

Institut für Landwirtschaftliche Botanik

**Interventionsstudie zur Wirkung von moderatem Rotweinkonsum
auf ausgewählte redoxsensitive Immunfunktionen
bei T-Lymphozyten und Phagozytenpopulationen**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft

(Dr.oec.troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

genehmigte Dissertation

Vorgelegt am 30. Juli 2003

von

Sabine Ellinger

aus Stuttgart

Referent:	PD Dr. Roland Goerlich
Koreferenten:	Prof. Dr. Heinrich Enbergs Prof. Dr. Peter Stehle
Tag der mündlichen Prüfung:	28.11.2003

Meinen Eltern

Kurzfassung: Interventionsstudie zur Wirkung von moderatem Rotweinkonsum auf ausgewählte redoxsensitive Immunfunktionen bei T-Lymphozyten und Phagozytenpopulationen

Problemstellung: Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in allen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen, in besonders hoher Konzentration im Rotwein. Ihnen werden zahlreiche biologische Wirkungen zugeschrieben, u.a. auch immunmodulierende und antiinflammatorische Effekte. Letztere wurden bisher fast ausschließlich *in vitro* nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es daher zu prüfen, ob eine einmalige oder wiederholte nutritive Polyphenolaufnahme durch Konsum von Rotwein (RW) redoxsensitive Immunfunktionen *ex vivo* beeinflusst, und ob entalkoholisierter Rotwein (ERW) vergleichbare Effekte hat wie RW.

Methoden: A) 27 gesunde Nichtraucher tranken nüchtern einmalig 200 mL RW, 175 mL ERW oder 200 mL Wasser (Kontrolle). Bestimmt wurde der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten (Annexin-V-Bindungstest) und der Anteil phagozytischer und burstaktiver Granulozyten und Monozyten (Phago-, Bursttest[®]) vor, 90 und 360 min nach der Intervention. Alle Untersuchungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie. B) 49 gesunde Nichtraucher nahmen 6 Wochen lang täglich 200 mL RW oder 175 mL ERW zusätzlich zur gewohnten Kost auf. Eine Kontrollgruppe mit 25 Probanden erhielt kein Getränk. Blutproben wurden morgens nüchtern vor und nach der 6-wöchigen Intervention entnommen und dieselben Parameter untersucht wie bei A).

Ergebnisse: Immunmodulierende Wirkungen, die mit der Intervention in Verbindung gebracht werden können, wurden nur nach einmaligem, nicht aber nach wiederholtem Konsum von RW oder ERW festgestellt. Der Anteil phagozytischer Monozyten stieg 90 min nach Konsum von RW an, aber nicht nach Konsum von ERW, was durch den Alkohol oder die höhere Polyphenolaufnahme mit RW im Vergleich zu ERW bedingt sein könnte. Der Anteil burstaktiver Granulozyten nahm 360 min nach Konsum von ERW ab, während der Anteil burstaktiver Monozyten 90 und 360 min nach Konsum von ERW gegenüber dem Ausgangswert anstieg. Dass diese Veränderungen nur nach Konsum von ERW auftraten, aber nicht nach Konsum von RW, deutet darauf hin, dass der Alkohol im RW die Wirkungen der Polyphenole kompensiert, möglicherweise durch prooxidative Wirkungen oder einer beschleunigten Elimination der Polyphenole. Alle übrigen Parameter blieben unverändert.

Schlussfolgerung: Immunmodulierende Wirkungen wurden nur nach einmaligem Verzehr von RW und ERW bei der unspezifischen zellulären Abwehr festgestellt. Warum nach regelmäßigem Konsum von RW und ERW keine immunmodulierende Wirkungen auftraten, ist unklar. Da die immunmodulierenden Wirkungen der Polyphenole *in vitro* dosisabhängig sind, ist es denkbar, dass die Polyphenolkonzentration nach 6-wöchigem Konsum im Nüchternblut zu gering war, um den Phagozytoseprozess zu modulieren. Möglicherweise werden aber auch Adaptationsmechanismen aktiviert, um langfristig die Homöostase aufrecht zu halten. Ob eine erhöhte nutritive Aufnahme von anderen Flavonoiden, z.B. Flavonolen, ähnliche Wirkungen auslösen wie die Polyphenole im Rotwein, müsste in Hinblick auf einen möglichen präventiven oder therapeutischen Nutzen bei chronisch-degenerativen, entzündlichen Erkrankungen in weiteren Interventionsstudien überprüft werden.

Abstract: Intervention study to investigate the effect of moderate red wine consumption on selected redoxsensitive immune functions from T-lymphocytes and phagocyte populations

Background: Polyphenols are secondary plant products occurring in plant foods, in especially high concentrations in red wine. They have many biological properties, among them immunomodulatory and antiinflammatory effects. These effects have almost exclusively been observed *in vitro*. Hence the aim of this study was to investigate if single or repeated dietary polyphenol intake by means of red wine (RW) affects redox sensitive immune functions *ex vivo*, and if dealcoholized red wine (DRW) induces similar effects.

Methods: A) 27 healthy non-smokers consumed a single dose of 200 mL RW, 175 mL DRW or 200 mL water (controls). The percentage of apoptotic T-lymphocytes was determined with annexin V labelling and phagocytosis and burst of granulocytes and monocytes with testkits (Phago-, Bursttest®) before, 90 and 360 min after intervention. All investigations were done by flow cytometry. B) 49 healthy non-smokers ingested either 200 mL RW or 175 mL DRW daily for 6 weeks in addition to their usual diet. A control group including 25 participants did not receive any study drink. Blood samples were taken after an overnight fast before and after 6 weeks of intervention and the same parameters were investigated as in A).

Results: A) Immunomodulatory effects related to intervention could only be observed after single, but not after repeated ingestion of either RW or DRW. The percentage of phagocytic monocytes increased 90 min after consumption of RW, but not after consumption of DRW, probably due to the alcohol or the higher polyphenol intake with RW in comparison to DRW. The percentage of burstpositive granulocytes decreased 360 min after consumption of DRW and increased progressively in monocytes compared to baseline values. As these effects occurred only after consumption of DRW, but not after consumption of RW, the alcohol seems to compensate the polyphenols' effects, probably by prooxidative effects or by increased polyphenol elimination. Further parameter did not change in any group.

Conclusion: Immunomodulating effects occurred only after a single ingestion of RW or DRW within the unspecific defense. It is not clear why immunomodulatory effects did not occur after repeated consumption of RW or DRW. As immunomodulatory effects of polyphenols are concentration-dependent *in vitro*, the polyphenol concentration in blood after an overnight fast might have been too low after 6 weeks of intervention to modulate phagocytosis. Another explanation might concern compensatory mechanisms which might have been activated to maintain homeostasis. Regarding the potential protection against chronic-degenerative, inflammatory diseases, it should be investigated in further intervention studies whether an increased nutritional intake of other flavonoids, e.g. flavonols, may induce similar effects as polyphenols from red wine.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Polyphenole: Vorkommen, Struktur und Klassifikation	2
2.2	Polyphenolaufnahme	2
2.3	Bioverfügbarkeit von Polyphenolen	3
2.4	Wirkungen der Polyphenole und ihre mögliche biologische Bedeutung	5
2.5	Immunmodulierende Wirkung von Polyphenolen	6
2.5.1	Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf die T-Zell-Apoptose	6
2.5.2	Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf die Phagozytose	7
2.5.3	Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst	8
2.6	Rotwein als Polyphenolquelle	11
2.6.1	Polyphenole im Rotwein	11
2.6.2	Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Rotwein	12
3	Zielsetzung	15
4	Material und Methoden	16
4.1	Studiendesign	16
4.2	Probanden	16
4.3	Fallzahlabeschätzung	18
4.4	Intervention	19
4.4.1	Kurzzeitstudie	19
4.4.2	Langzeitstudie	20
4.5	Studiengetränke	21
4.6	Blutentnahme	22
4.7	Materialien	22
4.8	Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme	24
4.9	Apoptose	25
4.10	Phagozytose	30
4.11	Respiratory Burst	35
4.12	Statistische Auswertung	39

5	Ergebnisse	40
5.1	Kurzzeitstudie	40
5.1.1	Probanden	40
5.1.2	Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme	41
5.1.3	Apoptose	42
5.1.4	Phagozytose	43
5.1.5	Respiratory Burst	44
5.2	Langzeitstudie	45
5.2.1	Probanden	45
5.2.2	Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme	46
5.2.3	Apoptose	49
5.2.4	Phagozytose	50
5.2.5	Respiratory Burst	51
6	Diskussion	52
6.1	Studienaufbau und Methoden	53
6.2	Kurzzeitstudie	54
6.2.1	Probanden	54
6.2.2	Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme	55
6.2.3	Apoptose	56
6.2.4	Phagozytose	57
6.2.5	Respiratory Burst	60
6.3	Langzeitstudie	63
6.3.1	Probanden	63
6.3.2	Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme	63
6.3.3	Apoptose	65
6.3.4	Phagozytose	66
6.3.5	Respiratory Burst	66
6.4	Schlussbetrachtung	67
7	Zusammenfassung	72
8	Literaturverzeichnis	74
	Anhang	83

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
BD	Becton Dickinson
BMI	Body Mass Index
D-A-CH	Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
Gruppe ERW	Gruppe Entalkoholisierter Rotwein
Gruppe RW	Gruppe Rotwein
KG	Körpergewicht
Max	Maximum
Min	Minimum
MW	Mittelwert
O ₂ ^{•-}	Superoxidanionen
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PHA	Phytohämagglutinin
R 123	Rhodamin 123
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht
TE	Troloxäquivalente
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Auswertung des Kontrollansatzes bei der Apoptosemessung	29
Abb. 2:	Auswertung des Testansatzes bei der Apoptosemessung	30
Abb. 3:	Auswertung des Kontrollansatzes bei der Phagozytosemessung	33
Abb. 4:	Auswertung der Warmprobe bei der Phagozytosemessung	34
Abb. 5:	Auswertung des Kontrollansatzes zur Untersuchung des Respiratory Burst	37
Abb. 6:	Auswertung der Positivprobe zur Untersuchung des Respiratory Burst	38
Abb. 7:	Prozentualer Anteil apoptotischer T-Lymphozyten nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle)	42
Abb. 8:	Prozentualer Anteil phagozytischer Granulozyten (a) und phagozytischer Monozyten (b) nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle)	43
Abb. 9:	Prozentualer Anteil burstaktiver Granulozyten (a) und burstaktiver Monozyten (b) nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle)	44
Abb. 10:	Prozentualer Anteil apoptotischer T-Lymphozyten vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein und in der Kontrollgruppe	49
Abb. 11:	Prozentualer Anteil phagozytischer Granulozyten (a) und phagozytischer Monozyten (b) vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein und in der Kontrollgruppe	50
Abb. 12:	Prozentualer Anteil burstaktiver Granulozyten (a) und burstaktiver Monozyten (b) vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein und in der Kontrollgruppe	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst von humanen neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i>	9
Tab. 2:	Wirkung von Phenolsäuren auf den Respiratory Burst von humanen neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i>	10
Tab. 3:	Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst von humanen Monozyten <i>in vitro</i>	10
Tab. 4:	Konzentration verschiedener Polyphenole im Plasma nach einmaligem Konsum von Rotwein oder entalkoholisiertem Rotwein	12
Tab. 5:	Polyphenolgehalt einer Einzeldosis Rotwein bzw. entalkoholisierten Rotweins	21
Tab. 6:	Demographische Merkmale des Probandenkollektivs der Kurzzeitstudie	40
Tab. 7:	Durchschnittliche Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme am Vortag	41
Tab. 8:	Demographische Merkmale des Probandenkollektivs der Langzeitstudie	45
Tab. 9:	Durchschnittliche tägliche Energie- und Alkoholaufnahme vor und während der Intervention	46
Tab. 10:	Durchschnittliche tägliche Polyphenolaufnahme vor und während der Intervention	47
Tab. 11:	Mittlere Zusammensetzung der zusätzlich aufgenommenen Flavonoide (mg/d)	48
Tab. 12:	Mittlere Zusammensetzung der zusätzlich aufgenommenen Phenolsäuren (mg/d)	48

1 Einleitung

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen (HERTOG et al., 1992), in besonders hoher Konzentration im Rotwein (SOLEAS et al., 1997a). Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Wirkungen werden ihnen gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben (NIJVELDT et al., 2001). Am besten untersucht sind die antioxidativen Wirkungen der Polyphenole, die nicht nur *in vitro*, sondern auch nach Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln im Plasma *ex vivo* bzw. teilweise auch *in vivo* nachgewiesen wurden (VINSON, 1998). Eine Steigerung der antioxidativen Kapazität im Plasma oder ein erhöhter Schutz vor Cu^{2+} -induzierter LDL-Oxidation wurde inzwischen mehrfach bei gesunden Nichtrauchern nach einmaligem (WHITEHEAD et al., 1995; MIYAGI et al., 1997; CAO et al., 1998; DUTHIE et al., 1998; SERAFINI et al., 1998, 2000; SIMONETTI et al., 2001), teilweise auch nach wiederholtem (FUHRMAN et al., 1995; CARBONNEAU et al., 1997; NIGDIKAR et al., 1998; LEIGHTON et al., 1999; CHOPRA et al., 2000) Verzehr von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein oder Rotweineextrakt bei gesunden Nichtrauchern festgestellt. Im Unterschied dazu basieren die Hinweise auf immunmodulierende und antiinflammatorische Effekte, die zumindest teilweise durch die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole vermittelt werden, fast ausschließlich auf den Ergebnissen von *in vitro* Studien (ROBAK und GRYGLEWSKI, 1996; MIDDLETON, 1998; MIDDLETON et al., 2000; NIJVELDT et al., 2001). Zu der Frage, ob diese Wirkungen auch nach Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln auftreten, ist bisher nur sehr wenig bekannt, obwohl diese Wirkungen in der Prävention und Therapie von vielen chronisch-degenerativen, insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen von Bedeutung sein könnten. Daher sollte die vorliegende Studie zeigen, ob eine einmalige oder regelmäßige nutritive Polyphenolaufnahme durch Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein die Funktion von redoxsensitiven Immunfunktionen (Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten sowie Phagozytose und Respiratory Burst von Granulozyten und Monozyten) *ex vivo* beeinflusst.

2 Literaturübersicht

2.1 Polyphenole: Vorkommen, Struktur und Klassifikation

Polyphenole gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe, die in allen Nahrungsmittelpflanzen vorkommen. Hierzu zählen phenolische Säuren, Flavonoide und Stilbene (HERTOG et al., 1992; BRAVO, 1998). Zu den phenolischen Säuren gehören Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren, die meistens mit Zuckern oder organischen Säuren verestert sind (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000; WATZL und RECHKEMMER, 2001). Die Phenolsäuren sind häufig in den Randschichten von Samen und Früchten lokalisiert, verbessern die Stabilität der Zellwände und schützen die Pflanze vor Schäden, die durch UV-Strahlung entstehen können (WATZL und LEITZMANN, 1995). Flavonoide sind Verbindungen mit einem 2-Phenyl-benzo- γ -pyren-Grundgerüst (BRAVO, 1998). Hierzu zählen Flavonole, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone, Flavone, Isoflavone und Proanthocyanidine, die sich durch Oxidation des Sauerstoffs im heterozyklischen Ring unterscheiden (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Flavonoide liegen in Pflanzen v.a. in glykosilierter, die Flavanole in acetylierter Form vor, meistens als Monomere. Viele fungieren als Farbstoffe. Oligomere aus Flavanolen bilden die Gruppe der Proanthocyanidine, die den Tanninen zugeordnet werden (BRAVO, 1998). Stilbene sind nicht weit verbreitet. Resveratrol, das zu den Stilbenen gehört, kommt nur im Wein und in geringen Mengen in Erdnüssen vor (SOLEAS et al., 1997b).

2.2 Polyphenolaufnahme

Eine exakte Bestimmung des Polyphenolgehaltes in Lebensmitteln ist schwierig. Im Lebensmittel liegen sehr viele unterschiedliche Polyphenole vor. Standardisierte Analyseverfahren zur Polyphenolanalytik wurden bisher nicht etabliert. Darüber hinaus unterliegt der Polyphenolgehalt in Nahrungsmittelpflanzen einer biologischen Variabilität. Genaue Daten zur nutritiven Polyphenolaufnahme liegen deshalb nicht vor (BRAVO, 1998; HEILMANN und MERFORT, 1998; SCALBERT und WILLIAMSON, 2000).

Die Polyphenolaufnahme hängt von den Verzehrsgewohnheiten ab (AHERNE und O'BRIEN, 2002). Die mittlere tägliche Zufuhr an Phenolsäuren betrug bei einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie 222 mg, wobei die Spanne mit 9-989 mg relativ groß war. Zur Phenolsäureaufnahme trugen wesentlich die Hydroxyzimtsäuren bei (211 mg) und weniger Hydroxybenzoesäuren (11 mg). Die Phenolsäurezufuhr erfolgt v.a. durch

Kaffeensäure (206 mg), welche fast ausschließlich (92%) durch Kaffee aufgenommen wird. Gallussäure wird überwiegend durch Wein (93%) aufgenommen. Neben Kaffee ist die Gruppe der Obst-/produkte/-säfte der wichtigste Lieferant von Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren (RADTKE et al., 1998).

Die Flavonoidzufuhr bei einem Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie betrug im Durchschnitt 54 mg und zeigte eine hohe Variabilität (Spanne 7-203 mg). Den größten Anteil machten die Flavonole (12 mg), Catechine (8 mg) und Flavanone (13 mg) aus, der Beitrag der Anthocyanidine (2,7 mg) und Proanthocyanidine (3,7 mg) war gering. Die Flavonidaufnahme erfolgte wesentlich durch die Gruppe Obst-/produkte/-säfte, wobei Rotwein-Konsum zur Aufnahme von Catechin, Epicatechin und Proanthocyanidinen beitrug (LINSEISEN et al., 1997).

Aufgrund fehlender Analysedaten und der Berücksichtigung nur einzelner Flavonoide wird die Polyphenolaufnahme wahrscheinlich unterschätzt (BRAVO, 1998; AHERNE und O'BRIEN, 2002). Nach Berechnungen von SCALBERT und WILLIAMSON (2000) müsste die tägliche Polyphenolaufnahme über 1 g liegen, unabhängig von der Methode zur Schätzung der Polyphenolaufnahme.

2.3 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen

Die Bioverfügbarkeit der Polyphenole hängt primär von der chemischen Struktur, sowie von Molekulargewicht, Glykosylierung, Polymerisationsgrad und Löslichkeit ab. Absorptionsrate und -kinetik können durch andere Nahrungsmittelinhaltsstoffe (Ballaststoffe, Proteine, Alkohol) beeinflusst werden (BRAVO, 1998).

– Absorption

Freie Hydroxyzimtsäuren werden in Dünn- und Dickdarm absorbiert, während Phenolsäuren aus Esterverbindungen erst nach Hydrolyse durch mikrobielle Esterasen im Kolon bioverfügbar sind (WATZL und RECHKEMMER, 2001). Flavanole werden in freier und acetylierter Form absorbiert. Auch die Absorption von Flavonoidglykosiden wird für möglich gehalten (HOLLMAN, 1997), z.B. durch Natrium-Glukose-Transporter (AHERNE und O'BRIEN, 2002). Obwohl der Nachweis von Flavonoidglykosiden im Plasma (PAGANGA und RICE-EVANS, 1997) von MANACH et al. (1998) in Frage gestellt wird, wurden im Plasma Cyanidin-3-glucosid und in Spuren auch Cyanidindiglykosid nach oraler Aufnahme nachgewiesen (MIYAZAWA et al., 1999). Es gibt Hinweise dafür, dass die Procyanidine im Magen durch das saure Milieu zu Mono- und Dimeren abgebaut und im Dünndarm

absorbiert werden (SPENCER et al., 2001a). Die maximale Konzentration intakter Flavonoide im Plasma lag unterhalb von 1 μM und wurde 1-2 Stunden nach oraler Aufnahme erreicht.

– Metabolismus

Darm und Leber spielen eine bedeutende Rolle für den Stoffwechsel der Polyphenole. Dimere, die beim Abbau der Proanthocyanidine entstehen, werden im Enterozyten zu Monomeren gespalten und methyliert (SPENCER et al., 2001a). Die Deglykosylierung der Flavonoidglykoside erfolgt wahrscheinlich in Dünndarm oder Leber (AHERNE und O'BRIEN, 2002). In der Leber werden die Aglykone teilweise methyliert und anschließend konjugiert zu Glucuroniden und Sulfaten (HOLLMAN, 1997). Der Nachweis von nichtkonjugierten Verbindungen im Plasma nach Supplementierung pharmakologischer Dosen (mehrere Hundert mg), jedoch nie nach Verzehr von Nahrungsmitteln, ist vermutlich auf die Sättigung von Enzymsystemen zurückzuführen, die an der Konjugation beteiligt sind. Die Art der Metabolite ist dosisabhängig (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000).

– Ausscheidung

Konjugierte Polyphenole sind wasserlöslich und werden mit dem Urin oder der Galle ausgeschieden. Bei der biliären Exkretion ist eine Reabsorption über den enterohepatischen Kreislauf möglich. Im Kolon werden Polyphenole durch Enzyme der Darmflora dekonjugiert und abgebaut zu phenolischen Säuren (Derivate von Phenylessig-, Phenylpropion- und Hydroxybenzoesäure) und Lactonen. Diese werden entweder im Kolon absorbiert und mit dem Urin oder direkt mit der Galle ausgeschieden (HOLLMAN, 1997; SCALBERT und WILLIAMSON, 2000; AHERNE und O'BRIEN, 2002). Neuere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Polyphenole haben gezeigt, dass der Anteil der mikrobiellen Abbauprodukte an den Polyphenolmetaboliten *in vivo* wesentlich höher ist als der Anteil der Metabolite, die im Dünndarm absorbiert werden (RECHNER et al., 2002).

– Akkumulation

Die Flavonoidkonzentration im Plasma nimmt rasch ab (Eliminationshalbwertszeit: 1-2 Stunden). Ausgenommen von dieser Kinetik sind Polyphenole, die erst im Kolon mikrobiell zu niedermolekularen phenolischen Säuren abgebaut und absorbiert werden (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Die Eliminationshalbwertszeit von Quercetin nach Verzehr quercetinreicher Lebensmittel betrug 23-28 Stunden (HOLLMAN et al., 1997). RECHNER et al. (2002) konnten noch 3 Tage nach Verzehr einer flavonoidfreien Kost Quercetinglucosid sowie phenolische Säuren, welche bei der Fermentation im Kolon entstehen, im Plasma nachweisen. Daher kann eine Anreicherung von Polyphenolen im

Plasma nach wiederholter Aufnahme nicht ausgeschlossen werden (HOLLMAN et al., 1997; NIJVELDT et al., 2001; RECHNER et al., 2002).

In Untersuchungen von BOYLE et al. (2000) wurde gezeigt, dass die Konzentration von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin bei täglicher Aufnahme von 500 mg Rutin über 6 Wochen im Plasma um das 2,5-10-fache ansteigt. Akkumulationseffekte bei Quercetin und Isorhamnetin wurden auch von anderen Arbeitsgruppen nach 3-tägigem Konsum von Zwiebeln, Schwarztee und Rotwein beobachtet (DE VRIES et al., 2001). Da die Konzentrationen von Quercetin im Nüchternplasma nach 6-wöchigem Konsum von Rutin deutlich geringer waren im Vergleich zu den Konzentrationen, die unmittelbar nach einmaliger Aufnahme erreicht werden, scheint die Akkumulation marginal zu sein (BOYLE et al., 2000).

2.4 Wirkungen der Polyphenole und mögliche biologische Bedeutung

Das Interesse an den Wirkungen der Polyphenole ist auf das Phänomen des French Paradox (geringes Herzinfarktrisiko trotz hoher Zufuhr an gesättigten Fettsäuren) (RENAUD und DE LORGERIL, 1992) zurückzuführen, das mit dem Rotweinverzehr in Zusammenhang gebracht wird. Das French Paradox war Auslöser breit angelegter Forschungsaktivitäten, die sich auf die physiologischen und pharmakologischen Wirkungen von Polyphenolen konzentrieren (FORMICA und REGELSON, 1995; BERTELLI, 1999; BÖHM, 2000; NIJVELDT et al., 2001).

Im Mittelpunkt des Interesses stehen die antioxidativen Wirkungen der Polyphenole (PIETTA, 2000). Durch das konjugierte Doppelbindungssystem sind die Polyphenole in der Lage, durch Elektronenabgabe andere Verbindungen zu reduzieren und freie Radikale abzufangen. Hierbei entstehen stabile Phenoxyradikale. Hydroxylsubstituenten inaktivieren katalytisch wirksame Metallionen durch Komplexbildung. Die antioxidative Wirkung der Polyphenole ist strukturabhängig (RICE-EVANS et al., 1995; RICE-EVANS et al., 1996; DE GROOT und RAUEN, 1998; PIETTA, 2000) und stärker als die der Vitamine C und E (RICE-EVANS et al., 1995).

Aufgrund ihres antioxidativen Potentials können die Flavonoide vor LDL-Oxidation schützen und damit möglicherweise atherosklerotischen Veränderungen vorbeugen. Durch Abbau von oxidativem Stress und Schutz vor oxidativen DNA-Schäden werden ihnen antikanzerogene Effekte beigemessen. Daneben werden antiinflammatorische, antithrombotische, antivirale und immunmodulierende Wirkungen diskutiert. Neben antioxidativen Mechanismen werden viele Effekte auf eine spezifische Interaktion der

Polyphenole mit Enzymen oder Elementen der Signalkaskade zurückgeführt (FORMICA und REGELSON, 1995; ROBAK und GRYGLEWSKI, 1996; MIDDLETON, 1998; MIDDLETON et al., 2000; NIJVELDT et al., 2001).

2.5 Immunmodulierende Wirkung von Polyphenolen

In vitro Studien haben gezeigt, dass Polyphenole die spezifische und unspezifische Abwehr modulieren können (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1992; FORMICA und REGELSON, 1995; MIDDLETON, 1998; MIDDLETON et al., 2000). Abgesehen von biphasischen Effekten bei der Lymphozytenproliferation — Hemmung bei hoher Konzentration, Stimulation (BERG et al., 1988; FORMICA und REGELSON, 1995) bzw. kein Effekt (BRATTIG et al., 1984) bei niedriger Konzentration — werden bzgl. Phagozytoseprozess, Synthese von Zytokinen, Immunglobulinen und Aktivität von natürlichen Killerzellen ausschließlich immunsuppressive Wirkungen beschrieben (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1992; FORMICA und REGELSON, 1995; MIDDLETON et al., 2000). Bei Untersuchungen am Menschen wurden nach Konsum von polyphenolreichen Nahrungsmitteln entweder keine oder immunstimulierende Effekte festgestellt (WATZL et al., 2002; BUB et al., 2003; WATZL et al., 2003; WINKLER et al., 2003).

Nachfolgend werden die Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen bzw. einer nutritiven Polyphenolaufnahme auf die T-Zell-Apoptose, die Phagozytose und den Respiratory Burst beschrieben.

2.5.1 Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf die T-Zell-Apoptose

Zur Wirkung von Polyphenolen auf die Apoptose von T-Lymphozyten *in vitro* liegt nur eine Untersuchung vor. In dieser Studie wurden nach Inkubation von T-Zellen von gesunden Probanden mit Tee-Extrakt oder Epigallocatechingallat keine Veränderungen im Apoptoseverhalten beobachtet. Wurden stattdessen Zellen einer HTLV-I-(human T-cell leukemia virus type I) infizierten T-Zelllinie oder entartete T-Zellen von Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie mit Tee-Extrakt oder Epigallocatechingallat versetzt, wurden wie bei anderen Studien mit entarteten T-Zellen oder T-Zelllinien proapoptotische Effekte festgestellt (LI et al., 2000).

Im Rahmen einer Pilotstudie wurde untersucht, ob der regelmäßige Konsum von Fruchtsäften oder eines Obst-Gemüsesaft-Konzentrats bei HIV⁺ und HIV⁻ Probanden die Apoptose von Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten T-Zellen *ex vivo* beeinflusst. Bei den

HIV⁻ Probanden stieg der Anteil an apoptotischen T-Lymphozyten nach Konsum von Fruchtsäften an, jedoch nicht nach Konsum des Obst-Gemüsesaft-Konzentrats. Bei den HIV⁺ Probanden blieb die T-Zell-Apoptose in beiden Gruppen unverändert. Da mit den Fruchtsäften mehr Polyphenole aufgenommen wurden als mit dem Obst-Gemüsesaft-Konzentrat, aber vergleichsweise weniger antioxidative Vitamine, wird die apoptosestimulierende Wirkung den Polyphenolen zugeschrieben. Dass bei den HIV⁺ Probanden nach Konsum von Fruchtsaft die apoptosestimulierende Wirkung nicht auftrat, könnte damit zu erklären sein, dass die Apoptose zu allen Untersuchungsterminen allein durch den HIV-Status stark erhöht war (WINKLER et al., 2003). In einer Studie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung zur immunmodulierenden Wirkung eines regelmäßigen Verzehrs von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein oder rotem Traubensaft wurden auch Apoptosemessungen an Lymphozyten durchgeführt. Veränderungen wurden in dieser Studie nicht beobachtet (WATZL et al., 2003).

2.5.2 Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf die Phagozytose

Untersuchungen von PRUZANSKI et al. (1983) zur Wirkung von Quercetin, Rutin und Rutosid auf die Phagozytose von humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* haben gezeigt, dass der Anteil phagozytischer Zellen und die Phagozytoseaktivität nur durch Rutin in Konzentrationen $\geq 1,5$ mM gehemmt wird. Derartige Untersuchungen wurden mit humanen Monozyten bisher nicht durchgeführt. Bei U 937 Zellen, einer humanen promonozytären Zelllinie, wurde eine Zunahme beim Anteil phagozytischer Zellen durch Quercetin und Resveratrol in Konzentrationen von 10 μ M, eine Reduktion durch Resveratrol bei 1 μ M beobachtet (BERTELLI et al., 1999).

Im Rahmen einer Interventionsstudie wurde kürzlich die Wirkung eines einmaligen Verzehrs von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein oder rotem Traubensaft auf die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an gesunden Nichtrauchern *ex vivo* untersucht. Von jedem Getränk wurden 500 mL verabreicht. Bestimmt wurde die Phagozytoseaktivität sowie der Anteil phagozytischer Monozyten und Granulozyten vor, 1, 3, und 24 Stunden nach der Intervention. Veränderungen wurden in keiner Gruppe beobachtet (WATZL et al., 2002). Auch nach 2-wöchigem, täglichem Konsum derselben Mengen o.g. Getränke wurde kein Einfluss auf die Phagozytose von Granulozyten und Monozyten festgestellt (WATZL et al., 2003).

2.5.3 Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst

Die Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst wird intensiv untersucht. Allerdings liegen zu dieser Fragestellung bisher nur *in vitro* Studien vor, die fast ausschließlich mit isolierten Polyphenolen, d.h. in Form von Reinsubstanzen, durchgeführt wurden.

Als Indikator für den Respiratory Burst wurde in diesen Studien die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), der Sauerstoffverbrauch oder die Aktivität burstspezifischer Enzyme bei humanen neutrophilen Granulozyten bestimmt. Mit Ausnahme von LIMASSET et al. (1993), die bei der Mehrzahl der untersuchten Substanzen keinen Effekt auf die Freisetzung von Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) feststellten, wurde in allen anderen Studien eine Hemmung des Respiratory Bursts beobachtet, die mit steigender Konzentration zunahm (Tab. 1). Quercetin, das in nahezu allen Studien eingesetzt wurde, hatte im Vergleich zu anderen Polyphenolen eine starke inhibitorische Wirkung, die bereits bei Konzentrationen von 1 μ M statistisch signifikant war (ZIELIŃSKA et al., 2000, 2001).

In einer weiteren Studie wurde auch eine Inhibition des Respiratory Bursts von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, wenn diese mit einem Polyphenolextrakt aus entöltem Kakao inkubiert wurden (SANBONGI et al., 1997).

Tab. 1: Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst von humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro*.

	Substanz	Konzentration	Parameter	Ergebnis
Busse et al. (1984)	Api, Cat, Fis, Que, Ru, Tax, Tang	0,01–100 μ M 1–10 μ M 15–100 μ M	O ₂ -Verbrauch (Que) ROS-Synthese ^a O ₂ [•] -Freisetzung ^d	↓ O ₂ -Verbrauch Que 100 μ M ↓ ROS-Synthese 10 μ M außer Tang, Que 1 μ M ↓ O ₂ [•] -Freisetzung Que 10 μ M
Tauber et al. (1984)	Fis, Kae, Mor, Que	k. A.	O ₂ -Verbrauch NADPH-Ox.-Akt.	↓ O ₂ -Verbrauch 104-120 μ M (IC ₅₀) außer Mor ↓ NADPH-Ox.Akt. 30-110 μ M (IC ₅₀)
Pagonis et al. (1986)	Fis, Kae, Mor, Que	12,5 –500 μ M	H ₂ O ₂ -Synthese O ₂ [•] -Freisetzung ^d	↓ H ₂ O ₂ -Synthese (50-70 μ M, IC ₅₀) ↓ O ₂ [•] -Freisetzung (12,5-35 μ M, IC ₅₀)
Blackburn et al. (1987)	Que	10–250 μ M	O ₂ [•] -Freisetzung ^d	↓ O ₂ [•] -Freisetzung 80 μ M (IC ₅₀)
Pincemail et al. (1988)	Que u. Derivate	100–1000 μ M	MPO-Akt.	↓ MPO-Akt. 0,1 mM Que
T'Hart et al. (1990)	Cat, Erio Fis, Hes, Kae, Lu, Tax,	10–200 μ M 10.000 μ M	ROS-Synthese ^a O ₂ [•] -Freisetzung ^a	↓ ROS-Synthese (z.T. 10, 50 μ M) ↓ O ₂ [•] -Freisetzung (z. T. 6-22%)
Limasset et al. (1993)	34 Flavonoide u. Derivate	1–10 μ M	ROS-Synthese ^a O ₂ [•] -Freisetzung ^c	↓ ROS-Synthese 1 μ M (fast alle) ∅ O ₂ [•] -Freisetzung (fast alle)
Rotondo et al. (1998)	Resv	0,5–12,5 μ M 1–44 μ M	ROS-Synthese ^a O ₂ [•] -Freisetzung ^d	↓ ROS-Synthese 1 μ M ↓ O ₂ [•] -Freisetzung 2 μ M
Jang et al. (1999)	Resv	6,3–100 μ M	ROS-Synthese ^a	↓ ROS-Synthese 12,5 μ M
Zielińska et al. (2000)	Kae, Que, Irh u. Derivate	1–100 μ M	ROS-Synthese ^a ROS-Synthese ^b	↓ ROS-Synthese 1 μ M (außer Que-glc) ↓ ROS-Synthese 1 μ M Kae-glc, 100 μ M (fast alle)
Zielińska et al. (2001)	Irh-glc, Que, Que-glc	1–100 μ M	ROS-Synthese ^b MPO-Akt. O ₂ [•] -Freisetzung ^d	↓ ROS Synthese 10 μ M Irh-glc, 100 μ M ↓ MPO-Akt. 10 μ M Que, Que-glc ↓ O ₂ [•] -Freisetzung 1 μ M

Die intrazelluläre ROS-Synthese wurde durch die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz (a) oder die Oxidation von 2,7-Dichlorfluoreszein (b) bestimmt. Die H₂O₂-Synthese wurde durch Änderungen des Membranpotentials ermittelt. Die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz (c) bzw. Reduktion von Cytochrom C (d) diente als Parameter für die O₂[•]-Freisetzung. Der O₂-Verbrauch wurde mit der Clark-Elektrode gemessen.

Angegeben ist jeweils die geringste Dosis, die signifikante Veränderungen hervorruft bzw. die IC₅₀-Dosis. Sofern nicht explizit bestimmte Substanzen genannt sind, beziehen sich die Angaben auf alle untersuchten Substanzen.

Api = Apigenin, Cat = Catechin, Erio = Eriodictyol, Fis = Fisetin, Hes = Hesperitin, Irh = Isorhamnetin, Kae = Kaempferol, Lu = Luteolin, Mor = Morin, Que = Quercetin, Resv = Resveratrol, Ru = Rutin, Tang = Tangeritin, Tax = Taxifolin

↓ = Hemmung, ∅ = kein Effekt, glc = Glucosid, IC₅₀ = Dosis, bei der die Wirkung um 50% gegenüber der polyphenolfreien Probe reduziert ist, k. A. = keine Angaben, MPO-Akt. = Aktivität der Myeloperoxidase, NADPH-Ox.-Akt. = Aktivität der NADPH-Oxidase, ROS = reaktive Sauerstoffspezies

In vitro Studien von MERFORT et al. (1996) haben gezeigt, dass Phenolsäuren, die bei der Fermentation von Flavonoiden im Kolon entstehen können, in Konzentrationen von 0,5 μM (teilweise sogar bei 0,25 μM) die ROS-Synthese von aktivierten neutrophilen Granulozyten des Menschen hemmen. Diese Beobachtung wird von LIMASSET et al. (1999), die allerdings nur Konzentrationen von 10 μM einsetzten, bei Messungen der ROS-Synthese bestätigt. Die Freisetzung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ wurde nur durch wenige Phenolsäuren inhibiert (Tab. 2). Die Wirkung der Phenolsäuren auf die Burst-vermittelte ROS-Synthese *in vitro* war bei den Phenolsäuren deutlich schwächer im Vergleich zur Wirkung der Muttersubstanzen.

Tab. 2: Wirkung von Phenolsäuren auf den Respiratory Burst von humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro*.

	Substanz	Konzentration	Parameter	Ergebnis
Merfort et al. (1996)	3 Phenolsäuren ^a	0,25 - 4 μM	ROS-Synthese	↓ ROS-Synthese 0,25 μM (fast alle), 0,5 μM alle
Limasset et al. (1999)	18 Phenolsäuren ^b	10 μM	ROS-Synthese $\text{O}_2^{\bullet-}$ Freisetzung	↓ ROS-Synthese Catechol- und Methoxyverbindungen ∅ $\text{O}_2^{\bullet-}$ Freisetzung (fast alle)

Die intrazelluläre ROS-Synthese wurde über die Luminol-verstärkte, die $\text{O}_2^{\bullet-}$ Freisetzung durch die Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz ermittelt. Angegeben ist jeweils die geringste Dosis, bei der ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum polyphenolfreien Ansatz beobachtet wurde.

^a 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure; ^b Derivate der Benzoe-, Phenylelessig-, Phenylpropan- oder Zimtsäurefamilie

↓ = Hemmung, ∅ = kein Effekt, ROS = reaktive Sauerstoffspezies

Zur Wirkung von Polyphenolen auf den Respiratory Burst von humanen Monozyten *in vitro* gibt es bisher nur zwei Untersuchungen, bei denen eine Inhibition durch Catechin (DANIEL et al., 1986) und Resveratrol (JANG et al., 1999) festgestellt wurde (Tab. 3).

Tab. 3: Wirkung von Polyphenolen auf Respiratory Burst von humanen Monozyten *in vitro*.

	Substanz	Konzentration	Parameter	Ergebnis
Daniel et al. (1986); Berg und Daniel (1988)	Cat	6,9 - 880 μM	ROS-Synthese	↓ ROS-Synthese bei allen Konzentrationen
Jang et al. (1999)	Resv	6,3 - 100 μM	ROS-Synthese	↓ ROS-Synthese 12,5 μM

In beiden Studien wurde die Luminol-vermittelte Chemilumineszenz gemessen. Bei Daniel et al. bzw. Berg und Daniel wurden die Zellen nach der Inkubation mit Catechin gewaschen, um Radikalfängereffekte auszuschließen. Die Konzentrationsangaben [$\mu\text{g}/\text{mL}$] wurden in [μM] umgerechnet, eine statistische Auswertung fehlt. Bei Jang et al. ist die geringste Dosis angegeben, die eine statistisch signifikante Veränderung hervorruft.

Cat = Catechin, Resv = Resveratrol, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, ↓ = Hemmung

Da die Polyphenol-induzierte Inhibition des Respiratory Burst auch vom Stimulus abhängig war (BUSSE et al., 1984; PAGONIS et al., 1986; LIMASSET et al., 1993), werden den Polyphenolen unterschiedliche Wirkungsmechanismen zugeschrieben. Neben antioxidativen Effekten, die auf der Radikalfängerwirkung der Polyphenole basieren (PINCEMAIL et al., 1988; ZIELIŃSKA et al., 2000), wird eine direkte Interaktion der Substanzen mit Rezeptoren und Elementen der Signalkaskade, die an der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt sind, diskutiert (ROTONDO et al., 1998). Aufgrund des Nachweises von Quercetin und Morin in spezifischen Granula von humanen neutrophilen Granulozyten könnte die Hemmung des Bursts auf einer Inhibition von funktionell bedeutsamen Oxidasen basieren (PAGONIS et al., 1986). Eine kompetitive Hemmung der Myeloperoxidase durch Quercetin konnten PINCEMAIL et al. (1988) bei humanen Neutrophilen nachweisen. Quercetin hemmt die Phosphorylierung eines 67 kDa-Proteins, dessen Phosphorylierung mit der Aktivierung neutrophiler Granulozyten assoziiert sein könnte (BLACKBURN et al., 1987). In Bezug auf antiinflammatorische Effekte wird der Modulation des Eicosanoidstoffwechsels durch Hemmung von Lipoxygenase und Cyclooxygenase eine wesentliche Bedeutung beigemessen (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1992; FORMICA und REGELSON, 1995; ROBAK und GRYGLEWSKI, 1996; MIDDLETON, 1998; NIJVELDT et al., 2001).

2.6 Rotwein als Polyphenolquelle

2.6.1 Polyphenole im Rotwein

Rotwein zeichnet sich durch eine Vielfalt biologisch bedeutsamer phenolischer Verbindungen aus, die während der Fermentation – begünstigt durch das leicht saure, alkoholische Milieu – aus Schale, Kern und Stielen, aber auch aus Holzfässern extrahiert werden (SOLEAS et al., 1997a). Mengenmäßig bedeutsam sind im Rotwein die Flavanole, zu denen Catechin, Epicatechin, Proanthocyanidine und kondensierte Tannine zählen (WATERHOUSE und TEISSEDRE, 1997). In hoher Konzentration liegen auch Anthocyanidine wie Malvidin, Cyanidin, Peonidin, Petunidin und Delphinidin vor (MATTIVI et al., 2002; WATERHOUSE, 2002). Der Anteil der anderen Flavonoide ist vergleichsweise gering (WATERHOUSE und TEISSEDRE, 1997). Zu den Nicht-Flavonoiden im Rotwein gehören Derivate der Benzoessäure, Hydroxyzimtsäure und der Stilbene (z.B. Resveratrol). Die Flavanole liegen im Rotwein frei, Epicatechin als Gallatester und Anthocyanidine in glykosidischer Form als Anthocyane vor (WATERHOUSE, 2002).

2.6.2 Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Rotwein

– Bioverfügbarkeit nach einmaligem Konsum

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus nativem und entalkoholisierem Rotwein nach einmaligem Konsum wurde bereits in mehreren Studien mit gesunden Probanden untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Konzentration verschiedener Polyphenole im Plasma nach einmaligem Konsum von Rotwein oder entalkoholisierem Rotwein.

	Intervention	Substanz	Aufnahme	C _{basal}	C _{max}	t _{max}
Donovan et al. (1999)	120 mL RW 120 mL ERW	Cat	34 mg (RW) 35 mg (ERW)	< 2 nM	91 nM (RW) 81 nM (ERW)	1 h
Abu-Amsha Caccetta et al. (2000)	5 mg/kg KG RW 5 mg/kg KG ERW	K, MG G, PC		38 nM ^K 10 nM ^{MG}	84 nM (RW) ^K 91 nM (ERW) ^K 176 nM (RW) ^{MG} 184 nM (ERW) ^{MG}	1-4 h
Bell et al. (2000)	120 mL RW 120 mL ERW	Cat	35 mg	≤ 2 nM	75 nM (RW) 78 nM (ERW)	1,4 h
Bub et al. (2001)	500 mL RW 500 mL ERW	Mal-3-glc	68 mg (RW) 58 mg (ERW)	k. A.	1,38 nM (RW) 1,41 nM (ERW)	50 min (RW) 90 min (ERW)
Simonetti et al. (2001)	100 mL RW 200 mL RW 300 mL RW	K	k. A.	n. n.	6,6 nM (100 mL) 17,9 nM (200 mL) 27,2 nM (300 mL)	1 h
Frank et al. (2003)	400 mL RW	Mal-3-glc Del-3-glc Peo-3-glc Pet-3-glc Cy-3-glc	130,7 mg 49,8 mg 83,2 mg 16,8 mg 3,1 mg	k. A.	38 nM n. n. 27 nM 24 nM n. n.	1,5 h n. n. 1,5 h 1,5 h n. n.

Bei Donovan et al. und Bell et al. wurde Rotwein entalkoholisiert und einem Teil Ethanol zugesetzt; bei den anderen Studien wurde nativer RW verwendet. Die Proben wurden mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert. Die Angaben von Simonetti et al. und Frank et al. [ng/mL] wurden in [nM] umgerechnet. Die basale Catechinkonzentration bei Abu-Amsha Caccetta et al. sowie die maximale Konzentration von Malvidin-3-glucosid im Plasma nach Konsum von ERW (Bub et al.) wurde aus Abbildungen geschätzt.

C_{basal} = basale Konzentration, C_{max} = maximale Konzentration, t_{max} = Dauer bis Erreichen von C_{max}, Cat = Catechin, G = Gallussäure, K = Kaffeesäure, MG = 4'-O-Methylgallussäure, Mal-3-glc = Malvidin-3-glucosid, PC = Protocatechussäure, Del-3-glc = Delphinidin-3-glucosid, Peo-3-glc = Peonidin-3-glucosid, Pet-3-glc = Petunidin-3-glucosid, Cy-3-glc = Cyanidin-3-glucosid, RW = Rotwein, ERW = entalkoholisierter Rotwein, KG = Körpergewicht, k. A. = keine Angaben, h = Stunde, min = Minute, n. n. = nicht nachweisbar

Die Übersicht in Tab. 4 zeigt, dass die Konzentration von Catechin (DONOVAN et al., 1999; BELL et al., 2000), Malvidin- (BUB et al., 2001; FRANK et al., 2003), Peonidin-, Petunidin-3-glucosid (FRANK et al., 2003) und Kaffeesäure (ABU-AMSHA CACCETTA et al., 2000; SIMONETTI et al., 2001) im Plasma nach Konsum von Rotwein oder entalkoholisiertem Rotwein anstieg. Delphinidin- und Cyanidin-3-glucosid wurden im Plasma nach Konsum von Rotwein nicht nachgewiesen, was bei Cyanidin-3-glucosid durch eine rasche Methylierung zu Peonidin-3-glucosid bedingt sein könnte (FRANK et al., 2003). Gallussäure wird rasch umgesetzt zu 4'-O-Methylgallussäure. Protocatechussäure, die mit nativem und entalkoholisiertem Rotwein nur in geringen Mengen aufgenommen wurde, konnte nicht im Plasma detektiert werden (ABU-AMSHA CACCETTA et al., 2000). Die maximale Konzentration wurde bei den meisten Studien 1-1,5 Stunden nach Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein erreicht. Der Kaffeesäurespiegel im Plasma korrelierte mit der aufgenommenen Menge Rotwein (SIMONETTI et al., 2001).

Ethanol hatte keinen Einfluss auf die Absorption von Catechin (DONOVAN et al., 1999; BELL et al., 2000), Kaffee- und Gallussäure (ABU-AMSHA CACCETTA et al., 2000). Auch wenn die maximale Konzentration von Malvidin-3-glucosid im Plasma nach Aufnahme von nativem und entalkoholisiertem Rotwein nicht verschieden war, deutet die kürzere Dauer bis zum Erreichen der maximalen Konzentration von Malvidin-3-glucosid auf eine beschleunigte Absorption durch den Alkohol hin (BUB et al., 2001). Auch die Ergebnisse von FRANK et al. (2003), die die Bioverfügbarkeit verschiedener Anthocyanidin-3-glucoside aus Rotwein und rotem Traubensaft untersuchten, sprechen für eine absorptionsfördernde Wirkung des Alkohols.

Catechin lag im Plasma zu 98% konjugiert, d.h. in Form von Sulfaten, Glucuroniden und Glucuronidsulfaten, vor; 20% des gesamten Catechins war methyliert (DONOVAN et al., 1999). Konjugierte Metabolite von Malvidin-3-glucosid traten im Plasma nicht auf (BUB et al., 2001).

Die geringere Halbwertszeit von Catechin im Plasma nach Konsum von alkohol- gegenüber wasserangereichertem, entalkoholisiertem Rotwein deutet darauf hin, dass Ethanol die Exkretion oder Methylierung von Catechin beschleunigt (BELL et al., 2000). Bei den konjugierten Metaboliten des Catechin handelt es sich um polare Verbindungen, die wahrscheinlich mit der Galle ausgeschieden und über den enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert werden können (DONOVAN et al., 1999). Hierzu wurden bisher jedoch noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Anthocyanidin-3-glucoside (Malvidin-, Peonidin-, Petunidin-, Dephinidin- und Cyanidin-3-glucosid) wurden im Urin nach Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein nachgewiesen (BUB et al., 2001; FRANK et al., 2003). Von der aufgenommenen Menge mit den Getränken wurden bei Malvidin-3-glucosid nach 6 Stunden weniger als 0,03% (BUB et al., 2001), bei allen Anthocyanidin-3-glucosiden nach 7 Stunden im Durchschnitt 0,18% (FRANK et al., 2003) im Urin nachgewiesen.

– Bioverfügbarkeit nach wiederholtem Konsum

Untersuchungen von DE VRIES et al. (2001) haben gezeigt, dass der tägliche Konsum von 750 mL Rotwein nach 3 Tagen bei einer flavonoidarmen Kost zu einem Konzentrationsanstieg von Quercetin (26 ± 10 nM vs. 10 ± 3 nM) und Isorhamnetin (9 ± 6 nM vs. 3 ± 3 nM) im Plasma führt. Der Plasmaspiegel von Kämpferol blieb unverändert (3 ± 3 nM vs. 3 ± 3 nM). Die renale Ausscheidung von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin, gemessen im 24-Stunden-Urin, war am letzten Tag der Intervention höher als am Tag vor der Intervention. Von der supplementierten Menge wurden insgesamt nur 0,8% mit dem Urin ausgeschieden.

3 Zielsetzung

In den vorliegenden Interventionsstudien sollten bei gesunden Probanden folgende Fragen untersucht werden:

- Führt eine *einmalige* nutritive Polyphenolaufnahme durch Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein zu Veränderungen bei redoxsensitiven Immunfunktionen (T-Zell-Apoptose, Phagozytose, Respiratory Burst von Granulozyten und Monozyten)?
- Führt eine *regelmäßige* nutritive Polyphenolaufnahme durch Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein zu Veränderungen bei o.g. redoxsensitiven Immunfunktionen?
- Hat der Konsum entalkoholisierten Rotweins dieselben Effekte wie nativen Rotweins? Welche Rolle spielt der Alkohol im Rotwein?

4 Material und Methoden

Die Wirkung von Rotweinkonsum auf ausgewählte redoxsensitive Immunfunktionen wurde im Rahmen einer Humanstudie untersucht, die in zwei Teiluntersuchungen durchgeführt wurde. Eine Kurzzeitstudie sollte die unmittelbare Immunreaktion nach Rotweinkonsum zeigen. Mit einer Langzeitstudie sollte untersucht werden, ob sich durch den regelmäßigen Konsum von Rotwein oben genannte Parameter verändern.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Sitzung vom 29.03.2001 geprüft und genehmigt. Es entsprach den Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki, 1989; (BUNDES-ÄRZTEKAMMER, 1991)) sowie den EU-Richtlinien der „Good Clinical Practice“.

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik der Universität Bonn durchgeführt. Hier erfolgten die Blutentnahmen unter Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Spengler, der diese Studie als Prüfarzt betreute.

4.1 Studiendesign

Kurz- und Langzeitstudie wurden als dreiarmlige Studie durchgeführt. Für den Parallelgruppenvergleich wurden die Probanden durch Randomisierung auf die drei Gruppen Rotwein (RW), entalkoholisierter Rotwein (ERW) und Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Randomisierung erfolgte mit Hilfe von Zufallstabellen. Beide Studien wurden monozentrisch und prospektiv durchgeführt.

4.2 Probanden

Die Probanden wurden in universitären und studentischen Einrichtungen (Mensa, Wohnheime) durch Aushänge und Ankündigungen im elektronischen Newsletter der Universität rekrutiert. Zusätzlich wurden Probanden über eine Annonce in einer lokalen Tageszeitung gewonnen.

An der Studie konnten nur gesunde Erwachsene teilnehmen. Mit Hilfe eines Fragebogens wurde der Gesundheitsstatus der Probanden überprüft. Die Angaben hierzu basierten auf der persönlichen Einschätzung der Probanden. In diesem Fragebogen wurden darüber hinaus die Einnahme von Medikamenten, der Konsum von Genussmitteln, Drogen, Zigarettenkonsum, Nahrungsergänzungsmitteln und die sportliche Aktivität erfasst.

Die Probanden mussten folgende **Einschlusskriterien** erfüllen:

- Alter: 18-50 Jahre
- Body Mass Index (BMI) < 30 kg/m²
- Schriftliche Einverständniserklärung

Folgende Kriterien galten als **Ausschlusskriterien**:

- Schwangerschaft (auch wahrscheinliche Schwangerschaft), Stillzeit
- Erkrankungen der Leber, der Bauchspeicheldrüse, des Magen-Darm-Trakts sowie Nierenfunktionsstörungen
- Hyperlipoproteinämien, Hyperurikämie, Gicht, Diabetes mellitus
- Autoimmunerkrankungen
- Akute Infektionskrankheit
- Essstörungen
- Hühnereiweißallergie
- (frühere) Alkoholabhängigkeit
- Konsum von BTMG-pflichtigen oder bewusstseinsverändernden Drogen
- Nikotinabusus
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten, die Immunstatus oder antioxidative Kapazität im Plasma beeinflussen (z.B. entzündungshemmende Medikamente, einschließlich cortisonhaltiger Präparate, Immunstimulantien) oder durch Wechselwirkungen mit Alkohol Nebenwirkungen hervorrufen
- Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (z.B. Multivitaminpräparate, Fischöl- und Rotweinkapseln, Bioaktivkonzentrate)
- Hochleistungssportler (> 8 Stunden Sport/Woche)
- Andere Gründe, durch die die Teilnahme nach Ansicht des Prüfarztes nicht möglich ist
- Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung gleichzeitig oder innerhalb der letzten 30 Tage

Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über den jeweiligen Studienablauf und mögliche Risiken informiert. Bei den Informationsveranstaltungen stand ein Arzt für medizinische Fragen zur Verfügung. Frauen, die regelmäßig orale Kontrazeptiva einnahmen, mussten dies schriftlich erklären. Andernfalls wurde zu Studienbeginn ein Schwangerschaftstest durchgeführt, um eine Schwangerschaft sicher auszuschließen.

4.3 Fallzahlabeschätzung

Die Fallzahl wurde vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universitätsklinik Bonn mit Hilfe der Software SAS System berechnet. In der Annahme, dass die Funktion immunkompetenter Zellen wesentlich vom antioxidativen Status beeinflusst wird, wurde die antioxidative Kapazität im Plasma als Hauptzielgröße betrachtet. Die Fallzahlabeschätzung basierte auf Daten zur antioxidativen Kapazität im Plasma gesunder Probanden, die bei einer früheren Interventionsstudie erhoben wurden (ARENDDT et al., 2001).

a) Kurzzeitstudie

Basierend auf den Daten des Kurzzeitversuches der Fruchtsaftstudie, bei der die mittlere Standardabweichung für die Differenz der TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)-Werte zwischen zwei Messterminen 0,033 mM betrug, wurde eine Fallzahl von 6 Probanden pro Gruppe ermittelt (RW, ERW, Kontrolle). Hierbei wird eine Änderung der antioxidativen Kapazität von mehr als 0,033 mM mit einer Power von mehr als 90 % angezeigt.

Zur Auswertung mit nichtparametrischen Tests ist eine Fallzahl von $n \geq 7$ erforderlich. Um die Auswertung auch im Fall eines Ausscheidens einzelner Probanden oder bei Probenverlust zu gewährleisten, wurde eine Probandenanzahl von 9 Personen pro Gruppe angestrebt.

b) Langzeitstudie

Die mittlere Standardabweichung für die Differenz der TEAC-Werte zwischen zwei Messterminen betrug 0,075 mM. Ein Unterschied in der Änderung des TEAC von mehr als 0,075 mM wurde als klinisch relevant eingestuft. Eine Probandenanzahl von 25 Personen pro Gruppe (RW, ERW, Kontrolle) kann einen Unterschied in der Veränderung der antioxidativen Kapazität von 0,075 mM mit einer Power von mehr als 90 % zeigen.

Der Unterschied zwischen zwei Gruppen wird mit einer Power von mehr als 90 % angezeigt. Im Gesamttestverfahren liegt die Power bei 90 %, wenn sich die Wirkung der beiden Studiengetränke Rotwein und entalkoholisierter Rotwein von der Kontrollgruppe unterscheidet.

4.4 Intervention

4.4.1 Kurzzeitstudie

An der Kurzzeitstudie nahmen 27 Probanden teil, von denen jeweils 9 einmalig 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisierten Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrollgruppe) aufnahmen. Wegen der potentiell gesundheitsschädlichen Wirkung des Alkohols sollte der Rotwein in Mengen gegeben werden, die auch bei längerfristiger Aufnahme als unbedenklich angesehen werden. Dazu gibt es bisher keinen internationalen Konsens. Die von verschiedenen nationalen Gesellschaften für Ernährung festgelegten Schwellenwerte liegen für Männer zwischen 20 und 48 g (D-A-CH, (2000); United States Department of Agriculture, (2000); Australian Nutrition Foundation (2000)), für Frauen bei der Hälfte der für Männer genannten Mengen. Damit liegt die Zufuhr von 24,6 g Alkohol mit 200 mL Rotwein bei Männern innerhalb dieser Spanne, bei Frauen an der oberen Grenze. Da diese Mengen einen jahrzehnte langen Verzehr unterstellen, ist der Konsum von 200 mL Rotwein bei Frauen nicht als bedenklich anzusehen. In der Annahme, dass sich entalkoholisierter und nativer Rotwein (Ethanolgehalt 12,5%) durch den Alkohol unterscheidet, wurden 175 mL entalkoholisierter Rotwein gegeben, um dadurch eine vergleichbare Menge an Polyphenolen wie in 200 mL Rotwein zuzuführen.

Bei dieser Studie wurden 3 Blutentnahmen durchgeführt: vor Beginn sowie 90 und 360 min nach der Intervention. Es sollte überprüft werden, ob zu einem Zeitpunkt, bei dem die Konzentration der Polyphenole im Plasma nach Konsum von nativem und entalkoholisiertem Rotwein in anderen Studien maximal war (s. Tab. 4) und antioxidative Effekte im Plasma nachweisbar waren¹, redoxsensitive Immunfunktionen beeinflusst werden. Die Blutentnahme nach 360 min sollte zeigen, ob zu einem späteren Zeitpunkt, bei dem in anderen Studien die Konzentration der Polyphenole sowie antioxidative Effekte im Plasma nicht mehr gegenüber dem Ausgangswert erhöht waren, Veränderungen bei redoxsensitiven Immunfunktionen messbar sind, bedingt durch eine potentielle zelluläre Akkumulation der Polyphenole.

Die Probanden wurden angewiesen, am Vortag auf polyphenolreiche Lebensmittel zu verzichten, um mögliche Störeinflüsse durch eine Retention von Polyphenolen ausschließen zu können. Hierzu erhielten sie eine Liste mit polyphenolreichen Lebensmitteln, die gemieden

¹ Max. antioxidative Wirkung innerhalb 90 min nach Verzehr von RW, ERW oder RW-Extrakt, nach 2-4 h Baseline erreicht (WHITEHEAD et al., 1995; CAO et al., 1998; DUTHIE et al., 1998; SERAFINI et al., 1998, 2000; SIMONETTI et al., 2001).

werden sollten. Auf dieser Liste waren polyphenolarme Lebensmittel aufgeführt, die stattdessen verzehrt werden durften (Anhang A). Ab 20 Uhr des Vorabends durfte nur noch Mineralwasser getrunken werden. Die Einhaltung der diätetischen Restriktionen wurde mit Hilfe eines Ernährungsprotokolls überprüft.

Die Probanden sollten 12 Stunden vor der ersten Blutentnahme auf sportliche Aktivitäten verzichten. Am Morgen des Untersuchungstages waren maximal 0,4 L Mineralwasser erlaubt. Eine Stunde nach der Einnahme des Studiengetränkes konnten sich die Probanden ein Frühstück aus polyphenolarmen Lebensmitteln (Weißbrot, Butter, Wurst, Käse, Honig, Mineralwasser, Milch, Naturjoghurt) zusammenstellen. Zwischen der zweiten und dritten Blutentnahme durften die Probanden die Klinik verlassen. Sie durften in dieser Zeit etwas essen, allerdings waren nur polyphenolarme Lebensmittel erlaubt.

4.4.2 Langzeitstudie

An dieser Studie nahmen 78 Probanden teil. Die Probanden der Gruppe RW nahmen über einen Zeitraum von 6 Wochen täglich 200 mL Rotwein, die Probanden der Gruppe ERW 175 mL entalkoholisierten Rotwein zusätzlich zu ihrer gewohnten Kost auf. Die Teilnehmer der Kontrollgruppe bekamen kein Studiengetränk. Das Studiengetränk sollte etwa 1 Stunde nach der Abendmahlzeit eingenommen werden. Um die Wirkungen einer einmaligen und regelmäßigen Aufnahme von nativem und entalkoholisiertem Rotwein auf redoxsensitive Immunfunktionen vergleichen zu können, wurden dieselben Mengen eingesetzt wie in der Kurzzeitstudie.

Die Interventionsdauer orientierte sich an anderen Studien, bei denen 2–4 Wochen nach wiederholtem Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein oder Rotweinextrakt antioxidative Effekte (FUHRMAN et al., 1995; CARBONNEAU et al., 1997; NIGDIKAR et al., 1998; LEIGHTON et al., 1999; CHOPRA et al., 2000) sowie eine Zunahme des Gesamtphenolgehalts im Plasma (FUHRMAN et al., 1995; NIGDIKAR et al., 1998; LEIGHTON et al., 1999) nachgewiesen wurden und somit nach 4 Wochen Wirkungen durch eine Akkumulation der Polyphenole zu erwarten sind. Aus organisatorischen Gründen wurde die Intervention auf 6 Wochen festgesetzt.

Die Blutentnahmen erfolgten vor und 6 Wochen nach der Intervention. Am Vorabend durften die Probanden ab 20 Uhr nichts mehr essen oder trinken mit Ausnahme von Mineralwasser. Am Morgen vor der Blutentnahme waren maximal zwei Gläser Mineralwasser erlaubt.

Um Einflüsse von anderen polyphenolreichen Lebensmitteln auszuschließen, wurde der Verzehr von Kaffee, schwarzem oder grünem Tee auf maximal zwei Tassen (0,3 L), der Konsum von Fruchtsaft auf maximal zwei Gläser (0,4 L) beschränkt. Alkoholische Getränke (außer dem Studienwein), Multivitamin-, Trauben- und ACE-Säfte durften nicht konsumiert werden. Nahrungsergänzungsmittel und Probiotika waren nicht erlaubt. Diese Restriktionen galten bereits eine Woche vor Studienbeginn bis zum Ende der Intervention. Die Einhaltung der diätetischen Restriktionen wurde durch zwei Ernährungsprotokolle überprüft, die jeweils 7 Tage vor Studienbeginn und in der letzten Interventionswoche geführt wurden und darüber hinaus zur Bestimmung der Polyphenolaufnahme dienten.

4.5 Studiengetränke

Für beide Studien wurde ein 1999er Spätburgunder Marienthaler Klostergarten verwendet, der von der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal/Ahr zur Verfügung gestellt wurde. Ein Teil des Weins wurde von der Firma Carl Jung GmbH, Rüdesheim, mit einem speziellen, kontinuierlich arbeitendem Vakuum-Extraktionsverfahren entalkoholisiert. Die Kontrollgruppe in der Kurzzeitstudie bekam das Mineralwasser "Markus Brunnen" (Vereinte Mineral- und Heilquellen, Rosbach). Die Konzentration an Flavonoiden und phenolischen Säuren sowie der Gesamtphenolgehalt in den Studiengetränken wurde von der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachbereich Weinanalytik und Getränkeforschung, bestimmt. Polyphenolgehalt und -zusammensetzung einer Einzeldosis sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Polyphenolgehalt einer Einzeldosis Rotwein bzw. entalkoholisierten Rotweins.

	Rotwein (200 mL)	Entalkoholisierter Rotwein (175 mL)
Flavonoide	50,4 mg	24,5 mg
-Catechin	26,5 mg	10,8 mg
-Epicatechin	14,4 mg	8,4 mg
-Malvidin ^a	8,5 mg	4,7 mg
-Peonidin ^b	1,0 mg	0,5 mg
Phenolische Säuren	12,4 mg	13,3 mg
-Gallussäure	8,0 mg	9,4 mg
-Kaffeesäure ^c	3,7 mg	3,2 mg
-p-Cumarsäure ^d	0,7 mg	0,8 mg
Gesamtphenole (CÄ)	293,2 mg	271,6 mg

^a aus Malvidin-3-glucosid, ^b aus Peonidin-3-glucosid, ^c aus Caftaräure, ^d aus p-Cumaryl-glycosyl-tartrat
CÄ = Catechinäquivalente

4.6 Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten mit Hilfe des Vacutainer[®]-Systems. Hierzu wurden die Arterien in der Ellenbeuge mit einem Butterfly punktiert und das Blut in Entnahmeröhrchen mit Lithium-Heparin und ohne Antikoagulans überführt. Letztere wurden sofort ins Eiswasserbad gestellt. Die heparinisierten Proben wurden bei Raumtemperatur (RT) dunkel aufbewahrt. Das Serum wurde bei 4 °C abzentrifugiert (1900 × g, 20 min) und zur Herstellung des Kompletmediums verwendet.

4.7 Materialien

Folgende Materialien und Geräte wurden zur Durchführung der Studie benötigt:

Blutentnahme

Butterfly	Abbott, Irland	E633-A05
Luer Adapter	Becton Dickinson (BD), Heidelberg	367300
Röhrchenhalter	BD, Heidelberg	364887
6 mL Entnahmeröhrchen mit Lithium-Heparin LH 145 IE	BD, Heidelberg	368886
6 mL Entnahmeröhrchen ohne Antikoagulans	BD, Heidelberg	367919

Apoptose

– Reagenzien

Biocoll Separating Solution [®]	Biochrom, Berlin	L 6115
RPMI-1640 Medium mit Phenolrot, ohne Glutamin, Dutch Modification	Gibcos [®] Life Technologies, Berlin	22409-015
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Sigma, Deisenhofen	D-8537
Trypan Blue Solution 0,5%ig	Serva, Heidelberg	47285
Phytohemagglutinin-P (PHA-P)	Sigma, Deisenhofen	L-8754
CD3PE	BD, Heidelberg	345765
Annexin V Binding Buffer, 10×	Biozol, Eching	10045-01
Annexin V-FITC	Pharmingen, Heidelberg	556419
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma, Deisenhofen	A-9400
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen	D-8779

– Plastikmaterial

5 mL Falcon [®] Tubes	BD, Heidelberg	352052
PP-Tubes, Cellstar [®] , 15 mL/50 mL	Greiner, Frickenhausen	188.271 / 227.261
Eppendorf Safe Lock 0,5 mL	Eppendorf, Hamburg	0030.121.023
Eppendorf Safe Lock 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg	0030.120.086
Dispenser Tips unsteril 0,5 mL	Brand, Wertheim	702370
Dispenser Tips unsteril 2,5 mL	Nerbe plus, Winsen	07.032.0000
Dispenser Tips unsteril 12,5 mL	Nerbe plus, Winsen	07.052.0000
Serologische Pipetten 10 mL	Greiner, Frickenhausen	607107

– **Geräte**

Zentrifuge Varifuge K	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Absaugsystem SUC-O-MAT	Wisa, Wuppertal
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen
Inkubator IR 1500	ICN Flow, Meckenheim
Lichtmikroskop Typ 787901	Leitz, Wetzlar
Zählkammer Neubauer Improved [®]	Brand, Wertheim

Phagozytose und Respiratory Burst– **Reagenzien**

Phagotest [®]	Orpegen Pharma, Heidelberg	340330 + 340331
Bursttest [®] (Phagoburst [®])	Orpegen Pharma, Heidelberg	340332 + 340333
FACS Lysing solution [®]	BD, Heidelberg	349202
CD14PE	BD, Heidelberg	345785
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma, Deisenhofen	D-8537
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Sigma, Deisenhofen	A 9400
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen	D-8779

– **Plastikmaterial**

5 mL Falcon [®] Tubes	BD, Heidelberg	352052
Dispenser Tips, unsteril, 0,5 mL	Brand, Wertheim	702370

– **Geräte**

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
FACSscan [®]	BD, Heidelberg
Schüttelwasserbad	Kottermann, Ketzle-Hansingen
Membranpumpe	Vacubrand, Wertheim
Vortexer Vortex Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Universal-Flaschendispenser	Brand, Wertheim

Zur flowzytometrischen Untersuchung aller Immunparameter– **Reagenzien**

FACSFlow [®]	BD, Heidelberg	349202
FACSRinse [®]	BD, Heidelberg	340346
Natriumhypochlorit-Lösung	Fluka [®] , Sigma-Aldrich, Taufkirchen	71696
Calibrite [®] 3 Bead	BD, Heidelberg	340486

– **Geräte**

FACSscan [®]	BD, Heidelberg
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Kehlheim

– **Software**

CellQuest [®] Version 3.3	BD, Heidelberg
WinMDI 2.8 [®]	J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA

Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden farblose, FITC-, PE- und 7-AAD-gefärbte Beads eingesetzt, wobei die 7-AAD-gefärbten Beads durch Anfärbung von farblosen Beads gewonnen wurden.

4.8 Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme

- Dokumentation der Nahrungsaufnahme

Die Energie-, Alkohol und Polyphenolaufnahme wurde mit Hilfe eines standardisierten Ernährungsprotokolls (Anhang B) festgehalten. Die Lebensmittel waren nach Produktgruppen (z.B. Brot und Backwaren, Obst, Gemüse) sortiert und darunter einzeln aufgeführt. Zur genauen Erfassung der Polyphenolaufnahme wurden polyphenolreiche Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Fruchtgetränke und Tees detailliert aufgeführt. In der Kategorie Fruchtgetränke wurde zwischen Fruchtsäften, Nektaren und Fruchtsaftgetränken unterschieden. Die verzehrten Mengen wurden von den Probanden geschätzt und in verzehrsüblichen Portionsgrößen angegeben.

- Energie- und Alkoholaufnahme

Die Energie- und Alkoholaufnahme wurde mit der Software DGE-PC-Professional[®] ermittelt. Die Daten zum Energie- und Alkoholgehalt der Lebensmittel bei der Software DGE-PC-Professional[®] basieren auf dem Bundeslebensmittelschlüssel.

- Polyphenolaufnahme

Da weder Ernährungsprogramme noch Nährwerttabellen Angaben zum Phenolsäure- und Flavonoidgehalt von Lebensmitteln enthalten, wurde eine eigene Polyphenoldatenbank erstellt. Als Basis diente die Polyphenoldatenbank einer deutschen Arbeitsgruppe (LINSEISEN et al., 1997; RADTKE et al., 1998), die durch neuere Daten anderer Arbeitsgruppen, z.B. zum Quercetin- und Kämpferolgehalt in Tomatensoße, -suppe, -püree und Ketchup (STEWART et al., 2000), ergänzt wurde. Darüber hinaus wurden die Daten zum Catechin- und Epicatechingehalt in Äpfeln und roten Trauben von einer niederländischen Arbeitsgruppe (ARTS et al., 2000a) in die Polyphenoldatenbank aufgenommen. Diese Daten sind repräsentativ, da bei der Probenauswahl die Sortenvielfalt als auch Verzehr- und Einkaufsgewohnheiten berücksichtigt wurden. Die Daten zum Gehalt von Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin und Gallocatechin in Schwarztee – berechnet als Mittelwert verschiedener Schwarzteesorten – stammen ebenfalls von ARTS et al. (2000b).

Bei der Ermittlung der Polyphenolaufnahme wurden diejenigen Flavonoide und phenolischen Säuren berücksichtigt, die wesentlich zur Polyphenolaufnahme aus Nahrungsmitteln beitragen oder in den Studiengetränken enthalten sind. Als Hauptvertreter der Flavonoide wurden Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Gallocatechin, Cyanidin, Kämpferol, Malvidin, Myricetin, Naringenin, Peonidin, Petunidin und Quercetin ausgewählt. Bei den phenolischen Säuren wurden Kaffee-, Gallus-, Ellag-, Ferula-, p-Cumar-, p-Hydroxybenzoe-, Salizyl- und Syringasäure berücksichtigt.

Diese Daten wurden als Aglykone in mg/kg bzw. mg/L angegeben (Flavonoid- und Phenolsäuredatenbank, Anhang C). Die Mengenangaben aus dem Ernährungsprotokoll wurden in kg bzw. L umgerechnet und mit den Werten der selbst erstellten Datensammlung multipliziert. Bei den 7-Tage-Ernährungsprotokollen wurde die Gesamtsumme durch den Faktor 7 dividiert, um die durchschnittliche Polyphenolaufnahme eines Tages zu ermitteln.

4.9 Apoptose

- Testprinzip

Der flowzytometrische Nachweis apoptotischer Zellen mit Hilfe des Annexinbindungstests geht auf Arbeiten von KOOPMAN et al. (1994) und VERMES et al. (1995) zurück. Der Annexinbindungstest misst *ex vivo* die zellulären Veränderungen in der frühen Phase der Apoptose, die mit der Translokation des Phosphatidylserin von der zytosolischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran einhergehen. Der Nachweis erfolgt durch Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) markiertes Annexin V, ein Ca^{2+} -abhängiges Protein, das mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran ist eine Interaktion zwischen Annexin V und dem zytosolwärts gerichteten Phosphatidylserin nicht möglich (Annexin V⁻ Zellen). Mit dem Verlust der Membranasymmetrie in der frühen Phase der Apoptose bindet Annexin V an extrazellulär gerichtetes Phosphatidylserin (Annexin V⁺ Zellen). Durch Verlust der Membranintegrität kann sich Annexin V auch an zytosolwärts gerichtetes Phosphatidylserin nekrotischer Zellen binden. Nekrotische Zellen sind damit ebenfalls annexinpositiv. Die Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen basiert auf der Anfärbung nekrotischer Zellen mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff, der nur in nekrotische, nicht aber in apoptotische Zellen mit intakter Zellmembran eindringen kann. In Kombination mit FITC-markiertem Annexin V wird der DNA-interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt (VAN ENGELAND et al., 1998).

- Etablierung des Apoptosetests

In Vorversuchen wurde zunächst nach einem geeigneten Apoptoseinduktor gesucht. Wegen des Einsatzes eines phycoerythrin(PE)-konjugierten CD3-Antikörpers zur Markierung von T-Zellen musste ein FITC- und PE-kompatibler DNA-Farbstoff verwendet werden. Die Empfehlungen des Herstellers zur Annexin V-FITC-Färbung wurden ebenfalls überprüft. Das Ziel der Vorversuche bestand darin, die Färbung mit Annexin V-FITC, CD3PE und der DNA zu optimieren.

Bei der Auswahl des Apoptoseinduktors wurde H₂O₂ in unterschiedlichen Konzentrationen (20-200 µM) und Inkubationszeiten (1-3 Stunden) eingesetzt, jedoch keine deutliche Zunahme des Anteils frühapoptotischer Zellen beobachtet. In Anlehnung an MARTÍNEZ-LORENZO et al. (1996), die bei PHA-Konzentrationen von 50 µg/mL eine deutliche Steigerung der Apoptose bei humanen T-Zellen feststellten, wurde PHA als Apoptoseinduktor ausgetestet. Nach einstündiger Inkubation nahm der Anteil vitaler T-Zellen ab (-50%), vor allem zugunsten der frühapoptotischen T-Zellen (+44%). Der Anteil an spätapoptotisch / nekrotischen T-Zellen blieb – trotz einer Zunahme um +6% – gemessen an den Anteilen vitaler und frühapoptotischer Zellen auch unter PHA-Stimulation gering. Die Induktion der Apoptose durch PHA basiert auf einer T-Zell-Rezeptor-vermittelten Hyperaktivierung der Zelle, welche zu einer gesteigerten Sekretion des Fas(CD95)-Liganden führt (MARTÍNEZ-LORENZO et al., 1999). Die Zellen überlebten die PHA-Stimulation nur im serumangereicherten Medium.

Zur Detektion der T-Zellen wurde ein T-zellspezifischer, PE-konjugierter CD3-Antikörper eingesetzt. Die erforderliche Antikörpermenge wurde durch Titration ermittelt. Bereits nach 15 min Inkubation mit 10 µL einer 1:1 (v/v) mit DPBS verdünnten CD3PE-Lösung wurde eine 1 000-fache Anfärbung von CD3⁺ gegenüber CD3⁻ Zellen erreicht, womit eine eindeutige Erkennung von CD3⁺ T-Zellen möglich war. Die Färbung erfolgte bei 4 °C, um falsch negative Ergebnisse infolge von Capping auszuschließen (RADBRUCH, 1994).

Die Zellen wurden vor der Annexinfärbung in 100 µL Annexinpuffer resuspendiert. Bei größeren Mengen des Annexinpuffers nahm die Messdauer durch die Verdünnung der Probe zu, die Färbung blieb unverändert. Mit 5 µL Annexin V-FITC war die Fluoreszenz der Annexin⁺ Zellen im Durchschnitt 1 000-fach höher gegenüber Annexin⁻ Zellen, wodurch Annexin⁺ gegenüber Annexin⁻ Zellen deutlich voneinander unterschieden werden konnten. Da die Fluoreszenz bei Zugabe größerer Annexinmengen nicht anstieg, scheint mit 5 µL Annexin V-FITC eine Sättigung aller potentiellen Bindungsstellen vorzuliegen.

Der DNA-Farbstoff Propidiumiodid konnte wegen der starken Überlappung seines Emissionsspektrums mit dem des Phycoerythrin nicht simultan mit PE-markierten Antikörpern eingesetzt werden. Er wurde durch den PE- und FITC-kompatiblen Farbstoff 7-AAD (SCHMID et al., 1992) ersetzt. In Vorversuchen wurde mit 1 µg 7-AAD - in Anlehnung an HERAULT et al. (1999) und HASPER et al. (2000) - eine Anfärbung der 7-AAD⁺ Zellen um den Faktor 1 000 gegenüber 7-AAD⁻ Zellen erzielt, womit eine sichere Unterscheidung zwischen 7-AAD⁺ und AAD⁻ Zellen gewährleistet ist. Zytotoxische Effekte durch 7-AAD, die zur Anfärbung von frühapoptotischen Zellen führen, sind erst bei 20- bis 200-fach höheren Konzentrationen zu befürchten (HERAULT et al., 1999).

- Durchführung

Vor Studienbeginn wurden verschiedene Stammlösungen hergestellt. 1 mg 7-AAD wurden in 0,2 mL DMSO + 4,8 mL DPBS und 5 mg PHA-P in 5 mL RPMI-1640 Medium gelöst. Die 7-AAD-Stammlösung (200 µg/mL) und PHA-Stammlösung (1 mg/mL) wurden aliquotiert und bei -18 °C gelagert. Trypanblau wurde 1:4 (v/v) mit DPBS verdünnt.

An den Untersuchungstagen wurden aus den Stammlösungen jeweils die Arbeitslösungen hergestellt. Hierzu wurde die 7-AAD-Stammlösung mit RPMI 1640-Medium auf 11 µg/mL verdünnt. Die PHA-Arbeitslösung (100 µg/mL) wurde aus der Stammlösung durch 1:10-Verdünnung mit RPMI gewonnen. Das Annexinpuffer-10-fach Konzentrat wurde 1:10 (v/v) mit Aqua bidest und CD3PE 1:4 (v/v) mit RPMI verdünnt. Das Komplettmedium wurde durch 1:5 (v/v) Verdünnung von autologem Serum mit RPMI hergestellt.

- Gewinnung PBMC

6 mL heparinisiertes Vollblut mit 12 mL DPBS verdünnen und auf 9 mL Biocoll Separating Solution[®] überschichten. Bei $450 \times g$ zentrifugieren 30 min, RT.

Interphase in 15 mL Tube überführen. 2 \times mit 15 mL DPBS waschen ($350 \times g$; $225 \times g$), RT. Überstand dekantieren und Pellet in wenig Medium resuspendieren.

Bestimmung der Zellzahl bei 400-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop. Auszählung von 4 Eckquadranten. Zellsuspension: Einstellen der Zellzahl auf $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ mit Komplettmedium.

- Apoptoseinduktion

50 μL Zellsuspension in Falcon[®] Tubes vorlegen. Zu den Kontrollansätzen 50 μL RPMI, zu den Testansätzen 50 μL PHA-Arbeitslösung zufügen, vortexen. 1 h im Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchte inkubieren.

2 \times waschen mit 2 mL DPBS, jeweils 5 min zentrifugieren bei $350 \times g$ bzw. $225 \times g$, RT. Überstand dekantieren.

- Phänotypisierung

10 μL CD3PE-Arbeitslösung zufügen, vortexen, 15 min dunkel bei 4°C inkubieren.

2 \times waschen mit 2 mL DPBS, 5 min zentrifugieren bei $350 \times g$, RT, Überstand dekantieren.

- Annexin V/7-AAD Färbung

Pellet in 100 μL Annexin-Puffer resuspendieren. 5 μL Annexin V-FITC und 10 μL 7-AAD (11 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zufügen, vortexen, 15 min dunkel bei RT inkubieren. Dann Proben auf Eis stellen.

- Analyse

Sofortige Messung von 5 000 Ereignissen im FACScan[®] bei 488 nm mittels CellQuest[®].

- Auswertung

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit WinMDI 2.8[®]. Der Anteil frühapoptotischer T-Zellen in den unstimulierten Proben (Kontrollansätze) wurde wie in Abb. 1 dargestellt ermittelt. Die Regionen und Quadranten zur Auswertung der Kontrollansätze wurden für die Auswertung der PHA-stimulierten Proben übernommen und entsprechend der Apoptoseanteil bestimmt (Abb. 2). Der Anteil apoptotischer T-Zellen aus dem Kontrollansatz wurde von dem Anteil apoptotischer T-Zellen aus der PHA-stimulierten Probe subtrahiert. Die Differenz spiegelt den Apoptoseanteil bei aktivierten T-Zellen wider.

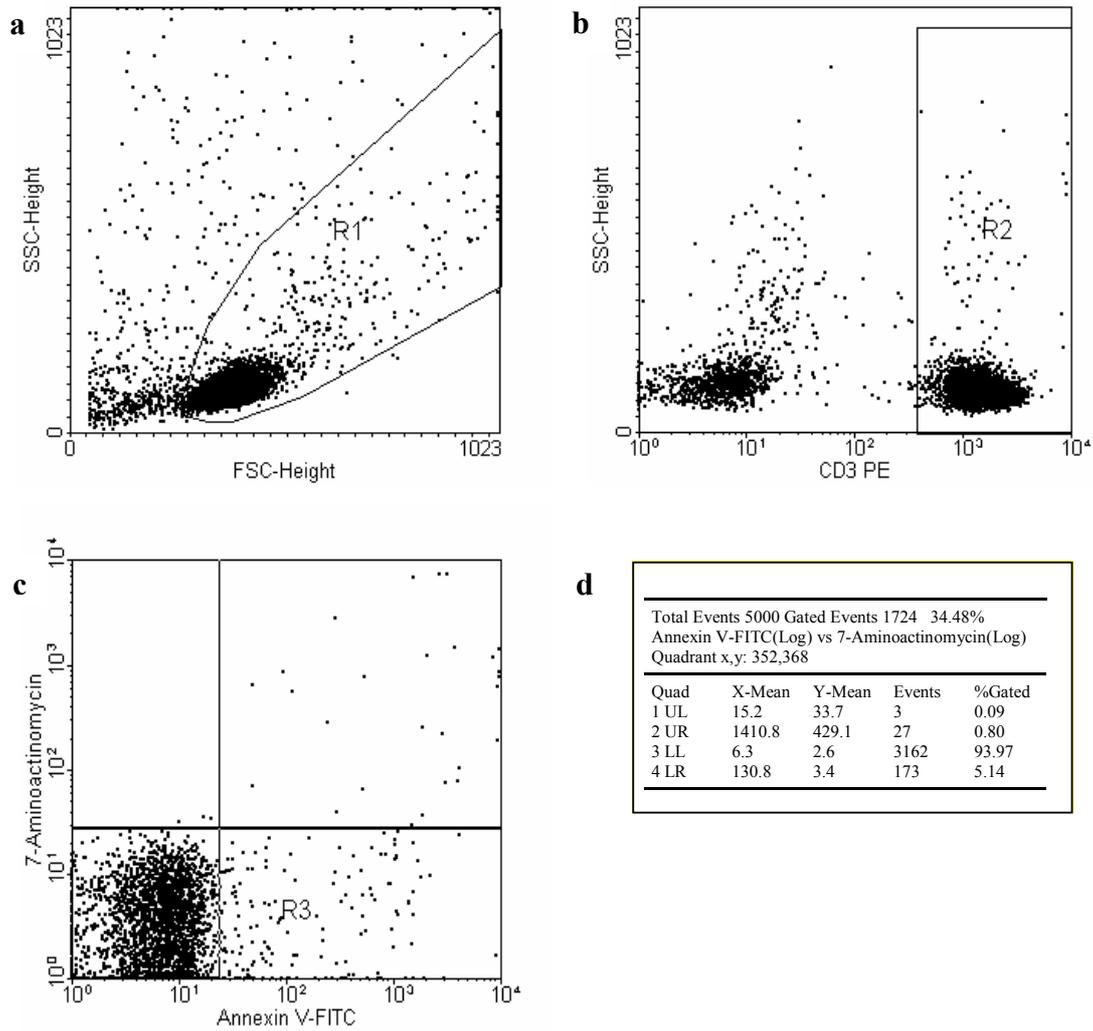


Abb. 1: Auswertung des Kontrollansatzes bei der Apoptosemessung.

Die mononukleären Zellen wurden im Streulichtdiagramm (a) eingegrenzt (R1) und im Dotplot CD3PE/SSC (b) aufgetragen. Die CD3PE⁺ Zellen wurden gegatet (R2) und im Plot Annexin V-FITC/7-AAD (c) einer Quadrantenanalyse unterzogen. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse sind in (d) dargestellt. Der untere linke Quadrant (LL) enthält vitale, der untere rechte (LR) frühapoptotische und der obere rechte (UR) spätapoptotische / nekrotische Zellen. Der Anteil frühapoptotischer T-Lymphozyten berechnet sich aus der Anzahl der Ereignisse im unteren rechten Quadranten, bezogen auf die Gesamtzahl T-Lymphozyten (Summe der Ereignisse aus LL, LR, UR).

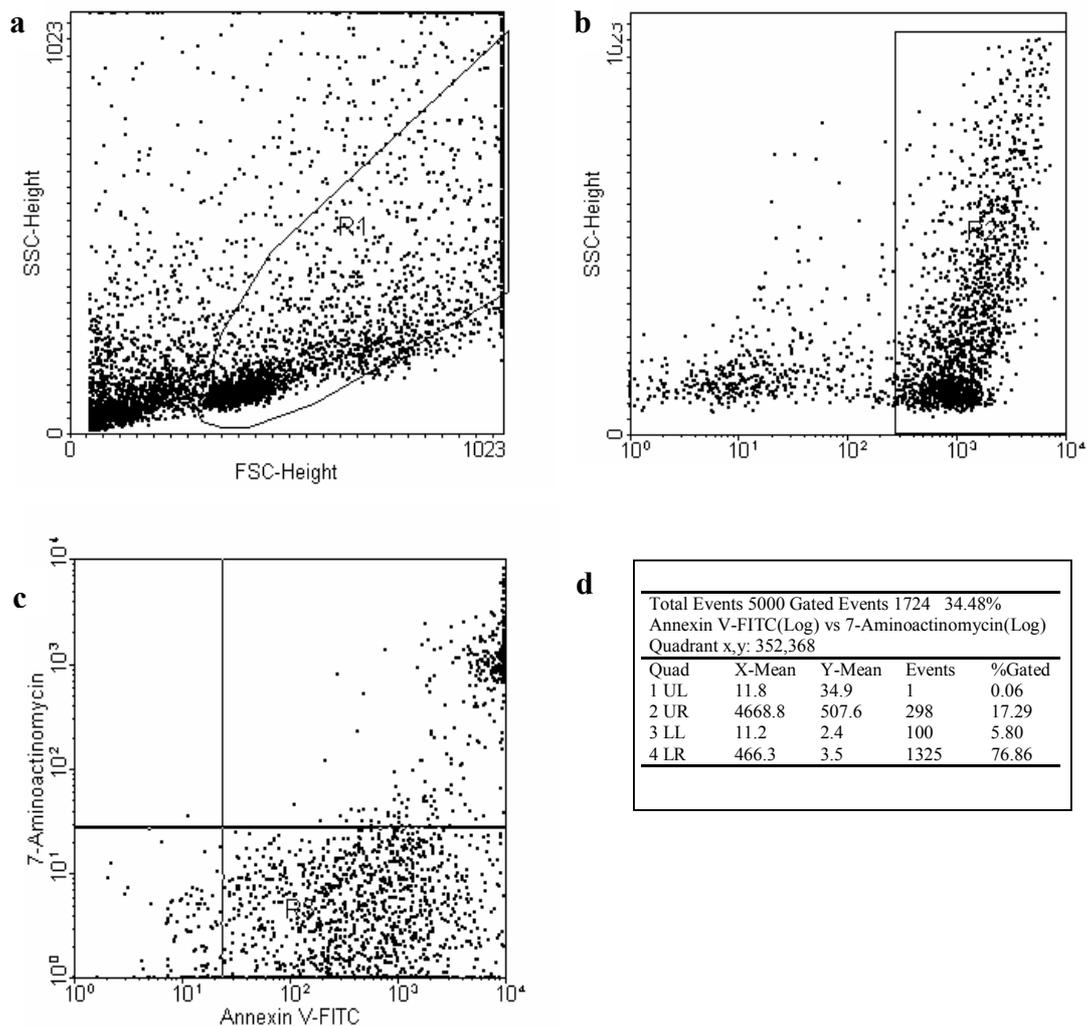


Abb. 2: Auswertung des Testansatzes bei der Apoptosemessung.

Die Regionen R1, R2 sowie der Quadrant werden aus dem Kontrollansatz übernommen. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse sind tabellarisch in (d) dargestellt. Die Berechnung des Prozentsatzes frühapoptotischer Zellen erfolgt wie bei Abb. 1 beschrieben.

4.10 Phagozytose

- Testprinzip

Die Untersuchung der Phagozytose von Granulozyten und Monozyten *ex vivo* wurde mit dem Testkit Phagotest[®] im heparinisierten Vollblut durchgeführt. Als Stimuli dienen hierbei opsonierte, FITC-markierte *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien. Nach Zugabe der Bakterien wird der Testansatz 10 min bei 37 °C inkubiert, während der Kontrollansatz auf Eis stehen bleibt. Danach wird die Phagozytose durch Zugabe von Quenchlösung gestoppt. Damit wird auch die Fluoreszenz von adhären, nicht phagozytierten Bakterien gelöscht, eine Maßnahme, die zwingend erforderlich ist, um falsch positive Signale auszuschließen (HIRT

et al., 1994; NEBE, 1994; CARULLI, 1996; BASSØE et al., 2000; LEHMANN et al., 2000). Die Erythrozyten werden lysiert, die verbleibenden Zellen fixiert. Durch Anfärbung der DNA ist eine sichere Unterscheidung von Bakterienartefakten, Thrombozytenaggregaten, nicht lysierten Erythrozyten und Leukozyten möglich (HIRT et al., 1994; CARULLI, 1996). Anhand der Grünfluoreszenz werden nichtphagozytierende von phagozytierenden Zellen unterschieden. Die Kaltprobe wird mitgeführt zur Bestimmung der Autofluoreszenz und des Anteils an falsch FITC⁺ Zellen.

– Etablierung des Phagozytostests

Bei unverdünntem Einsatz der Bakterien lag der Anteil phagozytischer Zellen bei mehr als 95 %. Um den Spielraum zur Messung einer möglichen Stimulation zu erweitern, wurden die Bakterien 1:4 (v/v) mit DPBS verdünnt, und damit ein Anteil phagozytischer Zellen von 50-70 % erreicht.

Da eine sichere Identifikation phagozytischer Monozyten im Streulichtdiagramm aufgrund der Streulichteigenschaften nicht möglich ist, wurden die Monozyten mit einem monozytenspezifischen CD14PE-Antikörper markiert, eine Maßnahme, die auch von anderen Arbeitsgruppen empfohlen wird (ZELLER et al., 1989; O'GORMAN, 1997; BASSØE et al., 2000). In Vorversuchen wurde bereits mit 10 µL CD14PE (1:1 (v/v) verdünnt in DPBS) eine Anfärbung von CD14⁺ gegenüber CD14⁻ Zellen um den Faktor 1 000 erzielt, wodurch eine sichere Unterscheidung zwischen CD14⁺ und CD14⁻ Zellen möglich ist. Mengen von 20 µL CD14PE (Empfehlung des Herstellers) sind nicht erforderlich und können durch unspezifische Anfärbung CD14⁻ Zellen die Ergebnisse verfälschen (RADBRUCH, 1994).

Der im Testkit enthaltene DNA-Farbstoff PI ist nicht mit PE kompatibel und wurde gegen 7-AAD ausgetauscht. Durch Zugabe von jeweils 5,5 µg 7-AAD ist eine deutliche Anfärbung 7-AAD⁺ Zellen um den Faktor 1 000 gegenüber 7-AAD⁻ möglich und damit eine Unterscheidung zwischen 7-AAD⁺ und 7-AAD⁻ Zellen sichergestellt.

Die Stichprobe wurde auf 25 000 Ereignisse erweitert, um auch bei Proben mit geringem Monozytenanteil aussagefähige Ergebnisse zu erhalten. Als Parameter für die Phagozytoseaktivität wurde der Prozentsatz phagozytischer Granulozyten und Monozyten berechnet. Auf eine Beurteilung der Phagozytoseleistung anhand der mittleren Fluoreszenzintensität wurde wegen einer möglichen Beeinträchtigung der Fluoreszenz von FITC-markierten Bakterien im sauren Milieu des Phagolysosoms (LEHMANN et al., 1998) verzichtet.

– Durchführung

Wasch- und Lyselösung wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst bzw. verdünnt. An jedem Untersuchungstag wurde die 7-AAD-Arbeitslösung (55 µg/mL) aus der Stammlösung hergestellt und sowohl Bakterien als auch CD14PE wurden 1:4 (v/v) mit DPBS verdünnt.

- Aliquotieren

100 µL heparinisiertes Vollblut in ein 5 mL Röhrchen pipettieren und 10 min auf Eis stellen.

- Stimulation

20 µL vorgekühlte *E. coli* zufügen, vortexen. Testansätze 10 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad, die Kontrollansätze stattdessen im Eiswasserbad inkubieren. Anschließend alle Proben auf Eis stellen.

- Fluoreszenzlöschung

Jeweils 100 µL eiskalte Quenchlösung zugeben, vortexen.

- Waschen (2×)

3 mL Waschlösung zufügen, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 × g, 4 °C). Überstand dekantieren.

- Phänotypisierung

Jeweils 10 µL CD14PE-Lösung zugeben, vortexen, 30 min bei 4 °C inkubieren.

- Waschen

2 mL DPBS zugeben, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 × g, 4 °C), Überstand dekantieren.

- Lyse und Fixierung

Je 2 mL Lysing Solution hinzufügen, vortexen und 20 min bei RT inkubieren.

- Waschen (1×)

3 mL Waschlösung zufügen, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 × g, 4 °C). Überstand dekantieren.

- DNA-Färbung

10 µL 7-AAD-Arbeitslösung zugegeben, vortexen, 10 min dunkel im Eiswasserbad inkubieren.

- Messung

Innerhalb von 60 min nach Beendigung des Tests im FACScan[®] bei 488 nm mit CellQuest[®].

– Auswertung

Die Messdaten wurden mit WinMDI 2.8[®] wie in Abb. 3 und Abb. 4 beschrieben ausgewertet. Der Anteil an phagozytierenden Monozyten bzw. Granulozyten in Kontroll- und Testansatz wurde als arithmetisches Mittel bestimmt. Der Anteil phagozytierender Zellen im Kontrollansatz wurde von dem Anteil im Testansatz subtrahiert. Die Differenz ist ein Parameter für die Phagozytoseaktivität der Granulozyten bzw. Monozyten im Vollblut.

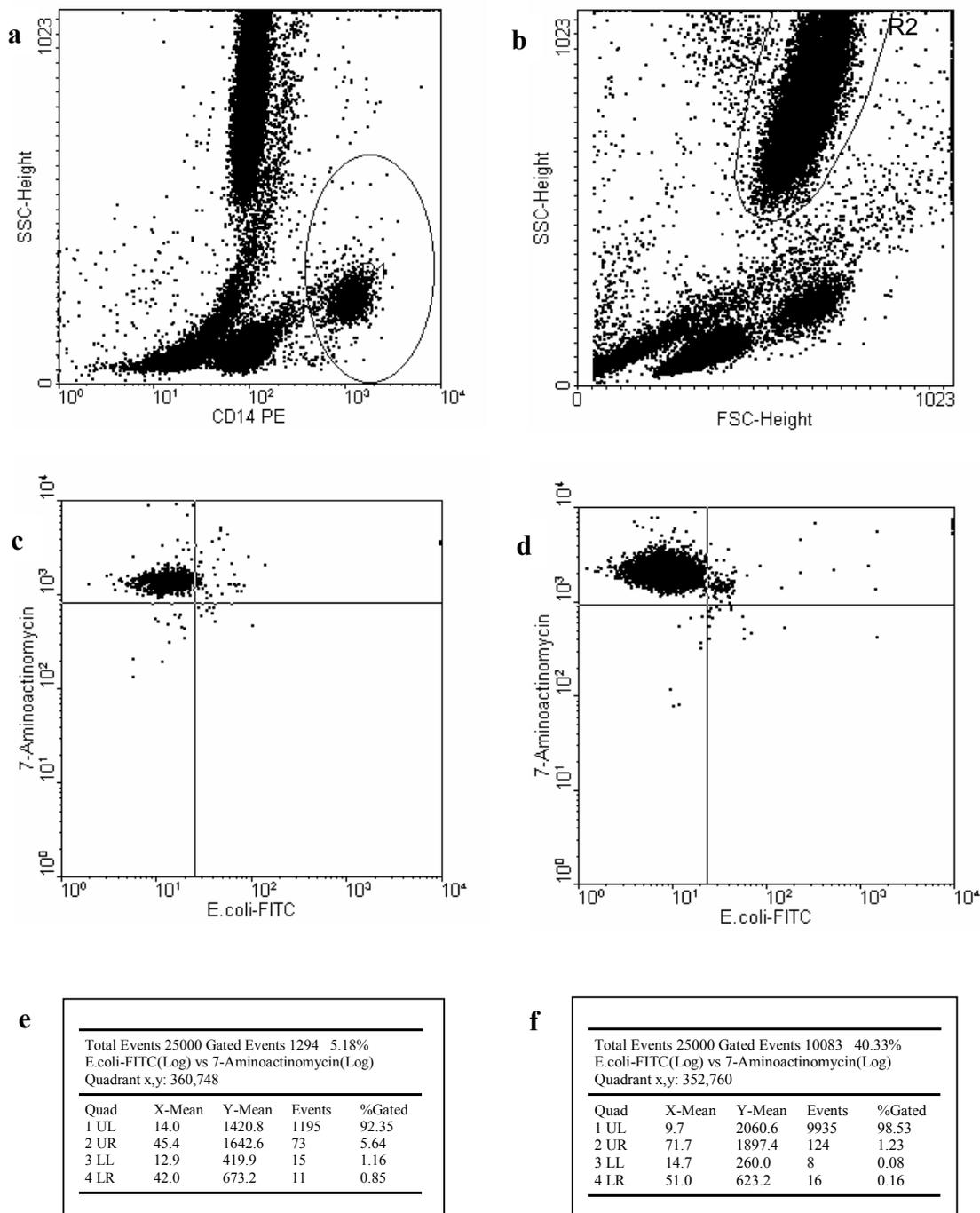


Abb. 3: Auswertung des Kontrollansatzes bei der Phagozytosemessung.

Im Dotplot CD14PE/SSC (a) wurden die Monozyten als CD14⁺ Zellen eingegrenzt (R1). Die Granulozyten wurden im Streulichtdiagramm (b) gated (R2). In den Dotplots E. coli-FITC/7-AAD wurden die Ereignisse aus R1 (c) und aus R2 (d) aufgetragen. Bei der Quadrantenanalyse wurden die FITC⁻ und FITC⁺ Ereignisse einerseits und 7-AAD⁻ und 7-AAD⁺ Ereignisse andererseits abgegrenzt. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse von (c) sind in (e), die aus (d) in (f) dargestellt. Die unteren Quadranten enthalten Bakterien und Debris. Phagozytierende Monozyten bzw. Granulozyten befinden sich im oberen rechten (UR), nicht phagozytierende Zellen im oberen linken Quadranten (UL). Der Anteil an phagozytierenden Zellen wurde aus der Anzahl der Ereignisse in UR, bezogen auf die Summe der Ereignisse aus den Quadranten UL und UR berechnet.

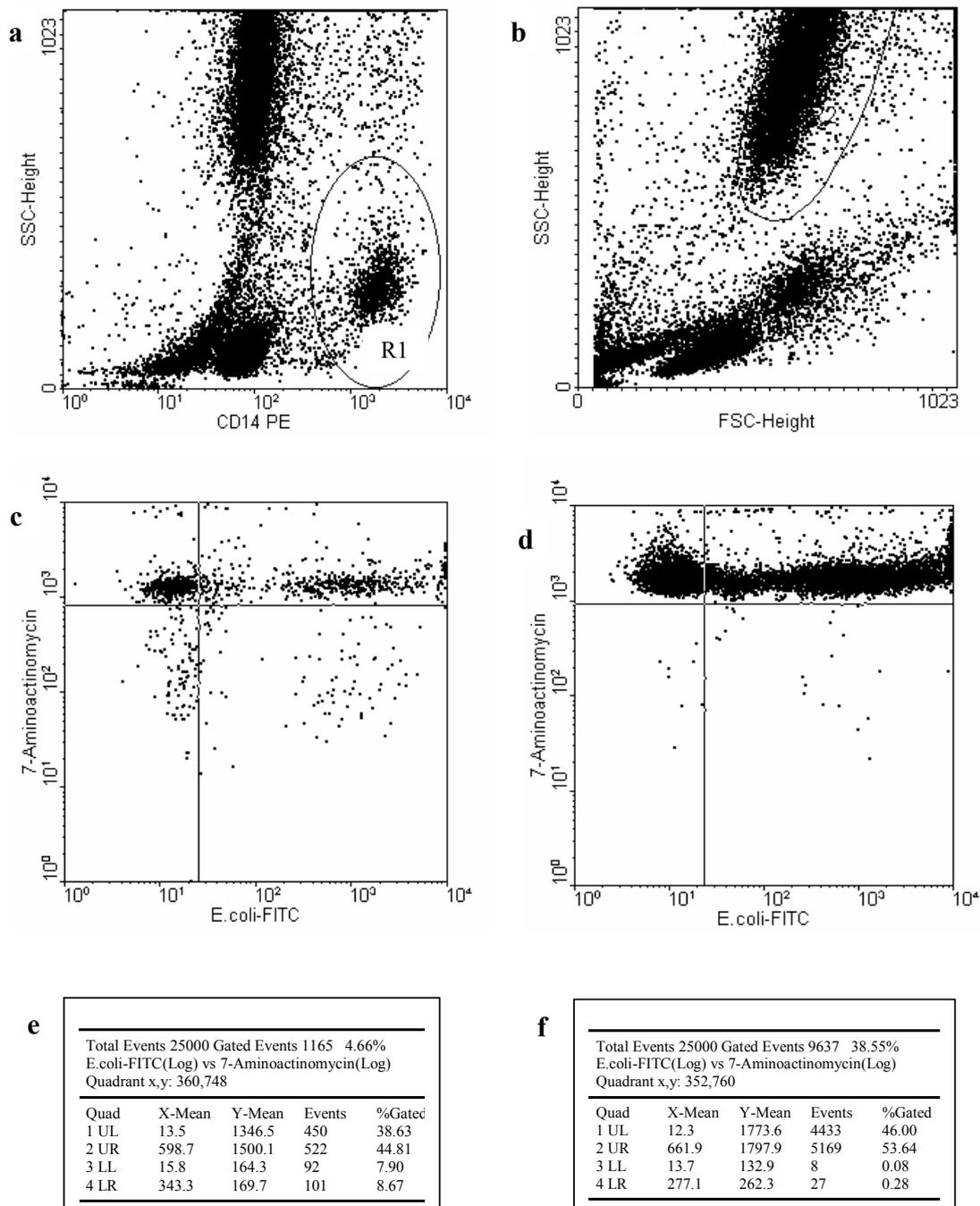


Abb. 4: Auswertung der Warmprobe bei der Phagozytosemessung.

Die Gates R1, R2 sowie die beiden Quadranten wurden aus dem Kontrollansatz übernommen. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse sind tabellarisch in (e) und (f) dargestellt. Die Berechnung des Prozentsatzes phagozytierender Zellen erfolgte wie in Abb. 3 beschrieben.

4.11 Respiratory Burst

- Testprinzip

Die flowzytometrische Untersuchung des Respiratory Burst *ex vivo* wurde mit dem Testkit Burstest[®] unter Verwendung von heparinisiertem Vollblut durchgeführt. Der Respiratory Burst wird durch Zugabe von opsonierten *E. coli*-Bakterien stimuliert. Als Burst-Indikator wird die Bildung des Fluorochroms Rhodamin 123 (R 123) aus dem nicht fluorogenen Substrat Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) herangezogen, die durch intrazelluläres H₂O₂ induziert wird. R 123 ist der sensitivste Marker zum flowzytometrischen Nachweis von ROS bei phagozytierenden Zellen (LEHMANN et al., 1998). Eine unstimulierte Probe wird mitgeführt, um die Autofluoreszenz und den Anteil an R 123⁺ Zellen, die burstunabhängig ROS, z.B. durch Atmungskette, produziert haben, zu ermitteln (Kontrollansatz). Nach Anfärbung der Zellen mit R 123 werden die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert. Durch die DNA-Färbung der Leukozytenkerne können Bakterienartefakte und nicht lysierte Erythrozyten ausgeschlossen werden (HIRT et al., 1994; CARULLI, 1996).

- Etablierung des Bursttests

Da bei unverdünntem Einsatz der Bakterien der Anteil burstaktiver Zellen bei mindestens 95 % lag, und damit der Spielraum für eine mögliche Stimulation sehr eng ist, wurde der Anteil durch Verdünnung der Bakterien um 1:4 (v/v) mit DPBS auf 80 % reduziert. Analog zum Phagotest[®] wurde das Herstellerprotokoll durch Einsatz eines monozytenspezifischen CD14PE-Antikörpers und Austausch des DNA-Farbstoffs PI gegen 7-AAD modifiziert (vgl. Kapitel 4.10). Um auch bei Proben mit einem geringen Monozytenanteil aussagefähige Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils 25 000 Ereignisse anstelle von 15 000 Ereignissen - wie im Protokoll des Herstellers angegeben - gemessen.

- Durchführung

Wasch- und Lyselösung wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gelöst bzw. verdünnt. An jedem Untersuchungstag wurden die *E. coli* Bakterien und CD14PE 1:4 (v/v) mit DPBS verdünnt. Das Substrat wurde in 1 mL Waschlösung gelöst.

- Aliquotieren

100 μ L heparinisiertes Vollblut in ein 5 mL Röhrchen geben und 10 min auf Eis stellen.

- Stimulation

Zu Testansätzen 20 μ L vorgekühlte Bakterien geben, zur Kontrolle stattdessen 20 μ L Waschlösung. Vortexen und 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren. Dann alle Proben auf Eis stellen.

- Oxidation

Zugabe von 20 μ L Substratlösung, vortexen, 10 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubieren.

- Waschen (2 \times)

3 mL Waschlösung zufügen, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 \times g, 4 °C), Überstand dekantieren.

- Phänotypisierung

Jeweils 10 μ L CD14PE-Lösung zugeben, vortexen, 30 min bei 4 °C inkubieren.

- Waschen

2 mL DPBS zugeben, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 \times g, 4 °C). Überstand dekantieren.

- Lyse und Fixierung

Je 2 mL Lysing Solution zufügen, vortexen und 20 min bei RT inkubieren.

- Waschen (1 \times)

3 mL Waschlösung zufügen, vortexen, zentrifugieren (5 min, 250 \times g, 4 °C). Überstand dekantieren.

- DNA-Färbung

10 μ L 7-AAD-Arbeitslösung zufügen, vortexen, 10 min dunkel im Eiswasserbad inkubieren.

- Messung

Innerhalb von 30 min, analog zu den Proben des Phagotests.

- Auswertung

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit WinMDI 2.8. Analog zum Phagotest wurde bei den nichtstimulierten Proben (Kontrollansätze) der Anteil R 123⁺ Granulozyten bzw. Monozyten wie in Abb. 5 beschrieben ermittelt. Diese Regionen und Quadranten wurden für die Auswertung der stimulierten Proben (Testansätze) übernommen und der Anteil R 123⁺ Granulozyten bzw. Monozyten berechnet (Abb. 6). Aus den beiden Test- und Kontrollansätzen wurde der Anteil an R 123⁺ Monozyten bzw. Granulozyten als arithmetisches Mittel bestimmt. Berechnet wurde die Differenz von R 123⁺ Granulozyten bzw. Monozyten aus Test- und Kontrollansatz. Diese spiegelt den Anteil burstaktiver Granulozyten und Monozyten im Vollblut wider.

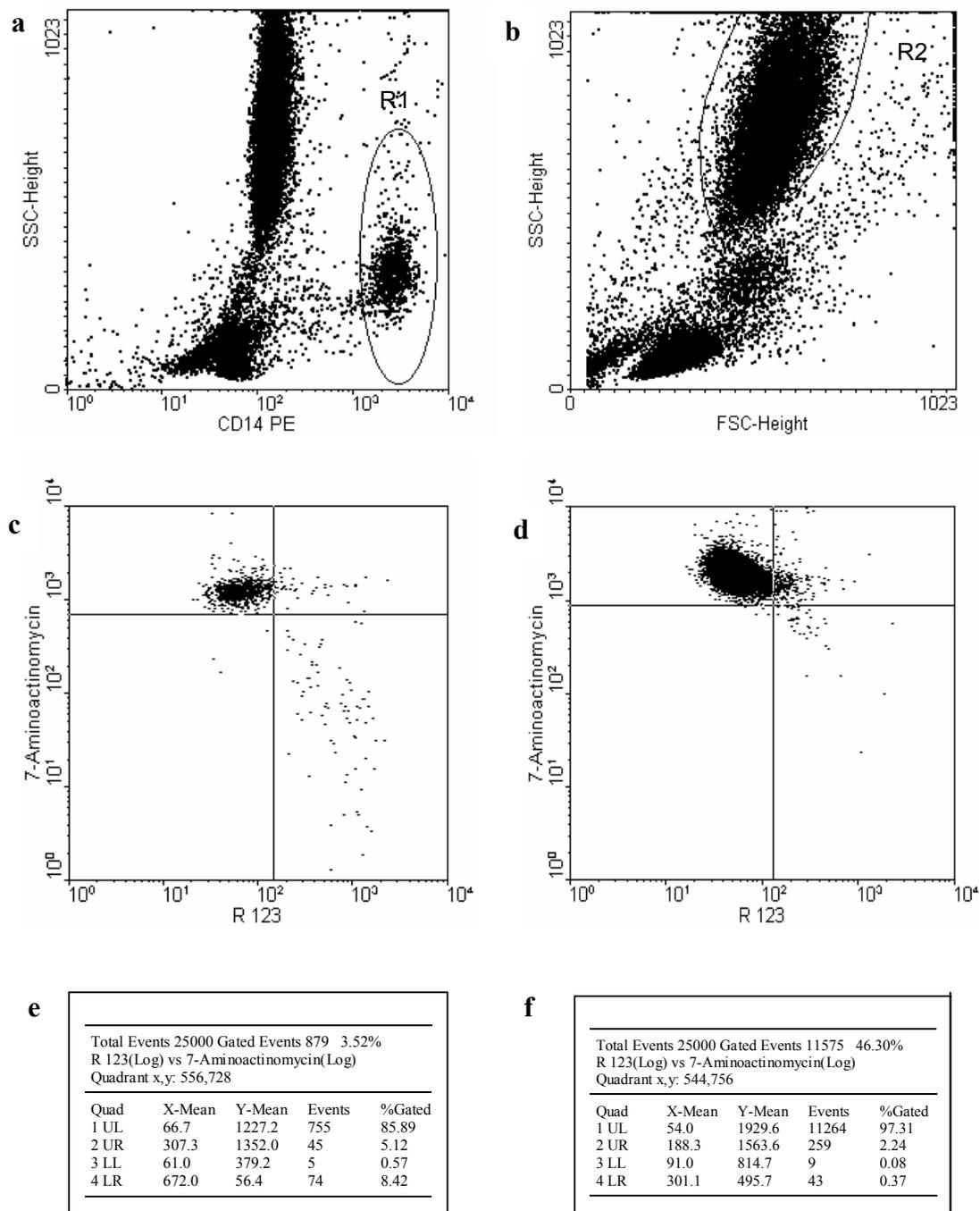


Abb. 5: Auswertung des Kontrollansatzes zur Untersuchung des Respiratory Burst.

Im Dotplot CD14PE vs. SSC (a) wurden die Monozyten als CD14⁺ Ereignisse (R1) und die Granulozyten im Streulichtdiagramm (b) eingegrenzt (R2). In den Dotplots R 123/7-AAD wurden die Ereignisse aus R1 (c) und aus R2 (d) aufgetragen. Bei der Quadrantenanalyse wurden R 123⁻ und R 123⁺ sowie 7-AAD⁻ und 7-AAD⁺ Ereignisse voneinander abgegrenzt. Die Ergebnisse der Quadrantenanalyse von (c) sind in (e), die aus (d) in (f) dargestellt. Der obere linke Quadrant (UL) enthält R 123⁻, der obere rechte Quadrant (UR) R 123⁺ Monozyten bzw. Granulozyten. Der Anteil an R 123⁺ Monozyten bzw. Granulozyten berechnet sich aus der Anzahl der Ereignisse im oberen rechten Quadranten, bezogen auf die Gesamtzahl 7-AAD⁺ Ereignisse (Summe aus UR, UL).

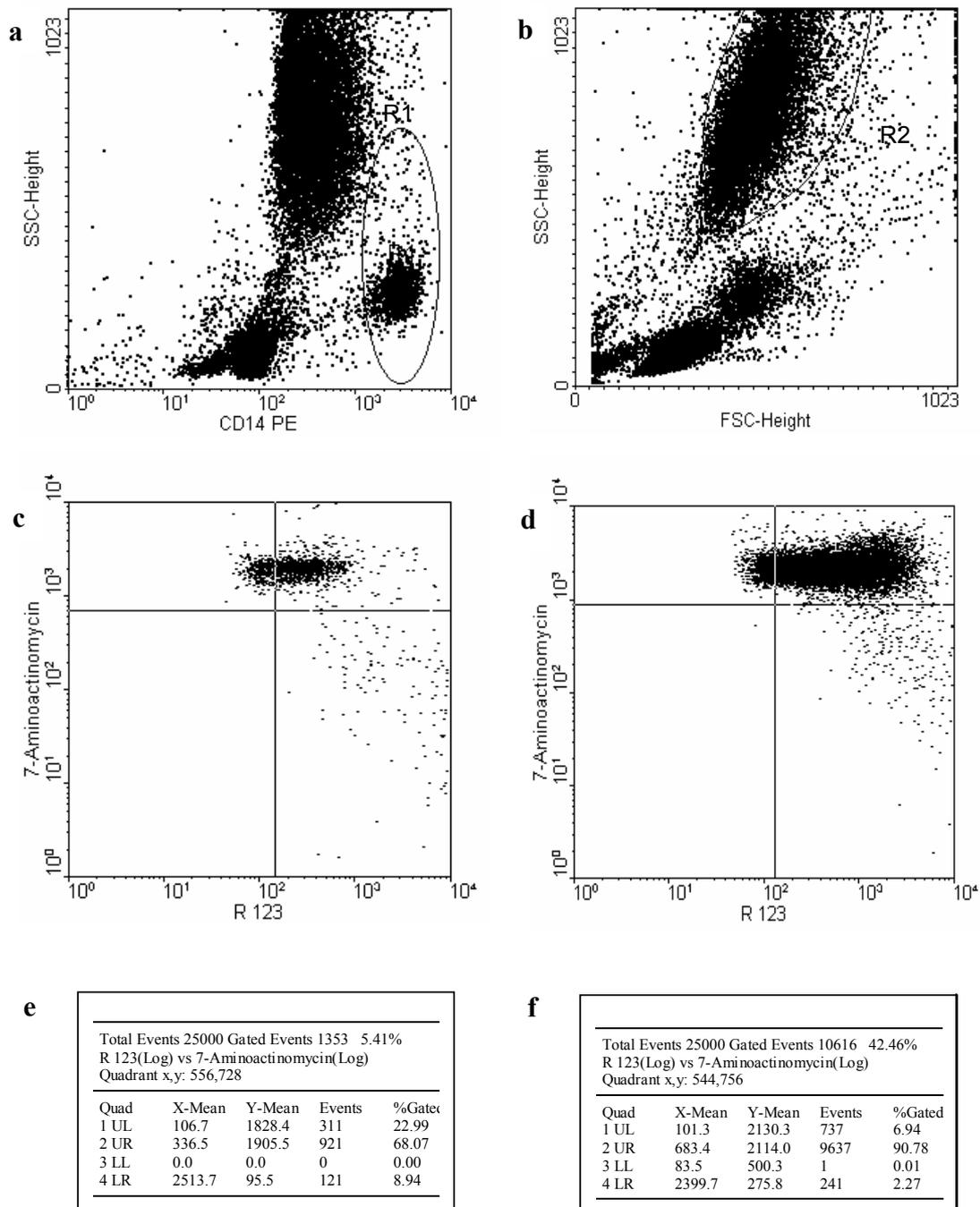


Abb. 6: Auswertung der Positivprobe zur Untersuchung des Respiratory Burst.

Die Gates R1, R2 sowie die beiden Quadranten wurden aus dem Kontrollansatz übernommen. Die Quadrantenanalyse erfolgte wie bei der Auswertung des Kontrollansatzes beschrieben. Die Ergebnisse für die CD14⁺ Zellen sind in (e) und für Granulozyten in (f) dargestellt.

4.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und wurde mit verteilungsunabhängigen, nichtparametrischen Tests durchgeführt. Die *Unterschiede zwischen den drei Gruppen* zu Studienbeginn wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft und bei signifikanten Unterschieden die Daten von jeweils zwei Gruppen mit dem U-Test nach Mann-Whitney-Wilcoxon verglichen. Die *Veränderungen innerhalb einer Gruppe* wurden mit Hilfe des Wilcoxon-signed-Rank Tests untersucht. Allen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt.

Die Gruppen wurden bezüglich Alter, Körpergewicht und –größe, BMI, und sportlicher Aktivität durch Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum in Häufigkeitstabellen beschrieben. Die Ergebnisse zur Polyphenolaufnahme werden in gleicher Weise dargestellt.

Die immunologischen Messdaten wurden durch Boxplots dargestellt. Die Balken repräsentieren den Interquartilbereich (25er, 75er Perzentil), wobei der schwarze Balken in der Box den Median darstellt. Die horizontal verlaufenden Striche über und unter der Box zeigen den größten und kleinsten Wert an, der nicht als extremer Wert oder Ausreißer gekennzeichnet ist. Ausreißer² werden durch Kreise, Extremwerte³ durch Sternchen dargestellt.

² Werte, die von der oberen bzw. unteren Kante der Box zwischen dem 1,5- und 3-fachen der Boxhöhe entfernt sind

³ Werte, die von der oberen bzw. unteren Kante der Box um mehr als das 3-fache entfernt sind

5 Ergebnisse

5.1 Kurzzeitstudie

5.1.1 Probanden

In der Kurzzeitstudie konnten die Proben von allen Teilnehmern der Gruppen RW und ERW vollständig ausgewertet werden. In der Kontrollgruppe standen die 90-Minuten-Proben von zwei Teilnehmern nicht zur Verfügung. Von diesen Probanden wurden jedoch die beiden Proben, die vor und 360 min nach der Intervention genommen wurden, in die statistische Auswertung einbezogen, da nicht die Kinetik, sondern der paarweise Vergleich der Untersuchungsparameter von Interesse war.

Die demographischen Merkmale zur Beschreibung des Probandenkollektivs sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Demographische Merkmale des Probandenkollektivs der Kurzzeitstudie.

		Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
Probanden	n	9	9	9
Geschlecht	♀ / ♂	7 / 2	8 / 1	6 / 3
Alter (Jahre)	MW ± SD	27,1 ± 9,0 ^a	26,2 ± 3,5	31,4 ± 5,8 ^a
	Min – Max	21 – 50	20 – 30	24 – 41
Gewicht (kg)	MW ± SD	62,2 ± 9,1	63,5 ± 9,1	64,1 ± 12,0
	Min – Max	48 – 77	48 – 79	50 – 78
Größe (m)	MW ± SD	1,72 ± 0,09	1,71 ± 0,09	1,70 ± 0,07
	Min – Max	1,57 – 1,85	1,60 – 1,87	1,60 – 1,83
BMI (kg/m ²)	MW ± SD	20,8 ± 1,1	21,8 ± 1,9	22,0 ± 2,8
	Min – Max	19,0 – 22,5	18,1 – 24,1	18,9 – 27,0
Sport (h/Wo)	MW ± SD	3,4 ± 2,9	2,7 ± 3,3	1,9 ± 2,3
	Min – Max	0 – 10	0 – 10	0 – 9

Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen a: $p = 0,04$.

n = Anzahl Probanden, ♀ = weiblich, ♂ = männlich, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimum, Max = Maximum, BMI = Body Mass Index, h/Wo = Stunden pro Woche.

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. Körpergewicht, Größe, BMI und sportlicher Aktivität zwischen den Gruppen. Die Probanden der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt älter als die Teilnehmer der Gruppe RW ($p = 0,04$).

5.1.2 Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme

Tab. 7 gibt einen Überblick zur Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme am Vortag der Studie. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden hierbei nicht beobachtet.

Tab. 7: Durchschnittliche Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme am Vortag.

		Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
Probanden	n	9	9	9
Energie (kcal)	MW ± SD	1718 ± 483	1610 ± 204	2040 ± 875
	Min – Max	1060 – 2700	1360 – 2000	1150 – 3770
(kJ)	MW ± SD	7188 ± 2021	6736 ± 853	8535 ± 3661
	Min – Max	4435 – 11297	5690 – 8368	4812 – 15774
Alkohol (g)	MW ± SD	1,7 ± 3,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	Min – Max	0,0 – 11	0,0 – 0,0	0,0 – 0,0
Flavonoide (mg)	MW ± SD	1,6 ± 4,8	2,1 ± 5,5	2,8 ± 6,5
	Min – Max	0,0 – 14,3	0,0 – 16,5	0,0 – 17,5
Phenolsäuren (mg)	MW ± SD	26,6 ± 63,9	17,6 ± 36,9	17,5 ± 34,9
	Min – Max	0,0 – 191,7	0,0 – 106,4	0,0 – 95,2
Polyphenole (mg)	MW ± SD	28,1 ± 63,3	19,7 ± 41,8	20,3 ± 35,5
	Min – Max	0,0 – 191,7	0,0 – 122,9	0,0 – 96,5

n = Anzahl, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimum, Max = Maximum.

5.1.3 Apoptose

Statistisch signifikante Veränderungen beim Anteil apoptotischer T-Lymphozyten nach Konsum von Rotwein wurden nicht beobachtet. In der Gruppe ERW sowie in der Kontrollgruppe nahm der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten ab, wobei die Veränderungen in beiden Gruppen 360 min nach der Intervention signifikant waren (ERW: $p = 0,008$; Kontrolle: $p = 0,021$) (Abb. 7). Der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten war zu Studienbeginn nicht zwischen den Gruppen verschieden.

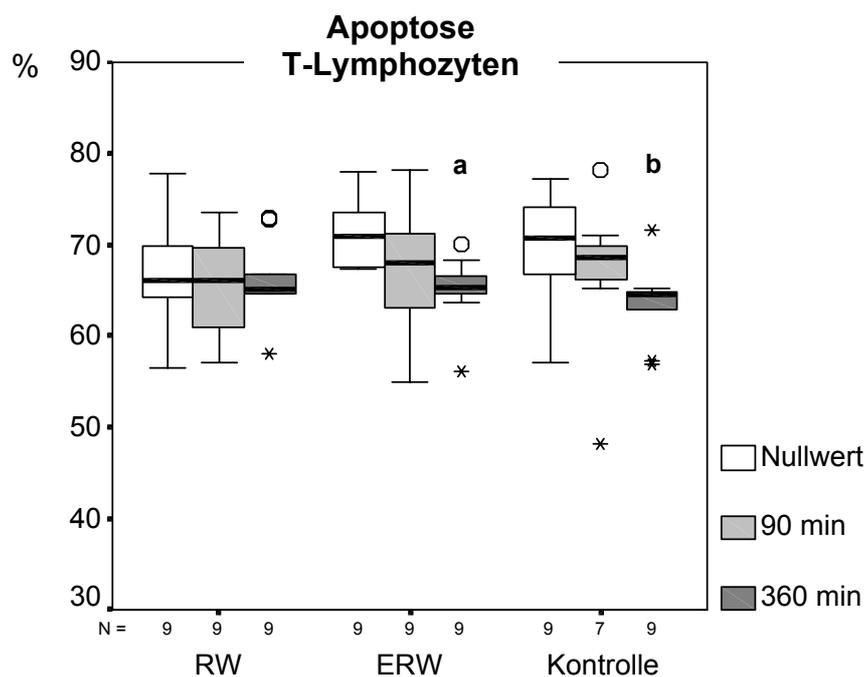


Abb. 7: Prozentualer Anteil apoptotischer T-Lymphozyten nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle).

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil, größter und kleinster nicht-extremer Wert, sowie Ausreißer (o) und Extremwerte (*). Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert: a: $p = 0,008$; b: $p = 0,021$.

RW = Rotwein, ERW = entalkoholisierter Rotwein, N = Anzahl Probanden.

5.1.4 Phagozytose

Der Anteil phagozytischer Granulozyten blieb in allen Gruppen unverändert (Abb. 8a). Beim Anteil phagozytischer Monozyten wurde nur 90 min nach Konsum von Rotwein eine signifikante Zunahme gegenüber dem Ausgangswert beobachtet ($p = 0,013$). In den Gruppen ERW und in der Kontrollgruppe veränderte sich der Anteil phagozytischer Monozyten nicht (Abb. 8b). Zu Studienbeginn wurden keine signifikanten Unterschiede im Anteil phagozytischer Granulozyten und Monozyten zwischen den Gruppen beobachtet.

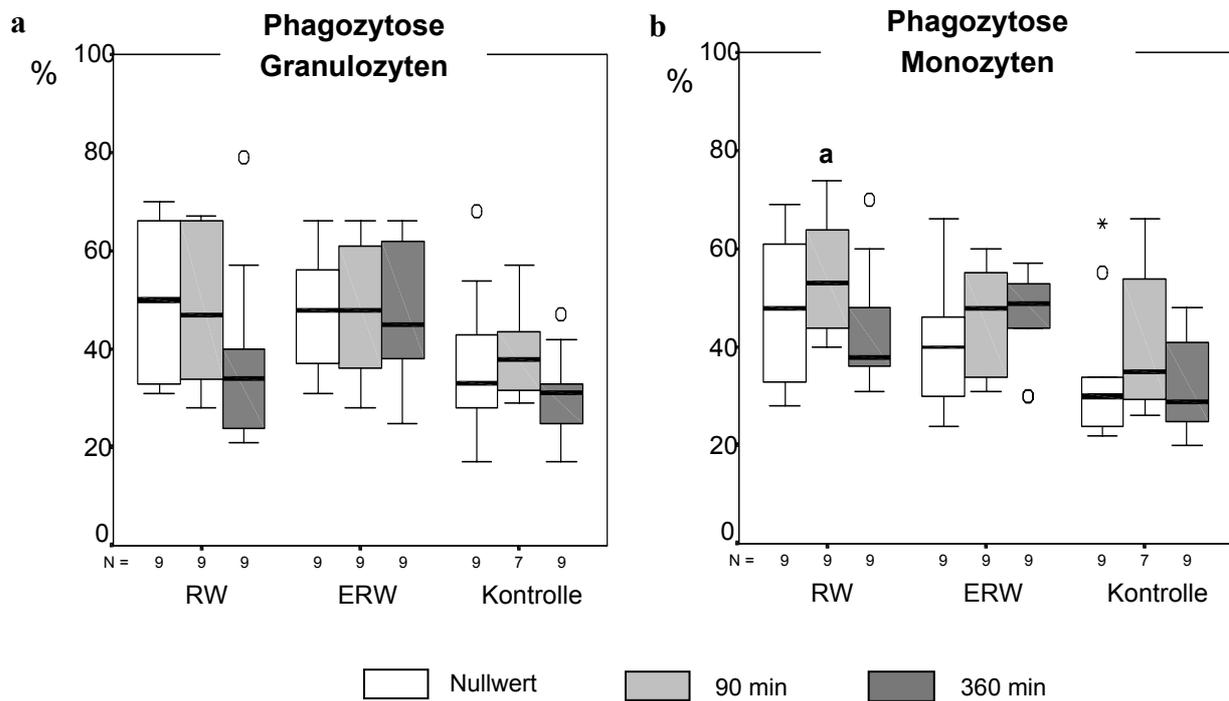


Abb. 8: Prozentualer Anteil phagozytischer Granulozyten (a) und phagozytischer Monozyten (b) nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle).

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil, kleinster und größter nicht-extremer Wert sowie Ausreißer (○) und Extremwerte (*). Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert: a: $p = 0,013$. RW = Rotwein, ERW = entalkoholisiertes Rotwein, N = Anzahl Probanden.

5.1.5 Respiratory Burst

Der Anteil burstaktiver Zellen veränderte sich nur nach Konsum von entalkoholisiertem Rotwein. Während bei den Granulozyten der Anteil burstaktiver Zellen 360 min nach Konsum von entalkoholisiertem Rotwein gegenüber dem Ausgangswert abnahm ($p = 0,037$) (Abb. 9a), stieg dieser bei den Monozyten kontinuierlich nach 90 min ($p = 0,05$) und nach 360 min ($p = 0,011$) gegenüber dem Ausgangswert an (Abb. 9b).

Der Anteil burstaktiver Granulozyten und Monozyten war zwischen den Gruppen zu Studienbeginn nicht verschieden.

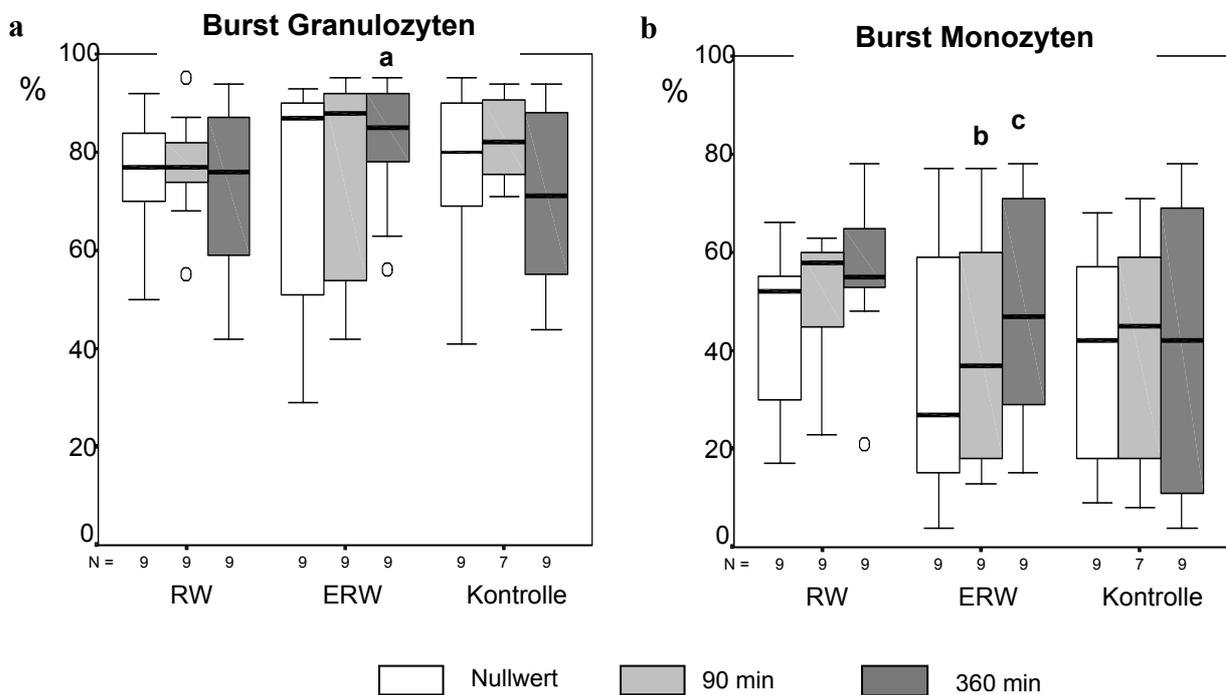


Abb. 9: Prozentualer Anteil burstaktiver Granulozyten (a) und burstaktiver Monozyten (b) nach einmaligem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein oder 200 mL Mineralwasser (Kontrolle).

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil, größter und kleinster nicht-extremer Wert sowie Ausreißer (○) und Extremwerte (*). Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert: a: $p = 0,037$, b: $p = 0,05$, c: $p = 0,011$.

RW = Rotwein, ERW = entalkoholisierter Rotwein, N = Anzahl Probanden.

5.2 Langzeitstudie

5.2.1 Probanden

Im Verlauf der Studie schieden von den 78 Probanden, die die Studie begonnen hatten, insgesamt 4 Teilnehmer aus. Zwei Teilnehmer (jeweils 1 Proband aus Gruppe RW und ERW) brachen aus gesundheitlichen Gründen die Studie ab. Ein Proband aus der Gruppe RW fing an zu rauchen und ein weiterer (Gruppe RW) erschien nicht zur zweiten Blutentnahme. Für die statistische Auswertung wurden die Daten von den 74 Probanden zugrunde gelegt, die bis zum Studienende teilgenommen hatten. Die demographischen Merkmale des Probandenkollektivs sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Demographische Merkmale des Probandenkollektivs der Langzeitstudie.

		Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
Probanden	n	24	25	25
Geschlecht	♀ / ♂	12 / 12	15 / 10	15 / 10
Alter (Jahre)	MW ± SD	30,0 ± 8,3	26,7 ± 6,4	28,8 ± 7,1
	Min – Max	20 – 46	20 – 45	20 – 42
Gewicht (kg)	MW ± SD	75,4 ± 15,5 ^{a,b}	65,4 ± 10,2 ^a	65,2 ± 9,3 ^b
	Min – Max	51,0 – 106,0	49,5 – 88,5	47,3 – 84,6
Größe (m)	MW ± SD	1,78 ± 0,10	1,72 ± 0,09	1,74 ± 0,06
	Min – Max	1,59 – 2,00	1,56 – 1,95	1,63 – 1,86
BMI (kg/m ²)	MW ± SD	23,5 ± 3,3 ^{c,d}	21,9 ± 2,1 ^c	21,4 ± 2,2 ^d
	Min – Max	17,2 – 30,7	18,8 – 26,1	17,8 – 25,5
Sport (h/Wo)	MW ± SD	2,2 ± 2,2	2,0 ± 2,0	2,9 ± 2,4
	Min – Max	0 – 6	0 – 6	0 – 8

Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu Studienbeginn: a: $p = 0,032$, b: $p = 0,023$, c: $p = 0,046$, d: $p = 0,017$.

n = Anzahl, ♀ = weiblich, ♂ = männlich, BMI = Body Mass Index, h/Wo = Stunden/Woche, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min = Minimum, Max = Maximum.

Die Gruppen unterschieden sich nicht bzgl. Alter und sportlicher Aktivität. Vor Studienbeginn waren Körpergewicht (KG) und BMI in der Gruppe RW höher als in der Gruppe ERW (KG: $p = 0,032$; BMI: $p = 0,046$) und in der Kontrollgruppe (KG: $p = 0,023$; BMI: $p = 0,017$) (Tab. 8). Gewicht und BMI blieben in allen Gruppen unverändert (KG: Woche 6: RW: $75,6 \pm 15,8$; ERW: $65,6 \pm 10,5$; Kontrolle: $65,2 \pm 9,5$; BMI Woche 6: RW: $23,5 \pm 3,6$; ERW: $21,9 \pm 2,1$; Kontrolle: $21,4 \pm 2,3$). Auch in Woche 6 waren Gewicht und BMI in der Gruppe RW höher als in der Gruppe ERW (KG: $p = 0,034$; BMI: $p = 0,024$).

5.2.2 Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme

Eine Übersicht zur durchschnittlichen täglichen Energie- und Alkoholaufnahme in der Woche vor Studienbeginn und in der letzten Interventionswoche in den Gruppen RW, ERW und in der Kontrollgruppe gibt Tab. 9.

Signifikante Unterschiede bei der durchschnittlichen täglichen Energieaufnahme vor Studienbeginn zwischen den Gruppen wurden nicht beobachtet. Die Energieaufnahme innerhalb der Gruppen blieb im Verlauf der Studie unverändert.

Die mittlere, tägliche Alkoholaufnahme war vor Studienbeginn zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden. In der Gruppe RW wurde eine statistisch signifikante Steigerung der Alkoholaufnahme von $7,5 \pm 8,2$ g auf $28,1 \pm 5,3$ g beobachtet ($p < 0,001$), bedingt durch den Konsum von Rotwein. In der Gruppe ERW und in der Kontrollgruppe traten bei der Alkoholaufnahme keine signifikanten Veränderungen auf.

Tab. 9: Durchschnittliche tägliche Energie- und Alkoholaufnahme vor und während der Intervention.

	Rotwein		Entalkoholisierter Rotwein		Kontrolle	
	Wo 0	Wo 6	Wo 0	Wo 6	Wo 0	Wo 6
n	24		25		25	
Energie (kcal)	1869 ± 443	1924 ± 515	1922 ± 445	1945 ± 637	1862 ± 464	1950 ± 545
(KJ)	7820 ± 1853	8050 ± 2155	8042 ± 1862	8138 ± 2665	7791 ± 1941	8159 ± 2280
Alkohol (g)	$7,5 \pm 8,2$	$28,1 \pm 5,3^a$	$5,8 \pm 7,1$	$6,5 \pm 7,7$	$6,1 \pm 6,6$	$6,9 \pm 6,7$
Δ (g)	+20,6		+0,7		+0,8	
-Getränk	+24,2		+1,1		-	
-Sonstiges	-3,6		-0,4		+0,8	

Angaben für Woche 0 und Woche 6: Mittelwert, Standardabweichung. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zwischen Woche 0 und Woche 6 innerhalb einer Gruppe: a: $p < 0,001$.

n = Anzahl Probanden, Δ = Veränderungen, Wo 0 = Woche vor Studienbeginn, Wo 6 = 6. Interventionswoche

Vor der Intervention wurden keine signifikanten Unterschiede bei der durchschnittlichen täglichen Aufnahme an Flavonoiden, Phenolsäuren und Polyphenolen beobachtet. Die Flavonoidaufnahme insgesamt nahm in den Gruppen RW und ERW zu (beide $p < 0,001$) (Tab. 10), wobei in beiden Gruppen die Zufuhr an Catechin, Epicatechin, Malvidin und Peonidin anstieg (alle $p < 0,001$ außer $p = 0,002$ Peonidin Gruppe RW und Epicatechin Gruppe ERW) (Tab. 11). Die Flavonoidaufnahme in der Kontrollgruppe blieb insgesamt

unverändert (Tab. 10). Dennoch wurden bei der Aufnahme einzelner Flavonoide Veränderungen in der Kontrollgruppe beobachtet: Die Zufuhr an Kämpferol ($p = 0,007$) und Cyanidin ($p = 0,001$) stieg an, während die Aufnahme von Gallocatechin ($p < 0,001$) und Epigallocatechin ($p = 0,002$) abnahm (Tab. 11).

Die Zufuhr an Phenolsäuren insgesamt nahm in allen Gruppen zu (RW: $p = 0,014$; ERW: $p = 0,019$; Kontrolle: $p = 0,025$) (Tab. 10), wobei in den Gruppen RW und ERW nur die Aufnahme an Gallussäure anstieg (beide $p < 0,001$). In der Kontrollgruppe erhöhte sich die Aufnahme an p-Hydroxybenzoe-, Ellag-, (beide $p < 0,001$) und Salizylsäure ($p = 0,011$). Syringasäure wurde in Woche 6 in geringeren Mengen zugeführt als zu Studienbeginn ($p = 0,006$) (Tab. 12).

Die Aufnahme an Polyphenolen insgesamt war am Ende der Intervention in allen Gruppen höher als zu Studienbeginn (RW: $p < 0,001$; ERW: $p = 0,005$; Kontrolle: $p = 0,035$) (Tab. 10).

Tab. 10: Durchschnittliche tägliche Polyphenolaufnahme vor und während der Intervention.

	Rotwein		Entalkoholisierter Rotwein		Kontrolle	
	Wo 0	Wo 6	Wo 0	Wo 6	Wo 0	Wo 6
n	24		25		25	
Flavonoide (mg)	29±17	77±25 ^a	39±20	64±28 ^a	38±21	41±25
Δ (mg)	+48		+25		+3	
-Getränk	+50		+24		-	
-Sonstiges	-2		+1		+3	
Phenolsäuren (mg)	108±75	135±83 ^b	123±83	158±103 ^c	87±70	136±100 ^d
Δ (mg)	+27		+35		+48	
-Getränk	+12		+13		-	
-Sonstiges	+15		+22		+48	
Polyphenole (mg)	137±81	212±91 ^a	163±94	222±118 ^e	125±80	177±112 ^f
Δ (mg)	+75		+59		+52	
-Getränk	+63		+38		-	
-Sonstiges	+12		+21		+52	

Angaben für Woche 0 und Woche 6: Mittelwert, Standardabweichung. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert innerhalb einer Gruppe: a: $p < 0,001$, b: $p = 0,014$, c: $p = 0,019$, d: $p = 0,025$, e: $p = 0,005$, f: $p = 0,035$.

n = Anzahl Probanden, Δ = Veränderungen, Wo 0 = Woche vor Studienbeginn, Wo 6 = 6. Interventionswoche

Tab. 11: Mittlere Zusammensetzung der zusätzlich aufgenommenen Flavonoide (mg/d).

	Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
n	24	25	25
Σ Flavanole	38,9^a	17,3^a	-1,6
-Catechin	24,6 ^a	11,1 ^a	2,1
-Epicatechin	14,2 ^a	6,2 ^b	-2,2
-Gallocatechin	0,1	0	-0,6 ^a
-Epigallocatechin	0,1	0	-0,9 ^b
Σ Flavonole	-0,3	0,6	0,7
-Kämpferol	0,6	0,8	1,2 ^c
-Myricetin	0,0	0,1	0,0
-Quercetin	-0,9	-0,3	-0,4
Σ Anthocyanidine	8,8^b	10,0^a	6,2^d
-Cyanidin	-0,2	4,9	8,1 ^a
-Malvidin	7,6 ^a	4,7 ^a	-1,2
-Peonidin	1,4 ^b	0,5 ^a	-0,3
-Petunidin	0,0	0,0	-0,4
Σ Flavanone	-0,1	-2,8	-2,0
-Naringenin	-0,1	-2,8	-2,0
Σ Flavonoide	47,8^a	25,1^a	3,4

Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert (nicht aufgeführt) der gleichen Gruppe: a: p = 0,001, b: p = 0,002, c: p = 0,007, d: p = 0,031. n = Anzahl Probanden, Σ = Summe

Tab. 12: Mittlere Zusammensetzung der zusätzlich aufgenommenen Phenolsäuren (mg/d).

	Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
n	24	25	25
Σ Hydroxybenzoesäuren	8,8^a	15,7^c	31,5^b
-p-Hydroxybenzoesäure	0	0,4	0,8 ^b
-Ellagsäure	0,3	6,7	30,4 ^b
-Gallussäure	7,3 ^b	9,1 ^b	0,2
-Salizylsäure	0,3	0,1	0,8 ^e
-Syringasäure	0,9	-0,6	-0,7 ^f
Σ Hydroxyzimtsäuren	18,2	19,2	16,9
-Ferulasäure	-0,2	-0,1	-0,2
-Kaffeesäure	18,3	17,7	17,7
-p-Cumarsäure	0,1	1,6	-0,5
Σ Phenolsäuren	27,0^b	34,9^d	48,4^g

Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert (nicht aufgeführt) der gleichen Gruppe: a: p < 0,034, b: p < 0,001, c: p = 0,002, d: p = 0,005, e: p = 0,011; f: p = 0,006; g: p = 0,035. n = Anzahl Probanden, Σ = Summe

5.2.3 Apoptose

Der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten blieb nach der 6-wöchigen Intervention im Vergleich zum Ausgangswert in allen Gruppen unverändert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu Studienbeginn wurden nicht beobachtet (Abb. 10).

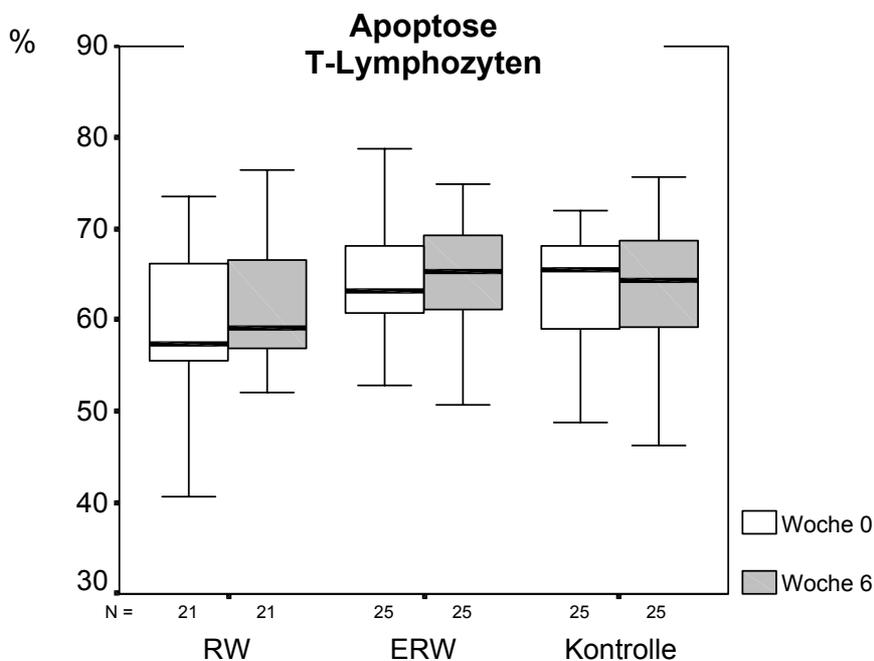


Abb. 10: Prozentualer Anteil apoptotischer T-Lymphozyten vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein und in der Kontrollgruppe.

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil sowie größter und kleinster nicht-extremer Wert. RW = Rotwein, ERW = entalkoholisiertem Rotwein, N = Anzahl Probanden

5.2.4 Phagozytose

Die Anteil phagozytischer Granulozyten blieb während der 6-wöchigen Intervention in allen Gruppen unverändert (Abb. 11a). Auch bei den Monozyten wurden keine Veränderungen beim Anteil phagozytischer Zellen beobachtet (Abb. 11b). Signifikante Unterschiede beim Anteil phagozytischer Granulozyten und Monozyten zwischen den Gruppen wurden zu Studienbeginn nicht festgestellt.

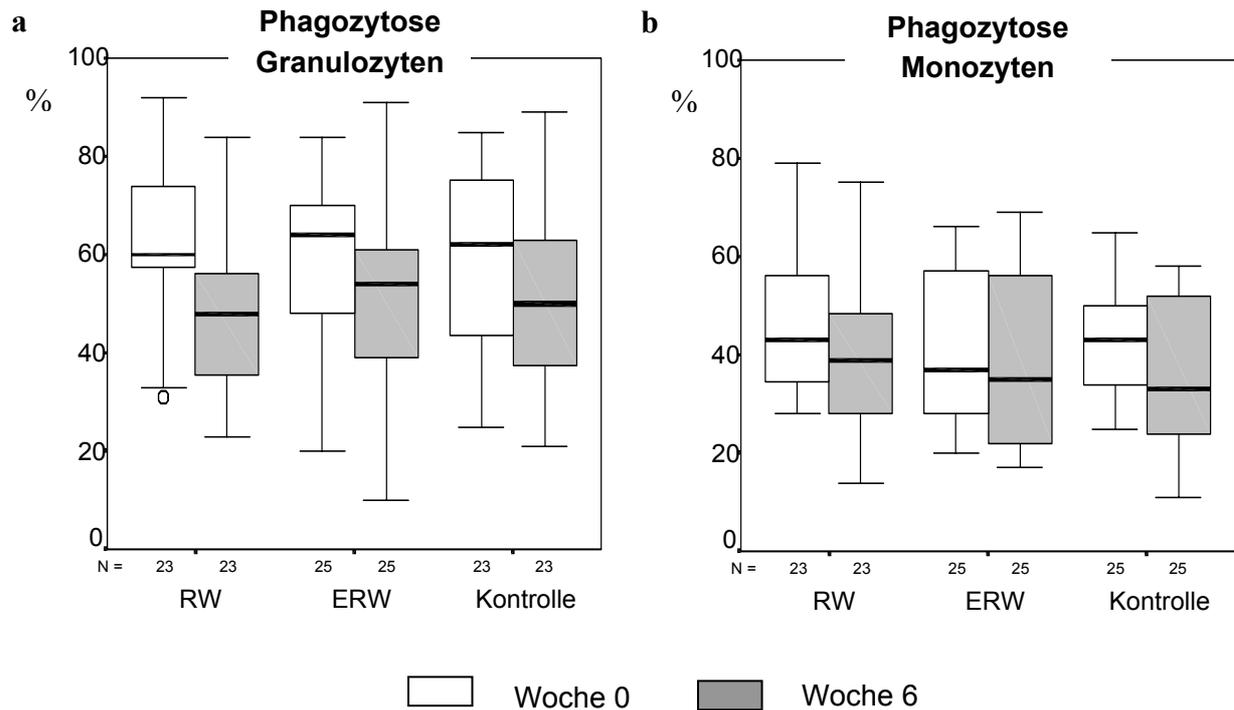


Abb. 11: Prozentualer Anteil phagozytischer Granulozyten (a) und phagozytischer Monozyten (b) vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisierendem Rotwein und in der Kontrollgruppe.

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil, größter und kleinster nicht-extremer Wert sowie Ausreißer. RW = Rotwein, ERW = entalkoholisierter Rotwein, N = Anzahl Probanden

5.2.5 Respiratory Burst

Der Anteil burstaktiver Granulozyten veränderte sich in keiner Gruppe während der Intervention (Abb. 12a). Bei den Monozyten nahm der Anteil burstaktiver Zellen in der Gruppe RW während der 6-wöchigen Intervention signifikant ab ($p = 0,001$), aber auch in der Kontrollgruppe ($p = 0,007$) (Abb. 12b). Signifikante Unterschiede beim Anteil burstaktiver Granulozyten und Monozyten zwischen den Gruppen wurden zu Studienbeginn nicht beobachtet.

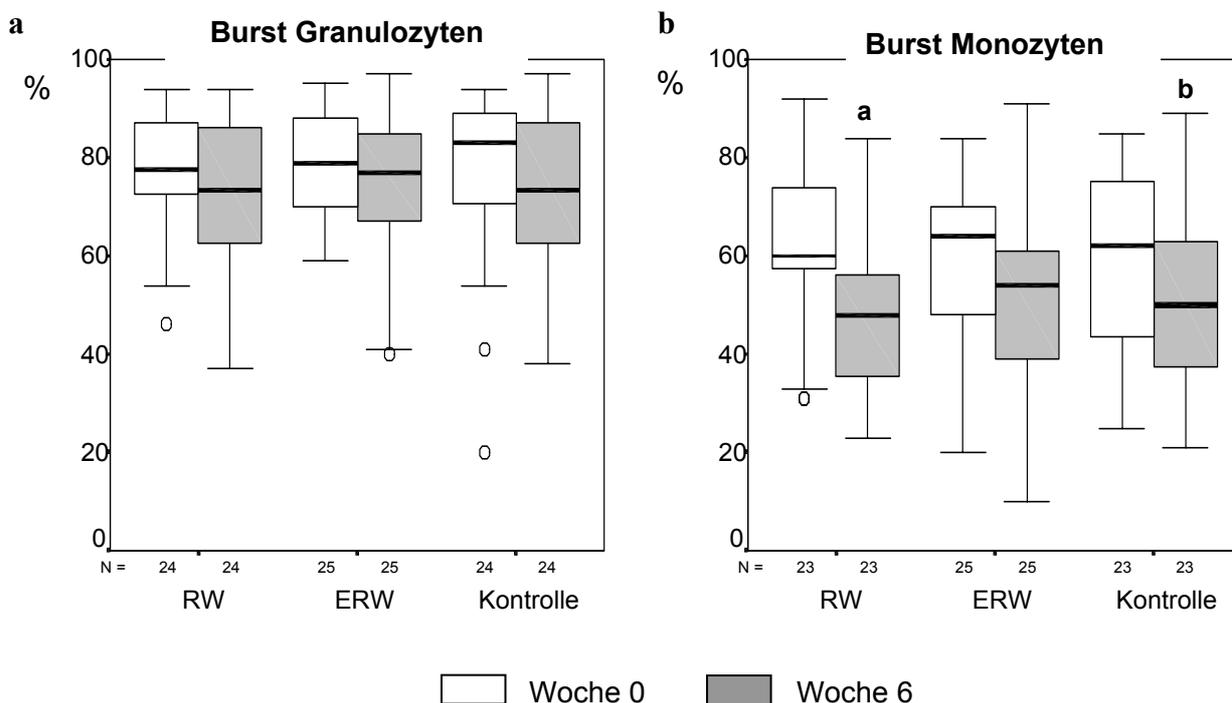


Abb. 12: Prozentualer Anteil burstaktiver Granulozyten (a) und burstaktiver Monozyten (b) vor und nach 6-wöchigem Konsum von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein und in der Kontrollgruppe.

Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil, größter und kleinster nicht-extremer Wert, Ausreißer (\circ). Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zum Ausgangswert. a: $p = 0,001$; b: $p = 0,007$. RW = Rotwein, ERW = entalkoholisierter Rotwein, N = Anzahl Probanden

6 Diskussion

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in allen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen (HERTOG et al., 1992), in besonders hoher Konzentration im Rotwein (SOLEAS et al., 1997a). Da sie den Organismus vor oxidativem Stress und damit assoziierten Erkrankungen schützen können, werden den Polyphenolen gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben (NIJVELDT et al., 2001). Ob mit dem Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln neben antioxidativen Effekten im Plasma auch funktionelle Veränderungen bei Leukozyten des peripheren Blutes hervorgerufen werden, ist weitgehend unbekannt. Antiinflammatorische Wirkungen der Polyphenole, die teilweise auf antioxidativen Effekten basieren, wurden bisher nur *in vitro* nachgewiesen (ROBAK und GRYGLEWSKI, 1996). Auch zur Wirkung einer nutritiven Polyphenolaufnahme auf die Apoptose von humanen T-Lymphozyten, die durch oxidativen Stress bei der T-Zell-Aktivierung hervorgerufen wird, ist bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Aufnahme von Polyphenolen aus nativem oder entalkoholisierendem Rotwein redoxsensitive Immunfunktionen (T-Zell-Apoptose, Phagozytose und Respiratory Burst von Monozyten und Granulozyten) beeinflusst. Da immunmodulierende Wirkungen bei einer zellulären Akkumulation der Polyphenole zu erwarten sind, aber nur wenig dazu bekannt ist, ob und in wie weit diese Effekte bei wiederholter Polyphenolaufnahme auftreten und zu funktionellen Veränderungen bei Leukozyten des peripheren Blutes führen, wurden die Wirkungen von nativem und entalkoholisierendem Rotwein nach einmaligem und wiederholtem Verzehr in zwei Teilstudien überprüft. Dazu wurden zwei Interventionsstudien mit gesunden Nichtrauchern durchgeführt. In einer Kurzzeitstudie wurden die Wirkungen eines einmaligen Verzehrs von 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisierendem Rotwein im Vergleich zu 200 mL Mineralwasser gemessen. In einer Langzeitstudie nahmen die Probanden täglich dieselbe Menge an nativem oder entalkoholisierendem Rotwein zusätzlich zu ihrer gewohnten Kost auf. Die Kontrollgruppe erhielt kein Studiengetränk.

6.1 Studienaufbau und Methoden

Die Untersuchungen sollten unter möglichst realitätsnahen Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurde ein kommerziell erhältlicher Rotwein eingesetzt, von dem moderate, d.h. gesundheitlich unbedenkliche Einzeldosen verzehrt wurden. Die Untersuchungen wurden an Männern und Frauen durchgeführt, damit geschlechtsunabhängige Aussagen gemacht werden können. Für die Kurzzeitstudie war am Vortag eine polyphenolarme Ernährung erforderlich, um potentielle Störfaktoren durch Polyphenole, die noch am nächsten Tag im Plasma vorliegen können, auszuschließen. In der Langzeitstudie mussten die Probanden nicht generell auf polyphenolreiche Lebensmittel wie bei BUB et al. (2003) und WATZL et al. (2003) verzichten, weil es das Ziel war, den Einfluss einer wiederholten, nutritiven Polyphenolaufnahme durch nativen oder entalkoholisierten Rotwein zusätzlich zur gewohnten Kost (und diese schließt polyphenolreiche Lebensmittel ein!) beurteilen zu können. Durch die diätetischen Restriktionen sollten Störfaktoren, z.B. durch exzessiven Konsum von Säften, Kaffee oder Tee oder durch Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln oder Probiotika, vermieden werden.

Die Untersuchungen zur Wirkung von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein auf redox-sensitive Immunfunktionen wurden als dreiarmlige Studien durchgeführt. Der Parallelgruppenvergleich erlaubt Aussagen darüber, ob der Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein im Vergleich zu Nichtrotweintrinkern (Kontrollgruppe) zu signifikanten Veränderungen bei redoxsensitiven Immunfunktionen führt. Darüber hinaus sollte der Vergleich von Rotwein mit entalkoholisiertem Rotwein Hinweise zur Wirkung des Alkohols auf immunmodulierende Wirkungen von Rotwein *in vivo* liefern. Da ein Teil der Flavonoide durch das Entalkoholisieren verändert bzw. abgebaut wird, und daher unterschiedliche Flavonoidmengen mit einer Einzeldosis nativen oder entalkoholisierten Rotweins aufgenommen wurden (Tab. 5), ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

Wegen der starken antioxidativen Wirkung der Polyphenole, die man nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* bzw. *ex vivo* nach einer nutritiven Polyphenolaufnahme beobachtet hat, wurden Immunparameter untersucht, die durch oxidativen Stress initiiert (T-Zell-Apoptose) bzw. verstärkt (Phagozytoseprozess) werden.

Die Apoptose wurde mit dem Annexinbindungstest mit kombinierter DNA-Färbung untersucht, ein Verfahren, das eine simultane Phänotypisierung der T-Zellen durch Anfärbung mit dem T-zellspezifischen Oberflächenmarker CD3 ermöglicht. Da bei der simultanen Phänotypisierung die T-Zellen nicht isoliert werden, können auch physiologisch relevante Interaktionen zwischen den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (z.B. durch Zytokine oder Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Monozyten) erfasst werden. Veränderungen im Serum durch den Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein, die auch für die T-Zell-Apoptose *in vivo* relevant sein können, wurden durch Anreicherung des Mediums mit autologem Serum berücksichtigt.

Die Untersuchungen zu Phagozytose und Respiratory Burst wurden mit Testkits durchgeführt, die auch in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden. Durch die Modifikation des Herstellerprotokolls können die Monozyten in demselben Probenansatz wie die Granulozyten gleichzeitig untersucht und dabei sicher detektiert werden. Damit ist es möglich, aussagekräftige Ergebnisse zur Wirkung von moderatem Rotweinkonsum auf die Phagozytose und den Respiratory Burst von Granulozyten und Monozyten zu erzielen.

Außerdem wurden nutritive Parameter erfasst, die Hinweise auf die Compliance der Probanden und auf das Vorliegen von potentiellen Störfaktoren geben. Die Energieaufnahme stellt einen wichtigen Surrogatmarker für den Nahrungsmittelverzehr dar, der bei gleichzeitiger Messung des BMI anzeigt, ob bzw. in wie weit die berechnete Polyphenolaufnahme der tatsächlichen Polyphenolaufnahme entspricht. Damit wird die Validität der erhobenen Daten ersichtlich.

6.2 Kurzzeitstudie

6.2.1 Probanden

Da die Probanden bezüglich Größe, Gewicht, BMI und sportlicher Aktivität vergleichbar waren (Tab. 6), kann man davon ausgehen, dass die Stoffwechselaktivität bei allen Gruppen ebenfalls vergleichbar war und nicht die Bioverfügbarkeit der Polyphenole aus den Studiengetränken beeinflusst hat. Der Altersunterschied zwischen den Probanden der Kontrollgruppe und den Gruppen RW und ERW ist mit 5 bzw. 4 Jahren relativ gering und für die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht von Bedeutung.

6.2.2 Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme

Die Energiezufuhr am Vortag (Tab. 7) lag mit durchschnittlich 1718 kcal (Gruppe RW), 1610 kcal (Gruppe ERW) und 2040 kcal (Kontrollgruppe) unterhalb der Richtwerte, die von der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Ernährung für die Altersgruppe der 19-24 Jährigen (2400 kcal für Frauen, 3000 kcal für Männer) und 25-50 Jährigen (2300 kcal für Frauen, 2900 kcal für Männer) (D-A-CH, 2000) angegeben wird. Die Diskrepanz zwischen der berechneten Energieaufnahme und dem tatsächlichen Energiebedarf ist wahrscheinlich z.T. auf die diätetischen Restriktionen zurückzuführen, welche die Nahrungsmittelauswahl stark einschränken und daher tatsächlich die Energieaufnahme reduzieren („Undereating“). Durch die Sortierung der Lebensmittel nach Produktgruppen und die Angabe verzehrsüblicher Portionsgrößen war das Protokoll benutzerfreundlich aufgebaut. Ein Unterschätzen des Nahrungsmittelverzehr („Underreporting“) durch mangelhafte Dokumentation (z.B. Vergessen von Zwischenmahlzeiten; „Underrecording“) ist unwahrscheinlich, da das Protokoll nur einen Tag geführt werden musste und die Teilnehmer (Mitarbeiter aus der eigenen Arbeitsgruppe sowie aus dem Institut Physiologie, Biochemie und Hygiene der Haustiere, Studenten der Ernährung- und Haushaltswissenschaften sowie Mediziner) hochmotiviert waren. Zudem können Ernährungswissenschaftler/Innen, die in der vorliegenden Studie die Hälfte des Probandenkollektivs ausmachten, relativ gut die Nahrungsaufnahme einschätzen (CHAMPAGNE et al., 2002). Da ein Underreporting v.a. bei jungen Frauen beobachtet wurde (LIVINGSTONE und BLACK, 2003), und 70% der Teilnehmer in der vorliegenden Studie Frauen waren (Tab. 6), kann ein Underreporting nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der Ernährungsprotokolle zeigt, dass die Zufuhr an Flavonoiden (RW: $1,6 \pm 4,8$ mg; ERW: $2,1 \pm 5,5$ mg; Kontrolle: $2,8 \pm 6,5$ mg) und phenolischen Säuren (RW: $26,6 \text{ mg} \pm 63,9$ mg; ERW: $17,6 \pm 36,9$ mg; Kontrolle: $17,5 \pm 34,9$ mg) am Vortag (Tab. 7) in allen Gruppen deutlich unterhalb der Mengen lag, die bei einer normalen Mischkost (54 mg Flavonoide (LINSEISEN et al., 1997), 222 mg Phenolsäuren (RADTKE et al., 1998)) aufgenommen werden. Damit können selbst bei unterschätzter Nahrungsmittelaufnahme potentielle Störeinflüsse von der Polyphenolaufnahme am Vortag ausgeschlossen werden.

Die geringe Polyphenolaufnahme und der Verzicht auf alkoholische Getränke am Vortag (Tab. 7) (nur ein Proband konsumierte 100 g Sekt) deuten auf eine gute Compliance der

Probanden bzgl. der diätetischen Restriktionen hin. Nutritive Störfaktoren können daher in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden.

6.2.3 Apoptose

Die Apoptose von aktivierten T-Zellen wird durch Redoxveränderungen ausgelöst, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden (HILDEMAN et al., 1999; BOGDAN et al., 2000; PERL et al., 2002; HILDEMAN et al., 2003). Durch Antioxidantien konnte die Apoptose von T-Lymphozyten der Maus *in vitro* gehemmt werden (FORREST et al., 1994). Eine Inhibition der T-Zell-Apoptose wurde auch bei gesunden Menschen nach Supplementierung von Antioxidantien *ex vivo* beobachtet (MOSCA et al., 2002). Da Polyphenole nicht nur *in vitro* (PIETTA, 2000), sondern auch nach einmaligem Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln wie Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein und Rotweinxtrakt antioxidative Wirkungen im Plasma ausüben (WHITEHEAD et al., 1995; MIYAGI et al., 1997; CAO et al., 1998; DUTHIE et al., 1998; SERAFINI et al., 1998, 2000; SIMONETTI et al., 2001), könnte der Verzehr von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein bei aktivierten T-Lymphozyten antiapoptotische Effekte hervorrufen.

In der vorliegenden Studie nahm der Anteil apoptotischer T-Zellen 360 min nach der Intervention in der Gruppe ERW, aber auch in der Kontrollgruppe ab (Abb. 7). Deshalb können die Veränderungen in der Gruppe ERW nicht mit dem Konsum von entalkoholisierendem Rotwein in Verbindung gebracht werden. Der einmalige Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein hat damit keinen Einfluss auf die Apoptose von aktivierten T-Lymphozyten *ex vivo*.

Es ist zu vermuten, dass die Polyphenole in den Konzentrationen, die im Plasma nach einmaligem Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein erreicht werden (C_{\max} : 1-184 nM) (Tab. 4), die T-Zell-Apoptose bei gesunden Personen nicht modulieren können. In der bisher einzigen *in vitro* Studie zur Wirkung von Polyphenolen auf das Apoptoseverhalten von humanen T-Zellen wurden durch Tee-Extrakt und Epigallocatechingallat ($27 \mu\text{g/mL} \triangleq 60 \mu\text{M}$) keine Veränderungen der T-Zell-Apoptose nachgewiesen (LI et al., 2000). Referenzstudien zur Wirkung von Polyphenolen u.a. Antioxidantien auf die T-Zell-Apoptose nach einmaliger Aufnahme liegen nicht vor. Da die Inhibition der T-Zell-Apoptose bei MOSCA et al. (2002) nach Gabe von Antioxidantien stets mit einer Reduktion des intrazellulären Redoxstatus einherging, jedoch nicht zwingend mit antioxidativen Veränderungen im Plasma, sind Veränderungen der T-Zell-Apoptose nur bei

signifikanten Veränderungen des intrazellulären Redoxstatus in Richtung Reduktion zu erwarten. Dies tritt vermutlich erst bei Megadosen an Antioxidantien oder bei Akkumulation nach wiederholter Aufnahme auf. Ebenso ist bei einer Imbalance des zellulären Redoxstatus, wie er z.B. bei HIV-Patienten vorliegt (AUKRAST et al., 1995; WALMSLEY et al., 1997), eher mit Veränderungen bei der T-Zell-Apoptose nach Supplementierung von Antioxidantien zu rechnen als bei gesunden Probanden, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden.

Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass Polyphenole auch unabhängig von ihren antioxidativen Wirkungen das Apoptoseverhalten modulieren können. Dieser Hinweis basiert auf Beobachtungen von SPENCER et al. (2001b), die bei humanen Fibroblasten antiapoptotische Wirkungen *in vitro* feststellten, wenn die Zellen vor Induktion der Apoptose durch Oxidantien (H_2O_2 , oxidiertes LDL) mit Epicatechin oder dem Metaboliten 3'O-Methylepicatechin behandelt und mehreren Waschschritten unterzogen wurden. Wegen des deutlich geringeren antioxidativen Potentials von 3'O-Methylepicatechin werden diese Wirkungen nicht auf Redoxveränderungen, sondern vielmehr auf eine direkte Interaktion des Metaboliten mit Elementen der Signalkaskade zurückgeführt (SPENCER et al., 2001b). Diese Effekte wurden bei Konzentrationen von 30 μM Epicatechin oder 3'O-Methylepicatechin im Medium beobachtet. Physiologisch relevante Polyphenolkonzentrationen, die nach Konsum polyphenolreicher Lebensmittel im Plasma erreicht werden (nach SCALBERT und WILLIAMSON (2000) maximal 1 μM), wurden von SPENCER et al. (2001b) nicht eingesetzt. Da in der vorliegenden Interventionsstudie nach einmaligem Konsum von nativem oder entalkoholisierem Rotwein keine Veränderungen bei der T-Zell-Apoptose messbar waren, scheinen die von SPENCER et al. (2001b) postulierten Mechanismen, z.B. eine direkte Interaktion der Polyphenole mit Proteintyrosinkinasen und Phospholipasen (MIDDLETON, 1998), nach einmaliger nutritiver Polyphenolaufnahme keine Rolle zu spielen.

6.2.4 Phagozytose

Die Phagozytose ist ein effizienter Mechanismus zur Elimination von pathogenen Keimen, dem insbesondere beim Erstkontakt mit dem Antigen eine wichtige Bedeutung zukommt. Monozyten fungieren im Unterschied zu neutrophilen Granulozyten als antigenpräsentierende Zellen und stellen damit ein funktionelles Bindeglied zur spezifischen Abwehr dar (KLEIN, 1991; JANEWAY und TRAVERS, 1997). Der Aktivierungszustand der Neutrophilen bei der Phagozytose wird streng reguliert und durch Primern den jeweiligen Erfordernissen angepasst (BAGGIOLINI und WYMAN, 1990; SWAIN et al., 2002). Über die

Mechanismen, mit denen die Monozyten die Phagozytoseaktivität regulieren, ist wenig bekannt. Eine wichtige regulatorische Bedeutung wird den ROS beigemessen (FORMAN und TORRES, 2001b; KARLSSON und DAHLGREN, 2002; SWAIN et al., 2002), welche dosisabhängig die Fc γ -vermittelte Internalisierung bei aktivierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten / Makrophagen *in vitro* verstärken (GRESHAM et al., 1988; GAMALEY et al., 1994; PRICOP et al., 1999; PRICOP und SALMON, 2002). Inhibitorische Effekte wurden erst bei sehr hohen H₂O₂-Konzentrationen beobachtet (GAMALEY et al., 1994).

Der Anteil phagozytischer Granulozyten wurde durch einmaligen Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein oder Mineralwasser nicht verändert (Abb. 8a). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von WATZL et al. (2002), die nach einmaligem Konsum von 500 mL Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein oder rotem Traubensaft bei gesunden Nichtrauchern keine Veränderungen beim Anteil phagozytischer Granulozyten messen konnten. Zur Wirkung von Polyphenolen auf die Phagozytose von Granulozyten ist wenig bekannt. *In vitro* Studien hierzu wurden nur mit Quercetin, Rutosid und Rutin durchgeführt, wobei eine Inhibition bei Supplementierung des Mediums mit 1,5 mM Rutin festgestellt wurde (PRUZANSKI et al., 1983). Diese Ergebnisse sind physiologisch nicht relevant, da Rutin im Plasma nicht nachweisbar ist (GRAEFE et al., 2001) und darüber hinaus Polyphenolkonzentrationen im Plasma von mehr als 1 μ M durch Konsum polyphenolreicher Lebensmittel nicht erreicht werden (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000).

In der vorliegenden Studie scheint der Alkohol keine Wirkung auf die Phagozytose von Granulozyten zu haben (Abb. 8a). Auch in einer anderen Interventionsstudie traten nach Gabe von 500 mL einer 12%igen Ethanollösung keine Veränderungen bei der Phagozytose von Granulozyten auf (WATZL et al., 2002). Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien, die inhibitorische Effekte nach Konsum von alkoholischen Getränken bei Aufnahme von höheren Alkoholmengen nachweisen konnten (LAHARRAGUE et al., 1985; CORBERAND et al., 1989). Die Wirkung des Alkohols auf die Phagozytose von Granulozyten scheint damit konzentrationsabhängig zu sein.

Zu der Frage, ob Polyphenole die Phagozytose von Monozyten beeinflussen, gab es bis vor kurzem keine Hinweise. In der vorliegenden Studie war der Anteil phagozytischer Monozyten 90 min nach Konsum von Rotwein gegenüber dem Ausgangswert erhöht. In den beiden anderen Gruppen wurden keine Veränderungen beobachtet (Abb. 8b). Bei WATZL et al. (2002) traten 1, 2 und 24 Stunden nach einmaligem Konsum von Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein oder rotem Traubensaft keine Veränderungen beim Anteil

phagozytischer Monozyten auf. Hierbei wurde zwar ein vergleichbares Verfahren zur Messung der Phagozytose durchgeführt, jedoch wurden die Monozyten aufgrund ihrer Streulichteigenschaften und nicht durch einen fluorochrommarkierten CD14-Antikörper detektiert. Da phagozytierende Monozyten wegen veränderter Streulichteigenschaften im Streulichtdiagramm nicht sicher detektiert werden können (ZELLER et al., 1989; MANCA et al., 1997; BASSØE et al., 2000), ist unklar, inwieweit die Daten von WATZL et al. (2002) tatsächlich das Phagozytoseverhalten der Monozyten widerspiegeln. Die Reinheit des Monozytenclusters wurde nicht durch Backgating überprüft (WATZL, 2003a).

Da der Anteil phagozytischer Monozyten nur 90 min nach Konsum von Rotwein erhöht war, nicht aber nach Konsum von entalkoholisiertem Rotwein, könnte der Alkohol im Rotwein für die Reaktion der Monozyten verantwortlich sein. Bei einer Alkoholaufnahme von 24,2 g, einem durchschnittlichen Körperwasseranteil von 62,2% und einem Körpergewicht von 62,2 kg der Probanden in der Gruppe RW (Tab. 6) ist eine Blutalkoholkonzentration von etwa 0,6‰ zu erwarten. Bisher wurde die Wirkung von Alkoholkonsum auf die Phagozytose von Monozyten *ex vivo* nur in einer Studie untersucht und hierbei keine Effekte festgestellt (WATZL et al., 2002), was durch o.g. methodische Schwächen bei der Detektion der Monozyten bedingt sein könnte. Konzentrationen von 1-3,7‰, bei denen teilweise eine Hemmung der Monozyten-Phagozytose *in vitro* auftrat (MØRLAND und MØRLAND, 1984, 1987, 1989; ZUIABLE et al., 1992), wurden in der vorliegenden Studie sicher nicht erreicht. Ob die von DUTHIE et al. (1998) postulierte Steigerung der Absorptionsrate von Polyphenolen durch den Alkohol eine Erklärung für die temporäre Zunahme der Monozyten-Phagozytose 90 min nach Konsum von Rotwein liefert, ist unklar. Unterschiede in der Absorption von Catechin (C_{\max} , t_{\max} , AUC) wurden nach Konsum von entalkoholisiertem Rotwein, dem entweder Wasser oder Alkohol zugesetzt wurde, nicht festgestellt (DONOVAN et al., 1999; BELL et al., 2000), während in einer anderen Studie in Gegenwart von Ethanol die Absorption von Catechin verstärkt wurde (GOLDBERG et al., 2003). Sofern die Konzentration der Polyphenole im Plasma von der Aufnahmemenge abhängig ist, wie inzwischen für Malvidin-3-glucosid (BUB et al., 2001) und Kaffeesäure (SIMONETTI et al., 2001) nachgewiesen wurde, könnte der kurzfristige Anstieg der Monozyten-Phagozytose 90 min nach Konsum von Rotwein auf der 1,7–2,4-fach höheren Flavonoidaufnahme im Vergleich zur Gruppe ERW (Tab. 5) basieren.

Da die Phagozytoserate nur bei Monozyten 90 min nach Konsum von Rotwein anstieg, aber nicht bei Granulozyten, scheint dieser Effekt zellspezifisch zu sein. Ob die kurzfristige

Stimulation der Phagozytose bei Monozyten funktionell von Bedeutung ist und mit einer verstärkten Antigenpräsentation und Stimulation von T-Zellen einhergeht, sollte durch Untersuchungen geeigneter Aktivierungsmarker (z.B. Proliferation, Interleukin-2-Synthese, Expression von CD25, CD45RO) überprüft werden.

6.2.5 Respiratory Burst

Der Respiratory Burst ist Teil des Phagozytoseprozesses, bei dem die Granulozyten und Monozyten durch die Synthese verschiedener ROS zur Vernichtung phagozytierter, pathogener Keime beitragen (KLEIN, 1991; JANEWAY und TRAVERS, 1997). ROS aktivieren dosisabhängig weitere neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (WINN et al., 1991; GAMALEY et al., 1994; MURPHY et al., 1995) und stimulieren die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen (CONNER und GRISHAM, 1996; FORMAN und TORRES, 2001a). Bei neutrophilen Granulozyten induzieren ROS intrazelluläre Redoxveränderungen, die bei diesen Zellen die Apoptose induzieren (KARLSSON und DAHLGREN, 2002; SPLETTSTOESSER und SCHUFF-WERNER, 2002).

In zahlreichen *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass Polyphenole den Respiratory Burst bei humanen neutrophilen Granulozyten und Monozyten hemmen (Tab. 1, Tab. 3). Auch bei einigen niedermolekularen phenolischen Säuren, die bei der Fermentation von Flavonoiden im Kolon entstehen, konnten derartige Effekte auf Neutrophile beobachtet werden (Tab. 2). Ob der Respiratory Burst von Granulozyten und Monozyten auch durch Verzehr von polyphenolreichen Lebensmitteln *ex vivo* beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

Veränderungen beim Anteil burstaktiver Granulozyten und Monozyten traten in der vorliegenden Studie nur in der Gruppe ERW auf. Bei den Granulozyten nahm dieser 360 min nach der Intervention ab (Abb. 9a), während er bei Monozyten 90 min und 360 min nach der Intervention gegenüber dem Ausgangswert erhöht war (Abb. 9b). Da in der Kontrollgruppe keine Effekte beobachtet wurden, können die Veränderungen in der Gruppe ERW mit dem Konsum von entalkoholisierendem Rotwein in Verbindung gebracht werden.

Eine Akkumulation von Polyphenolen in Granulozyten und Monozyten *in vivo* scheint prinzipiell möglich zu sein. Untersuchungen an Liposomen haben gezeigt, dass Polyphenole in der Lage sind, mit Doppellipidmembranen zu interkalieren und diese zu penetrieren (SAIJA et al., 1995). Nach Inkubation von Granulozyten mit Polyphenolen *in vitro* konnten PAGONIS et al. (1986) Polyphenole in spezifischen Granula von neutrophilen Granulozyten nachweisen. Da innerhalb von 6 Stunden nach Konsum von nativem oder entalkoholisierendem

Rotwein nur 0,03% des Malvidin-3-glucosids im Plasma mit dem Urin ausgeschieden wird, wird neben einer möglichen Exkretion mit dem Faezes eine Metabolisierung in der Leber oder der intestinalen Mikroflora eine rasche Akkumulation in verschiedenen Geweben diskutiert (BUB et al., 2001). Dass der Respiratory Burst auch nach Präinkubation von phagozytierenden Zellen mit Polyphenolen *in vitro* gehemmt wird, deutet auf eine zelluläre Anreicherung der Polyphenole hin, die mit funktionellen Änderungen einhergeht (DANIEL et al., 1986; PAGONIS et al., 1986; BLACKBURN et al., 1987). Da Veränderungen beim Respiratory Burst in der vorliegenden Studie bei Monozyten 90 min nach Konsum von entalkoholisierendem Rotwein gerade nachweisbar waren ($p = 0,05$), und nach 360 min sowohl bei Monozyten ($p = 0,011$) als auch bei Granulozyten ($p = 0,037$) auftraten, scheint eine Akkumulation von Polyphenolen eine gewisse Zeit zu erfordern. Diese Hypothese steht in Einklang mit den Ergebnissen von DANIEL et al. (1986), die bei einer längeren Präinkubation der Polyphenole (8 Stunden vs. 4 Stunden) mit Makrophagen eine stärkere Inhibition des Respiratory Burst *in vitro* feststellten.

Da in Bioverfügbarkeitsstudien keine Unterschiede in der Plasma-Konzentration von Catechin, Kaffeesäure, Methylgallussäure und Malvidin-3-glucosid nach Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein (ABU-AMSHA CACCETTA et al., 2000; BUB et al., 2001) bzw. alkohol- gegenüber wasserangereichertem entalkoholisierendem Rotwein (DONOVAN et al., 1999; BELL et al., 2000) beobachtet wurden, stellt sich die Frage, warum Veränderungen beim Anteil burstaktiver Granulozyten und Monozyten nur nach Konsum von entalkoholisierendem Rotwein auftraten und nicht nach Konsum von nativem Rotwein. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine beschleunigte Elimination bzw. renale Ausscheidung von Polyphenolen aus dem Plasma durch den Alkohol. Durch die beschleunigte Elimination wären eine zelluläre Anreicherung von Polyphenolen und dadurch bedingte funktionelle Veränderungen in Gegenwart von Alkohol erschwert. Eine weitere Erklärung basiert auf den prooxidativen Wirkungen des Alkohols. Diese können die antioxidativen Wirkungen der Rotwein-Polyphenole kompensieren (ABU-AMSHA et al., 1996; VAN GOLDE et al., 1999). Damit würde auch die Radikalfängerwirkung der Polyphenole, die u.a. für die Inhibition des Respiratory Burst verantwortlich gemacht wird (PINCEMAIL et al., 1988; ZIELIŃSKA et al., 2000), verloren gehen.

Außerdem stellt sich die Frage, warum nach Konsum von entalkoholisierendem Rotwein der Anteil burstaktiver Granulozyten abnahm, jedoch bei Monozyten anstieg. Eine Hemmung des Respiratory Burst bei Granulozyten *ex vivo* nach Konsum von entalkoholisierendem

Rotwein korreliert mit den Ergebnissen von *in vitro* Studien, bei denen eine Inhibition auch in Gegenwart von Polyphenolen beobachtet wurde (Tab. 1). Die inhibierende Wirkung wurde auch durch niedermolekulare phenolische Säuren hervorgerufen, die beim mikrobiellen Abbau der Polyphenole entstehen (MERFORT et al., 1996; LIMASSET et al., 1999; Tab. 2). Diesen phenolischen Säuren wird aufgrund ihres hohen Anteils an den Polyphenolmetaboliten *in vivo* eine wesentliche physiologische Bedeutung beigemessen (RECHNER et al., 2002). Da eine Hemmung des Burst von Neutrophilen bereits bei 0,25 μM auftrat (MERFORT et al., 1996), also bei physiologisch relevanten Konzentrationen, ist eine Inhibition beim Anteil burstaktiver neutrophiler Granulozyten nach Konsum von entalkoholisierendem Rotwein plausibel. Zur Wirkung von Polyphenolen auf den Burst von humanen Monozyten ist bisher wenig bekannt. *In vitro* Studien wurden nur mit Catechin und Resveratrol durchgeführt, wobei inhibitorische Effekte beobachtet wurden (DANIEL et al., 1986; JANG et al., 1999; Tab. 3). Allerdings ist die physiologische Bedeutung der Ergebnisse von DANIEL et al. (1986) zweifelhaft, da freies Catechin nach Konsum von alkohol- und wasserangereichertem entalkoholisierendem Rotwein nur in Spuren (1-2 nM) im Plasma vorliegt (BELL et al., 2000). Bei DANIEL et al. (1986) wurden jedoch deutlich höhere Konzentrationen (6,9-880 μM) eingesetzt. Außerdem fehlt eine statistische Auswertung. Nach Aufnahme von 25 mg Resveratrol, gelöst in 120 mL Weißwein, wurden im Plasma von gesunden Probanden höchstens 7,1 $\mu\text{g/L}$ freies Resveratrol (\triangleq 0,03 μM) nachgewiesen (SOLEAS et al., 2001; GOLDBERG et al., 2003). Da beim Verzehr von 200 mL Rotwein wesentlich geringere Mengen aufgenommen werden (GOLDBERG et al., 1995), sind Resveratrol-Konzentrationen von 12,5 μM , die bei JANG et al. (1999) eine Hemmung des Bursts von Monozyten *in vitro* hervorriefen, nach Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein im Plasma nicht zu erwarten. Daher sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht als Widerspruch zu den Ergebnissen der beiden *in vitro* Studien zu sehen. Physiologisch bedingte tageszeitliche Schwankungen beim Anteil burstpositiver Monozyten können als Ursache für die Stimulation des Bursts ausgeschlossen werden, da in der Kontrollgruppe keine Veränderungen auftraten.

6.3 Langzeitstudie

6.3.1 Probanden

Die Probanden aller Gruppen waren bzgl. Alter, Größe und sportlicher Aktivität vergleichbar. Lediglich Gewicht und BMI waren in der Gruppe RW höher als in den beiden anderen Gruppen (Tab. 8). Dadurch bedingte Unterschiede in der Stoffwechselaktivität sind jedoch unwahrscheinlich, da die Unterschiede zwischen den Gruppen relativ gering waren und der BMI bei allen Gruppen im Normbereich lag. Dass sich Gewicht und BMI im Verlauf der Studie nicht änderten, zeigt, dass sich die Probanden in allen Gruppen isokalorisch ernährt haben müssen und dass die Energieaufnahme durch die Intervention nicht beeinflusst wurde.

6.3.2 Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme

Die durchschnittliche Energieaufnahme (Tab. 9) lag bei allen Gruppen vor und nach der Intervention unterhalb der Richtwerte, die von der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Ernährung (D-A-CH, 2000) für die Altersgruppe der 19-24 Jährigen (2400 kcal für Frauen, 3000 kcal für Männer) und der 25-50 Jährigen (2300 kcal für Frauen, 2900 kcal für Männer) angegeben wird. Da sich der mittlere BMI in keiner Gruppe veränderte – ein Indikator für eine bedarfsgerechte, d.h. isokalorische Ernährung – muss die Nahrungsaufnahme von den Probanden unterschätzt worden sein („Underreporting“), ein Phänomen, das auch in anderen Studien beobachtet wurde (LIVINGSTONE und BLACK, 2003).

Die Daten zur Alkoholaufnahme zeigen, dass die Probanden entgegen den diätetischen Restriktionen nicht völlig auf alkoholische Getränke verzichtet haben (Tab. 9). Allerdings war die Alkoholaufnahme in der vorliegenden Studie deutlich niedriger als in der Nationalen Verzehrsstudie, bei der für die entsprechende Altersgruppe eine durchschnittliche Alkoholaufnahme von 20,9 g bei Männern und 12,3 g bei Frauen ermittelt wurde (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2000). Da die Alkoholaufnahme nur in der Gruppe RW durch den Verzehr des Studienweins anstieg, aber die Alkoholaufnahme in den Gruppen ERW und in der Kontrollgruppe unverändert blieb (Tab. 9), hat der geringfügige Konsum von alkoholischen Getränken keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Wegen des „Underreporting“ muss man davon ausgehen, dass die tatsächliche Aufnahme an Flavonoiden und Phenolsäuren in allen Gruppen höher war als aufgrund der Protokolle ermittelt wurde (Tab. 10). Da in allen drei Gruppen zu allen Terminen eine zu geringe Zufuhr protokolliert wurde, liegt offenbar ein systematischer Fehler vor, der jedoch die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie nicht beeinflusst. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass eine zusätzliche Flavonoidaufnahme in den Gruppen RW und ERW ausschließlich bei Catechin, Epicatechin, Malvidin und Peonidin beobachtet wurde (Tab. 11), die in den Studiengetränken enthalten waren (Tab. 5). Bei den phenolischen Säuren nahm in den Gruppen RW und ERW erwartungsgemäß nur die Aufnahme an Gallussäure zu (Tab. 12), die im Unterschied zu Kaffee- und p-Cumarsäure fast ausschließlich mit Rotwein aufgenommen wird (RADTKE et al., 1998). Die zusätzliche Aufnahme von Ellag-, Salizyl-, p-Hydroxybenzoesäure und Cyanidin und die reduzierte Aufnahme von Syringasäure und Gallo catechin in der Kontrollgruppe (Tab. 11, Tab. 12) könnte durch einen höheren Verzehr von Beerenobst am Ende der Intervention bedingt sein als vor Studienbeginn, bei gleichzeitigem Verzicht auf Kernobst. Diese Hypothese basiert auf den Angaben von LINSEISEN et al. (1997) und RADTKE et al. (1998), nach denen Ellag-, Salizyl- p-Hydroxybenzoesäure und Cyanidin v.a. mit Beerenobst und Syringasäure wie auch Gallo catechin mit Kernobst zugeführt werden. Da die Studie in der Zeit Mai–Juli durchgeführt wurde, sind diese Veränderungen saisonal bedingt. Die Zunahme der Gesamtphenolaufnahme in allen Gruppen ist auf den relativ hohen Beitrag der Phenolsäuren an der Gesamtphenolaufnahme zurückzuführen (Tab. 10). Die Gesamtphenolaufnahme ist damit kein spezifischer Parameter für die zusätzliche Polyphenolaufnahme durch nativen oder entalkoholisierten Rotwein.

Die Ergebnisse zur Energie-, Alkohol-, Flavonoid- und Phenolsäureaufnahme deuten darauf hin, dass die Ernährungsgewohnheiten der Probanden – abgesehen von einem saisonal bedingten verstärkten Verzehr von Beerenobst auf Kosten von Kernobst in der Kontrollgruppe – während der Studie beibehalten wurden. Damit sind die Voraussetzungen erfüllt, um die Wirkungen einer nutritiven Polyphenolaufnahme durch nativen oder entalkoholisierten Rotwein auf redoxsensitive Immunfunktionen beurteilen zu können.

6.3.3 Apoptose

Veränderungen beim Anteil apoptotischer T-Zellen wurden in keiner Gruppe nach Beendigung der 6-wöchigen Intervention beobachtet (Abb. 10). Im Unterschied dazu stieg die Apoptose von T-Lymphozyten nach mehrwöchigem Konsum von polyphenolreichen Fruchtsäften bei gesunden Probanden an (WINKLER et al., 2003). Da die Polyphenolaufnahme insgesamt, geschätzt anhand der antioxidativen Kapazität von 1 L Fruchtsaft ($\cong 3,07$ mM Troloxäquivalente (TE); ARENDT, 1999) mit der antioxidativen Kapazität von 200 mL Rotwein ($\cong 3,9$ mM TE) und 175 mL entalkoholisierendem Rotwein ($\cong 2,7$ mM TE) vergleichbar waren, könnten die unterschiedlichen Wirkungen von Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein und Säften auf dem unterschiedlichen Polyphenolmuster der Getränke basieren. Möglicherweise wurde die proapoptotische Wirkung nach Fruchtsaftkonsum durch bestimmte Polyphenole hervorgerufen, die in den Säften enthalten waren, aber nicht im Studienwein (z.B. Quercetin). Außerdem könnten auch matrixabhängige Effekte eine Rolle bei der Bioverfügbarkeit der Polyphenole spielen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von mehreren Bioverfügbarkeitsstudien gestützt, die gezeigt haben, dass Catechin und diverse Anthocyanidin-3-glucoside (Peonidin-, Petunidin-, Cyanidin-, Delphinidin-3-glucosid) aus Säften besser bioverfügbar sind als aus Rotwein (FRANK et al., 2003; GOLDBERG et al., 2003). Lediglich bei Malvidin-3-glucosid sind die Ergebnisse kontrovers (BUB et al., 2001; FRANK et al., 2003). Allerdings könnte auch die längere Intervention von 16 Wochen (WINKLER et al., 2003) gegenüber 6 Wochen in der vorliegenden Studie eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der T-Zell-Apoptose geben. Da nach regelmäßigem Konsum eines Obst-Gemüsesaft-Konzentrats in der Studie von WINKLER et al. keine proapoptotischen Effekte messbar waren wie nach Konsum von Fruchtsäften, und mit dem Konzentrat vergleichsweise weniger Polyphenole und mehr antioxidative Vitamine aufgenommen wurden, ist die Wirkung der Fruchtsäfte eher durch die zusätzliche Polyphenolaufnahme und weniger durch Vitamin C zu erklären (WINKLER et al., 2003). Daher kann die unterschiedliche Wirkung von Fruchtsäften gegenüber nativem oder entalkoholisierendem Rotwein nicht auf dem Vitamin C basieren.

In der Untersuchung von WATZL et al. (2003) blieb der Anteil apoptotischer Lymphozyten nach 2-wöchigem Verzehr von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein oder rotem Traubensaft unverändert. Allerdings wurden die Lymphozyten nicht wie in der vorliegenden Studie mit einem T-zell-spezifischen Oberflächenmarker angefärbt (WATZL, 2003b). Ein T-Zellmitogen zur Stimulation der T-Zell-Proliferation - wie bei WINKLER et al. (2003) -

wurde nicht eingesetzt. Auch wenn die T-Lymphozyten im Durchschnitt 72% der gesamten Lymphozytenpopulation ausmachen und damit die größte Lymphozyten-Subpopulation darstellen (COMANS-BITTER et al., 1997), ist es nicht klar, inwieweit die Daten von WATZL et al. (2003) auch das Apoptoseverhalten der T-Lymphozyten repräsentieren. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit denen von WATZL et al. (2003) ist daher nicht möglich.

6.3.4 Phagozytose

Der Anteil phagozytischer Granulozyten und Monozyten *ex vivo* blieb in allen Gruppen unverändert (Abb. 11). Wie kürzlich bekannt wurde, konnten bei einer Untersuchung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung nach täglichem Konsum von 500 mL Rotwein oder von entsprechenden Mengen entalkoholisierten Rotweins, roten Traubensafts und 12%iger Alkohollösung über zwei Wochen keine Veränderungen bei der Phagozytose von Granulozyten und Monozyten festgestellt werden (WATZL et al., 2003). Aufgrund der Tatsache, dass beide Studien trotz unterschiedlicher Interventionsdauer und Verzehrsmenge zu dem gleichen Ergebnis kommen, scheint eine mehrwöchige, regelmäßige Polyphenolaufnahme durch nativen oder entalkoholisierten Rotwein keinen Einfluss auf die Phagozytose der Granulozyten zu haben. Auch bei den Monozyten kommen beide Studien zu denselben Ergebnissen. Sie sind jedoch wegen methodischer Unterschiede bei der Detektion der Monozyten nicht vergleichbar.

6.3.5 Respiratory Burst

In der vorliegenden Studie wurden nach regelmäßigem Konsum von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein keine Veränderungen beim Anteil burstaktiver neutrophiler Granulozyten festgestellt (Abb. 12a). Da der Anteil burstpositiver Monozyten sowohl in der Gruppe RW als auch in der Kontrollgruppe abnahm (Abb. 12b), können diese Veränderungen in der Gruppe RW nicht mit der Intervention in Verbindung gebracht werden.

Bei MERFORT et al. (1996) wurde der Respiratory Burst von neutrophilen Granulozyten *in vitro* durch niedermolekulare phenolische Säuren (Flavonoidmetabolite), die dem Medium in Konzentrationen von 0,25-0,5 μM zugesetzt wurden, gehemmt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Hinblick auf die gewählte Konzentration und des Einsatzes von Metaboliten als physiologisch relevant einzustufen. Diese Konzentrationen sind wahrscheinlich unmittelbar

nach Polyphenolaufnahme im Plasma zu erwarten, aber nicht nach wiederholter Aufnahme im Nüchternplasma. Eine Akkumulation von Polyphenolen im Plasma wurde nach wiederholtem Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln, auch nach Konsum von Rotwein, nachgewiesen (DE VRIES et al., 2001; ARENDT, 2003). Wie in Untersuchungen von BOYLE et al. (2000) gezeigt wurde, sind die Konzentrationen an Quercetin, die nach wiederholter Aufnahme von Rutin im Plasma erreicht werden, im Vergleich zu denen nach einmaliger Aufnahme vergleichsweise gering. Daher war möglicherweise die Konzentration der Polyphenole im Nüchternplasma nach 6-wöchigem Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein zu gering, um den Anteil burstpositiver Granulozyten und Monozyten zu modulieren.

6.4 Schlussbetrachtung

Polyphenole sind Nahrungsmittelinhaltsstoffe, die wegen ihrer potentiell gesundheitsfördernden Wirkungen Gegenstand intensiver Forschung sind. Am besten untersucht sind die antioxidativen Wirkungen, die nicht nur *in vitro*, sondern auch nach Verzehr von polyphenolreichen Lebensmitteln *ex vivo* (Steigerung der antioxidativen Kapazität im Plasma oder Hemmung der Cu^{2+} -induzierten LDL-Oxidation) und *in vivo* (Reduktion oxidierter Verbindungen im Plasma) nachgewiesen wurden. Ob der Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln auch die Funktion von Zellen des Immunsystems beeinflusst, ist weitgehend unbekannt. Die zahlreichen Hinweise auf antiinflammatorische Wirkungen der Polyphenole, die u.a. mit antioxidativen Effekten in Verbindung gebracht werden, basieren ausschließlich auf Ergebnissen von *in vitro* Studien.

Die physiologische Relevanz der meisten Ergebnisse aus *in vitro* Studien ist aus mehreren Gründen fragwürdig. Häufig werden die Wirkungen von Polyphenolen in Konzentrationen untersucht, die durch eine nutritive Polyphenolaufnahme im Plasma – als Höchstgrenze wird 1 μM betrachtet (SCALBERT und WILLIAMSON, 2000) – nicht erreicht werden. Meistens werden die Polyphenole in freier Form eingesetzt, die im Plasma allenfalls in Spuren vorkommen (DONOVAN et al., 1999; SCALBERT und WILLIAMSON, 2000). Untersuchungen zur Wirkung von Polyphenolen auf die T-Zell-Apoptose wurden nahezu ausschließlich an Zelllinien oder entarteten Zellen durchgeführt. Da diese Zellen bzgl. der Apoptose anders auf Polyphenole reagieren als entsprechende Primärzellen (LI et al., 2000), sind sie zur Bewertung von immunmodulierenden Wirkungen bei Gesunden nicht geeignet. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Polyphenole im Zellkulturmedium die Synthese von H_2O_2

induzieren und dadurch Wirkungen hervorrufen, die möglicherweise auf Artefakte zurückzuführen sind. Daher müssen Ergebnisse aus *in vitro* Studien generell als fragwürdig angesehen werden (HALLIWELL et al., 2000; LONG et al., 2000; LAPIDOT et al., 2002). Dies betrifft auch *in vitro* Studien zur immunmodulierenden Wirkung, denn diese Effekte wurden auch bei Verwendung von RPMI, einem Standardmedium für Leukozyten, festgestellt (LONG et al., 2000). Ob auch physiologisch relevante Polyphenolkonzentrationen die H₂O₂-Synthese induzieren, ist nicht bekannt, weil nur höhere Konzentrationen (10-1000 µM bzw. 25-200 µM) eingesetzt wurden. Dies sollte untersucht werden, um grundsätzlich die Tauglichkeit von *in vitro* Studien bei physiologisch relevanten Polyphenolkonzentrationen überprüfen zu können.

Um die Wirkungen einer nutritiven Polyphenolaufnahme auf die Funktion von immunkompetenten Zellen beurteilen zu können, sind Interventionsstudien unerlässlich, da physiologisch relevante Faktoren, z.B. neuroendokrine Interaktionen, Akkumulations- und Adaptationseffekte *in vitro* nicht zum Tragen kommen. Wegen des einfachen Zugangs zu Leukozyten des peripheren Blutes wurden diese Zellen zur Beurteilung der immunmodulierenden Wirkungen herangezogen. Untersucht wurden in der vorliegenden Studie funktionelle zelluläre Parameter, die durch oxidativen Stress aktiviert (T-Zell-Apoptose) oder verstärkt werden (Phagozytose, Respiratory Burst).

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass der Anteil apoptotischer T-Zellen nach *ex vivo* Aktivierung mit PHA weder durch einmalige noch wiederholte Polyphenolaufnahme in Form von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein beeinflusst wurde. Dieses Ergebnis ist positiv zu bewerten, weil Apoptose physiologischerweise bei T-Zellen nach Aktivierung eintritt (KABELITZ et al., 1993) und Veränderungen des Apoptoseverhaltens schwerwiegende Folgen (z.B. Autoimmun-, Tumorerkrankungen bei reduzierter Apoptose, Immunodefizienz durch fortschreitende Depletion von T-Zellen infolge erhöhter Apoptose) (KANNAN und JAIN, 2000) haben könnten. Aufgrund der regulatorischen Bedeutung der T-Zell-Apoptose zum Erhalt der Homöostase kann der Anteil apoptotischer T-Zellen – wie bei WINKLER et al. (2003) – auch infolge einer verstärkten T-Zell-Proliferation, d.h. infolge einer Aktivierung der Zellen, ansteigen. Dies ist ebenfalls als physiologisch einzuschätzen, weil damit langfristig Veränderungen der Homöostase verhindert werden können (WINKLER et al., 2003). Um potentielle Veränderungen des Apoptoseverhalten von T-Zellen bewerten zu können, sollten in künftigen Studien ergänzend Aktivierungsmarker (Proliferation, Interleukin-2) von T-Zellen untersucht werden.

Der Anteil phagozytischer Granulozyten wurde in der vorliegenden Studie weder durch einmaligen noch durch wiederholten Verzehr von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein moduliert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die auch bei Gabe größerer Mengen nativen oder entalkoholisierten Rotweins keine Effekte nach einmaligem und wiederholtem Verzehr feststellen konnten (WATZL et al., 2002; 2003). Daher scheint die Phagozytose von Granulozyten entgegen den Ergebnissen aus *in vitro* Studien nicht durch eine nutritive Polyphenolaufnahme beeinflusst zu werden. Der Anteil phagozytischer Monozyten nahm zwar kurzfristig nach einmaligem Verzehr von Rotwein zu, blieb aber bei wiederholtem Verzehr unverändert. Da die Konzentration der Polyphenole im Nüchternplasma nach wiederholter Aufnahme geringer ist als unmittelbar nach Aufnahme einer Einzeldosis (BOYLE et al., 2000; ARENDT, 2003), und die Wirkung der Polyphenole auf die Phagozytose von Monozyten *in vitro* konzentrationsabhängig ist, ist es denkbar, dass bei regelmäßiger Aufnahme phagozytosemodulierende Konzentrationen nicht erreicht werden. Dies gilt auch für den Respiratory Burst, bei dem die Wirkung der Polyphenole *in vitro* ebenfalls konzentrationsabhängig ist (Tab. 1) und bei dem ebenfalls nur Akuteffekte – wenn auch nur nach Verzehr von entalkoholisierendem Rotwein – auftraten. Darüber hinaus ist es denkbar, dass der Organismus Adaptationsmechanismen aktiviert, um den Anteil phagozytischer und burstaktiver Zellen langfristig auf einem bestimmten Niveau zu halten. Eine Hemmung der Burstaktivität kann die intrazelluläre Abtötung von pathogenen Keimen herabsetzen und darüber hinaus die Apoptose von neutrophilen Granulozyten inhibieren oder verzögern. Dies wäre nach SPLETTSTOESSER und SCHUFF-WERNER (2002) bedenklich, weil bei einer verlängerten Lebenszeit von aktivierten, aber zugleich auch potentiell gefährlichen Zellen die Entzündungsreaktion außer Kontrolle geraten könnte.

Den antioxidativen Wirkungen der Polyphenole, die in zahlreichen Studien nach Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein im Plasma *ex vivo* und teilweise auch *in vitro* beobachtet wurden, wurde eine wichtige Bedeutung in Hinsicht auf die Modulation redoxsensitiver Immunfunktionen beigemessen. Veränderungen bei der T-Zell-Apoptose wurden in der vorliegenden Studie jedoch nicht beobachtet. Auch bei einer erneuten Untersuchung der Daten zur Wirkung eines regelmäßigen Konsums polyphenolreicher Fruchtsäfte auf antioxidative und immunologische Parameter wurden keine Zusammenhänge zwischen den Veränderungen der antioxidativen Kapazität im Plasma (ARENDT et al., 2001) und der Apoptose von PHA-aktivierten T-Zellen (WINKLER et al., 2003) festgestellt. Bei MOSCA et

al. (2002) wurde nach Supplementierung einer antioxidativen Formula ein deutlicher Zusammenhang zwischen der T-Zell-Apoptose und dem Redoxstatus der T-Zellen beobachtet, aber nicht zwischen T-Zell-Apoptose und der antioxidativen Kapazität im Plasma. Demnach scheint für die Wirkung der Polyphenole auf die T-Zell-Apoptose nicht der Redoxstatus im Plasma, sondern, wenn überhaupt, ihr Einfluss auf den intrazellulären Redoxstatus entscheidend zu sein.

Wie inzwischen bekannt ist, werden viele Zellfunktionen des Immunsystems durch ROS moduliert, die Elemente der Signalkaskade oxidieren und damit die Signaltransduktion verändern (Redoxsignaling). Dazu gehört auch die Aktivierung von T-Zellen, die T-Zell-Apoptose sowie die Phagozytose und der Respiratory Burst von Granulozyten und Monozyten (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1997; KANNAN und JAIN, 2000; KNIGHT, 2000; PANI et al., 2000; FORMAN und TORRES, 2001b, PERL et al., 2002). Dies ist nur möglich, weil die Zellen in der Lage sind, ihren Redoxstatus durch entsprechende Regulationsmechanismen aufrechtzuerhalten (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1997; DAVIES, 1999). Daher ist es unwahrscheinlich, dass geringfügige antioxidative Veränderungen im Plasma durch zelluläre Redoxänderungen die Funktion von Zellen beeinflussen. Das gilt umso mehr für starke intrazelluläre Redoxveränderungen, die bei der T-Zell-Aktivierung von den Zellen selbst hervorgerufen werden und apoptotische Veränderungen auslösen. Mit immunmodulierenden Wirkungen, sofern sie durch Veränderungen des zellulären Redoxstatus hervorgerufen werden, ist daher wahrscheinlich nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen an Antioxidantien oder Polyphenolen zu rechnen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Polyphenole bzw. ihre Metabolite unabhängig von antioxidativen Wirkungen mit Elementen der Signalkaskade interagieren und dadurch antiinflammatorische Wirkungen ausüben (FORMICA und REGELSON, 1995; ROBAK und GRYGLEWSKI, 1996; MIDDLETON, 1998; NIJVELDT et al., 2001) oder die Apoptose modulieren (SPENCER et al., 2001b; WINKLER et al., 2003). Nach Einschätzung der Antioxidant Research Group könnten redoxunabhängige Änderungen der Signaltransduktion oder Genexpression eine entscheidende Rolle für die biologischen Wirkungen der Polyphenole spielen (PROTEGENTE et al., 2002). Der Wirkung von natürlichen Antioxidantien, einschließlich des Einflusses polyphenolreicher Lebensmittel auf den zellulären Redoxstatus und das Redox Signaling, sollte im Rahmen der Free Radical Research und damit assoziierten Forschungsrichtungen ein wesentlicher Stellenwert eingeräumt werden (DARLEY-USMAR und STARKE-REED, 2000).

Das Immunsystem ist ein Organsystem, dem eine wesentliche Bedeutung für die Gesundheit des Organismus zukommt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, immunologische Bewertungen bei der Abschätzung der biologischen Wirkungen der Polyphenole zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von nativem und entalkoholisiertem Rotwein auf ausgewählte redox-sensitive Immunfunktionen untersucht und hierbei lediglich Akuteffekte bei der unspezifischen zellulären Abwehr festgestellt, die bei wiederholtem Verzehr jedoch nicht nachweisbar waren. Um zu überprüfen, ob diese Diskrepanzen konzentrationsbedingt sind und möglicherweise auf einer zu geringen Anreicherung von Polyphenolen im Plasma bei wiederholter regelmäßiger Aufnahme basieren, sollten in zukünftigen Studien neben immunologischen Parametern auch Daten zur Bioverfügbarkeit der Polyphenole erhoben werden. Hierbei wäre auch der intrazelluläre Nachweis der Polyphenole wünschenswert. Darüber hinaus könnten ergänzende Untersuchungen zum zellulären Redoxstatus und den Interaktionen zwischen Polyphenolen und Elementen der Signalkaskade zum besseren Verständnis der immunmodulierenden Mechanismen beitragen.

7 Zusammenfassung

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in allen pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommen, in hoher Konzentration im Rotwein. Ihnen werden zahlreiche biologische Wirkungen zugeschrieben, u.a. auch immunmodulierende und antiinflammatorische Wirkungen. Letztere wurden bisher fast ausschließlich *in vitro* nachgewiesen. Ob der Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln redoxsensitive Immunfunktionen beeinflusst, die durch oxidativen Stress initiiert (T-Zell-Apoptose) oder verstärkt (Phagozytose, Respiratory Burst) werden, ist weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine einmalige oder wiederholte Polyphenolaufnahme durch Konsum von Rotwein redoxsensitive Immunfunktionen (T-Zell-Apoptose, Phagozytose und Respiratory Burst von Monozyten und Granulozyten) bei gesunden Nichtrauchern *ex vivo* beeinflusst, und ob entalkoholisierter Rotwein vergleichbare Effekte hat wie nativer Rotwein.

Hierzu wurden zwei prospektive, randomisierte Interventionsstudien durchgeführt mit Parallelgruppenvergleich und dreiarbigem Design. A) 27 Probanden nahmen einmalig morgens nüchtern 200 mL Rotwein (Gruppe RW) oder 175 mL entalkoholisierten Rotwein (Gruppe ERW) oder 200 mL Mineralwasser (Kontrollgruppe) auf. Blutentnahmen wurden vor, 90 und 360 min nach der Intervention durchgeführt. B) 24 Probanden nahmen 6 Wochen lang täglich 200 mL Rotwein, 25 weitere Probanden 175 mL entalkoholisierten Rotwein zu sich. Die 25 Probanden der Kontrollgruppe erhielten kein Studiengetränk. Blutentnahmen erfolgten nüchtern vor Studienbeginn und nach der 6-wöchigen Intervention. Der Nahrungsmittelverzehr wurde jeweils über 7 Tage vor Studienbeginn und in der letzten Interventionswoche in einem standardisierten Ernährungsprotokoll dokumentiert.

Der Anteil an apoptotischen T-Lymphozyten wurde mit dem Annexinbindungstest mit kombinierter DNA-Färbung und simultaner Phänotypisierung in einer Zellsuspension aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes bestimmt. Die Phagozytose von Granulozyten und Monozyten wurde mit Hilfe von Testkits (Phago-, Burstest[®]) im Vollblut gemessen. Die Monozyten wurden hierbei durch Anfärbung mit CD14PE detektiert. Alle immunologischen Untersuchungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Zusätzlich wurden Energie-, Alkohol- und Polyphenolaufnahme ermittelt, um potentielle nutritive Störfaktoren erkennen zu können.

A) Der Anteil apoptotischer T-Lymphozyten nahm nach 360 min in der Gruppe ERW ab, aber auch in der Kontrollgruppe. Der Anteil phagozytischer Granulozyten blieb in allen

Gruppen unverändert, während er bei den Monozyten 90 min nach Konsum von Rotwein anstieg. Der Anteil burstaktiver Zellen wurde nur durch Verzehr von entalkoholisierendem Rotwein beeinflusst, wobei der Anteil bei den Granulozyten 360 min nach Konsum von entalkoholisierendem Rotwein abnahm, und bei den Monozyten kontinuierlich anstieg. B) Der Anteil burstaktiver Monozyten nahm in der Gruppe RW ab, aber auch in der Kontrollgruppe. Alle anderen Immunfunktionen blieben unverändert. Die Aufnahme an Flavonoiden in den Gruppen RW und ERW war während der Intervention durch die zusätzliche Aufnahme von Catechin, Epicatechin, Malvidin und Peonidin mit den Studiengetränken erhöht.

Immunmodulierende Wirkungen, die mit der Intervention in Verbindung gebracht werden können, wurden nur nach einmaligem Konsum von nativem oder entalkoholisierendem Rotwein nachgewiesen. Hierbei wurden bei den Granulozyten antiinflammatorische Effekte beobachtet, die auch *in vitro* beschrieben wurden. Bei den Monozyten zeigten sich proinflammatorische Effekte. Die Wirkungen von nativem im Vergleich zu entalkoholisierendem Rotwein waren verschieden. Diese Unterschiede können jedoch nicht auf den Alkohol zurückgeführt werden, weil die Polyphenolaufnahme mit einer Einzeldosis von entalkoholisierendem Rotwein geringer war als mit einer Einzeldosis von nativem Rotwein.

Warum nach regelmäßigem Konsum von nativem und entalkoholisierendem Rotwein diese Effekte ausblieben, ist nicht klar. Da die Wirkungen der Polyphenole auf Phagozytose und Respiratory Burst *in vitro* dosisabhängig sind, ist es denkbar, dass die Konzentrationen der Polyphenole im Nüchternplasma nach 6-wöchiger Intervention zu gering waren, um den Phagozytoseprozess zu modulieren. Möglicherweise werden auch Adaptationsmechanismen aktiviert, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Ob eine erhöhte nutritive Aufnahme von anderen Flavonoiden, z.B. Flavonolen, ähnliche Effekte auslöst wie die Polyphenole im Rotwein, müsste in Hinblick auf einen möglichen präventiven oder therapeutischen Nutzen der Polyphenole bei chronisch-degenerativen, entzündlichen Erkrankungen in weiteren Interventionsstudien überprüft werden. Um die Interaktion der Polyphenole mit immunkompetenten Zellen bewerten zu können, sind weitere Interventionsstudien erforderlich, bei denen auch die Bioverfügbarkeit der Polyphenole, möglichst auch eine Anreicherung in den Zellen, untersucht werden sollte. Zum Verständnis der Wirkungsmechanismen könnten auch Untersuchungen zum zellulären Redoxstatus sowie zur Interaktion der Zellen mit Elementen der Signalkaskade beitragen.

8 Literaturverzeichnis

ABU-AMSHA R, CROFT KD, PUDDEY IB, PROUDFOOT JM (1996): Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci* 91, 449-458

ABU-AMSHA CACCETTA R, CROFT KD, BEILIN LJ, PUDDEY IB (2000): Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 71, 67-74

AHERNE AS, O'BRIEN NM (2002): Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81

ARENDET BM (1999): Bestimmung des antioxidativen Potentials im Plasma gesunder und HIV-infizierter Personen nach Verzehr polyphenolreicher Getränke im Rahmen einer klinischen Studie. Univ. Bonn, Landwirtschaftliche Fakultät, Diplomarbeit

ARENDET BM, BOETZER AM, LEMOCH H, WINKLER P, ROCKSTROH JK, BERTHOLD HK, SPENGLER U, GOERLICH R (2001): Plasma antioxidant capacity of HIV-seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetable-concentrate rich in polyphenols. *Eur J Clin Nutr* 55, 786-792

ARENDET B (2003): Auswirkungen eines moderaten Konsums von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein auf antioxidative Parameter im Blut und DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten gesunder Proband/inn/en – Ergebnisse einer Interventionsstudie. Univ. Bonn, Landwirtschaftliche Fakultät, Diss.

ARTS ICW, VAN DE PUTTE B, HOLLMAN PCH (2000a): Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem* 48, 1746-1751

ARTS ICW, VAN DE PUTTE B, HOLLMAN PCH (2000b): Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem* 48, 1752-1757

AUKRUST P, SVARDAL AM, MULLER F, LUNDEN B, BERGE RK, UELAND PM, FROLAND SS (1995): Increased levels of oxidized glutathione in CD4+ lymphocytes associated with disturbed intracellular redoxbalance in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 86, 1, 258-267

AUSTRALIAN NUTRITION FOUNDATION (2000): Nutrition Australia. http://www.NutritionAustralia.org/Food_Facts/FAQ/red_wine_and_heart_disease_faq.asp Nov. 2000

BAGGIOLINI M, WYMAN MP (1990): Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem Sci* 15, 2, 69-72

BASSØE C-F, SMITH I, SØRNES S, HALSTENSEN A, LEHMANN AK (2000): Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods* 21, 203-220

BELL JRC, DONOVAN JL, WONG R, WATERHOUSE AL, GERMAN JB, WALZEM RL, KASIM-KARAKAS SE (2000): (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 71, 103-108

BERG PA, DANIEL PT: Effects of flavonoid compounds on the immune response. In: Cody V, Middleton E Jr, Harbone JB, Beretz A (eds.): *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular, and medicinal properties*. Alan R Liss, New York, 1988

BERG AU, BARON DP, BERG PA (1988): Immunoenhancing properties of cyanidanol on responsiveness and function of human peripheral blood T-cells and K-cells. *Int J Immunopharmacol* 10, 387-394

BERTELLI AAE (1999): Recent progress in research on wine and its components and their favorable effects on health. *Drugs Exptl Clin Res* 2/3, 51-52

BERTELLI AAE, FERRARA F, DIANA G, FULGENZI A, CORSI M, PONTI W, FERRERO ME, BERTELLI A (1999): Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: A co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *Int J Tissue React* 21, 4, 93-104

BLACKBURN WD JR, HECK LW, WALLACE RW (1987): The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 144, 3, 1229-1236

BÖHM H (2000): Das Französische Paradoxon – Gesundheit durch Phenole des Weins? *EU* 47, 44-49

BOGDAN C, RÖLLINGHOFF M, DIEFENBACH A (2000): Reactive oxygen and nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 64-76

BOYLE SP, DOBSON VL, DUTHIE SJ, HINSELWOOD DC, KYLE JAM, COLLINS AR (2000): Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr* 54, 774-782

BRATTIG NW, DIAO G-J, BERG PA (1984): Immunoenhancing effect of flavonoid compounds on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Int J Immunopharmacol* 6, 205-215

BRAVO L (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 11, 317-333

BUB A, WATZL B, HEEB D, RECHKEMMER G, BRIVIBA K (2001): Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr* 40, 113-120

BUB A, WATZL B, BLOCKHAUS M, BRIVIBA K, LIEGIBEL U, MÜLLER H, POOL-ZOBEL BL, RECHKEMMER G (2003): Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem* 14, 90-98

BUNDESÄRZTEKAMMER (1991): Deklaration von Helsinki. *Dt Ärztebl* 88, 50, 12, 2927-2928

BUSSE WW, KOPP DE, MIDDLETON E JR (1984): Flavonoid modulation of human neutrophil function. *J Allergy Clin Immunol* 73, 6, 801-809

CAO G, RUSSELL RM, LISCHNER N, PRIOR RL (1998): Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 128, 2383-2390

CARBONNEAU MA, LEGER CL, MONNIER L, BONNET C, MICHEL F, FOURET G, DEDIEU F, DESCOMPS B (1997): Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur J Clin Nutr* 51, 10, 682-690

CARULLI G (1996): Applications of flow cytometry in the study of human neutrophil biology and pathology. *Hematopathol Mol Hematol* 10, 1/2, 39-61

CHAMPAGNE CM, BRAY GA, KURTZ AA, MONTEIRO JB, TUCKER E, VOLAUFOVA J, DELANY JP (2002): Energy intake and energy expenditure: a controlled study comparing dietitians and non-dietitians. *J Am Diet Assoc* 102, 10, 1428-1432

CHOPRA M, FITZSIMONS PEE, STRAIN JJ, THURNHAM DI, HOWARD AN (2000): Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin Chem* 46, 8, 1162-1170

COMANS-BITTER WM, DE GROOT R, VAN DEN BEEMD R, NEIJENS HJ, HOP WCJ, GROENEVELD K, HOOIJKAAS H, VAN DONGEN JJM (1997): Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. *J Pediatr* 130, 388-393

CONNER EM, GRISHAM MB (1996): Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12, 274-277

CORBERAND JX, LAHARRAGUE PF, FILLOLA G (1989): Human neutrophils are not severely injured in conditions mimicking social drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 13, 4, 542-546

D-A-CH (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG, SCHWEIZERISCHE VEREINIGUNG FÜR ERNÄHRUNG): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. D-A-CH (Hrsg). Umschau / Braus. 1. Aufl. Frankfurt am

Main, 2000. 2. korrigierter Nachdruck, 2001

DANIEL PT, FALCIONI F, BERG AUJ, BERG PA (1986): Influence of cyanidanol on specific and non-specific immune mechanisms. *Meth and Exptl Clin Pharmacol* 8, 3, 139-145

DARLEY-USMAR V, STARKE-REED PE (2000): Antioxidants: Strategies for interventions in aging and age-related diseases. *Antioxid Redox Signal* 2, 3, 375-377

DAVIES KJA (1999): The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells. A new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* 48, 41-47

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG: ERNÄHRUNGSBERICHT 2000: Deutsche Gesellschaft für Ernährung (Hrsg): Frankfurt am Main / DGE, 2000

DONOVAN JL, BELL JR, KASIM-KARAKAS S, GERMAN JB, WALZEM R, HANSEN RJ, WATERHOUSE AL (1999): Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129, 9, 1662-1668

DUTHIE GG, PEDERSEN MW, GARDNER PT, MORRICE PC, MC PHAIL DB, STEELE GM (1998): The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 52, 733-736

FORMAN HJ, TORRES M (2001a): Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 22, 4-5, 189-216

FORMAN HJ, TORRES M (2001b): Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 51, 365-371

FORMICA JV, REGELSON W (1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem Toxic* 33, 12, 1061-1080

FORREST VJ, KANG Y-H, MCCLAIN DE, ROBINSON DH, RAMAKRISHNAN N (1994): Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic Biol Med* 16, 6, 675-684

FRANK T, NETZEL M, STRASS G, BITSCH R, BITSCH I (2003): Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 423-435

FUHRMAN B, LAVY A, AVIRAM M (1995): Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 61, 549-554

GAMALEY IA, KIRPICHNIKOVA KM, KLYUBIN IV (1994): Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. *Cell Signal* 6, 8, 949-957

GOLDBERG DM, YAN J, NG E, DIAMONDIS P, KARUMANCHIRI A, SOLEAS GJ, WATERHOUSE AL (1995): A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines. *Am J Enol Vit* 46, 159-165

GOLDBERG DM, YAN J, SOLEAS GJ (2003): Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 36, 79-87

GRAEFE EU, WITTIG J, MUELLER S, RIETHLING A-K, UELEKE B, DREWELow B, PFORTE H, JACOBASCH G, DERENDORF H, VEIT M (2001): Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 41, 492-499

GRESHAM HD, MCGARR JA, SHACKELFORD PG, BROWN EJ (1988): Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen metabolites and is deficient in polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 82, 4, 1192-1201

DE GROOT H, RAUEN U (1998): Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 12, 249-255

HALLIWELL B, CLEMENT MV, RAMALINGAM J, LONG LH (2000): Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 50, 4-5, 251-257

- HASPER HJ, WEGHORST RM, RICHEL DJ, MEERWALDT JH, OLTUIS FMFG, SCHENKEVELD CEI (2000): A new four-color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. *Cytometry* 40, 167-171
- HEILMANN J, MERFORT I (1998): Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharmazie in unserer Zeit* 2, 58-65
- HERAULT O, COLOMBAT P, DOMENECH J, DEGENNE M, BREMOND J-L, SENSEBE L, BERNARD M-C, BINET C (1999): A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. *Br J Haematol* 104, 530-537
- HERTOG MGL, HOLLMAN PCH, KATAN MB (1992): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40, 2379-2383
- HILDEMAN DA, MITCHELL T, TEAGUE TK, HENSON P, DAY BJ, KAPPLER J, MARRACK PC (1999): Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, 735-744
- HILDEMAN DA, MITCHELL T, KAPPLER J, MARRACK P (2003): T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* 111, 5, 575-580
- HIRT W, NEBE T, BIRR C (1994): Phagotest[®] und Bursttest (Phagoburst[®]), Testkits zur Untersuchung von Phagozytosefunktionen. *Wien Klin Wochenschr* 106, 8, 250-252
- HOLLMAN PCH (1997): Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* 51, Suppl 1, S66-S69
- HOLLMAN PCH, VAN TRIJP JMP, BUYSMAN MNCP, VAN DER GAAG MS, MENGELERS MJB, DE VRIES JHM, KATAN MB (1997): Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418, 152-156
- JANEWAY CA, TRAVERS P: *Immunologie*. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997
- JANG D-S, KANG B-S, RYU SY, CHANG I-M, MIN KR, KIM Y (1999): Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol* 57, 705-712
- KABELITZ D, POHL T, PECHHOLD K (1993): Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 339, 14, 338-339
- KANNAN K, JAIN SK (2000): Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 27, 153-163
- KARLSSON A, DAHLGREN C (2002): Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal* 4, 49-60
- KLEIN J: *Immunologie*. 1. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1991
- KNIGHT JA (2000): Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 30, 2, 145-158
- KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CPM, KUIJTEN GAM, KEEHNEN RMJ, PALS ST, VAN OERS MHJ (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 5, 1415-1420
- LAHARRAGUE P, CORBERAND J, FILLOLA G, GLEIZES B, GYRARD E, FONTANILLES AM (1985): Effet de l'éthanol sur les polynucléaires neutrophiles humains. Étude in vitro et in vivo. *Ann Med Interne (Paris)* 136, 3, 210-212
- LAPIDOT T, WALKER MD, KANNER J (2002): Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J Agric Food Chem* 50, 3156-3160
- LEHMANN AK, HALSTENSEN A, BASSØE C-F (1998): Flow cytometric quantification of human opsonin-dependent phagocytosis and oxidative burst responses to meningococcal antigens. *Cytometry* 33, 406-413
- LEHMANN AK, SØRNES S, HALSTENSEN A (2000): Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol*

Meth 243, 229-242

LEIGHTON F, CUEVAS A, GUAS V, PEREZ DD, STROBEL P, SAN MARTIN A, URZUA U, DIES MS, FONCEA R, CASTILLO O, MIZON C, ESPINOZA MA, URQUIAGA I, ROZOWSKI J, MAIZ A, GERMAIN A (1999): Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drug Exptl Clin Res* 25, 2/3, 133-141

LI H-C, YASHIKI S, SONODA J, LOU H, GHOSH SK, BYRNES JJ, LEMA C, FUJIYOSHI T, KARASUYAMA M, SONODA S (2000): Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res* 91, 34-40

LIMASSET B, LE DOUCEN C, DORE JC, OJASOO T, DAMON M, CRASTES DE PAULET A (1993): Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). *Biochem Pharmacol* 46, 7, 1257-1271

LIMASSET B, OJASOO T, LE DOUCEN C, DORÉ J-C (1999): Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. *Planta Medica* 65, 23-29

LINSEISEN J, RADTKE J, WOLFRAM G (1997): Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss* 36, 403-412

LIVINGSTONE MB, BLACK AE (2003): Markers of the validity of reported energy intake. *J Nutr* 133, Suppl 3, 895S-920S

LONG LH, CLEMENT MV, HALLIWELL B (2000): Artefacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 50-53

MANACH C, MORAND C, CRESPIY V, DEMIGNÉ C, TEXIER O, RÉGÉRAT F, RÉMÉSY C (1998): Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426, 331-336

MANCA E, ARANGINO V, LOMBARDINI S, GHIANI A, MUSU D, AMBROSINI B, DEL GIACCO SR, DEL GIACCO GS (1997): Triple-labeling cytofluorimetric quantitative and qualitative evaluation of phagocytic activity of monocytes and polymorphonuclear cells. *Ann NY Acad Sci* 832, 21-28

MARTÍNEZ-LORENZO MJ, ALAVA MA, ANEL A, PIÑEIRO A, NAVAL J (1996): Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. *J Immunol* 89, 511-517

MARTÍNEZ-LORENZO MJ, ANEL A, GAMEN S, MONLÉON I, LASIERRA P, LARRAD L, PIÑEIRO A, ALAVA MA, NAVAL J (1999): Activated human T cells release bioactive fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163, 1274-1281

MATTIVI F, ZULIAN C, NICOLINI G, VALENTI L (2002): Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 957, 37-56

MERFORT I, HEILMANN J, WEISS M, PIETTA P, GARDANA C (1996): Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Medica* 62, 289-292

MIDDLETON E JR, KANDASWAMI C (1992): Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol* 43, 6, 1167-1179

MIDDLETON E JR (1998): Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439, 175-182

MIDDLETON E JR, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52, 4, 673-751

MIYAGI Y, MIWA K, INOUE H (1997): Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* 80, 1627-1631

- MIYAZAWA T, NAKAGAWA K, KUDO M, MURASHI K, SOMEYA K (1999): Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-glucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* **47**, 1083-1091
- MØRLAND B, MØRLAND J (1984): Reduced Fc-receptor function in human monocytes exposed to ethanol in vitro. *Alcohol Alcohol* **19**, 3, 211-217
- MØRLAND B, MØRLAND J (1987): Effects of ethanol on human monocyte IgG Fc receptors. *Scand J Immunol* **26**, 187-192
- MØRLAND H, MØRLAND B (1989): Different effects of ethanol on particle phagocytosis via different receptors in human monocytes. *APMIS* **97**, 853-857
- MOSCA L, MARCELLINI S, PERLUIGI M, MASTROIACOVO P, MORETTI S, FAMULARO G, PELUSCO I, SANTAINI G, DE SIMONE C (2002): Modulation of apoptosis and improved redox metabolism with the use of a new antioxidant formula. *Biochem Pharmacol* **63**, 1305-1314
- MURPHY JK, HOYAL CR, LIVINGSTON FR, FORMAN HJ (1995): Modulation of the alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* **18**, 1, 37-45
- NEBE CT: Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten im Vollblut. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg.): *Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik*. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1994
- NIGDIKAR SV, WILLIAMS NR, GRIFFIN BA, HOWARD AN (1998): Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* **68**, 258-265
- NIJVELDT RJ, VAN NOOD E, VAN HOORN DEC, BOELENS PG, VAN NOVVEN K, VAN LEEUWEN PAM (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**, 418-425
- O'GORMAN MRG: Phagocytic cell functions. II. Adhesion and phagocytosis. In: Rose NR et al. (eds.): *Manual of clinical laboratory immunology*. 5th ed. ASM press, Washington, DC, 1997
- PAGANGA G, RICE-EVANS CA (1997): The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett* **401**, 78-82
- PAGONIS C, TAUBER AI, PAVLOTSKY N, SIMONS ER (1986): Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem Pharmacol* **35**, 2, 237-245
- PANI G, COLAVITTI R, BORRELLLO S, GALEOTTI T (2000): Redox regulation of lymphocyte signaling. *IUBMB Life* **49**, 381-389
- PERL A, GERGELY P, PUSKAS F, BANKI K (2002): Metabolic switches of T-cell activation and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **4**, 427-443
- PIETTA P-G (2000): Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **63**, 1035-1042
- PINCEMAIL J, DEBY C, THIRION A, DE BRUYN-DISTER M, GOUTIER R (1988): Human myeloperoxidase activity is inhibited in vitro by quercetin. Comparison with three related compounds. *Experientia* **44**, 450-453
- PRICOP L, GOKHALE J, REDECHA P, NG SC, SALMON JE (1999): Reactive oxygen intermediates enhance Fcγ receptor signaling and amplify phagocytic capacity. *J Immunol* **162**, 12, 7041-7048
- PRICOP L, SALMON JE (2002): Redox regulation of Fcγ receptor-mediated phagocytosis: Implications for host defense and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* **4**, 1, 85-95
- PROTEGGENTE AR, PANNALA AS, PAGANGA G, VAN BUREN L, WAGNER E, WISEMAN S, VAN DE PUT F, DACOMBE C, RICE-EVANS CS (2002): The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res* **2**, 217-233

- PRUZANSKI W, NITZAN DW, SAITO S (1983): Effects of bioflavonoids on phagocytosis, intracellular bactericidal activity and chemotaxis of human polymorphonuclear cells. *Asian Pacific J Allerg Immunol* 1, 97-103
- RADBRUCH A: Immunofluoreszenz: Färbung - Messung - Datenauswertung. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg.): Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1994
- RADTKE J, LINSEISEN J, WOLFRAM G (1998): Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss* 37, 190-197
- RECHNER AR, KUHNLE G, BREMNER P, HUBBARD GP, MOORE KP, RICE-EVANS CA (2002): The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 33, 2, 220-235
- RENAUD S, DE LORGERIL M (1992): Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523-1526
- RICE-EVANS CA, MILLER NJ, BOLWELL PG, BRAMLEY PM, PRIDHAM JB (1995): The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22, 4, 375-383
- RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G (1996): Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 7, 933-956
- ROBAK J, GRYGLEWSKI RJ (1996): Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol* 48, 555-564
- ROTONDO S, RAJTAR G, MANARINI S, CELARDO A, ROTILIO D, DE GAETANO G, EVANGELISTA V, CERLETTI C (1998): Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 123, 1691-1699
- SAIJA A, SCALESE M, LANZA M, MARZULLO D, BONINA F, CASTELLI F (1995): Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 19, 4, 481-486
- SANBONGI C, SUZUKI N, SAKANE T (1997): Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 177, 129-136
- SCALBERT A, WILLIAMSON G (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S
- SCHMID I, KRALL WJ, UITTENBOGAART CH, BRAUN J, GIORGI JV (1992): Dead cell discrimination with 7-Amino-Actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13, 204-208
- SCHULZE-OSTHOFF K, BAUER MKA, VOGT M, WESSELBORG S (1997): Oxidative stress and signal transduction. *Internat J Vit Nutr Res* 67, 336-342
- SERAFINI M, MAIANI G, FERRO-LUZZI A (1998): Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 128, 1003-1007
- SERAFINI M, LARANJINHA JAN, ALMEIDA LM, MAIANI G (2000): Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 11, 585-590
- SIMONETTI P, GARDANA C, PIETTA P (2001): Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake. *J Agric Food Chem* 49, 5964-5968
- SOLEAS GJ, DIAMANDIS EP, GOLDBERG DM (1997a): Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11, 287-313
- SOLEAS GJ, ELEFTHERIOS PD, GOLDBERG DM (1997b): Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30, 2, 91-113
- SOLEAS GJ, YAN J, GOLDBERG DM (2001): Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and

resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection. *J Chromatogr B* 757, 161-172

SPENCER JPE, SCHROETER H, RECHNER AR, RICE-EVANS C (2001a): Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: Gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxid Redox Signal* 3, 1023-1039

SPENCER JPE, SCHROETER H, KUHNLE G, SRAI SKS, TYRRELL RM, HAHN U, RICE-EVANS C (2001b): Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 345, 493-500

SPLETTSTOESSER WD, SCHUFF-WERNER P (2002): Oxidative stress in phagocytes—"The enemy within". *Microsc Res Tech* 57, 441-455

STEWART AJ, BOZONNET S, MULLEN W, JENKINS GI, LEAN MEJ, CROZIER A (2000): Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agric Food Chem* 48, 2663-2669

SWAIN SD, ROHN TT, QUINN MT (2002): Neutrophil priming in host defense: Role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal* 4, 1, 69-83

TAUBER AI, FAY JR, MARLETTA MA (1984): Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol* 33, 8, 1367-1369

T'HART BA, IP VAI CHING TRAM, VAN DIJK H, LABADIE RP (1990): How flavonoids inhibit the generation of luminol-dependent chemiluminescence by activated human neutrophils. *Chem Biol Interactions* 73, 323-335

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE: Nutrition and your health: Dietary guidelines for Americans. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2000/dietGD.pdf>, November 2000

VAN ENGELAND M, NIELAND LJW, RAMAEKERS FCS, SCHUTTE B, REUTELINGSBERGER CPM (1998): Annexin V-affinity assay: A review on apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9

VAN GOLDE PHM, SLOOTS LM, VERMEULEN WP, WIELDERS JPM, HART HC, BOUMA BN, VAN DE WIEL A (1999): The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis* 147, 365-370

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSBERGER C (1995): A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 184, 39-51

VINSON JA (1998): Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 439, 151-164

DE VRIES JHM, HOLLMAN PCH, VAN AMERSFOORT I, OLTJOF MR, KATAN MB (2001): Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *J Nutr* 131, 745-748

WALMSLEY SL, WINN LM, HARRISON ML, UETRECHT JP, WELLS PG (1997): Oxidative stress and thiol depletion in plasma and peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients: toxicological and pathophysiological implications. *AIDS* 11, 14, 1689-1697

WATERHOUSE AL (2002): Wine phenolics. *Ann NY Acad Sci* 957, 21-36

WATERHOUSE AL, TEISSEDRE P-L: Levels of phenolics in California varietal wines. In: Watkins TR (ed.): *Wine: Nutritional and therapeutic benefits*. ACS Symposium Series 661, American Chemical Society, Washington DC, 1997

WATZL B, LEITZMANN C: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag Stuttgart, 1995

WATZL B, RECHKEMMER G (2001): Phenolsäuren. *EU* 48, 10, 413-416

WATZL B, BUB A, BRIVIBA K, RECHKEMMER G (2002): Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol

has no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Nutr* 47, 264-270

WATZL B (2003a): Persönliches Telefonat am 28.04.2003

WATZL B (2003b): Persönliches Email am 08.05.2003

WATZL B, BUB A, PRETZER G, ROSER S, BARTH S, RECHKEMMER R (2003): Daily moderate amounts of red wine or alcohol have no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Clin Nutr*, in press

WHITEHEAD TP, ROBINSON D, ALLAWAY S, SYMS J, HALE A (1995): Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* 41, 1, 32-35

WINKLER P, ELLINGER S, BOETZER AM, ARENDT BM, BERTHOLD HK, ROCKSTROH JK, SPENGLER U, GOERLICH R (2003): Lymphocyte proliferation and apoptosis in HIV-seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetable-concentrate rich in polyphenols and antioxidant vitamins. *Eur J Clin Nutr*, in press

WINN JS, GUILLE J, GEBICKI JM, DAY RO (1991): Hydrogen peroxide modulation of the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 41, 1, 31-36

ZELLER JM, ROTHBERG L, LANDAY AL (1989): Evaluation of human monocyte oxidative metabolism utilizing a flow cytometric assay. *Clin Exp Immunol* 78, 91-96

ZIELIŃSKA M, KOSTRZEWA A, IGNATOWICZ E (2000): Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochem Cytobiol* 38, 1, 25-30

ZIELIŃSKA M, KOSTRZEWA A, IGNATOWICZ E, BUDZIANOWSKI J (2001): The flavonoids quercetin and isorhamnetin 3-o-acetylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochim Pol* 48, 1, 183-189

ZUIABLE A, WIENER E, WICKRAMASINGHE SN (1992): In vitro effects of ethanol on the phagocytic and microbial killing activities of normal human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Clin Lab Haematol* 14, 2, 137-147

Anhang A

Kurzzeitstudie: Lebensmittel, die jeweils am Tag vor den Untersuchungen erlaubt bzw. zu meiden sind:

erlaubt sind:	zu meiden wären:
Getränke	
Mineralwasser, Fruchtetee, Limonaden	Kaffee, Grüntee, Schwarztee, Kräutertee, Fruchtsaft, Nektare, Fruchtsaftgetränke, Gemüsesäfte, Cola, Bier, Wein, Spirituosen
Brot und Backwaren	
Weißbrot, Brötchen, Toastbrot	Vollkornprodukte
Kuchen, Torten, Kekse	Schokoladenkuchen, -kekse, Vollkornkuchen, Obstkuchen, Lebkuchen
Beilagen	
Polierter Reis	Naturreis, Kartoffeln
Nudeln (Eier-, Hartweizen)	Vollkornnudeln
Fleisch, Wurstwaren, Geflügel	Obst und Gemüse
Eier	Frisch, gefroren, getrocknet, Konserven
Fisch	insbesondere Zwiebeln, Broccoli, Äpfel, Beerenobst, Weintrauben, Zitrusfrüchte
Brotbelag	
Käse (ohne Kräuter)	Käse (mit Kräutern), Vegetarischer Brotaufstrich
Honig	Marmelade, Nuss-Nougat-Creme, Apfelkraut
Milch- und Milchprodukte	
Milchprodukte pur	Milchprodukte mit Früchten oder Kräutern, Kakao, Vanille-, Erdbeer-, Bananenmilch, Schokoladen-, Vanillepudding
Süßwaren und Knabbereien	
Speiseeis	Erdbeer-, Himbeer-, Brombeer-, Schokoladeneis
	Schokolade
Salzstangen, Chips	Nüsse, Erdnussflips
Sonstiges	
Öle und Fette	
Salz, Gewürze, Essig, Zucker	Kräuter
Nahrungsergänzungsmittel	
Eiweißpräparate, Mineralstofftabletten	Vitaminpräparate, Fischöl-, Rotweinkapseln, Grüntee kapseln, Bioaktivstoffpräparate

Anhang B

Ernährungsprotokoll 1 vom bis

Name: _____

ProbandIn Nr. _____

Adresse: _____

Alter (Jahre): _____

Größe (cm): _____

Gewicht zu Beginn: _____ kg

Gewicht am Ende: _____ kg

Protokolltage: _____

Beachten Sie bitte beim Ausfüllen:

1. Nehmen Sie Ihr Ernährungsprotokoll überall mit hin. Notieren Sie bitte alles. Auch z. B. Nüsse, Bonbons und Snacks beim Fernsehen. Versuchen Sie während dieser Woche nicht abzunehmen, aber auch nicht zuzunehmen.
2. Machen Sie jeweils einen Strich für die angegebene Portionsmenge.
3. Die Bezeichnung „Tasse“ ist ein Maß für die Menge, die in eine normale Kaffeetasse passt.
4. Ändern Sie die Mengenbezeichnungen nicht.
5. Geben Sie Ihr Gewicht vor und nach der Woche an.
6. Nach sieben Tagen zählen Sie bitte Ihre Strichlisten zusammen und tragen in die entsprechenden Kästchen die Summe ein.
7. Bei Fruchtsäften, Fruchtnektaren und Fruchtsaftgetränken achten Sie bitte auf die genaue Bezeichnung des Getränks.

Lebensmittel	Anzahl	Summe	Küchen-einheit
Brot			
Graubrot			Scheibe 40 g
Weißbrot, Toast			Scheibe 25 g
1/2 Brötchen			Stück 25 g
1/2 Vollkornbrötchen			Stück 30 g
Vollkornbrot			Scheibe 45 g
Knäcke, Zwieback			Scheibe 10 g
Brotaufstrich			
Butter			Teelöffel 5 g
Margarine			Teelöffel 5 g
Margarine halbfett			Teelöffel 5 g
Wurst			Portion 25 g
Wurst fettreduziert			Portion 25 g
Käse unter 20% Fett			Portion 30 g
Käse 20-40% Fett			Portion 30 g
Käse über 40% Fett			Portion 30 g
Süße Aufstriche			
Honig			Teelöffel 10 g
Nussnougatcreme			Portion 20 g

Konfitüre, Gelee			
Aprikose			Teelöffel 10 g
Pfirsich			Teelöffel 10 g
Sauerkirsche			Teelöffel 10 g
Pflaumen			Teelöffel 10 g
Erdbeeren			Teelöffel 10 g
Himbeeren			Teelöffel 10 g
Brombeeren			Teelöffel 10 g
Heidelbeeren			Teelöffel 10 g
Johannisbeeren rot			Teelöffel 10 g
Johann. schwarz			Teelöffel 10 g
Hagebutte			Teelöffel 10 g
Sonst. Marmeladen			Teelöffel 10 g
Frühstücksallerlei			
Magerquark			Esslöffel 30 g
Speisequark			Esslöffel 30 g
Eier			Stück 60 g
Haferflocken, trocken			Esslöffel 10 g
Müsli, trocken			Esslöffel 15 g
Friskornbrei			Tasse 125 g
Cornflakes, trocken			Tasse 20 g
Frühstückscerealien			Tasse 30 g

Heiße Getränke			
Kaffee			Tasse 150 g
Tee schwarz			Tasse 125 g
Tee grün			Tasse 125 g
Mate-Tee			Tasse 125 g
Pfefferminztee			Tasse 125 g
Kräutertee			Tasse 125 g
Kakao			Tasse 150 g
Malzkaffee			Tasse 150 g
Kondensmilch			Teelöffel 5 g
Milch und Milchprodukte			
Trinkmilch 3,5% Fett			Glas 200 g
Trinkmilch 1,5% Fett			Glas 200 g
Buttermilch			Tasse 150 g
Joghurt mit Früchten 3,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt mit Früchten 1,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt 3,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt 1,5 % Fett			Becher 150 g
Quark mit Früchten			Esslöffel 30 g
Quark mit Kräutern			Esslöffel 30 g
Rahm, Schmand			Esslöffel 25 g
Fleisch, Geflügel			
Kotelett, Schnitzel			Portion 125 g
Steak, Schnitzel natur			Portion 125 g
Putenschnitzel			Stück 125 g
Braten			Portion 125 g
Gulasch, Ragout			Portion 125 g
Bratwurst			Stück 150 g
Würstchen, Bockwurst, Wiener			Stück 125 g
Fleisch-, Kochwurst			Portion 100 g
Frikadelle, Klops			Stück 100 g
Eisbein, Haxe			Portion 130 g
1/2 Hähnchen			Stück 300 g
Leber, Herz, Niere			Portion 125 g
Mett, Gehacktes			Portion 125 g
Tatar, Schabefleisch			Portion 70 g
Speck, Bauchfleisch			Scheibe 50 g
Fisch			
Fisch, gekocht			Portion 150 g
Fisch, gebraten			Portion 150 g
Fischstäbchen			Stück 30 g
Fischkonserve			Dose 180 g
Fisch, geräuchert			Stück 70 g
Rollmops, Matjes			Stück 90 g
Krustentiere			Portion 100 g

Beilagen			
Kartoffeln			Stück 80 g
Kartoffelpüree			Portion 150 g
Klöße, Knödel			Stück 80 g
Bratkartoffeln			Portion 150 g
Pommes frites			Portion 100 g
Kartoffelpuffer			Stück 70 g
Reis, gekocht			Tasse 100 g
Naturreis, gekocht			Tasse 100 g
Eiernudeln, gekocht			Tasse 100 g
Nudeln ohne Ei, gekocht			Tasse 100 g
Vollkornnudeln, gekocht			Tasse 100 g
Soßen			
Bratensoße			Portion 60 g
Tomatensoße			Portion 60 g
Hackfleischsoße			Esslöffel 20 g
Béchamelsoße			Portion 60 g
Pilzsoße mit Sahne			Portion 60 g
Fertig- und Schnellgerichte			
Pizza			Stück 300 g
Döner Kebap			Portion 350 g
Nudelauflauf (Schinken, Käse)			Portion 350 g
Hamburger			Portion 150 g
Gemüseburger			Portion 200 g
Getreidebratling			Portion 200 g
Gemüse			
<i>Blattgemüse</i>			
Spinat tiefgefroren			Portion 150 g
Bleichsellerie			Portion 150 g
Sellerie			Portion 150 g
Mangold			Portion 150 g
<i>Kohl- und Lauchgemüse</i>			
Blumenkohl			Portion 150 g
Broccoli			Portion 150 g
Chinakohl			Portion 150 g
Grünkohl / Braunkohl			Portion 150 g
Kohlrabi			Portion 150 g
Rosenkohl			Portion 150 g
Rotkohl / Blaukraut			Portion 150 g
Weißkohl / Weißkraut			Portion 150 g
<i>Sprossen- und Lauchgemüse</i>			
Artischocken			Portion 150 g
Fenchel			Portion 150 g
Spargel weiß			Portion 200 g
Porree / Lauch			Portion 200 g
Zwiebeln			Portion 30 g

Knoblauch			Portion 2 g
Fruchtgemüse			
Aubergine			Portion 150 g
Okra			Portion 150 g
Paprika grün			Portion 150 g
Paprika gelb			Portion 150 g
Paprika rot			Portion 150 g
Tomaten			Stück 60 g
Wurzel- und Knollengemüse			
Rote Rübe / Rote Bete			Portion 150 g
Weißer Rübe			Portion 150 g
Mohrrübe			Portion 150 g
Pastinake			Portion 150 g
Schwarzwurzel			Portion 150 g
Knollen- / Wurzelsellerie			Portion 150 g
Pilze			
Champignons			Portion 100 g
Sonst. Pilze			Portion 100 g
Hülsenfrüchte			
Bohnen grün gegart			Portion 150 g
Erbsen gegart			Portion 60 g
Wachsbohnen gegart			Portion 150 g
Bohnen dick, Konserve			Portion 150 g
Sojabohnen gegart			Portion 150 g
Bambussprossen gegart			Portion 150 g
Kichererbsen gegart			Portion 150 g
Suppen, Eintöpfe			
Klare Suppe			Teller 300 g
Erbsen-, Linsensuppe, Konserve			Teller 250 g
Champignoncremesuppe			Teller 320 g
Gemüsesuppe (Minestrone)			Teller 350 g
Tomatensuppe			Teller 300 g
Franz. Zwiebelsuppe			Teller 300 g
Eintopf			Teller 450 g
Salat			
Rettich			Portion 150 g
Radieschen			Portion 100 g
Gurke			Portion 100 g
Chicoree			Portion 50 g
Endivien			Portion 50 g
Eisbergsalat			Portion 50 g
Feldsalat (Rapunzel)			Portion 50 g
Kopfsalat			Portion 50 g
Romanasalat			Portion 50 g
Kresse frisch			Portion 150 g
Oliven grün			Portion 20 g

Oliven schwarz			Portion 20 g
Kartoffelsalat			Portion 150 g
Fleischsalat			Portion 50 g
Heringsalat			Portion 50 g
Essiggurken			Portion 100 g
Alkoholfreie Getränke			
Fruchtsaft, Nektar			
Apfel Fruchtsaft			Glas 200 g
Apfel Fruchtnektar			Glas 200 g
Birne Fruchtsaft			Glas 200 g
Birne Nektar			Glas 200 g
Aprikose Nektar			Glas 200 g
Pfirsich Nektar			Glas 200 g
Sauerkirsche Nektar			Glas 200 g
Pflaumen Nektar			Glas 200 g
Himbeere Nektar			Glas 200 g
Traubensaft rot			Glas 200 g
Traubensaft weiß			Glas 200 g
Johannisbeere rot Nektar			Glas 200 g
Johannisbeere schwarz Nektar			Glas 200 g
Holunderbeere Fruchtsaft			Glas 200 g
Ananas Fruchtsaft			Glas 200 g
Ananas Nektar			Glas 200 g
Banane Nektar			Glas 200 g
Mango Fruchtsaft			Glas 200 g
Mango Nektar			Glas 200 g
Maracuja Nektar			Glas 200 g
Orange Fruchtsaft			Glas 200 g
Orange Nektar			Glas 200 g
Grapefruit Fruchtsaft			Glas 200 g
Grapefruit Nektar			Glas 200 g
Gemüsesaft			Glas 200 g
Softdrinks			
Limonaden			Glas 200 g
Diätgetränke			Glas 200 g
Colagetränke			Glas 200 g
Cola light			Glas 200 g
Cola Mix			Glas 200 g
Malzbier			Glas 330 g
Wasser, Mineralwasser			Glas 200 g
Alkoholische Getränke			
Bier			Glas 300 g
Bier alkoholfrei			Glas 300 g
Weißwein			Glas 130 g
Rotwein			Glas 130 g
Roséwein			Glas 130 g
Sekt			Glas 100 g
Apfelwein			Glas 130 g

Likörweine			Glas 50 g
Liköre			Schnapsglas20g
Spirituosen			Schnapsglas20g
Obst			
<i>Kern-, Steinobst</i>			
Apfel			Stück 125 g
Orange / Apfelsine			Stück 150 g
Grapefruit			Portion 125 g
Mandarine, Clementine			Stück 40 g
Birne			Stück 140 g
Quitte			Portion 125 g
Aprikose / Marille			Portion 125 g
Pfirsich			Portion 125 g
Süßkirsche			Portion 125 g
Kirschen Konserve			Portion 125 g
Pflaumen			Portion 35 g
<i>Beerenobst</i>			
Erdbeeren			Portion 125 g
Himbeeren			Portion 125 g
Brombeeren			Portion 125 g
Heidelbeeren			Portion 125 g
Heidelbeeren Konserve			Portion 125 g
Stachelbeeren			Portion 125 g
Weintrauben rot			Portion 125 g
Weintrauben weiß			Portion 125 g
Johannisbeeren rot			Portion 125 g
Johannisbeeren weiß			Portion 125 g
Johannisbeeren schwarz			Portion 125 g
<i>Süd-, Zitrusfrüchte</i>			
Banane			Stück 140 g
Ananas			Portion 125 g
Avocado			Portion 125 g
Granatapfel			Portion 125 g
Mango			Portion 125 g
Kiwi			Portion 125 g
Papaya			Portion 125 g
Wassermelone			Portion 125 g
Zucker- / Honigmelone			Portion 125 g
Zitrone			Portion 125 g
Limette			Portion 125 g
Feige frisch			Portion 20 g
Feige getrocknet			Portion 25 g
Dattel getrocknet			Portion 25 g
Rosinen			Portion 25 g
<i>Süßspeisen</i>			
Milchspeisen (Grießbrei, Milchreis,...)			Portion 250 g
Pfannkuchen			Stück 180 g

pudding			Portion 150 g
Rhabarberkompott			Portion 125 g
Apfelkompott			Portion 125 g
Kuchen, Süßwaren, Knabbereien			
Obstkuchen			Stück 100 g
Trockenkuchen			Stück 70 g
Teilchen			Stück 100 g
Sahne-, Cremetorte			Stück 120 g
Kekse			Stück 5 g
Schlagsahne			Esslöffel 20 g
Eis			Portion 75 g
Bonbon			Stück 5 g
Lakritze			Portion 50 g
Gummibärchen			3 Stück 15 g
Schokolade			Stück 6 g
Schokoriegel (z. B. Mars, Nuts)			Stück 60 g
Pralinen			Stück 13 g
Salzige Knabbereien			Tasse 25 g
Nüsse, Kerne			
Erdnuss			Esslöffel 25 g
Walnüsse			Esslöffel 25 g
Haselnuss			Esslöffel 25 g
Kokosnuss Raspeln			Esslöffel 20 g
Cashewnuss			Esslöffel 25 g
Paranuss			Esslöffel 25 g
Sesam			Esslöffel 20 g
Sonnenblumenkerne			Esslöffel 20 g
Kürbiskerne			Esslöffel 20 g
Gewürze, Soßen			
Jodiertes Salz			Teelöffel 5 g
Zucker			Teelöffel 5 g
Gewürzkräuter			Portion 1 g
Schnittlauch			Portion 5 g
Petersilie			Portion 10 g
Salatsoße			Portion 45 g
Tzatziki			Portion 150 g
Tomatenketchup			Esslöffel 20 g
Senf			Teelöffel 5 g
Mayonnaise			Esslöffel 25 g

Für Lebensmittel, die nicht in dieser Liste aufgeführt sind			
Lebensmittel	Anzahl	Summe	Kücheneinheit

	Flavonoidgehalt (mg/kg bzw. mg/L)											
	Catechin	Cyanidin	Epicatechin	Epigallo- catechin	Gallocatechin	Kämpferol	Malvidin	Myricetin	Naringenin	Peonidin	Petunidin	Quercetin
Gemüse												
Aubergine						0,0						0,0
Blumenkohl						1,0						0,5
Bohnen, grün						6,0						34,0
Bohnen, weiß						0,0		26,0				20,0
Brokkoli						58,0						22,0
Endivie						46,0						1,3
Grünkohl						105,5						60,0
Kopfsalat						1,0						14,0
Möhre								0,0				
Paprika								0,0				
Porree						55,8						5,1
Radieschen						6,2						1,0
Rettich						6,2						0,0
Rosenkohl						7,4						0,5
Rotkohl						0,0						5,1
Schnittlauch						9,3						245,0
Tomate						1,0						8,0
Tomatensaft						0,2		0,0				13,0
Weißkohl						0,7						0,6
Wirsing						2,0						1,0
Zwiebel						1,0						347,0
Tomatensoße						0,1 ^c						6,5 ^e
Tomatensuppe						n.n. ^c						1,1 ^c
Ketchup						0,1 ^c						5,9 ^e
Tomatenpüree						0,6 ^c						29,9 ^e
Getränke												
Rotwein	109,8	1,6	30,7	20,6		0,3	7,4	6,4				5,7
Schokoladenmilch								0,0				1,3
Sherry						0,0						0,2
Schwarzer Tee (Aufguß)	6,1 ^d		26,6 ^d	28,8 ^d	12,6 ^d	13,1		5,7				17,3
Bier	1,7		0,6					0,0				0,0
Weißwein	18,3	0,0	6,6				0,0	0,4				0,0

Alle Angaben stammen aus Linseisen et al. (1997), sofern nicht gesondert gekennzeichnet. ^a arithmetisches Mittel aus 7 verschiedenen Apfelsorten aus Arts et al. (2000a), ^b Arts et al. (2000a), ^c Stewart et al. (2000), ^d arithmetisches Mittel von 8 verschiedenen Schwarztees aus Arts et al. (2000b). n. n. = nicht nachweisbar

	Phenolsäuregehalt (mg/kg bzw. mg/L)							
	p-Cumarsäure	Ellagsäure	Ferulasäure	Gallussäure	p-Hydroxy-benzoesäure	Kaffeesäure	Salizylsäure	Syringasäure
Gemüse								
Artischocke	4,6		1,0			218,9		
Aubergine			8,0			329,5	4,4	
Blumenkohl	18,4		3,7	6,9		4,8	1,6	11,4
Bohnen, grün							1,1	
Brokkoli	8,1		8,3			18,6	6,5	
Brunnenkresse					1,3			
Champignon							12,6	
Chinakohl			1,7	5,2		4,9		4,6
Chicoree						2,2	10,2	
Endivie			1,0			283,9	19,0	
Erbsen							0,4	
Grünkohl	25,0		200,0			210,0	0,0	
Gurke			15,0				7,8	
Kartoffel	1,0					28,3	0,0	
Kopfsalat			1,0			196,8	0,0	
Möhre	1,4		2,0			45,6	2,3	
Olive, grün							12,3	
Porree			4,8				0,8	
Radieschen							12,4	
Rettich							12,4	
Rosenkohl	4,4		3,6			50,4	0,7	
Rote Rübe	5,0		60,0			5,0	2,5	
Rotkohl	62,3		25,3			26,4	0,8	
Sojakeimlinge			0,2	7,0		0,2		
Spinat	54,4		28,8			9,3	5,8	
Tomate	11,0		6,4			23,8	0,9	
Tomatensaft							1,3	
Wirsing	26,8		4,5		0,5	12,8	0,0	
Zwiebel							1,6	
Walnuss		7400,0						
Getränke								
Rotwein	12,4	24,0	0,5	59,5	0,6	7,0		7,0
Vollbier	0,7		1,3			0,2		0,9
Weißbier	0,7		1,3			0,2		0,9
Weißwein	0,5		2,1	3,3		3,9		
Kaffee						631,3		

Alle Daten stammen aus Radtke et al. (1998).

Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

...PD Dr. Roland Goerlich, der die zündende Idee zur Durchführung der Weinstudie hatte und als Doktorvater diese Arbeit betreut hat

...Prof. Dr. Heinrich Enbergs, der durch die Mitnutzung seiner Räumlichkeiten die praktischen Arbeiten überhaupt erst ermöglichte und die Arbeit als Zweitgutachter betreut

...Prof. Dr. Stehle für die konstruktiv kritische Beurteilung des Manuskripts, die vielen guten Ratschläge kurz vor der Abgabe und die Übernahme des Koreferates

...Prof. Dr. Spengler für die Betreuung des Projektes als Prüfarzt

...ganz besonders Dipl.-Oecotroph. Bianca Arendt für die erstklassige Kooperation bei dieser Studie, die sonst in dieser Weise nicht realisierbar gewesen wäre

...Dipl.-Oecotroph. Leonie Geus für die zuverlässige Unterstützung bei der Untersuchung von Phagozytose und Respiratory Burst

...Dipl.-Oecotroph. Klaudia Kekic, die mir in der Kurzzeitstudie bei der Apoptosemessung unter die Arme gegriffen und die unzähligen Ernährungsprotokolle ausgewertet hat

...Birgit Stimper für die zuverlässige Hilfe bei der Zellzahlbestimmung

...Dr. Rolf Fimmers, der mit seinem statistischen Know-how bei der Fallzahlabeschätzung und der Konzeption des Studiendesigns an der Realisierung der beiden Studien beteiligt war

...Dr. Jan-Christian Wasmuth, der stellvertretend für Herrn Prof. Spengler für medizinische Fragen bei der Probandeninformation und der Durchsicht der Fragebögen und Einverständniserklärungen zur Verfügung stand

...Prof. Dr. Helmut Dietrich von der Forschungsanstalt für Weinanalytik und Getränkeforschung, Geisenheim, und seinem Team für die Analyse der Studiengetränke

...Dr. Karl Peter Linscheid, der mich in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie eingewiesen hat und bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand

...Herrn Schmelzer von der Verwaltung der Medizinischen Einrichtungen Bonn, durch dessen Engagement die verwaltungstechnischen Schwierigkeiten beim Abschluss der Probandenversicherung beseitigt und die Studie durchgeführt werden konnte

...der Graduiertenförderung Nordrhein-Westfalen für die Bereitstellung des Stipendiums

...der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal, Marienthal, für die Bereitstellung des Weines

...der Firma Carl Jung GmbH, Rüdesheim, für das Entalkoholisieren des Studienweines

...der Deutschen Weinakademie, Mainz, für die Finanzierung der Probandenversicherung

...den Firmen Rentschler Arzneimittel GmbH, Laupheim, und Roland Arzneimittel GmbH, Hamburg, für die Bereitstellung der Schwangerschaftstests

...der Pressestelle der Universität Bonn, die uns durch den elektronischen Newsletter und die Zeitungsannonce bei der Rekrutierung der Probanden unterstützt hat

...meinen Eltern, die mich bis zum Beginn des Stipendiums finanziell unterstützt haben

...und last but not least natürlich allen Probandinnen und Probanden für die unentgeltliche Teilnahme an der Studie und das Durchhaltevermögen derjenigen, die über 6 Wochen den entalkoholisierten Wein getrunken haben