

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur
Bioverfügbarkeit und intestinalen Absorption
von Quercetin und Quercetinglykosiden**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sandra Landgraf

Apothekerin aus Rendsburg

Kiel 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Prof. Dr. F. Taube

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. S. Wolfram

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. E. Wisker

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2003

für Rüdiger und Lisa

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Struktur, Biosynthese, Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden	3
2.2 Funktion von Flavonoiden in Pflanzen	9
2.3 Wirkungen von Flavonoiden im menschlichen und tierischen Organismus	11
2.3.1 Epidemiologische Studien zum Präventionspotential von Flavonoiden	11
2.3.2 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden	13
2.3.3 Wirkung von Flavonoiden auf Enzyme, Signaltransduktion und Genexpression	15
2.4 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden	19
2.4.1 Intestinale Absorptionsmechanismen von Flavonoiden	24
2.4.2 Metabolisierung und Ausscheidung von Quercetin und Quercetinglykosiden	29
3 Material und Methoden	33
3.1 Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein	33
3.1.1 Zielsetzung	33
3.1.2 Versuch 1	34
3.1.2.1 Versuchstiere und Fütterung	34
3.1.2.2 Durchführung des Versuches 1	35
3.1.3 Versuch 2	36
3.1.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	36
3.1.3.2 Durchführung des Versuches 2	36
3.1.4 Analytik	37
3.1.4.1 Probengewinnung	37
3.1.4.2 Probenaufarbeitung	37
3.1.4.3 HPLC-Methode	38
3.1.4.4 Kalibrierung	39
3.1.4.5 Nachweisgrenze und Wiederfindung	41
3.1.5 Versuchsauswertung	42
3.1.5.1 Pharmakokinetische Parameter	42
3.2 In vitro-Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) vom Schwein	44
3.2.1 Zielsetzung	44
3.2.2 Präparation der Bürstensaummembranvesikel (BSMV)	45
3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der BSMV	46
3.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes	48

3.2.5	Enzymatische Charakterisierung	48
3.2.5.1	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	48
3.2.5.2	Bestimmung der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase-Aktivität	49
3.2.5.3	Anreicherung der Bürstensaummembranen	49
3.2.6	Messung der Substrataufnahme in die BSMV	50
3.2.7	Funktionelle Charakterisierung der BSMV	53
3.2.8	Versuch zur Bestimmung der Stabilität von Quercetin-3-Glukosid im Inkubationsmedium	55
3.2.8.1	Zielsetzung	55
3.2.8.2	Probenaufarbeitung, Analyse und Auswertung	55
3.3	Statistik	56
3.3.1	In-vivo-Versuche zur Bioverfügbarkeit am Schwein	56
3.3.2	In vitro-Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln vom Schwein	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Erster In vivo-Versuch zur Bioverfügbarkeit	58
4.1.1	Applikation von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon, Quercetin-3-Glukosid oder Quercetin-3-Glukorhamnosid	58
4.1.1.1	Jugularvene	58
4.1.1.2	Pfortader	66
4.1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der hohen Dosierung	70
4.1.3	Applikation von 33,1 µmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon, Quercetin-3-Glukosid und Quercetin-3-Glukorhamnosid	70
4.1.3.1	Jugularvene	70
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der niedrigen Dosierung	74
4.2	Zweiter In vivo-Versuch zur Bioverfügbarkeit	74
4.2.1	Applikation von 33,1 µmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-glukosid	74
4.2.2	Applikation von 33,1 µmol Quercetin-3-Glukosid/kg KGW mit Standardfutter im Vergleich zur Applikation mit Hackfleisch	78
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten In vivo-Studie	82

4.3	In-vitro Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln	84
4.3.1	Cis-Inhibition der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid	84
4.3.2	Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Aufnahme von L-Leucin	87
4.3.3	Initialer Zeitverlauf der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart von Na ⁺	88
4.3.4	Versuch zur Bestimmung der Stabilität von Quercetin-3-Glukosid im Inkubationsansatz	90
4.3.5	Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Quercetin-3-Glukosid auf die initiale D-Glukose-Aufnahme	90
4.3.6	Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme	92
4.3.7	Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Transportkinetik von D-Glukose	96
4.3.8	Trans-Stimulation der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid	98
5	Diskussion	101
6	Zusammenfassung	120
7	Summary	122
8	Literaturverzeichnis	123

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturmerkmale einiger Flavonoidunterklassen.....	4
Abbildung 2:	Strukturformeln von Quercetin und Quercetinglykosiden.....	6
Abbildung 3:	Blutprobenentnahme über implantierten Jugularvenenkatheter beim Schwein.....	34
Abbildung 4:	Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung von Quercetin bzw. Isorhamnetin und Tamarixetin im Plasma.....	40
Abbildung 5:	Aufnahme isolierter Bürstensaummembranvesikel (BSMV) mit dem Transmissionselektronenmikroskop.....	47
Abbildung 6:	Zeitlicher Verlauf der D-Glukose-Aufnahme in jejunale BSMV vom Schwein.....	54
Abbildung 7:	Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin, Quercetin-3- Glukosid bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid/kg KGW im Jugularvenenblut.....	60
Abbildung 8:	Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetinmeta- boliten nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin/kg KGW, Quercetin-3-Glukosid/kg KGW bzw. Quercetin-3-Gluko- rhamnosid im Jugularvenenblut.....	61
Abbildung 9:	Vergleich der Gesamtflavonolkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin, Quercetin-3- Glukosid bzw. Quercetin- 3-Glukorhamnosid/kg KGW im Jugularvenenblut.....	63
Abbildung 10:	Vergleich der Quercetinplasmakonzentrations-Zeit-Verläufe in Pfortader- und Jugularvenenblut nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin bzw. Quercetin-3-Glukosid/kg KGW.....	67
Abbildung 11:	Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oralen Gabe von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW bzw. nach 165,4 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-Glukosid.....	72
Abbildung 12:	Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oralen Gabe von 33,1 μmol Quercetin /kg KGW in Form von Quercetinaglykon und Quercetin-3-Glukosid im Jugularvenenblut.....	75

Abbildung 13: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetin-metaboliten nach Gabe von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon und Quercetin-3-Glukosid im Jugularvenenblut.....	77
Abbildung 14: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von 33,1 μmol Quercetin-3-glukosid /kg KGW mit stärkereichem Futter bzw. nach Applikation mit 15g Hackfleisch im Jugularvenenblut.....	79
Abbildung 15: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetin-metaboliten nach Applikation von 33,1 μmol Quercetin-3-Glukosid/kg KGW mit Hackfleisch bzw. Standardfutter im Jugularvenenblut.....	81
Abbildung 16: Cis-Inhibition der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid.....	86
Abbildung 17: Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Gesamtaufnahme von L-Leucin in Gegenwart von Na^+	87
Abbildung 18: Initialer Zeitverlauf der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten.....	89
Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Quercetin-3-Glucosid auf die Na^+ -abhängige D-Glukose-Aufnahme.....	91
Abbildung 20: Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme unter Na^+ -haltigen Bedingungen.....	94
Abbildung 21: Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme unter Na^+ -freien Bedingungen.....	95
Abbildung 22: Einfluss von Quercetin-3-Glukosid (Isoquercitrin) auf die Transportkinetik von D-Glukose.....	97
Abbildung 23: Cis-Inhibition und Trans-Stimulation.....	99
Abbildung 24: Trans-Stimulation der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid.....	100
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Absorptionsmechanismen der untersuchten Quercetinglykoside.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Durchschnittliche Flavonoidgehalte einiger Nahrungsmittel.....	7
Tabelle 2:	Geschätzte tägliche Aufnahmen an Flavonolen und Flavonen in verschiedenen Ländern.....	9
Tabelle 3:	Zusammenfassung prospektiver epidemiologischer Studien zur Aufnahme von Flavonolen und Flavonen und dem Mortalitätsrisiko für Herzinfarkt und Schlaganfall.....	12
Tabelle 4:	Wiederfindung von Quercetin und Metaboliten.....	41
Tabelle 5:	Proteingehalt, spezifische Enzymaktivitäten und Anreicherungsfaktoren in Homogenat und BSMV aus mittlerem Jejunum vom Schwein.....	50
Tabelle 6:	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nach Gabe von 165,4 µmol Quercetin, Quercetin-3-Glukosid bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid/kg KGW.....	65
Tabelle 7:	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin und Quercetinmetaboliten nach Applikation von 165,4 µmol Quercetin/KGW als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-Glukosid in Portader- und Jugularvenenblut.....	69
Tabelle 8:	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nach hoher (165,4 µmol Quercetin / KGW) und niedriger (33,1 µmol Quercetin/KGW) Dosierung in der Jugularvene.....	73
Tabelle 9:	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nach Gabe von 33,1 µmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon und Quercetin-3-Glukosid.....	78
Tabelle 10:	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nach Applikation von 33,1 µmol Quercetin-3-Glukosid/kg KGW mit Standardfutter und nach Applikation mit 15g Hackfleisch in der Jugularvene.....	82
Tabelle 11:	Apparente kinetische Parameter der D-Glukoseaufnahme in Ab- und Anwesenheit von Quercetin-3-Glukosid.....	98
Tabelle 12:	Vergleich der aus der vorliegenden Untersuchung erhaltenen maximalen Quercetinplasmakonzentrationen im Vergleich zu Literaturdaten unter Berücksichtigung der Dosierung und Applikationsart.....	107

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the curve
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator-Proein-1
BSMV	Bürstensaummembranvesikel
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -Aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinylethansulfonsäure
I. E.	Internationale Einheiten
KGW	Körpergewicht
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
MDG	α -Methyl-D-Glukopyranosid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MRP2	Multidrug Restistance Associated Protein 2
mU/mg	milli Units/Milligramm (Einheit für Enzymaktivität)
NF κ B	Nuclear-Factor-Kappa-B
ng	Nanogramm
pmol	Pikomol
PSMF	Phenylmethyl-Sulfonyl-Flourid
Q-3-Glc	Quercetin-3-O-Glukosid
Q-3-Glc-Rha	Quercetin-3-O-Glukorhamnosid
R ²	Bestimmtheitsmaß
R	Linearer Korrelationskoeffizient
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SGLT1	Sodium depend glucose transporter 1
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

Die zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählenden Flavonoide sind nahezu in allen höheren Pflanzen vorkommende polyphenolische Verbindungen und werden somit sowohl vom Menschen als auch vom Tier mit der Nahrung aufgenommen. In der Pflanze und in pflanzlichen Lebensmitteln liegen Flavonoide überwiegend als Glykoside vor, wobei Mono-, Di-, oder z. T. auch Oligosaccharide meist β -glykosidisch an das Aglykon geknüpft sind. Zahlreiche *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass Flavonoide, insbesondere Quercetin, eine Vielzahl verschiedener biologischer Effekte besitzen. Sie wirken v. a. als Antioxidantien und Radikalfänger. Außerdem sind sie in der Lage, verschiedene Schlüsselenzyme wie z. B. Phospholipasen, Protein-Tyrosinkinasen, sowie redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF κ B und AP-1, zu beeinflussen. Hauptsächlich aufgrund der antioxidativen Eigenschaften wird im Zusammenhang mit den sogenannten „Free Radical Diseases“ wie z. B. Arteriosklerose und damit verbundenen Herz-Kreislaufkrankungen oder bestimmten Tumorformen, eine protektive Wirkung der Flavonoide diskutiert, wobei der protektive Effekt bei Herz-Kreislaufkrankungen in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen wurde.

Vorraussetzung für sämtliche systemische Wirkungen *in vivo* ist eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit, d. h. das Flavonoid muss nach oraler Aufnahme absorbiert werden, sich im Organismus verteilen und so letztlich systemisch verfügbar werden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetinmonoglukosiden höher ist als nach Gabe des Aglykons bzw. Glukorhamnosids. Als mögliche Erklärung dafür wird u. a. eine Beteiligung des in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierten Na⁺-abhängigen Glukose-transporters (SGLT1) bei der Absorption von Quercetinglukosiden diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einerseits die Bioverfügbarkeit von Quercetin und Quercetinmetaboliten nach oraler Applikation verschiedener Quercetinquellen (Quercetinaglykon, Quercetin-3-O-Glukosid bzw. Quercetin-3-Gluko-

rhamnosid) in einer Studie am Schwein *in vivo* zu vergleichen sowie die auftretenden Quercetinmetaboliten qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Andererseits sollten Erkenntnisse zum möglichen Transport von Quercetinglukosiden über den SGLT1 *in vitro* anhand von Versuchen mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln gewonnen werden. Die Untersuchungen wurden im Wesentlichen mit dem Flavonol Quercetin und einigen seiner Glykoside durchgeführt, da diese Verbindungen zu den häufigsten und wirksamsten Flavonoiden zählen.

2 Literaturübersicht

2.1 Struktur, Biosynthese, Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden

Flavonoide sind im Pflanzenreich ubiquitär vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Sie gehören neben Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen zur großen Gruppe der pflanzlichen Polyphenole (SCALBERT & WILLIAMSON 2000). Flavonoide sind durch ein Phenylchromangrundgerüst, bestehend aus drei aromatischen Ringen A, B und C, gekennzeichnet. Ring A ist mit einem O-haltigen heterocyclischen Ring C kondensiert, der in Position 2 einen Phenylrest (Ring B) aufweist (Abbildung 1).

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt durch stufenweise Kondensation einer aktivierten Hydroxyzimtsäure (C-6-C-3-Einheit) mit drei Molekülen Malonyl-Coenzym A (liefert C-2-Einheit) zu einem Chalkon (C-15-Einheit). Dabei wird die Hydroxyzimtsäure aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, dem Endprodukt des sogenannten Shikimisäure-Weges, in der Pflanze synthetisiert. Vom Chalkon ausgehend werden durch anschließenden Ringschluss und verschiedene Hydroxylierungen, Oxidationen und Reduktionen letztlich die Verbindungen der unterschiedlichen Flavonoidunterklassen gebildet (SHIRLEY 1996, SALUNKHE et al. 1990, AISLING AHERNE & O'BRIEN 2002).

Abhängig von Hydroxylierungsgrad, Oxidationsgrad des Ringes C, Art der Substituenten und Polymerisierungsgrad werden die Flavonoide in insgesamt 16 Unterklassen eingeteilt (BORS et al. 1992, AGULLO et al. 1996, BRAVO 1998, BERHOW & VAUGHN 1999). Strukturmerkmale der Untergruppen der Flavonole, Flavone, Flavanole, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavone, die sich nur durch Variation des heterocyclischen Ringes C unterscheiden, sind in Abbildung 1 dargestellt.

Neben Flavonolen sind auch Flavone im Pflanzenreich weit verbreitet (HOLLMAN & ARTS 2000, AISLING AHERNE & O'BRIEN 2002). Flavonole sind gekennzeichnet durch eine Doppelbindung zwischen dem C-2 und C-3-Atom und eine Hydroxygruppe in Position 3 des C-Rings. Im Gegensatz zu den Flavonolen weisen die Flavone keine Hydroxygruppe am C-3-Atom auf. Die am weitesten verbreiteten und häufigsten Flavonole sind Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon) und Kämpferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon) (HERRMANN 1988, 1990).

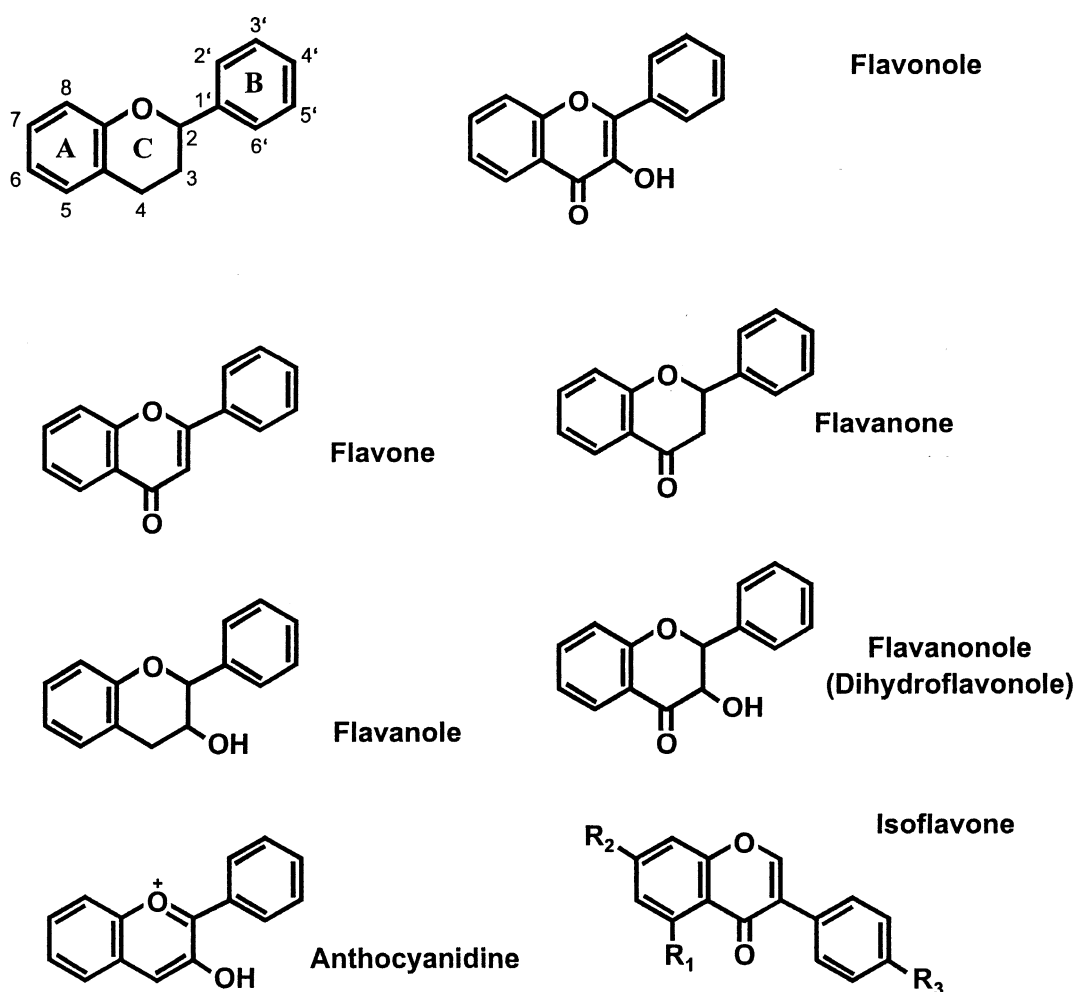


Abbildung 1: Strukturmerkmale einiger Flavonoidunterklassen

In der Natur liegen die Flavonoide fast ausschließlich in Form von Glykosiden vor, wobei in der Gruppe der Flavonole hauptsächlich O-Glykoside vorkommen. Die bevorzugte Position für die Glykosilierung in der Pflanze ist die Hydroxygruppe in C-3-Position, daneben kommen aber auch Glykosilierungen am C-7- und C-4'-Atom vor. Als Zuckerrest sind dabei Glukose, Galaktose, Rhamnose, Xylose und Arabinose in Form von Mono-, Di- oder Oligosacchariden meist β -glykosidisch mit dem Aglykon verknüpft. Allein 179 verschiedene Glykoside des Quercetins wurden bislang identifiziert, darunter häufig vorkommend Quercetin-3-Glukosid (=Isoquercitrin) und Quercetin-3-Glukorhamnosid (=Rutin) (WILLIAMS & HARBORNE 1994). Abbildung 2 zeigt die Struktur des Quercetins und der genannten Quercetinglykoside. Bei den Flavonen, Isoflavonen u. a. kommen hingegen auch C-Glykoside vor (SALUNKHE et al. 1990, BRAVO, 1998, HOLLMAN & ARTS 2000). Die Glykosilierung erhöht die Löslichkeit der Flavonoide im Zellsaft der Pflanze und stabilisiert sie gegenüber Licht und enzymatischen Abbauvorgängen (SALUNKHE et al. 1990, AHERNE & O'BRIEN 2002).

Bislang wurden über 6000 verschiedene, natürlich vorkommende Flavonoide identifiziert, wobei die große Zahl an Einzelsubstanzen vor allem auf den unterschiedlichen Glykosilierungsmustern beruht (HARBORNE & WILLIAMS 2000). Besonders die Flavonoidgehalte von Pflanzen, die der menschlichen Ernährung dienen, sind zumindest teilweise genauer untersucht. Einen besonders hohen Flavonoidgehalt weisen z. B. Zwiebeln, Brokkoli, Äpfel, Aprikosen, Tomaten, Johannisbeeren, grüner Kopfsalat, Tee und Rotwein auf (HERRMANN 1988, 1990, HERTOOG, HOLLMAN & KATAN 1992, DUTHIE et al. 2000, HOLLMAN & ARTS 2000, BÖHM et al. 1998, BÖHM 2000). Dabei kommen einige Flavonoidunterklassen bevorzugt in bestimmten Pflanzengruppen vor: Flavone sind hauptsächlich in Getreide und Kräutern (HERRMANN 1995), Flavanone vor allem in Zitrusfrüchten, Isoflavone fast ausschließlich in Leguminosen, wie z. B. in Sojabohnen, zu finden (BRAVO 1998). Hohe Konzentrationen an Anthocyanidinen treten z. B. in Beeren und Pflaumen auf (HERRMANN 1990, HÄKKINEN et al. 1999). Flavanole (Catechine und Epicatechine) kommen hauptsächlich in Tee, Rotwein und Obst vor. Flavonole sind in fast allen Pflanzen, v.a. in Obst und Gemüse, zu finden, wobei Quercetin und Kämpferol bzw. deren Glykoside, wie schon erwähnt, die am häufigsten vorkommenden Flavonole sind (HERTOOG et al. 1993b, HERRMANN

1988). Tabelle 1 zeigt die Flavonoidgehalte einiger ausgewählter Nahrungsmittel pflanzlichen Ursprungs (nach HERTOOG et al. 1992, CROZIER et al. 1997, HOLLMANN & ARTS 2000).

Innerhalb einer Pflanzenart sind jedoch z. T. große Schwankungen der Flavonoidkonzentration je nach Sorte, Standort, Reifegrad und Behandlungs- sowie Lagerungsbedingungen zu beobachten (CROZIER et al. 1997, DUTHIE et al. 2000). So reduzierte z. B. das Trocknen von Zwiebeln den Gehalt von Quercetin-4'-Glukosid um circa 50 %, während durch Kochen oder Einfrieren ein Verlust von 25 % zu beobachten war. Bei keiner der Behandlungen wurde eine Zunahme des Gehaltes an freiem Quercetin gemessen (PRICE et al. 1997).

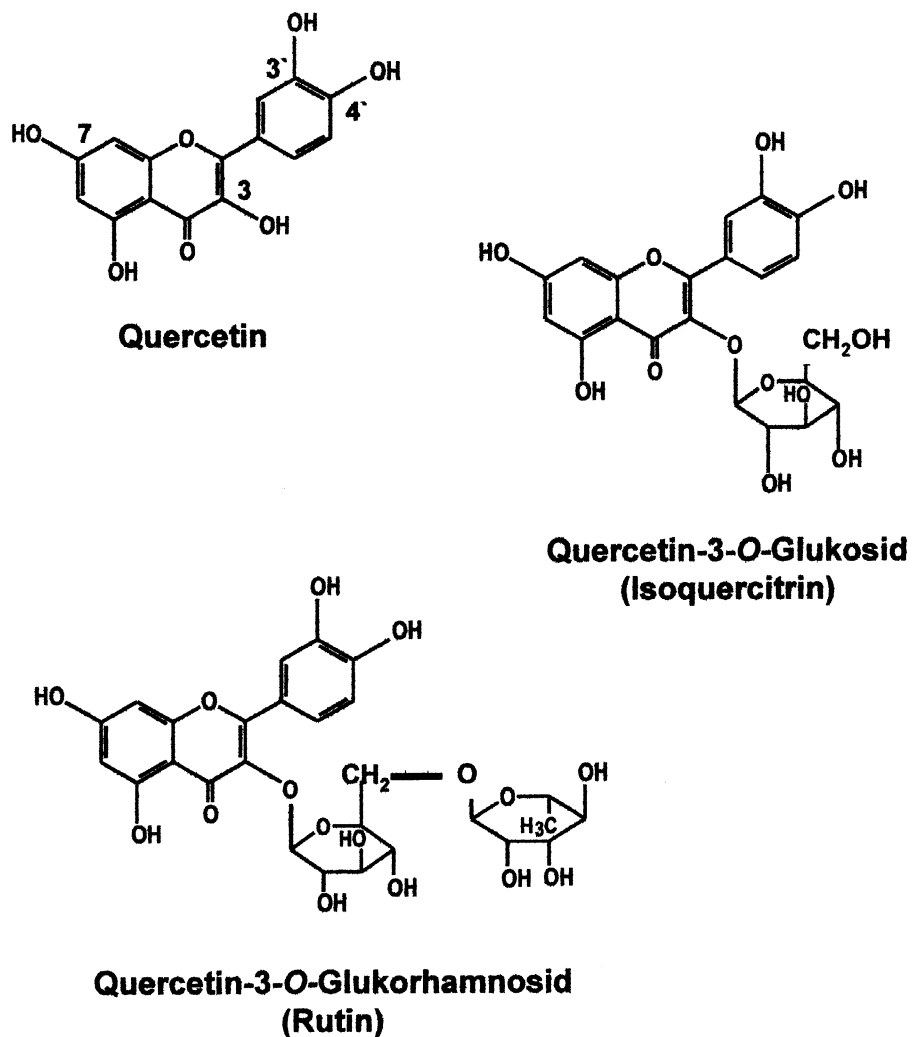


Abbildung 2: Strukturformeln von Quercetin und Quercetinglykosiden

Tabelle 1: Durchschnittliche Flavonoidgehalte einiger Nahrungsmittel (*Nachweis der Aglyka nach Hydrolyse der Glykoside)

Nahrungsmittel	Flavonoid	Flavonoidunterklasse	Gehalt ¹⁾
Äpfel	Quercetin*	Flavonol	20-36 ⁴⁾
	(+)-Catechin	<i>Flavanol</i>	0-17 ⁴⁾
	(-)-Epicatechin	<i>Flavanol</i>	2-101 ⁴⁾
Aprikosen	Quercetin*	Flavonol	25-26 ⁴⁾
	(+)-Catechin	<i>Flavanol</i>	26-57 ⁴⁾
	(-)-Epicatechin	<i>Flavanol</i>	67-17 ⁴⁾
Bohnen (grün)	Quercetin*	Flavonol	39 ⁴⁾
	Kämpferol*	Flavonol	<12 ⁴⁾
Brokkoli	Quercetin*	Flavonol	30-37 ²⁾
	Kämpferol*	Flavonol	60-72 ²⁾
Johannisbeere (schwarz)	Quercetin*	Flavonol	37 ⁴⁾
	Kämpferol*	Flavonol	1 ⁴⁾
Salat (grün)	Quercetin*	Flavonol	147 ³⁾
Staudensellerie	Luteolin*	Flavon	200 ⁴⁾
	Apigenin*	Flavon	750 ⁴⁾
Tomaten	Quercetin*	Flavonol	2-14 ²⁾
Zwiebel	Quercetin*	Flavonol	342 ³⁾
Tee (schwarz)	Quercetin*	Flavonol	14-17 ⁴⁾
	Kämpferol*	Flavonol	14-16 ⁴⁾
	Myricetin*	Flavonol	3 ⁴⁾
	(-)-Epicatechin	<i>Flavanol</i>	31-79 ⁴⁾
Rotwein	Quercetin*	Flavonol	8,3 ⁴⁾
	Myricetin*	Flavonol	7,9 ⁴⁾
	(+)-Catechin	<i>Flavanol</i>	0-208 ⁴⁾
	(-)-Epicatechin	<i>Flavanol</i>	15-88 ⁴⁾

¹⁾ Angaben in mg/kg bzw. mg/l Frischsubstanz, nur essbare Anteile berücksichtigt

²⁾ Hertog et al. (1992), ³⁾ Crozier et al. (1997), ⁴⁾ Hollman & Arts (2000)

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens werden Flavonoide mit nahezu jedem pflanzlichen Nahrungsmittel aufgenommen. Die tägliche Aufnahme ist dabei abhängig von der Art der Ernährung bzw. von den verwendeten Nahrungsmitteln und daher schwer zu bestimmen.

KÜHNAU (1976) schätzte die tägliche Gesamtflavonidaufnahme in den Vereinigten Staaten auf 1 g, wobei 115 mg auf die Unterklasse der Flavone und Flavonole entfallen. Neuere Untersuchungen beziffern die durchschnittliche Flavon- und Flavonolaufnahme in den Niederlanden auf 23 mg pro Tag (HERTOG et al. 1993a), wobei der Anteil an Quercetin ca. 16 mg pro Tag (entspricht ca. 50 μmol) betrug. Die durchschnittliche tägliche Flavonolaufnahme pro Person in Bayern liegt nach LINSEISEN et al. (1997) bei ca. 12 mg, wobei Quercetin mit 10,3 mg pro Tag den Hauptanteil ausmacht. Die Zufuhr von Flavonoiden erfolgt im europäischen Raum hauptsächlich durch Zwiebeln, Äpfel, Beeren, Tee und Rotwein. Weitere tägliche Aufnahmen von Flavonolen und Flavonen, die u. a. in epidemiologischen Studien in verschiedenen Ländern ermittelt bzw. zugrunde gelegt wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Geschätzte tägliche Aufnahmen an Flavonolen und Flavonen in verschiedenen Ländern

Land	Tägliche Aufnahme in mg / Tag	Flavonoidquelle
BRD (nur alte Bundesländer)	11,5 ²	Obst und Gemüse, v. a. Zwiebeln, Tee
Niederlande	23 ³ , 33 ¹	Tee, Zwiebeln, Äpfel
Finnland	6 ¹ , 0-41 ⁴	Obst und Gemüse, v. a. Beeren
Griechenland	16 ¹	Obst und Gemüse, v. a. Zwiebeln
Japan	64 ¹ , 17 ⁵	Tee
Italien	27 ¹	Rotwein, Obst und Gemüse
USA	13 ¹ , 20 ⁶	Zwiebeln, Tee

¹ HERTOOG et al. 1995, ² BÖHM et al. 1998, ³ HERTOOG et al. 1993a, ⁴ KNEKT et al. 1996, ⁵ ARAI et al. 2000, ⁶ RIMM et al. 1996

2.2 Funktion von Flavonoiden in Pflanzen

Flavonoide sind in den Photosynthese betreibenden Zellen aller höheren Pflanzen zu finden, da ihre Hauptaufgabe in der Katalyse von Elektronentransportprozessen während der Lichtphase der Photosynthese liegt (DAS 1994). Nach dem Absterben der photosynthetisierenden Zellen werden die in ihnen enthaltenden Flavonoide freigesetzt und gehen als sekundäre Metaboliten in verschiedene Flüssigkeitskompartimente, Wachse und Harze der Pflanze über (DAS 1994). Deshalb sind besonders hohe Konzentrationen an Flavonoiden in äußeren, dem Licht zugewandten Schichten, wie die Blattepidermis sowie Blüten und Früchten der Pflanze zu finden (SHIRLEY 1996).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass Flavonoide eine wichtige Rolle beim Schutz der Pflanze vor Schädigungen durch UV-Strahlung spielen. Das Absorptionsmaximum zahlreicher Flavonoide liegt im UV-B-Bereich, so dass die Substanzen als effektive UV-B-Filter wirken. Einige Untersuchungen zeigen, dass Pflanzen auf UV-B-Strahlung mit einer gesteigerten Synthese von Flavonoiden reagieren (SHIRLEY 1996, BERHOW & VAUGHN 1999, HARBORNE & WILLIAMS 2000).

Des Weiteren tragen bestimmte Flavonoidunterklassen zur charakteristischen Färbung von Blütenblättern, Pollen, Früchten und Herbstlaub bei. Die Untergruppe der Anthocyanidine ist z. B. für blaue, violette oder rote, die Untergruppe der Flavonole für gelbe Farbtöne verantwortlich (HARBORNE & WILLIAMS 2000, SCALBERT & WILLIAMSON 2000). Da die Färbung der Blüten für das Anlocken von pollensammelnden Insekten bzw. Vögeln wichtig ist, spielen die Flavonoide somit eine zentrale Rolle bei der Fortpflanzung der jeweiligen Pflanzenart (DAS 1994, HARBORNE & WILLIAMS 2000). Bei bestimmten Pflanzenarten wurde außerdem gezeigt, dass Flavonoide auch einen direkten Einfluss auf die Fertilität von Pollen besitzen (SHIRLEY 1996).

Eine weitere Funktion der Flavonoide ist die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen durch Auxine, da sie den Auxinspiegel in der Pflanze kontrollieren (FORMACIA & REGELSON 1995, BROWN et al. 2001).

Darüber hinaus spielen Flavonoide eine wichtige Rolle bei der gegenseitigen Beeinflussung von Pflanzen und Mikroorganismen. Sie stellen dabei sowohl Abwehrstoffe gegen pathogene Bakterien, Viren und Pilze als auch Signalstoffe für bestimmte nützliche Mikroorganismen dar. So geben Pflanzen aus der Familie der Leguminosen bestimmte Flavonoide, z. B. Genistein, über ihre Wurzeln ab und regen dadurch symbiotische Bakterien der Familien *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* zur Synthese sogenannter Nodulationsfaktoren an. Diese Faktoren führen zur Knötchenbildung der Wurzeln, in denen die Pflanze mit Hilfe der Bakterien Stickstoff fixieren können (SHIRLEY 1996, KNEER 1999). Eine Abwehrfunktion von Flavonoiden besteht darin, dass sie zum einen als Fraßhemmer gegenüber Pflanzenschädlingen wirken und zum anderen bei Befall der Pflanze mit pathogenen Bakterien, Pilzen oder Viren deren Wachstum und Vermehrung hemmen. So induziert der Befall der Pflanze

mit pathogenen Erregern eine vermehrte Synthese von Flavonoiden (SHIRLEY 1996, BERHOW & VAUGHN 1999).

2.3 Wirkungen von Flavonoiden im menschlichen und tierischen Organismus

2.3.1 Epidemiologische Studien zum Präventionspotential von Flavonoiden

Es ist seit langem bekannt, dass Nahrungsmittel pflanzlichen Ursprungs z. T. einen hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen enthalten, die das Risiko für das Auftreten sogenannter „Free Radical Diseases“, wie z. B. Arteriosklerose und damit verbundenen Herz-Kreislaufkrankungen oder bestimmter Tumorformen, möglicherweise reduzieren (BLOCK et al. 1992, GREY 1995, KROMHOUT 1999, PIETTA 2000). Obwohl eine Wirkung von Flavonoiden bei der Prävention von mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehenden Herz-Kreislaufkrankungen noch nicht eindeutig belegt ist, weist die Mehrzahl der epidemiologischen Studien auf eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens dieser Erkrankungen und der Flavonoidaufnahme hin (HIRVONEN 2001, HERTOOG et al. 1998, KELI et al. 1996, KNEKT et al. 1996, RIMM et al. 1996, YOCHUM et al. 1999, GELEIJNSE et al. 1999, 2002). Als Flavonoidquellen dienten hauptsächlich Obst, Gemüse, Rotwein und Tee. Dabei wurde vor allem eine reduzierte Mortalitätsrate und weniger eine verringerte Morbiditätsrate beobachtet. Im Unterschied dazu ist ein Zusammenhang zwischen Flavonoidaufnahme und dem Verlauf bzw. der Entstehung von Tumorerkrankungen weniger klar. Nur eine Studie zeigte eine inverse Korrelation von Flavonoidaufnahme und Lungenkrebs (KNEKT et al., 1997). Abweichend von den oben zitierten Untersuchungen erbrachte eine weitere von HERTOOG et al. (1997) durchgeführte epidemiologische Studie ein erhöhtes Mortalitätsrisiko durch Herz-Kreislaufkrankungen mit steigendem Teekonsum. In Tabelle 3 sind die genannten epidemiologischen Studien zusammengestellt.

Tabelle 3: Zusammenfassung prospektiver epidemiologischer Studien zur Aufnahme von Flavonolen und Flavonen und dem Mortalitätsrisiko für Herzinfarkt und Schlaganfall.

Population	Alter (Jahre)	Beobachtungszeitraum (Jahre)	Relatives Risiko ¹⁾ (95% Konfidenzintervall)
Zutphen Elderly Study, Niederlande, 805 Männer, Herzinfarkt (Hertog et al. 1993)	65-84	5	0,32 (0,15-0,71)
Zutphen Elderly Study, Niederlande, 552 Männer, Schlaganfall (Keli et al. 1996)	50-69	15	0,27 (0,11-0,7)
Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey, Finnland, 5133 Männer und Frauen (Knekt et al. 1996)	30-69	20	Frauen: 0,73 (0,41-1,32) Männer: 0,67 (0,44-0,87)
Iowa Womens Health Study, USA, 34492 Frauen, Herzinfarkt (Yochum et al. 1999)	Postmenopause	10	0,62 (0,44-0,87)
Health Professionals Study, USA, 34789, Männer, Herzinfarkt (Rimm et al. 1996)	40-75	6	1,08 ²⁾ (0,81-1,43)
Caerphilly Study, Wales, 1900, Männer, Herzinfarkt (Hertog et al. 1997)	49-59	14	1,6 (0,9-2,9)
Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study, Finnland, 25372 Raucher (Hirvonen et al. 2001)	50-69	6	0,89 (0,71-1,11) 0,77 ³⁾ (0,64-0,93)
Rotterdam Study, Niederlande, 4807, Männer und Frauen, Herzinfarkt (Geleijnse et al. 2002)	≥ 55	6	0,35 (0,13-0,98)

¹⁾Relatives Risiko der Gruppe mit der höchsten gegenüber der mit der niedrigsten Flavonoidaufnahme

²⁾tödlich und nicht tödlich verlaufende Herzinfarkte

³⁾nicht tödlich verlaufender Herzinfarkt

2.3.2 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden

Die Diskussion über die genannten gesundheitsfördernden bzw. präventiven Wirkungen von Flavonoiden, mit Ausnahme der v. a. für die Isoflavone gezeigten östrogenen bzw. antiöstrogenen Wirkungen, konzentrierten sich hauptsächlich auf das antioxidative Potential polyphenolischer Verbindungen. Dem Gleichgewicht zwischen (pro)oxidativen und antioxidativen Prozessen scheint im Stoffwechsel eine Schlüsselrolle zuzukommen (AW 1999). Störungen dieses Gleichgewichts werden mit einer Vielzahl von Stoffwechselstörungen bzw. Krankheitskomplexen in Zusammenhang gebracht, wobei in erster Linie degenerative Erkrankungen, wie Herzkreislauferkrankungen, Krebs, Alzheimer, aber auch chronische und akute Entzündungsprozesse zu nennen sind (ARUOMA 1999, BEHL & MOOSMANN 2003). Im oxidativen Stoffwechsel eukaryontischer Zellen können an verschiedenen Stellen Sauerstoffradikale und andere hochreaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen, wie z. B. Hydroxyl- und Superoxidradikale oder Peroxynitrit, entstehen, die zusammen als reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindungen (ROS bzw. RNS) bezeichnet werden (KHAN & WILSON 1995, JI & LEICHTENWEIS 1997, CHANDRA et al. 2000). Entstehende ROS werden durch zelleigene antioxidative Abwehrmechanismen deaktiviert, zu denen enzymatische Systeme, darunter u. a. Superoxid-Dismutasen, Katalase, Glutathion-Peroxidasen sowie nicht enzymatische Systeme wie z. B. Glutathion, α -Tocopherol und Ascorbat gehören (JI & LEICHTWEIS 1997, CHANDRA et al. 2000, FINKEL & HOLBROOK 2000). Bei einem Übergewicht prooxidativer Prozesse (= oxidativer Stress) kann es zu oxidativen Schädigungen von Proteinen, Membranlipiden, DNA sowie Kohlenhydraten kommen. Die oben genannten Krankheitskomplexe scheinen mit oxidativem Stress einherzugehen (BÖHM et al. 1998, ARUOMA 1999). So belegen z. B. eine Vielzahl von *In vitro*-Studien, dass eine Hemmung der Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen einen präventiven Effekt auf die Entstehung von Herzkreislauferkrankungen haben kann (FRANKEL et al. 1993, AVIRAM & FUHRMANN 1998, DA SILVA et al. 2000, CHOPRA et al. 2000). Oxidierte Low-Density-Lipoproteine spielen nach dem heutigen Kenntnisstand eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese atherosklerotischer Veränderungen.

Bezüglich des antioxidativen Effektes von Flavonoiden werden verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert, die bisher fast ausschließlich *in vitro* gezeigt wurden. Zum einen wirken Flavonoide als Radikalfänger. Sie können aufgrund ihres geringeren Redoxpotentials reaktive Sauerstoffverbindungen reduzieren, wobei sie ein Elektron aus einer phenolischen OH-Gruppe auf das Radikal übertragen, so dass dieses seine hohe Reaktivität verliert (WISEMAN et al. 1997, BORS et al. 1998, PIETTA 2000). Das Flavonoid selbst wird dabei zum Radikal, welches aber im Vergleich zu Sauerstoffradikalen relativ reaktionsträge ist (BORS et al. 1997, PIETTA 2000). Es kann mit weiteren Radikalen reagieren und in eine stabile Chinonstruktur übergehen (PIETTA 2000, PANNALA et al. 2001). Die Fähigkeit von Flavonoiden, an Ein-Elektronen-Übergängen teilzunehmen, beruht auf ihrer spezifischen chemischen Struktur. Von besonderer Bedeutung scheint neben den 3'- und 4'-OH-Gruppen am Ring B die Anwesenheit der 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Oxogruppe im Ring C zu sein, welche eine Elektronendelokalisation über das gesamte Ringsystem und damit eine Stabilisierung des Radikals ermöglicht. Eine zusätzliche Hydroxygruppe am C3-Atom am Ring C erhöht ebenfalls die Stabilität des Flavonoidradikals und somit die antioxidative Kapazität des Flavonoids (BORS et al. 1992, PIETTA 2000). Des Weiteren bewirkt die 3-Hydroxygruppe, dass die drei Ringe eines Flavonoids in einer Ebene liegen, was sich ebenfalls positiv auf das antioxidative Potential auswirkt, da eine nicht planare Anordnung möglicherweise zu sterischen Behinderungen führt (VAN ACKER et al. 1996). Die genannten chemischen Strukturmerkmale treffen insbesondere auf die Gruppe der Flavonole zu und erklären das im Vergleich zu anderen Flavonoiden hohe antioxidative Potential (JOVANOVIC et al. 1996, PIETTA 2000). Zum anderen vermögen Flavonoide freie Metallionen zu komplexieren und dadurch die Metallionen in ihrer Eigenschaft als Prooxidantien zu inaktivieren, wobei Flavonole aufgrund ihrer Struktur besonders stabile Chelatkomplexe bilden (KANDASWAMI & MIDDLETON 1994, FERRALI et al. 1997, PIETTA 2000). Außerdem hemmen Flavonoide verschiedene Enzyme, die an der Bildung von ROS beteiligt sind, wie z. B. die Xanthinoxidase, NADH-Oxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase (PIETTA 2000, BÖHM et al. 1998, KANDASWAMI & MIDDLETON 1994). Des Weiteren zeigen mehrere Untersuchungen, dass insbesondere Flavonole, Flavanole sowie Anthocyanidine unter den gegebenen *In vitro*-Testbedingungen effektivere Antioxidantien als das wasserlösliche Vitamin E-Analog

Trolox und als Vitamin C sind (BORS et al 1995, CAO et al. 1997, WISEMANN et al. 1997, PIETTA 2000). Flavonoide könnten auch bei der Regeneration wichtiger etablierter Antioxidantien wie Vitamin C und Vitamin E eine Rolle spielen (KANDASWAMI & MIDDLETON 1994, BORS et al. 1995, MIURA et al. 2000, PIETTA 2000). Da das Redoxverhalten von Flavonoiden bzw. Antioxidantien im Allgemeinen stark von den gewählten Versuchsbedingungen (z. B. pH-Wert, lipophiles oder hydrophiles Versuchsmedium, effektive Konzentration, Redoxpotential des Reaktionspartners) abhängt, sind die Erkenntnisse aus den *In vitro*-Versuchen nicht ohne Weiteres auf die *In vivo*-Situation übertragbar. Kritisch anzumerken ist außerdem, dass die meisten Versuche mit den Flavonoidglykolyka und nicht mit den hauptsächlich in der Natur vorkommenden Glykosiden bzw. den *in vivo* im Organismus zirkulierenden Konjugaten durchgeführt wurden. Zum Beispiel haben bisher nur wenige Studien eine antioxidative Wirkung von Quercetinkonjugaten, wie z. B. Quercetinglukuroniden, wie sie nach oraler Aufnahme von Quercetinaglykon im Plasma zu finden sind, nachgewiesen. Erst in neueren Studien wurden auch Quercetinglukuronide untersucht, wie z. B. von TERAO et al. (2001). Sie zeigten, dass nicht nur Quercetin, sondern auch Quercetin-3-glukuronid den Verbrauch bestimmter Antioxidantien, wie β -Carotin und α -Tocopherol, in Low-Density-Lipoproteinen verringerten. Daneben existieren *Ex vivo*-Versuche, die den Einfluss von Quercetin auf die Lipidperoxidation nach *In vivo*-Applikation der Flavonoide untersuchen (DA SILVA et al. 1998, MANACH et al. 1998). Somit ist eine abschließende Bewertung der antioxidativen Effekte von Flavonoiden *in vivo* derzeit nicht möglich. An dieser Stelle sei erwähnt, dass in einigen Untersuchungen auch prooxidative Effekte von Flavonoiden gezeigt wurden (SAHU & GRAY 1996, BÖHM et al. 1998, SKIBOLA & SMITH 2000, AWAD et al. 2002), auf die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.

2.3.3 Wirkung von Flavonoiden auf Enzyme, Signaltransduktion und Genexpression

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass ROS nicht nur schädigende Wirkungen besitzen, sondern auch wichtige regulatorische Funktionen bei verschiedenen Signaltransduktionswegen einnehmen und direkt an der Regulation von Transkriptionsfaktoren

beteiligt sind (KHAN & WILSON 1995, JACKSON et al. 1998, FINKEL & HOLBROOK 2000). Die Beeinflussung des intrazellulären Stoffwechsels durch ROS spielt z. T. eine bedeutende Rolle bei den oben erwähnten Erkrankungen (SEN & PACKER 1996, CHOPRA & THURNHAM 1999, BEHL & MOOSMANN 2002). Da Flavonoide aufgrund ihrer oben genannten antioxidativen Wirkungen den Redoxstatus der Zelle beeinflussen können, haben sie somit indirekt Einfluss auf die regulatorischen Funktionen der ROS und damit letztlich auf die Genexpression (JACKSON et al. 1998, FINKEL & HOLBROOK 2000, AW 1999, SEN & PACKER, 1996). Neben der indirekten Beeinflussung der Genexpression beeinflussen Flavonoide aber auch direkt Transkriptionsfaktoren bzw. Signaltransduktionswege. Im Allgemeinen führt eine erhöhte Konzentration freier Radikale zu einer Aktivierung bestimmter Faktoren von Signalkaskaden, wie z. B. Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Am Ende solcher Signaltransduktionswege stehen Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung an die Promotorregion von Zielgenen binden und die Transkription beeinflussen. Der letzte Schritt, die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA, kann auch direkt durch ROS beeinflusst werden (JACKSON et al. 1998). Zu den näher untersuchten redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren bzw. Faktoren von Signalkaskaden gehören Nuclear-Factor-Kappa-B (NFκB), Aktivator-Protein 1 (AP-1), p53, Hitze-Schock-Faktoren (HSF) sowie Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK), c-Jun-Amino-terminale Kinase (JNK) und p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38-MAPK). Sie alle sind an der Induktion von Genen beteiligt, die v. a. im Zusammenhang mit Zellproliferation, Differenzierung, Apoptosis und Alterung stehen (JACKSON et al. 1998, Finkel 1998, FINKEL & HOLBROOK 2000). Es wurde mehrfach gezeigt, dass Flavonoide, darunter Quercetin, einen inhibitorischen Effekt auf den Transkriptionsfaktor NFκB besitzen (SEN & PACKER 1996, YODIM et al. 2002). Quercetin vermag außerdem verschiedene mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) zu hemmen (ISHIKAWA & KITAMURA 2000, YODIM et al. 2002, KONG et al. 2000, 2001.). Auch in diesem Themenbereich werden in jüngerer Zeit vermehrt die *in vivo* vorkommenden Quercetinmetabolite bzw. Konjugate untersucht. YOSHIZUMI et al. (2002) wiesen nach, dass auch Quercetin-3-Glukuronid die durch Angiotensin II induzierte Aktivierung der JNK bzw. Anreicherung von AP-1 inhibierte. Der Einfluss von Quercetin auf die intrazelluläre Konzentration von Glutathion, eines der wichtigsten zelleigenen Antioxidantien, wurde von ISHIGE et al.

(2001) an neuronalen HT-22-Zellen der Maus untersucht. Sie zeigten, dass Quercetin die Zellen u. a. durch eine Erhöhung der intrazellulären Glutathionkonzentration sowie durch eine direkte Verringerung der ROS-Konzentration vor oxidativen Schädigungen zu schützen vermag. RIMBACH et al. (2001) konnten dagegen an humanen Keratinozyten eine Erhöhung der Glutathionkonzentration nur durch den Ginkgoextrakt EGb761 (hoher Gehalt an Flavonolglykosiden), nicht aber durch reines Quercetin nachweisen. Zusätzlich zeigten sie sowohl auf enzymatischer als auch auf genetischer Ebene eine Anreicherung der katalytischen Untereinheit der γ -Glutamyl-cystein-Synthetase bzw. der mRNA der genannten Untereinheit, wobei die Beeinflussung eines AP-1-abhängigen Signaltransduktionsweges eine Rolle zu spielen scheint. Flavonoide sind nicht nur in der Lage, die Genexpression zu beeinflussen, sondern interagieren auch mit zahlreichen Enzymsystemen, die z. T. Schlüsselpositionen bei der Zellteilung, Proliferation, Blutgerinnung, Metabolisierung von Xenobiotika sowie bei Entzündungs- und Immunreaktionen einnehmen (HOLLMAN et al. 1996). Aufgrund der Fülle von Untersuchungen kann im Folgenden nur exemplarisch auf die Beeinflussung einiger Enzyme eingegangen werden. Flavonoide nehmen Einfluss auf die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, die Phosphorylierungsreaktionen katalysieren und damit bei der Steuerung nahezu aller Zellfunktionen eine wichtige Rolle spielen. Flavonole sind z. B. potente Proteinkinase-C-Inhibitoren (AGULLO et al. 1997, FERRIOLA et al. 1989), wobei noch nicht geklärt ist, ob sie eine Spezifität für bestimmte Isoformen besitzen (GAMET-PAYRASTRE et al. 1999). Auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase wird durch Flavonole gehemmt (AGULLO et al. 1997, GAMET-PAYRASTRE et al. 1999). Einige Flavonoide, darunter Genistin und Quercetin, inhibieren Protein-Tyrosinkinasen (CUNNINGHAM et al. 1992). Des Weiteren beeinflusst Quercetin Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels, der bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt. Dabei vermag Quercetin die Phospholipase A₂ zu hemmen, die v. a. zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden führt (WELTON et al. 1988). Von der Arachidonsäure ausgehend werden entweder durch Cyclooxygenasen Prostaglandine und Thromboxane oder durch Lipoxygenasen Leukotriene gebildet. Quercetin und andere Flavonoide weisen einen inhibitorischen Effekt sowohl auf Cyclooxygenasen als auch auf Lipoxygenasen auf (FORMACIA & REGELSON 1995, WELTON et al. 1988). Somit können Flavonoide an verschiedenen Stellen des Arachidonsäurestoffwechsels

eingreifen. Auch die in allen Zellen vorkommende Na^+/K^+ -ATPase kann von verschiedenen Flavonoiden, darunter Quercetin, gehemmt werden (UMAROVA et al. 1998). Für mehrere Flavonoide wurde ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die für die Magensäuresekretion verantwortliche H^+/K^+ -ATPase der Belegzellen nachgewiesen (MURAKAMI et al. 1999). Außerdem können Flavonoide Phosphodiesterasen hemmen, die für den Spaltung von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. 3'5'-Guanosinmonophosphat (cGMP) verantwortlich sind (RUCKSTUHL & LANDRY 1981). Dieser Mechanismus spielt z. B. bei der Inhibition der Plättchenaggregation durch Flavonoide eine Rolle (COOK & SAMMANN 1996). Außerdem beeinflussen Flavonoide die Aktivität von Cytochrom P450-Oxidoreduktasen in komplexer Art und Weise (CANIVÉC-LAVIER et al. 1996a, b). Dabei wirken sie einerseits als Enzyminduktoren (CIOLINO et al. 1999), andererseits hemmen sie eine Reihe von Cytochrom P450-Isoenzymen (FELDMANN 1997) und können somit die Bioverfügbarkeit anderer Xenobiotika beeinflussen (FELDMANN 1997, OBERMEIER et al. 1995). Neben den genannten Enzymen ist ein Einfluss von Flavonoiden auf eine Vielzahl weiterer Enzyme beschrieben worden, darunter u. a. Lactatdehydrogenase, Pyruvatkinase, Catechol-*O*-Methyl-Transferase, Ornithindecaboxylase, RNA- und DNA-Polymerasen, DNA-Topoisomerase, reverse Transkriptase, HIV-1-Proteinase, HIV-1 Integrase sowie 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (MIDDELTON et al. 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der Literatur beschriebenen Wirkungen von Flavonoiden, von denen hier nur einige dargestellt wurden, sehr komplex und oft sogar gegensätzlich erscheinen. Es ist jedoch nicht verwunderlich, dass den Flavonoiden aufgrund des hohen Potentials zur Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen die genannten Wirkungen im Zusammenhang mit der Prävention von bestimmten Tumorformen, verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sowie Herzkreislaufkrankungen zugesprochen werden (BÖHM et al. 1998, DUNTHIE et al. 2000, MIDDELTON et al. 2000). In wie weit aber die überwiegend *in vitro* gezeigten Effekte tatsächlich für *In vivo*-Prozesse von Bedeutung sind, bedarf weiterer Aufklärung.

2.4 Bioverfügbarkeit von Flavonoiden

Die bislang dargestellten Wirkungen von Flavonoiden auf bestimmte Organe und Gewebe, einzelne Zellen oder zelluläre Bestandteile wurden im Wesentlichen durch *In vitro*-Untersuchungen mit entsprechenden Aglyka ermittelt. Effekte wurden dabei meistens bei Flavonoidkonzentrationen im mikromolaren Bereich nachgewiesen. Voraussetzung für tatsächliche Wirkungen *in vivo* ist aber eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit, d. h. das Flavonoid muss nach oraler Aufnahme in ausreichendem Maße absorbiert werden, sich im Organismus verteilen und so letztlich systemisch verfügbar werden, um am entsprechenden Wirkort in genügend hoher Konzentration vorzuliegen. Dabei ist die Bioverfügbarkeit auch von Art und Ausmaß der prae- und postabsorptiven Metabolisierung abhängig.

In der Literatur gibt es z. T. widersprüchliche Aussagen darüber, ob natürlich vorliegende Flavonoidglykoside eine höhere Bioverfügbarkeit als Flavonoidaglyka aufweisen. Außerdem scheint es bei den verschiedenen Flavonoidunterklassen Unterschiede zu geben. Zusätzlich besteht noch Unklarheit darüber, ob Flavonoide als intakte Glykoside oder erst nach Deglykosilierung absorbiert werden und welcher Mechanismus der Absorption zu Grunde liegt.

Obwohl in der Literatur schon seit langem zahlreiche Untersuchungen zu *In vitro*-Effekten von Flavonolen zu finden sind, wurden erst in den letzten Jahren vermehrt Bioverfügbarkeitsstudien mit Flavonoiden bzw. Flavonoidglykosiden durchgeführt. Die folgende Übersicht konzentriert sich entsprechend dem Thema der vorliegenden Arbeit auf Studien zur Bioverfügbarkeit von Quercetin. Auf einzelne Punkte, insbesondere auf die möglichen Absorptionsmechanismen, die eine Erklärung für unterschiedliche Bioverfügbarkeiten liefern könnten, wird in folgenden Unterkapiteln sowie im Rahmen der Diskussion der eigenen Ergebnisse vertiefend eingegangen.

Da GUGLER et al. (1975) nach oraler Applikation einer Einmaldosis von 4 g Quercetinaglykon weder im Blutplasma noch im Urin das intakte Flavonol oder Metaboliten deselben nachweisen konnten, nahmen sie an, dass die Absorption des Quercetinaglykons weniger als 1 % der verabreichten Dosis betrug. Sie vermuteten eine umfangreiche mikrobielle Metabolisierung im Darmtrakt, da nur 53 % der applizierten Dosis in den Faeces wiedergefunden wurde.

MANACH et al. (1995) fanden bei einem Fütterungsversuch mit Ratten, denen 16,4 mmol Quercetin bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid/kg Futter (entspricht ca. 0,4 mmol/Tag) über 10 Tage verabreicht wurde, nach beiden Behandlungen eine Gesamtflavonkonzentration einschließlich konjugierter Metaboliten im Blutplasma von 115 µmol/l, die auf eine geringe Absorption hindeutete. In einem weiteren Fütterungsversuch mit Ratten verglichen MANACH et al. (1997) die Bioverfügbarkeit von Quercetinaglykon und Quercetin-3-Glukorhamnosid. Nach beiden Behandlungen wurden neben Quercetin die 3'-und 4'-O-Methylether des Quercetins (Isorhamnetin, Tamarixetin) identifiziert. MANACH et al. (1997) zeigten, dass das Glukorhamnosid deutlich langsamer als das Aglykon absorbiert wurde. Sie vermuteten, dass Quercetin-3-Glukorhamnosid erst nach mikrobieller Deglykosylierung im Dickdarm, Quercetin hingegen bereits im Dünndarm absorbiert wurde.

Eine hohe Bioverfügbarkeit von 52 % wurde von HOLLMAN et al. (1995) in einer Studie mit ileostomierten Probanden nach Applikation von gedünsteten Zwiebeln, die v. a. Quercetinglukoside enthielten (89 mg Quercetinäquivalente), berechnet. Im Vergleich dazu lag die Bioverfügbarkeit nach Applikation des Aglykons nur bei 24 %, nach Gabe von Quercetin-3-Glukorhamnosid sogar bei nur 17 %. Allerdings wurde die Bioverfügbarkeit in dieser Studie als Differenz zwischen oral applizierter Menge und der im Perfusat über den Ileostomiebeutel ausgeschiedenen Menge definiert. In einer weiteren Studie an 9 Probanden mit intaktem Darm verglichen HOLLMAN et al. (1997) die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebeln (Quercetinglukoside, 68 mg Quercetinäquivalente), Äpfeln (verschiedene Quercetinglykoside, 109 mg Quercetinäquivalente) und Quercetin-3-Glukorhamnosid (112 mg Quercetinäquivalente) und bestätigten die Ergebnisse der Studie mit ileostomierten Probanden. Die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den Zwiebeln war am höchsten. Die anhand der Konzentration von Quercetinäquivalenten im Plasma ermittelten relativen Bioverfügbarkeiten von Quercetin aus Äpfeln bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid lag nur bei ca. 30 % des entsprechenden Wertes nach Gabe von Zwiebeln. Deutliche Unterschiede ergaben sich auch für den Zeitpunkt der maximalen Konzentrationen von Quercetinäquivalenten im Plasma (0,7 h, 2,5 h bzw. 9,3 h) und für die maximalen Plasmakonzentrationen (224, 92 bzw. 90 ng/ml). HOLLMAN et al. (1997) folgerten aufgrund des frühen Konzentrationsmaximums nach Aufnahme von Zwiebeln, dass die

Quercetinglukoside schon aus dem Dünndarm absorbiert werden, wohingegen Quercetinglykoside mit anderen Zuckerresten erst im Dickdarm verfügbar sind. Ein Einfluss der Pflanzenmatrix auf die Freisetzung von Quercetin war jedoch in dieser Studie nicht auszuschließen.

Ein weiterer Versuch, bei dem Probanden 311 μmol reines Quercetin-4'-Glukosid bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid oral aufnahmen, führte zu einem ähnlichen Ergebnis (HOLLMAN et al. 1999) und bestätigte die Aussagen der oben genannten Studie. Nach Gabe des Monoglukosid wurde die maximale Plasmakonzentration schon nach einer halben Stunde, nach Gabe des Glukorhamnosids erst nach sechs Stunden erreicht. Auch die maximalen Plasmakonzentrationen nach Applikation von Quercetin-4'-Glukosid war annähernd 20fach höher als nach Quercetin-3-Glukorhamnosid (3,5 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0,2 $\mu\text{mol/l}$). Als Erklärung für die bessere Absorption und damit höhere relative Bioverfügbarkeit des Quercetins aus dem Glukosid vermuteten sie einen aktiven Transport des Glukosids über den natriumabhängigen Glukosetransporter (SGLT1), während das Glukorhamnosid erst nach Deglykosilierung im Dickdarm absorbiert werden kann.

Ergänzend dazu untersuchten DE VRIES et al. (2000) die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rotwein bzw. Tee (v. a. Quercetin-3-Glukorhamnosid) im Vergleich zur Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebeln (v. a. Quercetin-3-Glukosid, Quercetin-4'-Glukosid). Die Probanden erhielten vier Tage lang jeweils zwischen 14 und 16 mg Quercetin über eine bestimmte Menge der verschiedenen Nahrungsquellen. Auch DE VRIES et al. (2000) konnten zeigen, dass Quercetin zwar nach Gabe aller drei Quellen absorbiert wurde, die Quercetinplasmakonzentration und letztlich auch die Bioverfügbarkeit nach Applikation von Zwiebeln jedoch fast doppelt so hoch war wie nach Rotwein oder Tee.

OLTHOF et al. (2000) verglichen die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Quercetin-3-Glukosid und mit der aus Quercetin-4'-Glukosid nach einmaliger Applikation von 325 μmol bzw. 331 μmol des jeweiligen Glukosids. Die Konzentrationszeitverläufe im Plasma, die Flächen unter den Konzentrationszeitkurven und die Eliminationshalbwertszeiten waren nach beiden Behandlungen annähernd identisch. Daher folgerten

OLTHOF et al. (2000), dass die Position des Glukoserestes keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den beiden Monoglukosiden hat.

In einer weiteren Studie verglichen ERLUND et al. (2000) die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation des Quercetinaglykons und des Quercetin-3-Glukorhamnosids in drei verschiedenen Dosierungen (8 mg, 20 mg bzw. 50 mg Quercetinäquivalente). Des Weiteren untersuchten sie, in welcher Form Quercetin nach der Absorption im Plasma vorliegt. Nach Gabe der niedrigsten Dosierung war die mittlere maximale Quercetinplasmakonzentration nach Applikation von Quercetinaglykon signifikant größer als nach Quercetin-3-Glukorhamnosid (41,4 µg/l bzw. 23,5 µg/l). Für die beiden höheren Dosierungen ergaben sich aber zwischen den Behandlungen keine signifikanten Unterschiede. Die maximalen Plasmakonzentrationen traten dagegen bei allen drei Dosierungen nach Applikation des Aglykons im Vergleich zum Quercetin-3-Glukorhamnosid signifikant früher auf. Die mittels der Flächen unter den Konzentrationszeitkurven (AUC) berechnete Bioverfügbarkeit war nach Applikation von Quercetinaglykon in der niedrigen und mittleren Dosis, nicht aber nach Applikation der hohen Dosierung, signifikant größer als nach Gabe des Glukorhamnosids. Dabei waren große interindividuelle Schwankungen zu beobachten. Diese Schwankungen schienen von Geschlecht und der Einnahme oraler Kontrazeptiva abzuhängen. Nach Gabe von Quercetin-3-Glukorhamnosid in der höchsten Dosierung (100 mg) wurde unkonjugiertes Quercetin, aber kein Quercetin-3-Glukosid im Plasma nachgewiesen. ERLUND et al. (2000) kamen wie HOLLMAN et al. (1997) zu dem Schluss, dass Quercetin-3-Glukorhamnosid erst nach Deglykosilierung in distalen Darmabschnitten absorbiert wird. Der frühe Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration nach Applikation von Quercetinaglykon spricht nach Ansicht der Autoren hingegen für eine Absorption hauptsächlich im oberen Dünndarm.

ADER et al. (2000) untersuchten die Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Schwein, dessen Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes und Kreislaufsystems weitgehend mit den Verhältnissen beim Menschen übereinstimmt. Den Tieren wurde eine einmalige Dosis Quercetinaglykon sowohl intravenös (i. v., 0,4 mg/kg KGW) als auch oral (50 mg/kg KGW) verabreicht. Gemessen wurden die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und einigen seiner Metaboliten (Isorhamnetin, Tamarixetin) mit und ohne vorausgegangene enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von

Konjugaten. Nach i. v.-Applikation wurden hauptsächlich freies Quercetin und konjugierte Methylether des Quercetins, Isorhamnetin und Tamarixetin, identifiziert. Dagegen konnten nach oraler Applikation nur Spuren an freiem Quercetin neben konjugiertem Quercetin und konjugierten Quercetinmetaboliten nachgewiesen werden. Bezogen auf die i. v.-Applikation betrug die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Aufnahme nur 0,5 %. Unter Einbezug der Menge an konjugiertem Quercetin erhöhte sich die Bioverfügbarkeit auf 8,5 %. Wurden zusätzlich auch die monomethylierten Metaboliten Isorhamnetin und Tamarixetin berücksichtigt, betrug der Wert für die Bioverfügbarkeit durchschnittlich 17 %. Da ein erstes Maximum der Quercetinkonzentration nach oraler Gabe schon nach ca. 2 Stunden erreicht wurde, wurde auch hier von den Autoren eine Absorption von Quercetinaglykon im oberen Gastrointestinaltrakt angenommen.

Um den Einfluss der Pflanzenmatrix und des Zuckerrestes auf die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin zu ermitteln, verabreichten GRAEFE et al. (2001) zwölf Probanden Quercetin-4'-Glukosid, Zwiebeln (jeweils 100 mg Quercetinäquivalente) bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid und Buchweizentee (jeweils 200 mg Quercetinäquivalente). Die Bioverfügbarkeit und pharmakokinetischen Parameter unterschieden sich nicht zwischen der Behandlung mit Quercetin-4'-Glukosid und der mit Zwiebeln (enthielten v.a. Quercetin-4'-Glukosid und Quercetin-3,4'-Glukosid). Die maximalen Plasmakonzentrationen betrugen 2,1 µg/ml bzw. 2,3 µg/ml und wurden bei beiden Behandlungen nach 0,7 Stunden erreicht. Trotz der höheren Dosierung betrug die maximale Plasmakonzentration nach Quercetin-3-Glukorhamnosid nur 0,3 µg/ml, nach Buchweizentee (enthielt v.a. Quercetin-3-Glukorhamnosid) dagegen 0,6 µg/ml nach 7 bzw. 4,3 Stunden. Nach allen Behandlungen wurden verschiedene Quercetinglukuronide und konjugiertes Isorhamnetin identifiziert. Intakte Quercetinglykoside oder freies Quercetin konnten nicht nachgewiesen werden. Die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe des Glukorhamnosids war nur halb so groß wie nach Gabe des Glukosids. Die Studie zeigt, dass unabhängig von der Art des applizierten Glykosids, Quercetin hauptsächlich glukuronidiert im Plasma vorlag. In Übereinstimmung mit den zuvor zitierten Versuchen war die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Glukosiden deutlich höher als aus Glukorhamnosiden.

Auch MORAND et al. (2000) zeigten an einer Untersuchung mit Ratten, denen Quercetin, Quercetin-3-Glukosid, Quercetin-3-Rhamnosid oder Quercetin-3-Glukorhamnosid (jeweils 83 mg Quercetinäquivalente/kg KGW) appliziert wurden, dass nach Gabe des Glukosids die höchsten maximalen Quercetinplasmakonzentrationen erhalten wurden. Die Absorption und damit die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Quercetin-3-Glukosid war also deutlich höher als nach Gabe des Aglykons oder Glukorhamnosids. Nach allen Behandlungen konnte kein freies Quercetin nachgewiesen werden. Als weitere Metaboliten wurden, wie in anderen Versuchen, konjugiertes Isorhamnetin und Tamarixetin identifiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine höhere orale Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe der Monoglukoside im Vergleich zur Applikation des Aglykons oder komplexerer Glykoside vorliegt. Quercetin scheint nach der Absorption relativ schnell metabolisiert zu werden und hauptsächlich in konjugierter Form im Blutplasma zu zirkulieren (s. u.). Ferner bleibt festzuhalten, dass selbst bei sehr hohen oralen Dosen von Quercetin oder Quercetinglykosiden die Quercetinplasmakonzentrationen nur im unteren mikromolaren Bereich lagen. Da Quercetin fast ausschließlich als Konjugat vorliegt, ist auch aus diesem Grund eine direkte Übertragung der beschriebenen *In vitro*-Wirkungen auf *In vivo*-Bedingungen nur bedingt möglich. Schließlich muss auch im Zusammenhang mit möglichen biologischen Effekten von Flavonoiden im Stoffwechsel die Plasmaproteinbindung des Quercetins und seiner Metabolite berücksichtigt werden. Für das Quercetinaglykon wurde eine fast vollständige Plasmaproteinbindung, v. a. eine Bindung an Albumin (98 % bzw. 95 %) nachgewiesen (MANACH et al. 1995, BOULTON et al. 1998).

2.4.1 Intestinale Absorptionsmechanismen von Flavonoiden

Wie schon erwähnt besteht nach wie vor Unklarheit darüber, ob die in der Nahrung vorliegenden Flavonoidglykoside als solche absorbiert werden oder ob eine Spaltung der β -glykosidischen Bindung durch Mikroorganismen in tieferen Darmabschnitten oder aber durch körpereigene Enzyme Voraussetzung für die Absorption ist. Anzumerken ist hierbei, dass in den meisten Bioverfügbarkeitsstudien die Quercetinplasmakonzentrationen nach saurer oder enzymatischer Hydrolyse bestimmt

wurden, so dass eine Unterscheidung zwischen intakten Quercetinglykosiden und möglichen konjugierten Metaboliten wie Quercetinglukuroniden bzw. Quercetinsulfaten aufgrund der Analytik nicht möglich war. Außerdem ist nicht geklärt, welcher Mechanismus der Absorption zu Grunde liegt.

In einigen wenigen Arbeiten wurden unveränderte, intakte Quercetinglykoside im Plasma nachgewiesen. Dies wurde als Hinweis gedeutet, dass Glykoside z. T. in intakter Form die Darmwand passieren können (AZIZ et al. 1998, PAGANGA & RICE-EVANS 1997, SPENCER et al. 1999). Hierzu soll kritisch angemerkt werden, dass mit der eingesetzten Analytik eine klare Unterscheidung der Glykoside von den entsprechenden Glukuroniden, die zu den Hauptmetaboliten zählen (s.u.), in den genannten Studien kaum möglich war. In keiner der Arbeiten wurden Flavonoid-glukuronide als Standards zum Vergleich eingesetzt. Die Mehrzahl der neueren Untersuchungen weist jedoch darauf hin, dass eine Absorption intakter Quercetinglykoside unwahrscheinlich ist.

MOON et al. (2000) zeigten in einer Studie mit Frauen, denen eine Woche lang eine Diät mit Zwiebeln (68-94 mg Quercetinäquivalente/Tag v.a. in Form von Glukosiden) verabreicht wurde, dass Quercetin nicht in Form von Quercetinglukosiden im Plasma zu finden war. Freies Quercetinaglykon konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass Quercetin in Form von Glukuroniden und/oder Sulfaten zirkuliert. Auch MORAND et al. (2000) konnten mit einer verbesserten Analytik keine Quercetinglukoside im Plasma von Ratten nachweisen und nahmen dies als Hinweis auf eine prä- oder postabsorptive Hydrolyse der Quercetinglukoside. SESINK et al. (2001) analysierten humane Plasmaproben nach oraler Applikation von 325 µmol Quercetin-3-Glukosid bzw. Quercetin-4'-Glukosid und bewiesen erstmals durch den Vergleich mit einem Glukuronidstandardgemisch, dass Quercetin beim Menschen hauptsächlich in Form von Glukuroniden im Blut zirkuliert. Sie fanden weder intakte Glukoside noch nennenswerte Konzentrationen an freiem Quercetin. In einer Untersuchung mit umgestülpten Darmsäckchen von Ratten fanden GEE et al. (2000) intakte Quercetinglukoside weder im mukosalen Gewebe noch im serosalen Kompartiment. Sie identifizierten aber mit Hilfe von Standards Quercetin-3-Glukuronid und Quercetin-7-Glukuronid im serosalen Kompartiment. Auch die Humanstudie von DAY et al. (2001) deutet darauf hin, dass oral applizierte Quercetinglukoside nicht intakt ins Blut gelangen. Nach der Aufnahme einer Zwiebelmahlzeit (v.a. Quercetinglukoside,

äquivalent zu 79,2 mg Quercetinaglykon) wurden Quercetin-3-Glukuronid, 3'-Methyl-Quercetin-3-Glukuronid und im Vergleich zu SESINK et al. (2001) zusätzlich 3'-Quercetin-Sulfat als Hauptmetaboliten im Plasma anhand von Standards identifiziert. Im Gegensatz zu den Befunden bei der Ratte wurde kein Quercetin-7-Glukuronid gefunden.

Untersuchungen mit Phospholipidmembranmodellen zeigen, dass Flavonoidglykoside, wie Quercetin-3-Glukorhamnosid, aufgrund des hydrophilen Zuckerrestes nicht in der Lage sind, die Membran zu penetrieren, während dies für das lipophilere Aglykon Quercetin möglich ist (SAIJA et al. 1995, MOVILEANU et al. 2000, VAN DIJK et al. 2000). Demnach müssten Glykoside entweder vor der Absorption deglykosiliert werden oder aber über einen Carrier-vermittelten Transportprozeß in die Intestinalzelle aufgenommen werden. Quercetin hingegen könnte durch passive Diffusion in die Zelle gelangen.

Es wurde bis vor Kurzem davon ausgegangen, dass die Spaltung der Glykoside durch Mikroorganismen im distalen Dünndarm bzw. Dickdarm Voraussetzung für die Absorption ist, da keine Untersuchungen mit tierischen oder humanen Enzymen zur Spaltung β -glykosidischer Bindungen vorlagen (KÜHNAU 1976, MIDDLETON & KANDASWAMI 1993, FORMACIA & REGELSON 1995, HOLLMAN et al. 1997, , MANACH et al. 1996a). In neueren Versuchen mit isolierten Dünndarm- und Lebermikrosomen vom Menschen bzw. von der Ratte konnte allerdings gezeigt werden, dass verschiedene Flavonoidglykoside, darunter Quercetin-4'-Glukosid, durch eine cytosolische β -Glukosidase deglykosiliert wurden. Quercetin-3-Glukosid wurde in geringerem Umfang nur durch eine intestinale β -Glukosidase gespalten. Quercetin-3-Glukorhamnosid wurde dagegen nicht enzymatisch hydrolysiert (DAY et al. 1998, IOKU et al. 1998). Auch beim Schwein wurde eine jejunale cytosolische β -Glukosidase nachgewiesen (MCMAHON et al. 1997). Eine Spaltung der β -glukosidischen Bindung durch ein cytosolisches Enzym würde einen Transport des intakten Glukosids in die Intestinalzelle voraussetzen, wie ihn HOLLMAN et al. (1995) erstmals zur Diskussion stellten.

Wie schon kurz im Kapitel 2.4 erwähnt, stellten HOLLMAN et al. (1995) die Hypothese auf, dass sich die schnellere Absorption von Quercetinglukosiden mit dem aktiven Transport über den in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierten

Na⁺/Glukosetransporter SGLT1 erklären ließe. Dabei wiesen sie auf eine Untersuchung hin, in welcher der Transport von β -Naphthylglukosiden und β -Naphthylgalaktosiden über den SGLT1 an umgestülpten Darmsäckchen aus Rattenjejunum gezeigt worden war (MIZUMA et al. 1994). Die Ergebnisse demonstrierten, dass der SGLT1 nicht nur Glukose als solche, sondern auch bestimmte Verbindungen transportieren kann, die mit Glukose bzw. Galaktose β -glykosidisch verknüpft sind. In einer Untersuchung an umgestülpten Darmsäckchen aus dem Jejunum von Ratten fanden GEE et al. (1997) eine Na⁺-abhängige Stimulation des Effluxes von ¹⁴C-Galaktose in das Inkubationsmedium durch Quercetinglukoside, nicht jedoch durch Quercetin-3-Glukorhamnosid (Trans-Stimulation). Sie werteten dieses Ergebnis als einen Hinweis auf die Beteiligung des SGLT1 am intestinalen Transport von Quercetinglukosiden. In einem weiteren Versuch mit umgestülpten Darmsäckchen konnten GEE et al. (2000) neben der Trans-Stimulation des ¹⁴C-Galaktose-Effluxes eine kompetitive Hemmung der ¹⁴C-Galaktose-Aufnahme durch Anwesenheit von Quercetin-3-Glukosid auf mukosaler Seite nachweisen. Außerdem zeigten sie eine schnellere Absorption von radioaktiv markiertem Quercetin-3- und 4'-Glukosid im Vergleich zum Quercetinaglykon, wobei jedoch intakte Quercetinglukoside weder im mukosalen Gewebe noch im serosalen Medium detektiert wurden. Stattdessen wurden freies Quercetin im mukosalen Gewebe und Quercetinglukuronide sowohl im Gewebe als auch im serosalen Medium identifiziert. Ein Transport der Monoglukoside über den SGLT1 wurde auch in dieser Studie nicht direkt nachgewiesen, sondern nur eine Interaktion mit dem SGLT1. Der Versuch zeigte außerdem, dass Quercetinglukoside anscheinend während der Passage durch die Darmmukosa deglykosiliert und anschließend glukuronidiert werden. Im Gegensatz zum Monoglukosid scheint das Aglykon passiv absorbiert zu werden. WALGREN et al. (2000b) setzten als Zellmodell für Absorptionsstudien humane CaCo-2-Zellen sowie mit SGLT1 transfizierte Hamsterovarzellen (G6D3-Zellen) ein und wiesen erstmals direkt den Na⁺-abhängigen Transport von Quercetin-4'-Glukosid über den SGLT1 nach, der durch Phlorizin, einem Inhibitor des SGLT1, gehemmt wurde. Ein transepithelialer Transport des Glukosids in mukoserosaler Richtung (Absorption) konnte jedoch erst beobachtet werden, als das in der apikalen Membran lokalisierte Transportprotein MRP2 (Multidrug Resistance Associated Protein 2) gehemmt wurde (WALGREN et al. 2000a, 1998). MRP2 vermittelte einen verstärkten Efflux des Quercetinglukosids durch

die luminale Membran und verhinderte so in den Experimenten von WALGREN et al. (2000a, 1998) eine Nettoabsorption. In einer Studie von ADER et al. (2001) konnte eine Hemmung der Na^+ -abhängigen Aufnahme des nicht metabolisierbaren Glukoseanalogons Methyl- α -D-Glukopyranosid (MDG), einem Substrat des SGLT1, in die Mukosa des Rattenjejunums durch Quercetin-3- und 4'-Glukosid gezeigt werden. Quercetinaglykon und Quercetin-3-Glukorhamnosid beeinflussten die Aufnahme hingegen nicht. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die Quercetinglukoside spezifisch die Na^+ -abhängige mukosale Aufnahme von MDG über den SGLT1 hemmen, da die Na^+ -abhängige Aufnahme von Alanin nicht beeinflusst wurde. Sie lieferten aber keinen Beweis für einen Transport der Glukoside über den SGLT1. In einer neueren Untersuchung derselben Arbeitsgruppe an mit Rattenjejunum bestückten Ussing-Kammern konnte direkt ein Na^+ -abhängiges „Verschwinden“ von Quercetin-3-Glukosid aus dem mukosalen Kompartiment gezeigt werden (WOLFFRAM et al. 2002). Sowohl die Anwesenheit von D-Glukose als auch der Einsatz von Na^+ -freiem Puffer unter gleichzeitiger Zugabe von Phlorizin im mukosalen Kompartiment führte zu einem geringeren Verschwinden des Glukosids. Außerdem war beim Einsatz von Colongewebe, das im Gegensatz zu Jejunum den SGLT1 nicht exprimiert, kein Verschwinden von Quercetin-3-Glukosid zu beobachten. Sie werteten diese Ergebnisse als einen deutlichen Hinweis auf die Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Quercetin-3-Glukosid. Eine Beteiligung des Na^+ -unabhängigen Fructosetransporter GLUT5 wurde dagegen ausgeschlossen, da D-Fructose in Na^+ -freiem Medium auf mukosaler Seite keinen Einfluss auf das „Verschwinden“ von Quercetin-3-Glukosid besaß.

Neben der intrazellulären Spaltung durch körpereigene β -Glukosidasen wird ein weiterer Mechanismus der Spaltung von im Darmlumen vorliegenden Quercetinglukosiden diskutiert. Es handelt sich dabei um die extrazelluläre Hydrolyse des Glukosids durch die bürstensaummembranständige Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH, EC. 3.2.1.62), gefolgt von der Diffusion des Quercetinaglykons durch die Membran (DAY et al. 2000). DAY et al. (2000) zeigten, dass die aus dem Dünndarm von Lämmern isolierte LPH sowohl Quercetin-3-Glukosid als auch Quercetin-4'-Glukosid, nicht aber Quercetin-3-Glukorhamnosid effizient spaltete. Die Hauptaktivität scheint dabei von der

Laktase-Domäne und nicht von der Phlorizin-Hydrolase-Domäne des Enzyms auszugehen.

2.4.2 Metabolisierung und Ausscheidung von Quercetin und Quercetinglykosiden

Der Nachweis von glukuronidierten, sulfatierten und methylierten Quercetinmetaboliten *in vivo* schon kurz nach oraler Applikation weist auf eine umfangreiche Metabolisierung der Flavonoide vor Eintritt in die systemische Zirkulation hin (ADER et al. 2000, MORAND et al. 1998, MANACH et al. 1998, ERLUND et al. 2000). Dieser First-Pass-Effekt beruht nicht nur auf einer Verstoffwechslung in der Leber, sondern auch auf einer intensiven Metabolisierung bereits in der Darmmukosa. Dies weist auf ein Vorhandensein sowohl von UDP-Glukuronyltransferasen als auch von Catechol-O-Methyltransferasen im Dünndarmepithel hin (KUHNLE et al. 2000, SPENCER et al. 1999). In einer *In situ*-Perfusionsstudie am Dünndarm von Ratten konnten CRESPIY et al. (1999) zeigen, dass Quercetinaglykon absorbiert wurde und einer intensiven Glukuronidierung, Methylierung und Sulfatierung bereits in der Darmmukosa unterlag, da die Sekretion von Galle bei der Versuchsanordnung unterbrochen war. Quercetin-3-Glukorhamnosid wurde dagegen weder absorbiert noch metabolisiert. Mit Hilfe von intestinalen Mikrosomen konnten sie außerdem die Aktivität einer UDP-Glukuronyltransferase im Dünndarm nachweisen, deren Aktivität höher war als die Aktivität in Lebermikrosomen. In einer weiteren Untersuchung fand dieselbe Arbeitsgruppe im Plasma von Ratten, die 3 Wochen lang eine quercetinhaltige Diät erhalten hatten, neben glukuronidiertem Quercetin sulfoglukuroniertes Quercetin sowie dessen methylierte Metaboliten. Auch hier zeigte ein zusätzlicher *In vitro*-Versuch mit Mikrosomen eine höhere Aktivität der UDP-Glukuronyltransferase im Dünndarm als in der Leber (MORAND et al. 1998). Beim Menschen wurden in Jejunum, Ileum und Colon spezifische UDP-Glukuronyltransferasen (UGT1A8, UGT1A10) nachgewiesen, die verschiedene Flavonoide, darunter Quercetin, glukuronidieren können (CHENG et al. 1998, 1999). In CaCo-2-Zellen induzierten Quercetin und Chrysin (Flavan) eine verstärkte Expression von UDP-Glukuronyltransferase 1A-Isoformen und erhöhten so die Glukuronidierungsrate in den Zellen (GALIJATOVIC et al. 2000). Die Glukuronidierung von Quercetin und Kämpferol durch eine humane, in der Leber

vorkommende UDP-Glukuronyltransferase wurde von OLIVEIRA et al. (2000, 2002) *in vitro* nachgewiesen. Kürzlich wurde veröffentlicht, dass Quercetin und andere Flavonoide auch ein Substrat für humane, intestinale UDP-Glukuronyltransferasen darstellen (DAY et al. 2000a). Daneben wurde gezeigt, dass Flavonoide durch Catechol-O-Methyltransferasen sowohl im Darm als auch in der Leber methyliert werden (PISKULA & TERA0 1998, ZHU et al. 1994, NIELSEN et al. 1998).

Diese umfangreiche postabsorptive Metabolisierung in Darm und Leber erklärt, warum nach oraler Applikation von Flavonolen und anderen Flavonoiden fast ausschließlich konjugierte Metabolite und kaum freie Aglyka im Blutplasma nachgewiesen wurden (ADER et al. 2000, BOUTIN et al. 1993, DAY et al. 2001, DONOVAN et al. 1999, FELGINES et al. 2000, MANACH et al. 1999, SHIMOI et al. 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Flavonoide bereits zum größten Teil in der Darmmukosa glukuronidiert und in einem gewissen Umfang auch methyliert werden. In der Leber finden weitere Glukuronidierungen und Methylierungen statt. Sie scheint der Hauptort für die Bildung von Sulfokonjugaten zu sein (PISKULA & TERA0 1998, SHALI et al. 1991).

Ein großer Teil der genannten Metabolite wird über die Galle ins Darmlumen sezerniert. Dort können sie partiell rückresorbiert werden und können somit einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (CRESPY et al. 1999, MANACH et al. 1996b, SFAKIANOS et al. 1997, UENO et al. 1983). Ein weiterer Teil der Metabolite wird mit dem Urin ausgeschieden (MANACH et al. 1996b, CHOUDHURY et al. 1999, DE VRIES et al. 1998, UENO et al. 1984, WALLE et al. 2001). Die Elimination über die Niere scheint bei der Ausscheidung von Flavonoiden aber eine untergeordnete Rolle zu spielen. So zeigten HOLLMAN et al. (1995) in ihrer Studie mit ileostomierten Probanden, dass nur 0,5 % der absorbierten Flavonoidmenge als Metaboliten über den Harn ausgeschieden wurden. Auch CHOUDHURY et al. (1999) fanden nach intravenöser Applikation von Quercetin, Quercetin-3-Glukosid sowie Quercetin-3-Glukorhamnosid nur 2,4 %, 6,7 % bzw. 9,2 % der applizierten Dosis im Urin von Ratten wieder. UENO et al. (1983) wiesen nach intravenöser Applikation von radioaktivmarkiertem Quercetin bei der Ratte ca. 17 % der applizierten Dosis im Harn, dagegen ca. 55 % in der Gallenflüssigkeit nach. Die bereits oben genannte *In situ*-Untersuchung von CRESPY et al. (1999) zeigte,

dass teilweise auch eine Resekretion von den in der Darmmukosa gebildeten Quercetinkonjugaten stattfindet. Ob diese Sekretion über den MRP2, wie an CaCo-2-Zellen für Quercetinglukosid gezeigt, erfolgt und in wie weit dieses auch *in vivo* eine Rolle spielt, ist noch ungewiss (WALGREN et al. 2000a).

Flavonoide, Flavonoidglykoside und Flavonoidmetaboliten, wie z. B. Glukuronide die nicht im Dünndarm absorbiert bzw. über die Galle resezerniert wurden, gelangen in den Dickdarm und unterliegen dort einer intensiven mikrobiellen Verstoffwechslung. AURA et al. (2002) zeigten vor Kurzem in einer *In vitro*-Fermentationsstudie mit humanen Faeces, dass die menschliche Darmflora in der Lage ist, sowohl Quercetin-3-Glukosid und Quercetin-3-Glukorhamnosid als auch Quercetinglukuronide zu dekonjugieren, da sie eine hohe β -Glukosidase-, eine hohe β -Glukuronidase- sowie eine α -Rhamnosidase Aktivität besitzt. Im Dickdarm könnte es somit zu einer Absorption der freigesetzten Aglyka kommen, worauf einige der bereits genannten Bioverfügbarkeitsstudien hindeuten (GRAEFE et al 2001, HOLLMAN et al. 1997, MANACH et al. 1997). Als Hauptabbauprodukt des Quercetin-3-Glukorhamnosids wurde 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure identifiziert, die weiter zu 3-Hydroxyessigsäure dehydroxyliert wurde (AURA et al. 2002). Auch in anderen *In vitro*-Studien wurden Mono- und Dihydroxyphenylessigsäuren, sowie Hydroxybenzoesäuren, und Hydroxyzimtsäuren als Abbauprodukte von Quercetinglykosiden nachgewiesen (HEILMANN & MERFORT 1998a,b, JUSTESEN et al. 2000, SCHNEIDER et al. 1999). Im Wesentlichen führt der mikrobielle Abbau also zu einer Spaltung des C-Ringes unter Entstehung verschiedener hydroxylierter, monomerer Phenolsäuren. Diese können ebenfalls absorbiert werden oder weiter zu kurzkettigen Fettsäuren und Kohlendioxid abgebaut werden (HEILMANN & MERFORT 1998a,b, HOLLMAN & KATAN 1998). In einer kürzlich veröffentlichten Studie fanden WALLE et al. (2001) nach oraler bzw. intravenöser Applikation von radioaktivmarkiertem Quercetin beim Menschen Kohlendioxid als Hauptmetabolit (zwischen 24% und 81% der applizierten Dosis) in der Atemluft wieder. Da der größte Teil des Kohlendioxids schon nach 4 Stunden nachweisbar war, schlussfolgerten WALLE et al. (2001), dass es schon im Darm unter Beteiligung der Mikroflora gebildet wurde.

Im Folgenden wird noch kurz darauf eingegangen, ob die im Vergleich zu Quercetin für Quercetinglukoside gezeigte höhere Bioverfügbarkeit bzw. beschleunigte Absorption

auch auf Glukoside anderer Flavonoide zutrifft. In verschiedenen *In vitro*-Versuchen wurde für Isoflavone im Gegensatz zu den Flavonolen eine schnellere und umfangreichere Absorption des Aglykons im Vergleich zum Monoglucosid gezeigt (MUROTA et al. 2002, STEENSMA et al. 1999, LIU & HU 2002). So wurden in CaCo-2-Zellen nur die Isoflavonaglyka Genistein und Daidzein, nicht aber Quercetin bzw. die Flavonaglyka Luteolin und Apigenin, ins basolaterale Kompartiment transportiert (MUROTA et al. 2002). Eine Erklärung dafür, dass Isoflavonglukoside nicht auf basolateraler Seite nachgewiesen wurden, könnte wie bei den Flavonolglukosiden ein Efflux über das MRP2 (Multidrug Resistance Associated Protein 2) sein (WALLE et al. 1999). Auch in einer *In vivo*-Bioverfügbarkeitsstudie von IZUMI et al. (2000) wurde eine schnellere Absorption und damit höhere Bioverfügbarkeit der Aglyka nachgewiesen. Die absolute orale Bioverfügbarkeit der freien Isoflavonaglyka ist jedoch wegen umfangreicher prae- und posthepatischer Metabolisierung ähnlich gering wie bei den Flavonolen (SFAKIANOS et al. 1997, JANNING et al. 2000, LIU & HU 2002). SETCHELL et al. (2002) konnte zeigen, dass Isoflavonglukoside, wie Flavonole auch, nicht als intakte Glukoside im Plasma vorliegen, sondern hauptsächlich in Form von Glukuroniden. Im Widerspruch zu den genannten *In vitro*-Studien zeigten SETCHELL et al. (2002) allerdings eine höhere Bioverfügbarkeit von Isoflavonglukosiden nach Applikation einer Sojamahlzeit als nach Applikation der jeweiligen Aglyka.

Einige Untersuchungen mit Flavonoiden aus der Untergruppe der Anthocyanidine deuten darauf hin, dass diese im Gegensatz zu den Flavonolen als intakte Glykoside (Anthocyanine) absorbiert werden können. MIYAZAWA et al. (1999) fanden nach oraler Applikation von Cyanidin-3-Glukosid bzw. Cyanidin-3,5-Diglukosid bei der Ratte sowie beim Menschen neben methylierten Metaboliten nur die intakten Glukoside im Plasma. Cyanidinaglykon oder Cyanidinkonjugate, wie z. B. Glukuronide wurden hingegen nicht nachgewiesen. Auch TSUDA et al. (1999) wiesen intaktes Cyanidin-3-Glukoside und methylierte Metaboliten, aber keine Konjugate nach oraler Gabe im Plasma der Ratte nach.

3 Material und Methoden

3.1 Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein

3.1.1 Zielsetzung

Voraussetzung für systemische Effekte von Quercetin nach oraler Aufnahme ist eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit der Substanz oder ihrer aktiven Metaboliten. Vor diesem Hintergrund und aufgrund von Hinweisen aus der Literatur, die für eine höhere orale Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Quercetinmonoglucosiden im Vergleich zur Bioverfügbarkeit nach Applikation des Aglykons bzw. des Glukorhamnosids (HOLLMAN et al. 1995, ERLUND et al. 2000, WALLE et al. 2000, GRAEFE et al. 2001) sprechen, hatte der erste *In vivo*-Versuch folgende Ziele:

1. Vergleich der oralen Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinmetaboliten aus Quercetinaglykon, Quercetin-3-O-glucosid (Q-3-Glc) und Quercetin-3-O-glucorhamnosid (Q-3-Glc-Rha) in einer hohen und einer niedrigen Dosierung
2. Qualitative und quantitative Bestimmung der auftretenden Metaboliten in Pfortader- und Jugularvenenblut
3. Aussage über Art und Ausmaß der Metabolisierung bei der Passage durch die Darmmukosa bzw. Leber.

Da im ersten Versuch letztendlich die Anzahl der auswertbaren Beobachtungen für einige Aussagen relativ gering war, wurde in einem zweiten Versuch der Vergleich der Applikation von Quercetinaglykon und Q-3-Glc in der niedrigen Dosierung wiederholt, um die Ergebnisse des ersten Versuches zu verifizieren. Als zusätzlicher Aspekt wurde der Einfluss der Futterzusammensetzung auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Q-3-Glc untersucht. Dazu wurde den Schweinen das Flavonolglucosid mit einem stärkereichen Futter und im Vergleich dazu mit Hackfleisch verabreicht.

3.1.2 Versuch 1

3.1.2.1 Versuchstiere und Fütterung

Als Versuchstiere dienten sechs männliche kastrierte Schweine (Hybridzucht, Firma Schaumann, Versuchsgut Hülsenberg, Wahlstedt/Holstein) mit einem Gewicht von 30-35 kg. Am Ende der Versuchsperiode erreichten die Tiere ein Gewicht zwischen 41 und 47 kg. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurde jedem Tier sowohl in die Vena jugularis als auch in die Vena portae ein Verweilkatheter (doppellumiger Katheter der Firma Cook, C/TPN/9.0D/80) von einem erfahrenen Operateur implantiert. Dazu erhielten die Schweine eine Infusionsnarkose über die Ohrvene mit einer Kombination von Ketamin und Diazepam. Beide Katheter wurden subkutan bis zum Nacken geführt, um Pflege und stressfreie Blutprobenentnahme zu erleichtern (Abbildung 3).



Abbildung 3: Blutprobenentnahme über implantierten Jugularvenenkatheter beim Schwein.

Die Katheter wurden dreimal täglich mit heparinierter isotonischer Kochsalzlösung (100 I. E. Heparin-Na/1ml NaCl) gespült, um ihre Durchgängigkeit zu gewährleisten. Zum Schutz der Verweilkatheter an der Austrittsstelle wurde den Schweinen ein Mäntelchen aus Segeltuch mit eingenähter Öffnungsklappe für den Zugang zu den

Kathetern angelegt (Abbildung 3). Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzelboxen mit planbefestigtem Boden ohne Einstreu. Die Stalltemperatur betrug 24 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %.

Als Futter wurde während des gesamten Versuchs ein Fertigfutter ohne Zusatz von Leistungsförderern der Firma J. A. Plambeck, Brügge eingesetzt, das im Wesentlichen aus Weizenschrot, Weizenkleie und Sojaextraktionsschrot bestand. Mittels Weender-Analyse wurden in der Trockenmasse (89,7 %) neben 62,1 % Nichtstrukturkohlenhydraten (Non fiber carbohydrates) 18 % Rohprotein, 1,3 % Rohfett und 5,1 % Rohasche bestimmt. Der Stärkegehalt betrug 44,3 %. Die Bestimmung des Energiegehaltes des Futters ergab 4341,7 cal/g Trockenmasse. Das Futter enthielt zusätzlich pro kg 15.000 I. E. Vitamin A, 1.500 I. E. Vitamin D3, 50 mg Vitamin E und 128 mg Kupfer. Die Tiere wurden zweimal täglich, morgens und abends, gefüttert. Die Futterzuteilung erfolgte restriktiv (90 % der *Ad libitum*-Futteraufnahme), um einerseits ein zu schnelles Wachstum der Schweine während der Versuchsperiode zu verhindern und andererseits die vollständige Aufnahme der Versuchsration zu gewährleisten. Leitungswasser stand während der gesamten Versuchsdauer zur *Ad libitum*-Aufnahme zur Verfügung.

3.1.2.2 Durchführung des Versuches 1

Zusammen mit einer Testmahlzeit erhielten die Tiere pro Behandlung eines der drei Flavonoide in hoher oder niedriger Konzentration, so dass sich insgesamt pro Tier sechs Behandlungen (drei Substanzen in jeweils zwei Dosierungen) ergaben. Jedes Tier wurde damit allen Behandlungen unterzogen. Mit jeder der drei Quercetinquellen wurde eine identische Dosis Quercetin von 165,4 µmol/kg KGW (hohe Dosierung) bzw. 33,1 µmol/kg KGW (niedrige Dosierung) verabreicht. Dies entspricht einer Dosierung von 50 mg bzw. 10 mg Quercetinaglykon/kg KGW, 76,8 mg bzw. 15,4 mg Quercetin-3-Glukosid/kg KGW und 101 mg bzw. 20,2 mg Quercetin-3-Glukorhamnosid/kg KGW.

Die Verabreichung der Testmahlzeit (200 g) mit der jeweiligen Testsubstanz erfolgte zum Zeitpunkt der Morgenfütterung. Die Tiere nahmen die Mahlzeit rasch (< 5 min) und vollständig auf. Zwischen den verschiedenen Behandlungen lag jeweils ein Tag

Pause, um eine vollständige bzw. weitgehende Elimination der im Blut zu bestimmenden Substanzen zu gewährleisten (ADER et al. 2000).

Die erste Blutentnahme aus Jugular- und Pfortaderkatheter erfolgte unmittelbar vor der Futteraufnahme zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Anschließend wurden nach $t = 60$ min, danach bis zum Zeitpunkt $t = 300$ min halbstündlich und zu den Zeitpunkten $t = 360$ min, $t = 720$ min und $t = 1440$ min Blutproben entnommen.

3.1.3 Versuch 2

3.1.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten drei weibliche Schweine (Hybridzucht, Firma Schaumann, Versuchsgut Hülsenberg, Wahlstedt/Holstein) mit einem Gewicht von 30-34 kg. Am Ende der Versuchsperiode erreichten sie ein Gewicht von 39-40 kg. Für diesen Versuch wurde jedem Tier eine Woche vor Versuchsbeginn ein Verweilkatheter (s.o.) in die Vena jugularis implantiert. Die Katheter wurden in annähernd gleichen zeitlichen Abständen mit heparinisierter Kochsalzlösung viermal täglich gespült. Als Schutz für den Verweilkatheder dienten auch hier die speziellen Mäntelchen mit Öffnungsklappe. Die übrigen Haltungsbedingungen entsprachen denjenigen im ersten Versuch (s. 3.1.2.1).

3.1.3.2 Durchführung des Versuches 2

Da für diesen Versuch nur drei Tiere zur Verfügung standen, wurden alle Behandlungen einmal wiederholt, so dass am Ende sechs Beobachtungen von drei verschiedenen Tieren zur Auswertung herangezogen werden konnten.

Wie im ersten Versuch wurden den Schweinen 33,1 μmol Quercetin bzw. Quercetin-3-glukosid/kg KGW über eine Testmahlzeit des unter 3.1.2.1 beschriebenen Futters verabreicht.

Als weitere Behandlung erhielten die Tiere Quercetin-3-glukosid (33,1 μmol /kg KGW) zusammen mit 15 g rohem Rinderhack. Die Zusammensetzung des Hackfleisches wurde ebenfalls mittels Weender-Analyse bestimmt. Das Hackfleisch enthielt in der Trocken-

masse (31,2 %) 65,7 % Rohprotein, 30,4 % Rohfett und 3,2 % Rohasche. Der Energiegehalt betrug 6427,8 cal/g Trockenmasse.

Zwischen den verschiedenen Behandlungen lag jeweils ein Tag Pause, um eine vollständige bzw. weitgehende Elimination der im Blut zu bestimmenden Substanzen zu gewährleisten.

Wie im ersten Versuch erfolgte die erste Blutprobenentnahme direkt vor Aufnahme der Testmahlzeit (Zeitpunkt $t = 0$ min). Anschließend wurden bis zum Zeitpunkt $t = 300$ min halbstündlich, danach nach 360 min, 480 min, 720 min und 1440 min Blutproben entnommen. Nach Applikation des Quercetin-3-glukosids über das Hackfleisch wurde eine zusätzliche Blutprobe nach 45 min gezogen.

3.1.4 Analytik

3.1.4.1 Probengewinnung

Bei jeder Blutprobenentnahme wurden zunächst 3 ml Blut entnommen und verworfen, um den Katheter vollständig mit frischem Blut zu füllen. Anschließend wurde 8-10 ml Blut entnommen und sofort in Li-Heparinröhrchen überführt. Das entnommene Blutvolumen wurde durch 8-10 ml physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Anschließend wurde der Katheter mit 2,5 ml heparinisierte isotonische Kochsalzlösung (100 I. E. Heparin-Natrium/1 ml NaCl) gefüllt, um Blutgerinnungsprozesse im Katheter zu verhindern. Zur Plasmagewinnung wurden die Blutproben direkt nach Entnahme mit 4.500 g bei einer Temperatur von 4 °C 10 min zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma (ca. 6 ml) wurde auf drei 2 ml Eppendorf-Cups verteilt, sofort bei -18 °C eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70 °C gelagert.

3.1.4.2 Probenaufarbeitung

Die Plasmaextaktion erfolgte in Anlehnung an MORAND et al. (1998). Unmittelbar nach dem Auftauen wurden 980 µl der Plasmaprobe mit 130 µl Essigsäure (0,583 mol/L) auf einen pH von 4,9-5 (pH-Optimum der β -Glucuronidase/Sulfatase) eingestellt und gründlich gemischt (Vortex).

Da sowohl die Konjugate des Quercetins als auch die der zu erwarteten Quercetinmetabolite mit der verwendeten HPLC-Methode zumindest teilweise nicht

direkt erfassbar sind, wurden die angesäuerten Proben anschließend mit einem Gemisch von 10.000 Einheiten β -Glucuronidase (EC 3.2.131) und 250 Einheiten Sulfatase (Crude Solution, gewonnen aus *Helix pomatia*, Sigma-Aldrich AG, Deisenhofen) 60 min in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass diese Konditionen eine vollständige Spaltung der Konjugate gewährleisten (Daten nicht gezeigt).

Nach Zusatz von 20 μ l einer methanolischen Rhamnetinlösung (10 μ g/ml Methanol) als internen Standard wurden die Proben zur Extraktion der Flavonole aus dem Plasma mit 5,5 ml Aceton versetzt und anschließend 20 Minuten auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben 45 min bei 3.700 g (Varifuge 20RS, Heraeus, Hanau) zentrifugiert und der Überstand bis zur Trockene bei 45 °C und einem partiellen Vakuum eingedampft (Speed-Vac AES 1010, Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA). Der Rückstand wurde in 200 μ l Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wurden 77,5 μ l Aqua bidest. sowie 22,5 μ l Salzsäure (10 mol/l) zugegeben und die unlöslichen Probenrückstände 10 min in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf) bei 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt mittels HPLC analysiert.

3.1.4.3 HPLC-Methode

Die Bestimmung der Flavonole in den aufgearbeiteten Proben erfolgte nach der Methode von HOLLMAN et al. (1996a) mit leichten Modifikationen. Das Prinzip dieser hochempfindlichen HPLC-Methode beruht auf der Eigenschaft der Flavonole, mit dreiwertigen Aluminiumionen fluoreszierende Komplexe zu bilden (DENG & VAN BERKEL 1998). Diese Eigenschaft wurde bei der Nachsäulenderivatisierung genutzt (s. u.).

Jeweils 30 μ l der aufgearbeiteten Proben wurden über den Autosampler (950-AS, Firma Jasco, Gross-Umstadt) in die HPLC-Anlage injiziert. Als stationäre Phase diente eine „Reversed-Phase“-Trennsäule (C-18 Kromasil 100, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5 μ m, Firma Jasco), die durch eine Vorsäule (C-18 Inertsil ODS-2, 10 x 4 mm, Partikelgröße: 5 μ m, Firma Jasco) vor groben Verschmutzungen aus der Matrix geschützt wurde.

Die mobile Phase setzte sich aus einem Gemisch aus Natrium-Dihydrogen-Phosphat-Puffer (25 mmol/l, pH 2,4), Acetonitril und Methanol im Volumenverhältnis 68:27:5

zusammen. Der pH-Wert im Fließmittelgemisch betrug 2,9. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte in einem Kapillarreaktor (3 m lange Teflonkapillare, innerer Durchmesser 0,5 mm, geflochten) mittels eines Gemisches aus einer methanolischen Aluminiumnitratlösung (1 mol/l) und 7,2 % (V/V) Eisessig. Das Derivatisierungsreagenz wurde dem Substanzgemisch über ein „low-dead-volume“-T-Mischstück mit einer Flussrate von 0,4 ml/min zugeführt, so dass eine gute Durchmischung von Fließmittel und Reagenz gegeben war. Säule und Reaktor wurden in einem Säulenofen auf 30 °C temperiert. Die Detektion der Flavonol-Aluminiumionen-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (920-FP, Firma Jasco, Gross-Umstadt) bei einer Anregungswellenlänge von 422 nm und Emissionswellenlänge von 485 nm. Die Flavonole wurden mit Hilfe von Standardsubstanzen anhand der Retentionszeiten identifiziert.

3.1.4.4 Kalibrierung

Zur Erstellung der Eichgeraden für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin wurden 960 µl natives Blutplasma vom Schwein mit 20 µl der jeweiligen methanolischen Standardlösung, welche alle drei Substanzen enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden auch hier 20 µl methanolische Rhamnetinlösung als interner Standard zugegeben. Die Proben wurden auf die gleiche Art und Weise aufgearbeitet wie die eigentlichen Plasmaproben (s. 3.1.4.2). Das für die Standardreihen verwendete Plasma enthielt keine nachweisbaren Mengen der relevanten Flavonole. Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Peakflächen (Fläche Standard/Fläche interner Standard). Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ergab sich bei allen drei Substanzen ein linearer Verlauf (Abbildung 4).

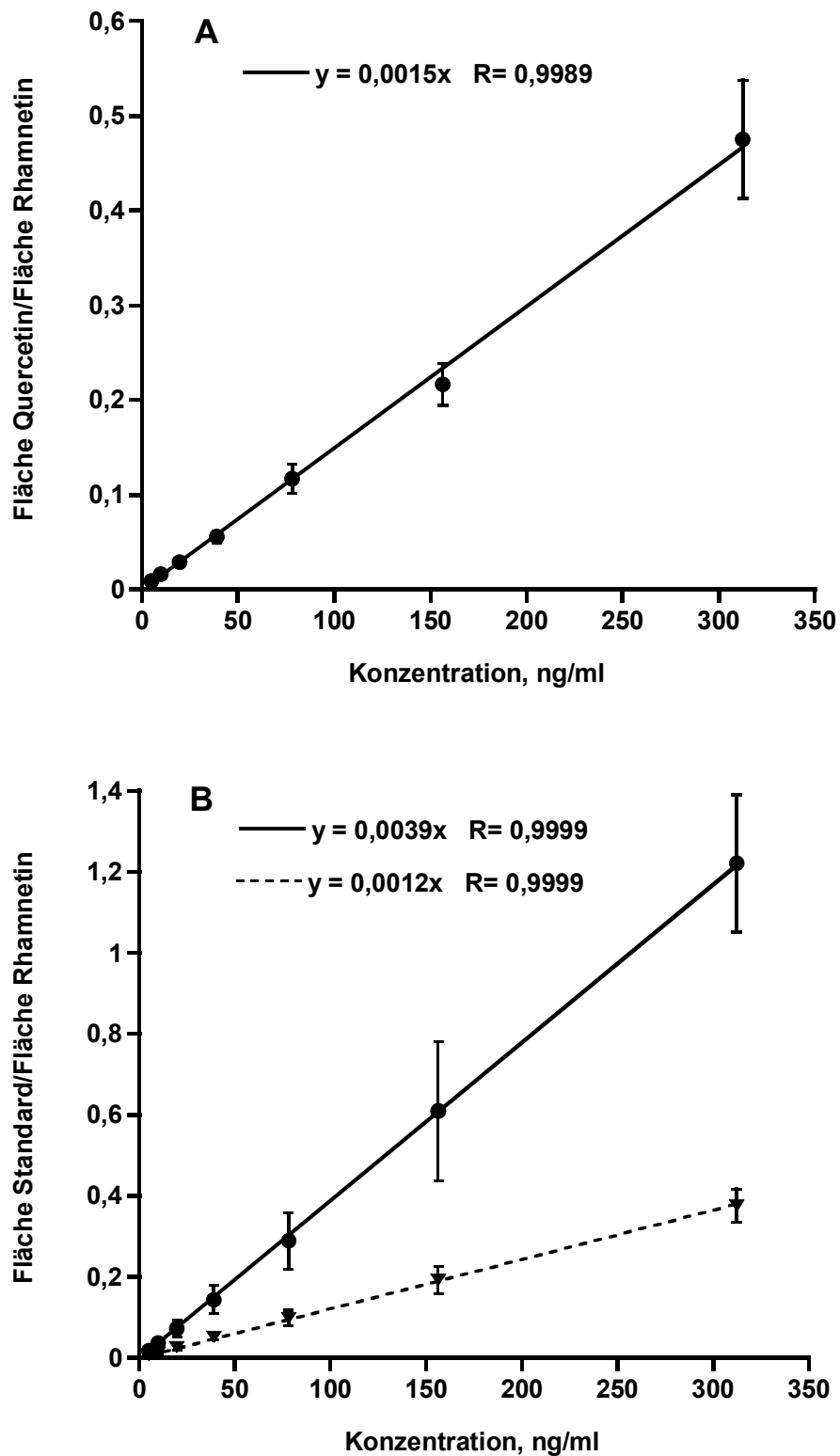


Abbildung 4: Kalibriergerade zur quantitativen Bestimmung von (A) Quercetin bzw. (B) Isorhamnetin (durchgezogene Linie) und Tamarixetin (gestrichelte Linie) im Plasma. Mittelwerte mit Standardabweichungen von 8 Bestimmungen. (R = linearer Korrelationskoeffizient)

3.1.4.5 Nachweisgrenze und Wiederfindung

Als Nachweisgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 5:1 zu Grunde gelegt, d. h. ein Peak, der mindestens fünfmal so hoch wie der Mittelwert des Basislinienrauschens war, galt als eindeutig nachweisbar. Für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin ergaben sich Nachweisgrenzen von 1-2 ng/ml Plasma.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde nativem Schweineplasma eine definierte Menge der Testsubstanz über einen methanolischen Standard zugesetzt und der Ansatz auf die gleiche Art und Weise wie eine Plasmaprobe aufgearbeitet (s. 3.1.4.2). Die so ermittelten Peakflächen wurden mit der Peakfläche des direkt gemessenen methanolischen Standards ins Verhältnis gesetzt. Die Wiederfindung wurde für alle Konzentrationen der Kalibriergerade als Mittelwert aus vier Bestimmungen berechnet. Für Quercetin lag die Wiederfindung zwischen 56 % und 90 %, für Isorhamnetin zwischen 83 % und 113 % und für Tamarixetin zwischen 87 % und 111 % (Tabelle 4).

Tabelle 4: Wiederfindung von Quercetin und Metaboliten. Mittelwerte mit Standardabweichung aus 4 Bestimmungen.

Konzentration (ng/ml)	Wiederfindung in Prozent		
	Quercetin	Isorhamnetin	Tamarixetin
4,88	56 ± 16	113 ± 14	93 ± 19
9,76	90 ± 15	90 ± 14	111 ± 19
19,53	78 ± 13	83 ± 12	92 ± 12
39,06	89 ± 33	92 ± 23	94 ± 10
78,125	78 ± 13	84 ± 14	87 ± 15
156,25	68 ± 28	100 ± 9	87 ± 32
312,5	69 ± 8	87 ± 12	91 ± 15

3.1.5 Versuchsauswertung

3.1.5.1 Pharmakokinetische Parameter

Eliminationshalbwertszeit

Die Eliminationshalbwertszeit wurde mit Hilfe des Rechenprogramms TOPFIT2.0 - Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System (G. Heinzel et al., Stuttgart; Jena; New York, 1993) über die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_{el} anhand eines Nichtkompartiment-Modells ermittelt. Voraussetzung für die Anwendung dieses Modells ist eine lineare Pharmakokinetik, d.h. die Elimination des Pharmakons verläuft nach einer Kinetik erster Ordnung, wobei die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung des Pharmakons ($-dC/dt$) proportional zur jeweils vorliegenden Konzentration (C) ist ($-dC/dt = k \cdot C$). Die kinetischen Parameter werden in diesem Modell unabhängig von der Zahl möglicher kinetischer Kompartimente bestimmt (DERENDORF & GARRETT, 1987). Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k_{el} stellt die (negative) Steigung einer durch den abfallenden Teil der Plasmakonzentrationszeitkurve gelegten Gerade dar, die über eine logarithmisch-lineare Regression berechnet wurde.

Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC)

Als Maß für die systemisch verfügbare Substanzmenge im Organismus wurde die Fläche unter der Plasmaspiegelkurve bis zum letzten Meßpunkt ($AUC_{(0-24h)}$) bestimmt, die mit Hilfe von TOPFIT (s.o.) mittels der linearen Trapezoidregel berechnet wurde. Aus jeweils zwei Meßzeitpunkten (t_n, t_{n+1}) und den dazugehörigen Konzentrationen (c_n, c_{n+1}) wurde die Fläche des entsprechenden Trapezes bestimmt:

$$\text{Fläche eines Trapezes} = (t_{n+1} - t_n) \cdot (c_n + c_{n+1}) / 2$$

Die Bestimmung der Gesamtfläche $AUC_{(0-24h)}$ erfolgte anschließend durch Addition aller Trapezflächen, so dass sie der Fläche unter der Plasmaspiegelkurve bis zum letzten Messzeitpunkt entspricht. Zur Ermittlung der Flächen der Isorhamnetin- bzw.

Tamarixetinkonzentrations-Zeit-Kurve wurde die jeweilige Metabolitenkonzentration in Quercetinäquivalente umgerechnet. Die Berechnung der Gesamt-AUC erfolgte durch die Addition der Einzel-AUCs:

$$\text{Gesamt-AUC} = \text{AUC}_{\text{Quercetin}} + \text{AUC}_{\text{Isorhamnetin}} + \text{AUC}_{\text{Tamarixetin}}$$

Relative Bioverfügbarkeit

Zur Berechnung der Relativen Bioverfügbarkeit wurde die Gesamt-AUC (s. o.), die nach Applikation des untersuchten Quercetinglykosids erhalten wurde, auf die nach Applikation von Quercetin erhaltene Gesamt-AUC (s. o.) bezogen:

Relative Bioverfügbarkeit =

$$\left(\frac{\text{Gesamt-AUC}_{\text{nach Quercetinglykosid}}}{\text{Gesamt-AUC}_{\text{nach Quercetin}}} \right) \cdot 100 \%$$

3.2 In vitro-Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) vom Schwein

3.2.1 Zielsetzung

Wie im Literaturteil beschrieben, existieren Hinweise auf die Beteiligung des sekundär aktiven Glukosetransporters SGLT1 bei der Absorption von Quercetinglukosiden (vgl. Kapitel 2.4.1). Daher sollten in der vorliegenden Arbeit in Ergänzung zu den *In vivo*-Studien weitergehende Erkenntnisse zum Transport von Q-3-Glc durch den in der Bürstensaummembran von Dünndarmepithelzellen lokalisierten SGLT1 gewonnen werden.

Für die Versuche wurden aus dem Dünndarm von Schweinen isolierte Bürstensaummembranvesikel (BSMV) verwendet (WOLFFRAM et al. 1986). Im Vergleich zu Versuchen mit intaktem Gewebe, wie z. B. beim Einsatz von Ussing-Kammern oder der Mucosal-Uptake-Technik, stellen die BSMV ein wesentlich einfacheres Modell mit deutlichen Vorteilen zur Untersuchung von Transportsystemen in polarisierten Zellen dar. Aufgrund der selektiven Anreicherung der Bürstensaummembran sind z. B. Untersuchungen von in der Bürstensaummembran lokalisierten Transportsystemen ohne Beeinflussung der Transportprozesse durch Transportsysteme anderer Membranfraktionen des Dünndarmepithels möglich. Ferner sind in den BSMV-Präparationen weder intrazelluläre Enzyme noch andere Zellorganellen vorhanden, so dass die eingesetzten Substrate nicht oder kaum metabolisiert werden. Somit kann direkt der Transport physiologisch relevanter Substrate durch die Bürstensaummembran untersucht werden (MURER et al. 1984, BERTELOOT & SEMENZA 1990). Ein weiterer Vorteil gegenüber den genannten anderen Methoden ist, dass BSMV eine vernachlässigbar kleine „Unstirred Layer“ aufweisen, da die Bürstensaummembran während der Präparation von der Mucusschicht befreit wird. Unstirred-Layer-Effekte können bei dieser Methode daher vernachlässigt werden. Dies und das kleine Vesikelvolumen ermöglichen wesentlich kürzere Inkubationszeiten als bei anderen Methoden, so dass sich BSMV insbesondere für die Bestimmung kinetischer Transportparameter eignen (BERTELOOT & SEMENZA 1990, MURER et al. 1984). Ferner kann die Zusammensetzung der Inkubationsmedien auf beiden Seiten der Membran

flexibler gestaltet werden, da im Gegensatz zu Versuchen mit lebendem Gewebe keine Sauerstoffbegasung, Einstellen eines physiologischen pH-Wertes u. ä. notwendig ist (BERTELOOT & SEMENZA 1990, MURER et al. 1984).

Ziel der Untersuchungen war, durch den Nachweis sowohl einer Cis-Inhibition als auch einer Trans-Stimulation den möglichen Transport von Q-3-Glc über den SGLT1 zu prüfen sowie den Typ der Interaktion von Q-3-Glc mit dem SGLT1 anhand der kinetischen Parameter des Transportes von Glukose in An- und Abwesenheit des Flavonols zu ermitteln.

3.2.2 Präparation der Bürstensaummembranvesikel (BSMV)

Die Präparation der BSMV erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von KESSLER et al. (1978a). Als Ausgangsmaterial dienten ca. 2 m mittleres Jejunum vom Schwein. Der Darm wurde unmittelbar nach Schlachtung der Tiere am Schlachthof entnommen. Der Dünndarm wurde sofort mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von 40 mg/l des Proteinaseinhibitors Phenylmethyl-Sulfonyl-Flourid (PSMF) und 154,3 mg/l Dithiothreitol (DTT) zur Auflösung der Mucusschicht gründlich gespült und der Länge nach aufgeschnitten. Während des 15minütigen Transports zum Labor wurde der Darm in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung mit PSMF und DTT aufbewahrt. Alle weiteren Isolationsschritte wurden bei einer Temperatur von 0-4 °C in einem Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt.

Die Mukosa wurde mit einem Objektträger unter leichtem Druck abgeschabt. Das so erhaltene Mukosageschabsel (ca. 60 ml) wurde in 200 ml Puffer 1 mit EGTA (Zusammensetzung in mmol/l: 50 Mannitol, 5 EGTA, 2 Tris, mit HCl auf pH 7,0 eingestellt) und 200 ml Puffer 1 ohne EGTA mittels einem Polytron PT MR 3100 mit 16.000 Umdrehungen/min 4 min lang homogenisiert. Zur Bestimmung des Proteingehaltes sowie der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Na⁺/K⁺-ATPase wurde eine Homogenatprobe von 1 ml entnommen und bis zur Bestimmung, die am gleichen Tag erfolgte, bei einer Temperatur von 0-4 °C aufbewahrt.

Anschließend wurde dem Homogenat CaCl₂ (Endkonzentration 10 mmol/l) über eine Stammlösung (1 mol/l) zugesetzt. Nach guter Durchmischung wurde der Ansatz zur Aggregation der Zellorganellen und unerwünschter Membranen 15 min stehen gelassen.

Im nächsten Schritt wurde das Homogenat in einer Kühlzentrifuge bei 4.000 g 15 min lang zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde verworfen und der Überstand 30 min bei 41.000 g zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in 80 ml Puffer 2 (Zusammensetzung in mmol/l: 50 Mannitol, 10 HEPES, mit Tris auf pH 7,5 eingestellt) mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators (Potter-S, Braun, Deutschland) bei 1200 Umdrehungen/min mit 10 Hüben resuspendiert. Nach Wiederholung der Präzipitation (Zusatz von CaCl_2) und der beiden Zentrifugationsschritte wurde das erhaltene Pellet schließlich in 40 ml „BSM-Puffer“ (Zusammensetzung, mmol/l: 300 Mannitol, 0,1 Mg-Sulfat, 35 HEPES, mit Tris auf pH 7,2 eingestellt) mit 10 Hüben bei 1200 Umdrehungen/min resuspendiert. Die Zusammensetzung des für die Transstimulationsversuche verwendeten BSM-Puffers ist in dem dazugehörigen Unterkapitel beschrieben.

Danach wurde ein letztes Mal 30 min bei 41.000 g zentrifugiert. Das daraus erhaltene Pellet wurde in 1-3 ml BSM-Puffer mit 30 Hüben bei 1200 Umdrehungen/min erneut im Glas-Teflon-Homogenisator resuspendiert.

Aliquote der Membransuspension (350 μl) wurden in Cryotubes pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Durchführung der entsprechenden Versuche eingefroren (WOLFFRAM et al., 1986).

Vor Versuchsbeginn wurde die Membransuspension bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut und anschließend zur Equilibrierung 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen.

3.2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der BSMV

Abbildung 5 zeigt transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der BSMV nach Aufarbeitung mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach SCHRADER et al. (1997). Die gereinigten Replikatate wurden anschließend unter dem Transmissionselektronenmikroskop (Philips EM 301, 60 kV) betrachtet und geeignete Ausschnitte fotografiert. Die Aufnahme zeigt, dass die isolierten Bürstensaummembranen Vesikel mit annähernd kugeligem Gestalt und einheitlicher Oberfläche bilden (Abbildung 5). In der oberen Abbildung ist ein z. T. durch die Aufarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie aufgebrochenes Membranbläschen zu sehen.

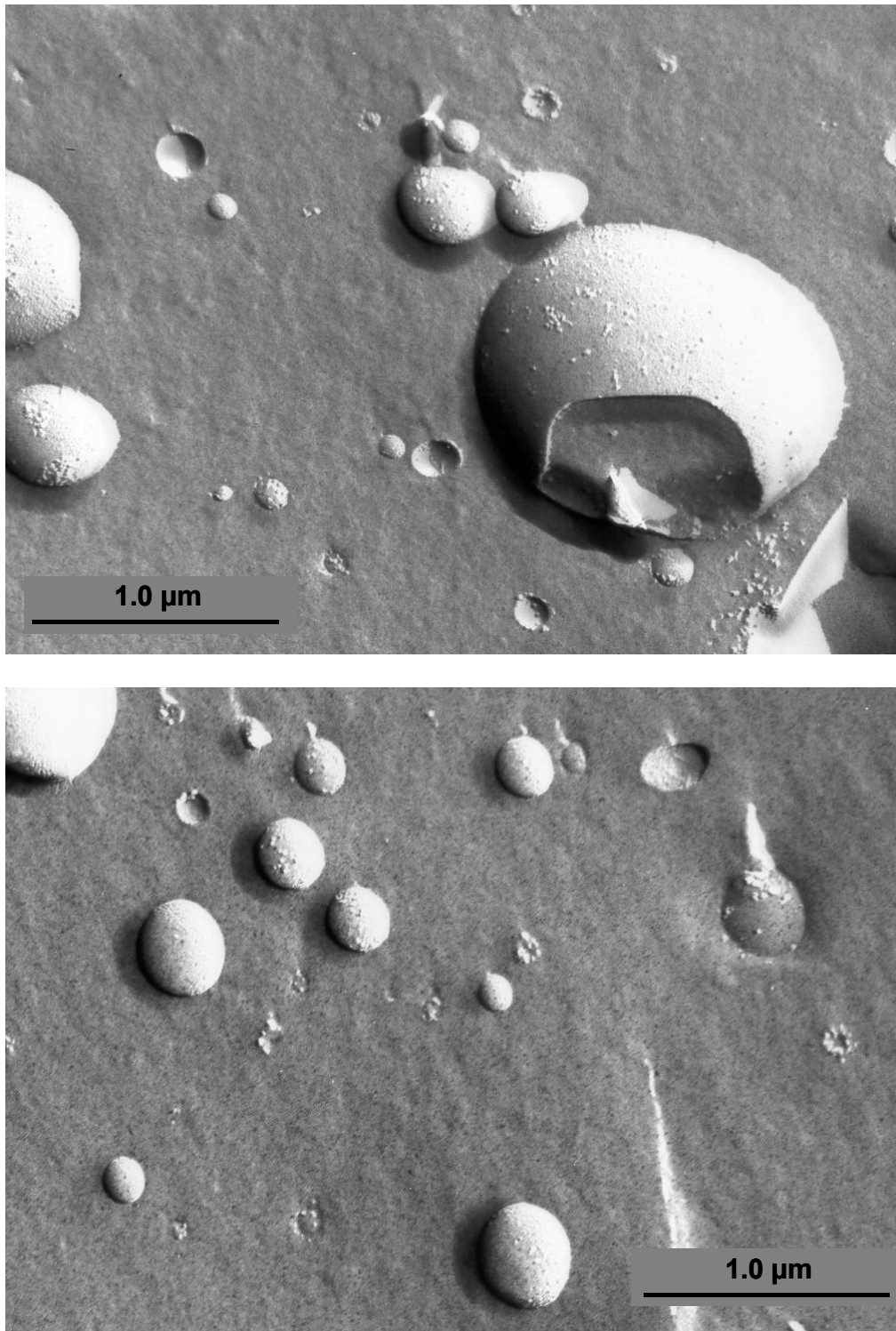


Abbildung 5: Aufnahme isolierter Bürstensaummembranvesikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Philips EM 310, 60 kV) nach Aufarbeitung mittels Gefrierbruchtechnik. Vergrößerung: 47.400fach. Aufnahmen: K. Schrader, Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel

3.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes im Homogenat und in der BSMV-Suspension (Tabelle 5) wurde der Bio-Rad-Test (Bio-Rad-Labratoreis GmbH, München, Deutschland) verwendet. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wodurch es zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt. Die daraus resultierende Farbänderung verläuft proportional zur Proteinkonzentration, so dass diese Änderung photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm (UV Spectrophotometer 1602, Shimadzu, Europa GmbH Photometer) bestimmt werden kann. Als Standard diente bovines Serum-Albumin (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz).

3.2.5 Enzymatische Charakterisierung

Die spezifische Aktivität (mU/mg Protein) der im Folgenden aufgeführten Enzyme wurde jeweils sowohl im Mukosahomogenat als auch in der dazugehörigen BSMV-Fraktion bestimmt. Zur Beurteilung der Anreicherung bzw. Verunreinigung der BSMV-Präparationen diente der Anreicherungsfaktor, der sich aus dem Quotienten der spezifischen Enzymaktivität der Membransuspension und dem entsprechenden Wert für das Mukosahomogenat ergibt (Tabelle 5).

3.2.5.1 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase kann als Markerenzym für die Büstensaummembranen verwendet werden, da dieses Enzym hauptsächlich in der luminalen Membran der intestinalen Epithelzellen lokalisiert ist (RAAB und SCHARRER 1980, HOPFER 1987). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte mit Hilfe eines käuflichen Testes (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), dem die Spaltung von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und Phosphat durch die AP zu Grunde liegt. Dabei ist die pro Zeiteinheit gebildete Menge an gelbem p-Nitrophenol proportional zur AP-Aktivität. Die resultierende Extinktionszunahme kann bei einer Wellenlänge von

405 nm photometrisch gemessen werden (UV Spectrophotometer 1602, Shimadzu, Europa GmbH).

3.2.5.2 Bestimmung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität

Als Markerenzym für die Verunreinigung mit basolateralen Membranen (BLM) wurde die spezifische Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase bestimmt. Die Vorhandensein dieses Enzyms ist in Epithelzellen auf die basolateralen Membranabschnitte beschränkt (DEL CASTILLO und ROBINSON, 1982). Der Bestimmung liegen mehrere gekoppelte, enzymatische Reaktionen zu Grunde. Sie erfolgte nach einer Methode von BERNER und KINNE (1976). Dabei ist die pro Zeiteinheit umgesetzte NADH-Menge proportional zur ATPase-Aktivität. Die durch die Oxidation von NADH zu NAD⁺ bedingte Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm wird photometrisch bestimmt. Für jede Probe wurde die Gesamt-ATPase-Aktivität sowohl mit als auch ohne Zugabe von Ouabain, einem spezifischen Inhibitor der Na⁺/K⁺-ATPase, gemessen. Die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase (Ouabain-sensitive ATPase) ergibt sich aus der Differenz der ATPase-Aktivität in Abwesenheit von Ouabain (Gesamt-Aktivität) und der in Gegenwart von Ouabain ermittelten ATPase-Aktivität (Ouabain-insensitive ATPasen). Um das Passieren von ATP durch die Membran zu den im Vesikelinneren liegenden ATP-Bindungsstellen zu ermöglichen, wurden alle Messungen in Gegenwart von 0,005% Saponin gemessen. Saponin bewirkt aufgrund seiner Detergenzeigenschaften eine Permeabilisierung der Membranvesikel (STIEGER und MURER, 1983).

3.2.5.3 Anreicherung der Bürstensaummembranen

Als Maß für die Anreicherung der Bürstensaummembranen in der isolierten Membranfraktion diente der Quotient aus der spezifischen Aktivität der AP in der BSM-Fraktion und der spezifischen Aktivität im entsprechenden Mukosahomogenat.

Die für die Transportuntersuchungen eingesetzten BSM-Präparationen wiesen durchschnittlich eine 14-fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der AP auf (Tabelle 5).

Die Verunreinigung der BSM-Fractionen mit basolateralen Membranen war gering, da der Quotient der spezifischen Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase in der Membranfraktion und im Mukosahomogenat nur zwischen 0,9 und 1,5 lag (Tabelle 5).

Tabelle 5: Proteingehalt, spezifische Enzymaktivitäten und Anreicherungsfaktoren in Homogenat und BSMV aus mittlerem Jejunum vom Schwein (Mittelwerte mit Standardfehler von 6 Membranpräparationen)

	Homogenat	BSMV	Anreicherungsfaktor*
Protein (mg/ml)	14,7 ± 1,2	12,6 ± 2,0	----
Alkalische Phosphatase (mU/mg Protein)	247,6 ± 44,9	3233,3 ± 443,4	13,7 ± 1,4
Na^+/K^+ -ATPase (mU/mg Protein)	113,2 ± 8,9	102,0 ± 27,8	0,9 ± 0,2

* Quotient aus spezif. Aktivität in BSM-Fraktion und im entsprechenden Mukosahomogenat

3.2.6 Messung der Substrataufnahme in die Bürstensaummembranvesikel

In den Transportuntersuchungen wurde die Aufnahme von $[2\text{-}^3\text{H}]$ -markierter D-Glukose (Amersham Pharmacia Biotech, GB) in die BSMV unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, die im jeweiligen Ergebnissteil genau beschrieben werden, gemessen. In allen Inkubationsmedien (Kontrolle und Versuchsansatz) war Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich AG, Deisenhofen) in einer Endkonzentration von 0,25 % zum Lösen der Testsubstanzen enthalten.

Zu 20 μl Versuchslösung, die u.a. das radioaktiv markierte Substrat enthält, wurden jeweils 10 μl BSMV-Suspension pipettiert und der Versuchsansatz gut durchmischt (Vortex). Nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit wurden dem Gemisch 3 ml eiskalte Stopplösung zugesetzt und der Ansatz sofort mittels einer Schnell-

filtrationsvorrichtung (WOLFFRAM et al. 1984) über einen vorgewaschenen Cellulosenitrat-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Deutschland) mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurde zweimal mit je 3 ml Stopplösung nachgespült. Der gesamte Absaugvorgang dauerte nicht länger als 15 s.

Für Versuche mit Inkubationszeiten von weniger als 10 s wurde eine elektronisch gesteuerte „Kurzinkubationsvorrichtung“ (N. Bader, Kilchberg, Schweiz) nach KESSLER et al. (1978) verwendet. Dabei wurden auf dem Boden des Reagenzgläschens 20 µl Versuchslösung vorgelegt und unmittelbar daneben 10 µl BSM-Suspension pipettiert. Nach automatischem Mischen und Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeit wurden dem Versuchsansatz mit Hilfe von über Druckluft gesteuerten Ventilen 3 ml Stopplösung aus einem eisgekühlten Vorratsgefäß zugesetzt. Filtration, Spülung und weiteres Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

Die Zusammensetzung der Stopplösung entsprach der Zusammensetzung des jeweiligen Inkubationsmedium ohne Zusatz von Transportsubstrat und Radioaktivität. Zusätzlich enthielt die Stopplösung 0,2 mmol/l des SGLT₁-Inhibitors Phlorizin (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz).

Zur Bestimmung der unspezifischen Substratbindung an den Filter (= Nullwert) wurden 20 µl Versuchslösung direkt mit 3 ml Stopplösung versetzt, nach dem Mischen in die Filtrationsvorrichtung überführt und anschließend zweimal mit je 3 ml Stopplösung nachgespült.

Die Filter wurden in ein Zählfläschchen überführt, das mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe, Lumac, Groningen, Niederlande) befüllt wurde. Anschließend wurde die Radioaktivität der Probe in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri Carb 2100 TR, Packard Bioscience Company) gemessen. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich, mit Ausnahme der Nullwerte, die nach Filtration gemessene Radioaktivität in Form von ³H-D-Glukose innerhalb der BSMV befindet.

Um die spezifische Radioaktivität der Versuchslösung zu bestimmen, wurden 20 µl Versuchslösung direkt mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und gemessen.

Die Berechnung der Substrataufnahme in die Vesikel erfolgte anhand der spezifischen Radioaktivität (Zerfälle/min) der Proben sowie der Versuchslösungen. Die auf 1 mg

Membranprotein bezogene Substrataufnahme lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Substrataufnahme (pmol/mg Protein)} = A_{\text{Probe}} \cdot V_{\text{Vlsg}} \cdot C_{\text{Vlsg}} / A_{\text{Vlsg}} \cdot V_{\text{BSMV}} \cdot P_{\text{BSMV}}$$

A_{Probe} : Zerfälle/min der Probe - Zerfälle/min des Nullwertes

A_{Vlsg} : Zerfälle/min der Versuchslösung- Zerfälle/min des Nullwertes

C_{Vlsg} : Substratkonzentration in der Versuchslösung (pmol/l)

V_{Vlsg} : eingesetztes Volumen der Versuchslösung (μl)

V_{BSMV} : eingesetztes Volumen der BSMV-Suspension (μl)

P_{BSMV} : Proteinkonzentration in der BSMV-Suspension ($\text{mg}/\mu\text{l}$)

3.2.7 Funktionelle Charakterisierung der BSMV

D-Glukose wird durch den Na^+ -abhängigen Glukosetransporter SGLT1, der in der Bürstensaummembran lokalisiert ist, aufgenommen (MURER & HOPFER 1974, HOPFER et al. 1976, HOPFER 1987, WOLFFRAM et al. 1986). Um die Brauchbarkeit der isolierten, jejunalen BSMV zur Messung des Substrattransportes zu prüfen, wurde die Aufnahme von radioaktiv markierter D-Glukose in die Vesikel in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten ($\text{Na}^+_{\text{außen}} = 100 \text{ mmol/l}$, $\text{Na}^+_{\text{innen}} = 0$) gemessen.

Abbildung 6 zeigt die Aufnahme von D-Glukose (0,1 mmol/l) in Gegenwart eines transmembranalen, in die Vesikel gerichteten Na^+ - bzw. Cholin^+ -Gradienten. Unter Na^+ -Gradienten-Bedingungen akkumulieren die BSMV D-Glukose über den Gleichgewichtswert (Inkubationszeit = 60 min) hinaus. Die maximale Aufnahme erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1 min. Der Quotient aus maximaler Glukose-Aufnahme und Gleichgewichtswert ergab einen „overshoot“ von $12,2 \pm 1,3$. Unter Na^+ -freien Bedingungen hingegen zeigte die Glukoseaufnahme nur einen langsamen Anstieg bis zum Gleichgewichtswert.

Somit energetisiert ein in die Vesikel gerichteter Na^+ -Gradient die Aufnahme der D-Glukose. Der dabei zu beobachtende „overshoot“ ist Ausdruck eines sekundär aktiven Transportprozesses. Die Glukoseaufnahme unter Na^+ -freien Bedingungen beruht dagegen auf Diffusion von D-Glukose in die Vesikel. Der gezeigte Verlauf ist typisch für die Aufnahme von D-Glukose in intestinale BSMV (KESSLER et al. 1978a,b, HOPFER et al. 1976, WOLFFRAM et al. 1986). Damit sind die aus dem Schweinedarm isolierten BSMV für Transportstudien geeignet.

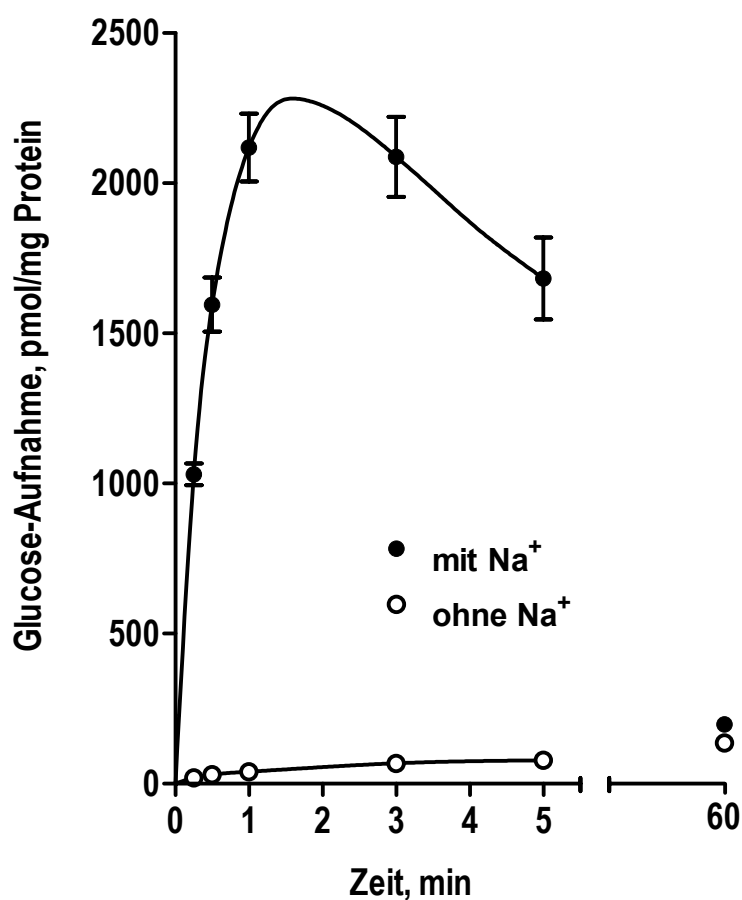


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der D-Glukose-Aufnahme in jejunale BSMV vom Schwein

Mittelwerte mit Standardfehler von 6 Bestimmungen (3 Membranpräparationen, jeweils Doppelbestimmungen). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 ³H-markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl bzw. Cholinchlorid, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES/Tris, pH 7,2.

3.2.8 Versuch zur Bestimmung der Stabilität von Quercetin-3-Glukosid im Inkubationsmedium

3.2.8.1 Zielsetzung

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Q-3-Glc durch die membranständige Laktat-Phlorizin-Hydrolase (EC 3.2.1.62) bzw. durch cytosolische β -Glukosidasen im Darmepithel (DAY et al. 2000, IOKU et al. 1998) gespalten wird. Um zu klären, ob die BSMV noch derartige Enzymaktivitäten besitzen, wurde der Inkubationsansatz nach 5 s Inkubationszeit extrahiert, um zu überprüfen, ob Quercetinaglykon während der Inkubationszeit freigesetzt wurde. Die Inkubationszeit von 5 s wurde gewählt, da der Versuch zur Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Q-3-Glc auf die Glukoseaufnahme unter initialen Bedingungen bzw. zur Transportkinetik ebenfalls bei einer Inkubationszeit von 5 s durchgeführt wurde (s. Kapitel 4.3.5 bzw. 4.3.7).

3.2.8.2 Probenaufarbeitung, Analyse und Auswertung

Wie unter 3.2.6 beschrieben, wurden 20 μ l Versuchslösung mit 0,6 mmol/l Q-3-Glc und 10 μ l BSMV-Suspension 5 s inkubiert. Anschließend wurden dem Gemisch 5,5 ml Aceton zugesetzt und der Ansatz 20 min zur Extraktion auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Vor Beginn der Extraktion wurde der Probe 20 μ l methanolische Rhamnetinlösung (50 μ g/ml Methanol) als interner Standard zugesetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Aufarbeitung der Plasmaproben aus den *In vivo*-Versuchen (s. 3.1.4.2). Die Probe wurde vor der HPLC-Analyse jedoch nicht mit Salzsäure angesäuert, um eine saure Hydrolyse von Q-3-Glc zu vermeiden. Die Probe wurde mit Hilfe der in Unterkapitel 3.1.4.3. beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Die Konzentration an Quercetin wurde mit Hilfe der Kalibriergerade aus den vorausgegangenen *In vivo*-Versuchen (s. 3.1.4.4) ermittelt.

3.3 Statistik

3.3.1 In-vivo-Versuche zur Bioverfügbarkeit am Schwein

Die Ergebnisse sind im Allgemeinen als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Im statistischen Vergleich wurde der Effekt der Behandlung mittels einer einfachen Varianzanalyse mit anschließendem multiplen paarweisen Vergleich der Gruppenmittelwerte nach Bonferroni untersucht. Dabei wurden die pharmakokinetischen Parameter c_{\max} , t_{\max} und AUC verglichen, wobei eine Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ gewählt wurde. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad InStat (GraphPad Software, 1997, V 3.00, San Diego, CA) durchgeführt.

Im zweiten *In vivo*-Versuch wurden die jeweiligen Mittelwerte der Doppelbestimmungen pro Tier für die pharmakokinetischen Parameter c_{\max} , t_{\max} und AUC gebildet. Anschließend erfolgte der Vergleich der Gruppenmittelwerte ($n = 3$) auf statistisch signifikante Unterschiede mittels einer einfachen Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und anschließendem multiplen paarweisen Vergleich nach Bonferroni. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad InStat (GraphPad Software, 1997, V 3.00, San Diego, CA) durchgeführt.

An dieser Stelle sei als Hilfe für den Leser erwähnt, dass sich im Ergebnisteil die Werte für c_{\max} und t_{\max} in den graphischen Darstellungen der Konzentrations-Zeit-Verläufe z. T. deutlich von den Werten in den Tabellen unterscheiden können. Grund dafür ist, dass bei den Konzentrations-Zeit-Verläufen die Mittelwertskurven, in den Tabellen dagegen die Mittelwerte der individuellen, maximalen Plasmakonzentrationen (c_{\max}) dargestellt sind. Dies gilt sinngemäß auch für die Darstellung der t_{\max} -Werte.

3.3.2 In vitro-Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln vom Schwein

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Die statistische Prüfung von Unterschieden zwischen Mittelwerten der einzelnen Gruppen erfolgte mit den im Folgenden aufgeführten Testverfahren, wobei eine Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ gewählt wurde. Der Vergleich von zwei Mittelwerten erfolgte mit dem Students t-Test. Zusätzlich wurden die Werte nach der Methode von Kolmogorov und Smirnov auf Normalverteilung überprüft. Beim Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten wurde die Homogenität der Varianzen mit Hilfe des Barlett-Tests (Prüfung der Gleichheit mehrerer Varianzen gleicher oder unterschiedlich großer Stichprobengrößen) überprüft. Da die Homogenität der Varianzen nicht gegeben war, erfolgte der Vergleich der Mittelwerte mit dem Kruskal-Wallis-Test (Sachs, L., 1999). Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computer Programms GraphPad Instat (GraphPad Software, 1997, V 3.00, San Diego, CA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Erster In vivo-Versuch zur Bioverfügbarkeit

4.1.1 Applikation von 165,4 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon, Quercetin-3-glukosid oder Quercetin-3-glukorhamnosid

4.1.1.1 Jugularvene

Da die Durchgängigkeit der Katheter trotz häufigen Spülens nicht bei allen sechs Tieren über den gesamten Versuchszeitraum aufrecht erhalten werden konnte, konnten am Ende für die Quercetin- und Quercetin-3-glukosid-Behandlung insgesamt vier, für die Quercetin-3-glukorhamnosid-Behandlung allerdings nur zwei Beobachtungen in der Auswertung berücksichtigt werden.

Freies Quercetin oder freie Quercetinmetabolite konnte ohne vorausgegangene enzymatische Hydrolyse nach keiner der drei diätetischen Behandlungen im Jugularvenenblut nachgewiesen werden. Alle im Folgenden dargestellten Konzentrationszeitverläufe wurden somit nach enzymatischer Behandlung der Plasmaproben mit β -Glucuronidase/Sulfatase erhalten.

Nach allen drei Behandlungen wurde konjugiertes Quercetin als Hauptmetabolit gefunden. Abbildung 7 zeigt die Quercetinplasmakonzentrationen nach oraler Applikation der drei verschiedenen Quercetinquellen – Quercetin, Quercetin-3-glukosid (Q-3-Glc) und Quercetin-3-glukorhamnosid (Q-3-Glc-Rha) – über den gesamten Zeitverlauf.

Nach Gabe des Q-3-Glc wurden die höchsten Quercetinplasmakonzentrationen erreicht. Besonders zu Beginn lagen die Quercetinkonzentrationen nach Q-3-Glc deutlich höher als nach Q oder Q-3-Glc-Rha. Das Glukorhamnosid ergab zu diesen Zeitpunkten nur Quercetinplasmakonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze. Nach Q-3-Glc-Behandlung war die Quercetinkonzentration schon nach 60 min doppelt so hoch wie nach Applikation des Quercetinaglykons. Der Plasmaspiegelverlauf nach Gabe des

Monoglucosids wies zwei Maxima nach 90 bzw. 210 min auf (Abbildung 7). Das sekundäre Maximum war auch bei Betrachtung der Einzeltierdaten bei drei von vier Tieren deutlich zu erkennen. Allerdings war nur bei einem Tier die Quercetinkonzentration am zweiten Maximum höher als am ersten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen lag der Mittelwert des zweiten Maximums mit 601 ± 129 ng/ml höher als der des ersten Maximums mit 577 ± 105 ng/ml. Auffallend ist, dass dieses sekundäre Maximum zeitlich mit der maximalen Quercetinplasmakonzentration nach Gabe des Q-3-Glc-Rha zusammenfällt.

Die maximale Quercetinplasmakonzentration nach Applikation von Q war nicht nur niedriger als nach Q-3-Glc, sondern wurde auch etwas später erreicht (Tabelle 6).

Nach Gabe des Q-3-Glc-Rha wurde nach einem langsamen Anstieg, der erst nach 150 min begann, eine wesentliche niedrigere maximale Quercetinkonzentration als nach den beiden anderen Behandlungen gemessen, d.h. die Absorption scheint hier erst später und in deutlich geringerem Umfang zu erfolgen.

Die einzelnen Werte der pharmakokinetischen Parameter sind Tabelle 6 am Ende dieses Unterkapitels zu entnehmen (s. S. 65).

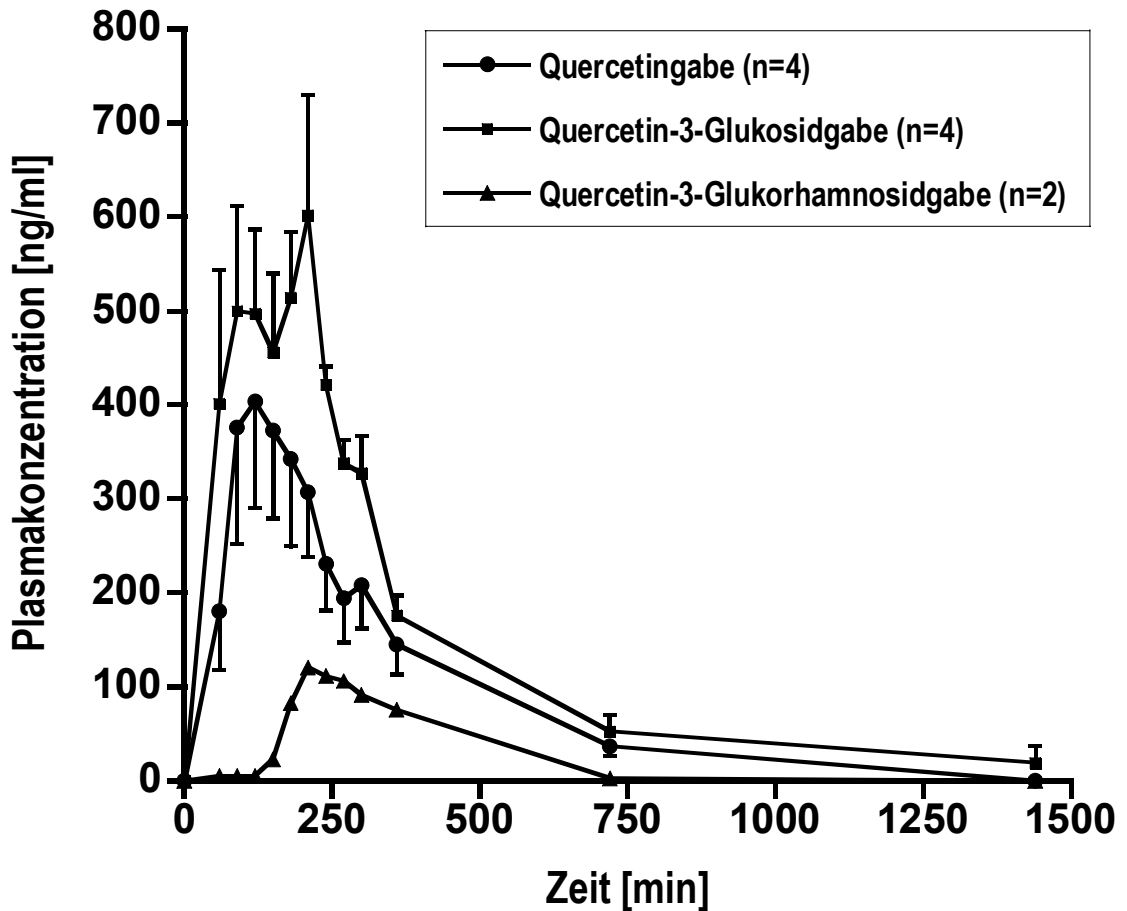


Abbildung 7: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin, Quercetin-3-glukosid bzw. Quercetin-3-glukorhamnosid/kg KGW im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler.

Nach allen drei Behandlungen wurden im Jugularvenenblut neben Quercetin Isorhamnetin und Tamarixetin, der 3'- bzw. 4'-Methylether des Quercetins, als Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur identifiziert (Abbildung 8). Da die behandlungsbedingten Unterschiede zwischen den Konzentrationszeitverläufen der methylierten Metaboliten den für die Quercetinplasmakonzentration beschriebenen behandlungsbedingten Unterschieden weitgehend entsprachen, bildeten sich diese Behandlungsunterschiede auch bei der Darstellung des Gesamtflavonolkonzentrations-Zeit-Verlaufs (= Summe der Plasmakonzentrationen von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin) wieder ab (Abbildung 9).

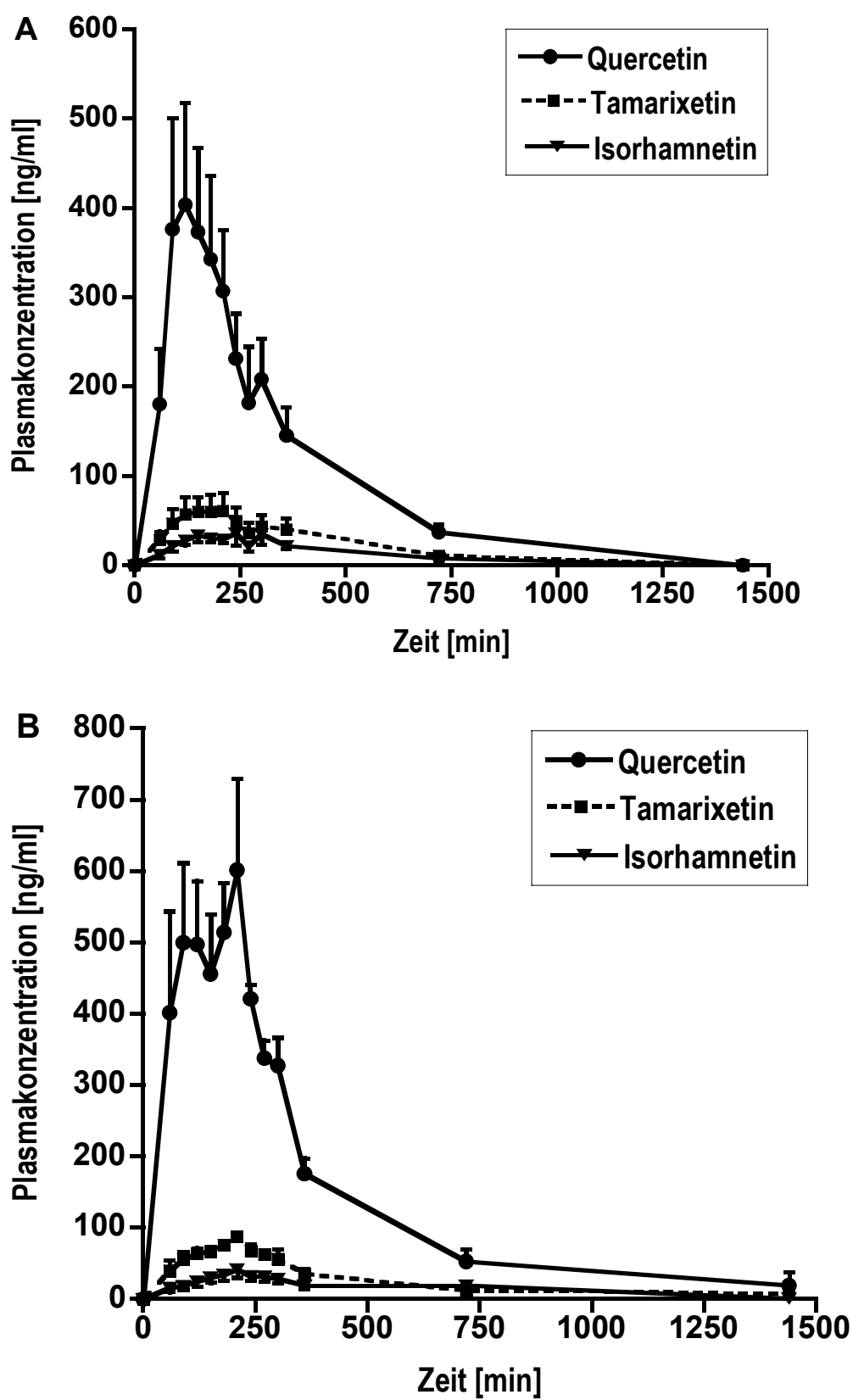


Abbildung 8: Legende s. nächste Seite

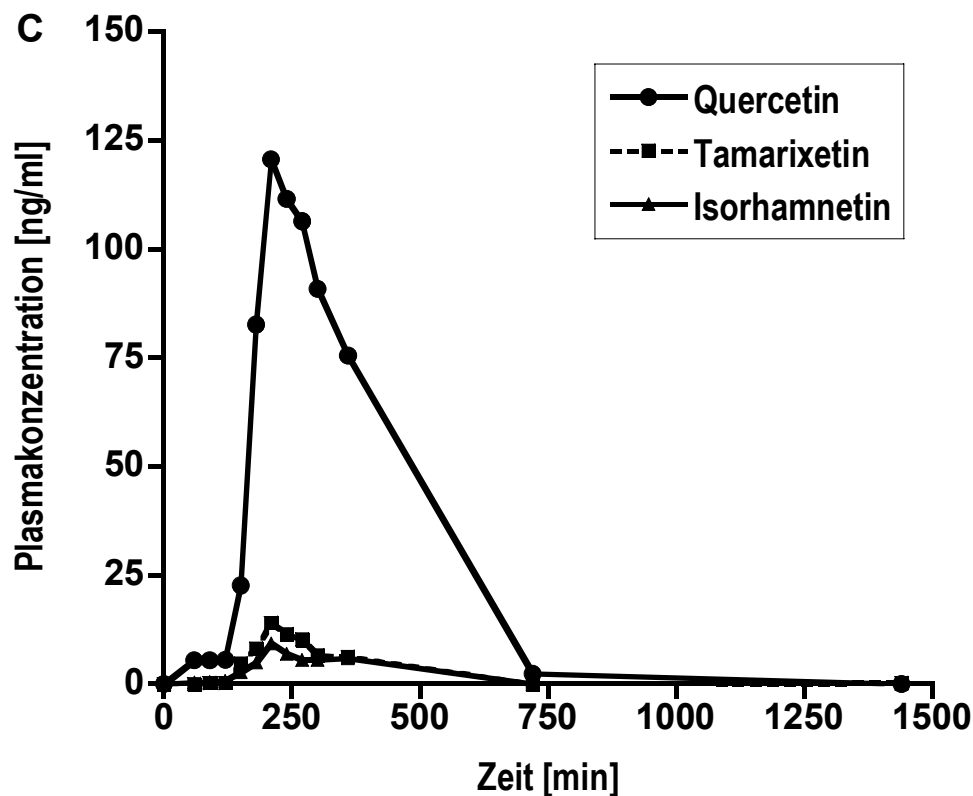


Abbildung 8: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetinmetaboliten nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin/kg KGW (A), Quercetin-3-Glukosid/kg KGW (B) bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid (C) im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler (n=4 bzw. 2).

Sowohl nach Applikation von Quercetin als auch nach Q-3-Glc waren die maximalen Plasmakonzentrationen von Tamarixetin deutlich höher als die von Isorhamnetin (Tabelle 6). Schon zum Zeitpunkt der maximalen Quercetinplasmakonzentrationen traten Konzentrationen der methylierten Formen auf, die annähernd so hoch waren wie ihre maximalen Plasmakonzentrationen (Abbildung 8, Tabelle 6). Diese Verhältnisse spiegeln sich auch bei der Betrachtung der Flächen unter den Kurven (AUC) wieder: Relativ gesehen zur Gesamtfläche unter den Kurven (= Summe der AUC von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin) war der Anteil von Tamarixetin fast doppelt so groß wie der Anteil von Isorhamnetin (16 % bzw. 8 %). Bezogen auf die Gesamt-AUC entfiel auf die methylierten Formen ein Anteil von 24 % (Tabelle 6).

Da Quercetin aus Q-3-Glc-Rha in viel geringerem Umfang absorbiert wurde, lagen auch die maximalen Plasmakonzentrationen der methylierten Quercetinmetaboliten,

Isorhamnetin und Tamarixetin, deutlich niedriger als nach Gabe des Aglykons oder Glukosids. Zeitlich fielen die maximalen Plasmakonzentrationen der genannten Metabolite mit der maximalen Quercetinplasmakonzentration zusammen (Tabelle 6). Bezogen auf die Gesamtfläche beliefen sich die Flächen des Isorhamnetins und Tamarixetins nach Applikation des Glukorhamnosids zusammen nur auf 13,3 % (Tabelle 6).

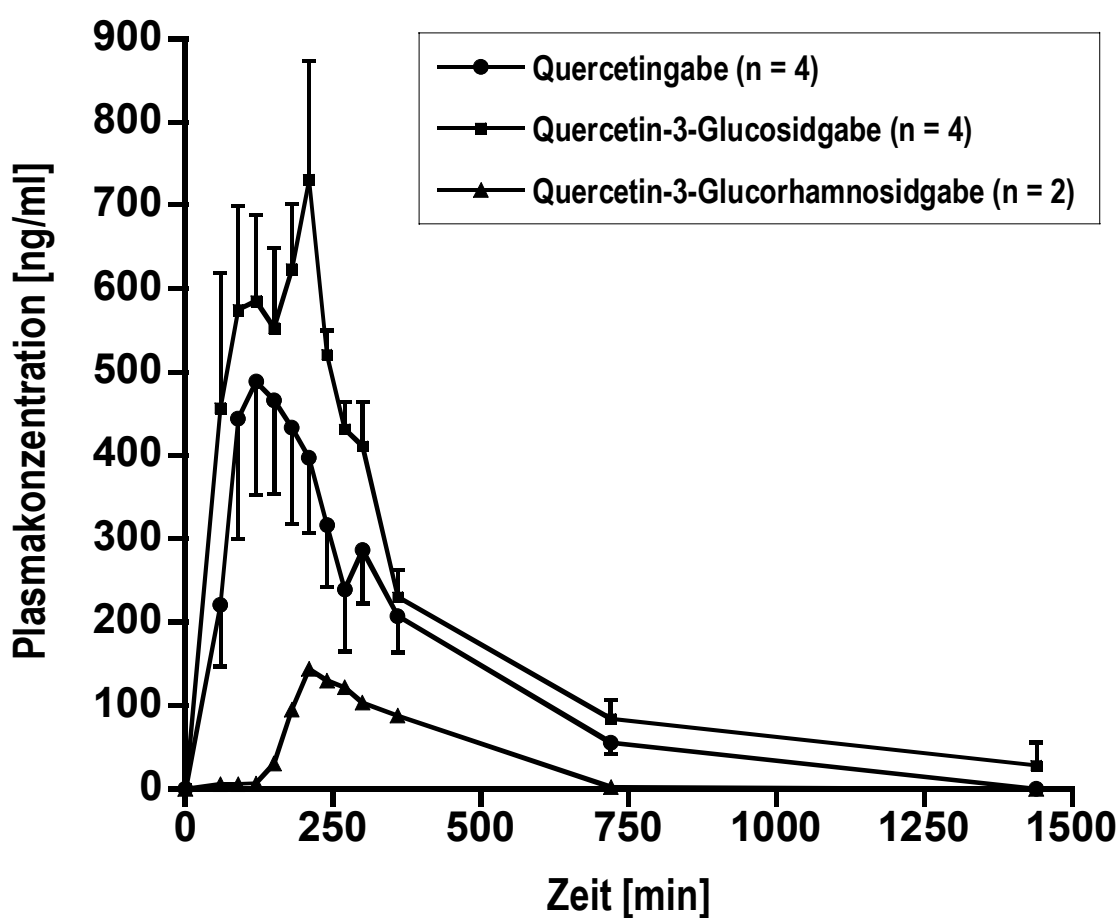


Abbildung 9: Vergleich der Gesamtflavonolkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin, Quercetin-3-glucosid bzw. Quercetin-3-glucorhamnosid/kg KGW im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler.

Als Maß für die Bioverfügbarkeit dient die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC, s. 3.1.5.1). Beim Vergleich der relativen Bioverfügbarkeit des Quercetins aus den drei verschiedenen Quercetinquellen wurde die nach Applikation des Quercetinaglykons ermittelte Gesamt-AUC (= Summe der AUC von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin) als 100 % gesetzt. Nach Gabe von Q-3-Glc bzw. Q-3-Glc-Rha wurde so eine relative systemische Verfügbarkeit von Quercetin von 147 % bzw. 23 % ermittelt (Tabelle 6). Obwohl die Gesamt-AUC deutlich verschieden waren, ergab sich für den Unterschied zwischen Quercetin- und Quercetin-3-Glukosidbehandlung aufgrund der geringen Anzahl von Beobachtungen nur eine Tendenz ($p = 0,0658$). Die Gesamt-AUC nach Gabe von Q-3-Glc-Rha unterschied sich hingegen signifikant von den anderen Behandlungen ($p < 0,05$).

Die Eliminationshalbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Quercetin nach Applikation von Q und Q-3-Glc waren annähernd gleich (Tabelle 6). Da nach Gabe von Q-3-Glc-Rha aufgrund der spät einsetzenden Absorption des Quercetins zu wenige Zeitpunkte der Eliminationsphase erfasst wurden, konnte die Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ nicht zuverlässig anhand des verwendeten Kinetikmodells berechnet werden, so dass hier kein Wert angegeben werden konnte.

Tabelle 6: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin und Quercetin-metaboliten¹⁾ nach Gabe von 165,4 μmol Quercetin, Quercetin-3-Glukosid bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid/kg KGW (Plasmaproben aus der Jugularvene). Mittelwerte mit Standardfehler.

Parameter	Behandlung								
	Quercetin (n=4)			Quercetin-3-Glukosid (n=4)			Quercetin-3-Glukorhamnosid (n=2)		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
C_{max} ²⁾	438 \pm 103	43 \pm 12	66 \pm 18	577 \pm 105 601 \pm 129 ^A	43 \pm 11	88 \pm 5	135 \pm 3	9 \pm 2	14 \pm 0
t_{max} ³⁾	120 \pm 21	203 \pm 19	173 \pm 14	98 \pm 14 210 \pm 0 ^A	218 \pm 19	203 \pm 8	255 \pm 45	210 \pm 0	210 \pm 0
$t_{1/2}$ ⁴⁾	2,8 \pm 0,1	n.b.	n.b.	2,5 \pm 0,3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AUC ⁵⁾	132,9 \pm 28,8	16,0 \pm 2,6	27,2 \pm 7,1	204,9 \pm 10,6	22,1 \pm 8,5	34,0 \pm 4,4	35,1 \pm 8,8	2,3 \pm 0,7	3,1 \pm 0,1
Gesamt-AUC ⁶⁾	176,1 \pm 36,4			261,0 \pm 102,7			40,5 \pm 9,4 *		
Relative AUC ⁷⁾	75,5	9	15,5	78,5	8,5	13	86,7	5,7	7,6
Relative Bioverfügbarkeit ⁸⁾	100			147			23		

¹⁾ nach Behandlung der Plasmaproben mit β -Glucuronidase/Sulfatase

²⁾ C_{max} [ng/ml]=maximale Plasmakonzentration (^A sekundäres Maximum)

³⁾ t_{max} [min] = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der C_{max}

⁴⁾ $t_{1/2}$ [h]=Eliminationshalbwertszeit

⁵⁾ AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]=Fläche unter der Plasmaspiegelkurve von 0-24 Stunden

⁶⁾ Gesamt-AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]=Summe der AUCs (Quercetin+Tamarixetin+Isorhamnetin)

⁷⁾ Relative AUC [%] = Prozent der Gesamt-AUC

⁸⁾ Relative Bioverfügbarkeit [%]: Quercetin = 100 %

* signifikanter Unterschied zwischen Behandlungen für jeweiligen Parameter (* $p < 0,05$), n.b. = nicht bestimmt

4.1.1.2 Pfortader

Da sowohl nach Gabe von Quercetin als auch nach Q-3-Glc nur bei jeweils zwei Schweinen Proben aus Portal- und Jugularvene vom selben Tier vorlagen, war ein Vergleich der Plasmakonzentrationen von Quercetinmetaboliten vor und nach der Leberpassage nur bedingt möglich. Ein Vergleich zwischen den beiden Behandlungen konnte leider nicht erfolgen, da die Daten für Quercetin bzw. Q-3-Glc von unterschiedlichen Tieren stammten. Nach Applikation von Q-3-Glc-Rha standen nur die Werte eines Tieres zur Verfügung, so dass auf eine genaue Darstellung dieser Ergebnisse im Folgenden verzichtet wird.

Zu betonen ist, dass auch im Pfortaderblut ohne vorausgegangene enzymatische Hydrolyse nach keiner der drei Behandlungen freies Quercetin oder freie Quercetinmetaboliten nachgewiesen werden konnten. Wie im Jugularvenenblut wurde auch im Pfortaderblut nach allen drei Behandlungen konjugiertes Quercetin als Hauptmetabolit gefunden. Die Plasmakonzentrationen in Jugularvene und Pfortader zeigten einen ähnlichen Zeitverlauf. Im Vergleich zur Plasmakonzentration im Jugularvenenblut lagen die maximalen Quercetinkonzentrationen sowohl nach Quercetin als auch nach Q-3-Glc in der Pfortader etwas höher als in der Jugularvene (Abbildung 10 A, B). Der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration wurde in der Pfortader bei beiden Behandlungen früher als in der Jugularvene erreicht (Tabelle 7A, B).

Die anfallenden Metaboliten im Pfortaderblut unterschieden sich nicht von denen im Jugularvenenblut, d. h., ein qualitativer Unterschied im Metabolitenmuster vor und nach der Leberpassage wurde nicht beobachtet. Zu bedenken ist hierbei allerdings, dass bei niedrigen Absorptionsraten und den gewählten Zeitabständen Unterschiede zwischen Plasmaproben aus der Pfortader und Plasmaproben aus der Jugularvene sich kaum manifestieren dürften.

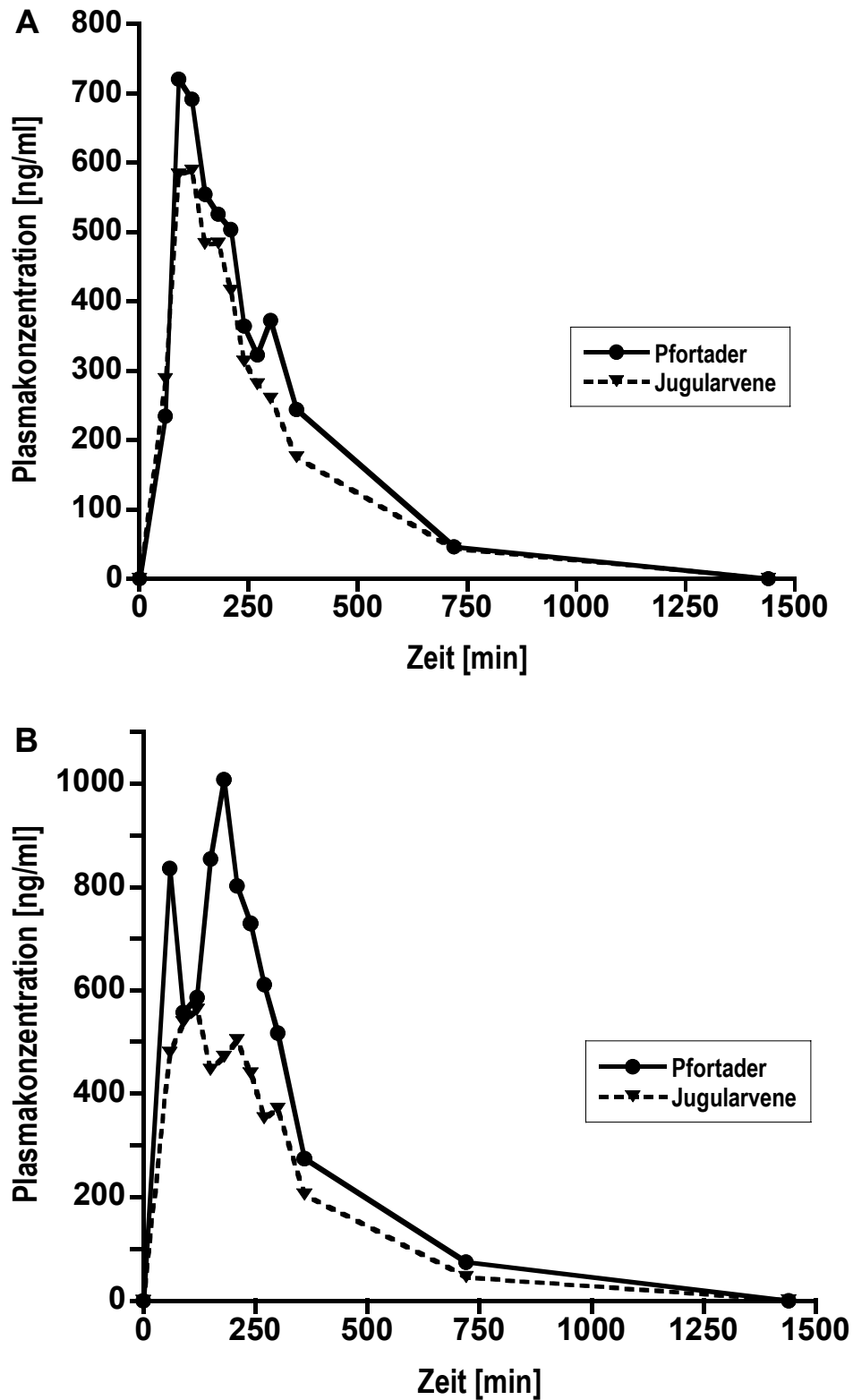


Abbildung 10: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe in Pfortader- und Jugularvenenblut nach oraler Gabe von 165,4 μmol Quercetin (A) bzw. Quercetin-3-Glucosid (B)/kg Körpergewicht. Die Daten in Abbildung 10A und 10B stammen von verschiedenen Tieren. Mittelwerte ($n=2$).

Nach Applikation von Quercetin waren die maximalen Plasmakonzentrationen des Isorhamnetins im Pfortaderblut höher als im Jugularvenenblut, während für Tamarixetin umgekehrte Verhältnisse vorlagen. Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung der relativen Flächen: Die Fläche unter der Isorhamnetinplasmaspiegelkurve nahm im Pfortaderblut 12,8 % der Gesamtfläche, im Jugularvenenblut aber nur 6,9 % ein. Für Tamarixetin ergab sich dagegen in der Jugularvene eine relative Fläche von 16,7 %, in der Pfortader nur eine relative Fläche von 9,9 % (Tabelle 7A).

Nach Gabe von Q-3-Glc waren sowohl die maximalen Isorhamnetin- als auch Tamarixetinkonzentrationen im Pfortaderblut höher als im Jugularvenenblut (Tabelle 7B). Bei Betrachtung der relativen Flächen ergaben sich aber keine deutlichen Unterschiede zwischen Pfortader und Jugularvene (Tabelle 7B). Der Anteil des gebildeten Tamarixetins ist sowohl in der Pfortader als auch in der Jugularvene etwas höher (Tabelle 7B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch im Pfortaderblut außer konjugiertem Isorhamnetin und Tamarixetin keine weiteren Metabolite mit intakter Flavonolstruktur identifiziert werden konnten. Bezogen auf die Gesamtfläche aller detektierten Metaboliten entfielen unabhängig von der Behandlung 23 % der Flavonole auf methylierte Metabolite (Isorhamnetin + Tamarixetin) und 77 % auf intaktes Quercetin.

Tabelle 7 A, B: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter¹⁾ von Quercetin und Quercetinmetaboliten nach Applikation von 165,4 μmol Quercetin/KGW als Quercetinaglykon (A) bzw. Quercetin-3-Glucosid (B) in Pfortader- und Jugularvenenblut. Die Werte in Tabelle 7 stammen jeweils von zwei verschiedenen Tieren.

A

Parameter	Quercetin (n=2)					
	Pfortader ²⁾			Jugularvene ²⁾		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
c_{max} ³⁾ [ng/ml]	731	80	64	591	50	97
t_{max} ⁴⁾ [min]	105	210	165	105	225	165
AUC ⁵⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	213,8	35,3	27,4	179,2	16,3	39,3
Gesamt-AUC ⁶⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	276,6			234,9		
Relative AUC ⁷⁾ [%]	77,3	12,8	9,9	76,4	6,9	16,7

B

Parameter	Quercetin-3-Glucosid (n=2)					
	Pfortader ²⁾			Jugularvene ²⁾		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
c_{max} ³⁾ [ng/ml]	851 1007 ^A	84	124	655 504 ^A	42	89
t_{max} ⁴⁾ [min]	75 180 ^A	180	180	90 210 ^A	225	195
AUC ⁵⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	313,5	32,9	56,6	206,2	30,5	36,6
Gesamt-AUC ⁶⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	403,1			273,3		
Relative AUC ⁷⁾ [%]	77,8	8,2	14	75,4	11,2	13,4

¹⁾ Werte wurden sowohl anhand von Proben aus der Pfortader als auch aus der Jugularvene berechnet, ²⁾ nach Behandlung der Plasmaproben mit β -Glucuronidase/Sulfatase, ³⁾ c_{max} = maximale Plasmakonzentration (^Asekundäres Maximum), ⁴⁾ t_{max} = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der c_{max} , ⁵⁾ AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, ⁶⁾ Gesamt-AUC = Summe der AUCs (Quercetin +Tamarixetin +Isorhamnetin), ⁷⁾ Relative AUC in Prozent der Gesamt-AUC

4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der hohen Dosierung

Nach Applikation von 165,4 μmol Quercetin/kg KGW in Form von Quercetin, Q-3-Glc bzw. Q-3-Glc-Rha wurden die höchsten Quercetinplasmakonzentrationen nach Gabe des Quercetinmonoglukosids, die niedrigsten Quercetinkonzentrationen nach Applikation des Quercetinglukorhamnosids erhalten. Somit war die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Q-3-Glc am größten. Dabei galt unabhängig von der Quercetinquelle, dass weder freies Quercetin noch freie methylierte Quercetinmetaboliten in Pfortader- und Jugularvenenblut nachgewiesen werden konnten. Der Hauptmetabolit war nach allen drei Behandlungen konjugiertes Quercetin. Als weitere Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur wurden konjugiertes Isorhamnetin und Tamarixetin, der 3'-bzw. 4'-Methylether des Quercetins, sowohl im Pfortader- als auch im Jugularvenenblut identifiziert.

4.1.3 Applikation von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon, Quercetin-3-Glukosid und Quercetin-3-Glukorhamnosid

4.1.3.1 Jugularvene

Für den Vergleich von hoher und niedriger Dosierung standen ebenfalls nur die Werte von zwei Tieren zur Verfügung. Ein Vergleich zwischen den beiden Behandlungen war jedoch möglich, da es sich jeweils um dieselben Individuen handelte.

Auch nach Applikation einer Dosis von 33,1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ KGW Quercetin in Form der drei verschiedenen Glykoside konnten nach keiner der drei Behandlungen freies Quercetin oder freie Quercetinmetabolite ohne vorausgegangene enzymatische Hydrolyse nachgewiesen werden.

Da nach Applikation von Q-3-Glc-Rha nur Quercetinplasmakonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze (2 ng/ml) auftraten, wird auf diese Daten im Folgenden nicht näher eingegangen.

Abbildung 11 A zeigt die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Gabe von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW in Form von Quercetinaglykon bzw. Q-3-Glc. Nach beiden Behandlungen lagen die Quercetinplasmakonzentrationen deutlich niedriger als nach der hohen Dosierung (Abbildung 11 B, Tabelle 8). Der c_{max} -Wert nach Quercetinapplikation in der niedrigeren Dosierung betrug 111 ng/ml, nach Applikation des Monoglukosids 82 ng/ml. Im Vergleich dazu wurde bei den selben Tieren nach der hohen Dosis eine maximale Quercetinkonzentration von 423 ng/ml nach Quercetin bzw. eine deutlich höhere maximale Plasmakonzentration von 655 ng/ml nach Q-3-Glc erreicht. Somit trat im Unterschied zur höheren Dosierung bei der niedrigeren Dosierung von Quercetin bzw. Q-3-Glc keine deutlichen Unterschiede zwischen den Quercetinquellen bezüglich der maximalen Quercetinkonzentrationen im Plasma auf.

Auch nach Quercetin- und Q-3-Glc-Behandlung in der niedrigen Dosierung wurden neben Quercetin Isorhamnetin und Tamarixetin als weitere Metaboliten im Jugularvenenblut identifiziert. Der Vergleich zwischen hoher und niedriger Dosierung zeigt, dass erwartungsgemäß nach beiden Behandlungen die Plasmakonzentrationen des jeweiligen Metaboliten nach der niedrigen Dosis geringer waren als nach der hohen Dosis (Tabelle 8).

Isorhamnetin und Tamarixetin erreichten nach beiden Behandlungen in der niedrigen Dosierung annähernd gleich hohe maximale Plasmakonzentrationen, wobei die Konzentration des jeweiligen Metaboliten nach Gabe von Quercetinaglykon höher lag als nach Quercetin-3-Glukosid (Tabelle 8). Bei der niedrigeren Dosierung trat im Vergleich zur höheren Dosis keine höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Quercetin-3-Glukosid im Vergleich zur Bioverfügbarkeit aus dem Aglykon auf (s. 4.1.1.1). Setzt man die Gesamt-AUC nach Gabe des Quercetinaglykons als 100 %, ergab sich bei der niedrigen Dosierung eine relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Q-3-Glc von nur 63 % (Werte von zwei Tieren) im Gegensatz zu einer Verfügbarkeit von 161 % nach Applikation der fünffach höheren Dosierung (Werte von zwei Tieren, Tabelle 8).

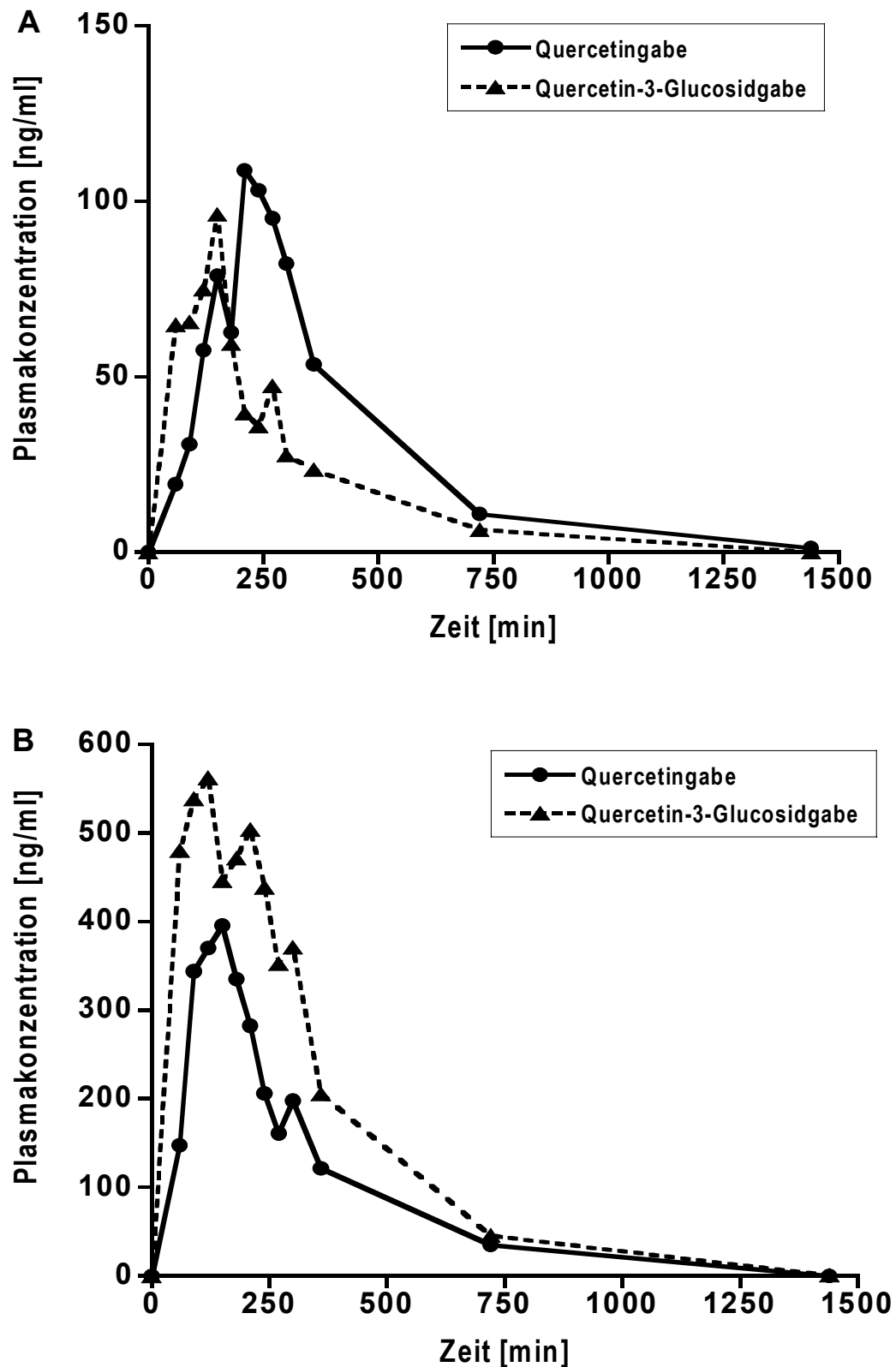


Abbildung 11: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Kurven nach Applikation von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW (A) bzw. nach 165,4 μmol Quercetin/kg KGW (B) als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-Glucosid im Jugularvenenblut. Mittelwerte von 2 Tieren.

Tabelle 8: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin und Quercetinmetaboliten ¹⁾ nach hoher (165,4 µmol Quercetin/kg KGW) und niedrigerer (33,1 µmol Quercetin/kg KGW) Dosierung im Jugularvenenblut. Mittelwerte von 2 Tieren.

Parameter	Quercetin (n=2)					
	Hohe Dosierung			Niedrige Dosierung		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
c _{max} ²⁾ [ng/ml]	423	57	71	111	24	21
t _{max} ³⁾ [min]	135	270	165	225	225	210
AUC ⁴⁾ [µg*min/ml]	122,9	20,7	26,4	38,2	7,8	5,9
Gesamt-AUC ⁵⁾ [µg*min/ml]	170,0			51,9		
Relative AUC ⁶⁾ [%]	72,3	12,2	15,5	73,6	15,0	11,4

Parameter	Quercetin-3-Glukosid (n=2)					
	Hohe Dosierung			Niedrige Dosierung		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
c _{max} ²⁾ [ng/ml]	655	42	89	82	8	11
t _{max} ³⁾ [min]	90	225	195	120	165	165
AUC ⁴⁾ [µg*min/ml]	206,2	30,5	36,6	24,8	2,9	4,8
Gesamt-AUC ⁵⁾ [µg*min/ml]	273,3			32,5		
Relative AUC ⁶⁾ [%]	75,4	11,2	13,4	76,3	8,9	14,8

¹⁾ nach Behandlung der Plasmaproben mit β-Glucuronidase/Sulfatase

²⁾ c_{max} = maximale Plasmakonzentration

³⁾ t_{max} = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der c_{max}

⁴⁾ AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

⁵⁾ Gesamt-AUC = Summe der AUCs (Quercetin+Tamarixetin+Isorhamnetin)

⁶⁾ Relative AUC in Prozent der Gesamt-AUC

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Applikation der niedrigen Dosierung

Die Ergebnisse, die nach Gabe der niedrigeren Dosierung erhalten wurden, lassen sich aufgrund der geringen Anzahl an Beobachtungen nur mit Vorsicht interpretieren. Zusammenfassend lässt sich dennoch sagen, dass sich nach Applikation von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW in Form von Quercetin bzw. Q-3-Glc ein deutlicher Unterschied in der relativen Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation des Agklykons bzw. Glucosids nicht manifestierte. Auch das sekundäre Maximum innerhalb des Quercetinplasmaspiegelverlaufes konnte im Vergleich zur hohen Dosierung nicht mehr beobachtet werden. Das Metabolitenmuster war annähernd gleich. Aufgrund der geringen Anzahl von Beobachtungen wurden die Ergebnisse in einem zweiten Versuch an einer größeren Anzahl von Beobachtungen überprüft.

4.2 Zweiter In vivo-Versuch zur Bioverfügbarkeit

4.2.1 Applikation von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-glukosid

Bei der Wiederholung des Versuches mit der niedrigeren Dosierung standen sechs Beobachtungen an drei Tieren zur Verfügung, d.h. jedes Individuum erhielt jede Behandlung zweimal. Da nach Applikation des Q-3-Glc-Rha im vorausgegangenen Versuch nur Quercetinplasmakonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze gefunden wurden, wurde in diesem Versuch auf die Behandlung mit Q-3-Glc-Rha verzichtet. Des Weiteren wurde von der Implantierung eines Pfortaderkatheters abgesehen.

Wie in den vorausgegangenen Versuchen konnten auch in diesem Versuch ohne enzymatische Hydrolyse der Plasmaproben weder freies Quercetin noch freie Quercetinmetabolite nachgewiesen werden.

Abbildung 12 stellt die Quercetinplasmaspiegelverläufe nach Applikation von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW in Form von Quercetinaglykon bzw. Q-3-Glc dar. Wie im vorausgegangenen Versuch zeigte sich, dass nach Gabe von Q-3-Glc in der

niedrigeren Dosierung keine höheren Quercetinkonzentrationen als nach Quercetin erreicht wurden.

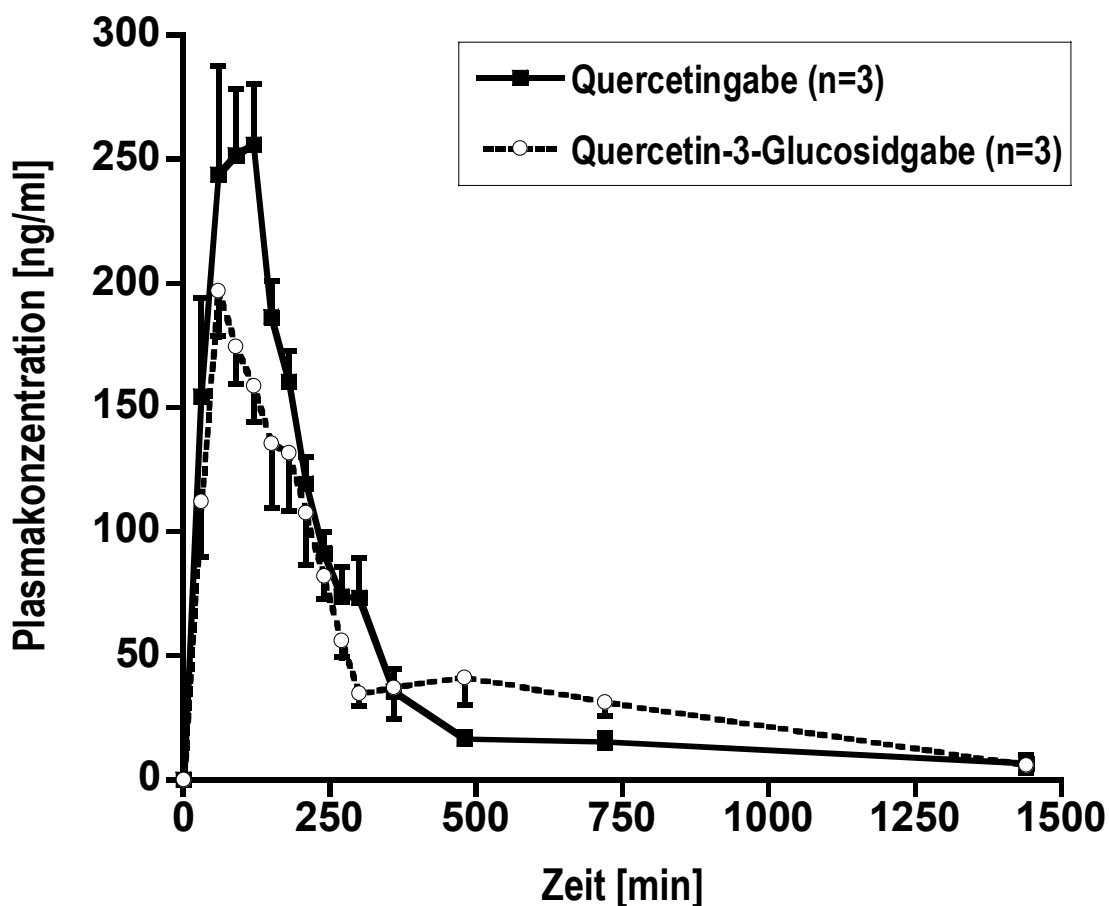


Abbildung 12: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe von $33,1 \mu\text{mol}$ Quercetin/kg KGW in Form von Quercetin-aglykon und Quercetin-3-Glucosid im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler.

Nach Gabe von Quercetin ergab sich ein c_{max} -Wert von $248 \pm 26 \text{ ng/ml}$ zum Zeitpunkt $t_{\text{max}} = 95 \pm 12 \text{ min}$. Nach Applikation von Q-3-Glc betrug die maximale Quercetin-plasmakonzentration $174 \pm 15 \text{ ng/ml}$ zum Zeitpunkt $t_{\text{max}} = 70 \pm 6 \text{ min}$. Weder die c_{max} - noch die t_{max} -Werte waren zwischen den beiden Behandlungen signifikant verschieden (Tabelle 9).

Wie im ersten Versuch wurden nach beiden Behandlungen Isorhamnetin und Tamarixetin als weitere Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur identifiziert (Abbildung 13 A, B). Die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der beiden Metaboliten waren annähernd gleich. Für die c_{\max} - und t_{\max} -Werte von Isorhamnetin bzw. Tamarixetin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungen gefunden. Die maximalen Plasmakonzentrationen von Isorhamnetin und Tamarixetin fielen bei beiden Behandlungen zeitlich mit dem Maximum der Quercetinkonzentration zusammen und nahmen erst nach 210 min wieder deutlich ab (Abbildung 13 A, B).

Die Anteile von Quercetin und Quercetinmetaboliten an der Gesamt-AUC waren ähnlich verteilt wie im ersten Versuch mit der niedrigen Dosierung (Tabelle 8) und betragen nach beiden Behandlungen 8-15 % der Gesamt-AUC.

Auch bei der Wiederholung des Versuches mit der niedrigen Dosierung war eine höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Quercetinmonoglucosid im Vergleich zur Verfügbarkeit aus dem Aglykon nicht gegeben. Setzt man die Gesamt-AUC nach Gabe des Quercetinaglykons als 100 %, ergab sich eine relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Q-3-Glc von 96 %. Die Gesamt-AUCs unterschieden sich nach beiden Behandlungen nicht signifikant voneinander (Tabelle 9).

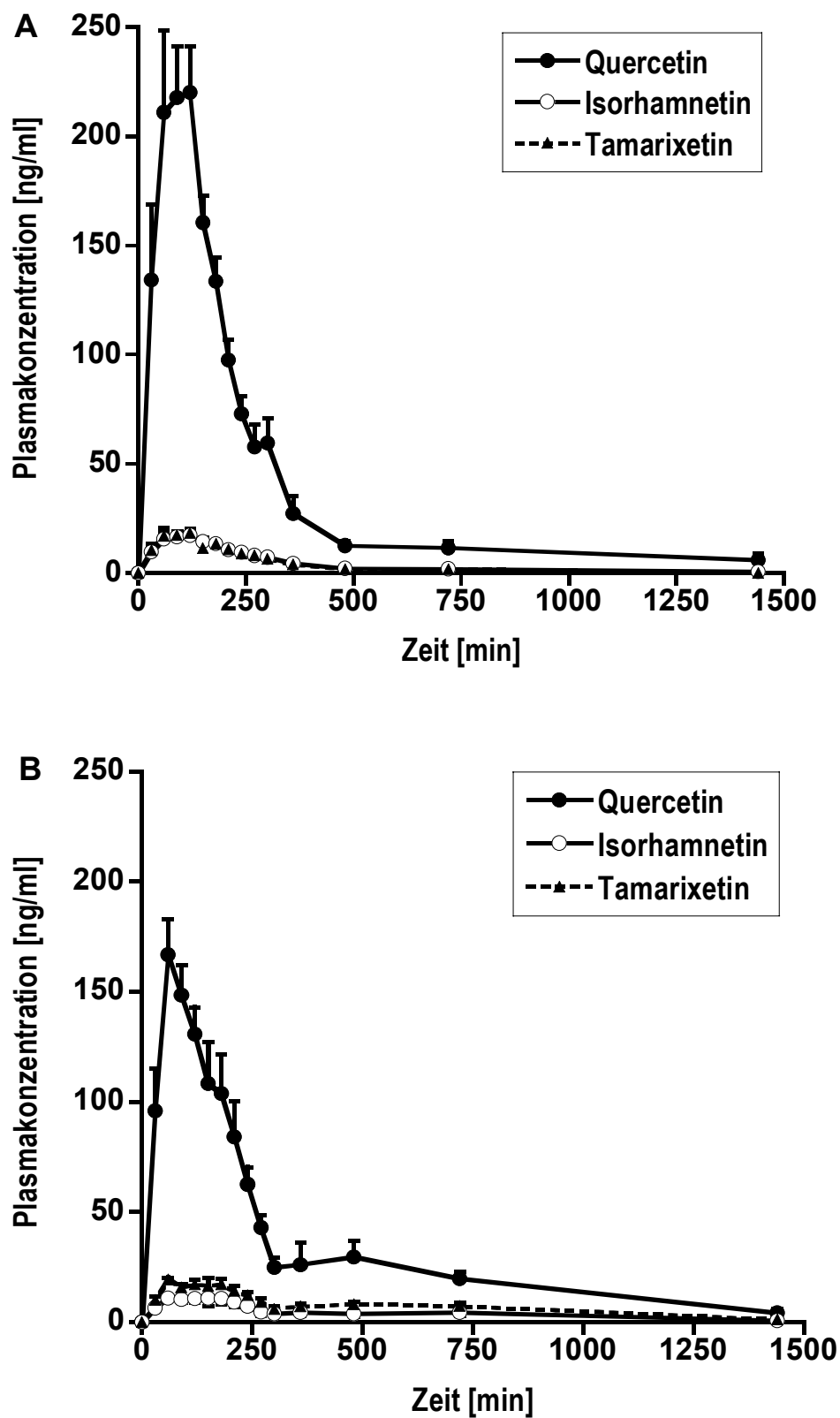


Abbildung 13: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetin-metaboliten nach oraler Gabe von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon (A) und Quercetin-3-Glukosid (B) im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler (n=3).

Tabelle 9: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin und Quercetin-metaboliten ¹⁾ nach Gabe von 33,1 μmol Quercetin/kg KGW als Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-Glukosid (Plasmaproben aus der Jugularvene). Mittelwerte mit Standardfehler.

Parameter	Behandlung					
	Quercetin (n = 3)			Quercetin-3-Glukosid (n = 3)		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
C_{max} ²⁾ [ng/ml]	248 \pm 26	20 \pm 2	21 \pm 3	174 \pm 15	14 \pm 3	24 \pm 3
t_{max} ³⁾ [min]	95 \pm 12	125 \pm 21	105 \pm 15	70 \pm 6	110 \pm 25	110 \pm 25
AUC ⁴⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	58,0 \pm 2,9	6,1 \pm 0,9	5,7 \pm 0,4	50,3 \pm 7,1	6,3 \pm 1,8	10,4 \pm 2,2
Gesamt-AUC ⁵⁾ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$]	69,7 \pm 3,1			67,0 \pm 9,7		
Relative AUC ⁶⁾ [%]	83,2	8,7	8,1	75,1	9,4	15,5
Relative Bioverfugbarkeit [%]	100			96		

¹⁾ nach Behandlung der Plasmaproben mit β -Glucuronidase/Sulfatase

²⁾ C_{max} = maximale Plasmakonzentration

³⁾ t_{max} = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der C_{max}

⁴⁾ AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

⁵⁾ Gesamt-AUC = Summe der AUCs (Quercetin+Isorhamnetin+Tamarixetin)

⁶⁾ Relative AUC in Prozent der Gesamt-AUC

4.2.2 Applikation von 33,1 μmol Quercetin-3-Glukosid/kg KGW mit Standardfutter im Vergleich zur Applikation mit Hackfleisch

Um den Einfluss der Zusammensetzung des Futters auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Q-3-Glc zu untersuchen, wurde den Schweinen im zweiten Teilversuch

das Flavonolglukosid anstelle mit stärkereichem Futter mit 15 g rohem Rinderhackfleisch appliziert.

Abbildung 14 stellt die Quercetinplasmakonzentrationen nach den beiden Behandlungen dar. Über den gesamten Zeitverlauf bis zum Zeitpunkt $t = 480$ min wurden nach Applikation mit Hackfleisch deutlich höhere Quercetinplasmakonzentrationen als nach Gabe mit dem Standardfutter gefunden.

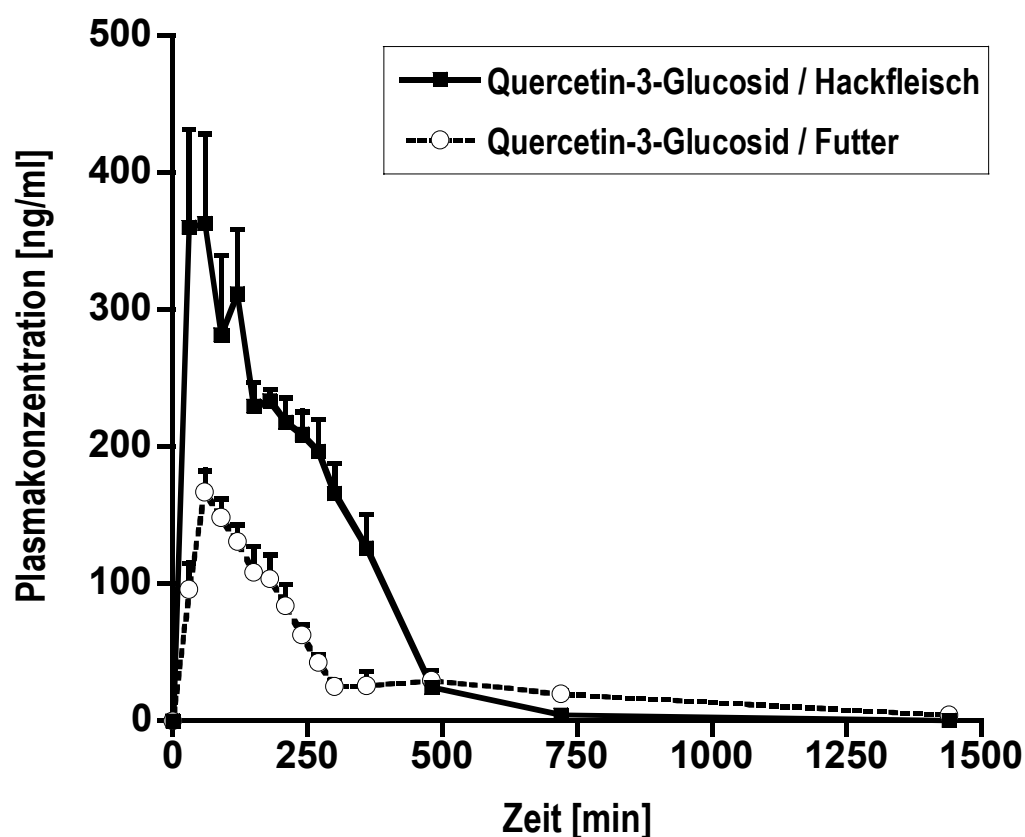


Abbildung 14: Vergleich der Quercetinkonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von $33,1 \mu\text{mol}$ Quercetin-3-glucosid/kg KGW mit stärkereichem Futter bzw. nach Applikation mit 15 g Hackfleisch im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$).

Wie Tabelle 10 zu entnehmen ist, war die maximale Quercetinplasmakonzentration nach Applikation von Q-3-Glc mit Hackfleisch im Vergleich zur Applikation mit Standardfutter ca. dreimal höher. Die c_{\max} -Werte unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$), wohingegen sich der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration nach beiden Behandlungen nicht signifikant unterschied.

Das Metabolitenmuster von Q-3-Glc unterschied sich nicht zwischen den Behandlungen. Ebenso wie bei allen vorausgegangenen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch hier Isorhamnetin und Tamarixetin als weitere Metaboliten identifiziert (Abbildung 15 A, B). Die maximalen Isorhamnetin- und Tamarixetinplasmakonzentrationen lagen dabei – wie die entsprechenden Quercetinplasmakonzentrationen (s. o.) – nach Aufnahme von Q-3-Glc mit Hackfleisch dreifach höher als nach Gabe des Glukosids zusammen mit dem Standardfutter. Somit hatte die Behandlung auf die c_{\max} -Werte einen signifikanten Einfluss ($p < 0,05$, Tabelle 10).

Die Betrachtung der AUC für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin zeigte, dass die im Organismus systemisch verfügbare Menge nach Applikation mit Hackfleisch jeweils deutlich größer war als nach Applikation mit Futter (Tabelle 10). Dementsprechend war auch die Gesamt-AUC nach Gabe des Quercetinglukosids mit Hackfleisch im Vergleich zur Gesamt-AUC nach Gabe mit dem Standardfutter ca. 2,5mal so groß ($p < 0,01$, Tabelle 10).

Bezogen auf die Gesamtfläche unterschieden sich die relativen Verhältnisse von Quercetin zu den Quercetinmetaboliten zwischen den beiden Behandlungen nicht. Unabhängig von der Behandlung entfielen knapp 30 % der Gesamtfläche auf methylierte Metaboliten und ca. 70 % auf intaktes Quercetin (Tabelle 10).

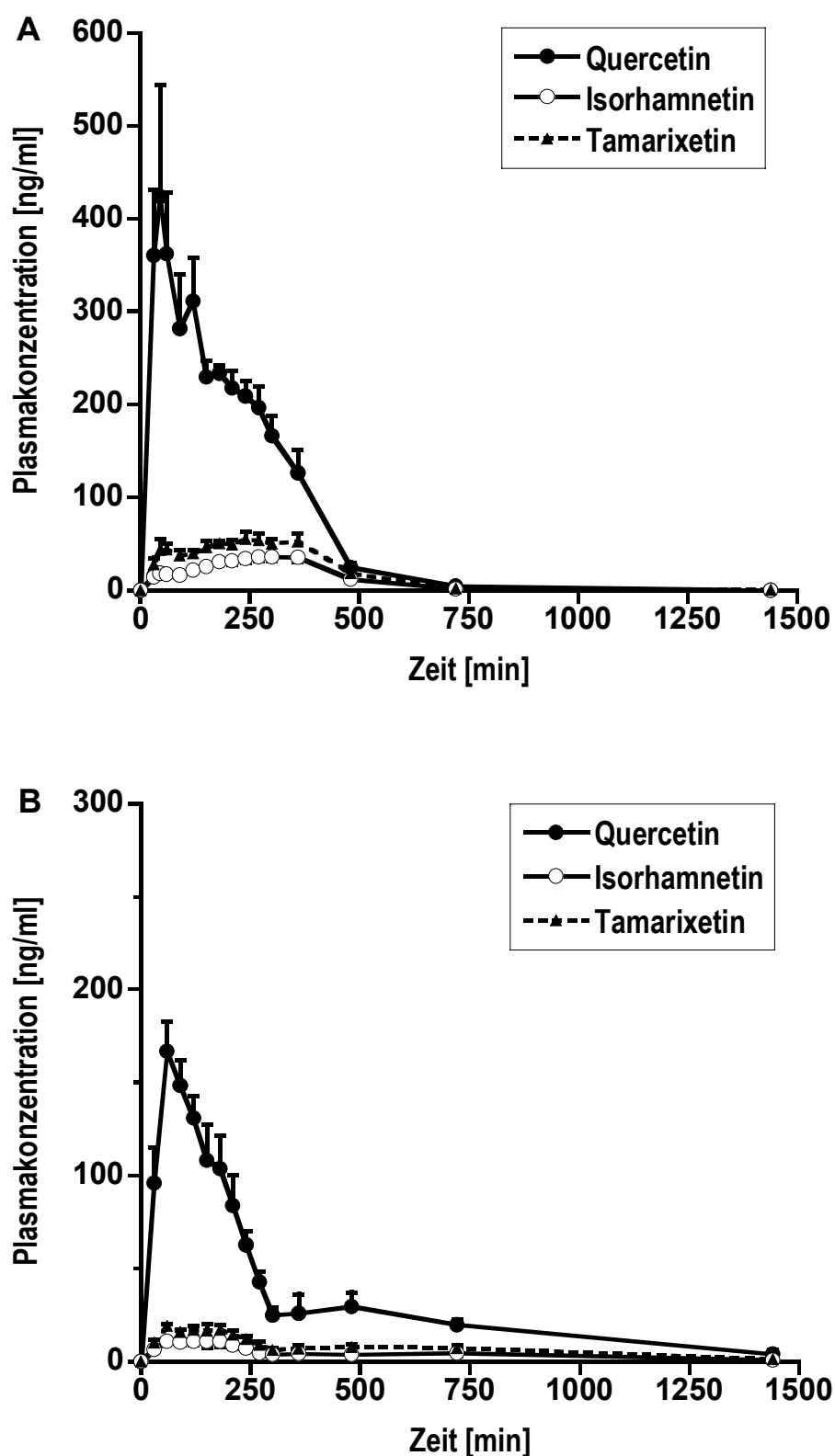


Abbildung 15: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetin-metaboliten nach oraler Gabe von 33,1 μmol Quercetin-3-Glukosid/kg KGW zusammen mit Hackfleisch (A) bzw. Standardfutter (B) im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler ($n=3$).

Tabelle 10: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin und Quercetinmetaboliten ¹⁾ nach Applikation von 33,1 µmol Quercetin-3-Glucosid/kg KGW mit Standardfutter bzw. nach Applikation mit 15g Hackfleisch im Jugularvenenblut. Mittelwerte mit Standardfehler.

Parameter	Behandlung					
	Quercetin-3-Glucosid / Futter (n = 3)			Quercetin-3-Glucosid / Hackfleisch (n = 3)		
	Que	Iso	Tam	Que	Iso	Tam
$c_{max}^{2)}$ [ng/ml]	174 ± 15	14 ± 3	24 ± 3	529 ± 56*	40 ± 4*	65 ± 7*
$t_{max}^{3)}$ [min]	70 ± 6	110 ± 25	110 ± 25	58 ± 8	180 ± 30	240 ± 32*
AUC ⁴⁾ [µg*min/ml]	50,3 ± 7,1	6,3 ± 1,8	10,4 ± 2,2	114,4 ± 8,8**	18,0 ± 1,8 *	28,4 ± 3,4*
Gesamt-AUC ⁵⁾ [µg*min/ml]	67,0 ± 9,7			160,8 ± 12,8*		
Relative AUC ⁶⁾ [%]	75,1	9,4	15,5	71,1	11,2	17,7

¹⁾ nach Behandlung der Plasmaproben mit β-Glucuronidase/Sulfatase

²⁾ c_{max} = maximale Plasmakonzentration

³⁾ t_{max} = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der c_{max}

⁴⁾ AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve

⁵⁾ Gesamt-AUC = Summe der AUCs (Quercetin+Isorhamnetin+Tamarixetin)

⁶⁾ Relative AUC in Prozent der Gesamt-AUC

*signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungen für jeweiligen Parameter (*p < 0,05, **p < 0,01)

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten In vivo-Studie

Auch im zweiten *In vivo*-Versuch wurde – im Unterschied zur höheren Dosierung – bei einer Dosierung von 33,1 µmol Quercetin/kg KGW in Form von Quercetinaglykon bzw. Quercetin-3-Glucosid eine höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Q-3-Glc im Vergleich zur relativen Bioverfügbarkeit aus dem Aglykon nicht mehr beobachtet.

Als Metabolite mit intakter Flavonolstruktur wurden nach allen Behandlungen, wie auch in den vorausgegangenen Versuchen, Isorhamnetin und Tamarixetin identifiziert.

Die Ergebnisse des zweiten Teilversuches zeigen, dass nicht nur die Bindung an den Glukoserest, sondern auch das Futter per se (Zusammensetzung, Menge u. ä.), mit dem das Flavonoid appliziert wurde, einen deutlichen Einfluss auf die Quercetinplasmakonzentration hatte. Die Plasmakonzentrationen von Quercetin und den Quercetinmetaboliten lagen bei der Applikation der Testsubstanz mit Hackfleisch deutlich höher als bei Verwendung einer stärkereichen Ration. Das relative Verhältnis von Quercetin zu Quercetinmetaboliten änderte sich dabei jedoch nicht.

4.3 In-vitro Versuche mit intestinalen Bürstensaummembranvesikeln (BSMV)

4.3.1 Cis-Inhibition der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid

Da kein radioaktiv markiertes Q-3-Glc zur Verfügung stand, konnte für die Untersuchung mit BSMV zur möglichen Interaktion von Q-3-Glc mit dem SGLT₁ nur ein indirekter Ansatz, nämlich die Beeinflussung der [³H]-D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Flavonoids, nicht jedoch die direkte Aufnahme des Flavonoids, gemessen werden. Als ein wichtiger Hinweis für eine Interaktion gilt eine gegenseitige Beeinflussung des Transportes zweier Substrate (Cis-Inhibition).

Um zu untersuchen, ob Q-3-Glc einen Einfluss auf die D-Glukose-Aufnahme über den SGLT₁ in isolierte BSMV hat, wurde zunächst die Aufnahme in An- und Abwesenheit von Q-3-Glc sowohl in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na⁺-Gradienten (Na⁺_{außen} : Na⁺_{innen} = 100 : 0 mmol/l) als auch eines entsprechenden Cholinchlorid-Gradienten (NaCl isomolar durch Cholinchlorid ersetzt) gemessen. Die Inkubationsmedien enthielten neben 0,1 mmol/l radioaktiv markierter D-Glukose 0,8 mmol/l Q-3-Glc. Für die Kontrollversuche wurden Inkubationsmedien gleicher Zusammensetzung ohne Zusatz von Q-3-Glc verwendet.

In Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten initialen Na⁺-Gradienten wurde die D-Glukose-Aufnahme bei Inkubationszeiten von 15 s bis 1 min durch Q-3-Glc im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt (Abbildung 13). Auch unter Na⁺-freien Bedingungen ergab sich bei Inkubationszeiten von 15 s bis 3 min eine signifikant geringere D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart von Q-3-Glc (Abbildung 16). Obwohl die prozentuale Hemmung der initialen Glukose-Aufnahme in Abwesenheit von Na⁺ (53,6 % ± 2,0 % bei 15 s) ähnlich ausgeprägt war wie in Anwesenheit von Na⁺ (39,6 % ± 1,9 % bei 15 s), lässt sich dennoch festhalten, dass Q-3-Glc vor allem die Na⁺-abhängige Aufnahme von D-Glukose inhibierte, da der Anteil der Na⁺-unabhängigen Aufnahme an der in Anwesenheit von Na⁺ gemessenen Gesamtaufnahme nur 1,5 % ± 0,2 % (15 s-Wert, Mittelwert mit Standardfehler, n = 6, 3 Membranpräparationen, jeweils Doppelbestimmungen) betrug.

Da unter Na^+ -freien Bedingungen die Glukose-Aufnahme v. a. über Diffusion erfolgt, könnte die Hemmung der Glukose-Aufnahme unter diesen Bedingungen durch einen Effekt von Q-3-Glc auf die passive Permeabilität der Bürstensaummembranvesikel verursacht werden. Allerdings kann unter nominell Na^+ -freien Bedingungen eine „Restaktivität“ des SGLT_1 nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch das Vorliegen eines transmembranalen H^+ -Gradienten ist in der vorliegenden Untersuchung nicht gänzlich auszuschließen, da zwar der pH-Wert im Vesikellumen und im Inkubationsmedium gleich war, aber ein Protonophor nicht zugesetzt wurde. HIRAYAMA et al. (1994) zeigten, dass auch Protonen den Glukosetransport über den SGLT_1 antreiben, wobei die Affinität des SGLT_1 für Protonen dreimal höher war als für Natriumionen. Die Kinetik des H^+ - und Na^+ -abhängigen Glukosetransports ist ähnlich, so dass von einem identischem Transportmechanismus ausgegangen werden kann (HIRAYAMA et al. 1994).

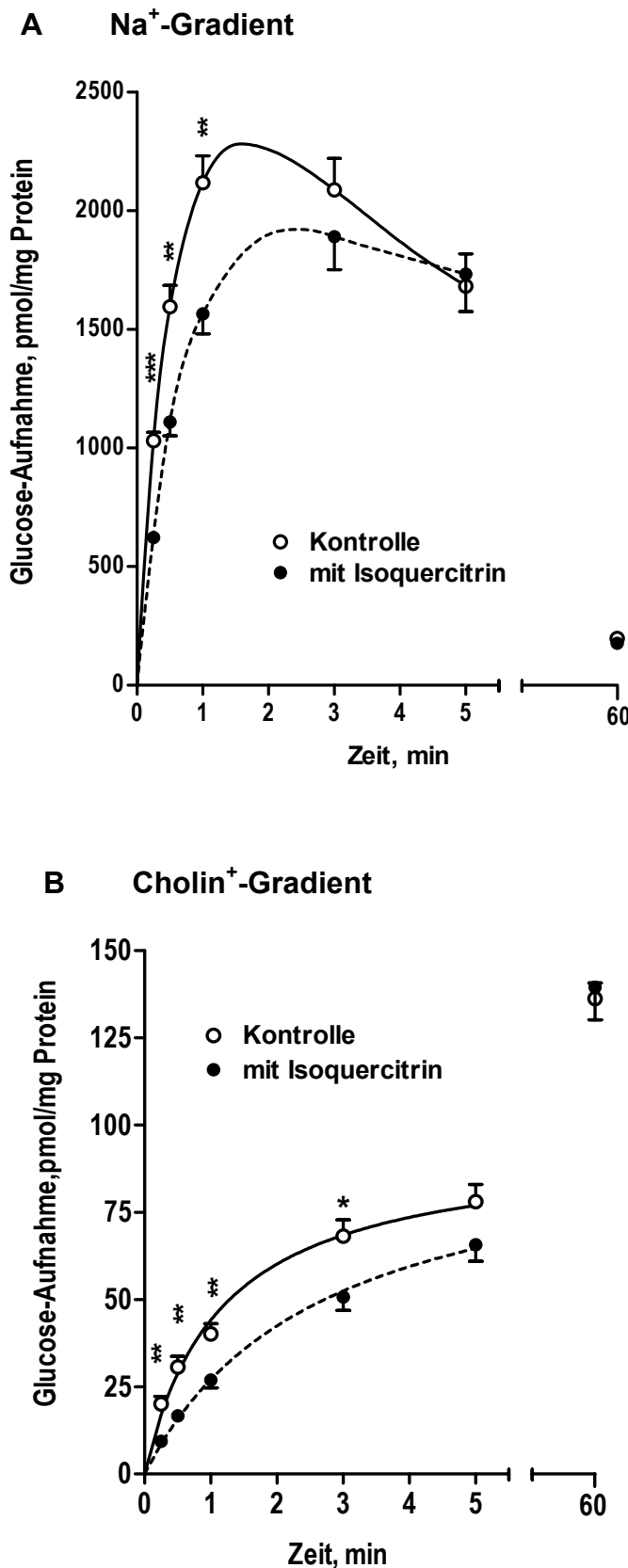


Abbildung 16:

Cis-Inhibition der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid (= Isoquercitrin).

Mittelwerte mit Standardfehlern von 6 Bestimmungen (3 Membranpräparationen, jeweils Doppelbestimmungen). Die Vesikel enthielten (mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentrationen, mmol/l): 0,1 ³H-markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl (A) bzw. Cholinchlorid (B), 0,1 MgSO₄, 35 HEPES/Tris, pH 7,2

(○) Kontrolle, (●) 0,8 Isoquercitrin. */**/** = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$ / $p < 0,01$ / $p < 0,001$) zwischen entsprechenden Werten mit und ohne Isoquercitrin.

4.3.2 Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Aufnahme von L-Leucin

Um der Frage nachzugehen, ob Q-3-Glc neben dem Effekt auf die Glukose-Aufnahme über den SGLT₁ auch einen Effekt auf andere sekundär aktive Transportsysteme besitzt, wurde der Einfluss von 0,8 mmol/l Q-3-Glc auf die Aufnahme von ³H-markiertem L-Leucin (0,1 mmol/l) unter Na⁺-Gradienten-Bedingungen sowie unter Na⁺-freien Bedingungen gemessen. Für die Kontrollversuche wurde ein Inkubationsmedium gleicher Zusammensetzung ohne Q-3-Glc eingesetzt (Abbildung 17).

Wie Abbildung 17 zeigt, hatte Q-3-Glc keinen Einfluss auf die Na⁺-abhängige L-Leucin-Aufnahme. Auch die Aufnahme unter Cholin⁺-Gradienten-Bedingungen wurde nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

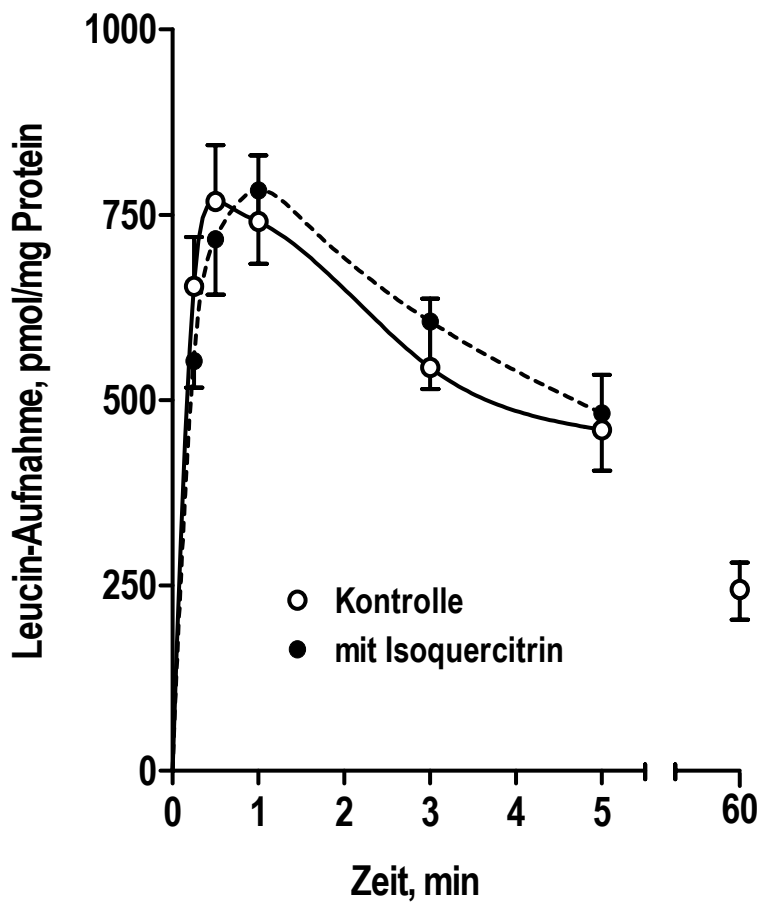


Abbildung 17:

Einfluss von Quercetin-3-Glukosid (Isoquercitrin) auf die Gesamtaufnahme von L-Leucin in Gegenwart von Na⁺

Mittelwerte mit Standardfehler von 6 Bestimmungen (3 Membranpräparationen, jeweils Doppelbestimmungen). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 ³H-markiertes L-Leucin, 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES/Tris, pH 7,2

(○) Kontrolle, (●) 0,8 Isoquercitrin

4.3.3 Initialer Zeitverlauf der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart von Na⁺

Wichtig für die nachfolgend dargestellten Hemmversuche und die Ermittlung der kinetischen Parameter des Glukosetransporters ist die Bestimmung des initialen Zeitverlaufes der D-Glukose-Aufnahme, um den linearen Bereich der Aufnahme zu ermitteln. Nur im linearen Bereich repräsentiert die gemessene Substratakkumulation den Transport des Substrats ins Vesikellumen ohne nennenswerte Beeinflussung durch Refluxvorgänge. Die D-Glukose-Konzentration im Inkubationsmedium betrug bei diesem Versuch 0,1 mmol/l.

Unter Na⁺-Gradienten-Bedingungen ergab sich über einen Zeitraum von 15 s eine nichtlineare Beziehung zwischen der Inkubationszeit und der entsprechenden D-Glukose-Aufnahme (Abbildung 18), während die Aufnahme unter Na⁺-freien Bedingungen über den untersuchten Zeitraum annähernd linear verlief (Daten nicht gezeigt). Bis zu einer Inkubationszeit von 10 s verlief die D-Glukose-Aufnahme unter Na⁺-Gradienten-Bedingungen annähernd linear, so dass für die weiteren Hemmversuche und für die Messung kinetischer Parameter eine Inkubationszeit von 5 s gewählt wurde.

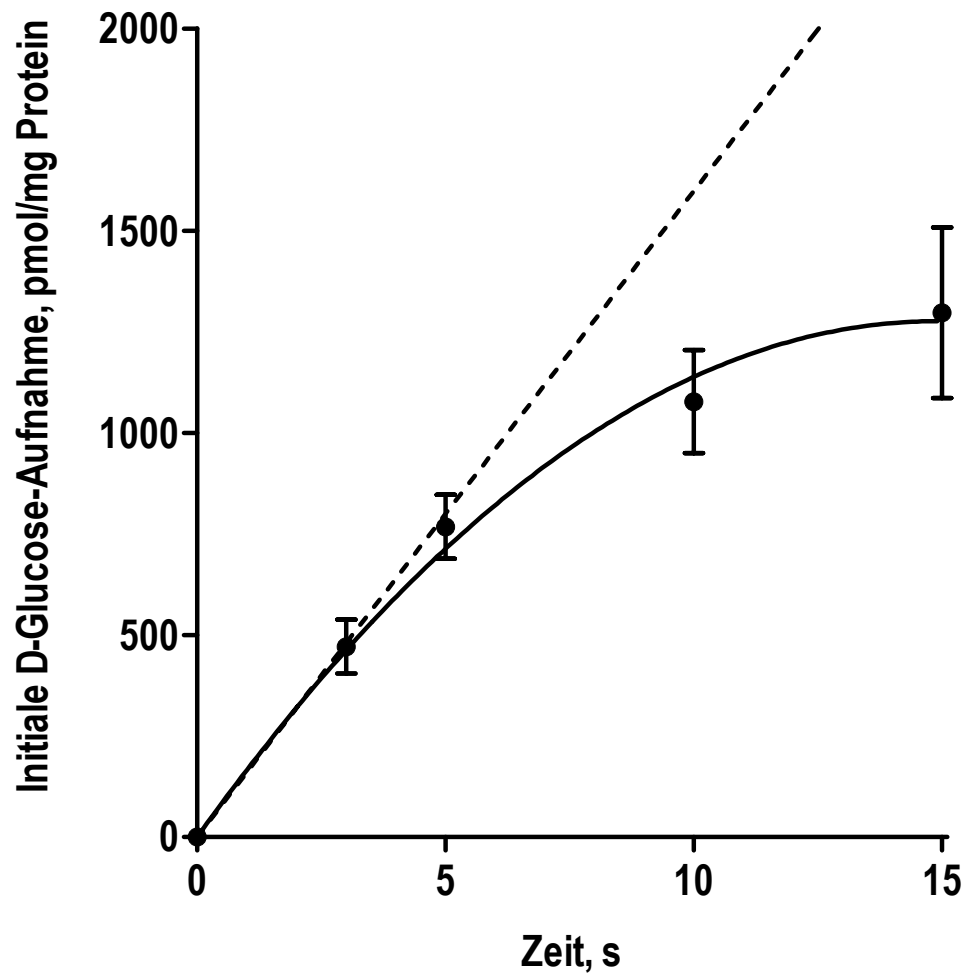


Abbildung 18: Initialer Zeitverlauf der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten

Mittelwerte mit Standardfehler von 3 Bestimmungen (3 Membranpräparationen, jeweils Dreifachbestimmungen). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO_4 , 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 ^3H -markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO_4 , 35 HEPES/Tris, pH 7,2. Die Kurve wurde mit Hilfe eines Polynoms 2. Grades berechnet, die gestrichelte Linie stellt die Tangente der Kurve durch den Nullpunkt dar.

4.3.4 Versuch zur Bestimmung der Stabilität von Quercetin-3-Glukosid im Inkubationsansatz

Um sicher zu gehen, dass keine spontane oder enzymatische Spaltung des eingesetzten Q-3-Glc innerhalb der relevanten Inkubationszeit (initiale Aufnahme, Inkubationszeit 5 s) stattfindet, wurde zunächst die Stabilität von Q-3-Glc in Gegenwart von BSMV untersucht. Die dafür verwendeten Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Das Inkubationsmediums war wie folgt zusammengesetzt (Endkonzentration, mmol/l): 0,6 Q-3-Glc, 0,1 D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES/Tris, pH 7,2.

Nach einer Inkubationszeit von 5 s betrug die gemessene Quercetinkonzentration im Inkubationsansatz nur $1,15 \pm 0,16 \cdot 10^{-3}$ mmol/l (n = 3). Das entsprach bei einer Q-3-Glc-Ausgangskonzentration von 0,6 mmol/l einer Spaltung von 0,2 % der eingesetzten Q-3-Glc-Menge. Dieses Ergebnis zeigt, dass zumindest bei Versuchen unter initialen Aufnahmebedingungen keine nennenswerte spontane oder enzymatische Hydrolyse des Quercetin-3-Glukosids stattfand.

4.3.5 Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Quercetin-3-Glukosid auf die initiale D-Glukose-Aufnahme

Die Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Q-3-Glc auf die initiale D-Glukose-Aufnahme wurde sowohl in Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na⁺-Gradienten als auch eines entsprechenden Cholin⁺-Gradienten untersucht. Dazu wurde die Aufnahme von ³H-markierter D-Glukose (0,1 mmol/l) nach einer Inkubationszeit von 5 s bei verschiedenen Q-3-Glc-Konzentrationen (0/ 0,2/ 0,4/ 0,6 und 0,8 mmol/l) gemessen. Abbildung 19 stellt die Gesamt-Glukose-Aufnahme in Gegenwart eines Na⁺-Gradienten in Abhängigkeit von der Q-3-Glc-Konzentration dar.

Bei einer Q-3-Glc-Konzentration von 0,2 mmol/l war bereits tendenziell ein inhibitorischer Effekt erkennbar, die Glukose-Aufnahme unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Aufnahme in Abwesenheit von Q-3-Glc. Die Hemmung betrug 11,8 %. Bei einer Q-3-Glc-Konzentration von 0,4 mmol/l wurde die D-Glukose-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt (p < 0,05). Die Hemmung war mit 34,2 %

ungefähr dreimal so hoch wie bei einer Konzentration von 0,2 mmol/l. Auch bei Q-3-Glc-Konzentrationen von 0,6 und 0,8 mmol/l war eine signifikante Hemmung der D-Glukose-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) zu beobachten. Der Hemmeffekt bei einer Inhibitorkonzentration von 0,8 mmol/l betrug 51,8 %.

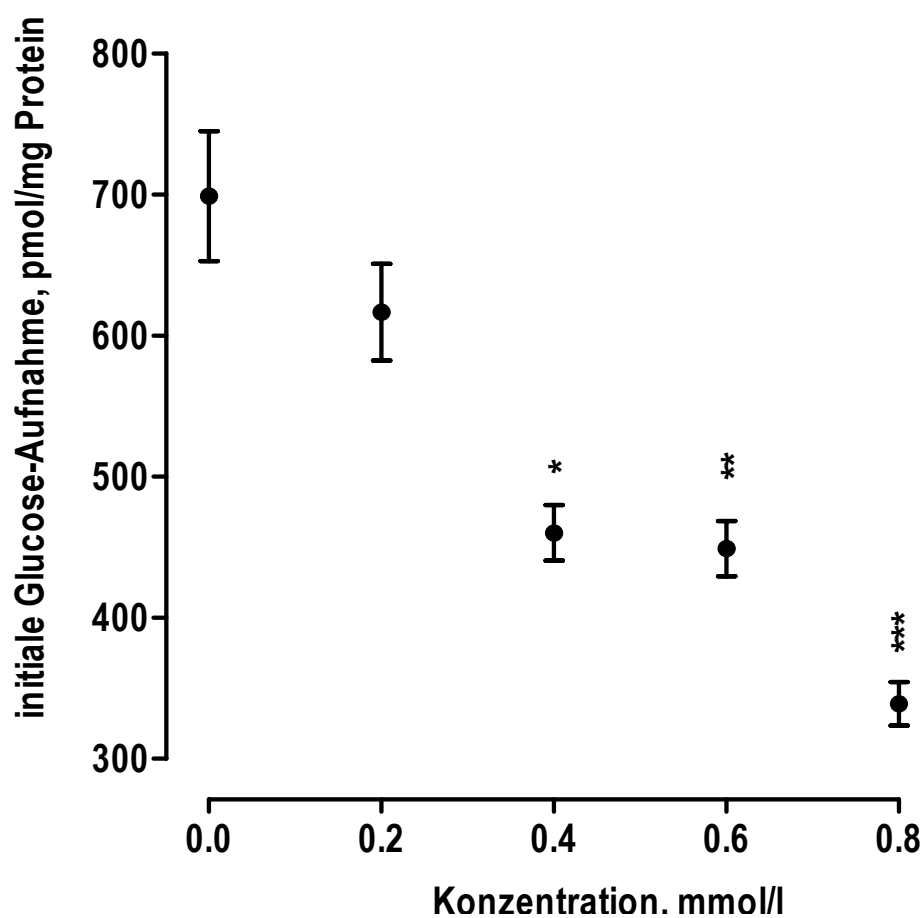


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von Quercetin-3-Glucosid auf die D-Glukose-Aufnahme

Mittelwerte mit Standardfehler von 9 Bestimmungen (3 Membranpräparationen, jeweils Dreifachbestimmungen). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 $MgSO_4$, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 3H -markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 $MgSO_4$, 35 HEPES/Tris, pH 7,2 und 0,2; 0,4; 0,6 bzw. 0,8 mmol/l Quercetin-3-Glucosid. Die Inkubationszeit betrug 5 s. */**/** signifikanter Unterschied zur Aufnahme in Abwesenheit von Quercetin-3-Glucosid ($p < 0,05$ / $p < 0,01$ / $p < 0,001$).

4.3.6 Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die Art und die Position des Zuckerrestes am Quercetinaglykon den inhibitorischen Effekt beeinflusst, wurden Cis-Inhibitionsversuche mit verschiedenen Quercetinglykosiden sowohl unter Na^+ - als auch unter Cholin^+ -Gradienten-Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde die initiale Aufnahme von radioaktiv markierter D-Glukose in Gegenwart von Quercetin-3-Glucosid (Q-3-Glc), Quercetin-4'-Glucosid (Q-4'-Glc), Quercetin-3-Galaktosid (Q-3-Gal) bzw. von Quercetin-3-Glukorhamnosid (Q-3-Glc-Rha) verglichen. Als „Positivkontrolle“ wurde der inhibitorische Effekt von Phlorizin (Phl), einem bekannten potenten SGLT_1 -Inhibitor sowie von α -Methyl-D-Glucopyranosid (MDG), einem nicht metabolisierbaren Glukoseanalogon und Transportsubstrat des SGLT_1 , untersucht. Zusätzlich wurde gemessen, ob das Aglykon Quercetin die Glukose-Aufnahme hemmt. Als Ergänzung zu den oben genannten Versuchen wurde auch der Einfluss von Glukosiden anderer Flavonoiduntergruppen auf die initiale Glukoseaufnahme untersucht. Dabei dienten das Isoflavon Genistein-7-Glucosid, das Flavanon Narigenin-7-Glucosid und das Anthocyan Cyanidin-3,5-Diglucosid als Testsubstanzen. Das Inkubationsmedium für die beschriebenen Cis-Inhibitionsversuche enthielt neben 0,1 mmol/l ^3H -markierter D-Glukose jeweils 0,6 mmol/l der zu untersuchenden Substanz. Für die Kontrolle wurde ein Inkubationsmedium gleicher Zusammensetzung ohne Zusatz der Testflavonoide verwendet. Die Inkubationszeit betrug 5 s.

In Gegenwart eines in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten wurde die D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart der beiden Monoglucoside Q-3-Glc und Q-4'-Glc im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt. Auch Phlorizin und MDG bewirkten eine signifikante Hemmung, wobei Phlorizin als SGLT_1 -Inhibitor zu einer nahezu vollständigen Hemmung führte (Abbildung 20). Da in Gegenwart des Glukoseanalogons MDG noch 72 ± 3 % der Glukose aufgenommen wurde, fiel die Hemmung der initialen Glukose-Aufnahme geringer aus als bei Q-3-Glc und Q-4'-Glc, in deren Gegenwart nur 61 ± 2 % bzw. 47 ± 3 % der Glukose aufgenommen wurden. Weder das 3-Galaktosid, das 3-Glukorhamnosid noch das Quercetinaglykon besaßen unter Na^+ -

haltigen Bedingungen einen signifikanten inhibitorischen Effekt. Auch die drei übrigen Glukoside aus den Untergruppen der Isoflavone, Flavanone und Anthocyane beeinflussten die initiale D-Glukose-Aufnahme nicht signifikant (Abbildung 20). Unter Na^+ -freien Bedingungen wurde die initiale Glukoseaufnahme ebenfalls durch Phlorizin, Q-3-Glc und Q-4'-Glc signifikant gehemmt. Im Gegensatz zum Na^+ -haltigen Inkubationsmedium war auch die Hemmung der Aufnahme durch Q-3-Gal signifikant (Abbildung 21). Die unter Na^+ -freien Inkubationsbedingungen beobachtete Hemmung durch Phlorizin unterstützt die Annahme, dass durch einen eventuell vorhandenen Protonengradienten und/oder gleichzeitige „Verunreinigungen“ mit Na^+ eine Restaktivität des SGLT₁ gegeben war (vgl. 3.2.2.1).

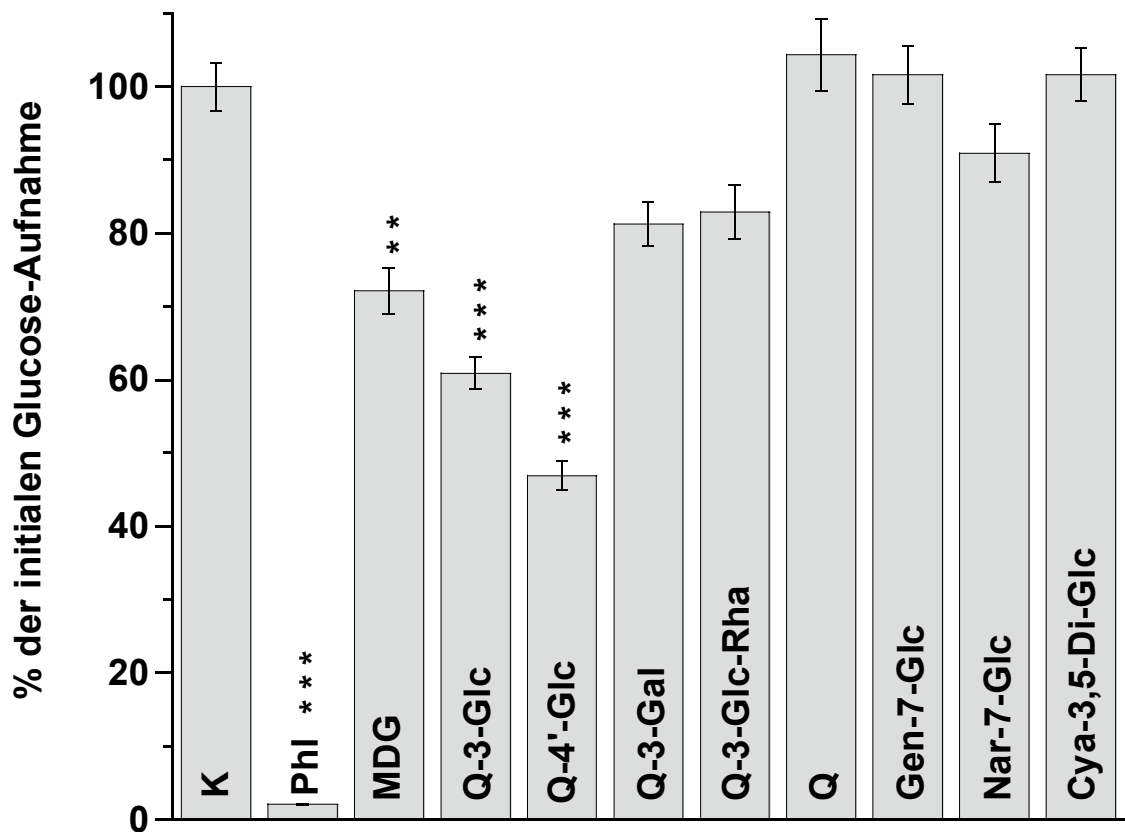


Abbildung 20: Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme unter natriumhaltigen Bedingungen

Mittelwerte mit Standardfehler aus Dreifachbestimmungen von drei Membranpräparationen ($n=9$ bzw. 18 für Kontrolle). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, $0,1$ MgSO_4 , 35 HEPES mit Tris auf pH $7,2$ eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): $0,1$ ^3H -markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl, $0,1$ MgSO_4 , 35 HEPES/Tris, pH $7,2$ (K = Kontrolle) und jeweils $0,6$ Phlorizin (Phl), Methyl-D-Glukopyranosid (MDG), Quercetin-3- bzw. 4'-Glukosid (Q-3-Glc, Q-4'-Glc), Quercetin-3-Galaktosid (Q-3-Gal), Quercetin-3-Glukorhamnosid (Q-3-Glc-Rha), Quercetin (Q), Genistein-7-Glukosid (Gen-7-Glc), Naringenin-7-Glukosid (Nar-7-Glc) oder Cyanidin-3,5-Diglukosid (Cya-3,5-Di-Glc). Die Inkubationszeit betrug 5 s. **/**signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,01$ / $p < 0,001$).

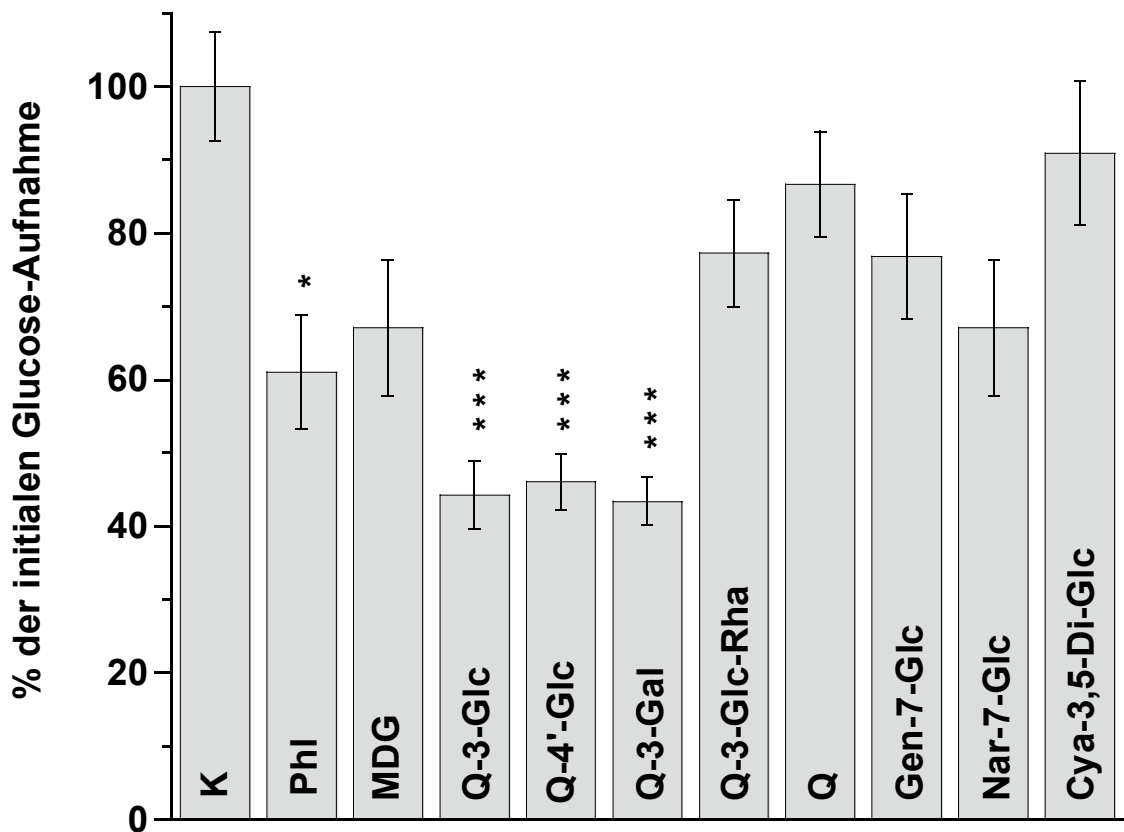


Abbildung 21: Einfluss verschiedener Flavonoidglykoside auf die initiale D-Glukose-Aufnahme unter natriumfreien Bedingungen

Mittelwerte mit Standardfehler aus Dreifachbestimmungen von drei Membranpräparationen ($n=9$ bzw. 18 für Kontrolle). Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO_4 , 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 ^3H -markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 Cholinchlorid, 0,1 MgSO_4 , 35 HEPES/Tris, pH 7,2 und jeweils 0,6 Phlorizin (Phl), Methyl-D-Glukopyranosid (MDG), Quercetin-3- bzw. 4'-Glukosid (Q-3-Glc, Q-4'-Glc), Quercetin-3-Galaktosid (Q-3-Gal), Quercetin-3-Glukorhamnosid (Q-3-Glc-Rha), Quercetin (Q), Genistein-7-Glukosid (Gen-7-Glc), Naringenin-7-Glukosid (Nar-7-Glc) oder Cyanidin-3,5-Diglukosid (Cya-3,5-Di-Glc). Die Inkubationszeit betrug 5 s. */***signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$ / $p < 0,001$).

4.3.7 Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Transportkinetik von D-Glukose

Um die Cis-Inhibition der D-Glukose-Aufnahme durch Q-3-Glc näher zu charakterisieren, wurde der Hemmtyp des Q-3-Glc untersucht. Dazu wurde die Kinetik der D-Glukose-Aufnahme in Gegenwart eines in die BSMV gerichteten Na^+ -Gradienten in An- und Abwesenheit des Q-3-Glc (0,5 mmol/l) bestimmt. Abbildung 22 A stellt die initiale D-Glukose-Aufnahme (Gesamtaufnahme) als Funktion der extravesikulären Substratkonzentration (0,05 / 0,075 / 0,125 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 5,0 bzw. 10,0 mmol/l) dar. Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Q-3-Glc zeigte die D-Glukose-Aufnahme einen kurvenlinearen Verlauf, der sich mit einer Michaelis-Menten-Gleichung mit einer aktiven Komponente und einer nicht saturablen Komponente (Diffusion) beschreiben lässt (R^2 Kontrolle = 0,9949, R^2 mit Q-3-Glc = 0,9978):

$$V = V_{\max} \cdot [S] / (K_M + [S]) + K_D \cdot [S]$$

V: Transportrate [nmol/mg Protein \cdot 5 s⁻¹]

V_{\max} : maximale Transportrate [nmol/mg Protein \cdot 5 s⁻¹]

[S]: Substratkonzentration [mmol/l]

K_M : Affinitätskonstante [mmol/l]

K_D : Diffusionskonstante [μ l/mg Protein \cdot 5 s⁻¹]

Abbildung 22 B zeigt die mit Hilfe des aus obiger Gleichung ermittelten K_D -Wertes berechnete Diffusionskomponente. Abbildung 22 C stellt die aus der Differenz zwischen der Gesamtaufnahme und der Diffusionskomponente berechnete saturable Komponente des Transportes dar. Bei diesen Darstellungen wurden zunächst die drei Bestimmungen pro Konzentration und Membranpräparation gemittelt und die Mittelwertskurven der einzelnen Membranpräparationen (n = 3) für die weiteren Berechnungen verwendet.

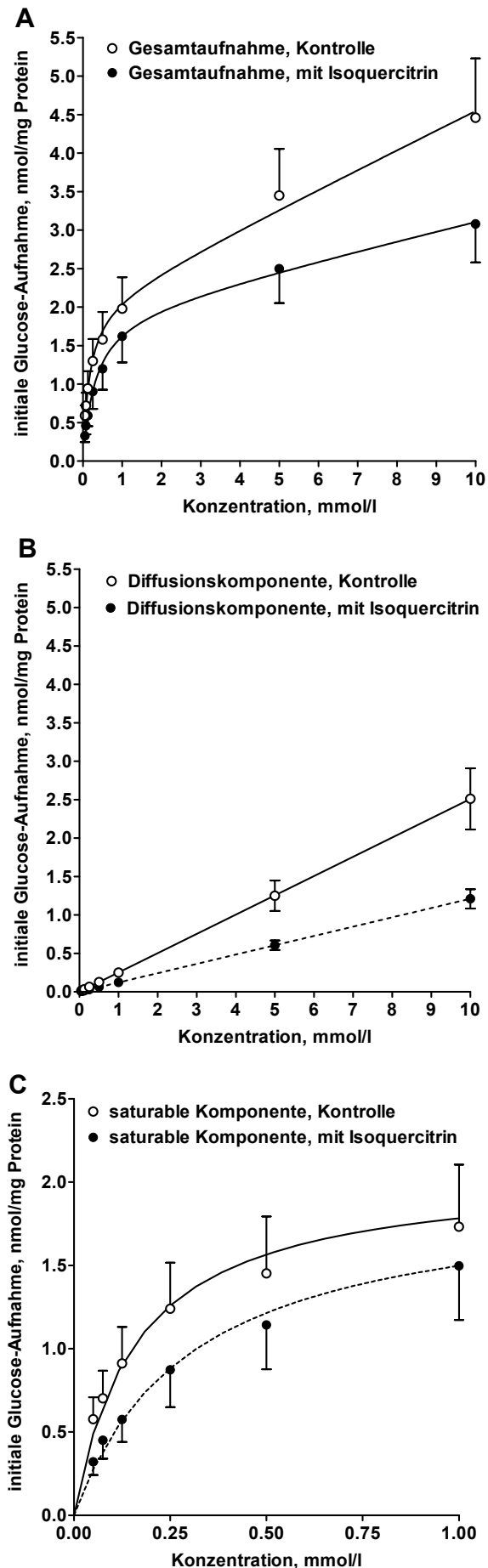


Abbildung 22:

Einfluss von Quercetin-3-Glukosid (Isoquercitrin) auf die Transportkinetik von D-Glukose

Die Vesikel enthielten (Endkonzentration, mmol/l): 300 Mannitol, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt. Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,05 / 0,075 / 0,125 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 5,0 bzw. 10,0 ³H-markierte D-Glukose, 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES/Tris, pH 7,2 (○) und 0,5 mmol/l Quercetin-3-Glukosid (●). Die Inkubationszeit betrug 5 s.

A) gemessene Gesamtaufnahme (n = 9, Mittelwerte mit Standardfehlern von 3 Membranpräparationen, jeweils Dreifachbestimmungen)

B) mit Hilfe des ermittelten K_D-Wertes berechnete Diffusionskomponente (n = 3, Mittelwerte mit Standardfehlern von 3 Membranpräparationen)

C) aus der Differenz zwischen Gesamtaufnahme und Diffusionskomponente berechnete saturable Komponente (n = 3, Mittelwerte mit Standardfehlern von 3 Membranpräparationen).

Die dargestellten Kurven bzw. Geraden wurden über nicht-lineare bzw. lineare Regression berechnet.

Q-3-Glc führte zu einer signifikanten Zunahme des mit Hilfe der oben genannten Gleichung berechneten apparenten K_M -Wertes ohne Verringerung des V_{max} -Wertes der saturablen Transportkomponente. Dies deutet auf eine kompetitive Hemmung der D-Glukose-Aufnahme durch Q-3-Glc hin. Zusätzlich hemmte Q-3-Glc jedoch auch die lineare Komponente (Diffusion). In Anwesenheit des Flavonoids war die Diffusionskonstante K_D signifikant kleiner (Tabelle 11).

Tabelle 11: Apparente kinetische Parameter der D-Glukose-Aufnahme in Ab- und Anwesenheit von Quercetin-3-Glukosid

Inhibitor	Parameter ¹⁾		
	V_{max} (nmol/mg Protein \cdot 5 s ⁻¹)	K_M (mmol/l)	K_D (μ l/mg Protein \cdot 5 s ⁻¹)
--	2,1 \pm 0,4	0,17 \pm 0,01	0,25 \pm 0,04
Quercetin-3-glukosid	2,0 \pm 0,4	0,32 \pm 0,03*	0,12 \pm 0,01*

V_{max} = maximale Transportrate, K_M = Affinitätskonstante, K_D = Diffusionskonstante, * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ¹⁾ Die apparenten kinetischen Parameter V_{max} , K_M und K_D wurden für jede Membranpräparation ($n=3$, jeweils Mittelwert aus Dreifachbestimmung mit Standardfehler) mittels nichtlinearer Kurvenanpassung (Gleichung s. S. 96) berechnet.

4.3.8 Trans-Stimulation der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid

Da der Nachweis einer Cis-Inhibition (vgl. 3.2.3.1) per se noch kein Beweis für den Transport von Q-3-Glc durch den SGLT₁ ist, wurden zusätzlich die im Folgenden beschriebenen Trans-Stimulationsversuche durchgeführt.

Dazu wurde die Aufnahme von 0,1 mmol/l [³H]-D-Glukose in mit 0,5 mmol/l Q-3-Glc vorbeladene BSMV bzw. in nicht vorbeladene Kontrollvesikel gemessen. Um eine Energetisierung des Glukosetransports durch einen Na⁺-Gradienten auszuschließen, wurden die Experimente unter Na⁺-Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt (Na⁺_{außen} = Na⁺_{innen} = 100 mmol/l). Um einen möglichst hohen, nach außen gerichteten

Gradienten für Q-3-Glc zu erhalten, wurden 10 μl BSMV-Suspension mit 190 μl bzw. 490 μl Versuchslösung inkubiert (= Verdünnung von 1:20 bzw. 1:50).

Unter den beschriebenen Trans-Stimulationsbedingungen steht somit keine Energie in Form eines transmembranalen, in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten zur Verfügung. Findet unter diesen Bedingungen eine deutlich höhere Glukose-Aufnahme in die vorbeladenen Vesikel statt, so gilt dies als ein weiterer Hinweis für einen Transport über den SGLT₁, da sich die stärkere Akkumulation von Glukose nur durch die Stimulation der Glukose-Aufnahme durch den entgegengesetzten Q-3-Glc-Gradienten erklären lässt (beschleunigter Austausch von intravesikulärem Q-3-Glc gegen extravesikuläre D-Glukose). Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 23 noch einmal die Cis-Inhibitions- und Trans-Stimulations-Bedingungen.

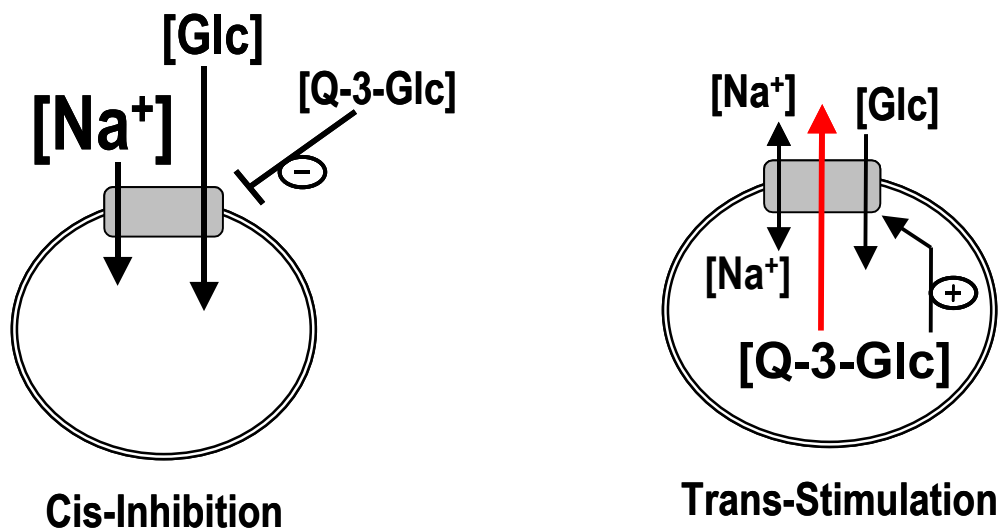


Abbildung 23: Cis-Inhibition und Trans-Stimulation

Wie Abbildung 24 zeigt, konnte eine gewisse Trans-Stimulation der D-Glukose-Aufnahme durch Q-3-Glc gezeigt werden. Nach 5 s lag sowohl bei einer 1:20 Verdünnung als auch bei einer 1:50 Verdünnung (Daten nicht gezeigt) eine statistisch

signifikant höhere Aufnahme bei den vorbeladenen Vesikeln vor, während bei späteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten waren.

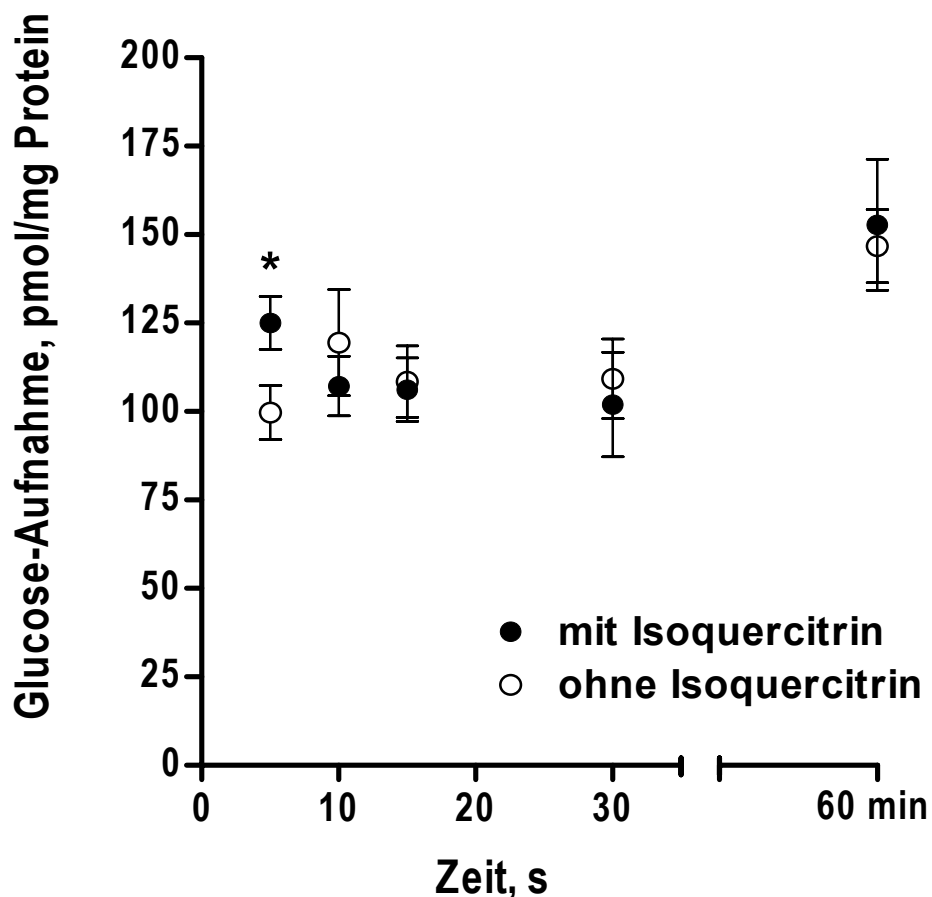


Abbildung 24: Trans-Stimulation der D-Glukose-Aufnahme durch Quercetin-3-Glukosid (Isoquercitrin)

Mittelwerte mit Standardfehler aus Dreifachbestimmungen von drei Vesikelpräparationen (n=9). Die BSMV enthielten (mmol/l) 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt (○) und zusätzlich 0,5 mmol/l Quercetin-3-Glukosid (●). Zusammensetzung des Inkubationsmediums (Endkonzentration, mmol/l): 0,1 ³H-markierte D-Glukose, 0,025 (●) bzw. kein Quercetin-3-Glukosid (○) 100 Mannitol, 100 NaCl, 0,1 MgSO₄, 35 HEPES mit Tris auf pH 7,2 eingestellt.

5 Diskussion

Flavonoide, darunter das zu den häufigsten Vertretern dieser Stoffgruppe zählende Quercetin, besitzen vielfältige Wirkungen, von denen die meisten in *In vitro*-Versuchen nachgewiesen wurden. Voraussetzung für die Wirkungen nach oraler Aufnahme *in vivo* ist die Absorption des Quercetins bzw. von dessen Glykosiden, wie sie v. a. in der Nahrung vorliegen, aus dem Gastrointestinaltrakt sowie das Erreichen ausreichend hoher Plasmakonzentrationen im systemischen Kreislauf, d. h. eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetinaglykon und den natürlich vorkommenden Quercetinglykosiden, Quercetin-3-Glukosid (Q-3-Glc) und Quercetin-3-Glukorhamnosid (Q-3-Glc-Rha) unter Berücksichtigung der gebildeten Metaboliten verglichen. Des Weiteren erfolgte exemplarisch ein Vergleich des Metabolitenmusters in Pfortader- und Jugularvenenproben. Zusätzlich wurde der Einfluss der Zusammensetzung der Testmahlzeit auf die systemische Verfügbarkeit untersucht. Als Versuchstiere wurden Schweine gewählt, da bei ihnen, z. B. im Vergleich zu Ratten, größere Blutvolumina, wie sie für Pharmakokinetikstudien erforderlich sind, entnommen werden können. Ferner ähnelt das Schwein bezüglich der Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes dem Menschen (ALMOND 1996, STEVENS 1988).

Um Plasmakonzentrationen zu erhalten, die sicher über der Nachweisgrenze liegen, wurde zunächst eine relativ hohe Dosierung (50mg/kg KGW) gewählt. Im Gegensatz zu den meisten bereits durchgeführten Studien zum Vergleich der Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Glykosiden wurden die Flavonoide den Schweinen nicht in Form einer Lösung bzw. als Reinsubstanz (ERLUND et al. 2000, GRAEFE et al. 2001, HOLLMAN et al 1999, OLTHOF et al. 2000), sondern zusammen mit einer Testmahlzeit, die dem normalen Futter entsprach, verabreicht.

Unabhängig von der Quercetinquelle wurde in Übereinstimmung mit den meisten Untersuchungen kein freies Quercetin oder freie Quercetinmetaboliten, sondern ausschließlich konjugierte Derivate gefunden, was eine umfangreiche Metabolisierung vor Erreichen der systemischen Zirkulation belegt (First-Pass-Effekt). Nach allen drei

Behandlungen war das relative Verhältnis von Quercetin zu Quercetinmetaboliten ähnlich, d. h. die drei Substanzen unterliegen grundsätzlich den gleichen Metabolisierungswegen. Bei den nachgewiesenen Konjugaten handelt es sich wahrscheinlich um Glukuronide, da Sulfatierungen als Phase-II-Reaktion beim Schwein nicht vorzukommen scheinen (CLADWELL 1980). Mit der im vorliegenden Versuch eingesetzten Analytik konnten verschiedene Konjugate jedoch nicht unterschieden werden. Das Vorliegen intakter Quercetinglykoside im Plasma ist unwahrscheinlich, da gerade jüngste Untersuchungen mit empfindlicherer Analytik (Massenspektroskopie u. a.) keine intakten Glykoside, sondern nur Glukuronide bzw. Sulfate nachweisen konnten (MOON et al. 2000, MORAND et al. 2000, SESINK et al. 2001, DAY et al. 2001).

Wie im eigenen Versuch stellt konjugiertes Quercetin auch in anderen Studien nach Applikation der verschiedenen Quercetinglykoside, d.h. unabhängig von der Quercetinquelle, den Hauptmetaboliten dar (DAY et al. 2001, GRAEFE et al. 2001). Als weitere Metaboliten wurden, wie auch in anderen Untersuchungen, der 3'-Methylether sowie der 4'-Methylether von Quercetin in konjugierter Form identifiziert. Dabei scheint es jedoch Speziesunterschiede zu geben. So wurde in den Humanstudien bisher nur der 3'-Methylether nachgewiesen (GRAEFE et al. 2001, DE VRIES et al. 2001, MANACH et al. 1998). Bei Studien mit Ratten wurden sowohl Isorhamnetin als auch Tamarixetin gefunden, wobei bei dieser Spezies im Gegensatz zum Schwein wesentlich mehr Isorhamnetin als Tamarixetin gebildet zu werden scheint (MORAND et al. 2000, MANACH et al. 1997). Die eigenen Versuche zeigen, dass beim Schwein die beiden Methylether in ungefähr gleichem Umfang auftreten. Dies zeigte auch die Studie an Schweinen von ADER et al. (2000). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass besonders zu späteren Zeitpunkten noch zahlreiche weitere Metaboliten ohne intakte Flavonolstruktur im Plasma zu finden sind, die aber mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, für Flavonole spezifischen Analytik, nicht identifiziert werden konnten. In Frage kommen dafür z. B. Mono- und Dihydroxyphenylelessigsäuren sowie Hydroxy-zimtsäuren, die durch mikrobielle Metabolisierung in tieferen Darmabschnitten gebildet und dort als solche absorbiert werden können (HEILMANN & MERFORT 1998a, b, HOLLMAN & KATAN 1998).

Interessanterweise wurden auch in der Pfortader, d.h. vor der Leberpassage, weder freies Quercetin noch freie Quercetinmetaboliten gefunden. Dabei wurden keine

wesentlichen Unterschiede im Metabolitenmuster zwischen Pfortader- und Jugularvenenblut festgestellt. Das relative Verhältnis von Quercetin zu Quercetinmetaboliten war ähnlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die absorbierten Flavonole bzw. Flavonolglykoside bereits in der Darmmukosa in großem Umfang glukuronidiert und z. T. auch methyliert werden. Kritisch anzumerken ist, dass wegen der zeitlichen Abstände der Blutprobenentnahme und einer relativ geringen Absorptionsrate der Testsubstanzen eventuelle Unterschiede in Art und Ausmaß der Metabolisierung bei der Passage durch die Darmmukosa bzw. Leber kaschiert wurden. Allerdings finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass bereits in der Darmmukosa eine umfangreiche Konjugation sowie z. T. Methylierung stattfindet und dass in der Leber weitere Glukuronidierungen, Methylierungen und bei anderen Spezies auch Sulfatierungen stattfinden (DONOVAN et al. 2001, MORAND et al. 2000, SESINK et al. 2001).

In Abhängigkeit von der Quercetinquelle wurden nach Gabe der hohen Dosierung unterschiedlich hohe Quercetinplasmakonzentrationen bzw. systemische Verfügbarkeiten erhalten, wobei die Applikation von Q-3-Glc zu den höchsten und die Gabe von Q-3-Glc-Rha zu den niedrigsten Werten führte. Die nach Applikation von freiem Quercetin erhaltenen Werte lagen dazwischen. Nach Applikation von Q-3-Glc traten schon nach 60 min doppelt so hohe Konzentrationen wie nach Quercetingabe auf. Somit scheint Quercetin nach Gabe des Monoglukosids schneller und in einem größeren Umfang absorbiert zu werden als nach Gabe des Aglykons oder Glukorhamosids, wie es auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt wurde (MORAND et al. 2000, GRAEFE et al. 2001, HOLLMAN et al. 1999). Da sowohl nach Quercetin als auch nach Q-3-Glc schon nach einer Stunde hohe Konzentrationen an Quercetin und Quercetinmetaboliten im Plasma nachweisbar waren, kann von einer Absorption im Dünndarm ausgegangen werden. Nach Applikation von Q-3-Glc-Rha traten hingegen erst nach über drei Stunden messbare Plasmakonzentrationen von Quercetin und seinen Metaboliten auf, was auf eine Absorption in distaler gelegenen Darmabschnitten (Ileum, Colon) hinweist. Diese Befunde stimmen ebenfalls mit denen aus Studien in der Literatur überein (MORAND et al. 2000, GRAFE et al. 2001, HOLLMAN et al. 1995, MANACH et al. 1997, ERLUND et al. 2000).

Auffallend ist, dass nach Gabe von Q-3-Glc ein sekundäres Maximum im Konzentrations-Zeit-Verlauf des Quercetins auftritt, das zeitlich mit der maximalen Quercetinkonzentration nach Q-3-Glc-Rha zusammenfällt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei den eingesetzten Dosierungen Q-3-Glc nicht vollständig im proximalen Dünndarm absorbiert wurde, in distale Darmabschnitte gelangte und dort nach mikrobieller Hydrolyse zu Quercetin zusätzlich absorbiert wurde. Eine andere Erklärung könnte sein, dass ein Teil des bereits absorbierten Quercetins wieder über die Galle sezerniert wird und in konjugierter Form in das Darmlumen gelangt und dort nach Dekonjugation erneut absorbiert wird (enterohepatischer Kreislauf). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass Quercetin und Quercetinmetaboliten einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (CRESPY et al. 1999, MANACH et al. 1996a, b, UENO et al. 1983). Auch ERLUND et al. (2000) wiesen nach Gabe von Quercetinaglykon einen biphasischen Verlauf der Quercetinplasmakonzentration, besonders beim Einsatz hoher Dosen, nach. Sie schlussfolgerten, dass das Quercetinaglykon aus verschiedenen Darmabschnitten absorbiert wird, was besonders bei hohen Dosierungen, wenn die gesamte Menge nicht vollständig in proximalen Dünndarmabschnitten aufgenommen werden kann, im Konzentrations-Zeit-Verlauf sichtbar wird. Ein geringer zwischenzeitlicher Anstieg der Quercetinkonzentration im abfallenden Teil des Konzentrationszeitverlaufes nach Gabe von Quercetinaglykon ist auch in der vorliegenden Arbeit nach beiden Dosierungen zu beobachten.

Im Gegensatz zur höheren Dosierung war bei der niedrigeren Dosierung von 33,1 $\mu\text{mol/kg}$ KGW sowohl im ersten als auch im zweiten Versuch eine höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Q-3-Glc im Vergleich zur Verfügbarkeit nach Gabe von Quercetinaglykon nicht mehr gegeben. Die maximale Quercetinplasmakonzentration trat nach Gabe des Monoglukosids aber weiterhin tendenziell früher auf. Somit scheint nach den vorliegenden Befunden die höhere Bioverfügbarkeit des Glukosids gegenüber dem Aglykon konzentrationsabhängig zu sein.

In der Literatur gibt es nur wenige *In vivo*-Studien zum direkten Vergleich der Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetinaglykon bzw. Q-3-Glukosid oder anderen Quercetinmonoglukosiden. In der einzigen neueren Untersuchung zum direkten Vergleich der Applikation von Quercetinaglykon und Q-3-Glc wurde eine relativ hohe Dosierung von 83 mg Quercetinäquivalenten/kg KGW bei Ratten

eingesetzt (MORAND et al. 2000). Ähnlich wie im vorliegenden Versuch wurden die Reinsubstanzen zusammen mit einer stärkereichen Testmahlzeit verabreicht (68 % Weizenstärke). Das Ziel dieser Untersuchung war jedoch nicht der Vergleich der Bioverfügbarkeiten, so dass die Quercetinplasmakonzentration nur an vier Zeitpunkten bestimmt wurden (nach 3,5 h, 7 h, 10,5 h und 24 h). Die Konzentrationen lagen nach Gabe von Q-3-Glc zu allen Zeitpunkten deutlich höher und deuten auf eine umfangreichere Absorption und damit Verfügbarkeit von Quercetin nach Q-3-Glc als nach Quercetinaglykon hin. Somit stimmen die Ergebnisse mit den eigenen Resultaten nach der hohen Dosierung (50 mg Quercetinäquivalente/ kg KGW) überein. HOLLMAN et al. (1995) wiesen auch bei einer niedrigen Dosierung (ca. 1,5 mg Quercetinäquivalente/kg KGW) indirekt eine umfangreichere Absorption und damit höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetinglukosiden im Vergleich zum Aglykon nach. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde Q-3-Glc allerdings nicht als Reinsubstanz über eine Testmahlzeit, sondern in Form gebratener Zwiebeln verabreicht, die v. a. ein Gemisch von Quercetin-3- und 4'-Glukosiden enthalten.

Eine Erklärung für die Beobachtung, dass sich eine höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Q-3-Glc bei der niedrigen Dosierung in den eigenen Experimenten nicht mehr manifestierte, könnte auf die beteiligten Absorptionsmechanismen zurückzuführen sein. Auf diesen Punkt wird zu einem späteren Zeitpunkt näher eingegangen (s. S 112 ff). Grundsätzlich muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studien auf einer geringen Anzahl von Beobachtungen basieren und es bislang in der Literatur keine vergleichbaren Befunde gibt. Ein zusätzlicher Versuch, der nach Abschluss der vorliegenden Untersuchungen am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Universität Kiel mit männlichen Tieren durchgeführt wurde, ergab auch bei einer Dosierung von 33,1 $\mu\text{mol/kg KGW}$ eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit nach Gabe des Q-3-Glc im Vergleich zum Quercetinaglykon (Daten nicht gezeigt). So könnte nicht nur die geringe Anzahl an Beobachtungen, sondern auch das Geschlecht der Schweine eine Rolle gespielt haben. Daher sind die hier dargestellten Ergebnisse nach Applikation der niedrigeren Dosierung mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten.

Beim Vergleich der in den eigenen Untersuchungen am Schwein erhaltenen Quercetinplasmakonzentrationen mit den in der Literatur vorliegenden Daten vom

Menschen fällt auf, dass trotz der sehr viel geringeren Dosierungen in den Humanstudien weit höhere maximale Plasmakonzentration von Quercetin auftraten (Tabelle 12). Ein Grund dafür könnte die Applikationsform sein. Besonders in den Studien, bei denen die Quercetinglykoside in Form einer wässrigen, ethanolhaltigen Lösung auf nüchternen Magen gegeben wurden, wurden deutlich höhere Konzentrationen erhalten. In der Untersuchung von ERLUND et al. (2000) und der Untersuchung von HOLLMAN et al. (1997), bei denen die Substanzen in Form einer Kapsel mit einem Glas Wasser verabreicht wurden, waren die Unterschiede nicht ganz so groß (Tabelle 12). AZUMA et al. (2002) zeigten, dass Ethanol in einer wässrigen Lösung von Quercetin als Lösungsvermittler dient und zu einer verbesserten Absorption führt, wenn auch in dieser Studie erst Ethanolkonzentrationen von 30 % (V/V) zu signifikanten Unterschieden führten. Im Allgemeinen bieten Lösungen die besten Voraussetzungen für die Absorption, da Flüssigkeiten u.a. schneller aus dem Magen in den Dünndarm gelangen und letztlich nur gelöste Substanzen absorbiert werden. Im vorliegenden Versuch mit Applikation der Testsubstanzen über das Futter könnte die Lösung der Testsubstanz u. a. durch Adsorption an Nahrungsbestandteile der Testmahlzeit negativ beeinflusst worden sein. Da MORAND et al. (2000) bei einem Versuch mit Ratten, denen die Testsubstanzen mit einer stärkereichen Testmahlzeit appliziert wurden, ebenfalls deutlich höhere Quercetinplasmakonzentrationen als im vorliegenden Schweineversuch nachwies, spielen wahrscheinlich auch Speziesunterschiede eine Rolle. Dabei könnte z. B. von Bedeutung sein, ob eine Resekretion der Quercetinglykoside z. B. über das Multidrug-Resistance-Associated Protein-2 (WALGREN et al. 2000a) oder eine Sekretion der gebildeten Quercetin-konjugate ins Darmlumen (CRESPY et al. 1999) bei den verschiedenen Spezies in unterschiedlichem Maße stattfindet.

Tabelle 12: Vergleich der aus der vorliegenden Untersuchung erhaltenen maximalen Quercetinplasmakonzentrationen im Vergleich zu Literaturdaten unter Berücksichtigung der Dosierung und Applikationsart. Es wurden nur Studien berücksichtigt, in denen die Reinsubstanzen verabreicht wurden

Flavonoid	Dosierung ¹⁾ [µmol/kg KGW]	C _{max} ²⁾ [ng/ml]	t _{max} [min]	Spezies	Literatur
Quercetin Q-3-Glc-Rha	je 3 Dosen: 0,4/1/2,6 (Kapsel)	41/66/86 24/48/90	114/162/288 390/444/450	Mensch (n=16)	Erlund et al. (2000)
Q-3-Glc Q-4'-Glc	5 5 (Lösung ⁴⁾)	1500 ± 300 1360 ± 211	37 ± 12 27 ± 5	Mensch (n=9)	Olthof et al. (2000)
Q-4'-Glc Q-3-Glc-Rha	5 10 (Lösung ⁵⁾)	2100 ± 1600 300 ± 300	42 ± 18 420 ± 174	Mensch (n=12)	Graefe et al. (2001)
Q-3-Glc-Rha	5 (Kapsel)	90 ± 93	553 ± 108	Mensch (n=9)	Hollman et al. (1997)
Q-4'-Glc Q-3-Glc-Rha	5 5 (Lösung ⁴⁾)	1057 ± 181 54 ± 12	30 360 ± 72	Mensch (n=9)	Hollman et al. (1999)
Quercetin	165,4 (mit Futter)	258 ± 27	240	Schwein (n=4)	Ader et al. (2000)
Quercetin Q-3-Glc Q-3-Glc-Rha	275 275 275 (mit Futter)	1570 ± 300 ³⁾ 4140 ± 724 ³⁾ 450	Jeweils nach 210	Ratte (n=5)	Morand et al. (2000)
Quercetin Q-3-Glc Q-3-Glc-Rha	165,4 165,4 165,4 (mit Futter)	404 ± 113 500 ± 112 121	120 90 210	Schwein (n=4 bzw.2)	eigene Unter- suchung
Quercetin Q-3-Glc	33,1 33,1 (mit Futter)	220 ± 21 167 ± 16	120 60	Schwein (n=3)	eigene Unter- suchung

¹⁾Dosierung, umgerechnet auf µmol/kg Körpergewicht (KGW), beim Menschen durchschnittliches KGW von 65 kg angenommen (BMI ca. 22 kg/m²), ²⁾maximale Quercetinplasmakonzentration nach Hydrolyse, ³⁾Quercetinplasmakonzentrationen nach 210 min, ⁴⁾wässrige Lösung mit 5 % Ethanol, ⁵⁾wässrige Lösung mit 15 % Ethanol

Nach Applikation von Q-3-Glc mit Hackfleisch waren die systemische Verfügbarkeit von Quercetin, gemessen an der Gesamt-AUC sowie die Quercetinplasmakonzentrationen mehr als doppelt so hoch wie nach Applikation von Q-3-Glc mit der stärkereichen Testmahlzeit. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich beim Hackfleisch um eine fettreichere Testmahlzeit handelt. Der höhere Fettgehalt könnte z. B. die Magenentleerung verzögern, so dass das Q-3-Glc insgesamt über eine längere Zeit im Dünndarm vorliegt und somit im größeren Ausmaß absorbiert bzw. metabolisiert werden kann (BORCHERT et al. 1995). AZUMA et al. (2002) untersuchten den Einfluss von Lipiden sowie Emulgatoren auf die Absorption von oral, in wässriger Lösung verabreichtem Quercetin bei der Ratte. Sie zeigten, dass eine Kombination von Fett und Emulgator, wie z. B. Sojabohnenöl und Natrium-Taurocholat, die Plasmakonzentration von konjugiertem Quercetin und Isorhamnetin signifikant erhöhte, da sie zu einer Steigerung der Löslichkeit als Voraussetzung für die Absorption von Quercetin in wässriger Lösung führen. Allerdings wurde nicht untersucht, in wie weit die Löslichkeit und damit die Absorption von Quercetinglukosiden beeinflusst wurde. Ein anderer Aspekt, der die Bioverfügbarkeit betrifft, könnte der unterschiedliche Kohlenhydratanteil in der Testmahlzeit im Vergleich zum Hackfleisch sein. Ein hoher Kohlenhydratanteil bedingt eine höhere Viskosität des Speisebreis (BORCHERT et al. 1995), was sich hemmend auf die Absorptionsrate auswirken könnte. Setzt man eine Beteiligung des Glukosetransporters SGLT1 bei der Absorption von Q-3-Glc voraus, könnte nicht nur die verbesserte Löslichkeit, sondern zusätzlich auch der sehr geringe Stärke- bzw. Glukosegehalt des Hackfleisch für die höhere Verfügbarkeit von Bedeutung sein, da Q-3-Glc und Glukose um die Bindungsstelle am Transporter zu konkurrieren scheinen (s. u.).

Insgesamt gesehen lässt der vorliegende Vergleich nur Spekulationen darüber zu, ob der Fettgehalt, der geringere Stärkeanteil oder eventuell andere Faktoren (z. B. Volumen der Testmahlzeit) für die umfangreichere Absorption verantwortlich sind. Dieser Versuch zeigt letztlich aber deutlich, dass die Zusammensetzung der Nahrung einen großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und damit auf mögliche Effekte *in vivo* besitzt, und dass dieser Aspekt in Zukunft genauerer Untersuchungen bedarf.

Da eine Diffusion hydrophiler Flavonoidglykoside durch Zellmembranen nicht möglich ist (VAN DIJK 2000, SAIJA 1995, MOVILEAU 2000), erfordert die Absorption von

Quercetin aus Quercetinglukosiden entweder eine vorausgehende extrazelluläre Hydrolyse im Darmlumen und/oder einen spezifischen Transportmechanismus, um die Bürstensaummembran zu überwinden. In der Literatur existieren sowohl Hinweise auf die Beteiligung des bereits erwähnten sekundär aktiven Glukosetransporters SGLT1 bei der Absorption von Quercetinglukosiden als auch auf eine extrazelluläre Hydrolyse durch die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH). Beide Mechanismen liefern grundsätzlich eine mögliche Erklärung für die mehrfach und auch in der eigenen Studie bei hoher Dosierung gezeigte höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Quercetinmonoglukosiden im Vergleich zum Aglykon oder Glukorhamnosid.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Interaktion von Q-3-Glc mit dem SGLT1 an isolierten Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) untersucht, um weitere Erkenntnisse zum möglichen Transport des Flavonolglukosids über den genannten Glukosetransporter zu gewinnen. Die Funktionalität des SGLT1 unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigen folgende Befunde: Die Glukoseaufnahme in die Vesikel zeigte eine deutliche Na^+ -Abhängigkeit und wurde durch Phlorizin, einem SGLT1-Inhibitor, fast vollständig gehemmt. Auch Methyl-D-Glukopyranosid, ein Transportsubstrat des SGLT1, verringerte die Glukoseaufnahme. Außerdem akkumulierten die BSMV in Gegenwart eines transmembranalen, in die Vesikel gerichteten Na^+ -Gradienten Glukose schon nach einer Minute weit über den Gleichgewichtswert hinaus. Dies stellt einen zusätzlichen Beweis für einen aktiven Transport dar.

Der Nachweis der Hemmung der Na^+ -abhängigen Glukoseaufnahme durch Q-3-Glc zusammen mit dem Nachweis, dass die Na^+ -abhängige L-Leucin-Aufnahme nicht beeinflusst wurde, zeigt, dass Q-3-Glc spezifisch mit dem SGLT1 interagiert und keine unspezifischen Effekte auf andere sekundär aktive Transportsysteme besitzt. Eine Hemmung der Aufnahme radioaktiv markierter Glukose durch Freisetzung von Glukose aus dem Q-3-Glc kann ausgeschlossen werden, da nach den relevanten Inkubationszeiten keine nennenswerte Hydrolyse auftrat. Somit beruht der Effekt auf einer Interaktion des intakten Q-3-Glc mit dem SGLT1. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von ADER et al. (2001) und WOLFFRAM et al. (2002), die ebenfalls einen spezifischen Effekt von Q-3-Glc auf den SGLT1 fanden.

Die Untersuchung des Einflusses von Q-3-Glc auf die Kinetik der Glukoseaufnahme in die BSMV ergab Hinweise auf die Art der Interaktion: Die Verdoppelung des apparenten K_M -Wertes durch Q-3-Glc bei unverändertem V_{max} -Wert deutet, wie bei ADER et al. (2001), auf eine kompetitive Hemmung des SGLT1 hin. Interessanterweise ergab sich bei den BSMV-Versuchen eine Beeinflussung der nicht-saturablen Komponente der Gesamtglukoseaufnahme. Eine Erklärung könnte ein zusätzlicher unspezifischer Effekt von Q-3-Glc auf die Permeabilität der Bürstensaummembran sein, der zu einer verringerten Diffusion von Glukose führt. Ein solcher unspezifischer Effekt scheint allerdings unwahrscheinlich, da z. B. die Aufnahme der Aminosäure L-Leucin weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Na^+ durch Q-3-Glc beeinflusst wurde. Eine andere Erklärung wäre die Präsenz eines zweiten Na^+ -unabhängigen saturablen Transportsystems für Glukose mit einer wesentlich geringeren Affinität, wie er schon bei einigen Spezies nachgewiesen wurde (OHNISHI et al. 1998, HALAIHEL et al. 1999). Bei der im Versuch eingesetzten maximalen Glukosekonzentration wäre die Sättigungskonzentration des zweiten Transportsystems noch nicht erreicht, so dass sich die Glukoseaufnahme noch im linearen Bereich befindet und (noch) einen für eine Diffusion typischen Zeitverlauf besitzt. OHNISHI et al. (1998) wiesen direkt den Transport von p-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid über den SGLT1 in BSMV von Ratten nach. Der Verlauf der Gesamtaufnahme des p-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosids ließ sich, wie auch in der vorliegenden Arbeit, am besten mittels einer Michaelis-Menten-Gleichung mit einer aktiven saturablen Komponente und einer nicht saturablen Komponente beschreiben. Eine genauere Untersuchung der nicht saturablen Komponente weist auf ein zweites Na^+ -unabhängiges Transportsystem mit einer geringeren Affinität für das Glukopyranosid hin. In einer Untersuchung mit BSMV vom Schwein kamen HALAIHEL et al. (1999) zu dem Schluss, dass dem intestinalen Glukosetransport zwei Transportsysteme mit unterschiedlicher Kinetik zu Grunde liegen, der SGLT1 mit einer hohen Affinität und einer geringen Kapazität für Glukose, neben einem noch nicht näher charakterisierten Na^+ -unabhängigen Transportsystem mit geringer Affinität und hoher Transportkapazität. Sie zeigten, dass es sich dabei weder um den Na^+ -unabhängigen Glukosecarrier GLUT2 noch um den Fruktosecarrier GLUT5 handelte. HALAIHEL et al. (1999) konnten allerdings erst bei Glukosekonzentrationen von > 50 mmol/l zwischen dem Transportsystem mit niedriger Affinität

und der Diffusionskomponente differenzieren. Anhand der vorliegenden Ergebnisse der eigenen Versuche ist es somit nicht möglich zu unterscheiden, ob es sich tatsächlich um eine Beeinflussung der Diffusionskomponente oder aber um die Hemmung eines weiteren saturablen, Na^+ -unabhängigen Transportsystems handelt. Eine Beteiligung des ebenfalls in der Bürstensaummembran lokalisierten Fruktosetransportes GLUT5 am Na^+ -unabhängigen Transport von Q-3-Glc ist unwahrscheinlich, da in der Studie von WOLFFRAM et al. (2002) die Anwesenheit von Fruktose unter Na^+ -freien Bedingungen keinen Einfluss auf die mukosale Aufnahme von Q-3-Glc hatte.

Da sowohl Q-3-Glc als auch Q-4'-Glc die carriervermittelte Na^+ -abhängige Glukoseaufnahme hemmten, scheint die Position des Glukoserestes am Aglykon keine Rolle bei der Interaktion mit dem SGLT1 zu spielen. Ferner kann auf eine höhere Affinität des Quercetinmonoglukosids im Vergleich zu MDG geschlossen werden, da die Hemmung der Glukoseaufnahme durch das Glukoseanalogon MDG weniger stark ausfiel.

Eine Interaktion scheint jedoch nur beim Vorhandensein bestimmter Zuckerreste möglich. So beeinflussten weder Quercetin-3-Galaktose noch Quercetin-3-Glukorhamnosid die Glukoseaufnahme. Auch das Aglykon als solches scheint keine Affinität zum SGLT1 zu besitzen. Ferner scheint die Struktur des Flavonoidgerüsts von Bedeutung, da auch die Glukoside des untersuchten Isoflavons, Flavanons und Anthocyans die Glukoseaufnahme nicht inhibierten. Da bei den Untergruppen der Flavanone und Isoflavone aufgrund der chemischen Struktur nur 7-Glukoside zur Verfügung standen, kann letztlich nicht beantwortet werden, ob allein die Unterschiede in der chemischen Struktur des Ringsystems oder die Position des Zuckerrestes eine Interaktion mit dem SGLT1 verhindert. Wahrscheinlich ist, dass sowohl die Änderungen des Ringsystems als auch die des Zuckerrestes die räumliche Struktur derartig verändert, dass eine Affinität zum Transporter nicht mehr gegeben ist. LASTAO et al. (1994) zeigten an Ovarzellen von *Xenopus laevis*, dass für die Interaktion bzw. für den Transport verschiedener Phenylglukoside über den SGLT1 die räumliche Anordnung von entscheidender Bedeutung ist. So ist z. B. eine β -Konfiguration der glykosidischen Bindung zwischen Phenylring und Zuckerrest eine Voraussetzung für die Affinität zum SGLT1. Auch KIMMICH & RANDLES (1978) zeigten, dass, wie in der vorliegenden Arbeit, nicht alle Flavonoidglykoside mit dem Na^+ -abhängigen Glukose-

transporter interagieren. In ihrer Studie inhibierte neben Phlorizin Apigenin-7-Glukosid die Aufnahme von ^{14}C -3-O-Methylglukose in isolierte Enterozyten vom Huhn, 7-Methoxy-Naringenin-5-Glukosid hingegen nicht.

Der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt des Q-3-Glc auf die Na^+ -abhängige Glukoseaufnahme (Cis-Inhibition) und die Effekte auf die kinetischen Parameter des Glukosetransports durch Q-3-Glc weisen zwar klar auf eine spezifische Interaktion mit dem SGLT1 hin, sind aber per se noch kein Beweis für einen Transport des Glukosids über den SGLT1 durch die Bürstensaummembran. Betrachtet man die signifikant höhere Glukoseaufnahme in mit Q-3-Glc vorbeladene BSMV nach 5 s (Trans-Stimulation), kann dies in Kombination mit der beschriebenen Cis-Inhibition als deutlicher Hinweis auf einen Transport des Glukosids über den SGLT1 gewertet werden. Zu späteren Zeitpunkten war eine signifikant höhere Aufnahme allerdings nicht mehr zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Q-3-Glc-Gradient als treibende Kraft schon nach kurzer Zeit zu gering ist, um eine längere Akkumulation von Glukose aufrechtzuerhalten. Hinzu kommt, dass Q-3-Glc, sobald es in höheren Konzentrationen an der Außenseite der BSMV vorliegt, aufgrund seiner hohen Affinität zum SGLT1 mit der Glukose um die Bindungsstelle konkurriert und dadurch die Glukoseaufnahme inhibiert. Um einen weiteren bzw. eindeutigen Beweis für den Transport des Glukosids zu erbringen, wäre es interessant gewesen, direkt die Aufnahme von radioaktiv markiertem Q-3-Glc in die BSMV zu erfassen. Dieses stand jedoch nicht zur Verfügung.

In der Literatur werden hauptsächlich zwei unterschiedliche Theorien zum Absorptionsmechanismus von Quercetinglukosiden diskutiert (HOLLMAN et al. 1995), zum einen der genannte aktive Transport über den SGLT1 mit anschließender intrazellulärer Hydrolyse (WOLFFRAM et al. 2002), zum anderen eine extrazelluläre Hydrolyse des Glukosids durch die bürstensaummembranständige Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH), gefolgt von der Diffusion des Quercetinaglykons durch die Membran (DAY et al. 2000). Q-3-Glc-Rha ist im Gegensatz zu den Quercetinmonoglukosiden kein Substrat der LPH (DAY et al. 2000).

Neben den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit zeigen auch verschiedene andere Studien eindeutig eine Interaktion von Q-3-Glc mit dem SGLT1 (GEE et al. 1998, 2000,

ADER et al. 2001). Dabei wurden in den genannten Arbeiten die Hemmung der Na^+ -abhängigen D-Glukose- bzw. D-Galaktose-Aufnahme durch Q-3-Glc bzw. Q-4'-Glc nachgewiesen. Q-3-Glc-Rha zeigte keine Interaktion. GEE et al. (2000) untersuchten zusätzlich direkt den Transport von radioaktiv markiertem Q-3-Glc mittels umgestülpter Darmsäckchen. Q-3-Glc sowie Q-4'-Glc, nicht aber Q-3-Glc-Rha wurden schneller in die Säckchen transportiert als das Quercetinaglykon. Sie fanden jedoch kein intaktes Quercetinglukosid auf serosaler Seite, sondern nur Quercetinglukuronide, so dass sowohl eine intrazelluläre Hydrolyse nach Absorption des intakten Glukosids als auch eine Spaltung durch die extrazelluläre LPH in Frage kommt. In einer früheren Untersuchung zeigten GEE et al. (1998) neben einem gesteigerten Efflux von Galaktose aus umgestülpten Darmsäckchen in Anwesenheit von Q-3-Glc ferner eine Na^+ -abhängigkeit des Effluxes. WALGREN et al. (2000) wiesen direkt den Na^+ -abhängigen Transport von intaktem Q-4'-Glc über den SGLT1 in mit SGLT1 stabil transfizierte Ovarzellen des chinesischen Hamsters sowie in Caco-2-Zellen nach. Außerdem zeigten sie an Caco-2-Zellen die Sekretion von intaktem Q-4'-Glc über das MRP2, was für einen vorausgegangenen Transport des intakten Glukosids über den SGLT1 spricht (WALGREN et al. 2000a). WOLFFRAM et al. (2002) erfassten direkt das „Verschwinden“ von Q-3-Glc aus dem mukosalen Kompartiment in Ussing-Kammer-Versuchen mit Dünndarmgewebe von Ratten. Unter Na^+ -freien Bedingungen und Anwesenheit von Phlorizin auf mukosaler Seite sowie in Anwesenheit von Glukose war das Verschwinden signifikant reduziert. Wurde anstelle von Jejunumgewebe Colongewebe eingesetzt, das den SGLT1 nicht exprimiert, blieb die Q-3-Glc-Konzentration unverändert. Ein Verschwinden von Q-3-Glc-Rha fand nicht statt. Im Gegensatz zu WALGREN et al. (2000) schließen die Befunde von GEE et al. (2000, 1998) und WOLFFRAM et al. (2002) zwar eine extrazelluläre Hydrolyse der Quercetinglukoside nicht gänzlich aus, aber die in den Versuchen demonstrierte Na^+ -Abhängigkeit, lässt sich am schlüssigsten mit dem aktiven Transport des intakten Q-3- bzw. 4'-Glc über den SGLT1 mit anschließender intrazellulärer Hydrolyse erklären, da eine Na^+ -Abhängigkeit der LPH nicht bekannt ist.

Die vorliegenden *In vitro*-Versuche mit BSMV zeigen ebenfalls eine eindeutige Na^+ -Abhängigkeit der Hemmung der Glukoseaufnahme. Zusammen mit dem Nachweis, dass Q-3-Glc im Inkubationsansatz keiner hydrolytischen Spaltung unterliegt, und der

gezeigten Trans-Stimulation zum initialen Zeitpunkt sprechen auch die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen für einen Transport des intakten Glukosids über den SGLT1.

In einer neueren *In situ*-Perfusionsstudie an Ratten folgerten CRESPIY et al. (2001), dass eine extrazelluläre Spaltung von Q-3-Glc durch die LPH nicht zwingend Voraussetzung für die bessere Absorption des Glukosids im Vergleich zum Aglykon ist, da auch eine hohe Konzentration von Phlorizin, welche die LPH hemmt, keinen Einfluss auf die Absorption des Q-3-Glc hatte. Sie schlossen allerdings ebenfalls die Beteiligung des SGLT1 bei der Absorption aus, da Q-3-Glc das Verschwinden von Glukose aus dem Perfusionsmedium nicht inhibierte und, wie schon erwähnt, die Absorption von Q-3-Glc durch Phlorizin nicht beeinflusst wurde. Da aber eine sehr viel höhere Glukosekonzentration (8 mmol/l) als Q-3-Glc-Konzentration (15 µmol/l) im Perfusat eingesetzt wurde, könnte der kompetitive, inhibitorische Effekt von Q-3-Glc nicht zum Tragen gekommen sein. Auch bei der gleichzeitigen Perfusion einer hohen Phlorizinmenge (150 nmol/min) neben einer kleinen Q-3-Glc-Menge (14 nmol/min) pro Zeiteinheit bei hoher Glukosekonzentration, könnte nur der Effekt des Phlorizins sichtbar sein, da Phlorizin als kompetitiver Inhibitor des SGLT1 sowohl Q-3-Glc als auch Glukose vom Transporter verdrängt. Eine weitere Studie von CRESPIY et al. (2002) deutet ebenfalls darauf hin, dass die extrazelluläre Spaltung durch die LPH keine entscheidende Rolle spielt. Phlorizin, das zwar ein Inhibitor des SGLT1 ist, aber selbst nicht über diesen Mechanismus transportiert wird, wird *in vivo* bei der Ratte langsamer absorbiert als das entsprechende Aglykon Phloretin, obwohl Phlorizin ein Substrat für die Hydrolyse durch die LPH ist (CRESPIY et al. 2002). Somit schließen auch diese Befunde eine Beteiligung des SGLT1 an der intestinalen Absorption nicht aus.

Die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Studie nach Gabe des Glukosids mit stärkereichem Futter bei der niedrigen Dosierung keine höheren Quercetinplasmaspiegel im Vergleich zur Applikation des Aglykons ergaben, könnte auf der Konkurrenz des Q-3-Glc mit der während der Verdauung aus dem Futter freigesetzten Glukose um die Bindungsstelle am Transporter beruhen. Da besonders bei der niedrigen Dosis im Verhältnis zum Flavonolglukosid mehr Glukose in der Testmahlzeit enthalten war, könnte der Vorteil eines aktiven Transports von Q-3-Glc über den SGLT1 gegenüber der passiven Diffusion von Quercetinaglykon nicht mehr

sichtbar gewesen sein. Das Ergebnis lässt sich allerdings ebenso mit der Konkurrenz um die Bindungsstelle der LPH begründen.

Außer Frage zu stehen scheint, dass eine Hydrolyse von Quercetinmonoglukosiden stattfindet, sei es durch die extrazelluläre LPH oder den vorliegenden Ergebnissen folgend durch intrazelluläre β -Glukosidasen, da, wie schon erwähnt, gerade in neueren Untersuchungen keine intakten Glukoside, sondern praktisch ausschließlich Konjugate im Plasma nachgewiesen wurden (DAY et al. 2001, SESNIK et al. 2001). Dabei wurde nach dem Verzehr von Zwiebeln, die u. a. Q-3-Glc enthielten, Quercetin-3-Glukuronid als Metabolit identifiziert, was darauf hindeutet, dass vor der Konjugation am C3-Atom eine Hydrolyse stattgefunden hat (DAY et al. 2001). Intrazelluläre, intestinale β -Glukosidasen wurden u. a. beim Menschen, beim Schwein sowie bei der Ratte nachgewiesen (DAY et al. 1998, IOKU et al. 1998, MCMAHON et al. 1997). DAY et al. (1998) zeigten, dass Q-3-Glc und Q-4'-Glc ein Substrat für die intestinale β -Glukosidase darstellen, wobei das 3-Glukosid jedoch nur in geringem Umfang hydrolysiert wurde. Q-3-Glc-Rha dagegen scheint kein Substrat der genannten Glukosidasen zu sein, da eine Hydrolyse nicht nachgewiesen werden konnte (IOKU et al. 1998, DAY et al. 1998). Die anschließende Konjugation mit Glukuronsäure kann sowohl durch im Darm als auch in der Leber vorkommende UDP-Glukuronyltransferasen erfolgen, wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde (GALIJATOVIC et al. 2000, CHENG et al. 1998, 1999, DAY et al. 2000a, OLIVEIRA et al. 2000, 2002). Wie die nach der Hydrolyse gebildeten hydrophilen Quercetinglukuronide die basolaterale Membran überwinden und in den Blutkreislauf gelangen, ist bislang noch nicht genauer untersucht (Abbildung 25).

Das ebenfalls in den vorliegenden Studien untersuchte Q-3-Glc-Rha stellt weder ein Substrat für die LPH noch für cytosolische β -Glukosidasen dar noch interagiert es mit dem SGLT1, so dass eine Absorption aus dem Dünndarm unwahrscheinlich ist. In Übereinstimmung mit anderen Studien (MANACH et al. 1995, HOLLMAN et al. 1997, GRAEFE et al. 2001, MORAND et al. 2000) sprechen auch die Ergebnisse der eigenen Versuche für eine Absorption des Aglykons aus tieferen Darmabschnitten nach mikrobieller Spaltung des Glykosids, da nach Applikation von Q-3-Glc-Rha die

Quercetinplasmakonzentrationen sehr niedrig waren und die maximalen Quercetinplasmakonzentrationen erst nach ca. vier Stunden erreicht wurden.

Insgesamt unterstützen die eigenen Resultate zusammen mit den diskutierten Befunden aus der Literatur grundsätzlich die Hypothese einer höheren Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetinmonoglukosiden im Vergleich zur Gabe des Aglykons oder Glukorhamnosids aufgrund der Beteiligung des SGLT1 an der Absorption der Monoglukoside. Abbildung 25 stellt ein aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie aufgrund von in der Literatur vorhandenen Befunden entwickeltes hypothetisches Modell zur Absorption von Quercetin und Quercetinglykosiden dar.

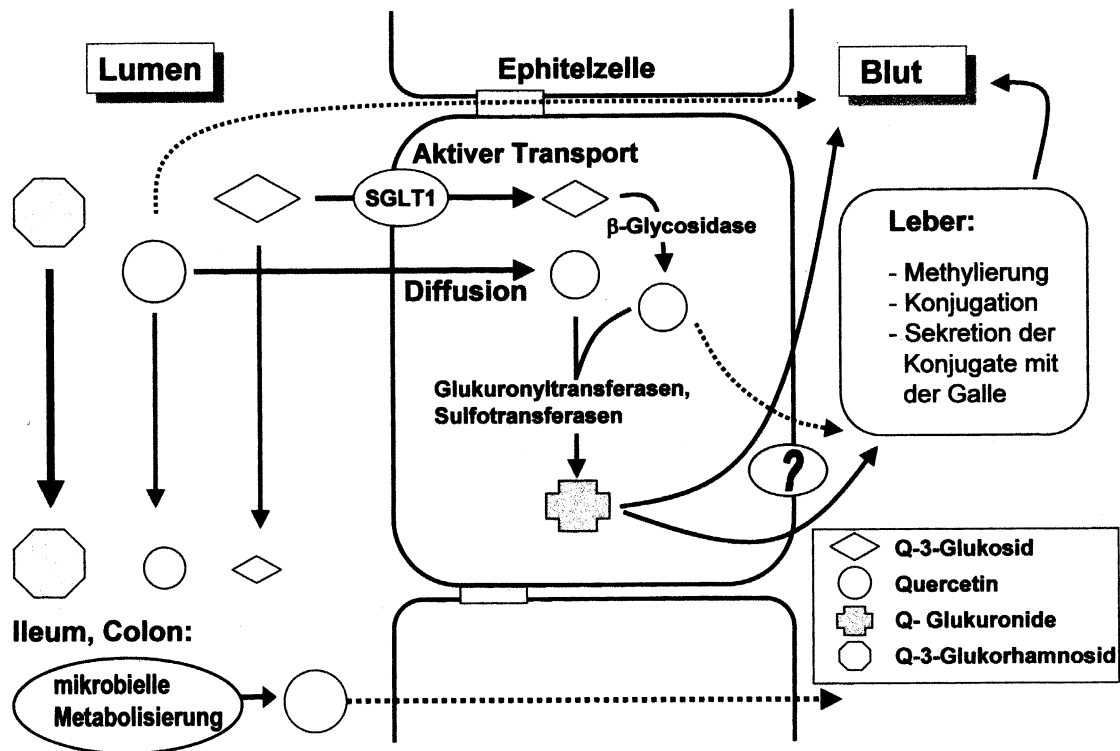


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Absorptionsmechanismen der untersuchten Quercetinglykoside

Quercetin-3-Glukosid wird im Dünndarm aktiv über den SGLT1 absorbiert und unterliegt anschließend einer intrazellulären Hydrolyse durch cytosolische β -Glukosidasen. Quercetin gelangt passiv per Diffusion in die Epithelzelle. Quercetin aus Quercetin-3-Glukorhamnosid wird erst nach mikrobieller Hydrolyse des Glykosids in tieferen Darmabschnitten per Diffusion absorbiert. (Weiteres s. Text)

Wie in Abbildung 25 dargestellt, gelangt das lipophile Aglykon passiv auf dem Diffusionsweg in die Epithelzelle des Dünndarms. Die folgenden Metabolisierungsschritte, wie Glukuronidierung, z. T. auch Methylierung und Sulfatierung, erhalten den Konzentrationsgradienten zwischen Darmlumen und Epithelzelle als treibende Kraft der Diffusion aufrecht. Quercetinmonoglykoside, wie Q-3-Glc, werden intakt über den sekundär aktiven, in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierten SGLT1 in die Zelle transportiert. Dort unterliegen sie einer Hydrolyse durch cytosolische β -Glukosidasen und weiteren Metabolisierungsschritten (Konjugationsreaktionen). Das Quercetinglukorhamnosid kann aufgrund seiner Molekülgröße und Hydrophilie weder

per Diffusion noch über einen Transporter die Membran der Dünndarmepithelzelle überwinden. Es gelangt unverändert in tiefere Darmabschnitte, wo es einer mikrobiellen Metabolisierung unterliegt. Das dabei freiwerdende Quercetin kann erst in diesen Darmabschnitten auf dem Diffusionswege absorbiert werden. In tieferen Darmabschnitten kann zusätzlich Quercetin aus überschüssigem, im Dünndarm nicht absorbierten Quercetinmonoglukosiden durch mikrobielle Hydrolyse freigesetzt und per Diffusion aufgenommen werden.

Zusammengefasst lassen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wenn auch mit gewisser Vorsicht aufgrund der relativ geringen statistischen Aussagekraft der *In vivo*-Resultate, folgende Schlüsse ziehen:

- Die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quercetinglykosiden ist abhängig von der Art des Zuckerrestes.
- Bei gleichzeitiger Gabe von Quercetin bzw. Quercetin-3-Glukosid zusammen mit einer stärkereichen Testmahlzeit scheint die höhere relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Monoglukosid im Vergleich zum Aglykon nur bei relativ hohen Dosierungen gegeben zu sein.
- Neben der Abhängigkeit von der chemischen Struktur des Zuckerrestes und der Dosierung scheint die systemische Verfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetin-3-Glukosid abhängig von der Zusammensetzung der applizierten Testmahlzeit zu sein. Dies bedarf in Zukunft näherer Untersuchungen, da Flavonole im Wesentlichen mit der täglichen Nahrung aufgenommen werden.
- Die Quercetinquelle hat keinen Einfluss auf das Metabolitenmuster: Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin liegen schon direkt nach der Absorption hauptsächlich als Konjugate vor. Somit zirkulieren die konjugierten Metaboliten der applizierten Flavonole bzw. Flavonolglykoside und nicht ihre freien, unveränderten Formen im systemischen Kreislauf. Dies sollte bei *In vitro*-Untersuchungen zu biologischen Effekten im Organismus stärker berücksichtigt werden, da bisher oft nur die Wirkung der Aglyka oder der Flavonolglykoside als solche untersucht wurden.

- Die Ergebnisse der *In vitro*-Untersuchungen zeigen klar eine spezifische Interaktion von Quercetin-3-Glukosid mit dem Na⁺-abhängigen Glukosetransporter SGLT1.
- Die Bestimmung der apparenten kinetischen Parameter in An- und Abwesenheit von Quercetin-3-Glukosid weist auf eine kompetitive Hemmung der D-Glukose-Aufnahme über den SGLT1 hin.
- Zusätzlich scheint Quercetin-3-Glukosid die nicht saturable Komponente (Diffusion) der Glukoseaufnahme oder aber ein nicht näher charakterisiertes Na⁺-unabhängiges Transportsystem mit geringer Glukoseaffinität zu beeinflussen.
- Da eine Trans-Stimulation der Glukoseaufnahme durch Quercetin-3-Glukosid zumindest unter initialen Bedingungen (5 s-Wert) gezeigt werden konnte, ist unter Berücksichtigung der Befunde aus der Literatur ein Transport nicht auszuschließen. Zur endgültigen Klärung der Frage, welcher intestinale Absorptionsmechanismus für die vielfach gezeigte schnellere und umfangreichere Absorption von Quercetinmonoglukosiden im Vergleich zum Aglykon verantwortlich ist, bedarf es weiterer Studien.

6 Zusammenfassung

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe von Quercetinmonoglukosiden höher ist als nach Gabe des Aglykons bzw. Glukorhamnosids. Als mögliche Erklärung dafür wird bei der Absorption von Quercetinglukosiden u. a. ein Transport der Substanz über den in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierten Na⁺-abhängigen Glukosetransporter (SGLT1) diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zum einen *in vivo* die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Applikation einer höheren und niedrigeren Dosierung (165,4 bzw. 33,1 µmol/kg KGW) von Quercetinaglykon, Quercetin-3-Glukosid (Q-3-Glc) bzw. Quercetin-3-Glukorhamnosid am Schwein verglichen, zum anderen *in vitro* der Einfluss von Quercetin-3-Glukosid auf die Aufnahme radioaktiv markierter D-Glukose über den SGLT1 in isolierte Bürstensaummembranvesikel (BSMV) vom Schwein untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass bei höheren Dosierungen die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Gabe des Glukosids höher war als nach Gabe des Aglykons oder Glukorhamnosids. Bei der niedrigeren Dosierung hingegen war ein deutlicher Unterschied in der Bioverfügbarkeit nicht mehr gegeben. Unabhängig von der Quercetinquelle und Dosierung galt, dass sowohl im Pfortader- als auch im Jugularvenenblut konjugiertes Quercetin den Hauptmetaboliten darstellte. Als weitere Metaboliten wurden der 3'- sowie der 4'-Methylether des Quercetins in konjugierter Form identifiziert. Eine Abhängigkeit der systemischen Verfügbarkeit von Quercetin von der Zusammensetzung der applizierten Testmahlzeit wurde nachgewiesen. Nach Applikation von Q-3-Glc mit Hackfleisch waren die Quercetinplasmakonzentrationen sowie die systemische Verfügbarkeit von Quercetin signifikant höher als nach Applikation von Q-3-Glc mit stärkereichem Standardfutter. Anhand der BSMV-Versuche konnte gezeigt werden, dass Q-3-Glc die Aufnahme von D-Glukose über den SGLT1 signifikant hemmte, wobei die Aufnahme von L-Leucin unbeeinflusst blieb. Die Bestimmung der apparenten kinetischen Parameter in An- und Abwesenheit von Q-3-Glc wies auf eine kompetitive Hemmung der Glukoseaufnahme über den SGLT1 hin. Unter initialen Bedingungen (5s-Wert) konnte eine Trans-Stimulation der Glukoseaufnahme durch Q-3-Glc nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quercetinglykosiden von der Art des Zuckerrestes abhängig ist, wobei die Quercetinquelle jedoch keinen Einfluss auf das Metabolitenmuster besitzt. Eine höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Glukosid im Vergleich zum Aglykon ist bei gleichzeitiger Gabe einer stärkereichen Testmahlzeit erst bei relativ hohen Dosierungen gegeben. Die spezifische Interaktion von Q-3-Glc mit dem SGLT1 und die gezeigte Trans-Stimulation schließen einen Transport des Q-3-Glc über den SGLT1 als Erklärung für die höhere Bioverfügbarkeit des Glukosids nicht aus.

7 Summary

Recent investigations indicate a higher bioavailability of quercetin derived from quercetin monoglucosides compared with the free aglycon or the glucorhamnoside. As a possible explanation an involvement of the intestinal Na⁺-dependent glucose cotransporter (SGLT1) in the absorption of quercetin glucosides has been discussed. Therefore, the present *in vivo* study compared the relative bioavailability of quercetin in pigs after oral application of 165,4 and 33,1 μmol/kg body weight of quercetin aglykon, quercetin-3-glucoside (Q-3-Glc) and quercetin-3-glucorhamnoside, respectively. Furthermore the influence of Q-3-Glc on D-glucose uptake into brush border membrane vesicles (BBMV) from pig jejunum was studied.

After application of the higher dose the relative systemic availability of quercetin from the glucoside was higher than from the aglycon or glucorhamnoside. At the lower dose, however, there was no difference in the bioavailabilities. Irrespective of the source of quercetin the main metabolite found in blood samples of both the jugular and portal vein was conjugated quercetin. In addition to quercetin, the conjugated 3'- and 4'-methylethers of quercetin were identified. The bioavailability of quercetin depended on dietary factors as well. The plasma concentration and the systemic availability of quercetin were significantly higher when the test meal consisted of a small meat ball compared with the regular starch rich pig diet. In the BBMV experiments Q-3-Glc significantly inhibited the SGLT1 mediated D-glucose uptake, whereas the uptake of L-leucin into the BBMV was not influenced. Determinations of the kinetic parameters in absence or presence of Q-3-Glc indicated a competitive type of inhibition of the Glukose uptake via the SGLT1. Under initial conditions (5 sec incubation time) a trans-stimulation of the glucose uptake by the Q-3-Glc was shown.

Taken together, the present results indicate that the bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides depends on the sugar moiety. The metabolites found in plasma after application of the different quercetin glycosides do not differ. A higher bioavailability of quercetin derived from the Q-3-Glc compared to the aglycon appeared only after a relatively high dose. The specific interaction between Q-3-Glc and the SGLT1 together with the observed trans-stimulation points to a transport of Q-3-Glc via the SGLT1 and in turn could explain the higher bioavailability of the Q-3-Glc.

8 Literaturverzeichnis

ADER, P., WEBMANN, A. & WOLFFRAM, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 1056-1067.

ADER, P., BLOECK, M. (2001). Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium / Glukose co-transporter (SGLT₁). *Cancer Letters*, **162**, 175-180.

AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., FERNANDEZ, Y., ANCIAUX, N., DEMIGNE, C. & REMESY, C. (1996). Comperative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29) cells). *Cancer Letters.*, **105**, 61-70.

AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., VIALA, C., RÉMÉSY, C., CHAP, H. & PAYRASTRE, B. (1997). Relationship between flavonoid stucture and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase; a comparsion with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition., *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1649-1657.

AISLING AHERNE, S. & O'BRIEN, NORA. (2002). Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutr.*, **18**, 75-81.

ALMOND, G. W. (1996). Research applications using pigs. *Anesthesiology Update*, **12**, 707-716.

ARAI, Y., WATANABE, S., RIMIRA, M. ET AL. (2000). Dietary intake of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration., *J. Nutr.*, **130**, 2243-2247.

ARUOMA, O. I. (1998). Free Radicals, oxidative Stress, and antioxidants in human health and disease., *JAOCS*, **75**, 199-212.

AURA, A.-M., O'LEARY, K. A., WILLIAMSON, G., OJALA, M., BAILEY, M., PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NUUTILA, A. M., OKSMAN-CALDENTY, K.-M. & POUTANEN, K. (2002). Quercetin derivates are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1725-1730.

AVIRAM, M. & FUHRMAN, B. (1998). Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis.*, **137**, S45-S50.

AW, T. Y. (1999). Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**, 557-565.

AWAD, H. M., BOERSMA, M. G., BOEREN, S., VAN DER WOUDE, H., VAN ZANDEN, J., VAN BLADEREN, P. J., VERVOORT, J. & RIETJENS, M. C. M. (2002). Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular *in vitro* system., *FEBS Lett.*, **520**, 30-34.

AZIZ, A. A., EDWARDS, C. A., LEAN, M. E. J. & CROZIER, A. (1998). Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Rad. Res.*, **29**, 257-269.

AZUMA, K., IPPOUSHI, K., ITO, H., HIGASHIO, H. & TERAOKA, J. (2002). Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1706-1712.

BEHL, C. & MOOSMANN, B. (2002). Oxidative nerve cells death in Alzheimer's disease and stroke: Antioxidants as neuroprotective compounds., *Biol. Chem.*, **383**, 521-536.

BERHOW, M. A. & VAUGHN, S. F. (1999). Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In: *Principles and Practices of Plant Ecology* (Dashek, W. V., ed.) pp. 425-438, CRC Press Inc. , Boca Raton, Florida, USA.

BERNER, W. & KINNE, R. (1976). Transport of p-aminohippuric acid by plasma membran vesicles isolated from rat kidney cortex., *Pflügers Arch.*, **361**, 269-277.

BERTELOT, A. & SEMENZA, G. (1990). Advantages and Limitations of Vesicles for the Characterization and the Kinetic Analysis of Transport Systems. In: *Methods in Enzymology, Vol. 192*, pp 409-437, Academic Press Inc.

BLOCK, G., PATTERSON, B. & SUBAR, A. (1992). Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **18**, 1-29.

BORCHERT, H., PFEIFER, S., PFLEGEL, P. (1995). Biopharmazie: Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation, 3. Auflage, Ullatein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin, Wiesbaden

BÖHM, H., BOEING, H., HEMPEL, J., RAAB, B. & KROKE, A. (1998). Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss.*, **37**, 147-163.

BÖHM, H. (2000). Das Französische Paradoxon-Gesundheit durch Phenole des Weins? Teil 1: Phenolische Inhaltsstoffe des Weins..., *Ernähr. Umsch.*, **47**, 44-49.

BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. & SARAN, M. (1992). Structural principles of flavonoid antioxidants. *Free Radicals and the Liver.* (G. Csomós & J. Fehér, eds.) S 77-95, Springer-Verlag, Berlin.

BORS, W., MICHEL, C. & SCHIKORA, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study., *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 45-52.

BORS, W., HELLER W. & MICHEL C. (1998). The chemistry of flavonoids. In: *Flavonoids in Health and Disease.* (Rice-Evans, C. A. & Packer, L., eds.), pp. 111-136; Marcel Dekker Inc., New York.

- BORS, W., MICHEL, C. & STETTMAIER, K. (1997).** Antioxidant effects of flavonoids., *Biofactors*, **6**, 399-402.
- BOULTON, D. W., WALLE, U. K. & WALLE, K. (1998).** Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 243-249.
- BOUTIN, J. A., MEUNIER, F., LAMBERT, P.-H., HENNIG, P., BERTIN, D., SERKIZ, B. & VOLLAND, J.-P. (1993).** *In vivo* and *in vitro* glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 1157-1166.
- BRAVO, L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.*, **56**, 317-333.
- BROWN, D. E., RASHOTTE, A. M., MURPHY, A. S., NORMANLY, J., TGUE, B. W., PEER, W. A., TAIZ, L. & MUDAY, G. K. (2001).** Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis., *Plant Physiol.*, **126**, 524-535.
- CANIVENC-LAVIER, M. C., BENTEJAC, M., MILLER, M. L., LECLERC, J., SIESS, M. H., LATRUFFE, N. & SUSCHETET, M. (1996A).** Differential effect of non-hydroxylated flavonoids as inducers of cytochrome P4501A and 2B isozymes in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **136**, 348-353.
- CANIVENC-LAVIER, VERNEVAUT, M. F., TOTIS, M., SIESS, M. H., MAGDALOU, J. & SUSCHETET, M. (1996B).** Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol.*, **114**, 19-27.
- CAO, G., SOFIC, E. & PRIOR, R. L. (1997).** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.*, **22**, 749-760.
- CHANDRA, J., SAMALI, A. & ORRENIUS, S. (2000).** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 323-333.
- CHENG, Z., RADOMINSKA-PANDYA, A. & TEPHLY, T. R. (1998).** Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8., *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **356**, 301-305.
- CHENG, Z., RADOMINSKA-PANDYA, A. & TEPHLY, T. R. (1999).** Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyl transferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1165-1170.
- CHOPRA, M. & THURNHAM, D. I. (1999).** Clinical nutrition and metabolism group symposium on 'nutrition and antioxidants': Antioxidants and lipoprotein metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, **58**, 663-671.
- CHOPRA, M., FRITZSIMONS, P. E. E., STRAIN, J. J., THURNHAM, D. I. & HOWARD, A. N. (2000).** Nonalcoholic wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations., *Clinical Chemistry*, **46:8**, 1162-1170.

CHOUDHURY, R., SRAI, S. K., DEBNAM, E. & RICE-EVANS, C. A. (1999). Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 278-286.

CIOLINO, H. P., DASCHNER, D. J. & YEH, G. C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that effect CYP1A1 transcription differentially., *Biochem.*, **340**, 715-722.

CLADWELL, J. (1980). Comparative aspects of detoxication in mammals. In: *Enzymatic basis of detoxication* (W. B. Jacoby, ed.), **1**, pp. 85-114, Academic Press Inc., New York.

COOK, N. C. & SAMMAN, S. (1996). Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76.

CRESPIY, V., MORAND, C., MANACH, C., BESSON, C., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen., *Am. J. Physiol.*, **277**, G120-126.

CRESPIY, V., MORAND, C., BESSON, C., MANACH, C., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats., *J. Nutr.*, **131**, 2109-2114.

CRESPIY, V., APRIKIAN, O., MORAND, C., BESSON, C., MANACH, C., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. (2002). Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J. Nutr.*, **132**, 3227-3230.

CROZIER, A., LEAN, M. E. J., McDONALD, M.S. & BLACK, C. (1997). Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 590-595.

CUNNINGHAM, B. D. M., THREADGILL, M. D., GROUNDWATER, P. W., DALE, I. L. & HICKMAN, J. A. (1992). Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases., *Anti-Cancer Drug Des.*, **7**, 365-384.

DAS, D. K. (1994). Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterisation. In: *Methods in Enzymology.*, **234**, pp. 410-420, Academic Press Inc., New York.

DA SILVA, E. L., PISKULA, M. K., YAMAMOTO, N., MOON, J-H. & TERAQ, J. (1998). Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma., *FEBS Lett.*, **430**, 405-408.

DA SILVA, E. L., ABBALLA, D. S. P. & TERAQ, J. (2000). Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalysed by mammalian 15-lipoxygenase. *Life*, **49**, 298-295.

DAY, A. J., DUPONT, M. S., RIDLEY, S., RHODES, M., RHODES, M. J. C., MORGAN, M. R. A. & WILLIAMSON, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Letts.*, **436**, 71-75.

DAY, A. J., CANADA, F. J., DIAZ, J. C., KROON, P. A., MELAUCHLAN, R., FAULDS, C. B., PLUMB, G. W., MORGAN, M. R. A. & WILLIAMSON, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase., *FEBS Letts.*, **468**, 166-170.

DAY, A.J., BAO, Y., MORGAN, M. R. & WILLIAMSON, G. (2000A). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity., *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 1234-1243.

DAY, A. J., MELLON, F., BARRON, D., SARRAZIN, G., MORGAN, M. R. A. & WILLIAMSON, G. (2001). Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin., *Free Rad. Res.*, **35**, 941-952.

DEL CASTILLO, J.R., ROBINSON, J.W.L. (1982). The simultaneous preparation of basolateral and brush border-vesicles from guinea pig intestinal epithelium and the determination of orientation of basolateral vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, **688**, 45-56.

DENG, HAITENG & VAN BERKEL, GARY J. (1998). Electrospray mass spectrometry and UV / Visible Spectrophotometry studies of aluminum (III)-Flavonoid Complexes. *J. Mass. Spectrom.*, **33**, 1080-1087.

DE VRIES, J. H. M., HOLLMAN, P. C. H., MEYBOOM, S., BUYSMAN, M. N. C. P., ZOCK, P. L., VAN STAVEREN, W. A. & KATAN, M. B. (1998). Plasma concentration and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake., *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 60-65.

DERENDORF & GARRETT (1987). Pharmakokinetik-Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie, Stuttgart: Wiss.Verl.-Ges.,pp. 15-17, 57, 65-68

DE VRIES, J. H. M., HOLLMAN, P. C. H., VAN AMERSFOORT, I., OLTHOF, M. R. & KATAN, M. B. (2001). Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men. *J. Nutr.*, **131**, 745-748.

DONOVAN, J. L., BELL, J. R., KASIM-KARAKAS, S., GERMAN, J. B., WALZEM, R. L., HANSEN, R. L. & WATERHOUSE, A. L. (1999). Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine., *J. Nutr.*, **129**, 1662-1668.

DUTHIE, G.G., DUTHIE, S.J., KYLE, J.A.M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, **13**, 79-106.

ERLUND, I. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur.J.Clin. Pharmacol.*, **56**; 545-553.

FELDMANN, E. B. (1997). How grapefruit juice potentiates drug bioavailability., *Nutr. Rev.*, **55**, 398-400.

FELGINES, C., TEXIER, O., MORAND, C., MANACH, C., SCALBERT, A., REGERAT, F. & REMESY, C. (2000). Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats., *Am. J. Physiol.*, **279**, G1148-1154.)

FERRALI, M., SIGNORINI, C., CACIOTTI, B., SUGHERINI, L., CICCOLI, L., GIACHETTI, D. & COMPORTI, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*, **416**, 123-129.

FERRIOLA, P. C., CODY, V. & MIDDLETON, E. (1989). Protein kinase C inhibition by plant flavonoids., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1617-1624.

FINKEL, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 248-253.

FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing., *Nature*, **408**, 239-245.

FORMACIA, J.V. & REGELSON, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.*, **33**, 1061-1080.

FRANKEL, E. N., KANNER, J., GERMAN, J. B., PARKS, E. & KINSELLA, J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine., *Lancet*, **341**, 454-457.

GALIJATOVIC, A., WALLE, U. K. & WALLE, T. (2000). Induction of UDP-Glucuronosyl-Transferase by the flavonoids chrysin and quercetin in CaCo-2 cells., *Pharmaceutical Research*, **17**, 21-26.

GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., GRATACAP, M. P., TULLIEZ, J., CHAP, H. & PAYRASTRE, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.*, **32**, 279-2886.

GEE, J. M., DUPONT, M. S., THODES, M. J. C. & JOHNSON, I. T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal Glucose transport pathway. *Free Rad. Biol. Med.*, **25**, 19-25.

GEE, J. M., DUPONT, M. S., DAY, A. J., PLUMB, G. W., WILLIAMSON, G. & JOHNSON, I. T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with hexose transport pathway. *J. Nutr.*, **130**, 2765-2771.

GELEIJNSE, J. M., LAUNER, L. J., HOFMAN, A., POLS, H. A. P. & WITTEMAN, J. C. M. (1999). Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. *Arch. Intern. Med.*, **159**, 2170-2174.

GELEIJNSE, J. M., LAUNER, L. J., van der Kuip, D. A. M., Hofman, A. & Witteman, J., C. M. (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study., *Am. J. Clin. Nutr.*, **75**, 880-886.

GRAEFE, EVA U., WITTIG, J., MUELLER, S., RIETHLING, A. K., UEHLEKE, B., DREWELow, B., PFORTE, H., JACOBASCH, G., DERENDORF, H. & VEIT, M. (2001). Pharamkokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, **41**; 492-499

GREY, K.F. (1995). Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis. *J. Nutr. Biochem.*, **6**, 206-236.

GUGLER, R., LESCHIK, M. & DENGLER, H. J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **9**, 229-234.

HALAIHEL, N., GERBAUD, D., VASSEUR, M. & ALVERADO, F. (1999). Heterogeneity of pig intestinal D-Glukose transpport systems. *Am. J. Physiol.*, **277**, C1130-C1141

HÄKKINEN, S. H., KÄRENLAMPI, S. O., HEINONEN, I. M., MYKKÄNEN, H. M., TÖRRÖNEN, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kämpferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2274-2279.

HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992., *Phytochemistry*, **55**, 481-504.

HEILMANN, J. & MERFORT, I. (1998A). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavoonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharmazie in unserer Zeit*, **27**, 58-65.

HEILMANN, J. & MERFORT, I. (1998B). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavoonoiden. II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit*, **27**, 173-183.

HERRMANN, K. (1988). On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **186**, 1-5, Springer-Verlag

HERRMANN, K. (1990). Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbsobstbau*, **32**, 32-37, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

HERRMANN, K. (1995). Flavone und Flavonole als wichtige Inhaltsstoffe von Gewürzen. *GORDIAN*, **6**, 104-107.

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, PETER C.H. & KATAN, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2379-2383.

HERTOG, M. G. L., HOLLMANN, P. C. H., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. (1993a). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, **20**, 21-29.

HERTOG, M. G. L., HOLLMANN, P. C. H. & VAN DE PUTTE, B. (1993b). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, 1242-1246.

HERTOG, M. G. L., FESKENS, E. J., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**, 1007-1011.

HERTOG, M. G. L., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B. S., TOSHIMA, H., FESKENS, E. J. M., HOLLMANN, P. C. H., KATAN, M. B. & KROMHOUT, D. (1995). Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.*, **155**, 381-386.

HERTOG, M. G. L., KATAN, M. B. (1998). Quercetin in foods, Cardiovascular disease, and cancer. In: *Flavonoids in Health and disease*, (Rice-Evans, C. A., Packer, L., eds.), (Kapitel 20), pp 447-467, Marcel Dekker, New York.

HIRAYAMA, B. A., LOO, D.D.F. & WRIGHT, E.M. (1994). Protons Drive Sugar Transport through the Na⁺/Glucose Cotransporter (SGLT₁). *J. of Biological Chemistry*, **269**, 21407-21410

HIRVONEN, T., PIETINEN, P., VIRTANEN, M., OVASKAINEN, M., HÄKKINEN, S., ALBANES, D. & VIRTAMO, J. (2001). Intake of Flavonols and Flavones and Risk of coronary heart disease in male smokers., *Epidemiology*, **12**, 62-67.

HOLLMAN, P. C. H., DE VRIES, J. H. M., VAN LEEUWEN, S. D., MENGELERS, M. J. B. & KATAN, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1276-1282.

HOLLMAN, P. C. H., VAN TRIJP, J. H. M., & BUYSMAN, M. N. C. P. (1996A). Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium., *Anal. Chem.*, **68**, 3511-3515.

HOLLMAN, P. C. H., HERTOG, M. G. L. & KATAN, M. B. (1996). Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease., *Bioactive Components of Food*, **24**, 785-789.

HOLLMAN, P. C. H., VAN TRIJP, J. M. P., BOYSMAN, M. N. C. P., V. D. GAAG, M. S., MENGELERS, M. J. B., DE VRIES, J. H. M. & KATAN, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, **418**, 152-156.

HOLLMAN, P. C. H. & KATAN, M. B. (1998). Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids. In: *Flavonoids in Health and Disease*, (Rice-Evans, C. A., Packer, L., eds.), (Kapitel 22), pp 483-522, Marcel Dekker, New York.

HOLLMAN, PETER C.H., BIJSMAN, MICHEL N.C.P., VAN GAMEREN, YVONNE, CNOSSEN, ELSE P.J., DE VRIES, JEANNE H.M., KATAN, MARTIJN B. (1999). The sugar moiety is a major Determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.*, **31**; 569-573.

HOLLMAN, P. CH. & ARTS, ILJA CW. (2000). Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1081-1093.

HOPFER, U. (1987). Membrane transport mechanisms for hexoses and amino acids in the small intestine. *Physiology of the gastrointestinal tract Johnson, L. R. Press, NY*, **2**, 1499-1526.

HOPFER, U., SIGRIST-NELSON, K. & GROSECLOSE, R. (1976). Jejunal and ileal D-Glucose transport in isolated brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 349-353.

IOKU, K., PONGPIRIYADACHA, Y, TAKEI, Y, NAKATANI, N. & TERAJO J. (1998). β -glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1428-1431.

ISHIGE, K., SCHUBERT, D. & SAGARA, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms., *Free Rad. Biol. Med.*, **30**, 433-446.

ISHIKAWA, Y. & KITAMURA, M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways., *Kidney Int.*, **58**, 1078-1087.

IZUMI, T., PISKULA, M. K., OSAWA, S., OBATA, A., TOBE, K., SAITO, M., KATAOKA, S., KUBOTA, Y. & KIKUCHI, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans., *J. Nutr.*, **130**, 1695-1699.

JACKSON, M. J., MCARDLE, A. & MCARDLE, F. (1998). Antioxidant micronutrients and gene expression. *Proceedings of the Nutrition Society*, **57**, 301-305.

JANNING, P., SCHUHMACHER, U. S., UPMEIER, A., DIEL, P., MICHNA, H., DEGEN, G. H. & BOLT, H. M. (2000). Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats., *Arch. Toxicol.*, **74**, 421-430.

JI, L. L. & LEICHTWEIS, S. (1997). Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*, **20**, 91-106.

JOVANOVIC, S. V., STEENKEN, S., HARA, Y. & SIMIC M. G: (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *J. Chem. Soc.*, **2**, 2497-2504.

JUSTESEN, U., ARRIGONI, E., LARSEN, B. R. & AMADO, R. (2000). Degradation of flavonoid glycosides and aglykonen during *in vitro* fermentation with human faecal flora., *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **33**, 424-430.

KANDASWAMI, C. & MIDDLETON, E. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **366**, 351-376.

KELI, S. O., HERTOOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M. & KROMHOUT, D. (1996). Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen study. *Arch. Intern. Med.*, **154**, 637-642

KESSLER, M., ACUTO, O., STORELLI, C., MURER, H., MÜLLER, M. & SEMENZA, G. (1978a). A modified procedure for rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 136-154.

KESSLER, M., TANNENBAUM, V. & TANNENBAUM, C. (1978b). A simple apparatus for performing short-time (1-2 seconds) uptake measurements in small volumes: ist application to D-Glukose transport studies in brush border membrane vesicles from rabbit jejunum and ileum. *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 348-359.

KHAN, A. U. & WILSON, T. (1995). Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. Biol.*, **2**, 437-445.

KIMMICH, G. A. & RANGLES, J. (1978). Phloretin-like action of bioflavonoids on sugar accumulation capability of isolated intestinal cells. *Membrane Biochemistry*, **1**, 221-237.

KNEER, R., POULEV, A. A., OLESINSKI, A. & RASKIN, I. (1999). Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L., *J. Exp. Botany*, **50**, 1553-1559.

KNEKT, P., JÄRVINEN, R., REUNANEN & A., MOATELA, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*, **312**, 478-481.

KNEKT, P., JÄRVINEN, R., SEPPÄNEN, R., HELIÖVAARE, M., TEPPONEN, L. PUKKALA, E & AROMAA, A. (1997). Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.*, **146**, 223-230.

KONG, A-T., YU, R., CHEN, C., MANDLEKAR, S. & PRIMIANO, T. (2000). Signal transduction events elicited by natural products, role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis., *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 1-16.

KONG, A. N. T., YU, R., HEBBAR, V., CHEN, C., OWUOR, E., HU, R., EE, R. & MANDLEKAR, S. (2001). Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds., *Mutation. Res.*, **480-481**, 231-241.

KROMHOUT, D. (1999). Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids*, **34**, 527-531.

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

KUHNLE, G., SPENCER, J. P. E., SCHROETER, H., SHENOY, B., DEBNAM, E. S., SRAI, S. K. S., RICE-EVANS, C. & HAHN, U. (2000). Epicatechin and Catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine., *Biochem. Biophysic. Res. Com.*, **277**, 507-512

LASTAO, M. P., HIRAYAMA, B. A., LOO, D. D. F. & WRIGHT, E. M. (1994). Phenylglucosides and the Na⁺/Glucose cotransporter (SGLT1): Analysis of interactions. *J. Membrane Biol.*, **142**, 161-170.

LI, Y. & HU, M. (2002). Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model., *DMD*, **30**, 370-377.

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

MANACH, C., MORAND, C., TEXIER, O., FAVIER, M.-L., AGULLO, G., DEMIGNÉ, C., RÉGÉRAT, F. & RÉMÉSY, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.*, **125**, 1911-1922.

MANACH, C., REGERAT, F., TEXIER, O., AGULLO, G., DEMIGNE, C. & REMESY, C. (1996a). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, **16**, 517-544.

MANACH, C., TEXIER, O., RÉGÉRAT, F., AGULLO, G., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. (1996b). Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 375-380.

MANACH, C., MORAND, C., DEMIGNE, C., TEXIER, O., REGERAT, F. & REMESY, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.*, **409**, 12-16.

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.

MANACH, C., TEXIER, O., MORAND, C., CRESPIY, V., RÉGÉRAT, F., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉSY, C. (1999). Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats., *Free Rad. Biol. Med.*, **27**, 1259-1266.

MCMAHON, L. G., NAKANO, H., LEVY, M.-D. & GREGORY III, J. F. (1997). Cytosolic pyridoxine- β -D-glucoside hydrolase from porcine jejunal mucosa. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32025-32033.

MIDDELTON, E. & KANDASWAMI, C. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implication for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. (Harborne, J. B., ed.), pp.619-652., Chapman and Hall, London.

MIDDELTON, E., KANDASWAMI, C. & THEOHARIDES, T. C. (2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-751.

MIURA, Y., CHIBA, T., MIURA, S., TOMITA, I., UMEGAKI, K. IKEDA, M. & TOMITA, T. (2000). Green tea polyphenols (flavan-3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoprotein: an ex vivo study in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 216-222.

MIYAZAWA, T., NAKAGAWA, K., KUDO, M., MURAISHI, K. & SOMEYA, K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1083-1091.

MIZUMA, T., OHTA, K. & AWAZU, S. (1994). The β -anomeric and Glukose preferences of Glukose transport carrier for intestinal active absorption on monosaccharude conjugates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 117-122.

MOON, J.-H., NAKATA, R., OSHIMA, S., INAKUMA, T. & TERAQ, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after short-term ingestion of onion by women., *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, **279**, R461-R467.

MORAND, C., CRESPI, V., MANACH, C., BESSON, C., DEMIGNÉ, C. & RÉMÉS, C. (1998). Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol.* **275**, R212-R219.

MORAND, C., MANACH, C., CRESPI, V. & REMES, C. (2000). Quercetin-3-O- β -Glucoside is better absorbed than other quercetin forms and it not present in rat plasma., *Free Rad. Res.*, **33**, 667-676.

MOVILEANU, L., NEAGOE, I., FLONTA, M. L. (2000) Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers., *Int. J. Pharm.*, **205**, 135-146.

MURAKAMI, S., MURAMATSU, M. & TOMISAWA, K. (1999). Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase by flavonoids: a stucture-activity study., *J. Enz. Inhib.*, **14**, 151-166.

MURER, H., BIBER, J., GMAJ, P. & STIEGER, B. (1984). Cellular Mechanisms in epithelial transport: Advantages and Disadvantages of studies with vesicles., *Molecular Physiology*, **6**, 55-82.

MUROTA, K., SHIMIZU, S., MIYAMOTO, S., IZUMI, T., OBATA, A., KIKUCI, M. & TERAO, J. (2002). Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2-cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids, *J. Nutr.*, **132**, 1956-1961.

NIELSEN, S. E., BREINHOLT, V., JUSTESEN, U., CORNETT, C. & DRAGSTED, L.O. (1998). In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes., *Xenobiotica*, **28**, 389-401.

OBERMEIER, M. T., WHITE, R. E. & YANG, C. S. (1995). Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities., *Xenobiotica*, **25**, 575-584.

OHNISHI, T., HIGASHI, S., MIZUMA, T. & AWAZU, S. (1998). Transport mechanisms of a glycoside, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, across rat small intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1370**, 192-198.

OLIVEIRA, E. J. & WATSON, D. G. (2000). In vitro glucuronidation of Kämpferol and Quercetin by human UGT-1A9 microsomes., *FEBS Lett.*, **471**, 1-6.

OLIVEIRA, E. J., WATSON, D. G. & GRANT, M. H. (2002). Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma., *Xenobiotica*, **32**, 279-287.

OLTHOF, M. R., HOLLMAN, P. C. H., VREE, T.B. & KATAN, M. B. (2000). Bioavailabilities of Quercetin-3-Glukoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.*, **130**, 1200-1203.

PAGANGA, G. & RICE-EVANS, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, **401**, 78-82.

PANNALA, A. S., CHAN, T. S., O'BRIEN, P. J. & RICE-EVANS, C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 1161-1168.

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

PISKULA, M. K. & TERAO, J. (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues., *J. Nutr.*, **128**, 1172-1178.

PRICE, K.R., BACON, J.R. & RHODES, M. J. C. (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 938-942

- RAAB, W., SCHARRER, E. (1980).** Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase der Dünndarmmukosa bei fettreicher Ernährung. *Z. Ernährungswiss.*, **19**, 276-279
- RIMBACH, G., GOHIL, K., MATSUGO, S., MOINI, H., SALIOU, C., VIRGILI, F., WEBER, S. U. & PACKER, L. (2001).** Induction of glutathione synthesis in human keratinocytes by ginkgo biloba extract (Egb761)., *BioFactors*, **15**, 39-52.
- RIMM, E. B., KATAN, M. B., ASCHERIO, A., STAMPFER M.J. & WILLETT, W.C. (1996).** Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals., *Ann. Intern. Med.*, **125**, 384-389.
- RUCKSTUHL, M. & LANDRY, Y. (1981).** Inhibition of lung cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases by flavonoids and other chromone-like compounds., *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 697-702.
- SACHS, L. (1999),** Angewandte Statistik- Anwendung statistischer Methoden, 9. überarbeitete Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- SAHU, S. C. & GRAY, G. C. (1997).** Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Fd. Chem. Toxic.*, **35**, 443-447.
- SAIJA, A., SCALESE, M., LANZA, M., MARZULLO, D., BONINA, F. & CASTELLE, F. (1995).** Flavonoids as antioxidants agents: Importance of their interaction with biomembranes., *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 481-486.
- SALUNKHE, D. K., CHAVAN, J. K. & KADAM, S. S. (1990).** Plant phenolics: structure, classification, and biosynthesis. In: *Dietary Tannins: Consequences and Remedies* (Kapitel 2), (Salunkhe, D. K., ed.), pp.469-482, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.*, **130**, 2073S-2085S
- SCHNEIDER, H., SCHWIERTZ, A., COLLINS, M. D. & BLAUT, M. (1999).** Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from human intestinal tract., *Arch. Microbiol.*, **171**, 81-91.
- SCHRADER, K., BUCHHEIM, W. & MORR, C. V. (1997).** High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung*, **41**, 133-138.
- SEN, C. K. & PACKER, L. (1996).** Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, **10**, 709-720.
- SESINK, A. L. A., O'LEARY, K. A. & HOLLMAN, P. C. H. (2002)** Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of Quercetin-3-Glukoside or quercetin-4'-glucoside., *J. Nutr.*, **131**, 1938-1941.

SETCHELL, K., BROWN, N., ZIMMER-NECHEMIAS, L., BRASHEAR, W. T., WOLFE, B. E., KIRSCHNER, A. S. & HEUBI, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides metabolism for bioavailability., *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 447-453.

SFAKIANOS, J., COWARD, L., CIRK, M. & BARNES, S. (1997). Intestinal uptake and biliary secretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, **127**, 1260-1268.

SHALI, N. A., CURTIS, C. G., POWELL, G. M. & ROY, A. B. (1991). Sulphation of the flavonoids quercetin and catechin by rat liver., *Xenobiotica*, **21**, 881-893.

SHIMOI, K., OKADA, H., FURUGORI, M., GODA, T., TAKASE, S., SUZUKI, M., HARA, Y., YAMAMOTO, H. & KINAE, N. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin-7-O- β -glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.*, **438**, 220-224.

SHIRLEY, B. W. (1998). Flavonoid biosynthesis: 'new' function for an old pathway., *Trends Plant Sci.*, **1**, 377-382.

SKIBOLA, C. F. & SMITH, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake., *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 375-383.

SPENCER, J. P. E., CHOWRIMOOTOO, G., CHOUDHURY, R., DEBNAM, E. S., SRAI, S. K. & RICE-EVANS, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.*, **458**, 224-230.

STEENSMA, A., NOTEBORN, H. P. J. M., VAN DER JAGT, R. C. M., POLMAN, T. H. G., MENGELERS, M. J. B. & KUIPER, H. A. (1999). Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environm. Toxicol. Pharmacol.*, **7**, 209-212.

STEVENS, C: E. (1988) General characteristics of the digestive system. *In: Comparative physiology of the vertebrate digestive system.* (Stevens, C. E., ed.) Cambridge: Cambridge University Press: 1-21.

STEVENS, B. R. (1982). Organic and inorganic solute transport in renal and intestinal membrane vesicles preserved in liquid nitrogen. *Membran Biochem.*, **4**; 271-282.

STIEGER, B., MURER, H. (1983). Heterogeneity of brush border membrane-vesicles from rat small intestine prepared by precipitation method using Mg/EGTA. *Eur. J. Biochem.*, **135**, 95-101.

TERAO, J., YAMAGUCHI, S., SHIRAI, M., MIYOSHI, M., MOON, J-H., OSHIMMA, S., INAKUMA, T., TSUSHIDA, T. & KATO, Y. (2001). Protection by quercetin and quercetin-3-O- β -D-Glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein., *Free Rad. Res.*, **35**, 925-931.

TSUDA, T. HORIO, F. & OSAWA, T. (1999). Absorption and metabolism of cyanidin-3-O- β -glucoside in rats. *FEBS Lett.*, **449**, 179-182.

UENO, I., NAKANO, N. & HIRONO, I. (1983). Metabolic fate of ¹⁴C quercetin in the ACI rat. *Jpn. J. Exp. Med.*, **53**: 41-50.

UMAROWA, F. T., KHUSHBACTOVA, Z. A., BATIROV, E. H. & MEKLER, V. M. (1998). Inhibition of Na⁺ K⁺-ATPase by flavonoids and their positive inotropic effect. Investigation of the structure-activity relationship., *Biol. Membrany.*, **15**, 24-35.

VAN ACKER, S. A. B. E., VAN DEN BERG, D. J., TROMP, M. N. J. L., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W. P., VAN DER VIJGH, W. J. F. & BAST, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids., *Free Rad. Biol. Med.*, **20**, 331-342.

VAN DIJK, C., DRIESSEN, A. J. M. & RECOURT, K. (2000) The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles., *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1593-1600.

WALGREN, R. A., WALLE, U. K. & WALLE, T. (1998). Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1721-1727.

WALGREN, R. A., KARNAKY, K. J., LINDENMAYER, G.E. & WALLE, T. (2000a). Efflux of dietary flavonoid quercetin-4'-β-glucoside across human intestinal CaCo-2-cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 830-836.

WALGREN, R.A., LIN, J.T., KINNE, R. K. H. & WALLE, T. (2000b). Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-β-glucoside by sodium-depent Glukose transporter SGLT1., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 837-843.

WALLE, U. K., FRENCH, K. L., WALGREN, R. A. & WALLE, T.(1999). Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal CaCo-2 cells: Potential role for MRP2., *Res. Commun. Molecul. Pathol. Pharm.*, **103**, 45-56.

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

WELTON, A. F., HURLEY, J. & WILL, P. (1988). Flavonoids and arachidonic acid metabolism., *Prog. Clin. Biol. Res.*, **280**, 301-312.

WILLIAMS, C. A. & HARBORNE, J.B. (1994). In: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* (Harborne, J.B., ed), pp 337-385, Chapman and Hall, London, GB.

WISEMAN, S. A., BALENTINE, D. A. & FREI, B. (1997). Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 705-718.

WOLFFRAM, S., GIERING, H & SCHARRER, E. (1984). Na⁺-gradient dependence of basic amino acid Transport into rat intestinal brush border vesicles. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78A**, 475-480.

WOLFFRAM, S., EGGENBERGER E., & SCHARRER, E. (1986). Kinetics of D-Glukose and L-Leucin transport into sheep and pig intestinal brush border membrane vesicles. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84A**, 589-593.

WOLFFRAM, S., BLÖCK, M., ADER, P. (2002). Quercetin-3-Glukoside is transported by the Glukose Carrier SGLT₁ across the Brush Border Membran of Rat Small Intestine. *J. Nutr.*, **132**; 630-635.

YOCHUM, L., KUSHI, L. W., MEYER, K. & FOLSOM, A. R. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.*, **149**, 943-949.

YOSHIZUMI, M., TSUCHIYA, K., SUZAKI, Y., KIRIMA, K., KYAW, M., MOON, J-H., TERAO, J. & TAMAKI, T. (2002). Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **293**, 1458-1465.

YOUDIM, K. A., SPENCER, J. P. E., SCHROETER, H. & RICE-EVANS, C. (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol. Chem.*, **383**, 503-519.

ZHU, B. T., EZELL, E. L. & LIEHR, J.G. (1994). Catechol-O-methyltransferase-catalysed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. *J. Biol. Chem.*, **1**, 292-299.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. S. Wolffram für die Überlassung des Themas und für seine unter allen Umständen währende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Herzlichen Dank insbesondere für die ausgezeichnete Betreuung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche sowie für die zu jeder Zeit gewährte Hilfe, Anregung und Diskussionsbereitschaft.

Ein Dankeschön an Maike Jürgensen und Petra Schulz für die vielen geleisteten Arbeitsstunden im Labor während der Analyse der Plasmaproben und den Enzymbestimmungen. Es hat mir immer viel Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten!

Für die Einarbeitung in das Thema meiner Arbeit und die Mithilfe bei der Durchführung des ersten Schweineversuches danke ich Herrn Dr. Peter Ader.

Herrn Dr. Rainer Cermak möchte ich für zahlreiche Anregungen, die Unterstützung bei der Literatursuche und besonders für die Zusammenarbeit bei der Durchführung des zweiten Schweineversuches danken.

Ein Dankeschön an Clemens Benthin und alle Hiwis für die Mithilfe im Stall.

Mein Dank gilt auch Herr Prof. Dr. E. Scharrer für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Zürich und besonders Beat Grenacher für seine tatkräftige Unterstützung bei der Präparation der Bürstensaummembranvesikel.

Schlachter Habermann in Preetz möchte ich für das zur Verfügung stellen von Schweinedärmen für die Bürstensaummembranpräparationen danken.

Frau Dr.-ing. Karin Schrader am Bundesinstitut für Milchforschung danke ich für die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Bürstensaummembranvesikel.

Außerdem möchte ich ganz herzlich allen Mitarbeitern des Instituts für die nette Atmosphäre danken. Ich habe mich von Anfang an sehr wohlfühlt und werde immer gern an meine Doktorandenzeit zurück denken! Danke Kathrin, dass du mir gezeigt hast, dass „Schweinezähmen“ gar nicht so schwer ist!

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für alles, was sie während der Zeit meines Studiums und darüber hinaus für mich und insbesondere in der letzten Zeit für uns drei getan haben.

Für die Unterstützung und den Rückhalt geht mein besonderer Dank an Rüdiger, der mir immer hilfreich zur Seite stand. Vielen Dank für's Rückenfreihalten, Rüdiger!

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (WO 763/2-1) gefördert.

Lebenslauf

Sandra Landgraf, geboren am 25.09.1974 in Rendsburg, als Tochter von Dr. med Axel Michaelsen und Elke Michaelsen, geb. Wittmaack

<u>Familienstand:</u>	verheiratet mit Rüdiger Landgraf, eine Tochter
<u>Schulen:</u>	
1981-1985	Grundschule in Büdelsdorf
1985-1994	Gymnasium in Rendsburg
Juni 1994	Abitur
<u>Studium und Beruf:</u>	
1994-1998	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1996	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1998	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1998-April 1999	Praktikum in einer Apotheke
Mai 1999-Oktober 1999	Praktikum in der Pharmazeutischen Industrie (Boehringer Ingelheim GmbH/Mainz)
November 1999	Praktikum in einer Apotheke
Dezember 1999	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2000	Erhalt der Approbation als Apothekerin
Februar 2000-Juni 2000	Auslandspraktikum in der Pharmazeutischen Industrie in Schweden (AstraZeneca AB/Lund)
Juli 2000-September 2000	Anstellung als Apothekerin in einer Apotheke
Oktober 2000- November 2002	Doktorandin am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dezember 2002-Februar 2003	Anstellung als Apothekerin in einer Apotheke
21. März 2003	Geburt von Lisa Landgraf
seit Juni 2003	Anstellung als Apothekerin in einer Apotheke

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die der benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe, sowie die Dissertation noch keiner anderen Fakultät vorgelegt habe.

Sandra Landgraf

Kiel, 28. August 2003