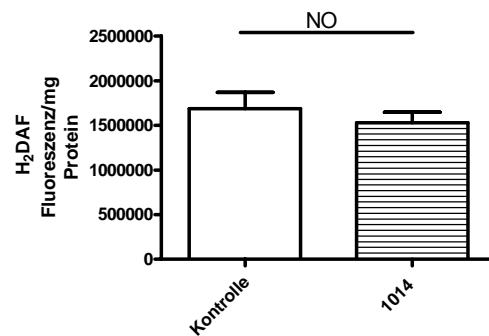
Die mit PAPA-NONOate stimulierten NO-Level waren in jungen Tieren im Gegensatz zu gleichaltrigen Kontrolltieren für die Extrakt-1020-Gruppe erhöht, für die Extrakt-1014-Gruppe erniedrigt und gleich bleibend für die Extrakt-2025-Gruppe (Abbildung 4-38). In alten Tieren waren lediglich die NO-Spiegel der 1014-Gruppe (11%) tendenziell erniedrigt (Abbildung

4-39). Die Aufnahme der anderen beiden Extrakte hatte keinen Effekt auf die stimulierten NO-Level.

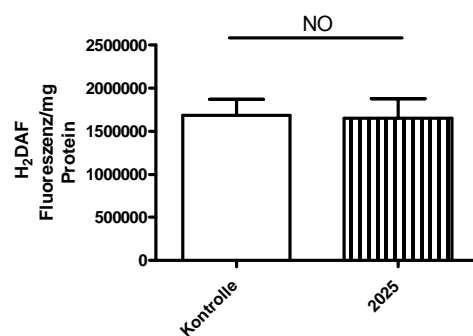
a



b

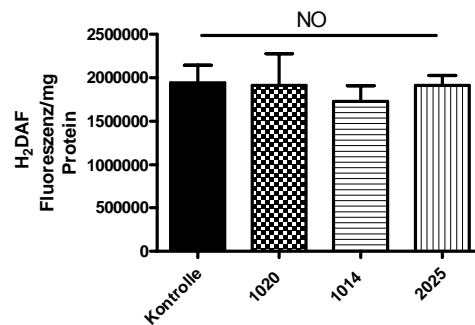


c



**Abbildung 4-38: Effekt von Extraktaufnahme auf mit PAPA-NONOate stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) Mäusen.**

- a) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in jungen (n = 8-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- b) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in jungen (n = 7-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- c) NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in jungen (n = 7-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

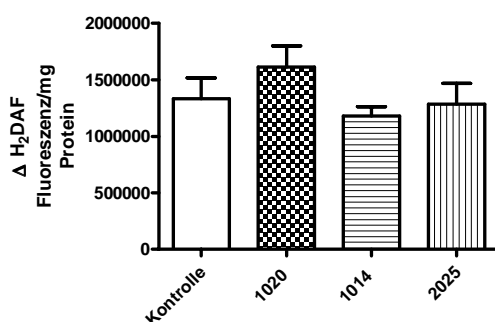


**Abbildung 4-39: Effekt von Extraktaufnahme auf mit Papa-NONOate stimulierte NO-Spiegel in alten (21 Monate) Mäusen.**

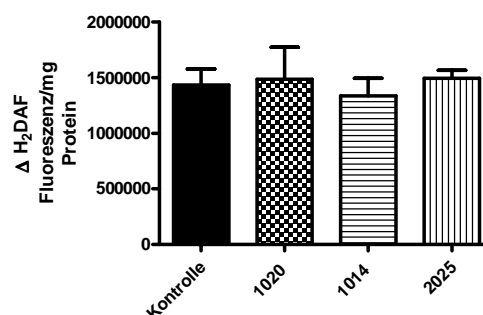
NO-Spiegel (H<sub>2</sub>DAF) (Fluoreszenz/mg Protein) in dissoziierten Neuronen nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt (1020, 1014, 2025) in alten (n = 4-8) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM

Die Differenz der mit PAPA-NONOate stimulierten und basalen NO-Spiegel ist ein Maß für die eventuell veränderte Scavenging-Aktivität der NMRI Mäuse nach Fütterung mit den drei Extrakten. An Hand der Deltawerte kann folglich eine Aussage über das Vermögen mit akut stimuliertem nitrosativem Stress umzugehen gemacht werden. In Abbildung 4-40 sind die Deltawerte der Fluoreszenzdaten abgebildet. Junge NMRI Tieren, die mit Extrakt 1020 gefüttert worden waren, hatten eine niedrigere Radikalfangaktivität und junge mit Extrakt 1014 und 1020 gefütterte Mäuse hatten eine bessere Scavenging-Aktivität als gleichalte Kontrolltiere. In alten Tieren resultierte eine Fütterung mit Extrakten nur für die 1014-Gruppe in einer Erhöhung der Scavenging-Aktivität.

**a**



**b**



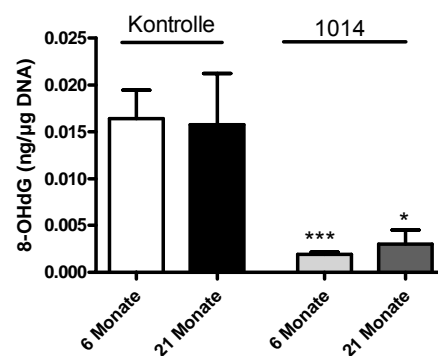
**Abbildung 4-40: Scavenging-Aktivität von nitrosativem Stress nach Extraktaufnahme.**

a) Scavenging-Aktivität junger NMRI Mäuse gegenüber exogen erzeugtem Stress ohne und nach Extraktaufnahme. Mittelwert und SEM.

b) Scavenging-Aktivität alter NMRI Mäuse gegenüber exogen erzeugtem Stress ohne und nach Extraktaufnahme. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.3 Messungen der oxidativen Schäden der DNA (ex vivo)

Als weiterer Parameter wurde die oxidative Schädigung der DNA gemessen. Die schädlichen Oxidationen führen zu spezifischen Veränderungen bestimmter Basen der DNA. In diesem Assay wurde die 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin Konzentration mittels ELISA bestimmt (vergleiche 3.2.4.3). Dabei konnte kein Altersunterschied zwischen 6 und 21 Monate alten NMRI Mäusen festgestellt werden. Allerdings verringerte die Aufnahme von Extrakt 1014 den 8-OHdG-Gehalt (ng/ $\mu$ g DNA) sowohl in alten als auch jungen Tieren signifikant (Abbildung 4-41).



**Abbildung 4-41: Oxidative Schädigung der DNA in jungen und alten NMRI Mäusen und Einfluss von Extrakt 1014 auf die Bildung von 8-OHdG.**

Oxidative Schädigung der DNA (8-OHdG ng/ $\mu$ g DNA) in jungen und alten NMRI Mäusen der Fütterungsstudie I. Mittelwert und SEM. Einfluss der Extraktaufnahme (1014) auf die DNA-Schädigung. Mittelwert und SEM, n = 4-7, p = 0,0414 \* vs. unbehandelte alte Kontrolle, p = 0,0005 \*\*\* vs. unbehandelte junge Kontrolle.

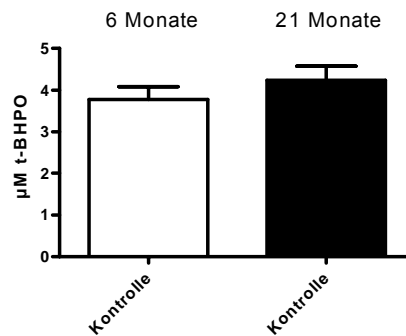
#### 4.4.2.4 Messungen aus dem Vollblut

Zur Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Spiegel als möglicher Indikator für zelluläre oxidative Schädigungen aus dem Vollblut wurde den Tieren nach Beendigung der ersten Fütterung retrobulbär Blut mittels einer heparinisierten Kapillare abgenommen und jeweils 3 mal 10  $\mu$ l für den Test verwendet.

##### 4.4.2.4.1 Zelluläre oxidative Schädigung (Hydroperoxid-Spiegel)

In Abbildung 4-42 ist zu erkennen, dass 21 Monate alte Tiere möglicherweise eine erhöhte zelluläre oxidative Schädigung gemessen in Form von Hydroperoxiden gegenüber 6 Monate alten Tieren aufwiesen.



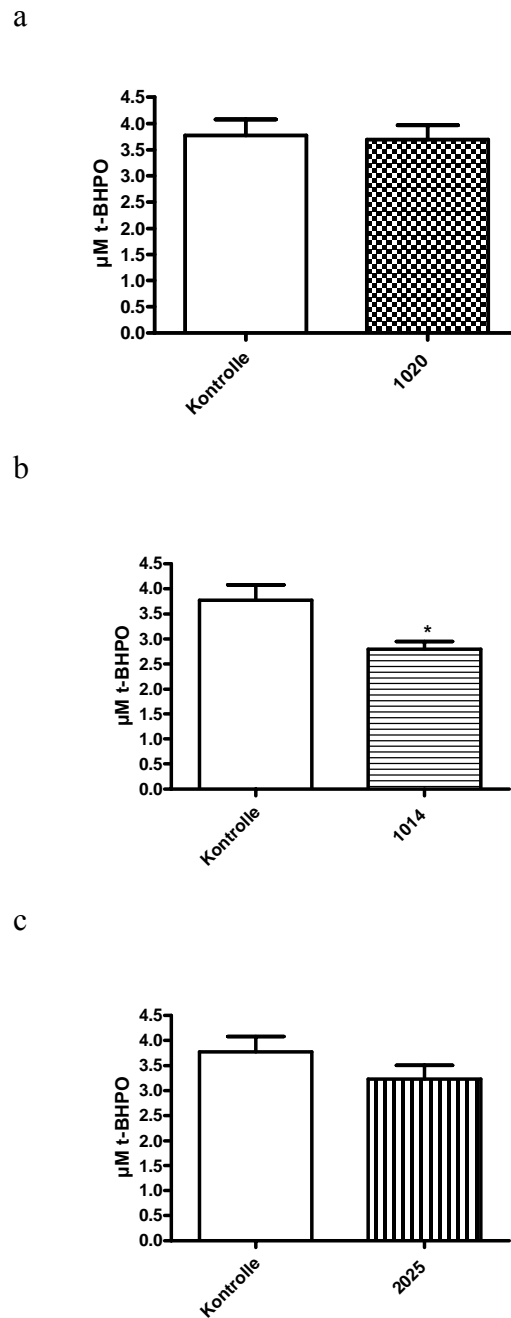


**Abbildung 4-42: Alterseffekt auf die initialen Hydroperoxid-Spiegel in weiblichen NMRI-Mäusen.**

Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) in 6 Monate alten Mäuse (weiße Balken,  $n = 7$ ) und in 21 Monate alten Mäusen (schwarze Balken,  $n = 5$ ), Mittelwert und SEM.

Die Fütterung der drei mediterranen Pflanzenextrakte hatte unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte in jungen Tieren zur Folge (Abbildung 4-43). Dabei waren alle Effekte eher positiv. Eine Fütterung führte also tendenziell zu einer Reduktion des Messparameters des Hydroperoxid-Spiegels, der bei Extrakt 1014 am stärksten und bei Extrakt 1020 am geringsten war.

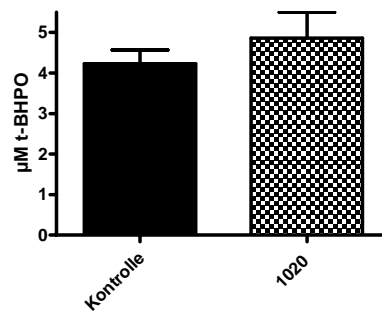
Bei den 21 Monate alten Tieren führte die Fütterung mit Extrakt 1020 zu einem leicht erhöhten zelluläre oxidative Schädigung (Abbildung 4-44), die mit Extrakt 1014 für 90 Tage gefütterten Tiere zeigten wie bei den jungen Tieren eine leichte Reduktion und Extrakt 2025-Aufnahme hatte keinen ausgeprägten Effekt auf die Bestimmung der Hydroperoxid-Spiegel.



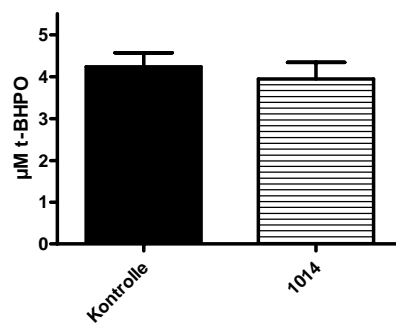
**Abbildung 4-43: Extrakteffekt auf die zelluläre oxidative Schädigung (initialen Hydroperoxid-Spiegel) nach Fütterung mit verschiedenen Extrakten für 3 Monate in jungen Mäusen.**

- a) Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in jungen ( $n = 7-8$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- b) initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in jungen ( $n = 7$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0120$  \* vs. junge Kontrolle.
- c) Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in jungen ( $n = 6-7$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

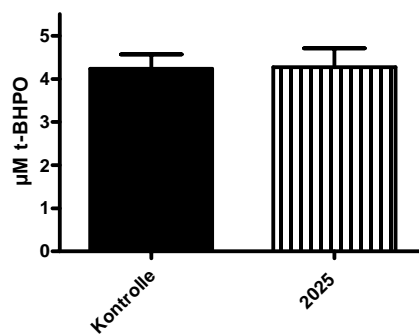
a



b



c



**Abbildung 4-44: Extrakteffekt auf die zelluläre oxidative Schädigung (initialen Hydroperoxid-Spiegel) nach Fütterung mit verschiedenen Extrakten für 3 Monate in alten Mäusen.**

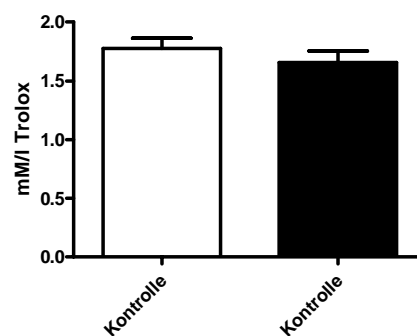
a) Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in alten ( $n = 5-6$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

b) Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

c) Initiale Hydroperoxid-Spiegel als  $\mu\text{M}$  tertiäres Butylhydroperoxid ( $\mu\text{M}$  t-BHPO) nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in alten ( $n = 5$ ) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.4.2 Antioxidative Kapazität (TEAC)

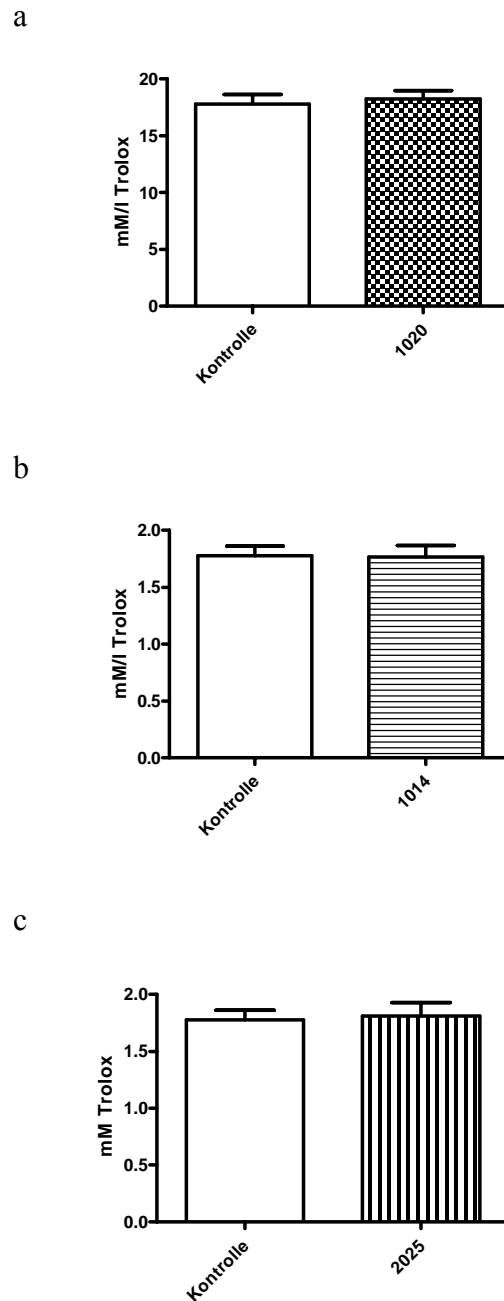
Nach der zweiten Fütterungsstudie wurde ein weiterer Parameter, die Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität (TEAC) untersucht. Hierbei wird das Vermögen des Serums, mit oxidativem Stress, im Vergleich zu Trolox umzugehen, untersucht. Dabei entspricht die TEAC der millimolaren Konzentration einer Trolox-Lösung, die die Antioxidative Kapazität von 1 mM/l Serum besitzt. Zuerst wurde den Tieren wie in der ersten Studie retrobulbär Blut abgenommen und aus dem Vollblut wie unter 3.2.5.1 beschrieben die Antioxidative Kapazität mittels Radikal-Quenchings detektiert. Abbildung 4-45 zeigt einen Alterseffekt in 21 Monate alten NMRI-Mäusen im Gegensatz zu 6 Monate alten Tieren. Dabei war die TEAC in alten Tieren unter dem Niveau der jungen Tiere.



**Abbildung 4-45: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität als  $\mu\text{M}$  Trolox in jungen und alten NMRI-Mäusen**

TEAC (mM Trolox) in jungen (weiße Säule, 6 Monate,  $n = 10$ ) und alten (schwarze Säule, 21 Monate,  $n = 7$ ) NMRI-Tieren, Mittelwert und SEM

Die Fütterung der Pflanzenextrakte zeigte eher wenig Effekt auf die TEAC in jungen Tieren (Abbildung 4-46). In den 21 Monate alten Mäusen resultierte die Fütterung für alle drei Extrakte in einer Verbesserung der Antioxidativen Kapazität, die für Extrakt 1014 am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 4-47).

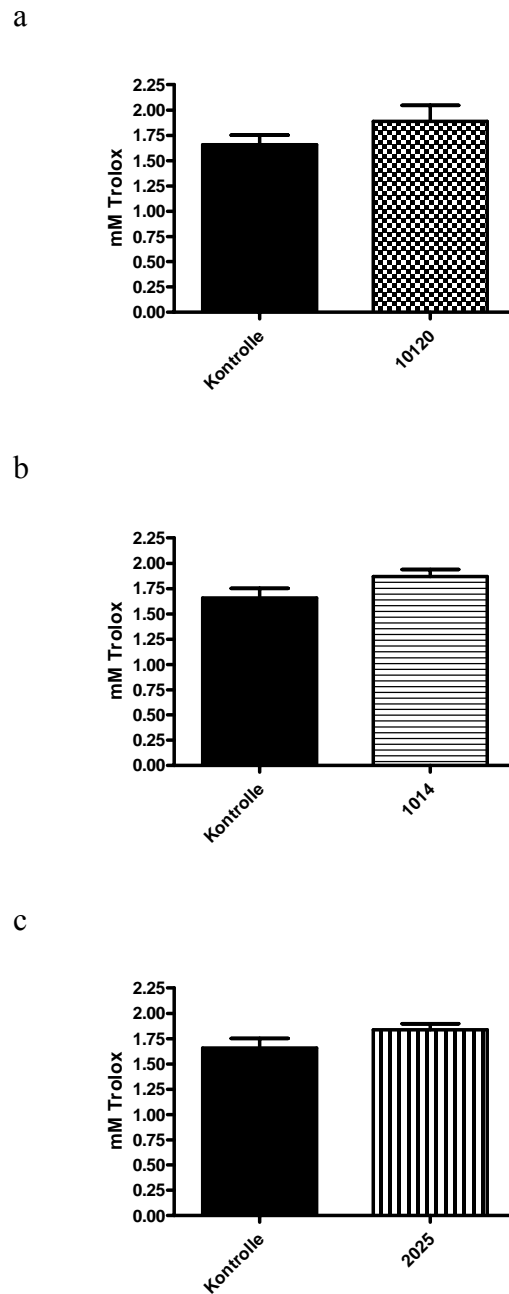


**Abbildung 4-46: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität in jungen NMRI-Mäusen nach Fütterung mit drei Extrakten für 3 Monate**

a) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in jungen (n = 8-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

b) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in jungen (n = 8-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0120$  \* vs. junge Kontrolle.

c) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in jungen (n = 8-10) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.



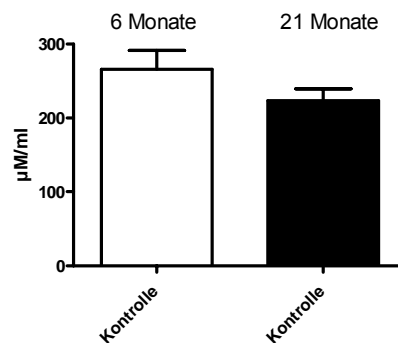
**Abbildung 4-47: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität in alten NMRI-Mäusen nach Fütterung mit drei Extrakten für 3 Monate**

- a) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1020 in alten (n = 4-7) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.
- b) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 1014 in alten (n = 7-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM,  $p = 0,0120$  \* vs. junge Kontrolle.
- c) TEAC als mM Trolox nach dreimonatiger Aufnahme von Extrakt 2025 in alten (n = 7-9) NMRI Mäusen. Mittelwert und SEM.

#### 4.4.2.5 Messungen aus dem Serum

##### 4.4.2.5.1 Antioxidative Kapazität (Oxy Adsorbent Test)

Zusätzlich zur Bestimmung der Antioxidativen Kapazität aus dem Vollblut (TEAC), wurde diese mit Hilfe einer standardisierten Methode aus dem Serum für die jungen und alten Kontrolltiere und die mit Extrakt 1014 gefütterten Tiere bestimmt. Dieser Test beruht auf der Bildung des DEPPD-Radikals, dessen Konzentration durch die antioxidativen Substanzen im Blut verringert wird und die spektrometrisch bei 505 nm detektierbar ist wie unter 3.2.5.3 beschrieben. In Abbildung 4-48 ist das Resultat für die Antioxidative Kapazität in jungen und alten Kontrolltieren dargestellt. Dabei war diese in 21 Monate alten Tieren tendenziell verringert gegenüber 6 Monate alten Tieren.



**Abbildung 4-48: Alterseffekt der Antioxidative Kapazität (Oxi Adsorbent Test) von jungen und alten NMRI-Mäusen**

Antioxidative Kapazität als  $\mu\text{M HOCl}$  die von 1 ml Serum absorbiert werden ( $\mu\text{M/ml}$ ) in jungen ( $n = 6$ ) und alten ( $n = 5$ ) Kontrolltieren, Mittelwert und SEM.

Die Fütterung mit Extrakt 1014-Pellets für 90 Tage führte zu einer deutlichen Verbesserung der Antioxidativen Kapazität im Gegensatz zu alten Kontrolltieren und zu einer weniger starken Verbesserung in jungen Tieren (Abbildung 4-49).

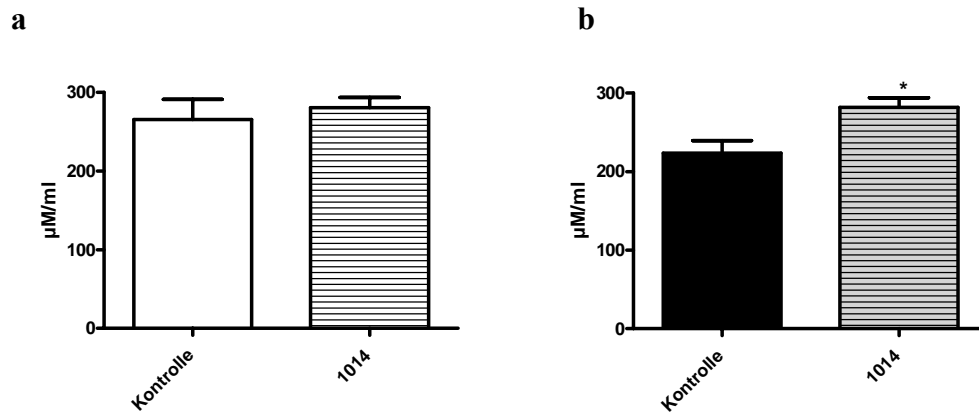


Abbildung 4-49: Extrakteffekt auf die Antioxidative Kapazität in jungen und alten NMRI-Tieren

Antioxidative Kapazität als  $\mu\text{M HOCl}$  die von 1 ml Serumprobe absorbiert werden ( $\mu\text{M/ml}$ ) a) in jungen ( $n = 6-8$ ) und b) in alten ( $n = 5-9$ ) Tieren, die für 3 Monate mit Extrakt 1014 gefüttert wurden, Mittelwert und SEM,  $p = 0,0158$  \* vs. alte Kontrolle.

#### 4.4.2.5.2 Oxidative Schädigung der Proteine (Carbonylierungs ELISA)

Um zu untersuchen ob das Alter und die Fütterung mit den drei verschiedenen Extrakten einen Einfluss auf die quantitative Schädigung von Proteinen haben, wurde eine ELISA durchgeführt, die die spezifischen Carbonylierungen der Proteine im Plasma sichtbar macht. In diesem Test wurde das Serum der alten und jungen Kontrolltiere der zweiten Fütterungsstudie und der Tiere, die Extrakt 1014 erhalten haben, untersucht. Dabei zeigte sich, dass die alten Tiere signifikant mehr durch oxidativen Stress carbonylierte Proteine aufweisen als junge Tiere (Abbildung 4-50).

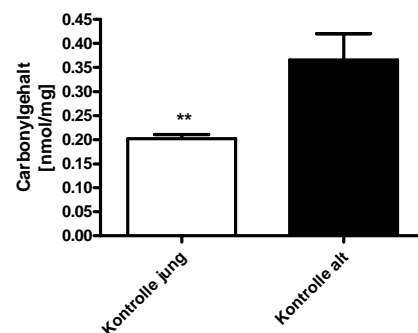
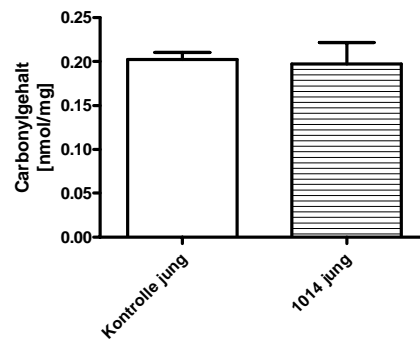


Abbildung 4-50: Alterseffekt auf den Carbonylgehalt in weiblichen NMRI-Mäusen

Carbonylgehalt der Proteine in jungen (6 Monate,  $n = 7$ ) und alten (21 Monate,  $n = 5$ ) Kontrolltieren, Mittelwert und SEM,  $p = 0,0054$  \*\* vs. alte Kontrolle.

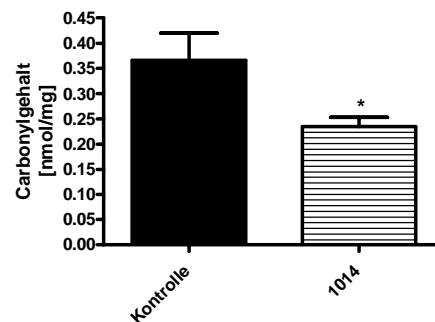


Eine Fütterung mit Extrakt 1014 führte in jungen Tieren, wie in Abbildung 4-51 dargestellt, zu keiner Verbesserung. Die Rate der oxidativ geschädigten Proteine konnte in alten Tieren durch die Extrakt-Aufnahme allerdings signifikant verringert werden (Abbildung 4-52).



**Abbildung 4-51: Effekt von Extrakt 1014-Fütterung für 3 Monate auf den Carbonylgehalt in jungen NMRI-Mäusen**

Einfluss des Extrakts 1014 auf die quantitative Carbonylierung von Proteinen in jungen (6 Monate, n = 7-8) Tieren, Mittelwert und SEM.



**Abbildung 4-52: Effekt von Extrakt 1014-Fütterung für 3 Monate auf den Carbonylgehalt in alten NMRI-Mäusen**

Einfluss des Extrakts 1014 auf die quantitative Carbonylierung von Proteinen in alten (21 Monate, n = 5) Tieren, Mittelwert und SEM, p = 0,0259 \* vs. alte Kontrolle.

## 5 Diskussion

Altersbedingte Veränderungen vieler physiologischer Parameter werden zum Teil durch eine Akkumulation reaktiver Radikale (ROS) und vermehrte oxidative Reaktionen hervorgerufen. Dabei entstehen hoch reaktive Moleküle, die mit verschiedenen Zellteilen weiter reagieren und eine Kettenreaktion auslösen, wenn sie nicht entgiftet werden. Neben Lipiden in den Zellmembranen werden auch Proteine und sogar die DNA der Mitochondrien und des Zellkerns angegriffen. Eine gesunde Zelle ist in der Lage mit einer gewissen Anzahl an radikalischen Angriffen fertig zu werden. Weiterhin ist bekannt, dass manche ROS im Körper physiologisch wichtige Aufgaben erfüllen. Superoxid und NO funktionieren z.B. als Sekundärbotenstoffe. Ist das Verhältnis zwischen der Produktion und der Entgiftung dieser Radikale aber nicht mehr im Gleichgewicht, kommt es zum so genannten „oxidativem Stress“ (vergleiche Abschnitt 1.3).

Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob und wie verschiedene oxidative und antioxidative Parameter mit dem Alter verändert sind und ob durch Gabe mediterraner Pflanzenextrakte für 3 Monate eine Verbesserung der antioxidativen Abwehrmechanismen in weiblichen Mäusen erreicht werden konnte. Zwei verschiedene Alterstufen (junge Tiere: 6 Monate und alte Tiere: 21 Monate) wurden in Fütterungsexperimenten eingesetzt, um eine Aussage darüber machen zu können, ob die beobachteten Effekte vom Alter beeinflusst werden. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der Extrakte als Nutraceuticals war es wichtig zu wissen, ob das Alter ein bestimmender Faktor ist, der die Wirksamkeit der gefütterten Extrakte z.B. Alterungsprozesse zu stoppen oder sogar wieder rückgängig zu machen verändert.

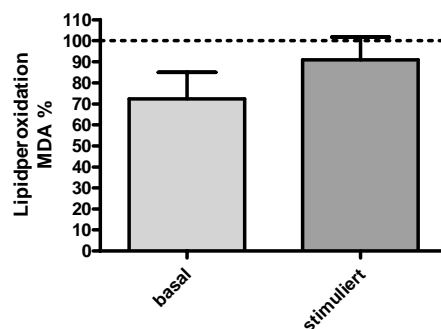
### **5.1 Alterseffekte auf oxidative Stress-Parameter in weiblichen NMRI Mäusen**

Der akkumulierte Einfluss von oxidativem Stress auf Membranen, Proteine und DNA und die damit verbundene Verschlechterung des allgemeinen Gesundheitszustandes und der kognitiven Leistungen alter Menschen und Tiere stellt eine gängige Theorie des Alterns dar. Das Gehirn ist eines der anfälligsten Organe hinsichtlich oxidativer Vorgänge, da es große Mengen Sauerstoff für eine optimale Funktionalität benötigt und zusätzlich eine große Menge ungesättigter Fettsäuren enthält, die extrem anfällig für radikalische Angriffe sind (Halliwell, 1992). Aus diesen Gründen wurde ein Großteil der untersuchten Parameter entweder aus Hirnhomogenat oder dissoziierten Neuronen der Mäuse untersucht. Zusätzlich wurden anschließend auch Marker für oxidativen Stress im Blut als peripheres Model bestimmt.

### 5.1.1 Lipidperoxidation im Gehirn von NMRI-Mäusen

In Gehirnen 21 Monate alter NMRI Mäuse konnten wir signifikant niedrigere basale MDA-Spiegel messen als in jungen Tieren (Abbildung 5-1). Weitere Untersuchungen an NMRI Mäusen und an einer anderen Mauslinie (C57BL/6J), die ebenfalls in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden sind, haben ein ähnliches Ergebnis gezeigt. So war die Lipidperoxidation in 18-22 Monate alten C57BL/6J Mäusen signifikant niedriger als in 3-4 Monate alten Tieren (Schüssel, 2005). Cand und Verdetti konnten ferner eine Verminderung des Lipidperoxidation-Produktes MDA im Gehirn und anderen Organen 24 Monate alter Ratten im Vergleich zu jungen Tieren messen (Cand et al., 1989). Dieses Ergebnis entspricht auf den ersten Blick nicht der Oxidativen-Stress-Hypothese, nach der, im Organismus im Laufe des Alterns reaktive Moleküle z.B. Lipidperoxidationsprodukte wie MDA entstehen und zu verstärkten Schäden führen. Im Gegensatz zu dieser Theorie und vorangegangenen Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe (Leutner et al., 2001), haben die neueren Ergebnisse niedrigere MDA-Spiegel in alten Tieren gezeigt. Generell gibt es in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Lipidperoxidation betreffend. Gründe dafür könnten unterschiedliche Haltungsbedingungen der Versuchstiere oder Versuchsansätze oder aber auch die verschiedenen Gewebeaufarbeitungen darstellen. Im Fall der in dieser Arbeit vorgestellten Studie haben alle Tiere während der Fütterung ein anderes Futter erhalten, als in den in der Arbeitsgruppe zu früherer Zeit durchgeführten Untersuchungen. Die beiden Futtersorten unterscheiden sich dabei hauptsächlich in den enthaltenen Vitaminmengen, wobei das in der neusten Studie verwendete Futter bis auf Vitamin B1 immer höhere Werte aufweist.

Für eine Erniedrigung der MDA-Level im Alter können zwei mögliche Gründe sprechen: entweder ist im Alter die Menge an ungesättigten Fettsäuren stark erniedrigt, die durch radikalische Angriffe geschädigt werden können, oder die antioxidative Gesamtkapazität ist als Gegenregulationsmechanismus in alten Tieren erhöht. Dass die Menge der PUFAs mit zunehmendem Alter reduziert ist, konnte sowohl in Tieren als auch in humanen Erythrozyten gezeigt werden (Lishinevs'ka et al., 2003, Youdim et al., 1999).



**Abbildung 5-1: Lipidperoxidation 21 Monate alter NMRI-Mäuse als Prozent der jungen Kontrolltiere.**

Basale (heller Balken) und stimulierte (dunkler Balken) Lipidperoxidation alter NMRI-Mäuse als % der jungen Kontrollen (gepunktete Linie).

Um eine Aussage über die Fähigkeit des murinen Systems Radikale abzufangen (Scavenging-Aktivität) machen zu können, wurden die Hirnhomogenate, zusätzlich zur Messung der basalen Lipidperoxidation, einem exogenen Stimulus unterworfen. Durch Inkubation mit Eisen-(III)-chlorid wurde oxidativer Stress in den Homogenaten *in vitro* stimuliert. Dabei werden  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen durch Superoxidradikale zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen reduziert, die wiederum zur Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid beitragen. Dieses Radikal ist in der Lage in einer weiteren Reaktion Lipidperoxidation und die damit verbundenen Kettenreaktionen zu initialisieren. Die Nettoreaktion wird als Haber-Weiss-Reaktion zusammengefasst (vergleiche Abschnitt 1.5), wobei die hier entstehenden Radikale ungesättigte Fettsäuren in der Membran angreifen und Hydroperoxide gebildet werden, die letztendlich zu Lipidperoxidationsprodukten wie MDA abgebaut werden. Deswegen ist die MDA-Bildung bei *in vitro*-Stimulation ein indirektes Maß für die Radikalabfangaktivität (Scavenging-Aktivität) des Systems. Die MDA-Konzentration war auch nach der Stimulation mit Eisenchlorid in alten Tieren niedriger als in jungen Tieren (9 %, Abbildung 5-1), dennoch wiesen alte Tiere eine erniedrigte Scavenging-Aktivität gegenüber exogen erzeugtem oxidativen Stress auf. Das heißt, die Zellen alter Tiere reagierten auf die Stimulation mit einem verstärkten Anstieg der MDA-Level und können folglich Radikale weniger gut abfangen (Abbildung 4-13). Die erniedrigten MDA-Spiegel in alten Tieren liegen folglich nicht an einem erniedrigten Fettsäuregehalt in den Membranen, da sich bei *in vitro*-Stimulation mehr MDA bildet, sondern könnte sich durch eine Verstärkung anderer antioxidativer Maßnahmen, wie z.B. eine Erhöhung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten, in den Zellen erklären lassen.

### 5.1.2 Veränderung der antioxidativen Enzym-Aktivitäten im Alter

Oxidative Schäden können entweder durch vermehrte ROS-Entgiftung oder verminderte ROS-Produktion verhindert werden. Die in alten Tieren gemessene verminderte Lipidperoxidation (Abbildung 4-12) kann z.B. durch erhöhte Aktivitäten der antioxidativen Enzyme im Hirn der alten NMRI Tiere erklärt werden. Durch die Aktivitätszunahme ROS-entgiftender Enzyme ist die ROS-Konzentration geringer und oxidative Schaden in Form von Lipidperoxidationsprodukten folglich ebenfalls erniedrigt.

Die Cu/Zn-SOD, GPx und GR sind die wichtigsten antioxidativen Enzyme des Gehirns. Eine erhöhte ROS-Entstehung führt häufig zu verstärkten Enzymaktivitäten, um der notwendigen Entgiftung schädlicher Spezies gerecht zu werden.

In der vorliegenden Fütterungsstudie waren alle gemessenen antioxidativen Enzym-Aktivitäten (SOD, GPx und GR) im Gehirn alter Tiere tendenziell erhöht (Abbildung 4-16), wodurch die erniedrigten basalen MDA-Level zumindest teilweise erklärt werden können. Die SOD-Aktivität war in alten Tieren nur tendenziell erhöht (13 %) (Abbildung 5-2). In der Arbeitsgruppe konnte eine ähnlich geringe Erhöhung SOD-Aktivität (11 %) in 19-21 Monate alten C57BL/6J-Mäusen im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren gezeigt werden (Schüssel, 2005). Im Gegensatz dazu hatten Leutner et al. eine 87 %-ige Erhöhung der MDA-Spiegel bereits in 10-12 Monate alten NMRI-Mäusen festgestellt, die auch in 20-21 Monate alten Tieren noch zu beobachten war (Leutner et al., 2001). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es sich nicht um artspezifische Veränderungen handelt, sondern eher experimentelle Unterschiede oder ein differierendes Futter für diesen Effekt verantwortlich sind. In der Studie von Schüssel wurde exakt die selbe Aufarbeitung der Gewebe und die selbe Methode wie in unserer Fütterungsstudie verwendet.

GPx- und GR-Aktivität waren in 21 Monate alten Tieren in der vorliegenden Studie deutlich erhöht (56 % und 44 %). Auch diese Ergebnisse entsprechen nicht den Resultaten von Leutner et al. Die Autoren hatten nur eine geringer Steigerung der GPx-Aktivität gezeigt. Hier stimmen unsere Messungen erneut mit den Daten von C57BL/6J-Mäusen überein, in denen eine steigende Zunahme der GPx-Aktivität mit zunehmendem Alter gezeigt werden konnte. Allerdings konnte sowohl in C57BL/6J als auch in NMRI-Tieren eine ca. 20 %-ige Steigerung gemessen werden, die nur der Hälfte der von uns beobachteten Steigerung entspricht.

Obwohl in der Literatur gegenteilige Berichte über die Aktivitäten von antioxidativen Enzymen zu finden sind, ist in den meisten Fällen die Aktivität der SODs am stärksten erhöht (Wei et al., 2002). Auch spielt das Verhältnis von SOD und GPx eine wichtige Rolle. Sind die

Aktivitäten der beiden Enzyme gleichmäßig erhöht, ist eine vollständige Entsorgung der reaktiven Moleküle gewährleistet. Ist aber die Aktivität nur eines Enzyms verstärkt, die Ratio folglich verändert, kann es zur Anreicherung gefährlicher Radikale kommen. Bei starker GPx-Erhöhung, ist die Ratio verkleinert und es wird vermehrt  $O_2^{\bullet-}$  in der Zelle akkumuliert, das die SOD nicht ausreichend entgiften kann. Ist hingegen die SOD-Aktivität erhöht, wird mehr  $H_2O_2$  gebildet, welches nicht mehr vollständig durch die GPx entgiftet werden kann. Sowohl das Superoxidanion als auch  $H_2O_2$  reagieren über die Fenton-Reaktion zum noch aggressiveren  $OH^{\bullet}$  (de Haan et al., 1996), wodurch es zu oxidativem Stress kommen kann. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass alle antioxidativen Enzym-Aktivitäten eine wichtige Rolle spielen und in einem komplexen Netzwerk zur zelleigenen Abwehr beitragen. Weiterhin scheint es der Fall zu sein, dass die gemessenen Enzym-Aktivitäten, wenn auch erhöht, nicht ausreichen, um das System vor exogen stimuliertem Stress ausreichend zu schützen, da sich ansonsten keine Lipidperoxidation in alten Hirnen *in vitro* stimulieren lassen würde (Abbildung 4-13).

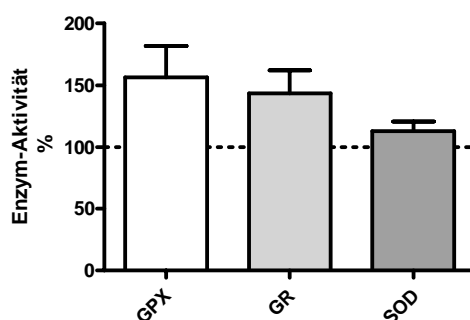


Abbildung 5-2: Aktivität der antioxidativen Enzyme in Prozent

Enzymaktivitäten in 21 Monate alten NMRI-Mäusen in Prozent der jungen Tiere. Die gepunktete Linie stellt die Enzymaktivitäten in jungen Kontrolltieren (6 Monate) dar.

### 5.1.3 Alterseffekte auf oxidative Stress-Parameter in dissoziierten Neuronen

Zusätzlich zur Messung der Lipidperoxidation und der antioxidativen Enzyme wurden noch Mitochondrien- und Cytosol-assoziierte ROS-Level, das mitochondriale Membranpotential und NO-Level in dissoziierten Neuronen junger und alter NMRI Mäuse bestimmt (Fütterungsstudie II). Dissoziierte Neurone wurden aus den Gehirnen weiblicher Mäuse isoliert und stellen ein geeignetes Testsystem zur Messung zellulärer ROS-Verhältnisse dar, da es sich um lebendige, intakte Zellen handelt.

### **5.1.3.1 Altersbedingte Veränderungen der ROS-Spiegel in NMRI Mäusen**

Nach der Oxidativen-Stress-Hypothese des Alterns sollten ROS-Spiegel in alten Tieren erhöht sein. Dies konnte allerdings in unserer Studie weder im Fall der cytosolischen noch der mitochondrialen ROS eindeutig gezeigt werden. Basale Mitochondrien-assoziierte ROS in 21 Monate alten Mäusen, gemessen als DHR-Fluoreszenz, waren gegenüber jungen Tieren nur um 3 %, basale Cytosol-assoziierte ROS (DCF) waren um 8 % erhöht (Abbildung 5-4 a). Ähnlich niedrige Effekte waren von Leutner et al. in NMRI-Tieren beobachtet worden. Dabei zeigten 20-21 Monate alte Tiere sogar leicht erniedrigte Mitochondrien-assoziierte ROS-Spiegel. Auch in murinen Lymphozyten konnten keine nennenswerten Veränderungen der mitochondrialen ROS-Level im Alter festgestellt werden (Schüssel, 2005). In allen drei Studien konnte keine Erhöhung der cytosolischen ROS detektiert werden. Diese Befunde weisen auf eine untergeordnete Rolle der cytosolischen und mitochondrialen ROS-Spiegel im Alter oder eine effektive Entgiftung der reaktiven Spezies selbst in alten Tieren und Zellen hin. Hier können wiederum die erhöhten Enzym-Aktivitäten maßgeblich beteiligt sein, da diese die ROS-Spiegel bis auf ein nur leicht erhöhtes Niveau entgiften können.

### **5.1.3.2 Altersabhängige Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials in NMRI-Mäusen**

Um zu untersuchen, ob trotz der nur leicht erhöhten mitochondrialen ROS-Spiegel eventuell das Membranpotential der Mitochondrien in alten NMRI-Tieren geschädigt war, wurden dissoziierte Neurone mit R123, der oxidierten Form des Farbstoffes DHR123 angefärbt. Der Farbstoff lagert sich auf Grund seiner Ladung direkt in die mitochondrialen Membranen ein und lässt Rückschlüsse auf Veränderungen des Membranpotentials zu.

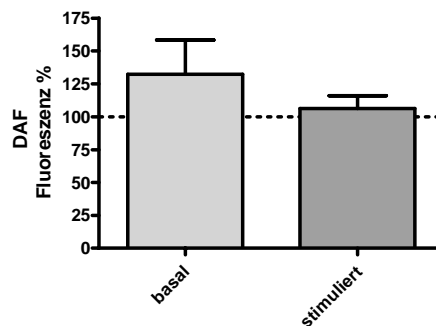
In der Literatur wird eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials einer Schädigung gleichgesetzt. Eine Depolarisation spiegelt sich in einer Abnahme der R123-Fluoreszenz wieder, da sich weniger positiv geladene Farbmoleküle in die Mitochondrienmatrix einlagern können (vergleiche 1.5.1.2). Das indirekt mittels Fluoreszenz gemessene basale Membranpotential der Mitochondrien alter Tiere erwies sich als um 13 % erniedrigt. Alte Tiere wiesen folglich tendenziell eine Depolarisation mitochondrialer Membranen gegenüber jungen Mäusen auf (Abbildung 4-26). Diese funktionelle Schädigung der Mitochondrien könnte durch erhöhte ROS-Spiegel ausgelöst werden. Da die mitochondrialen ROS-Spiegel aber nur sehr leicht angehoben waren, müssen andere ROS, wie z.B. NO oder Superoxidradikale, an diesem Effekt beteiligt sein. Da aber z.B. die



Superoxid-Spiegel aus Mangel an Gewebe nicht bestimmt werden konnte, kann hier kein weiterer Beleg für diese These gezeigt werden. In murinen Lymphozyten konnte jedoch keine Veränderung des mitochondrialen Potentials verbunden mit einer Erhöhung der Superoxid-Konzentration festgestellt werden, wodurch man eine Beteiligung dieses Radikals vermuten könnte (K. Schüssel).

### 5.1.3.3 Altersabhängige Veränderungen der NO-Spiegel in NMRI-Mäusen

Als weitere Ursache für geschädigte Mitochondrien kam noch eine erhöhte NO-Konzentration in Frage. NO ist ein gasförmiges Radikal, welches von NO-Synthasen aus L-Arginin gebildet wird, speziell im ZNS als Neuromodulator wirkt und z.B. bei Lern- und Erinnerungsfunktionen eine tragende Rolle spielt (Zhuo et al., 1994). Um zu untersuchen, ob die NO-Konzentration in alten NMRI-Mäusen erhöht war, wurde diese in dissoziierten Neuronen mittels Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-2-DA bestimmt. Dabei waren basale NO-Spiegel in alten NMRI Mäusen unserer Studie um 40 % gegenüber jungen Tieren erhöht (Abbildung 5-3).



**Abbildung 5-3: NO-Spiegel alter weiblichen NMRI Mäusen als Prozent der jungen Kontrolltiere.**

NO-Spiegel in 21 Monate alten Tieren gemessen als DAF Fluoreszenz in Prozent der jungen Kontrollen (gepunktete Linie).

Im Alter erhöhte NO-Spiegel konnten auch in peripheren Zellen von weiblichen C57BL/6J-Mäusen gezeigt werden (Schüssel, 2005). Dennoch gibt es unterschiedliche Meinungen, ob eher erhöhte oder erniedrigte NO-Spiegel mit zunehmenden Alter auftreten. Einige Autoren vertreten die Meinung, dass verminderte NO-Spiegel verbunden mit erniedrigten NO-Synthase-Aktivitäten z.B. für verminderte Lern- und Erinnerungsvorgänge verantwortlich sind (Noda et al., 1996, Yamada et al., 1998). Andererseits gibt es vermehrt Hinweise auf eine erhöhte NO-Produktion im Alter, bei der NO als freies Radikal wirkt und auf diese Weise zu

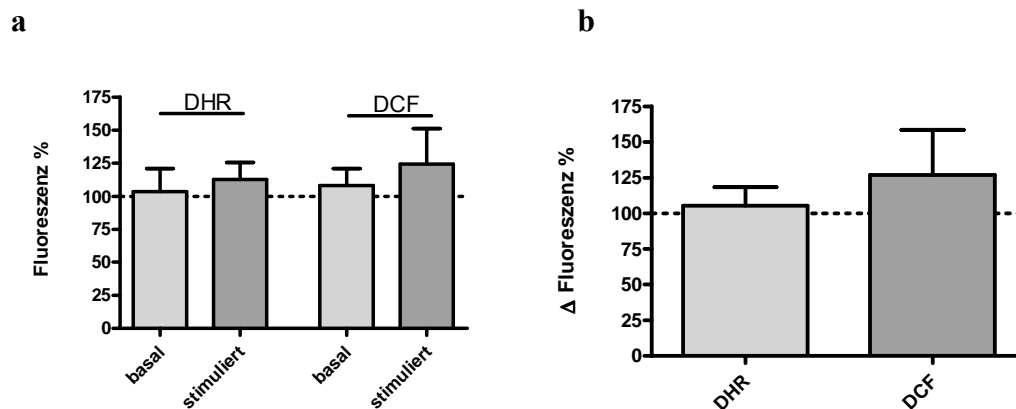
altersbedingten Schäden beitragen kann (Calabrese et al., 2000, Floyd et al., 2000, McCann, 1997). Erhöhte NO-Konzentrationen werden z.B. mit verminderten Immunfunktionen in alten Mäusen in Zusammenhang gebracht und sind möglicherweise in der Lage Apoptose, auszulösen (Bustamante et al., 2000, Quaglino et al., 2001). Hohe NO-Konzentrationen weisen auf eine vermehrte Aktivität der Synthasen hin. Da es drei verschiedene Isoformen des Enzyms gibt und in unserer Studie keine weiterführenden Untersuchungen gemacht worden sind, welche der drei Formen eine veränderte Aktivität aufweist, kann darüber keine Aussage gemacht werden.

Weiterhin wurde durch die H<sub>2</sub>DAF-Färbung untersucht, ob die beiden Farbstoffe DCF und DHR in unserer Studie, wie in der Literatur berichtet, zu einem Großteil auch durch Peroxynitrit oxidiert werden. Peroxynitrit wird in der Zelle durch Reaktion von NO mit Superoxidanionradikalen gebildet. Da die NO-Spiegel zwar erhöht, aber weder cytosolische noch mitochondriale ROS basal stark erhöht waren, deutet darauf hin, dass zumindest in dissoziierten Neuronen die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nicht verstärkt durch Peroxynitrit oxidiert werden oder die Superoxidradikalanion-Konzentrationen nicht hoch genug war, um Stickstoffmonoxid zu oxidieren.

#### **5.1.3.4 Radikalfängereigenschaften in Neuronen alter NMRI-Mäuse**

Die gesamte antioxidative Abwehrkraft eines Systems besteht nicht nur aus den antioxidativen Enzym-Aktivitäten. Um zusätzlich zu diesen Messungen auch die im Alter eventuell veränderten Radikalfängereigenschaften (Scavenging-Aktivität) der dissoziierten Neurone zu untersuchen, wurden die basal bestimmten oxidativen Parameter einem exogenen Stimulus ausgesetzt.

Durch Zugabe von Eisenchlorid erhöhten sich z.B. sowohl mitochondriale als auch cytosolische ROS-Konzentration und der basal detektierte Altersunterschied verstärkte sich. Mitochondriale ROS waren in alten Tieren um 13 % und cytosolische ROS um 24 % gegenüber den entsprechenden Kontrollen erhöht (Abbildung 5-4 a).

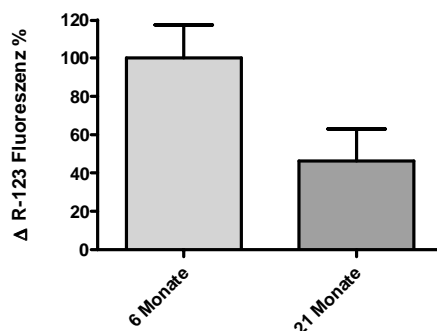


**Abbildung 5-4: Alterseffekt auf die ROS-Produktion (%) und Scavenging-Aktivität ( $\Delta$  Fluoreszenz) alter NMRI-Mäuse in Prozent der jungen Kontrolltiere.**

- a) Alterseffekt auf basale und stimulierte mitochondriale und cytosolische ROS-Produktion in % der jungen Kontrollen (gepunktete Linie).  
 b) Alterseffekt auf die ROS-Scavenging-Aktivität in % der jungen Kontrolltiere (gepunktete Linie)

In Abbildung 5-4 b sind die Scavenging-Aktivitäten, also die Reaktion der Neurone auf radikalerzeugende Stimuli, als Delta-Fluoreszenzen angegeben. Cytosol-assoziierte ROS ließen sich durch in vitro-Stimulation stärker erhöhen als mitochondriale ROS. In Mitochondrien um 5 % und im Cytosol um 27 % gegenüber den Kontrollen. Folglich wies das Cytosol eine verminderte Scavenging-Aktivität gegenüber Eisenchlorid-Stimulation auf als die Mitochondrien.

Auch das Vermögen alter Mitochondrien mit exogen erzeugtem Stress umzugehen wurde untersucht. Nach akuter Induktion von nitrosativem Stress in dissoziierten Neuronen konnte, wie bei der Messung des basalen Membranpotentials, ein Altersunterschied festgestellt werden. 21 Monate alte NMRI Mäuse hatten ein um 32 % erniedrigtes Membranpotential (Abbildung 4-27) gegenüber 6 Monate alten Tieren. Bei der Membranpotentialmessung wurde Stress durch Zugabe von SNP simuliert. SNP wird in die Zelle aufgenommen und setzt dort NO frei. Diese starke Erhöhung der NO-Konzentration führt zu einer Zerstörung der mitochondrialen Membran, einer Veränderung des Membranpotentials und folglich zu einem als R123-Fluoreszenz-Anstieg messbaren Farbstoffaustritt aus den Mitochondrien (Krohn et al., 1999). In diesen Versuchen zeigten Neurone alter NMRI-Mäuse bei exogener Reizung eine geringere Fluoreszenzzunahme als die Neurone junger Tiere. (Abbildung 5-5). Dies deutet primär auf eine verbesserte NO-Scavenging-Aktivität hin. Allerdings muss bedacht werden, dass die Neurone der 21 Monate alten Tieren auf Grund der basalen Vorschädigung schon weniger Farbstoff in die Mitochondrien eingelagert haben und bei einer Stimulation deswegen auch nur weniger R123 wieder austreten kann.



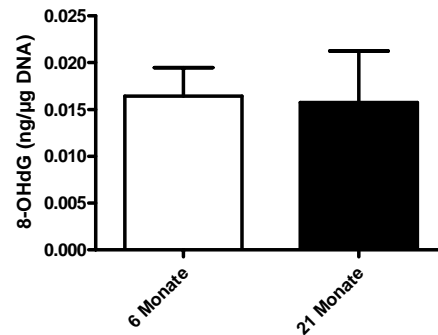
**Abbildung 5-5: Mitochondriale NO-Scavenging-Aktivität**

Scavenging-Aktivität der Mitochondrien 6 und 21 Monate alter NMRI Mäuse in % bei *in vitro*-Stimulation mit SNP.

Um die NO-Scavenging-Aktivität dissoziierter Neurone zu bestimmen, wurde ebenfalls eine *in vitro*-Stimulation durchgeführt. In beide Altersstufen ließen sich die NO-Spiegel mittels Stimulation stark erhöhen (Abbildung 4-33). Nach Zugabe des NO-Donors (PAPA-NONOate) war der Altersunterschied der NO-Level von 6 und 21 Monate alten NMRI-Mäusen zwar vorhanden, aber nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei den basalen NO-Spiegeln (15 %, Abbildung 4-34). Auch hatten alte NMRI Tiere nur eine leicht verringerte NO-Scavenging-Aktivität im Vergleich zu jungen Tiere (8 %, Abbildung 4-35).

#### **5.1.4 Einfluss des Alters auf die DNA-Schädigung**

Die DNA ist ebenfalls Gegenstand der durch ROS ausgelösten Schäden. Diese können weitreichende Veränderungen wie z.B. Mutationen nach sich ziehen, wenn sie nicht durch Reparaturmechanismen wieder in den Grundzustand zurückgebracht oder entsorgt werden. Eine gut messbare spezifische Veränderung durch oxidative Vorgänge ist die Hydroxylierung der Base Guanosin, die in der Bildung von 8-Hydroxydeguanosin (8-OHdG) resultiert (Chiou et al., 2003). Die 8-OHdG-Bildung kann zu fehlender Basenpaarung und falschem Ablesen der modifizierten und der umliegenden Basen führen. Gegen diese oxidativen Schäden besitzt jede Zelle unterschiedliche Reparaturmechanismen, wie zum Beispiel Enzyme, die Strangbrüche reparieren oder falsche Basen entfernen, um die Integrität der DNA wiederherzustellen. Dennoch können diese Abwehrmechanismen bei Krankheit oder mit zunehmendem Alter vermindert sein, wodurch eine Akkumulation der veränderten Basen auftritt (Chatgililoglu et al., 2001).



**Abbildung 5-6: Alterseffekt auf die oxidative Schädigung der Gesamt-DNA in jungen und alten NMRI Mäusen**

Oxidative Schädigung der DNA (8-OHdG ng/μg DNA) in jungen (6 Monate, n = 7) und alten (21 Monate, n = 4) NMRI Mäusen der Fütterungsstudie I. Mittelwert und SEM.

In der von uns durchgeführten Studie konnten in Hirnen junger und alter Kontroll-Mäusen keine altersabhängigen Veränderungen der oxidativen DNA-Schädigung mittels ELISA festgestellt werden (Abbildung 5-6).

Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen propagiert einen Zusammenhang von DNA-Schädigung, Reparatur der DNA-Schäden und dem Altern (Bohr et al., 1995). Und obwohl es keine einheitliche Meinung darüber gibt, wurde in einigen der Arbeiten eine Steigerung der Anzahl oxidativer Läsionen (8-OHdG) mit steigendem Alter beobachtet. Dabei wurden erhöhte 8-OHdG-Level in nucleärer DNA aus Leber Herz, Gehirn, Niere und Skelettmuskel und in mitochondrialer DNA aus der Leber gefunden von Ratten und Mäusen (Hamilton et al., 2001). Die Gründe für dieses Phänomen wurden in einer Abnahme der oxidativen Abwehrmechanismen (Ames et al., 1993, Martin et al., 1996) und einer verminderten Reparatur der DNA vermutet.

In der Literatur gibt es weiterhin Hinweise, dass die 8-OHdG-Level abhängig sind von verschiedenen Faktoren. Dabei spielen das Alter, das Geschlecht, das Organ und der untersuchte Tierstamm eine wichtige Rolle (Schmerold et al., 2001). Bei der Untersuchung von 12 verschiedenen Organen von jungen und alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten waren nur die 8-OHdG-Spiegel der zellulären DNA in der Leber und den Nieren von 30 Monate alten Tieren im Gegensatz zu 5 Monate alten Tieren signifikant erhöht. Gehirne wiesen sogar tendenziell erniedrigte oxidative Schädigungen auf.

### 5.1.5 Oxidative Veränderungen im peripheren System

Neben oxidativen Veränderungen im Gehirn, als zentrales Organ, von jungen und alten NMRI-Mäusen wurden noch zelluläre oxidative Schädigungen, die Antioxidative Kapazität und die oxidative Schädigung von Plasmaproteinen im Blut als peripherem Modell untersucht.

#### 5.1.5.1 Bestimmung der initialen Hydroperoxid-Spiegel

Zur Messung eines Indikators für zelluläre oxidative Schäden wurden die initialen Hydroperoxid-Spiegel aus dem Vollblut der Mäuse in der ersten Fütterungsstudie bestimmt. Diese Methode beruht auf einer standardisierten Messung der zellulären oxidativen Schädigung von humanem Serum oder Plasma in Apotheken (d-Roms-Test, 3.2.5.1) und wurde für die Messung des Mausblutes als Labormethode nachgestellt. Normalerweise werden die Ergebnisse nach dem Erfinder der Methode in so genannten Carratelli-Einheiten angegeben. Die Abstufungen der Werte und ihre Bedeutung sind in Tabelle 5-1 angegeben. Allerdings sind die in der Tabelle angegebenen Werte Richtwerte, die sich bisher nur dazu eignen z.B. einen Einfluss von Antioxidantien in intraindividuellen Studien am Menschen zu untersuchen. Bisher gibt es auch keine Messungen an Mausblut, daher wurde im Verlauf dieser Arbeit die Darstellung der oxidativen Schädigung als  $\mu\text{mol}$  tertiäres Butylhydroperoxid (t-BHPO) gewählt. Die Ergebnisse sind unter 4.4.2.4.1 dargestellt. Dabei konnte in 21 Monate alten Tieren eine Erhöhung der Hydroperoxid-Spiegel von 12 % gegenüber 6 Monate alten Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 4-42).

<b>Carratelli-Einheiten</b>	<b>Bedeutung</b>
200-250	Sehr gute Werte
251-300	Gute bis normale Werte
301-320	Geringe oxidative Belastung
321-360	Oxidativer Stress
361-400	Starker oxidativer Stress
> 400	Sehr starker oxidativer Stress

**Tabelle 5-1: Messbereiche des d-Roms-Tests und wissenschaftliche Bedeutung beim Menschen**

### 5.1.5.2 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität

Weiterhin wurde die Antioxidative Kapazität sowohl im Vollblut (TEAC, 3.2.5.2) als auch im Serum (Oxy Adsorbent Test, 3.2.5.3) der Mäuse aus der zweiten Fütterungsstudie untersucht, um einen weiteren wichtigen Faktor bei der Untersuchung von oxidativen Einflüssen auf den Organismus zu messen. Beide Tests zeigten in 21 Monate alten Tieren eine geringere Antioxidative Kapazität. Im Oxy Adsorbent Test hatten alten Mäuse eine um 16 % und im TEAC eine um 7 % geringere Kapazität. Die Messwerte der beiden Methoden unterscheiden sich stark (Abbildung 4-45 und Abbildung 4-48). Diese Abweichungen liegen wahrscheinlich an den unterschiedlichen Messansätzen. Die Einheit des Oxy Adsorbent Tests ist  $\mu\text{M HOCl}$ , die vom einem Milliliter Serum absorbiert werden können. Die Referenzwerte für diese Messung für Menschen sind in Tabelle 5-2 dargestellt. Die von uns gemessenen Werte liegen bei 224  $\mu\text{M HOCl/ml}$  für junge und bei 266  $\mu\text{M HOCl/ml}$  für alte Mäuse. Den humanen Referenzwerten zur Folge wäre selbst die Antioxidative Kapazität der jungen Kontrolliere schon sehr stark reduziert, die Werte der alten Tiere würden auf starken oxidativen Stress hinweisen. Es ist allerdings möglich, dass für die Antioxidative Kapazität von Mäusen andere Richtwerte gelten und ebenso wie bei den Carratelli-Werten (Tabelle 5-1) sind die angegebenen Bereiche nur geeignet um Veränderungen im Blut durch Variation bestimmter Nahrungsfaktoren zu messen. Tatsache ist, dass die Abstufungen zwischen den einzelnen unterschiedlich geschädigten Bereichen ca. 30  $\mu\text{M HOCl/ml}$  ausmachen und ein von uns gemessener Unterschied von 42  $\mu\text{M HOCl/ml}$  definitiv auf eine unterschiedliche Kapazität zwischen 6 und 21 Monate alten NMRI-Mäusen hinweisen.

Das Referenzintervall für die Antioxidative Kapazität gemessen mittels TEAC-Test ist für humanes Plasma oder Serum 1,32 – 1,58 mM/l Trolox (Miller et al., 1993). Die von uns gemessenen Werte von 1,78 mM/l Trolox für junge und 1,66 mM/l Trolox für alte Tiere liegen ungefähr in diesem Bereich.

$\mu\text{M HOCl /ml}$	Bedeutung
> 350	Normale Werte
350-320	Leichte Reduktion
319-280	Mittlere Reduktion
279-250	Starke Reduktion
<250	Sehr starker Reduktion

**Tabelle 5-2: Humane Referenzwerte für den Oxi Adsorbent Test und ihre Bedeutung**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Menschen mit kardiovaskulären oder anderen Stress-assoziierten Krankheiten höhere Hydroperoxid-Level und eine niedrigere Antioxidative Kapazität besitzen. So ist z.B. erhöhter Alkoholkonsum mit erhöhten Hydroperoxid-Spiegeln verbunden (Trotti et al., 2002) und Patienten mit Claudicatio intermittens wiesen ebenfalls erhöhte oxidative Stress Parameter auf (Cesarone et al., 1999). Diese Tatsache passt gut zu unseren Ergebnissen in alten Mäusen, die laut Harmans Theorie ebenfalls kumulativ erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind.

### 5.1.5.3 Altersabhängige Veränderungen der Proteine

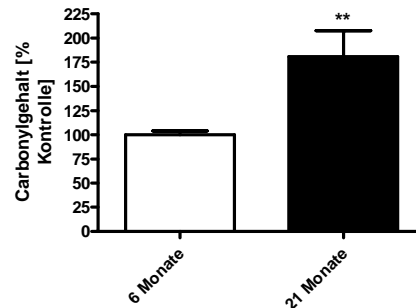
Das Alter wird als einer der größten Risikofaktoren vieler neurodegenerativer Krankheiten angesehen. Seit einiger Zeit ist klar, dass auch im gesunden alten Gehirn Veränderungen, wie z.B. Proteinoxidationen von statten gehen und alters-assoziierte neurodegenerative Krankheiten wie z.B. Alzheimer und Parkinson Demenz werden durch die Anwesenheit und Ablagerung abnormaler Proteinformen im Gehirn charakterisiert (Sayre et al., 2001). Diese abnormalen Proteine können das Ergebnis oxidativer Schädigung sein. Oxidative Schädigungen von Proteinen äußern sich z.B. in akkumulierten Carbonylierungen der Seitenketten (Stadtman, 1990).  $H_2O_2$  und HOCl können z.B. direkt Aminosäureseitenketten oxidieren und die Carbonylierung dieser einleiten (Berlett et al., 1997, Wondrak et al., 2000). Proteincarbonylierungen lassen sich nach einer Derivatisierung mit DNP mit hoher Sensitivität mittels ELISA nachweisen (Buss et al., 1997).

Bei der Untersuchung des Alterseinflusses auf die oxidative Schädigung zeigte sich ein über 80 % erhöhter Carbonylierungs-Level im Plasma von 21 Monate alten Tieren im Gegensatz zu 6 Monate alten Tieren (Abbildung 5-7).

Folgen von oxidativen Angriffen und nachfolgenden Veränderungen der Proteine können vielfältig sein. Die Konsequenzen dieser Reaktionen sind in Abbildung 5-8 dargestellt. Zu hohe ROS-Konzentrationen können chemische Modifikationen auslösen, die entweder reversibel oder irreversibel sind. Die umkehrbaren Modifikationen finden meist an den Cysteinresten statt und können eine Rolle in der Protektion der Cysteinreste spielen oder die Proteinfunktion modulieren. Die nicht umkehrbaren Veränderungen sind meist mit einem Verlust der Funktion und der strukturellen Integrität verbunden und können zur Elimination oder Aggregation der betroffenen Proteine führen (Ghezzi et al., 2003, Stadtman, 1990). Die Carbonylierung von Proteinen bedeutet z.B. die Einfügung einer relativ großen Gruppe und kann deshalb vielfältige Folgen nach sich ziehen. So kann es zu intermolekularen Cross-



linking oder Spaltung der Proteine kommen (England et al., 2004). Folglich ist die Rate der Proteindegradation verändert oder die Aktivität der betroffenen Proteine verringert.

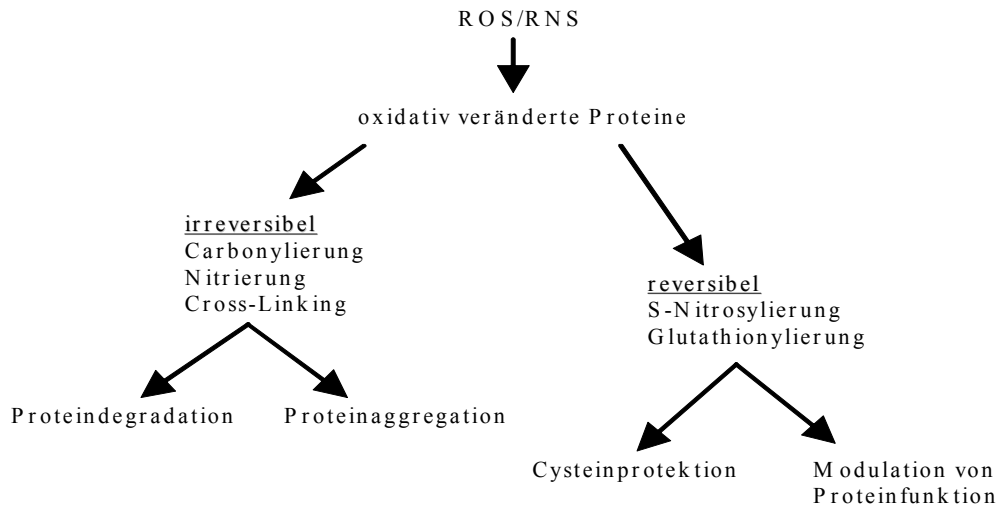


**Abbildung 5-7: Oxidative Schädigung von Plasmaproteinen in % Kontrolle**

Maß der oxidativen Schädigung als % der Kontrolle im Plasma von jungen ( $n = 7$ ) und alten ( $n = 5$ ) Kontrolltieren, Mittelwerte und SEM,  $p = 0,056$  \*\* vs. Kontrolle jung.

Levine und Stadtman haben einen dramatischen Anstieg des Carbonylgehaltes in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies im letzten Lebensdrittel berichtet (Levine et al., 2001, Stadtman et al., 2000). Den Autoren zu folge trägt im Durchschnitt ein Drittel der Proteine der untersuchten Spezies im Alter diese spezifische Modifikation (Stadtman et al., 2000). 2003 haben Soreghan et al. mittels LC MS/MS über 100 carbonylierte Proteine in Gehirnen von 18 Monate alten C57B Mäusen identifiziert. Unter diesen Proteinen sind interessanter Weise eine Reihe mitochondrialen Ursprungs (Soreghan et al., 2003). Obwohl eine so große Anzahl an oxidativ geschädigten Proteinen gefunden werden konnte, ist die Carbonylierung eine spezifische Veränderung, die verschiedene Proteine unterschiedlich stark beeinflusst. Hochmolekulare Proteine werden dabei öfters betroffen als mittelschwere Proteine und schon 1994 wurde gefunden, dass die mitochondrialen Proteine extrem anfällig sind für oxidative Angriffe im Alter (Agarwal et al., 1995). Durch den katalytischen und strukturellen Verlust der geschädigten Proteine ist es wahrscheinlich, dass hohe Schädigungsraten schwerwiegende Effekte auf Zellen und Organe mit sich bringen. Solche Reaktionen verändern auch die Aktivitäten antioxidativer Enzyme, woraus eine verschlechterte oxidative Schutzfunktion des Gehirns resultieren kann. Im Plasma ist die Proteinoxidation ebenfalls ein selektiver Prozess. Jana et al. haben entdeckt, dass von den untersuchten Plasmaproteinen einzig Albumin in alten Rhesusaffen, Ratten und Mäusen oxidativ verändert war (Jana et al., 2002). Dabei hatten 24 Monate alte C57BL/6Nia-Mäuse um 72 % erhöhte carbonylierte Protein-Level im Gegensatz zu 4 Monate alten Mäusen.

Neben Albumin war noch ein Protein mit einem molekularen Gewicht von 75 kD verstärkt carbonyliert, welches als Transferretin identifiziert werden konnte. Davies et al. haben zusätzlich gezeigt, dass ROS die Anfälligkeit von BSA für proteolytische Vorgänge dosisabhängig erhöhen (Davies et al., 1987b).



**Abbildung 5-8: Mögliche Konsequenzen von oxidativem Stress auf die Proteinfunktion nach Ghezzi (Ghezzi et al., 2003)**

Da in dieser Arbeit die durch oxidativen Stress carbonylierten Proteine nicht weiter identifiziert werden konnten, kann keine klare Aussage über die spezifischen Proteine getroffen werden. Eine Reduktion der Antioxidativen Kapazität, wie sie im Plasma 21 Monate alter Mäuse in unserer Studie gefunden wurde, ist aber für oxidative Schädigung von Albumin schon 1999 von Bourdon et al. beobachtet worden (Bourdon et al., 1999).

### 5.1.6 Zusammenfassung der Alterseffekte in weiblichen NMRI-Mäusen

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen an Hirnhomogenaten und dissoziierten Neuronen von alten NMRI-Mäusen, dass das Altern zur Aktivierung verschiedenster antioxidativer Abwehrmechanismen führt, die dazu dienen ROS-Level auf einem möglichst unschädlichen Niveau zu halten. Dabei spielen vor allem die erhöhten Enzym-Aktivitäten eine wichtige Rolle. Die Enzyme fangen die reaktiven Spezies zu einem relativ frühen Zeitpunkt ab und verhindern so z.B. eine vermehrte Schädigung der Lipidmoleküle. Diese Theorie konnte durch die von uns beobachteten erniedrigten MDA-Level in 21 Monate alten Mäusen bestätigt werden.

Weiterhin spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle im Alterungsprozess, da sie unter physiologischen Konditionen als wichtigste intrazelluläre Quelle für ROS gelten (Wei et al., 2002). Trotz einer verstärkten Entgiftung der ROS durch erhöhte Enzym-Aktivitäten, können kleine Mengen an reaktiven Spezies der zellulären Abwehr entkommen und so verschiedene Zellbestandteile wie auch die Mitochondrien selber schädigen. Hier kommt es z.B. auch zum Öffnen von Poren in der mitochondrialen Membran und zu einer Ausschüttung apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C (Tatton et al., 1999). In unserer Studie zeigten weibliche NMRI-Tiere im Alter weiterhin eine leichte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die Funktionalität dieser lebenswichtigen Organellen vermindert sein kann. Die Vermutung, dass NO eine modulierende Rolle in diesem Prozess spielt, liegt auf Grund der stark erhöhten NO-Level in alten Tieren nahe. Sowohl in Tieren als auch in Menschen wird eine Beteiligung von NO am Alterungsprozess vermutet (Siles et al., 2002, Tohgi et al., 1999). Ferner ist bekannt, dass NO in der Lage ist mit Superoxidradikalen zum hochreaktiven Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) zu reagieren, welches wiederum seinerseits DNA und Proteine angreifen und verändern und die antioxidative Abwehr verringern kann (Torreilles et al., 1999). In unserer Studie konnte zwar keine vermehrte DNA- Oxidation im Gehirn dafür aber eine starke Proteinoxidation im Plasma von alten Mäusen detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für die großen Effekte bei der Messung der Proteinschädigung ist, dass das Blut als peripheres Modell nicht die gleichen starken Schutzmechanismen wie das Gehirn besitzt, da es einer ständigen Erneuerung unterliegt und nicht wie die Gehirnzellen lebenslang oxidative Schäden akkumuliert.

Auch war in der Peripherie die oxidative Schädigung in alten Tieren leicht erhöht und die Kapazität sowohl im TEAC als auch im OAT erniedrigt, wofür vermehrte Superoxidradikale und NO-Level eine Erklärung darstellen können. Insgesamt sind in alten NMRI-Mäusen

diverse Parameter beeinflusst, wobei die verstärkte Aktivität der antioxidativen Enzyme und die erhöhten NO-Spiegel die prominentesten Veränderungen waren.

## 5.2 Extrakteffekte auf oxidative Parameter in weiblichen NMRI Mäusen

Neben den altersabhängigen Veränderungen der antioxidativen Abwehr und verschiedener oxidativen Parametern wurde der Einfluss einer dreimonatigen Fütterung mit jeweils einem von drei verschiedenen mediterranen Pflanzenextrakten (100mg/kg KG Tag) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) NMRI-Mäusen untersucht. Die Extrakte wurden durch ethanolschen Auszug aus folgenden, von der lokalen Bevölkerung in Italien und Spanien, traditionell verzehrten Pflanzen gewonnen: *Reichardia picroides* (1014), *Urospermum picroides* (1020) und *Thymus piperella* (2025). Die gefriergetrockneten Extrakte wurden von der Firma Sniff Spezialdiäten in Futterpellets gepresst und die Tiere hatten während der Fütterung freien Zugang zu Futter und Wasser.

### 5.2.1 Nicht-kultivierte Pflanzen in den mediterranen Ländern

In mediterranen Ländern werden wilde Blattgemüse und Salate regelmäßig gesammelt, um eine größere Gemüsevielfalt zu haben und positive Effekte auf die Gesundheit zu erzielen. Das erniedrigte Risiko kardiovaskulärer Vorfälle und anderer degenerativer Krankheiten wird zum Teil dem signifikant höheren Verzehr von pflanzlichen Nahrungsmitteln zugeschrieben (Trichopoulou et al., 2000). Auf der griechischen Insel Kreta werden z.B. 200 wilde Pflanzenspezies sowohl in den privaten Haushalten als auch den Restaurants gegessen. Diese werden von der einheimischen Bevölkerung gesammelt und entweder selbst konsumiert oder auf den lokalen Märkten zum Verkauf angeboten.

### 5.2.2 *Reichardia picroides* (1014)

*Reichardia picroides*, deutscher Trivialnamen Bitterkraut, gehört zur Familie der Asteraceae und stammt aus Griechenland, wo die Pflanze in der traditionellen Ernährung verzehrt wird. Dazu werden die Blätter häufig roh als Snack oder als Salat gegessen oder gekocht und anschließend in Olivenöl gebraten. Die letzte Variante wird häufig mit Chili und Knoblauch gewürzt. Über gesundheitlich positive Wirkweisen der Pflanze ist nicht viel bekannt. In den



ruralen Sammelgebieten werden junge Blätter zerstoßen und gegen Zahnschmerzen zerkaut (S. Nebel, persönliche Kommunikation). Die Bewohner einer ländlichen Region in Sardinien sprechen der Pflanze auch diuretische und tonische Eigenschaften zu (Loi et al., 2004). Als Inhaltsstoffe wurden von Recio et al. hauptsächlich das Flavonoid-Glykosid Luteolin-7-O-Glykosid identifiziert (Recio et al., 1992). Weiterhin haben die Autoren im methanolischen Extrakt der Pflanze mehrere Apigenin-Glykoside, Chlorogensäure und Isochlorogensäure gefunden (Abbildung 5-9). Luteolin und Apigenin gehören zu den in Pflanzen häufig vorkommenden Flavonoiden. Chlorogensäure gehört zu den Phenolsäuren und kommt z.B. im Kaffee vor. Sie ist bekannt für ihre antioxidativen, antikanzerogenen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften.

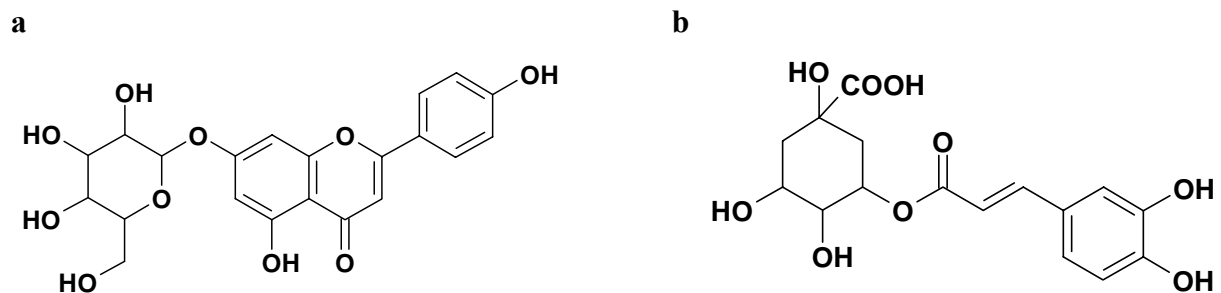


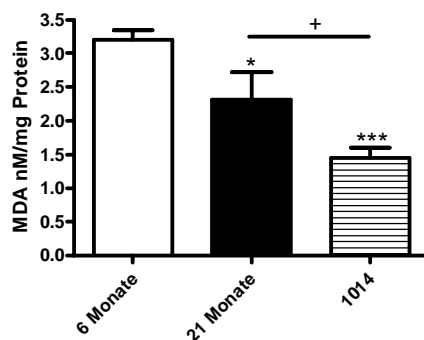
Abbildung 5-9: Strukturformeln phenolischer Komponenten von *Reichardia picroides*

a) Strukturformel von Apigenin-7-O-Glukosid und b) Chlorogensäure

### 5.2.2.1 Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 1014

#### *Effekte bei 6 Monate alten Tieren*

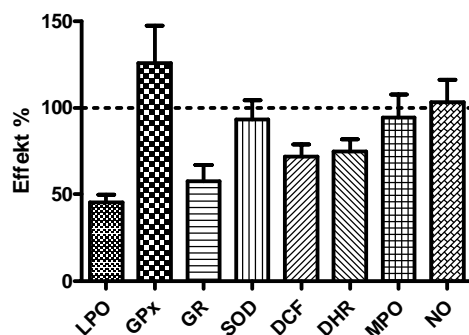
Jeweils eine Gruppe junger und alter NMRI-Mäuse erhielten den *Reichardia*-Extrakt in Form von supplementierten Futterpellets für drei Monate. Anschließend wurde der Einfluss der Extrakte auf die basale und stimulierte Lipidperoxidation untersucht. Die Fütterung resultierte in einer Erniedrigung der basalen und stimulierten MDA-Spiegel in 6 Monate alten NMRI Mäusen. Die MDA-Spiegel waren in jungen, Extrakt-gefütterten Tieren basal signifikant um 55 % gegenüber der jungen Kontrollgruppe erniedrigt (Abbildung 5-10).



**Abbildung 5-10: Basale Lipidperoxidation in jungen und alten Kontrolltieren und jungen mit Extrakt 1014 gefütterten Mäusen**

Basale Lipidperoxidation (MDA nM/mg Protein) in jungen Kontrolltieren (6 Monate, n = 8) und alten Kontrolltieren (21 Monate, n = 5) und jungen mit Extrakt 1014 gefütterten Tieren (6 Monate, n = 7). Mittelwerte und SEM, p = 0,0334 \*, p < 0,0001 \*\*\* vs. junge Kontrolle, p = 0,0446 + vs. alte Kontrolle.

Diese Erniedrigung kann ein Zeichen dafür sein, dass die Inhaltsstoffe des Extrakts in der Lage sind die ROS direkt abzufangen. Die Messung der GPx-, GR- und SOD-Aktivität zeigten, dass die GPx-Aktivität um 26 % erhöht war. Die Aktivität der GR und SOD waren um 42 % bzw. 7 % niedriger als in gleichalten Kontrolltieren. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die verminderten MDA-Level auf starke Radikalfängereigenschaften des Extraktes zurückzuführen sind.



**Abbildung 5-11: Effekt der Extraktgabe auf die untersuchten Parameter im Gehirn junger NMRI-Mäuse**

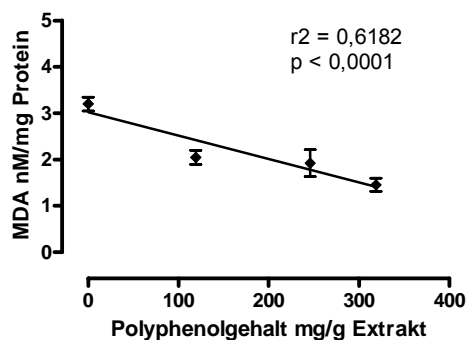
Diese Theorie lässt sich durch die basal um 25 % verringerten mitochondrialen ROS-Spiegel und um 28 % verminderten cytosolischen ROS-Level in den Neuronen junger Mäuse unterstützen (Abbildung 5-11). Auch zeigten dissoziierte Neurone nur eine leichte Erhöhung der NO-Spiegel und damit verbunden auch nur eine leichte Depolarisation des Membranpotentials der Mitochondrien (6 %) gegenüber den Kontrolltieren.

Neben den bisher gezeigten Parametern wurde der Polyphenolgehalt (PPG) aller Pflanzenextrakte in mg/g Extrakt mittels Folin-Ciocalteu-Assay vom italienischen Konsortiumspartner bestimmt. Die Polyphenolgehalte der drei in den Fütterungsstudien eingesetzten Extrakte sind in Tabelle 5-3: Polyphenolgehalt der drei mediterranen Pflanzenextrakte angegeben (Local Food Nutraceutical Consortium, 2006).

Extrakt	PPG
1014	319
1020	246
2025	119

**Tabelle 5-3: Polyphenolgehalt der drei mediterranen Pflanzenextrakte in mg/g Extrakt**

Um zu überprüfen, ob der Polyphenolgehalt eine bestimmende Größe für die protektiven Effekte der mediterranen Pflanzenextrakte ist, wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuche mit dem PPG korreliert.



**Abbildung 5-12: Korrelation des PPC mit der basale Lipidperoxidation in jungen NMRI-Mäusen**

In Abbildung 5-12 ist die Abhängigkeit des Polyphenolgehaltes von der MDA-Konzentration in jungen Tieren dargestellt. Die Korrelation ist signifikant ( $p < 0,0001$ ) und hat einen r-Wert von 0,6182, was auf einen starken Zusammenhang zwischen diesen beiden Parameter schließen lässt. In alten Tieren war diese Abhängigkeit nicht mehr zu beobachten. Es kann folglich für den protektiven Effekt der Extrakte wichtig sein, in welchem Alter die Extrakte konsumiert werden. Alle weiteren Tests zeigten, bis auf eine schwache Korrelation der cytosolischen ROS-Produktion (Abbildung 5-13), keinen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen und dem PPG.

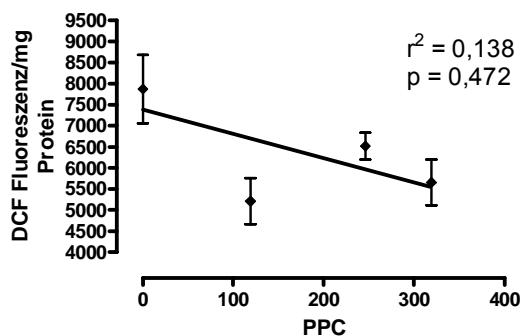


Abbildung 5-13: Korrelation des PPC mit den basale cytosolischen ROS in jungen NMRI-Mäusen

In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse was den Zusammenhang von antioxidativen Eigenschaften und dem PPG angeht. Zum Beispiel sind in nativem Olivenöl eine Vielzahl von phenolischen Verbindungen enthalten, deren Antioxidative Kapazität, gemessen mittels LDL-Oxidation und DPPH-Radikal-Quenching, stark mit dem PPC korreliert war (Mosca et al., 2000). In einer weiteren Studie erniedrigte die Kurzeitaufnahme von Olivenöl mit unterschiedlich hohem Polyphenolgehalt die LDL-Oxidation in humanem Plasma, die Oxidation von mitochondrialer DNA (8-OHdG) und die Malondialdehyd-Spiegel im Urin der Probanden dosisabhängig vom PPG. Weiterhin erhöhte der tägliche Verzehr von 25 ml Olivenöl für 4 Tage die HDL-Cholesterin-Spiegel und die GPx-Aktivität (Weinbrenner et al., 2004). Zheng et al. (Zheng et al., 2001) haben ebenfalls eine positive Korrelation zwischen dem PPG und der Antioxidativen Kapazität von 39 untersuchten Gewürzen beobachtet. Allerdings wurde die Kapazität von der Arbeitsgruppe mittels ORAC-Test (Oxygen Radical Absorbance Capacity) und nicht dem von uns genutzte TEAC-Test bestimmt, der keinen Zusammenhang zwischen der Antioxidativen Kapazität und den PPG unsere drei gefütterten Extrakte gezeigt hat.

Auch in Ergebnissen der Konsortiumspartner hat sich gezeigt, dass die positiven Wirkungen der Pflanzenextrakte z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten oxidativen Stress in humanen Lymphozyten zu verhindern nicht immer mit dem Polyphenolgehalt korrelieren. Einzig für den Thymus-Extrakt konnte eine starke Korrelation zwischen DNA-Protektion und Polyphenolgehalt gemessen werden (Kapiszewska et al., 2005). Fazit ist, dass die neben den phenolischen Inhaltsstoffen vorliegenden Biomoleküle wie z.B. Fettsäuren ebenfalls in nicht unerheblichem Maß zur gesundheitlich positiven Wirkweise der Pflanzen beitragen.

Insgesamt hat in unserer Studie aber der Extrakt mit dem höchsten Polyphenolgehalt (1014) die besten Ergebnisse in den ermittelten Tests gezeigt. Vielleicht ist das ein Zeichen dafür, dass trotzdem nicht die Masse aber die möglichst komplexe Zusammensetzung der



Inhaltsstoffe und somit auch der polyphenolischen Substanzen eine wichtige Rolle für eine antioxidative Wirkung spielen und bestätigt damit die Theorie, dass nicht ein einzelnes Flavonoid die positiven Effekte bewirkt, sondern die Summe aller Antioxidantien über die Wirksamkeit entscheidet.

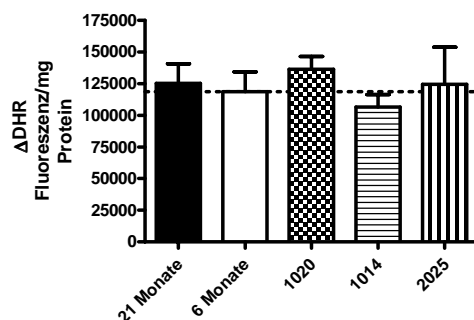
Ein weiterer Hinweis für die guten Radikalfängereigenschaften des Extraktes war die niedrige oxidative Schädigung, die um 26 % unter der, der gleichaltriger Kontroll-Mäuse lag. Auch war die Antioxidative Kapazität in den 6 Monate alten Tieren im OAT um 6 % verbessert. Der TEAC-Test aus dem Vollblut zeigte dagegen fast keine Veränderung der Kapazität nach dreimonatiger Extraktfütterung.

Aus dem Blut wurde weiterhin die oxidative Schädigung der Proteine mittels ELISA gemessen. Die Fütterung mit Extrakt 1014 resultierte in einer extrem leichten Erniedrigung der Proteincarbonylierung in jungen NMRI-Mäusen. Zusätzlich wurde bei diesem Extrakt die Reduktion der oxidativen DNA-Schädigung im Gehirn mittels ELISA untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Extrakt auch in der Lage war die spezifische Entstehung von 8-OHdG sowohl in jungen als auch in alten NMRI-Mäusen signifikant zu reduzieren (vergleiche Abschnitt 4.4.2.3). Dabei war die Reduktion der 8-OHdG-Level in jungen Tieren stärker ausgeprägt als in den alten Tieren. Es ist zu vermuten, dass die mit Reichardia-Extrakt über drei Monate gefütterten NMRI-Mäuse weniger ROS bilden oder diese effektiver entgiften als die Kontrolltiere, die Kontrollfutter erhielten, welches nicht mit pflanzlichen Extrakt angereichert war.

#### ***Effekte bei 21 Monate alten Tieren***

In 21 Monate alten Mäusen war die basale Lipidperoxidation und die stimulierte MDA-Konzentration tendenziell erhöht. Weiterhin senkte der Extrakt die NO-Spiegel um 9 %. Zwar waren auch die basalen mitochondrialen und cytosolischen ROS-Konzentrationen in den alten Tieren ebenfalls um 3 % bzw. 15 % erniedrigt, damit war aber der Effekt des Extrakt nicht so stark ausgeprägt wie in den jungen Tieren. Dennoch bewirkte nur eine Fütterung mit Extrakt 1014 eine Senkung der mitochondrialen ROS-Level unter das Niveau der jungen Kontrolltiere (Abbildung 5-14). Auch war die Aktivität der GPx nur um 8 % erhöht, was ebenfalls zu den leicht erhöhten MDA-Werte beigetragen haben könnte. Die GR-Aktivität war wie in den jungen Tieren um 42 % erniedrigt, die SOD-Aktivität war allerdings in alten Tieren um 11 % gegenüber den alten Kontrolltieren erhöht.

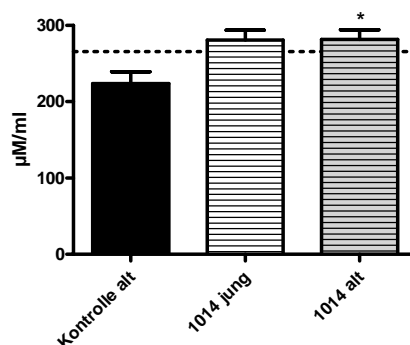
Die erhöhte SOD-Aktivität könnte auf einer vermehrten Superoxidationradikal-Konzentration beruhen. Diese versucht die Zelle verstärkt durch die SOD zu entgiften, ist aber nicht dazu in der Lage, was wiederum für die erhöhte Lipidperoxidation spricht. Auch die Mitochondrien zeigten eine leichte Schädigung des Membranpotentials um 7 % auf.



**Abbildung 5-14: Mitochondriale Scavenging-Aktivität junger und alter Kontrolltiere und alter NMRI Mäuse nach Extraktfütterung**

Darstellung des neuronalen Vermögens mit einem exogen erzeugtem ROS-Stimulus umzugehen. Die gestrichelte Linie zeigt das Niveau junger Kontrolltiere

Gleichzeitig wurde eine leicht verminderte oxidative Schädigung um 7 % und sowohl im TEAC als auch im Oxi Adsorbent Test eine Verbesserung der Antioxidativen Kapazität um 13 bzw. 26 % in der Peripherie gemessen. Auch bei dieser Methode erzielte die Fütterung mit Extrakt 1014 eine Verbesserung der Kapazität über das Niveau der jungen Kontrolltiere (Abbildung 5-15).



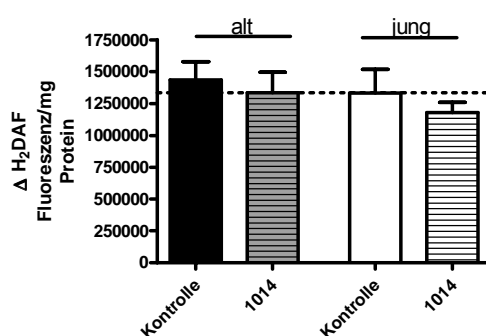
**Abbildung 5-15: Extrakteinfluss auf die Antioxidative Kapazität (OAT) in alten NMRI-Tieren**

Antioxidative Kapazität als  $\mu\text{M HOCl}$  die von 1 ml Probe absorbiert werden ( $\mu\text{M/ml}$ ) in jungen ( $n = 6$ ) und alten ( $n = 5$ ) Kontrolltieren und in jungen ( $n = 8$ ) und alten ( $n = 9$ ) Tieren, die für 3 Monate mit Extrakt 1014 gefüttert wurden, Mittelwert und SEM,  $p = 0,0158$  \* vs. alte Kontrolle.

Die Schädigung der Proteine in alten Tieren konnte allerdings durch die Aufnahme des Extraktes um 65 % gesenkt werden. Was auf eine starke Wirkung des Extraktes im Alter schließen lässt. Das im Extrakt enthaltene Flavon Luteolin ist z.B. als starker Inhibitor von advanced glycation endproducts bekannt. Es verhindert folglich die Bildung der Protein-Zucker-Komplexe und die nachfolgende Bildung der Protein-Protein-Cross-Links. Wu et al. konnten zeigen, dass Glycosilierungsreaktionen von Proteinen von Radikalbildung begleitet werden (Wu et al., 2005). Dabei war die inhibitorische Kapazität des Luteolins stark von seinen Radikalfängereigenschaften abhängig. Die Autoren folgern, dass die positiven Wirkungen der untersuchten Flavonoide zu mindest teilweise durch die antioxidativen Eigenschaften zu erklären sind.

### ***Radikalfängereigenschaften (Scavenging-Aktivität) bei 6 und 21 Monate alten Tieren***

Betrachtet man nun den Einfluss des Extraktes auf die Radikalfängereigenschaften der dissoziierten Neurone zeigt sich eine tendenzielle Verbesserung des cytosolischen ROS-Scavengings um 10 % und des NO-Scavengings um 11 % in jungen NMRI-Mäusen. Das bedeutet, dass die Neurone junger Tiere nach Fütterung mit dem Extrakt mit einem akuten radikalerzeugenden Stimulus besser umgehen konnten als die Neurone alter Tiere. Der Extrakt hatte aber keinen Effekt auf die mitochondrialen ROS-Scavenging-Aktivität in jungen Tieren. Neurone von 21 Monate alten Tieren konnten hingegen besser mit cytosolischen als auch mit mitochondrialen ROS-Level und auch exogen erhöhten NO-Konzentrationen umgehen als die Kontrolltiere.



**Abbildung 5-16: Effekt der Fütterung von Extrakt 1014 auf die NO-Scavenging-Aktivität**

NO-Scavenging-Aktivität ( $\Delta$  H<sub>2</sub>DAF Fluoreszenz) von jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) mit Extrakt 1014 gefütterten NMRI Mäusen und Kontrolltieren.

In Abbildung 5-16 ist die Radikalfängereigenschaft der 1014-gefütterten Tiere und der Kontrolltiere gezeigt. Die Aufnahme des Extraktes war auch bei diesem Test in der Lage die

Scavenging-Aktivität der alten Neurone gegenüber einem exogenen NO-Stimulus sogar auf das Niveau der jungen Tiere zu verbessern.

Gegenüber einer exogenen Stimulation der Lipidperoxidation waren Hirnhomogenate der jungen Tiere allerdings empfindlicher als die Kontrollhirne. Die MDA-Scavenging-Aktivität war in diesen Tieren um 12 % erniedrigt. Allerdings ist dieser Parameter nicht ganz zuverlässig, da sich einige Hirnzellen durch Eisenchlorid nicht stimulieren ließen und so die Abweichungen extrem groß waren. Dasselbe gilt für die Hirne alter Tiere.

### 5.2.3 *Urospermum picroides* (1020)

Auch *Urospermum picroides* gehört zur Familie der Asteraceae (Balboul et al., 1997). Der deutsche Trivialname lautet Bitterkrautartiger Schwefelsame oder Schwanzsame. Auch bei dieser Pflanze werden traditionell die Blätter verzehrt, allerdings werden sie auf Grund des bitteren Geschmackes nur gekocht gegessen. Über medizinische Gründe des Verzehrs ist bis heute nichts bekannt, sie wird rein aus Gründen der Nahrung und der Abwechslung zu anderem Gemüse verzehrt.



Die Hauptbestandteile des methanolischen Extraktes konnten als Quercetin und Luteolin in Form von Glykosiden und die phenolischen Säuren: Ferula-, Isoferula-, Kaffee- und Gallensäure identifiziert werden (Giner et al., 1992). Zusätzlich zu den bisher genannten Inhaltsstoffen identifizierte DSM (ehemals Roche Vitamins, Schweiz) im Rahmen des gemeinsamen Eu-Projektes das Flavonoid Astragalin (siehe Abbildung 5-17).

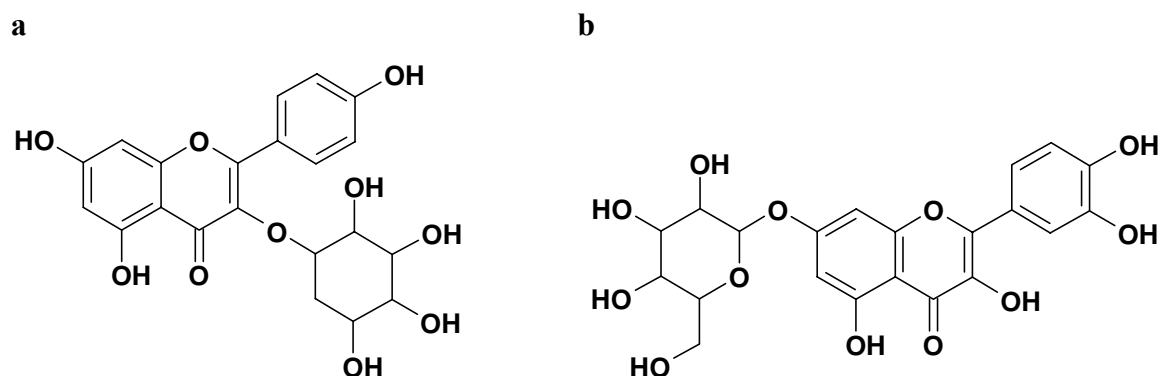


Abbildung 5-17: Strukturformel von a) Astragalin und b) Quercetin-7-O-Glykosid

### 5.2.3.1 Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 1020

#### *Effekte bei 6 Monate alten Tieren*

Die Fütterung mit Extrakt 1020 führte zu einer Abnahme des Lipidperoxidation-Markers MDA von 46 % in 6 Monate alten NMRI-Mäusen. Gleichzeitig waren die enzymatischen Aktivitäten der GPx und SOD um 4 % bzw. 5 % verringert. Die Aktivität der GR war dagegen ganz leicht erhöht (2 %). Generell hatte der Extrakt also wenig Einfluss auf die enzymatische Abwehr von oxidativem Stress in jungen NMRI-Tieren.

Weiterhin waren die mitochondrialen ROS-Level um 7 % erhöht, allerdings reicht diese geringe Zunahme eher nicht aus, um die stark erhöhten MDA-Spiegel zu erklären. Auch waren die cytosolischen Ros um 17 % erniedrigt. Die leichte Depolarisation der Mitochondrienmembranen um 8 % lässt sich eventuell durch die um 17 % erhöhten NO-Level erklären, da zu hohe NO-Konzentrationen die Membranen schädigen und das Membranpotential nicht aufrecht erhalten werden kann. Nach der Fütterung dieses Extraktes waren auch die Parameter der Peripherie eher wenig beeinflusst. Die Antioxidative Kapazität im TEAC war um 3 % erhöht und die initiale Hydroperoxid-Konzentration als Marker der oxidativen Schädigung war um 4 % erniedrigt.

#### *Effekte bei 21 Monate alten Tieren*

In 21 Monate alten NMRI-Mäusen konnte eine Zunahme der Lipidperoxidation um 26 % beobachtet werden. Auch in diesem Alter war die GPx-Aktivität durch die Extraktaufnahme reduziert. Dabei war die Abnahme der Aktivität mit 21 % sogar noch stärker als in den jungen Tieren. Dafür waren sowohl die GR- als auch die SOD-Aktivität um 2,5 bzw. 9 % leicht erhöht gegenüber den alten Kontrolltieren. Ebenfalls waren die Mitochondrien-assoziierten ROS-Level wie in den jungen Tieren erhöht (21 %). Die basalen ROS-Spiegel im Cytosol waren mit einer Verbesserung von 1 % wenig verändert. Die NO-Konzentration war in den alten Tieren um 21 % erhöht, wodurch wiederum die Schädigung des Membranpotentials um 32 % erklärt werden kann. In den alten Tieren konnte eine 15 %-ige Verschlechterung der oxidativen Schädigung im Blut nach Extraktfütterung gemessen werden. Konträrerweise war die Antioxidative Kapazität um 14 % erhöht.

### ***Radikalfängereigenschaften (Scavenging-Aktivität) bei 6 und 21 Monate alten Tieren***

Auch die Radikalfängereigenschaften der dissoziierten Neurone waren durch die Extraktgabe für drei Monate unterschiedlich beeinflusst. Die Cytosol- und Mitochondrien-assoziierten ROS wurden nach *in vitro*-Stimulation in jungen Tieren besser abgefangen (9 % und 7 %). Die erhöhten NO-Konzentrationen konnten in beiden Alterstufen dagegen weniger gut entgiftet werden, wobei der Effekt in jungen Tieren weniger stark ausgeprägt war. Die erhöhten Cytosol- und Mitochondrien-assoziierten ROS wurden von alten Tieren ebenfalls schlechter verkräftet.

#### **5.2.4 Thymus piperella (2025)**

Thymian ist eine auf der Welt weit verbreitete Heilpflanze, die wegen ihrer medizinischen Wirkung schon lange bei Husten und Bronchitis eingesetzt wird. Weiterhin sind z.B. antiseptische, antiemetische und diuretische Wirkungen von Thymian bekannt. Seit den 80er Jahren sind außerdem die spasmolytischen Eigenschaften von einigen methoxylierten Flavonen (Apigenin-7,4'-Dimethyl-Ether) untersucht worden (Van Den Broucke et al., 1983). Die Hauptkomponenten sind die beiden terpenabgeleiteten Phenole Thymol (ca. 40%) und Carvacrol (ca. 15%). Bei *Thymus piperella* handelt es sich um eine in Südspanien, vor allem in den Gebieten um Alicante, Valencia und Albacete, endemische Spezies (Blanquer et al., 1998), deren oberirdischen Teile traditionell von den Einheimischen auch zum Würzen von Speisen genutzt werden (Prof. Diego Rivera, persönliche Kommunikation). Mittlerweile steht die Pflanze unter Naturschutz und es ist eine Genehmigung erforderlich, um sie zu ernten. Neben den oben genannten Phenolen, sind Apigenin, Luteolin und Vicenin weitere Inhaltsstoffe von *Thymus piperella* (Barberan et al., 1985). Bei der Hauptkomponente Thymol handelt es sich um ein Phenolderivat (3-Hydroxy-p-Cymol) welches für seine starke desinfizierende fungizide und bakterizide Wirkung bekannt ist und z.B. in Zahnpasta und Mundwasser oder gegen Hautpilz benutzt wird. Kaempferol ist ein Flavon und zählt in Form von unterschiedlichen Glykosiden zu den in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Flavonoiden (Abbildung 5-18).



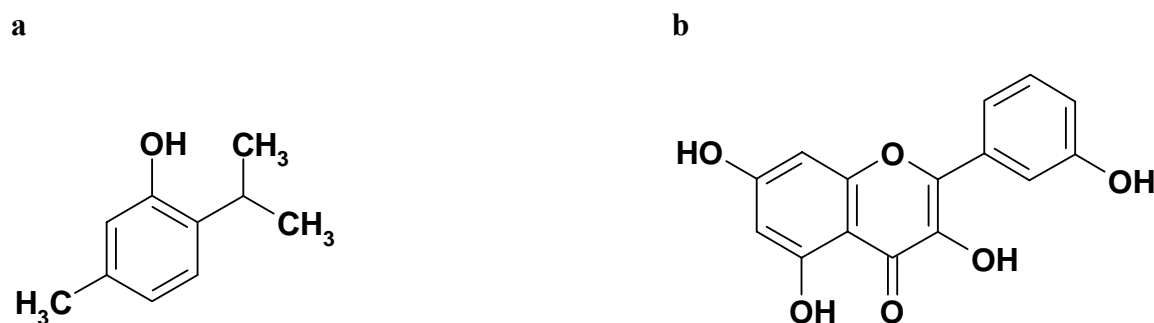


Abbildung 5-18: Strukturformel von a) Thymol (2-Isopropyl-5-methyl-phenol) und b) Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)

#### 5.2.4.1 Diskussion der Ergebnisse für Extrakt 2025

##### *Effekte bei 6 Monate alten Tieren*

Der Marker der Lipidperoxidation war im Gehirn von 6 Monate alten Tieren nach der dreimonatigen Aufnahme von Extrakt 2025 um 36 % erniedrigt. Dazu passend waren auch die antioxidativen Enzym-Aktivitäten aller drei Enzyme im Hirnhomogenat erhöht. Die GR und SOD wiesen ein um 27 % und die GPx um 17 % erhöhte Aktivität nach Extraktfütterung auf. Als Resultat waren die basalen cytosolische ROS um 34 % niedriger als in gleichalten nicht gefütterten Mäusen. Die NO-Spiegel waren dazu passend nur 1 % höher als die der Kontrolltiere, was auf eine verbesserte Entgiftung der ROS durch Enzyme hinweist. Dagegen waren die mitochondrialen ROS-Spiegel um 14 % erhöht. Dies resultierte auch in einer Depolarisation der mitochondrialen Membran um 14 %. Es kann folglich sein, dass die Reduktion der oxidativen Radikale durch die Enzyme nicht stark genug ist um alle ROS zu entsorgen. Dennoch war durch den Extrakt die Antioxidative Kapazität im Blut leicht erhöht und die oxidative Schädigung um 16 % gegenüber dem Kontrollblut gesenkt.

##### *Effekte bei 21 Monate alten Tieren*

In 21 Monate alten Tieren erzielte die Fütterung mit Extrakt 2025 eine Reduktion der Lipidperoxidation um 15 %. In den mit diesem Extrakt gefütterten NMRI-Mäusen waren die Aktivitäten der GR und SOD um 27 % bzw. 18 % erhöht. Die GPx-Aktivität war hingegen um 35 % niedriger als in gleichalten Kontrolltieren. Trotzdem waren die ROS-Level sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien um jeweils 11 % erniedrigt. Bestimmte Inhaltsstoffe des Extraktes müssen also in der Lage sein schädliche ROS abzufangen. Auch

die NO-Konzentration war um 2 % geringer als in gleichalten Kontrolltieren. Trotz der hohen Radikal-Scavenging-Aktivität des Extraktes war das mitochondriale Membranpotential um 7 % verschlechtert, die Membran folglich depolarisiert. In der Peripherie konnte eine 10 %-ige Verbesserung der Antioxidativen Kapazität (TEAC) und nur ein sehr geringer Einfluss des Extraktes auf die Hydroperoxid-Konzentration festgestellt werden.

### ***Radikalfängereigenschaften (Scavenging-Aktivität) bei 6 und 21 Monate alten Tieren***

Durch die Fütterung mit Extrakt 2025 konnte in jungen Tieren eine Verbesserung der MDA-Scavenging-Aktivität von 42 % erreicht werden. In den 21 Monate alten Tieren zeigten sich erneut relativ große Unterschiede in der Stimulierbarkeit. Hier zeigte sich tendenziell eine Verschlechterung der Fähigkeit des Systems mit exogen erzeugtem oxidativen Stress umzugehen. In jungen Tieren waren die Eigenschaften im Cytosol und den Mitochondrien anwesende ROS zu entgiften durch den Extrakt verringert. Einzig NO konnte nach der Fütterung besser abgefangen werden als in den nicht mit Extrakt gefütterten Kontrolltieren. In den 21 Monate alten NMRI-Mäusen hatte die Fütterung mit Extrakt 2025 keinen Einfluss auf die Fähigkeit Mitochondrien-assoziierte ROS abzufangen und mit NO konnten die dissoziierten Neurone nach den 3 Monaten schlechter umgehen (4 %). Hingegen war die Fähigkeit cytosolische ROS zu entgiften um 13 % verbessert.

Von den drei *in vivo* untersuchten Extrakten würde sich auf Grund der Resultate einzig der Reichardia-Extrakt für die Entwicklung eines Nutraceuticals eignen. Dieser Extrakt zeigte sowohl in jungen als auch in 21 Monate alten NMRI-Mäusen positive Effekte. Bei einer Fütterung mit dem Urospermum-Extrakt waren tendenziell eher Verschlechterungen der antioxidativen Parameter zu erkennen und die Effekte waren uneinheitlich. Diesen Extrakt kann man für eine Supplementation deswegen nicht empfehlen. Auch der Thymus-Extrakt hat, obwohl gute Effekte auf die Enzym-Aktivitäten und die Lipidperoxidation, laut unseren Versuchen nicht genug Potential, um als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt zu werden. Die positive Wirkung der Gesamtpflanze oder deren Auszüge als Hustensaft oder Spasmolytikum ist unumstritten, dennoch ist die Wirkung dieses Extraktes hinsichtlich seiner antioxidativen und Radikalfängereigenschaften für eine Empfehlung als Nutraceutical nicht ausreichend. Es scheint als wären andere als die untersuchten Parameter für die bekannte positive Wirkweise zuständig.



### 5.2.5 Positive Wirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen

Generell tragen die phenolischen Inhaltsstoffe, die in den Pflanzenextrakten gefunden wurden sicher einen Großteil zu den beobachteten positiven Effekten bei. Die im Reichardia-Extrakt gefundenen Inhaltsstoffe Luteolin und Apigenin sind z.B. häufig in Pflanzen vorkommende Flavonoide, die in hohen Anteilen auch in Olivenmark und Olivenöl vorkommen (Morello et al., 2005). Dabei gehören die Flavone Luteolin und Luteolin-7-*O*-Glykosid zu den potentesten Radikalfängern in Olivenmark.

Luteolin ist weiterhin ein potenter Inhibitor von Einzelstrangbrüchen, schützt folglich die DNA vor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziertem Schaden (Horvathova et al., 2004). In unserem Fall könnte folglich der hohe Anteil an Luteolin in dem Reichardia-Extrakt für die starken DNA-Schutzeffekte verantwortlich sein. Aber auch andere Flavonoide besitzen protektive Eigenschaften. Die antioxidativen Ergebnisse einer Vorbehandlung mit verschiedenen Flavonoiden auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte (100 µM/L) DNA-Schädigung in humanen Lymphozyten wurde mittels Comet-Assay untersucht (Noroozi et al., 1998). Eine Vorbehandlung der Zellen mit Flavonoiden bei einer Konzentration von 279 µM/L resultierte in einer Reduktion der DNA-Schäden mit folgender Reihenfolge der Potenz: Luteolin (9 %), Myricetin (10%), Quercetin (22%), Kaempferol (32%), Apigenin (59%), Quercetin-3-glucoside (62%) und Rutin (82%). Auch für Tannin-, Gallus- und Ellagsäure sind in Konzentrationen von 1 und 5 µM DNA-protektive Wirkungen in Hamsterzellen beobachtet worden (Labieniec et al., 2005). Zusätzlich inhibierte Ellagsäure neben Curcumin signifikant die durch Strahlung erzeugte Genotoxizität in Mäusen (Thresiamma et al., 1998).

In einer aktuellen Studie unterdrückten Luteolin and Luteolin-7-*O*-glykosid bei Konzentrationen unter 20 µM, signifikant die Produktion von NO und Prostaglandin E2 in lipopolysaccharid-aktivierten Mausemakrophagen (RAW264.7 Zellen) ohne cytotoxische Effekte zu zeigen. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die inhibitorischen Effekte auf der Abschwächung der Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) beruhen und nicht etwa auf reduzierten Enzym-Aktivitäten (Hu et al., 2004). Die Reduktion der NO-Spiegel in alten NMRI-Mäusen kann daher auf einer verminderten NOS-Expression beruhen. Auch Apigenin, und Kaempferol sind potente Inhibitoren der Transkription von COX-2 und der iNOS (IC<sub>50</sub> < 15 µM ), wodurch den Flavonoiden eine Rolle in der Prävention von karzinogenen und entzündlichen Erkrankungen zugesprochen wird (Liang et al., 1999).

Einige Studien weisen darauf hin, dass Flavonoide antiproliferierende Effekte auf hormonabhängige Krebszellen bei Brust- und Prostatakrebs besitzen. In einer aktuellen

Untersuchung von Yin et al. erwiesen sich von den getesteten Flavonoiden Apigenin und Luteolin als potenteste Inhibitoren der Proliferation von mehreren humanen Schilddrüsenkarzinom-Zell-Linien (Yin et al., 1999).

Um den Effekt von Petersilie (*Petroselinum crispum*), die hohe Konzentrationen an Apigenin enthält, auf Biomarker von oxidativem Stress zu untersuchen, war in einer randomisierten Crossoverstudie die GR- und SOD-Aktivität der Erythrozyten nach zweiwöchiger Apigenin-Aufnahme erhöht und die Katalase- und GPx-Aktivität unverändert gegenüber der Kontrollgruppe (Nielsen et al., 1999).

Bei dem Flavonoid Astragalin handelt es sich ebenfalls um einen im Pflanzenreich weit verbreiteten Inhaltsstoff, mit bekannten antioxidativen Eigenschaften (Han et al., 2004). Weiterhin zeigte eine orale Administration dieses Flavonols verhindernde Effekte auf die Entwicklung von Dermatitis und die Erhöhung der Serum IgE-Spiegel in einem Mausmodell für atopische Dermatitis (Kotani et al., 2000).

Chlorogensäure, Kaffesäure, Ferulasäure und Isoferulasäure gehören zur Gruppe der freien Hydroxycinnamtsäuren und damit ebenfalls zur großen Gruppe der Polyphenole. Diese Phenolsäuren besitzen zumindest im Laborversuch antioxidative, antikanzerogene und antimikrobielle Wirkungen. Die antikanzerogenen Wirkmechanismen sind weitgehend am Fall von Ellagsäure aufgeklärt. Als gesichert gilt jedoch auch, dass sich positiven Effekte der Phenolsäuren aus einem Synergismus mit weiteren Inhaltsstoffen, wie z.B. den Flavonoiden, Vitaminen usw., ergeben und sich womöglich nicht auf eine Einzelsubstanz zurückführen lassen. In einer Supplementationstudie an Ratten konnte durch Fütterung mit Thymianöl oder der Hauptkomponente Thymol ein positiver Effekt auf die SOD-Aktivität festgestellt werden. Weiterhin war die totale antioxidative Kapazität in alten Ratten, wie in unserer Studie an Mäusen, nach Supplementation gegenüber Kontrollratten verbessert (Youdim et al., 2000). *In vitro* konnte eine erhöhte NO-Freisetzung in porcinen Aortenendothelzellen nach Inkubation mit Thymianextrakt gemessen werden. Da eine reduzierte NO-Produktion bzw. NO-Inaktivierung mit dem Beginn von endothelialen Dysfunktionen assoziiert ist, vermuten die Autoren eine Verbesserung der Vasomotion und eine Verringerung arteriosklerotischer Vorfälle durch den regelmäßigen Konsum mediterraner Pflanzen (Grande et al., 2004).

In einer Studie von Cesarone (Cesarone et al., 1999) führte eine einwöchige orale Aufnahme des Antioxidanz AR(D) Stenovit weiterhin zu einer Senkung der Hydroperoxid-Level von 15 % in Patienten mit peripheren vaskulären Krankheiten und zu einer Senkung von 10 % in gesunden Kontrollpatienten. Cornelli et al. haben in einer Studie den Einfluss von Antioxidantien-Kombinationen auf gesunde Probanden untersucht und eine Reduktion des

Oxidativen Stress nach einwöchiger oraler Aufnahme von unterschiedlichen Kombinationen gemessen. Dabei haben sie den Cut-off bei 15 % gesetzt und ebenfalls festgestellt, dass bei der Gabe von Kombipräparaten in geringen Dosen, in manchen Fällen prooxidativ Phänomene auftreten, die allerdings nicht mit der Einnahme einer bestimmten Kombination korreliert waren (Cornelli et al., 2001).

Wie bisher gezeigt, haben die einzelnen Inhaltsstoffe oder Kombinationen dieser in einer Vielzahl von Versuchen und Studien zu positiven Effekten geführt. Allerdings haben die meisten dieser Studien nur einen oder wenige Parameter auf eine mögliche Beeinflussung der Gesundheit hin untersucht. Da die Pflanzenextrakte aber aus einer großen Anzahl Substanzen bestehen, müssen hier noch weitere Untersuchungen gemacht werden, bevor ein pflanzlicher Extrakt als Nutraceutical auf den Markt kommen darf.

#### **5.2.5.1 Zusammenfassung der Effekte einzelner Extrakte auf Lipidperoxidation und antioxidativen Enzyme auf junge und alte NMRI-Mäuse**

Die Ergebnisse bezüglich der Extrakteffekte auf Lipidperoxidation und die antioxidativen Enzyme sind in den nachfolgenden Tabellen für alle drei Extrakte in 6 und 21 Monate alten NMRI-Mäusen zusammengestellt. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Fütterung aller Extrakte einen stärker ausgeprägten Effekt auf die Lipidperoxidation in jungen Mäusen hatte. Sowohl die basalen als auch die *in vitro* stimulierten MDA-Spiegel, mit Ausnahme von Extrakt 1020, waren nach dreimonatiger Aufnahme signifikant gegenüber gleichalten Kontrolltieren gesenkt.

In alten Tieren gab es ein umgekehrtes Bild. Alle Extrakte erzeugten eine Erhöhung der MDA-Spiegel mit Ausnahme des Thymian-Extrakts, der in jungen Tieren eine Verringerung der Lipidperoxidation erreichte. Allerdings waren die Effekte in alten Tieren nicht signifikant. Die unterschiedlichen Effekte in jungen und alten NMRI-Mäusen weisen auf eine eher präventive Wirkung der pflanzlichen Extrakte hin. Scheinbar verhindern die Inhaltsstoffe der Pflanzen, dass in jungen Tieren vermehrt ROS gebildet werden oder die antioxidativen Enzym-Aktivitäten sind hochreguliert.

In Tabelle 5-5 sind die Enzym-Aktivitäten nach Extrakt-Fütterung in jungen und alten Mäusen in Prozent dargestellt. Die Effekte bis 10 % sind wahrscheinlich zu niedrig, um eine wirkliche Veränderung der Messparameter darzustellen und sind daher im Folgenden in allen Tabellen dünn gedruckt abgebildet. Es ist zu erkennen, dass einzig für den Thymian-Extrakt (2025) eine verstärkte Aktivierung aller antioxidativen Enzyme zu beobachten war. Eine Fütterung von Extrakt 1020 hatte kaum einen Effekt auf die Enzyme, wobei GPx- und SOD-

Aktivität tendenziell erniedrigt waren. Der positive Effekt der Extrakte auf die Lipidperoxidation war für Extrakt 1020 auch am schwächsten ausgeprägt. Extrakt 1014 resultierte in unterschiedlichen Effekten auf die Enzym-Aktivitäten in jungen Tieren. GR- und SOD-Aktivität waren, im Fall der ersteren, sogar signifikant erniedrigt. Dagegen war die GPx-Aktivität erhöht. Eine Verstärkung der GPx-Aktivität bei gleichzeitiger GR-Aktivitäts-Reduktion führt zur Erhöhung der intrazellulären Glutathion-Spiegel. Glutathion ist selber ein Antioxidanz und könnte für die erniedrigte Lipidperoxidation verantwortlich sein. Allerdings scheint noch genug Glutathion in den jungen Tieren vorhanden zu sein, um die Funktionalität der GPx zu gewährleisten.

Extrakt	6 Monate		21 Monate	
	basale MDA-Level	stimulierte MDA-Level	basale MDA-Level	stimulierte MDA-Level
1014	↓ 55 %***	↓ 46 %***	↑ 9 %	↑ 66 %
1020	↓ 46 %**	↓ 6 %	↑ 26 %	↑ 37 %
2025	↓ 36 %***	↓ 33%*	↓ 15 %	↑ 58 %

Tabelle 5-4: Effekte der Extrakte (%) auf die basale und stimulierte Lipidperoxidation in jungen und alten NMRI Mäusen.

In alten NMRI-Mäusen hatte eine Fütterung mit keinem der drei Extrakte einen signifikanten Effekt. Einzig die GR-Aktivität war nach Fütterung mit Extrakt 1014 stark verringert. Da dieser Effekt in beiden Alterstufen zu beobachten war, deutet auf eine hauptsächliche Wirkweise des Reichardia-Extraktes hin.

Wiederum waren die Effekte für Extrakt 1020 am geringsten ausgeprägt, wobei die Reduktion der GPx-Aktivität im Alter stärker war als in jungen Tieren.

Extrakt	6 Monate			21 Monate		
	GPx	GR	SOD	GPx	GR	SOD
1014	↑ 26 %	↓ 42 % *	↓ 7 %	↑ 8 %	↓ 42 %	↑ 11 %
1020	↓ 4 %	↑ 2 %	↓ 5 %	↓ 21 %	↑ 2 %	↑ 9 %
2025	↑ 17 %	↑ 27 %	↑ 27 %	↓ 35 %	↑ 27 %	↑ 18 %

Tabelle 5-5: Veränderungen der antioxidativen Enzyme (GPx, GR und SOD) nach Fütterung der Extrakte in jungen und alten NMRI Mäusen

### 5.2.5.2 Zusammenfassung der Extrakteffekte auf das mitochondriale Membranpotential und verschiedene ROS-Spiegel

Bezüglich der cytosolischen (DCF) und mitochondrialen (DHR) ROS-Bildung zeigten sich nach Fütterung der drei Extrakte wiederum stärkere Effekte in 6 Monate alten Mäusen. Dabei senkte Extrakt 1014 sowohl die cytosolischen als auch die mitochondrialen ROS zu fast gleichen Anteilen. Die anderen beiden Extrakte resultierten in einer leichten Erhöhung der mitochondrialen ROS, waren aber in der Lage die cytosolischen ROS-Konzentrationen zu verringern. Thymian senkte die Cytosol-assoziierten ROS sogar signifikant. Eine Senkung der intrazellulären ROS kann die niedrigen MDA-Level erklären. Da weniger ROS anwesend sind, die Lipidmoleküle schädigen können. In Alten Mäusen konnte ROS-senkende Effekt für Extrakt 1014 und 2025 in beiden Zellkompartimenten beobachtet werden, allerdings zu etwas geringeren Ausmaßen. Der Urospermum-Extrakt zeigte in 21 Monate alten Tieren eine deutlichere Erhöhung der Mitochondrien-assoziierten ROS als in jungen Tieren und hatte keinen Effekt auf die ROS im Cytosol.

Nach Stimulation mit Eisenchlorid und Vitamin C war die ROS-Scavenging-Aktivität für Extrakt 1014 in jungen und alten NMRI im Cytosol und in den Mitochondrien verbessert und für Extrakt 1020 in allen Fällen verschlechtert. Diese Effekte zeigen ganz deutlich, dass die unterschiedlichen Zusammensetzungen die Inhaltsstoffe betreffend verschiedenartige Wirkungen in NMRI-Mäusen hervorrufen. Extrakt 2025 hatte positive Effekte auf die Radikalfaneigenschaften in jungen Tieren und negative Resultate in alten Tieren. Bei diesem Extrakt könnte folglich das Alter der Tiere eine Rolle spielen, der Extrakt sich besser zur Prävention eignen als für die Therapie.

		Basale ROS-Level			Stimulierte ROS-Level		
Alter	Extrakt	1014	1020	2025	1014	1020	2025
jung	DHR	↓ 25 %	↑ 7 %	↑ 18 %	↓ 10 %	↑ 10 %	↑ 35 %
	DCF	↓ 28 %	↓ 17 %	↓ 34 %*	↓ 13 %	↑ 1 %	↑ 12 %
alt	DHR	↓ 3 %	↑ 21 %	↓ 11 %	↓ 20 %	↑ 3 %	↓ 8 %
	DCF	↓ 15 %	↓ 1 %	↓ 11 %	↓ 9 %	↑ 13 %	↓ 12 %

Tabelle 5-6: Einfluss der Extrakte auf die basalen und stimulierten ROS-Spiegel in den Mitochondrien und dem Cytosol junger und alter NMRI Mäuse.

Alle drei Extrakte erzeugten tendenziell eher negative Resultate im Bezug auf das mitochondriale Membranpotential in jungen und alten Tieren (Tabelle 5-7). Einzig Extrakt

1014 erzielte basal eine leichte Hyperpolarisation der Mitochondrienmembranen in alten Mäusen. Dazu passend waren die NO-Spiegel in jungen Tieren durch eine Fütterung mit den drei Extrakten ebenfalls leicht erhöht (Tabelle 5-8: Effekt der Extrakte auf die basalen und stimulierten NO-Level in jungen und alten NMRI-Mäusen).

Extrakt	Basales $\Psi_m$		Stimuliertes $\Psi_m$	
	jung	alt	jung	alt
1014	↓ 6 %	↑ 7 %	↓ 25 %	↑ 22 %
1020	↓ 8 %	↓ 32 %	↓ 2 %	↓ 30 %
2025	↓ 14 %	↓ 7 %	↓ 16 %	= 0 %

Tabelle 5-7: Extrakteffekt auf basales und stimuliertes Membranpotential in jungen und alten NMRI Mäusen

Extrakt	Basale NO-Level		Stimulierte NO-Level	
	jung	alt	jung	alt
1014	↑ 3 %	↓ 23 %	↓ 9 %	↓ 11 %
1020	↑ 17 %	↓ 15 %	↑ 21 %	↓ 1 %
2025	↑ 1 %	↓ 17 %	↓ 2 %	↓ 2 %

Tabelle 5-8: Effekt der Extrakte auf die basalen und stimulierten NO-Level in jungen und alten NMRI-Mäusen

In alten Tieren führte die Fütterung allerdings zu einer Reduktion der NO-Konzentrationen. Diese war für Extrakt 1014 am stärksten ausgeprägt und könnte damit für die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials verantwortlich sein. Der positive Effekt scheint für die beiden andern Extrakte nicht stark genug zu sein, um zu einer Wirkung auf die Mitochondrien zu führen. Extrakt 1014 hatte zusätzlich positive Effekte auf die NO-Scavenging-Aktivität in jungen und alten NMRI-Mäusen. In beiden Fällen konnte eine verringerte Sensibilität gegenüber nitrosativem Stress erreicht werden. Extrakt 2025 hatte den gleichen Effekt auf die Radikalfangeigenschaften, allerdings war dieser nur marginal ausgeprägt. Der Urospermum-Extrakt (1020) zeigte dagegen eine Verschlechterung der Scavenging-Aktivität in jungen Tieren und fast keinen Effekt in alten Tieren.

### 5.2.5.3 Zusammenfassung der Extrakteffekte auf die Oxidative Schädigung und die Antioxidative Kapazität im Vollblut bzw. Serum von weiblichen NMRI-Mäusen

Im TEAC Test wurden zusätzlich zu dem Alterseffekt auch der Einfluss der dreimonatigen Fütterung mit den drei mediterranen Pflanzenextrakten auf die Antioxidative Kapazität untersucht. Dabei war eine Verbesserung der Kapazität hauptsächlich in den 21 Monate alten Tieren zu erkennen (Tabelle 5-9). In jungen Tieren zeigte sich nur eine ganz leichte Tendenz zur Verbesserung bei Extrakt 1020 und 2025. Die Fütterung führte in alten Tieren sogar zu einer Verbesserung der Antioxidativen Kapazität über das Niveau von jungen Tieren hinaus (3-5 %). Betrachtet man wieder die Abstufungen zwischen den unterschiedlich geschädigten Niveaus der humanen Richtwerte, entspricht eine Zunahme der Antioxidativen Kapazität von 58  $\mu\text{M/l}$  Trolox definitiv einer Verbesserung der Kapazität in den 21 Monate alten Tieren nach der Fütterung mit Extrakt 1014. Eine Verbesserung um 15  $\mu\text{M/l}$  Trolox weist eher auf eine Tendenz zur Verbesserung der Kapazität in jungen Tieren hin.

Extrakt	TEAC	
	jung	alt
1014	↓ 1 %	↑ 13 %
1020	↑ 3 %	↑ 14 %
2025	↑ 2 %	↑ 10 %

**Tabelle 5-9: Extrakteffekt auf die Antioxidative Kapazität (TEAC) in alten und jungen Mäusen**

Auch die Hydroperoxid-Spiegel als Indikator für zelluläre oxidative Schädigung ist nach der Aufnahme der verschiedenen Extrakte für alle Altersgruppen bestimmt worden. Passend zu den Daten der Antioxidativen Kapazität führte eine Fütterung mit Extrakt 1014 zu einer erniedrigten oxidativen Schädigung sowohl in 6 (7 %) als auch in 21 Monate alten Mäusen (26 %). Allerdings war der positive Effekt bei diesem Test in jungen Tieren größer. Auch die Fütterung mit den andern beiden Extrakten erzielte einen verringerten Schaden. Extrakt 1020 senkte die Hydroperoxid-Konzentration um 4 % und Extrakt 2025 um 16 % in jungen Tieren. In alten Tieren begünstigten die Extrakte allerdings eine oxidative Schädigungen (Tabelle 5-10).

Extrakt	Oxidativer Schaden	
	jung	alt
1014	↓ 26 %	↓ 7 %
1020	↓ 4 %	↑ 15 %
2025	↓ 16 %	↑ 1 %

**Tabelle 5-10: Einfluss der Extrakte auf die initiale Hydroperoxid-Konzentration in jungen und alten Tieren**

### 5.3 Gesundheitspotential mediterraner Nahrungsbestandteile

Eine konsequente mediterrane Ernährungsweise trägt maßgeblich zur Erhaltung eines gesunden Herzkreislaufsystems bei. Die Mittelmeerkost ist reich an Vitaminen, Mineralstoffen, ungesättigten Fettsäuren und zahlreichen bioaktiven Inhaltsstoffen, z.B. den antioxidativ wirkenden Polyphenolen. Um die gesundheitlichen Wirkweisen umfassend zu untersuchen, müssen alle Komponenten hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit und ihres Beitrags zu den positiven Effekten untersucht werden.

#### 5.3.1 Bioverfügbarkeit der Bestandteile der mediterranen Ernährung im Gehirn

Um eine positive Wirkung im Körper und im Hinblick auf gesundes Altern insbesondere im Gehirn entfalten zu können, müssen die Inhaltsstoffe der mediterranen Ernährungsweise zuerst die Zielorgane erreichen und in diese aufgenommen werden. Das Ausmaß, in dem ein verzehrter Nährstoff resorbiert, vom Körpergewebe aufgenommen und für seine spezifischen Funktionen genutzt wird nennt man Bioverfügbarkeit.

Fettsäuren entfalten ihre protektiven Eigenschaften hauptsächlich in den Zellmembranen. Da sie extrem lipophil sind können die Fettsäuren die Membranen relative einfach passieren und in diese eingebaut werden.

Für hydrophile Moleküle wie z.B. viele Polyphenole, die ihre Wirkung wunschgemäß vor allem im Zentralen Nervensystem entfalten sollen, ist das Überwinden der Zellmembranen schwieriger. Sie müssen aktiv durch die Zellbarrieren transportiert werden. Da diese Transportprozesse genau wie die Absorption und Metabolisierung bis heute noch nicht genau geklärt sind, hat man lange Zeit an der Wirksamkeit dieser Substanzen gezweifelt.

Flavonoide kommen mit Ausnahme der Catechine (Flavanole) in der Nahrung ausschließlich als glykosilierte Derivate und nicht als Aglykone vor. Flavonoid-Glykoside sind relative



große Moleküle, die zu hydrophil sind, um biologische Membranen durch Diffusion zu überwinden und deren Absorption lange Zeit als vernachlässigbar galt (Ross et al., 2002, Youdim et al., 2003). Neue Daten weisen aber darauf hin, dass die Bioverfügbarkeit der Glykoside durch ein komplexes Netzwerk von Absorption, Metabolismus und Transportprozessen determiniert wird (Nemeth et al., 2003, Sesink et al., 2003, Vaidyanathan et al., 2003, Walgren et al., 2000). Obwohl Flavonoide relative hohe Absorptionsraten haben ist ihre Bioverfügbarkeit eher niedrig. Und trotz vermehrter Hinweise auf positive Wirkungen von Flavonoiden im Gehirn, wie z.B. Neuroprotektion, gibt es wenige Informationen über die Fähigkeiten der Flavonoide die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, um das zentrale Nervensystem zu erreichen. Die Blut-Hirn-Schranke wird von kapillaren Endothelzellen gebildet, die den Übertritt meist kleiner polarer Moleküle ins Gehirn strikt kontrollieren. Youdim et al. (Youdim et al., 2003) berichteten den Uptake von mehreren Flavonoiden und deren relevanten Metaboliten in einem Model endothelialer Gehirnzellen. Die Autoren zeigten, dass die meisten der getesteten Flavonoide und Metabolite in der Lage waren die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Dabei war das Potential der Permeation abhängig von der Lipophilität und der Aktivität von bestimmten Efflux-Transportern wie z.B. dem P-glykoprotein (Pgp) in der Blut-Hirn-Schranke (Youdim et al., 2004).

Bisher sind *in vitro* als auch *in vivo* sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte von Quercetin auf die Pgp-Aktivität gefunden worden (Mitsunaga et al., 2000, Weber et al., 2004). Allerdings ist der genaue Mechanismus, durch den Flavonoide die Pgp-Aktivität modulieren immer noch unklar. Dennoch konnte die Fähigkeit der Flavonoide das Gehirn zu erreichen durch ihrer Identifizierung im Gehirn nach peroraler oder intravenöser Administration nachgewiesen werden. Abd El Mohsen et al. (Abd El Mohsen et al., 2002) berichteten picomolare Konzentrationen von Epicatechin-Glukoronid und 3-O-methyl-Epicatechin-Glukoronid im Gehirn von Ratten nach oraler Supplementation mit Epicatechin (100 mg/kg Körpergewicht) für 1, 5 oder 10 Tage. Naringenin und Hesperetin konnten nach intravenöser Gabe ebenfalls im Gehirn detektiert werden (Peng et al., 1998, Tsai et al., 2000).

### 5.3.2 Neuroprotektion durch mediterrane Nahrungskomponenten

Neben den unter 1.7.3 genannten positiven Einflüssen (vergleiche Tabelle 5-11) gibt es noch weitere Belege für die Wirkung der Inhaltsstoffe einer mediterranen Ernährungsweise auf den Organismus. Neben den direkten antioxidativen Wirkungen sind z. B. Indirekte antioxidative und anti-inflammatorische Aktivitäten für Flavonoide bekannt. Die NADH-Oxidase ist ein Schlüsselenzym der mitochondrialen Respiration. In einer Studie von Hodnick et al. (Hodnick

et al., 1994) wurde das Hydroxylierungs- und Methoxylierungsmuster von Flavonoiden bezogen auf ihre Aktivität die NADH-Oxidase zu inhibieren verglichen. Die Reihenfolge der Wirksamkeit war Robinetin, Rhamnetin, Eupatorin, Baicalein, 7,8-Dihydroxyflavon und Norwogonin. Cos et al. (Cos et al., 1998, Hodnick et al., 1994) zeigten, dass Flavone besser in der Lage sind die Xanthinoxidase zu inhibieren als Flavonole. Die Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure. Während der Reoxidation des Enzyms werden sowohl Superoxidradikale als auch  $H_2O_2$  produziert. Die Autoren zeigten weiterhin, dass die Hydroxylgruppe an C-3 and C-3' für eine hohe Superoxid-Scavenging-Aktivität essentiell sind.

Komatsu et al. haben weiterhin eine erhöhte SOD-Aktivität nach einer einmonatigen Aufnahme von Betacarotin-Lösung in den mitochondrialen Fraktionen von alten Rattenstriati und Mittelhirnen gefunden (Cos et al., 1998, Hodnick et al., 1994, Komatsu et al., 2000).

Flavonoid/Extrakt	Behandlung	Positive Wirkung	Ref.
Erdbeerextrakt, Spinatextrakt, Vitamin E	9.5 g/kg 6.4 g/kg 500 IU/kg	Reduktion der ROS-Level im Striatum von sechs Monate alten Ratten nach zweiwöchiger Supplementation mit Extrakten	(Joseph et al., 1998)
Crataegus-Flavonoid-extrakt	0.5 mg/mL 2.5 mg/mL	Protektion gegenüber durch Ischemie/Reperfusionen verursachten Zelltod in Wüstenrennmäusen nach 15-tägiger Extraktapplikation mittels Drinkwassers	(Zhang et al., 2004)
Trauben-Polyphenol-extrakt	5 mg/dl	Prävention des ethanol-induzierten Dopaminuptakes. Aktivitätserniedrigung in jungen Ratten nach Traubenkern-Polyphenol-Supplementation für zwei Monate	(Sun et al., 1999)
Catechin	3.4 $\mu$ M 34 $\mu$ M 340 $\mu$ M	Reduktion der Lipidperoxidation in embryonalen Ratten Mesencephalonzellen nach 6-OHDA-induziertem Zelltod	(Nobre Junior et al., 2003)
Resveratrol	30 mg/kg KG	Reduktion des Kainsäure-induzierten Zelltods in adulten Rattenhirnen nach i.p. Administration für 5 Tage	(Wang et al., 2004)
(-)-Epigallocatechin-gallat	10 $\mu$ M 25 or 50 m/kg i.p.	Reduktion der MDA-Bildung in embryonalen hippocampalen Neuronen von Ratten Reduktion von postischemischen Hirnödemen in Wüstenrennmäusen	(Lee et al., 2004)

**Tabelle 5-11: Neuroprotektive Einflüsse von Flavonoiden und flavonoidreichen Extrakten**

### 5.3.2.1 Verbesserung kognitiver Fähigkeiten durch bioaktive Nahrungsbestandteile

Bisher sind eine Reihe von Studien veröffentlicht worden, die den Zusammenhang einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und der Aufnahme von Flavonoiden, flavonoidreichen Extrakten oder anderen mediterranen Nahrungskomponenten untersucht haben. Patil et al. (Patil et al., 2003) zeigten für alte, aber nicht für junge Mäuse, signifikante Effekte durch Quercetin-Supplementation auf die step-through- und Transfer-Latenz im Passive-Avoidance-Test und im elevated Plus-maze task. Gleichzeitig war die Lernzeit alter Mäuse durch Catechin-angereichertes Trinkwasser verbessert (Unno et al., 2004). Diese Ergebnisse wurden durch Befunde von Shirai and Suzuki (Shirai et al., 2004) unterstützt, die alte Mäuse mit einer catechinreichen Diät untersucht haben. Hier war die Zeit und die Distanz, die die Tiere benötigten, um den Ausgang des Labyrinthes zu finden gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert. Ein Anthocyanin-Extrakt aus Süßkartoffeln verbesserte ebenfalls die kognitiven Fähigkeiten, die mittels Passive-Avoidance-Test in ethanolbehandelten Mäusen untersucht worden war (Cho et al., 2003). Die Water-maze-performance war nach achtmonatiger Erdbeer-, Spinat- und Blaubeer-Supplementation in alten Ratten signifikant verbessert (Joseph et al., 1999).

Bis heute gibt es neben den vielen Tierstudien nur wenige Studien, die signifikante Effekte der Flavonoide auf die kognitiven Leistungen in alten oder dementen Menschen zeigen. Einer der wenigen Reports zeigt einen Trend auf, dass die Entwicklung einer Demenz durch eine flavonoidreiche Ernährung verlangsamt werden könnte. Die **Paquid Studie** wurde zwischen 1991-1996 im Südwesten Frankreichs durchgeführt. Die Autoren folgern daraus, dass das relative Risiko einer Demenz invers mit der durchschnittlichen Flavonoid-Aufnahme während der letzten fünf Jahre korreliert war. Die Aufnahme an Flavonoiden wurde mittels eines Fragebogens bestimmt. Nach der Anpassung für Alter, Geschlecht, Bildung, Gewicht und Vitamin C-Einnahme war das relative Risiko für eine Demenz in der Gruppe mit der höchsten Flavonoid-Aufnahme 0.49 (Commenges et al., 2000).

### 5.3.3 Ist eine Supplementation mit Nutraceuticals sinnvoll?

Laut dem heutigen Forschungsstand werden viele kardiovaskuläre, degenerative oder karzinogene Erkrankungen mit dem vermehrten Einfluss von oxidativen Radikalen verbunden (Ames et al., 1993). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sind immer wieder Versuche unternommen worden, die retrospektiv festgestellten positiven Wirkungen einer mediterranen Ernährungsweise im Bezug auf einzelne Komponenten zu belegen. Bis heute ist

es aber noch nicht gelungen die einzelnen Wirkmechanismen, aller in der Nahrung enthaltenen Phytochemikalien restlos aufzuklären. Weiterhin ist, ausgehend von der Theorie, dass oxidative Faktoren auch wesentlich zum Alterungsprozess beitragen, in vielen Studien versucht worden, das Altern durch gezielte Beeinflussung der Radikalbildung und Stärkung antioxidativer Schutzsysteme zu verlangsamen.

Bei der Messung einzelner Parameter, hat eine pflanzenreiche Ernährung immer wieder positive Effekte gezeigt. Zum Beispiel war die Antioxidative Kapazität, gemessen im Plasma als oxygen radical absorbance capacity (ORAC), durch vermehrten Früchte und Gemüseverzehr signifikant erhöht (Cao et al., 1998). Allerdings ist ein guter ORAC-Wert eines einzelnen Inhaltsstoffes, obwohl mittlerweile als gängiges Testsystem für Antioxidantien anerkannt, nicht ausreichend für eine Beurteilung. Der „biologische Wert“ ist der entscheidende Faktor, Antioxidantien müssen folglich auch *in vivo* Zellprotektion oder andere positive Effekte beweisen, bevor sie als Nutraceuticals auf den Markt kommen sollten. Vermutlich kann eine Stabilisierung des oxidativen Status durch eine Antioxidantien-Supplementation grundsätzlich einen positiven Effekt auf Lebenserwartung und Lebensqualität im Alter haben. Durch welche Antioxidanz in welcher Dosierung dies über welchen Zeitraum erreicht werden kann, ist nicht bekannt. Allerdings deuten die neueren Befunde eher auf Langzeiteffekte, also eine Prävention krankhafter Zustände, hin.

Weiterhin sollte immer bedacht werden, dass isolierte Nährstoffe in Form von Kapseln oder Tabletten eine vollwertige Ernährung, in der die Nährstoffe immer in Kombination miteinander vorkommen, nicht ersetzen können, höchstens ergänzen. Da Antioxidantien in enger Wechselwirkung untereinander und mit zellulären Strukturen stehen, ist es nicht wünschenswert oder möglicherweise nutzlos, einzelne Komponenten des Systems selektiv zu erhöhen. Eine ausgewogene Versorgung mit allen in der Nahrung vorkommenden Antioxidantien und Mineralstoffen scheint weiterhin eine der besten Voraussetzungen für die Prävention schwerwiegender Krankheiten und damit für ein langes gesundes Leben zu sein.

Allerdings gibt es bestimmte Risikogruppen wie alte Menschen oder Schwangere bei denen eine zusätzliche Aufnahme von positiv wirkenden Substanzen sinnvoll erscheint. Hier kann der Organismus unterstützt werden, da mit zunehmendem Alter gewisse Abläufe nicht mehr unbeeinträchtigt funktioniert, bzw. der Mehrbedarf bei der Entstehung eines neuen Organismus gut durch Supplementation mit essentiellen Bausteinen gedeckt werden kann. Dazu sollten die einzelnen Substanzen aber noch ausreichend auf ihre Wirkungen und mögliche Nebenwirkungen *in vivo* untersucht werden. Die gilt auch für das potentielle Nutraceutical unserer Studien, den Reichardia-Extrakt. Obwohl dieser in einem breiten

Spektrum von Test seine antioxidative und Radikalfangeigenschaften bewiesen hat, sollten weitere Untersuchungen *in vivo* durchgeführt werden, um sein positives Potential weiter zu charakterisieren. *In vitro* hatte der Extrakt auch positive Effekt auf eine Reihe anderer enzymatische Reaktionen und die Proliferation von Endothelzellen gezeigt. Es könnte sich bei diesem Extrakt folglich tatsächlich um ein potentielles Nutraceutical handeln, welches die Gesundheit alter oder kranker Menschen stabilisieren helfen könnte.

## **6 Zusammenfassung**

## 6.1 Ergebnisse der *in vitro*-Screenings

Das Ziel dieser Arbeit war es, die möglichen positiven Effekte von mediterranen Pflanzenextrakten auf oxidative Stress-Parameter zu untersuchen. Die Extrakte wurden im Rahmen eines EU-Projektes durch *in vitro*-Screenings aus einer Vielzahl, in Italien, Griechenland und Spanien gesammelten nicht-kultivierten Pflanzen, ausgesucht und hinsichtlich ihres Potentials verschiedene antioxidative Faktoren zu beeinflussen in einem *in vivo*-Mausmodell geprüft. Insgesamt sind 127 Pflanzen, die von der lokalen Bevölkerung in den mediterranen Ländern traditionell verzehrt werden in 12 *in vitro*-Test untersucht worden. Darunter waren radikal- und enzym-beeinflussende Tests und Versuchsansätze um antikanzerogene oder DNA-schädigende Eigenschaften zu überprüfen. Nach Auswahl von 12 potentiellen Extrakten für die Fütterungsexperimente, wurden auf Grund von weiteren Screening-Tests wie z.B. das Potential der Extrakte eine Rigidisierung der Membranen oder Lipidperoxidation zu verhindern, die möglichen Kandidaten für die *in vivo*-Versuche weiter eingegrenzt. Zur Auswahl der drei Extrakte *Reichardia picroides*, *Urospermum picroides* und *Thymus piperella* kam es letztendlich durch die guten Ergebnisse in den Screenings und durch den Ausschluss von ebenfalls positiven Extrakten, die allerdings toxische Eigenschaften im MTT-Test gezeigt hatten.

## 6.2 Alterseffekte in NMRI-Mäusen

Zur *in vivo*-Untersuchung der drei Extrakte wurden weibliche NMRI für drei Monate mit den Pflanzenextrakten gefüttert. Danach wurden sämtliche Parameter in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) NMRI-Mäusen untersucht, um altersbedingte Unterschiede hinsichtlich der Wirkung der Extrakte festzustellen. Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen an Hirnhomogenaten und dissoziierten Neuronen von NMRI-Mäusen, dass es mit zunehmendem Alter zur Aktivierung verschiedener antioxidativer Abwehrmechanismen kommt. Diese dienen dazu ROS-Level auf einem möglichst unschädlichen Niveau zu halten. Hier spielen vor allem die erhöhten Enzym-Aktivitäten eine wichtige Rolle, die die reaktiven Spezies zu einem relativ frühen Zeitpunkt abfangen und so z.B. eine vermehrte Schädigung der Lipidmoleküle verhindern. Weiterhin haben mitochondriale Schäden ebenfalls einen wichtigen Stellenwert bei Alterungsprozessen, da es trotz einer verstärkten Entgiftung der ROS durch erhöhte Enzym-Aktivitäten zu Beeinträchtigungen ihrer Funktion kommen kann. In unserer Studie zeigten weibliche NMRI-Tiere im Alter eine leichte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die Funktionalität dieser lebenswichtigen

Organellen vermindert sein kann. Vermutlich tragen die stark erhöhten NO-Level in alten Tieren zu diesem Prozess bei. Sowohl in Tieren als auch in Menschen wurde eine Beteiligung von NO am Alterungsprozess vermutet (Siles et al., 2002, Tohgi et al., 1999). Ferner ist bekannt, dass NO in der Lage ist mit Superoxidradikalen zum hochreaktiven Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) zu reagieren, welches wiederum seinerseits DNA und Proteine angreifen und verändern und die antioxidative Abwehr verringern kann (Torreilles et al., 1999). In unserer Studie konnte eine starke Proteinoxidation in alten Mäusen detektiert werden. Auch war in der Peripherie die oxidative Schädigung in alten Tieren leicht erhöht und die Kapazität in zwei verschiedenen Testsystemen erniedrigt, das für eine erhöhte Superoxidradikal- und NO-Konzentration sprechen könnte.

### **6.3 Extrakteffekte in jungen und alten NMRI-Mäusen**

Nach dem auf Basis der Screening-Ergebnisse und unter Berücksichtigung von toxikologischen Faktoren drei Extrakte mit viel versprechenden Resultaten ausgewählt worden waren, wurden diese in zwei jeweils dreimonatigen Fütterungsstudien an jungen und alten Mäusen getestet. Bei den Extrakten handelte es sich um die mit Ethanol extrahierten Inhaltsstoffe aus *Reichardia picroides* (1014), *Urospermum picroides* (1020) und *Thymus piperella* (2025). Die drei Extrakte haben variierende Polyphenolgehalte und eine unterschiedliche Zusammensetzung ihre Inhaltsstoffe, die Flavonoide betreffend. Alle drei Pflanzenextrakte zeigen unterschiedlich starke Effekte auf die gemessenen Parameter und machen deutlich wie wenig man eine positive Wirkweise von pflanzlicher Ernährung verallgemeinern kann.

#### **6.3.1 Reichardia-Effekte**

Es ist auf Grund der Testergebnisse zu vermuten, dass die mit Reichardia-Extrakt über drei Monate gefütterten jungen NMRI-Mäuse weniger ROS bilden und diese effektiver entgiften als die mit Kontrollfutter gefütterten Tiere. Es konnten deutliche Effekte auf Lipidperoxidation, GPx und mitochondriale und cytosolische ROS-Bildung beobachtet werden. In 21 Monate alten NMRI-Mäusen bewirkte die Fütterung mit dem Extrakt andere Effekte. Eine protektive Wirkung konnte hier in Bezug auf Lipidperoxidation nicht gemessen werden. Auch war die GPx-Aktivität weniger stark erhöht und wahrscheinlich aus diesem Grund die mitochondrialen und cytosolischen ROS-Level weniger stark erniedrigt als in jungen Tieren. Dagegen waren das Membranpotential und die NO-Level in alten Mäusen



positiv beeinflusst. Die guten Radikalfangeigenschaften des Reichardia-Extraktes zeigten sich auch durch bessere Resistenz der Neurone gegenüber nitrosativem und oxidativem Stress. Weiterhin wurden durch den Extrakt auch Proteine und die DNA vor oxidativen Modifikationen geschützt.

Diese Resultate könnten auf einen präventiven Effekt des Extraktes im Bezug auf seine ROS-Scavenging-Aktivität in einem frühen Lebensabschnitt hindeuten. Hat sich der Schaden im fortgeschrittenen Alter manifestiert, ist die Extraktaufnahme nicht in der Lage diesen stark zu beeinflussen. Dafür kann sich der Extrakt aber im Alter positiv auf die Funktionalität der Mitochondrien auswirken und eine Akkumulation von NO bzw. Peroxynitrit verhindern. Auch zeigt der Extrakt erst in 21 Monate alten Tieren stark positive Effekte auf die DNA- bzw. Proteinoxidation.

### **6.3.2 Urospermum-Effekte**

Extrakt 1020 zeigt im Gegensatz zu Extrakt 1014 wenige positive Effekte auf die gemessenen Parameter. Im Gegenteil einzig die basale Lipidperoxidation und die cytosolischen ROS-Spiegel waren in jungen Tieren durch die Extraktgabe positiv verringert. Keine der drei bestimmten Enzymaktivitäten waren nennenswert positiv verändert, weder in jungen noch in alten Tieren. Die mitochondrialen ROS-Konzentration, die NO-Spiegel und das Membranpotential waren basal in jungen Tieren und alten Tieren gegenüber Kontrolltieren sogar verschlechtert. Auch konnten die Neurone junger und alter Tiere nach der Behandlung mit dem Extrakt schlechter mit nitrosativem und oxidativem Stress umgehen als die Kontrolltiere. Obwohl der Extrakt in vitro in den Hirnhomogenaten junger Tiere z.B. gute Ergebnisse bezüglich der Lipidperoxidation gezeigt hat, sieht man an diesem Beispiel wie wichtig es ist ein breites Testspektrum zu haben, bevor voreilige Schlüsse bezüglich der antioxidativen Wirkung gezogen werden können.

### **6.3.3 Thymus-Effekte**

Der Thymian-Extrakt hatte deutlich positive Effekte auf die Reduktion der MDA-Bildung in jungen und alten Mäusen. Passend dazu waren durch die Fütterung mit dem Extrakt alle gemessenen Enzym-Aktivitäten in jungen Tieren erhöht. Dabei waren die GR- und die SOD-Aktivität beide gleichstark und die GPx etwas weniger stark erhöht. In den 21 Monate alten Tieren waren nur die GR- und die SOD-Aktivität gesteigert, die Aktivität der GPx war dagegen reduziert. Passend zu den erhöhten Enzym-Aktivitäten waren die Level der basalen

Cytosol-assoziierten ROS in jungen und alten Tieren erniedrigt, allerdings war der Extrakt nur in der Lage die mitochondriale ROS-Konzentration in den alten NMRI-Mäusen zu verringern. Auch reagierten die Neurone junger mit Extrakt gefütterter Mäuse empfindlicher auf exogen erzeugten Stress als die Kontrollneurone. Alte Tiere waren dagegen durch die Fütterung weniger anfällig für oxidativen Stress. Auf die NO-Spiegel hatte der Extrakt weder in jungen noch in alten Tieren einen Einfluss, allerdings war das Membranpotential der Mitochondrien in beiden Alterstufen leicht beeinträchtigt.

## **7    Abbildungen**

<i>Abbildung 1-1: Mediterrane Ernährungspyramide</i>	5
<i>Abbildung 1-2: Struktur wichtiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren</i>	6
<i>Abbildung 1-3: Chemische Struktur von Tocopherol</i>	9
<i>Abbildung 1-4: chemische Struktur von Ascorbinsäure</i>	9
<i>Abbildung 1-5: Einteilung der Polyphenole mit einigen Nebenklassen</i>	12
<i>Abbildung 1-6: Grundgerüst der Flavonoide</i>	13
<i>Abbildung 1-7: Flavonoid-Hauptgruppen</i>	14
<i>Abbildung 1-8: Entwicklung des Altersaufbau von 1950-2050 und die Geschlechtsverteilung (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2005)</i>	16
<i>Abbildung 1-9: Entstehung und Abwehr von oxidativem Stress</i>	17
<i>Abbildung 1-10: Globale Todesfälle durch Kardiovaskuläre Erkrankungen (MacKay et al., 2005)</i>	20
<i>Abbildung 1-11: Durch ROS verursachte Schäden in der Zelle</i>	24
<i>Abbildung 1-12: Aufbau eines Mitochondriums und sein Membranpotential</i>	27
<i>Abbildung 1-13: Stellen der radikalische Angriffe an der DNA</i>	29
<i>Abbildung 1-14: Strukturformel von 8-hydroxy-2'-deguanosin</i>	29
<i>Abbildung 1-15: Aufgaben der antioxidativen Enzyme</i>	32
<i>Abbildung 1-16: Abfangen von Lipidperoxidradikalen durch Tocopherol</i>	33
<i>Abbildung 1-18: Dosis-Wirkungskurve von Nährstoffen</i>	43
<i>Abbildung 3-1: MDA Reaktion mit R1-Molekül zum detektierbaren Chromogen</i>	55
<i>Abbildung 3-2: Bestimmung des MDA-Gehaltes [nM/ml] bei unterschiedlichern Stressoren und unterschiedlichen Stressorkonzentrationen im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate).</i>	56
<i>Abbildung 3-3: MDA-Gehalt [nm/ml] bei verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen und einer FeCl<sub>3</sub>-Konzentration von 150 µM im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate).</i>	57
<i>Abbildung 3-4: Vergleich der MDA-Ergebnisse bei Bestimmung mittels Fenton-Reagenz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>2+</sup>), dessen Einzelkomponenten und den von uns gewählten Stressoren (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>3+</sup>) im Hirnhomogenat junger Mäuse (2-3 Monate). Balken zeigen Ergebnisse aus 6 einzelnen Versuchen und SEM.</i>	57
<i>Abbildung 3-5: HNE-Reaktion mit 2 Molekülen Indol zum photometrisch detektierbaren Chromophor.</i>	58
<i>Abbildung 3-6: DHR-Struktur und Reaktionsweg in der Zelle</i>	62
<i>Abbildung 3-7: Dichlorofluorescein-Diacetat-Struktur und Reaktionsweg in der Zelle</i>	63
<i>Abbildung 3-8: DNA-Aufreinigungsschritte des DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen</i>	66
<i>Abbildung 3-9: SOD katalysierte Reaktion von Tetrahydrotrihydroxybenzofluoren zum fluoreszierenden Chromophor.</i>	71
<i>Abbildung 3-10: Entfernung von Störquellen der SOD-Reaktion wie z.B. Glutathion</i>	71
<i>Abbildung 3-11: 8-OHdG-Standardkurve</i>	74
<i>Abbildung 3-12: Schema des 8OHdG-ELISAs zur Detektion oxidativer Schäden von DNA</i>	75
<i>Abbildung 3-13: Rhodamin123-Molekül</i>	77
<i>Abbildung 3-14: Struktur des NO-Donors PAPA-NONOate</i>	78
<i>Abbildung 3-15: DAF-DA Reaktionsweg und Entstehung des fluoreszierenden Endproduktes</i>	78
<i>Abbildung 3-16: Alterseffekt auf basale und stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	79
<i>Abbildung 3-17: DEPPD-Reaktion zum photometrisch detektierbaren Radikal</i>	80

<i>Abbildung 3-18: a) Struktur des DEPPD-Radikals und b) DEPPD-Absorptionsmaxima</i>	80
<i>Abbildung 3-19: Struktur des ABTS-Radikals</i>	81
<i>Abbildung 3-20: Trolox Standardkurve, Mittelwert und SEM (n = 5)</i>	82
<i>Abbildung 3-21: Schema des Proteincarbonylierungs-ELISA zur Detektion oxidativer Schäden an Proteinen</i>	86
<i>Abbildung 4-1: Verlauf des EU-Projektes und Einfluss der entscheidenden Parameter</i>	91
<i>Abbildung 4-2: Herkunftsländer der gesammelten und untersuchten Pflanzen</i>	92
<i>Abbildung 4-3: Messung der Lipidperoxidation über die Hemmung der MDA-Bildung (MDA Inhibition %) in den Vorauswahltests in Hirnhomogenaten von jungen MNMRI Mäusen (2-3 Monate) in vitro.</i>	94
<i>Abbildung 4-4: Bestimmung der Lipidperoxidation und der Hemmung der MDA-Bildung (MDA Inhibition %) nach Inkubation mit Extrakt 1018 und 1003 in vitro.</i>	94
<i>Abbildung 4-5: EC<sub>50</sub>-Bestimmung für Quercetin bei Mitochondrien-assoziierten ROS (DHR)</i>	97
<i>Abbildung 4-6: Beispiel einer mitochondrialen ROS-Messung am Multilablereader (Victor) nach Stimulation mit Vitamin C und Eisenchlorid unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Extrakt 2009 in Fluoreszenzeinheiten und die Darstellung der Hemmung des maximalen Effekts als Inhibition %.</i>	98
<i>Abbildung 4-7: Beispiel einer cytosolischen ROS-Messung am Multilablereader (Victor) nach Stimulation mit Vitamin C und Eisenchlorid unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Extrakt 2009 in Fluoreszenzeinheiten und die Darstellung der Hemmung des maximalen Effekts als Inhibition %.</i>	98
<i>Abbildung 4-8: Gewicht der jungen und alten Tiere in Fütterungsstudie I in g.</i>	102
<i>Abbildung 4-9: Tägliche Futtermittelaufnahme junger und alter NMRI Mäuse in Fütterungsstudie I (g pro Tier)</i>	103
<i>Abbildung 4-10: Tägliche Futtermittelaufnahme junger und alter NMRI Mäuse in Fütterungsstudie II (g pro Tier)</i>	103
<i>Abbildung 4-11: Überlebensanalyse nach Kaplan –Meier für die alten Tiere der Fütterungsstudien</i>	104
<i>Abbildung 4-12: Alterseffekt auf basale und stimulierte Lipidperoxidation im Gehirn von jungen und alten NMRI-Mäusen.</i>	107
<i>Abbildung 4-13: Scavenging-Aktivität in jungen (6 Monate, n = 8) und alten (21 Monate, n = 5) NMRI-Mäusen.</i>	107
<i>Abbildung 4-14: Effekt von Extraktaufnahme auf basale Lipidperoxidation in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	109
<i>Abbildung 4-15: Effekt von Extraktaufnahme auf stimulierte Lipidperoxidation in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	110
<i>Abbildung 4-16: Alterseffekt der Aktivität antioxidativer Enzyme in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	112
<i>Abbildung 4-17: Aktivität der antioxidativen Enzyme nach dreimonatiger Extraktaufnahme (1020) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	113
<i>Abbildung 4-18: Enzym-Aktivität nach dreimonatiger Extraktaufnahme (1014) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	114
<i>Abbildung 4-19: Aktivität antioxidativer Enzyme nach dreimonatiger Extraktaufnahme (2025) in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	115
<i>Abbildung 4-20: Effekt von Stimulation auf Mitochondrien-assoziierte ROS Bildung in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	116
<i>Abbildung 4-21: Extrakteffekt auf basale Mitochondrien-assoziierte ROS in jungen (6 Monate, weiße Balken) und alten (21 Monate, schwarze Balken) Mäusen.</i>	118

---

<i>Abbildung 4-22: Extrakteffekt auf stimulierte Mitochondrien-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	119
<i>Abbildung 4-23: Effekt von Stimulation auf Cytosol-assoziierte ROS Bildung in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	120
<i>Abbildung 4-24: Extrakteffekt auf Cytosol-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung.</i>	121
<i>Abbildung 4-25: Extrakteffekt auf stimulierte Cytosol-assoziierte ROS in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung.</i>	122
<i>Abbildung 4-26: Alterseffekt auf basales Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	123
<i>Abbildung 4-27: Effekt von SNP-Stimulation auf Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	124
<i>Abbildung 4-28: Extrakteffekt auf das basale Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung mit Extrakten.</i>	126
<i>Abbildung 4-29: Extrakteffekt auf das SNP-stimulierte Membranpotential in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen nach dreimonatiger Fütterung mit Extrakten.</i>	127
<i>Abbildung 4-30: Scavenging-Aktivität dissoziierter Neuronen von jungen und alten Tieren mit exogen erzeugtem Stress umzugehen (Delta R123 Fluoreszenz).</i>	128
<i>Abbildung 4-31: Alterseffekt auf die Scavenging-Aktivität der Mitochondrien.</i>	129
<i>Abbildung 4-32: Alterseffekt auf basale NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	129
<i>Abbildung 4-33: Effekt von Stimulation auf NO-Spiegel in jungen und alten NMRI Mäusen</i>	130
<i>Abbildung 4-34: Alterseffekt auf stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) und alten (21 Monate) Mäusen.</i>	131
<i>Abbildung 4-35: Sensitivität der dissoziierten Neurone gegenüber Stimulation der basalen NO-Spiegel in jungen und alten NMRI Mäusen</i>	131
<i>Abbildung 4-36: Effekt von Extraktaufnahme auf basale NO-Spiegel in jungen (6 Monate) Mäusen.</i>	132
<i>Abbildung 4-37: Effekt von Extraktaufnahme auf basale NO-Spiegel in alten (21 Monate) Mäusen.</i>	133
<i>Abbildung 4-38: Effekt von Extraktaufnahme auf mit PAPA-NONOate stimulierte NO-Spiegel in jungen (6 Monate) Mäusen.</i>	134
<i>Abbildung 4-39: Effekt von Extraktaufnahme auf mit Papa-NONOate stimulierte NO-Spiegel in alten (21 Monate) Mäusen.</i>	135
<i>Abbildung 4-40: Scavenging-Aktivität von nitrosativem Stress nach Extraktaufnahme.</i>	135
<i>Abbildung 4-41: Oxidative Schädigung der DNA in jungen und alten NMRI Mäusen und Einfluss von Extrakt 1014 auf die Bildung von 8-OHdG.</i>	136
<i>Abbildung 4-42: Alterseffekt auf die initialen Hydroperoxid-Spiegel in weiblichen NMRI-Mäusen.</i>	137
<i>Abbildung 4-43: Extrakteffekt auf die zelluläre oxidative Schädigung (initialen Hydroperoxid-Spiegel) nach Fütterung mit verschiedenen Extrakten für 3 Monate in jungen Mäusen.</i>	138
<i>Abbildung 4-44: Extrakteffekt auf die zelluläre oxidative Schädigung (initialen Hydroperoxid-Spiegel) nach Fütterung mit verschiedenen Extrakten für 3 Monate in alten Mäusen.</i>	139
<i>Abbildung 4-45: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität als <math>\mu\text{M}</math> Trolox in jungen und alten NMRI-Mäusen</i>	140

---

---

<i>Abbildung 4-46: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität in jungen NMRI-Mäusen nach Fütterung mit drei Extrakten für 3 Monate</i>	141
<i>Abbildung 4-47: Trolox Equivalente Antioxidative Kapazität in alten NMRI-Mäusen nach Fütterung mit drei Extrakten für 3 Monate</i>	142
<i>Abbildung 4-48: Alterseffekt der Antioxidative Kapazität (Oxi Adsorbent Test) von jungen und alten NMRI-Mäusen</i>	143
<i>Abbildung 4-49: Extrakteffekt auf die Antioxidative Kapazität in jungen und alten NMRI-Tieren</i>	144
<i>Abbildung 4-50: Alterseffekt auf den Carbonylgehalt in weiblichen NMRI-Mäusen</i>	144
<i>Abbildung 4-51: Effekt von Extrakt 1014-Fütterung für 3 Monate auf den Carbonylgehalt in jungen NMRI-Mäusen</i>	145
<i>Abbildung 4-52: Effekt von Extrakt 1014-Fütterung für 3 Monate auf den Carbonylgehalt in alten NMRI-Mäusen</i>	145
<i>Abbildung 5-1: Lipidperoxidation 21 Monate alter NMRI-Mäuse als Prozent der jungen Kontrolltiere.</i>	149
<i>Abbildung 5-2: Aktivität der antioxidativen Enzyme in Prozent</i>	151
<i>Abbildung 5-3: NO-Spiegel alter weiblichen NMRI Mäusen als Prozent der jungen Kontrolltiere.</i>	153
<i>Abbildung 5-4: Alterseffekt auf die ROS-Produktion (%) und Scavenging-Aktivität (<math>\Delta</math> Fluoreszenz) alter NMRI-Mäuse in Prozent der jungen Kontrolltiere.</i>	155
<i>a) Alterseffekt auf basale und stimulierte mitochondriale und cytosolische ROS-Produktion in % der jungen Kontrollen (gepunktete Linie).</i>	155
<i>Abbildung 5-5: Mitochondriale NO-Scavenging-Aktivität</i>	156
<i>Abbildung 5-6: Alterseffekt auf die oxidative Schädigung der Gesamt-DNA in jungen und alten NMRI Mäusen</i>	157
<i>Abbildung 5-7: Oxidative Schädigung von Plasmaproteinen in % Kontrolle</i>	161
<i>Abbildung 5-8: Mögliche Konsequenzen von oxidativem Stress auf die Proteinfunktion nach Ghezzi (Ghezzi et al., 2003)</i>	162
<i>Abbildung 5-10: Basale Lipidperoxidation in jungen und alten Kontrolltieren und jungen mit Extrakt 1014 gefütterten Mäusen</i>	166
<i>Abbildung 5-11: Effekt der Extraktgabe auf die untersuchten Parameter im Gehirn junger NMRI-Mäuse</i>	166
<i>Abbildung 5-12: Korrelation des PPC mit der basale Lipidperoxidation in jungen NMRI-Mäusen</i>	167
<i>Abbildung 5-13: Korrelation des PPC mit den basale cytosolischen ROS in jungen NMRI-Mäusen</i>	168
<i>Abbildung 5-14: Mitochondriale Scavenging-Aktivität junger und alter Kontrolltiere und alter NMRI Mäuse nach Extraktfütterung</i>	170
<i>Abbildung 5-15: Extrakteinfluss auf die Antioxidative Kapazität (OAT) in alten NMRI-Tieren</i>	170
<i>Abbildung 5-16: Effekt der Fütterung von Extrakt 1014 auf die NO-Scavenging-Aktivität</i>	171
<i>Abbildung 5-17: Strukturformel von a) Astragalin und b) Quercetin-7-O-Glykosid</i>	172
<i>Abbildung 5-18: Strukturformel von a) Thymol (2-Isopropyl-5-methyl-phenol) und b) Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)</i>	175

**8 Tabellenverzeichnis**



---

<i>Tabelle 3-1: Anzahl der Tiere in Fütterungsstudie</i>	52
<i>Tabelle 3-2: Anzahl der Tiere in Fütterungsstudie II</i>	52
<i>Tabelle 4-1: Messung der Hemmung der MDA-Bildung als MDA Inhibition (%) aller 127 Extrakte</i>	95
<i>Tabelle 4-2: 12 Extrakte der Krakau Rangliste</i>	96
<i>Tabelle 4-3: Ergebnisse der weiterführenden Charakterisierung der Krakau Rangliste.</i>	99
<i>Tabelle 4-4: Resultate der antioxidativen Vorauswahl-Parameter, der zusätzlichen Tests und des MTT-Tests der in der Krakau ausgewählten Extrakte.</i>	100
<i>Tabelle 4-5: Legende zu Tabelle 4-4: Erläuterung der in Tabelle 4-4 verwendeten Symbole. Hemmung der Effekte in den jeweiligen Testsystemen als hohe, mittlere und niedrige Aktivität.</i>	101
<i>Tabelle 4-6: Anzahl der in den Fütterungsstudien I und II eingesetzten und überlebenden Tiere</i>	105
<i>Tabelle 5-1: Messbereiche des d-Roms-Tests und wissenschaftliche Bedeutung beim Menschen</i>	158
<i>Tabelle 5-2: Humane Referenzwerte für den Oxi Adsorbent Test und ihre Bedeutung</i>	159
<i>Tabelle 5-3: Polyphenolgehalt der drei mediterranen Pflanzenextrakte</i>	167
<i>Tabelle 5-4: Effekte der Extrakte (%) auf die basale und stimulierte Lipidperoxidation in jungen und alten NMRI Mäusen.</i>	180
<i>Tabelle 5-5: Veränderungen der antioxidativen Enzyme (GPx, GR und SOD) nach Fütterung der Extrakte in jungen und alten NMRI Mäusen</i>	180
<i>Tabelle 5-6: Einfluss der Extrakte auf die basalen und stimulierten ROS-Spiegel in den Mitochondrien und dem Cytosol junger und alter NMRI Mäuse.</i>	181
<i>Tabelle 5-7: Extrakteffekt auf basales und stimuliertes Membranpotential in jungen und alten NMRI Mäusen</i>	182
<i>Tabelle 5-8: Effekt der Extrakte auf die basalen und stimulierten NO-Level in jungen und alten NMRI-Mäusen</i>	182
<i>Tabelle 5-9: Extrakteffekt auf die Antioxidative Kapazität (TEAC) in alten und jungen Mäusen</i>	183
<i>Tabelle 5-10: Einfluss der Extrakte auf die initiale Hydroperoxid-Konzentration in jungen und alten Tieren</i>	184
<i>Tabelle 5-11: Neuroprotektive Einflüsse von Flavonoiden und flavonoidreichen Extrakten</i>	186

**9 Literaturverzeichnis**

- (1999): Krebsprävention durch Ernährung.
- Abd El Mohsen, M. M., Kuhnle, G., Rechner, A. R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., and Rice-Evans, C. A. (2002): Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic.Biol.Med.* 33 (12): 1693 - 1702.
- Agarwal, S. and Sohal, R. S. (1995): Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging. *Mech.Ageing Dev.* 85 (1): 55 - 63.
- Alberts, B, Bray, D, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, and Walter, P (1999): Membranstruktur. (11): 371 - 394.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (17): 7915 - 7922.
- Arnold, G., Dietz, R., Bode, C., Gottwik, M., and Katus, H. (2003): Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung. Nr. 019/001
- Avellone, G., Di Garbo, V., Abruzzese, G., Bono, M., Avellone, Gu., Raneli, G., De Simone, R., and Licata, G. (2003): Cross-over study on effects of Mediterranean diet in two randomly selected population samples. 1329 - 1339.
- Balboul, B, Ahmed, A, and Otsuka, H (1997): **SESQUITERPENE LACTONES AND GLUCOSIDES FROM Urospermum Picroides.** *Phytochemistry* 45 (2): 369 - 373.
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G. (2003): Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1606 (1-3): 137 - 146.
- Barberan, F. A. T., Hernandez, L., and Tomas, F. (1985): Highly Methylated 6-Hydroxyflavones and other Flavonoids from *Thymus piperella*. *Planta Med.* 452 - 454.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78 (2): 547 - 581.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol.Chem.* 272 (33): 20313 - 20316.
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. (1999): Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol.Chem.* 274 (22): 15345 - 15349.
- Beyer, R. E. (1994): The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg.Biomembr.* 26 (4): 349 - 358.
- Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., Clavel-Chapelon, F., Kesse, E., Nieters, A., Boeing, H., Tjonneland, A., Overvad, K., Martinez, C., Dorronsoro, M., Gonzalez, C. A., Key, T. J., Trichopoulou, A., Naska, A., Vineis, P., Tumino, R., Krogh, V., Bueno-de-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Berglund, G., Hallmans, G., Lund, E., Skeie, G., Kaaks, R., and Riboli, E. (2003): Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361 (9368): 1496 - 1501.
- Blanquer, A., Boira, H., Soler, V., and Peris, J. B. (1998): Variability of the Essential oil of *Thymus piperella*. *Phytochemistry* 4 (7): 1271 - 1276.
- Blum, J. and Fridovich, I. (1985): Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch.Biochem.Biophys.* 240 (2): 500 - 508.
- Bohr, V. A. and Anson, R. M. (1995): DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutat.Res.* 338 (1-6): 25 - 34.
- Bourdon, E., Loreau, N., and Blache, D. (1999): Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 13 (2): 233 - 244.
- Braugher, J. M., Duncan, L. A., and Chase, R. L. (1986): The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J.Biol.Chem.* 261 (22): 10282 - 10289.

- Brigelius-Flohe, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic.Biol.Med.* 27 (9-10): 951 - 965.
- Brookmeyer, R., Gray, S., and Kawas, C. (1998): Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am.J Public Health* 88 (9): 1337 - 1342.
- Brower, V. (1998): Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nat.Biotechnol.* 16 (8): 728 - 731.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., and Rice-Evans, C. A. (1998): Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem.J.* 330 ( Pt 3)1173 - 1178.
- Brückel, J. Köbberling J. (2002): Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. 057/002K
- Burton, G. W., Joyce, A., and Ingold, K. U. (1983): Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch.Biochem.Biophys.* 221 (1): 281 - 290.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K. B., Domigan, N. M., and Winterbourn, C. C. (1997): Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic.Biol.Med.* 23 (3): 361 - 366.
- Bustamante, J., Bersier, G., Romero, M., Badin, R. A., and Boveris, A. (2000): Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. *Arch.Biochem.Biophys.* 376 (2): 239 - 247.
- Calabrese, V., Bates, T. E., and Stella, A. M. (2000): NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem.Res.* 25 (9-10): 1315 - 1341.
- Calingasan, N. Y. and Gibson, G. E. (2000): Dietary restriction attenuates the neuronal loss, induction of heme oxygenase-1 and blood-brain barrier breakdown induced by impaired oxidative metabolism. *Brain Res.* 885 (1): 62 - 69.
- Cand, F. and Verdetti, J. (1989): Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic.Biol.Med.* 7 (1): 59 - 63.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., and Prior, R. L. (1998): Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am.J.Clin.Nutr.* 68 (5): 1081 - 1087.
- Cesarone, M. R., Belcaro, G., Carratelli, M., Cornelli, U., De Sanctis, M. T., Incandela, L., Barsotti, A., Terranova, R., and Nicolaidis, A. (1999): A simple test to monitor oxidative stress. *Int.Angiol.* 18 (2): 127 - 130.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59 (3): 527 - 605.
- Chatgililoglu, C. and O'Neill, P. (2001): Free radicals associated with DNA damage. *Exp.Gerontol.* 36 (9): 1459 - 1471.
- Chatton, J. Y. and Broillet, M. C. (2002): Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* 359134 - 148.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Illiou, R. (1999): Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem.Toxicol.* 37 (9-10): 949 - 962.
- Chen, K., Qiu, J. L., Zhang, Y., and Zhao, Y. W. (2003): Meta analysis of risk factors for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 9 (7): 1598 - 1600.
- Chiou, C. C., Chang, P. Y., Chan, E. C., Wu, T. L., Tsao, K. C., and Wu, J. T. (2003): Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin.Chim.Acta* 334 (1-2): 87 - 94.

- Cho, J., Kang, J. S., Long, P. H., Jing, J., Back, Y., and Chung, K. S. (2003): Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. *Arch.Pharm.Res.* 26 (10): 821 - 825.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., and Dartigues, J. F. (2000): Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur.J Epidemiol.* 16 (4): 357 - 363.
- Cooper, J. M., Mann, V. M., and Schapira, A. H. (1992): Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *J Neurol.Sci.* 113 (1): 91 - 98.
- Cornelli, U., Terranova, R., Luca, S., Cornelli, M., and Alberti, A. (2001): Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J.Nutr.* 131 (12): 3208 - 3211.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., and Vanden Berghe, D. (1998): Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J.Nat.Prod.* 61 (1): 71 - 76.
- Cotelle, N. (2001): Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr.Top.Med.Chem.* 1 (6): 569 - 590.
- Crawford, M., Galli, C., Visioli, F., Renaud, S., Simopoulos, A. P., and Spector, A. A. (2000): Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann.Nutr.Metab* 44 (5-6): 263 - 265.
- Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J. A., Costa, G., Echeverry, C., Lafon, L., Heizen, H., Ferreira, M., and Morquio, A. (2003): Neuroprotection by flavonoids. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 36 (12): 1613 - 1620.
- Davies, K. J. and Goldberg, A. L. (1987a): Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol.Chem.* 262 (17): 8220 - 8226.
- Davies, K. J., Lin, S. W., and Pacifici, R. E. (1987b): Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J.Biol.Chem.* 262 (20): 9914 - 9920.
- de Haan, J. B., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M. J., and Kola, I. (1996): Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum.Mol.Genet.* 5 (2): 283 - 292.
- de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., and Mamelle, N. (1999): Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 99 (6): 779 - 785.
- de, Freitas, V, da Silva, Porto P., Assuncao, M., Cadete-Leite, A., Andrade, J. P., and Paula-Barbosa, M. M. (2004): Flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal lipofuscin formation. *Alcohol Alcohol* 39 (4): 303 - 311.
- Diaz, G., Liu, S., Isola, R., Diana, A., and Falchi, A. M. (2003): Mitochondrial localization of reactive oxygen species by dihydrofluorescein probes. *Histochem.Cell Biol.* 120 (4): 319 - 325.
- Doll, R. and Peto, R. (1981): The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl.Cancer Inst.* 66 (6): 1191 - 1308.
- England, K., O'Driscoll, C., and Cotter, T. G. (2004): Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 11 (3): 252 - 260.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K. H. (1990): Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186:407 - 421.

- Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., and Waeg, G. (1991): Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am.J Clin.Nutr.* 53 (1 Suppl): 314S - 321S.
- Feng, Q., Kumagai, T., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., and Uchida, K. (2001): Anticarcinogenic antioxidants as inhibitors against intracellular oxidative stress. *Free Radic.Res.* 35 (6): 779 - 788.
- Finch, C. E. (2003): Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiol.Aging* 24 Suppl 1S123 - S127.
- Floyd, R. A. (1999): Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 222 (3): 236 - 245.
- Floyd, R. A. and Hensley, K. (2000): Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 899222 - 237.
- Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Rosner, B., Speizer, F. E., and Willett, W. C. (1999): Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N.Engl.J Med.* 340 (3): 169 - 176.
- Galli, C. and Visioli, F. (2001): Antioxidant properties of Mediterranean diet. *Int.J Vitam.Nutr.Res.* 71 (3): 185 - 188.
- Garcia, M. L. and Cleveland, D. W. (2001): Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13 (1): 41 - 48.
- Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., and Chaudiere, J. (1998): Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem.Res.Toxicol.* 11 (10): 1176 - 1183.
- Ghezzi, P. and Bonetto, V. (2003): Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* 3 (7): 1145 - 1153.
- Giner, R. M., Cuellar, M. J., Recio, M. C., Manez, S., and Rise, P. (1992): Chemical Constituents of *Urospermum picroides*. *Zeitung für Naturforschung* 47c531 - 534.
- Glökler, C (2004): Nahrungsergänzungsmittel - welche Wirkversprechen sind erlaubt? *Deutsche Apotheker Zeitung* 144 (22): 50 - 52.
- graham M.E. and Higgins, J. A. (1998): Molekularbiologische Membrananalyse.
- Grande, S., Bogani, P., de Saizieu, A., Schueler, G., Galli, C., and Visioli, F. (2004): Vasomodulating potential of mediterranean wild plant extracts. *J Agric.Food Chem.* 52 (16): 5021 - 5026.
- Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N., and Davies, K. (2001): Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56 (11): B459 - B467.
- Hagen, T. M., Yowe, D. L., Bartholomew, J. C., Wehr, C. M., Do, K. L., Park, J. Y., and Ames, B. N. (1997): Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (7): 3064 - 3069.
- Halliwell, B. (1992): Reactive oxygen species and the central nervous system. *J.Neurochem.* 59 (5): 1609 - 1623.
- Halliwell, B. and Chirico, S. (1993): Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am.J Clin.Nutr.* 57 (5 Suppl): 715S - 724S.
- Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., Walter, C. A., and Richardson, A. (2001): Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (18): 10469 - 10474.
- Han, J. T., Bang, M. H., Chun, O. K., Kim, D. O., Lee, C. Y., and Baek, N. I. (2004): Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. *Arch.Pharm.Res.* 27 (4): 390 - 395.

- Harborne, J. B. and Williams, C. A. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (6): 481 - 504.
- Harborne, J. B. Mabry T. J. Mabry H. (1975): The flavonoids.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256 (5054): 184 - 185.
- Harman, D. (1968): Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J.Gerontol.* 23 (4): 476 - 482.
- Harman, D. (1972): The biologic clock: the mitochondria? *J Am.Geriatr.Soc.* 20 (4): 145 - 147.
- Harman, D. (1981): The aging process. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (11): 7124 - 7128.
- Harman, D. (1988): Free radicals in aging. *Mol.Cell Biochem.* 84 (2): 155 - 161.
- Harper, M. E., Monemdjou, S., Ramsey, J. J., and Weindruch, R. (1998): Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. *Am.J Physiol* 275 (2 Pt 1): E197 - E206.
- Harris, E. D. (1992): Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 6 (9): 2675 - 2683.
- Hayakawa, M., Sugiyama, S., Hattori, K., Takasawa, M., and Ozawa, T. (1993): Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol.Cell Biochem.* 119 (1-2): 95 - 103.
- Hayakawa, M., Torii, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., and Ozawa, T. (1991): Age-associated accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 179 (2): 1023 - 1029.
- Heinrich, M. and Gibbons, S. (2001): Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm.Pharmacol.* 53 (4): 425 - 432.
- Heinrich, M. Leonti M. Nebel S and Peschel W (2005): 'Local Food – Nutraceuticals': An Example of a Multidisciplinary Research Project on Local Knowledge. *Journal of Pharmacology and Physiology. J Phys Pharm*
- Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., and Flaherty, D. M. (1999): Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic.Biol.Med.* 27 (1-2): 146 - 159.
- Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennen, L., Malvy, D., Roussel, A. M., Favier, A., and Briancon, S. (2004): The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch.Intern.Med.* 164 (21): 2335 - 2342.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342 (8878): 1007 - 1011.
- Heyn, G (2005): Strategien gegen den schleichenden Verfall. *Pharmazeutische Zeitung* (8): 18 - 24.
- Hodnick, W. F., Duval, D. L., and Pardini, R. S. (1994): Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem.Pharmacol.* 47 (3): 573 - 580.
- Horakova, L., Licht, A., Sandig, G., Jakstadt, M., Durackova, Z., and Grune, T. (2003): Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury. *Arch.Toxicol.* 77 (1): 22 - 29.
- Horvathova, K., Novotny, L., Tothova, D., and Vachalkova, A. (2004): Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H2O2-treated human ML cells K562. *Neoplasma* 51 (5): 395 - 399.
- Hu, C. and Kitts, D. D. (2004): Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol.Cell Biochem.* 265 (1-2): 107 - 113.

- Huxley, R. R. and Neil, H. A. (2003): The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur.J Clin.Nutr.* 57 (8): 904 - 908.
- Jana, C. K., Das, N., and Sohal, R. S. (2002): Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. *Arch.Biochem.Biophys.* 397 (2): 433 - 439.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., and Chen, L. B. (1980): Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77 (2): 990 - 994.
- Jones, C. R., Arai, T., and Rapoport, S. I. (1997): Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse. *Neurochem.Res.* 22 (6): 663 - 670.
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. J., and Bickford, P. C. (1999): Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.* 19 (18): 8114 - 8121.
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Tagliabue, G., and Bickford, P. C. (1998): Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.* 18 (19): 8047 - 8055.
- Joshi, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., and Willett, W. C. (2001): The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann.Intern.Med.* 134 (12): 1106 - 1114.
- Kafatos, A., Verhagen, H., Moschandreas, J., Apostolaki, I., and Van Westerop, J. J. (2000): Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J Am.Diet.Assoc.* 100 (12): 1487 - 1493.
- Kaiser, R. D. and London, E. (1998): Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37 (22): 8180 - 8190.
- Kalra, E. K. (2003): Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS.PharmSci.* 5 (3): E25 -
- Kapiszewska, M., Soltys, E., Visioli, F., Cierniak, A., and Zajac, G. (2005): The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J Physiol Pharmacol.* 56 Suppl 1183 - 1197.
- Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M., and Wink, D. A. (1996): "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268:281 - 293.
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J. B., Muller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Muller, W. E., and Eckert, A. (2004): Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol.Chem.* 279 (48): 50310 - 50320.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., and Maatela, J. (1996): Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312 (7029): 478 - 481.
- Kojima, H., Hirata, M., Kudo, Y., Kikuchi, K., and Nagano, T. (2001): Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. *J Neurochem.* 76 (5): 1404 - 1410.
- Komatsu, M. and Hiramatsu, M. (2000): The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicology* 148 (2-3): 143 - 148.
- Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., Kishimoto, T., and Tanaka, T. (2000): Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy Clin.Immunol.* 106 (1 Pt 1): 159 - 166.



- Krohn, A. J., Wahlbrink, T., and Prehn, J. H. (1999): Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J.Neurosci.* 19 (17): 7394 - 7404.
- Kromann, N. and Green, A. (1980): Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med.Scand.* 208 (5): 401 - 406.
- Kruse, A., Gaber, E., Heuft, G., Oster, P., Re, S., and Schulz-Nieswandt, F (2005): Gesundheit im Alter. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes* 10
- La Rue, A., Koehler, K. M., Wayne, S. J., Chiulli, S. J., Haaland, K. Y., and Garry, P. J. (1997): Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample: a 6-y reassessment. *Am.J Clin.Nutr.* 65 (1): 20 - 29.
- La Vecchia, C., Altieri, A., and Tavani, A. (2001): Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *Eur.J Nutr.* 40 (6): 261 - 267.
- Labieniec, M. and Gabryelak, T. (2005): Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicol.Lett.* 155 (1): 15 - 25.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., and Bondy, S. C. (1992): Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem.Res.Toxicol.* 5 (2): 227 - 231.
- Lee, H., Bae, J. H., and Lee, S. R. (2004): Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci.Res.* 77 (6): 892 - 900.
- Lee, H. C. and Wei, Y. H. (1997): Mutation and oxidative damage of mitochondrial DNA and defective turnover of mitochondria in human aging. *J Formos.Med.Assoc.* 96 (10): 770 - 778.
- Lentz, B. R. (1993): Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem.Phys.Lipids* 64 (1-3): 99 - 116.
- Leutner, S., Eckert, A., and Muller, W. E. (2001): ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm.* 108 (8-9): 955 - 967.
- Levine, R. L. and Stadtman, E. R. (2001): Oxidative modification of proteins during aging. *Exp.Gerontol.* 36 (9): 1495 - 1502.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., and Lin, J. K. (1999): Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20 (10): 1945 - 1952.
- Lim, S. Y. and Suzuki, H. (2002): Dose-response effect of egg-phosphatidylcholine on maze-learning ability and fatty acid composition of plasma and brain in aged mice fed an n-3 fatty acid-deficient diet. *Ann.Nutr.Metab* 46 (5): 215 - 221.
- Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T., and Tanaka, M. (1989): Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1 (8639): 642 - 645.
- Lishinevs'ka, V. I., Briuzhina, T. S., and Korkushko, O. V. (2003): [Age-related changes in fatty acid composition of the erythrocyte membrane]. *Fiziol.Zh.* 49 (6): 47 - 51.
- Local Food Nutraceutical Consortium (2006): Understanding Local Mediterranean Diets: A Multidisciplinary Pharmacological and Ethnobotanical Approach. *Pharmacological Research* 53
- Loi, M. C., Poli, F., Sacchetti, G., Seleno, M. B., and Ballero, M. (2004): Ethnopharmacology of ogliastra (villagrande strisaili, sardinia, Italy). *Fitoterapia* 75 (3-4): 277 - 295.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, F. W. (2005): DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120 (4): 497 - 512.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol.Chem.* 193 (1): 265 - 275.
- MacKay, J and Mensah, G. A (2005): The Atlas of Heart Disease and Stroke.

- Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M. G., Geraci, E., Levantesi, G., Maggioni, A. P., Mantini, L., Marfisi, R. M., Mastrogiuseppe, G., Mininni, N., Nicolosi, G. L., Santini, M., Schweiger, C., Tavazzi, L., Tognoni, G., Tucci, C., and Valagussa, F. (2002): Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105 (16): 1897 - 1903.
- Marklund, S. L., Westman, N. G., Lundgren, E., and Roos, G. (1982): Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42 (5): 1955 - 1961.
- Martin, G. M., Austad, S. N., and Johnson, T. E. (1996): Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat.Genet.* 13 (1): 25 - 34.
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Begley, J. G., and Mark, R. J. (1995): Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.* 46:187 - 216.
- McCann, S. M. (1997): The nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp.Gerontol.* 32 (4-5): 431 - 440.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969): The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol.Chem.* 244 (22): 6056 - 6063.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A. E., Koontz, D., Shoffner, J. M., Wallace, D. C., and Beal, M. F. (1993): Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann.Neurol.* 34 (4): 609 - 616.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin.Sci.(Lond)* 84 (4): 407 - 412.
- Miquel, J. (1992): An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat.Res.* 275 (3-6): 209 - 216.
- Mitsunaga, Y., Takanaga, H., Matsuo, H., Naito, M., Tsuruo, T., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2000): Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood-brain barrier. *Eur.J.Pharmacol.* 395 (3): 193 - 201.
- Mizuno, Y. and Ohta, K. (1986): Regional distributions of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brains. *J.Neurochem.* 46 (5): 1344 - 1352.
- Morello, J. R., Vuorela, S., Romero, M. P., Motilva, M. J., and Heinonen, M. (2005): Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *J Agric.Food Chem.* 53 (6): 2002 - 2008.
- Mosca, L., De Marco, C., Visioli, F., and Cannella, C. (2000): Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method. *J Agric.Food Chem.* 48 (2): 297 - 301.
- Müller, S., Schönthal, A. H., and Cadenas, E. (2000): Zytostatika lösen die oxidative Bremse im Zellzyklus aus. *Photochem.Photobiol.* 18
- Murota, K. and Terao, J. (2003): Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch.Biochem.Biophys.* 417 (1): 12 - 17.
- Nebel, S. (2005): Ta Chorta: Piante commestibili tradizionali di Gallicianò.
- Nebot, C., Moutet, M., Huet, P., Xu, J. Z., Yadan, J. C., and Chaudiere, J. (1993): Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal.Biochem.* 214 (2): 442 - 451.
- Nemeth, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., Williamson, G., Swallow, D. M., and Kroon, P. A. (2003): Deglycosylation by small intestinal epithelial

- cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur.J.Nutr.* 42 (1): 29 - 42.
- Nielsen, S. E., Young, J. F., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Sandstrom, B., and Dragsted, L. O. (1999): Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br.J Nutr.* 81 (6): 447 - 455.
- Nobre Junior, H. V., Cunha, G. M., Maia, F. D., Oliveira, R. A., Moraes, M. O., and Rao, V. S. (2003): Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. *Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol.* 136 (2): 175 - 180.
- Noda, Y., Yamada, K., Komori, Y., Sugihara, H., Furukawa, H., and Nabeshima, T. (1996): Role of nitric oxide in the development of tolerance and sensitization to behavioural effects of phencyclidine in mice. *Br.J Pharmacol.* 117 (7): 1579 - 1585.
- Noroozi, M., Angerson, W. J., and Lean, M. E. (1998): Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am.J Clin.Nutr.* 67 (6): 1210 - 1218.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., and Stadtman, E. R. (1987): Age-related changes in oxidized proteins. *J.Biol.Chem.* 262 (12): 5488 - 5491.
- Oyama, Y., Hayashi, A., Ueha, T., and Maekawa, K. (1994): Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. *Brain Res.* 635 (1-2): 113 - 117.
- Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab Clin.Med.* 70 (1): 158 - 169.
- Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Kokkinos, P., Chrysohoou, C., Vavuranakis, M., Stefanadis, C., and Toutouzas, P. (2003): Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case-control study. *Nutr.J.* 2 (1): 2 -
- Panza, F., Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., Del Parigi, A., Capurso, S., and Capurso, A. (2004): Mediterranean diet and cognitive decline. *Public Health Nutr.* 7 (7): 959 - 963.
- Patil, C. S., Singh, V. P., Satyanarayan, P. S., Jain, N. K., Singh, A., and Kulkarni, S. K. (2003): Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology* 69 (2): 59 - 67.
- Peng, H. W., Cheng, F. C., Huang, Y. T., Chen, C. F., and Tsai, T. H. (1998): Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 714369 - 374.
- Pieroni, A., Janiak, V., Durr, C. M., Ludeke, S., Trachsel, E., and Heinrich, M. (2002): In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in southern Italy. *Phytother.Res.* 16 (5): 467 - 473.
- Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G., and Wolf, G. (1997): 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* 416 (2): 175 - 178.
- Quaglino, D. and Ronchetti, I. P. (2001): Cell death in the rat thymus: a minireview. *Apoptosis.* 6 (5): 389 - 401.
- Recio, M. C., Giner, R. M., Hermenegildo, M., Peris, J. B., Manez, S., and Rise, P. (1992): Phenolics of *Reichardia* and their Taxonomic Implications. *Biochemistry* 20 (5): 449 - 452.
- Requena, J. R., Levine, R. L., and Stadtman, E. R. (2003): Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino.Acids* 25 (3-4): 221 - 226.
- Rice-Evans, C. (2004): Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic.Biol.Med.* 36 (7): 827 - 828.
- Richter, C., Park, J. W., and Ames, B. N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 (17): 6465 - 6467.

- Rimm, E. B., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., and Willett, W. C. (1996): Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann.Intern.Med.* 125 (5): 384 - 389.
- Rivera, D., Obon, C., Inocencio, C., Heinrich, M., Verde, A., Fajardo, J., and Llorach, R. (2005): The ethnobotanical study of local Mediterranean food plants as medicinal resources in Southern Spain. *J Physiol Pharmacol.* 56 Suppl 197 - 114.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002): Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu.Rev.Nutr.* 2219 - 34.
- Rothe, G., Oser, A., and Valet, G. (1988): Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75 (7): 354 - 355.
- Rothe, G. and Valet, G. (1990): Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc.Biol.* 47 (5): 440 - 448.
- Rusinek, H., De Santi, S., Frid, D., Tsui, W. H., Tarshish, C. Y., Convit, A., and de Leon, M. J. (2003): Regional brain atrophy rate predicts future cognitive decline: 6-year longitudinal MR imaging study of normal aging. *Radiology* 229 (3): 691 - 696.
- Rutten, B. P., Korr, H., Steinbusch, H. W., and Schmitz, C. (2003): The aging brain: less neurons could be better. *Mech.Ageing Dev.* 124 (3): 349 - 355.
- Sanders, T. A. (2001): Olive oil and the Mediterranean diet. *Int.J Vitam.Nutr.Res.* 71 (3): 179 - 184.
- Sasaki, N., Toda, T., Kaneko, T., Baba, N., and Matsuo, M. (2003): Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem.Biol.Interact.* 145 (1): 101 - 116.
- Sayre, L. M., Smith, M. A., and Perry, G. (2001): Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr.Med.Chem.* 8 (7): 721 - 738.
- Schmerold, I. and Niedermuller, H. (2001): Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cellular DNA from 12 tissues of young and old Sprague-Dawley rats. *Exp.Gerontol.* 36 (8): 1375 - 1386.
- Schmitt-Schillig, S., Schaffer, S., Weber, C. C., Eckert, G. P., and Muller, W. E. (2005): Flavonoids and the aging brain. *J Physiol Pharmacol.* 56 Suppl 123 - 36.
- Schüssel, K. (2005): Oxidative Stress During Aging and In Alzheimer's Disease, Dissertation, Universität Frankfurt
- Sesink, A. L., Arts, I. C., Faassen-Peters, M., and Hollman, P. C. (2003): Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *J.Nutr.* 133 (3): 773 - 776.
- Shirai, N. and Suzuki, H. (2004): Effects of Western, Vegetarian, and Japanese dietary fat model diets with or without green tea extract on the plasma lipids and glucose, and liver lipids in mice. A long-term feeding experiment. *Ann.Nutr.Metab* 48 (2): 95 - 102.
- Sies, H. and Stahl, W. (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am.J Clin.Nutr.* 62 (6 Suppl): 1315S - 1321S.
- Siles, E., Martinez-Lara, E., Canuelo, A., Sanchez, M., Hernandez, R., Lopez-Ramos, J. C., Del Moral, M. L., Esteban, F. J., Blanco, S., Pedrosa, J. A., Rodrigo, J., and Peinado, M. A. (2002): Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Res.* 956 (2): 385 - 392.
- Simopoulos, A. P. (2004): Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biol.Res.* 37 (2): 263 - 277.
- Simopoulos, A. P., Norman, H. A., Gillaspay, J. E., and Duke, J. A. (1992): Common purslane: a source of omega-3 fatty acids and antioxidants. *J Am.Coll.Nutr.* 11 (4): 374 - 382.
- Simopoulos, A. P. and Salem, N., Jr. (1986): Purslane: a terrestrial source of omega-3 fatty acids. *N.Engl.J Med.* 315 (13): 833 -

- Singer, S. J. (2004): Some early history of membrane molecular biology. *Annu.Rev.Physiol* 661 - 27.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972a): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (23): 720 - 731.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972b): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (23): 720 - 731.
- Skoog, I., Nilsson, L., Palmertz, B., Andreasson, L. A., and Svanborg, A. (1993): A population-based study of dementia in 85-year-olds. *N.Engl.J Med.* 328 (3): 153 - 158.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Freeman, B. A., and Crapo, J. D. (1986): Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab Invest* 55 (3): 363 - 371.
- Smith, K. J., Kapoor, R., and Felts, P. A. (1999): Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 9 (1): 69 - 92.
- Soreghan, B. A., Yang, F., Thomas, S. N., Hsu, J., and Yang, A. J. (2003): High-throughput proteomic-based identification of oxidatively induced protein carbonylation in mouse brain. *Pharm.Res.* 20 (11): 1713 - 1720.
- Spencer, J. P., Abd-el-Mohsen, M. M., and Rice-Evans, C. (2004): Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch.Biochem.Biophys.* 423 (1): 148 - 161.
- Stadtman, E. R. (1990): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic.Biol.Med.* 9 (4): 315 - 325.
- Stadtman, E. R. (1992): Protein oxidation and aging. *Science* 257 (5074): 1220 - 1224.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2000): Protein oxidation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 899:191 - 208.
- Stoll, L., Schubert, T., and Muller, W. E. (1992): Age-related deficits of central muscarinic cholinergic receptor function in the mouse: partial restoration by chronic piracetam treatment. *Neurobiol.Aging* 13 (1): 39 - 44.
- Sun, G. Y., Xia, J., Draczynska-Lusiak, B., Simonyi, A., and Sun, A. Y. (1999): Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport* 10 (1): 93 - 96.
- Takasawa, M., Hayakawa, M., Sugiyama, S., Hattori, K., Ito, T., and Ozawa, T. (1993): Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts. *Exp.Gerontol.* 28 (3): 269 - 280.
- Tappel, A. L. (1975): Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. 145 - 170.
- Tatton, W. G. and Olanow, C. W. (1999): Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 1410 (2): 195 - 213.
- Thresiamma, K. C., George, J., and Kuttan, R. (1998): Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp.Clin.Cancer Res.* 17 (4): 431 - 434.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Ishizaki, E., and Isobe, C. (1999): Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* 269 (1): 52 - 54.
- Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guerin, M., and Torreilles, J. (1999): Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 30 (2): 153 - 163.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., and Trichopoulos, D. (2003): Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N.Engl.J.Med.* 348 (26): 2599 - 2608.
- Trichopoulou, A. and Vasilopoulou, E. (2000): Mediterranean diet and longevity. *Br.J Nutr.* 84 Suppl 2S205 - S209.
- Trotti, R., Carratelli, M., and Barbieri, M. (2002): Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med.* 44 (1): 37 - 40.

- Tsai, T. H. and Chen, Y. F. (2000): Determination of unbound hesperetin in rat blood and brain by microdialysis coupled to microbore liquid chromatography. *J Food Drug Anal.* 8331 - 336.
- Tur, J. A., Romaguera, D., and Pons, A. (2004): Food consumption patterns in a mediterranean region: does the mediterranean diet still exist? *Ann.Nutr.Metab* 48 (3): 193 - 201.
- Unno, K., Takabayashi, F., Kishido, T., and Oku, N. (2004): Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp.Gerontol.* 39 (7): 1027 - 1034.
- Vaidyanathan, J. B. and Walle, T. (2003): Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 307 (2): 745 - 752.
- Van Den Broucke, C. O. and Lemli, J. A. (1983): Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm.Weekbl.Sci.* 5 (1): 9 - 14.
- van Gils, C. H., Peeters, P. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Boshuizen, H. C., Lahmann, P. H., Clavel-Chapelon, F., Thiebaut, A., Kesse, E., Sieri, S., Palli, D., Tumino, R., Panico, S., Vineis, P., Gonzalez, C. A., Ardanaz, E., Sanchez, M. J., Amiano, P., Navarro, C., Quiros, J. R., Key, T. J., Allen, N., Khaw, K. T., Bingham, S. A., Psaltopoulou, T., Koliva, M., Trichopoulou, A., Nagel, G., Linseisen, J., Boeing, H., Berglund, G., Wirfalt, E., Hallmans, G., Lenner, P., Overvad, K., Tjonneland, A., Olsen, A., Lund, E., Engeset, D., Alsaker, E., Norat, T., Kaaks, R., Slimani, N., and Riboli, E. (2005): Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA* 293 (2): 183 - 193.
- Walgren, R. A., Karnaky, K. J., Jr., Lindenmayer, G. E., and Walle, T. (2000): Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 294 (3): 830 - 836.
- Wallace, D. C. (1992): Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256 (5057): 628 - 632.
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., and Vasson, M. P. (2003): Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin.Chim.Acta* 331 (1-2): 103 - 110.
- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Rottinghaus, G., Sun, G. Y., and Sun, A. Y. (2004): Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem.Res.* 29 (11): 2105 - 2112.
- Weber, C. C., Kressmann, S., Fricker, G., and Muller, W. E. (2004): Modulation of P-glycoprotein function by St John's wort extract and its major constituents. *Pharmacopsychiatry* 37 (6): 292 - 298.
- Wei, Y. H. (1998): Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 217 (1): 53 - 63.
- Wei, Y. H. and Lee, H. C. (2002): Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 227 (9): 671 - 682.
- Weinbreuner, T., Fito, M., de la Torre R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., Coolen, S., Albaladejo, M. F., Abanades, S., Schroder, H., Marrugat, J., and Covas, M. I. (2004): Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr.* 134 (9): 2314 - 2321.
- Wondrak, G. T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K. (2000): Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem.J* 351 Pt 3769 - 777.
- Wu, C. H. and Yen, G. C. (2005): Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric.Food Chem.* 53 (8): 3167 - 3173.
- Yamada, K. and Nabeshima, T. (1998): Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. *Microsc.Res.Tech.* 43 (1): 68 - 74.

- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., and Kusu, F. (2001): Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal.Sci.* 17 (5): 599 - 604.
- Yen, T. C., Chen, Y. S., King, K. L., Yeh, S. H., and Wei, Y. H. (1989): Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 165 (3): 944 - 1003.
- Yin, F., Giuliano, A. E., and Van Herle, A. J. (1999): Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 9 (4): 369 - 376.
- Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., and Folsom, A. R. (1999): Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am.J Epidemiol.* 149 (10): 943 - 949.
- Yoon, I., Lee, K. H., and Cho, J. (2004): Gossypin protects primary cultured rat cortical cells from oxidative stress- and beta-amyloid-induced toxicity. *Arch.Pharm.Res.* 27 (4): 454 - 459.
- Youdim, K. A. and Deans, S. G. (1999): Beneficial effects of thyme oil on age-related changes in the phospholipid C20 and C22 polyunsaturated fatty acid composition of various rat tissues. *Biochim.Biophys.Acta* 1438 (1): 140 - 146.
- Youdim, K. A. and Deans, S. G. (2000): Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Br.J Nutr.* 83 (1): 87 - 93.
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J., and Rice-Evans, C. (2003): Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J.Neurochem.* 85 (1): 180 - 192.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., and Joseph, J. A. (2004): Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic.Biol.Med.* 37 (11): 1683 - 1693.
- Zarchin, N., Meilin, S., Rifkind, J., and Mayevsky, A. (2002): Effect of aging on brain energy-metabolism. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 132 (1): 117 - 120.
- Zhang, D. L., Zhang, Y. T., Yin, J. J., and Zhao, B. L. (2004): Oral administration of Crataegus flavonoids protects against ischemia/reperfusion brain damage in gerbils. *J.Neurochem.* 90 (1): 211 - 219.
- Zheng, W. and Wang, S. Y. (2001): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric.Food Chem.* 49 (11): 5165 - 5170.
- Zhuo, M., Kandel, E. R., and Hawkins, R. D. (1994): Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. *Neuroreport* 5 (9): 1033 - 1036.

**10 Bibliographie**



## 10.1 Publikationen

Eckert GP, Schaffer S, Schmitt-Schillig S, Müller WE: Geistig fit durch mediterrane Kost?, *Forschung Frankfurt* (2003) 1:10-16.

Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber CC, Eckert GP, Müller WE: Flavonoids and the aging brain, *Journal of Physiology and Pharmacology* (2005) Supplement 1:23-36.

The Local Food-Nutraceutical Consortium: Understanding Local Mediterranean Diets: A Multidisciplinary Pharmacological and Ethnobotanical Approach", *Pharmacological Research* (2005), in press.

Schaffer S, Schmitt-Schillig S, Müller WE, Eckert GP: Antioxidant properties of wild Mediterranean plant foods: Geographical differences, *Journal of Physiology and Pharmacology* (2005) Supplement 1:115-124.

Schaffer S, Schmitt-Schillig S, Eckert GP, Müller WE: Antioxidantien und der Benefit der mediterranen Ernährung. *Pharmazeutische Zeitung* (2005) 21:17-23.

## 10.2 Poster

Nebel SM, Schaffer S, Eckert GP, Pieroni A, Schmitt-Schillig S, Müller WE, Heinrich M: Antioxidant activity of local food plants consumed in Southern Italy. 51. Kongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, Kiel (2003).

Eckert GP, Pieroni A, Nebel SM, Heinrich M, Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Müller WE, Galli C, Visioli F: Health-modulating Activity of Local Mediterranean Food Plant Extracts. 1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, Frankreich (2003).

Schmitt-Schillig S, Antonopoulou S, Galli C, Heinrich M, Koj A, Müller WE, Rivera D, De Sazieu A: Local Mediterranean Food Plants: potential new Nutraceuticals and their current role in the Mediterranean diet. 41. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Weihenstephan (2004).

Schaffer S, Visioli F, Galli C, Schmitt-Schillig S, Müller WE, Eckert GP: Local Mediterranean food plants exhibit cardio- and neuroprotective activity in vitro. 41. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Weihenstephan (2004).

## 11 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Walter Müller und Dr. Gunter Eckert für die Bereitstellung des Themas und die Chance an diesem internationalen Projekt mitzuwirken. Die Zusammenarbeit mit den Gruppen aus verschiedenen Ländern hat mir großen Spaß gemacht und unter anderem gezeigt, dass wir im Biozentrum in extrem angenehmer Umgebung forschen dürfen. Vielen Dank auch für die schöne Gelegenheit an den Meetings in Krakau, Murcia und Frankfurt teilzunehmen.

Sebastian Schaffer als „Leidensgenosse in den Mühlen der EU“ ; ) und für die gute Zusammenarbeit bei diversen Paper, Abstracts und anderen Pamphleten.

Katrin Schüssel für die tatkräftige Unterstützung bei der Diskussion dieser Arbeit.

all meinen Unifreunden und Kollegen:

- für viele schöne Bastelstunden
- für die Hilfe bei neuen und alten Methoden
- fürs Zuhören bei alten und neuen Problemen
- ohne die ich vielleicht das Handtuch geworfen hätte. Ich hoffe wir führen unsere außerunilichen Aktivitäten noch lange fort. Jungs, vielleicht gewinnt ihr dann auch mal ein Badmintonmatch!!!

meiner Familie, die mich in allen Situationen unterstützt hat und mir immer mit den richtigen Worten Mut gemacht hat oder gesagt hat, dass ich mich nicht anstellen soll. Vor allem danke ich meinem Dad auch für die finanzielle Unterstützung, ohne die eine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre: Ich bin endlich fertig!

meinem Freund, der mir viel Frust abgenommen hat und dafür gesogt hat, daß ich immer wieder über alles lachen konnte. Es gibt tatsächlich Wichtigeres...; )!

## 12 Appendix

### 12.1 Partner des EU-Projektes

**Partner 1: School of Pharmacy, Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy, University of London**

Prof. Dr. Michael Heinrich; Dr. Marco Leonti; Sabine Nebel; Wieland Peschel, Dr. Andrea Pieroni (until 30.6.2003)

**Partner 2: Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Spanien**

Prof. Dr Diego Rivera; Dr. Concepción Obón; Dr. Cristina Inocencio; Dr. Alonso Verde; José Fajardo; Dr. Rafael Llorach

**Partner 3: Institute für Pharmacologie, Universität Frankfurt, Deutschland**

Prof. Dr. Walter E. Müller; Dr. Gunter P. Eckert; Sebastian Schaffer ; Stephanie Schmitt-Schillig

**Partner 4: Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Athen, Griechenland**

Prof, Dr. Smaragda Antonopoulou; Dr. Yannis Manios; Andriana Kaliora

**Partner 5: Department of Pharmacological Sciences, University of Milan, Italien**

Prof. Dr. Claudio Galli; Dr. Francesco Visioli; Simona Grande; Paola Bogani

**Partner 6: DSM plc (formerly Roche Vitamins Ltd.); Kaiseraugst, Switzerland**

Dr. Antoine de Seizeau; Dr. Beat Flühmann

**Partner 7: Department of Cell Biochemistry, Faculty of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland;**

Prof. Dr. Aleksander Koj; Dr. Joanna Bereta; Dr. Józef Dulak; Dr. Amalia Guzdek; Dr. Maria Kapiszewska