

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler  
(Direktor: Prof. Dr. Edmund Maser)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**WIRKUNG VON AUSGEWÄHLTEN PFLANZLICHEN  
POLYPHENOLEN AUF DIE PEROXID-INDUZIERTE RADI-  
KALBILDUNG IN C6-ASTROGLIOMAZELLEN**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel**

**vorgelegt von  
ANIKA ANKER  
aus Ratzeburg**

**Kiel 2010**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edmund Maser, Toxikologie**  
**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Kaatsch, Rechtsmedizin**  
**Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2010**  
**Zum Druck genehmigt: Kiel, den 21.09.2010**

**gez.: Prof. Dr. Herdegen, Institut für Pharmakologie**  
**(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	
2.1.1	C6-Astrogliazellen	6
2.1.1.1	Herkunft und Lagerung	6
2.1.1.2	Kultivierung	6
2.1.1.3	Aufbereitung der Zellen für die Versuche	7
2.1.2	Nährmedien und Pufferlösungen	8
2.1.2.1	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	8
2.1.2.2	PBS-Puffer (Phosphate buffered saline nach Dulbecco)	8
2.1.2.3	Hanks-Puffer	8
2.1.3	Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein)	9
2.1.4	CHP (Cumolhydroperoxid)	10
2.1.5	Polyphenole	10
2.1.6	Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry	11
2.1.7	Messgeräte	11
2.1.8	Sonstige Materialien	13
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	
2.2.1	Proteinbestimmung nach Lowry	14
2.2.2	Messung der Radikalbildung	16
2.2.2.1	Versuche zur Wirkung von CHP	17
2.2.2.2	Versuche zur antioxidativen Wirkung der Polyphenole	18
2.2.2.3	Versuche zur prooxidativen Wirkung der Polyphenole	19
2.2.2.4	Versuche zur antioxidativen Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol	20
<b>2.3</b>	<b>Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>3.1</b>	<b>Zytotoxizität von Cumolhydroperoxid</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Auslösung von oxidativem Stress durch CHP</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Wirkung von Polyphenolen auf die Radikalbildung</b>	<b>25</b>
3.3.1	Quercetin	26
3.3.2	Luteolin	27
3.3.3	Galangin	28
3.3.4	Kaempferol	29
3.3.5	Taxifolin	30
3.3.6	Genistein	31
3.3.7	Resveratrol	32
3.3.8	Vergleich der antioxidativen Wirkung der Polyphenole	33
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung der Polyphenole auf prooxidative Effekte</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Antioxidative Wirkung von <math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	<b>40</b>

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	46
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	48
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	53
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	54

### **Abkürzungen:**

CHP	Cumolhydroperoxid
DCFH-DA	2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC/IC <sub>50</sub>	Konzentration einer Substanz, die zu einer Reduktion des betrachteten Messparameters um 50% gegenüber der Kontrollgruppe führt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales Rinderserum
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	reactive oxygen species
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity

# 1. Einleitung

Pflanzliche Polyphenole, wie z.B. die Flavonoide und Hydroxystilbene, bieten ein breites Spektrum an biologischen Wirkungen. Viele von diesen sind wegen ihres positiven Einflusses auf die Gesundheit des Menschen Gegenstand der Forschung. Den Polyphenolen werden unter anderem Tumorsuppression, neuroprotektive sowie kardioprotektive Wirkung und antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen (Ishige et al., 2001; Klein and King, 2007; Sonee et al., 2004; Sun et al., 2002; Ulrich et al., 2005). Baur und Sinclair (2006) haben herausgefunden, dass das Hydroxystilben Resveratrol, welches immer wieder im Zusammenhang mit dem „French Paradoxon“ genannt wird, in der Lage ist, die Lebenserwartung von diversen Spezies zu erhöhen. Resveratrol ist zusätzlich in der Lage, antikarzinogen zu wirken, sowie das Ausmaß der Schädigung bei kardialer Ischämie zu mindern (Murias et al., 2005).

Viele der positiven Eigenschaften von Polyphenolen scheinen im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur antioxidativen Wirksamkeit zu stehen (Cotelle, 2001). Und tatsächlich haben einige der Polyphenole in diversen Studien gezeigt, dass sie als sogenannte „Radikalfänger“ in der Lage sind oxidativem Stress entgegenzuwirken. Dieses ist oft in zellfreien Testsystemen untersucht worden (Rice-Evans et al., 1997). Ein positives Ergebnis aus solchen Studien bedeutet jedoch nicht ohne Weiteres, dass auch in intakten Zellen *in vitro*, oder gar *in vivo*, ein antioxidativer Effekt durch Polyphenole erzielt werden kann. Es hat sich sogar gezeigt, dass Polyphenole sowohl als Antioxidantien als auch als „Prooxidantien“ wirken, also selbst in der Lage sein können, oxidativen Stress auszulösen (Sakihama et al., 2002).

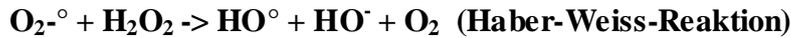
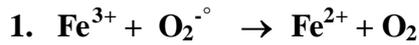
Die in dieser Arbeit untersuchten Polyphenole wurden ausgewählt nach den Kriterien der Verfügbarkeit von Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Values (Ishige et al., 2001), sowie ihrer Fähigkeit, die Zellen vor Peroxid-induziertem Zelltod zu bewahren, also zytoprotektiv wirksam zu sein. Dieses ist in dieser Arbeit vorangegangenen Studien untersucht worden (Zielinska et al., 2003) bzw. der Literatur entnommen (Hanneken et al., 2006).

So wurden die Flavonoide Quercetin, Galangin, Luteolin, Kaempferol, Taxifolin, Genistein, und das Hydroxystilben Resveratrol untersucht. Diese Polyphenole wirken über verschiedene Mechanismen antioxidativ. Sie unterdrücken die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Hemmung von Enzymen, wirken als Chelatbildner oder fangen Radikale ab, das sogenannte „scavenging“ (Cotelle, N., 2001). Das Isoflavon Genistein, teilweise auch als „Phytoöstrogen“ bezeichnet, wird unter anderem erfolgreich bei postmenopausalen Beschwerden eingesetzt (D'Anna R. et al., 2007) oder zur Osteoporose-Prophylaxe (Zhang G. et al., 2007).

Des Weiteren wurde die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol, der biologisch wirksamsten Komponente des Vitamin E, geprüft. Vitamin E ist der Oberbegriff für eine Gruppe biologisch aktiver Komponenten, zu denen Tocopherole und Tocotrienole zählen. Das in dieser Arbeit neben den Polyphenolen untersuchte  $\alpha$ -Tocopherol ist die unter den Tocopherolen vorherrschende Substanz im Zytoplasma und spielt eine bedeutende Rolle als Antioxidanz zum Schutz von Lipoproteinen (Spencer A.P. et al., 1999). Es kann sich in Membranen einlagern und dort die Lipidperoxidation hemmen (Esterbauer et al., 1991).

„Oxidativer Stress“ ist definiert als ein Überwiegen der Radikalwirkung gegenüber den zellulären Schutzmechanismen (Halliwell B. und Gutteridge J.M.C., 1999). Um als „Antioxidanz“ bezeichnet zu werden, muss eine Substanz mehrere Kriterien erfüllen: Sie muss verglichen mit einem eingesetzten Oxidanz in relativ niedrigeren Konzentrationen vorliegen und die Oxidation dann verhindern oder zumindest hemmen (Halliwell B. et al., 1990). Weiterhin muss das aus der Reaktion hervorgehende Radikal stabil sein (Shahidi, F. et al., 1992). Die sogenannten Radikale, nämlich reaktive Sauerstoffspezies, z.B. das Superoxidradikalanion und das Hydroxylradikal, entstehen bei der schrittweisen Reduktion des Sauerstoffmoleküls. Diese fallen im Stoffwechsel bei diversen Prozessen wie z.B. Autooxidationsvorgängen, in der Atmungskette oder bei der Erregerabwehr durch Granulozyten an (Schweda, 2004). Manche ROS, z.B. das Superoxidradikalanion oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sind für sich noch vergleichsweise stabil, d.h. reaktionsträge, jedoch können sie theoretisch mittels Übergangsreaktionen mit allen Molekülen reagieren und diese dann selbst zu Radikalen werden lassen. Daraufhin erfahren diese eine strukturelle bzw. funktionelle Änderung, die auch deren Wirkungsverlust oder zumindest eine Wirkungsänderung bedingen kann. So kann es intrazellulär z.B. bei Interaktion mit Proteinen zu Strukturänderungen von Enzymen oder Rezeptoren kommen, bei Reaktion mit der DNA kann die Bindung der Radikale an die Nukleobasen zu Strangbrüchen und Fehlpaarungen führen. Auch an den Zellmembranen zeigt sich die Folge oxidativen Stresses: Membranphospholipide werden geschädigt, die Folge ist die Lipidperoxidation, die zum Zelltod führt. Doch nicht nur die Zellmembran wird durch diesen Pathomechanismus zerstört, auch andere intrazelluläre Organellen und ihre Membranen werden durch Lipidperoxidation geschädigt, z.B. die an den Mitochondrienmembranen lokalisierte Atmungskette (Schweda, 2004).

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit der ROS ist die Reaktion mit Übergangsmetallionen. Haber und Weiss (1934) beschrieben die Reaktion von Superoxidradikalanion und Wasserstoffperoxid mit Übergangsmetallionen (z.B.  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ), in welcher schließlich die reaktiven Hydroxylradikale entstehen.



Es existieren intrazelluläre Mechanismen, um oxidativem Stress vorzubeugen bzw. diesen abzuwehren. Dazu gehören enzymatische (Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase) und nicht-enzymatische Radikalfänger, wie z.B. das Glutathion, Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotin und Harnsäure (Schweda, 2004).

Um oxidativen Stress auszulösen, wurden die C6-Zellen in dieser Arbeit mit Cumolhydroperoxid (CHP) behandelt. CHP ist ein organisches Hydroperoxid, das unter anderem Lipidperoxidation auslöst (Schweda, 2004). Es wird in Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen in der Fenton-Reaktion in das Alkoxyradikal umgewandelt, das ähnlich wie das aus Wasserstoffperoxid entstehende Hydroxylradikal mit zellulären Makromolekülen reagieren kann (Cohen, G., 1985). Es wirkt vermutlich aufgrund seiner Lipophilie vorwiegend an biologischen Membranen (Vroegrop, 1995). Es löst wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  ATP-Mangel und Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration aus, wird jedoch anders als dieses nicht über die Katalase, sondern enzymatisch nur über die Glutathionperoxidase abgebaut (Starke, P.E., Faber, J.L., 1985; Dringen, R. et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob und in welcher Konzentration Polyphenole in der Lage sind, Zellen vor oxidativem Stress zu schützen und somit antioxidativ wirksam zu sein, und zusätzlich, ob sie selbst in Zellen oxidativen Stress auslösen und somit prooxidativ wirksam werden können. Zur Quantifizierung der Radikalbildung dienten Fluoreszenzmessungen mit dem Farbstoff Dichlorodihydrofluoresceindiacetat.

Folgende Punkte sollten im Einzelnen untersucht werden:

- 1.) Der Einfluß der Konzentration des Peroxids auf die Radikalbildung,
- 2.) ihre Zeitabhängigkeit,
- 3.) eine mögliche Schutzfunktion der ausgewählten Polyphenole gegenüber oxidativem Stress -> antioxidative Funktion,
- 4.) prooxidative Wirkungen der Polyphenole,
- 5.) und die antioxidative Wirkung von Alpha-Tocopherol.

## 2.1. Material

### 2.1.1. C6-Astrogliazellen

#### 2.1.1.1. Herkunft und Lagerung

Für die Versuche wurden C6-Astrogliazellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem primären Rattenhirntumor stammt, der ursprünglich durch N-Nitrosomethylharnstoff induziert worden war (Vernadakis und Nidess, 1976).

Von Benda et al. (1968) etabliert, wurden die Zellen von der American Typ Culture Collection (ATCC:CCL 107) am 12.10.1999 in der 37. Passage bezogen. Anschließend erfolgte eine dreimalige Passage, seitdem werden die Zellen in Flüssigstickstoff gelagert. Nach ca. 15 Passagen wird jeweils eine neue Stammreihe aufgetaut. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 45-55 verwendet.

#### 2.1.1.2. Kultivierung

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

So wurde stets unter einer Laminair Air Flow Werkbank der Reinraumklasse A gearbeitet.

Die Glaspipetten, -kolben etc. wurden nach Gebrauch gespült, desinfiziert, und dann bei 180°C für jeweils 4 Stunden heißluftsterilisiert. Kunststoffmaterial (auch Einmalmaterial) wie Pipettenspitzen, Pipettierhilfen, Lösungsschalen etc. wurde bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Sämtliche Medien und Pufferlösungen sind nach der Herstellung stets steril filtriert worden. Die Erhaltungskulturen und auch die vorbereiteten Versuchsplatten wurden regelmäßig unter einem Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet, um Kontaminationen zu erkennen. Die Zellen wurden in serumhaltigem Erhaltungsmedium in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Firma Sarstedt) bei 37°C in einem Brutschrank kultiviert, der mit 10% CO<sub>2</sub> begast wurde.

Einmal pro Woche wurde passagiert. Hierfür wurden zunächst der PBS-Puffer, sowie das serumhaltige Versuchsmedium im 37°C-Wasserbad aufgewärmt. Die Zellen wurden dann mit PBS-Puffer (5 ml/ Flasche) gespült, danach mit einer 1:10 verdünnten Trypsin-PBS-Pufferlösung versehen, die für nur ca. 30 sek. belassen, dann abgesaugt wurde. Anschließend wurde die Flasche für ca. 5 Minuten in den Brutschrank zurückgestellt, um dem Zellrasen ausreichend Zeit zu geben, sich vom Flaschenboden abzulösen. Nun wurde pro Flasche 5 ml angewärmtes Erhaltungsmedium hinzugefügt, und mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um die Zellsuspension gründlich zu durchmischen und alle Zellen aufzunehmen. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem sterilen Röhrchen auf Eis gelagert.

Daraufhin folgte die Zellzählung in einer Thomae-Zählkammer unter Zuhilfenahme des Farbstoffes Trypanblau (0,2 %, 1:2-Verdünnung, Firma Merck) zur Unterscheidung abgestorbener von intakten Zellen unter dem Lichtmikroskop.

Für die Erhaltungskulturen wurden jeweils 250.000 Zellen in 7 ml Medium pro Flasche ausgesät, für die Versuche 40.000 Zellen/Well der 96-Well-Versuchsplatten.

Die Erhaltungskulturen wurden jeden 2. Tag „gefüttert“, d.h. das alte gegen 7 ml frisches Medium ausgetauscht.

### **2.1.1.3. Aufbereitung der Zellen für die Versuche**

Sowohl für die Proteinbestimmungen als auch für die Fluoreszenzmessungen wurden die 96-Well-Platten jeweils am Vortag des eigentlichen Versuchs mit Zellen beschickt, so dass diese genügend Zeit zum Anwachsen hatten. Dies geschah folgendermaßen:

Bei der oben beschriebenen Passage wurden aus der auf Eis gelagerten Zellsuspension entsprechend viele Zellen entnommen, um pro Well der 96-Well-Platten („black-wall-flat-clear-bottom“ der Firma Corning „Cell Bind“-> nur bei den Fluoreszenzmessungen; bei den Proteinbestimmungen wurden komplett durchsichtige Platten der Firma Falcon verwendet) 40.000 Zellen in 200 µl Medium/Well auszusähen.

Es wurden zudem immer 12 Wells als Leerwert (Blanks) belassen, d.h. mit DMEM-Medium *ohne* Zellen befüllt. Es wurde für die Fluoreszenz-Versuche nur Medium ohne den Farbstoff Phenolrot verwendet, um Störungen der Messungen zu vermeiden.

Die Platten wurden dann 24 Stunden zum Inkubieren in den Brutschrank gestellt.

An den Fluorimetrie-Versuchstagen selbst war gründliches Spülen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wichtig, um Interaktion zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und dem fetalen Rinderserum (enthält Esterasen, die möglicherweise mit DCF zu weniger zellpermeablem nicht-deesterifiziertem DCF reagieren könnten) zu vermeiden (Halliwell&Whiteman, 2004).

## 2.1.2 Nährmedien und Pufferlösungen

### 2.1.2.1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Firma: c.c.pro, Bestellnr.: PM-25-S, phenolrothaltig (bzw. phenolrotfrei, dann versetzt mit zusätzlich 4,5 g/l Glucose, sowie 20 ml 200 mM Glutamin), jeweils versetzt mit 4,766 g HEPES-Puffer und 3,7 g NaHCO<sub>3</sub>.

Dieses Grundmedium wurde in Ultra-Pure-H<sub>2</sub>O gelöst, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, zu 500 ml steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Als Erhaltungsmedium wurde es zusätzlich versetzt mit 5% Fetalem Rinderserum (FBS), 1% Gentamycin und 0,5% Fungizone.

### 2.1.2.2. PBS-Puffer (Phosphate buffered saline nach Dulbecco)

a) NaCl: 8000 mg/l

KCl: 200 mg/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1150 mg/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 200 mg/l

b) MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O: 100 mg/l

CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O: 132 mg/l

Der Puffer mit Ca/Mg (a)+b)) wurde nur zur Proteinbestimmung gebraucht, die Pufferlösung a) zur Passagierung/Trypsinisierung. Sie wurden jeweils in Aqua-ultra-pure angesetzt und steril filtriert.

### 2.1.2.3. Hanks-Puffer

CaCl<sub>2</sub>: 185 mg/l

KCl: 400 mg/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 60 mg/l

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O: 100 mg/l

MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O: 100 mg/l

NaCl: 8000 mg/l

NaHCO<sub>3</sub>: 350 mg/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 48 mg/l

Glucose: 1000 mg/l

Der Hanks-Puffer wurde am Versuchstag selbst benötigt für die Spülvorgänge zwischen den einzelnen Arbeitsschritten bei den fluorimetrischen Messungen, zur Herstellung der Verdünnungsreihen der Peroxidkonzentrationen und Antioxidantien, sowie der 10 µM Gebrauchslösung des Fluoreszenzfarbstoffes.

### 2.1.3. Fluoreszenzfarbstoff

#### 2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA)

(Firma Sigma, Minimum 97%, gelagert bei -20°C/ Inertgas, CAS 2044-85-1)

Es wurde ein Farbstoff verwendet, der in lebenden Zellen Radikalbildung anzeigt. DCFH-DA ist ein sensibler, aber unspezifischer Marker für viele Formen von reaktiven Sauerstoffspezies (Tarpey et al., 2004).

Es ist in der Lage die Zellmembran zu durchdringen und wird dann dort durch intrazelluläre Esterasen zu DCF-H hydrolysiert. Dieses ist negativ geladen und verbleibt somit intrazellulär. Trifft es nun auf reaktive Sauerstoffspezies, so wird das DCFH rasch zu dem fluoreszierenden DCF oxidiert (Royall and Ischiropoulos, 1993; Duranteau et al., 1998).

Quantifiziert wird dies durch Messung in einem Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

Da DCF-DA im Zytosol akkumuliert wird, empfiehlt es sich, Zellen nur mit kleinen Konzentrationen, etwa 1-10 µM für max. 45-60 min. zu beladen, um zytotoxische Effekte zu vermeiden. Des Weiteren wurden die Zellen nach dem Beladen gründlich gewaschen, um nicht-reagiertes DCF-DA wieder herauszuspülen. In geringen Mengen können DCF und DCFH selbst aus der Zelle herausdiffundieren (Halliwell&Whiteman, 2004).

Für die Fluoreszenzmessungen hatte sich in Vorversuchen eine Konzentration von 10 µM als optimal für das Aufladen der Zellen erwiesen. Hierfür wurde zunächst eine 5 mM Stammlösung hergestellt. Dafür wurden 12,183 mg der Trockensubstanz in 5 ml DMSO eingewogen und anschließend 1:500 (Endkonzentration DMSO 0,2%) verdünnt. Die DCFH-DA-Trockensubstanz musste bei -18°C gelagert werden und nach Öffnen des Behälters war es wichtig, ihn vor dem Verschließen mit Stickstoff zu begasen (ansonsten Zerfall unter Reaktion mit Sauerstoff).

#### 2.1.4. Cumolhydroperoxid (CHP)

(88% Luperox® CU9, Firma Aldrich, Lagerung bei +2- +8°C)

Die CHP-Gebrauchslösung wurde jeweils am Versuchstag frisch angesetzt. Hierfür wurde jeweils eine 10 mM-Stammlösung (17,3 µl 88% CHP in 10 ml Medium bzw. PBS) hergestellt, aus der dann eine Verdünnungsreihe mit den jeweils benötigten Konzentrationen berechnet und entsprechend pipettiert werden konnte.

#### 2.1.5. Polyphenole („Antioxidantien“)

2.1.5.1. Resveratrol: Firma Sigma, approx. 99 % GC

2.1.5.2. Quercetin: =3',3'',4',5,7-Pentahydroxyflavon-dihydrat, Firma Sigma

2.1.5.3. Kaempferol:=3,5,7-Trihydroxy-2-[4-hydroxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one,  
Firma Sigma, Minimum 90 %

2.1.5.4. Taxifolin: Minimum 85 %, Firma Sigma

2.1.5.5. Luteolin: Firma Sigma

2.1.5.6. Galangin: Firma Aldrich

2.1.5.7. Genistein: Minimum 98 % HPLC, Firma Sigma

2.1.5.8. Alpha-Tocopherol: =Vitamin E, Firma Calbiochem, GC 100,2 %

Alle Polyphenole, der Fluoreszenzfarbstoff, sowie das Tocopherol wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO)/ Firma Merck gelöst.

Es wurde eine 1:500-Verdünnung der Stammlösung verwendet, so dass in den Gebrauchslösungen eine 0,2% ige DMSO-Endkonzentration vorlag.

## 2.1.6. Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry

- 2.1.6.1. Biuretlösung: 48 Teile 4% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung  
1 Teil 2% K-Na-Tartrat-Lösung  
1 Teil 1% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O-Lösung

Die Lösungen wurden in „Aqua-ultra-pure“ hergestellt. Die Biuretlösung wurde jeweils frisch am Versuchstag aus den Stammlösungen angesetzt.

- 2.1.6.2. Folinlösung: Das aus Natriumwolframat, Natriummolybdat, Phosphorsäure und Salzsäure bestehende Folin-Ciocalteu-Reagenz wurde 1:2 mit Aqua-ultra-pure verdünnt.

## 2.1.7. Messgeräte

- 2.1.7.1. Fluoreszenz-Messgerät: Tecan GENios Pro-Fluorimeter  
(Software: Xfluor4GenosPro, Version V 4.53)

*Einstellungen am Gerät:*

- Measurement mode: Fluorescence intensity, Endpoint bzw. Kinetic
- Plate definition file: GRE96fb.pdf
- Part of the plate: A1-H12
- Multiple reads per well: (pattern: square) Number of reads: 3x3
- Fluorescence wavelengths-excitation: 485nm, -emission: 535nm
- Gain: manual (50)
- Mirror selection: automatic
- Lag time: 0µs
- Integration time: 40µs
- Number of flashes: 3
- Time between move and flash: 0ms
- Endpoint: 1 cycle
- Kinetic: 8 cycles
- Temperature valid range: 36,0-38,0°C

Wichtig war die Verwendung des jeweils gleichen Gains (Fluoreszenzverstärkungswert), um vergleichbare Fluoreszenzwerte zu erhalten, sowie die Aufwärmung des Messgerätes auf 37°C. Außerdem war es erforderlich zügig zu arbeiten und die Platten so wenig wie möglich dem Umgebungslicht auszusetzen, um die Fluoreszenz nicht vorzeitig zu vermindern (sog. Photobleaching).

- 2.1.7.2. Mikrotiterplattenphotometer: BIO-TEK EL<sub>x</sub>800<sub>uv</sub>, Extinktionsmessung bei Wellenlänge von 630 nm
  
- 2.1.7.3. Schüttelinkubator 1000/ Unimax 1010, Firma Heidolph instruments  
(Software: KC junior)
  
- 2.1.7.4. Zellkulturbrutschrank: CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (10 %)  
der Firma Heraeus electronic, Temp.: 37°C
  
- 2.1.7.5. Sterilbänke: Hera safe and LaminAir, Firma Heraeus
  
- 2.1.7.6. Sterilisator: T 5050 Firma Heraeus

## 2.1.8. Sonstige Materialien

### 2.1.8.1. Proteinstandards für die Proteinbestimmung nach Lowry:

Rinderserumalbumin (BSA) der Firma Sigma,

Stammlösung = 20mg BSA in 5ml H<sub>2</sub>O ultra-pure + 5ml 1N NaOH

Standard	...ml Stammlösung	...ml 0,5 N NaOH	Endkonz. in mg BSA/ml
<b>S1</b>	2,0	8,0	0,4
<b>S2</b>	1,5	8,5	0,3
<b>S3</b>	1,0	9,0	0,2
<b>S4</b>	0,5	9,5	0,1
<b>S5</b>	0,25	9,75	0,05
<b>S6</b>	0,125	9,875	0,025

**Tabelle 1: Zusammensetzung der 6 verschiedenen Standards**

### 2.1.8.2. Ergänzende Zusätze für Medien und Puffer:

FBS:	Firma Gibco
Hepes Puffer:	Merck
Glutamin 200 mM:	c.c.pro
Gentamycin 10 mg/ml:	Gibco
Fungizone (Amphotericin B: 250 µg/ml):	Gibco
Trypsin EDTA (10x):	Gibco
NaHCO <sub>3</sub> :	Merck
Glucose:	Merck

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)

Prinzip:

Zugrunde liegt der Methode die Biuret-Reaktion. Eine mit Hilfe von Folinreagenz entstehende Farbentwicklung ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Diese kann anhand einer mit Rinderserumalbuminstandards erstellten Eichgerade ermittelt werden.

Hierfür wird der sogenannte Biuret-Komplex benötigt, ein Komplex, der im alkalischen Milieu (hier Natronlauge) in Anwesenheit von Proteinen bzw. Peptiden und Kupfersulfat (im Biuret-reagenz enthalten) entsteht. Das in den Proteinen enthaltene Tyrosin und Tryptophan (sowie zu kleineren Anteilen auch Cystin, Cystein und Histidin) reduzieren das im Folin-Ciocalteus-Reagenz enthaltene Wolframat und Molybdat zu charakteristisch blau gefärbten reduzierten Reaktionsprodukten. Der Biuret-Komplex erleichtert dieses (Rüweler, 2006; Schweda, 2004).

Gemessen wird die Extinktion dieser Reaktionslösung im Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 630 nm.

Versuchsdurchführung:

Der zu messenden 96-Well-Platte wurde zunächst nach der oben beschriebenen Vorbereitung und 24h-Inkubation das phenolrothaltige Medium abgesaugt. Anschließend wurde diese dreimal mit calcium- und magnesiumhaltigem PBS-Puffer gespült (je 200 µl je Well), der zuvor auf 37°C erwärmt worden war. Nun wurden die Wells der Spalten 3-10 der 96-Well-Platte mit jeweils 60 µl 0,5 N NaOH beschickt und für 45 min. bei 37°C auf dem Schüttelinkubator geschüttelt, so dass sich die Zellen im alkalischen Milieu lösen konnten. In die äußeren, zellfreien Wells (siehe Schema unten) wurden nun die Proteinstandards bzw. Leerwertkontrollen („Blanks“) pipettiert (je 60 µl). Anschließend erhielt jedes Well noch 150 µl der Biuret-lösung und die Platte wurde für weitere 10 Minuten auf den Schüttelinkubator gestellt. Schließlich wurden in jedes Well 60 µl des Folin-Reagenz pipettiert, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich durchmischt und nochmals 20 Minuten bei 37°C geschüttelt. Dann erfolgte, nachdem die Wells auf eventuell gebildete Luftbläschen überprüft worden waren, die Extinktionsmessung der gebildeten blauen Farbe bei einer Wellenlänge von 630 nm im Photometer. Anhand der blindwertbereinigten Extinktionswerte der Proteinstandards war eine Eichgerade erstellt worden, mithilfe derer sich nun über den Extinktionswert des einzelnen Wells die Proteinmenge in µg/Well ermitteln ließ.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<i>B</i>	S3									S3	<i>B</i>
<b>B</b>	<i>B</i>	S3	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S3	<i>B</i>
<b>C</b>	<i>B</i>	S4	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S4	<i>B</i>
<b>D</b>	<i>B</i>	S4	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S4	<i>B</i>
<b>E</b>	S1	S5	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S5	S1
<b>F</b>	S1	S5	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S5	S1
<b>G</b>	S2	S6	<i>K</i>	X1	X2	X3	<i>K</i>	X4	X5	X6	S6	S2
<b>H</b>	S2	S6									S6	S2

**Tab. 2: Inkubationsschema der Mikrotiterplatten für die Proteinbestimmung (Lowry)**

**Erläuterungen zur Tabelle:** [nur die umrandeten Felder (Wells) enthielten Zellen]

**B:** „Blanks“ (Leerwerte), keine Zellen, nur PBS, später NaOH

**S:** Proteinstandards (6 verschiedene Konzentrationen) aus BSA

**K:** Kontrolle-> Zellen ohne CHP, als Ausgangswert gedacht

**X:** diverse Konzentrationen (in aufsteigender Dosis) des zu untersuchenden Agens (z.B. CHP)

## 2.2.2. Messung der Radikalbildung

(Einstellungen des Fluorimeters: siehe oben unter „Messgeräte“)

Prinzip:

Radikalbildung kann optisch sichtbar und somit messbar gemacht werden. Hierfür dient u.a. die Messung der Fluoreszenz. Es wurde der oben näher erläuterte Farbstoff Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) verwendet, der mit Radikalen reagiert und hierdurch fluoresziert. Das Ausmaß der Fluoreszenz kann als Maß für die intrazelluläre Radikalbildung gesehen werden.

Zunächst muß das DCFH-DA in die Zellen gelangen. Hierfür war es durch eine Vorinkubation erforderlich die Zellen vorher mit dem Farbstoff „aufzuladen“.

Das Aufladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte mit einer Konzentration von 10 µM DCFH-DA für jeweils 30 min. im dunklen Brutschrank. Diese Gebrauchslösung wurde jeweils am Versuchstag frisch aus der bei -18°C eingefrorenen Trockensubstanz hergestellt.

### 2.2.2.1. Versuche zur Wirkung von Cumolhydroperoxid (CHP)

Bevor die Polyphenole auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht werden konnten, wurde zunächst die Induktion der Radikalbildung durch CHP gemessen.

Hierfür wurde im Prinzip der unter 2.2.2.2. näher erläuterte Versuchsaufbau gewählt, nur dass hier kein Polyphenol hinzugefügt wurde, dafür aber 7 verschiedene CHP-Konzentrationen (1; 5; 10; 50; 100; 500; 1000  $\mu\text{M}$  CHP).

#### CHP-Kinetik:

Der unten beschriebene Versuchsaufbau bezieht sich auf die überwiegend durchgeführten „Endpunkt“-Messungen am Tecan-Fluorimeter. Zu Anfang der Versuchsreihe war jedoch auch ein sogenannter „Kinetik“-Versuch ausschließlich mit CHP erfolgt, um die Entwicklung der Fluoreszenz über einen bestimmten Zeitraum zu untersuchen. Diese Funktion lässt sich im Gerät einstellen, so dass alle 15 min. über 2 Stunden automatisch eine Messung bei den ansonsten gleichen Einstellungen (s.o.) erfolgen konnte. Für diesen Versuchsaufbau wurde die Platte sofort nach Hinzugeben des CHPs in das Fluorimeter gestellt, d.h. der letzte Spülvorgang entfiel.

Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um die konzentrationsabhängige Radikalbildung über die Zeit in Anwesenheit des Peroxids zu beobachten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
<b>B</b>	B	K	K	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10	50	100	500	1000	K	B
<b>C</b>	B	K	K	1	5	10	50	100	500	1000	K	B
<b>D</b>	B	K	K	1	5	10	50	100	500	1000	K	B
<b>E</b>	B	K	K	1	5	10	50	100	500	1000	K	B
<b>F</b>	B	K	K	1	5	10	50	100	500	1000	K	B
<b>G</b>	B	K	K	1	5	10	50	100	500	1000	K	B
<b>H</b>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

**Tabelle 3: Inkubationsschema für CHP-Endpunkt-/Kinetik-Fluoreszenz-Messung**

Erläuterungen zur Tabelle:

**B** = “Blank”, d.h. Hanks-Puffer-Lösung in den Wells enthalten, keine Zellen, kein DCFH-DA

**K** = Kontrolle, d.h. nur Zellen in Hanks mit DCFH-DA, kein Peroxid

### **2.2.2.2. Versuche zur antioxidativen Wirkung der Polyphenole**

#### Versuchsdurchführung:

Die Zellen auf der tags zuvor vorbereiteten 96-Well-Platte wurden zunächst vom serumhaltigen Medium befreit (s.o.), zweimal mit Hanks-Puffer gespült (je 200 µl pro Well) und dann mit 200 µl/Well der DCFH-DA-Gebrauchslösung für 30 Minuten im dunklen Brutschrank bei 37°C „aufgeladen“. Ab sofort wurden die Platten nur so kurz wie möglich dem Umgebungslicht ausgesetzt, um vorzeitiges „Photobleaching“ (schnelles Verblässen der Fluoreszenz) zu vermeiden, hierfür wurden sie zwischen den einzelnen Arbeitsschritten im dunklen Brutschrank inkubiert und zusätzlich in Alufolie gewickelt. Nach dem Aufladen der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde dieser wieder abgesaugt und anschließend erneut zweimal mit Hanks-Puffer gespült. Dann wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen (dem Peroxid CHP und dem jeweils zu untersuchenden Antioxidans in unterschiedlichen Konzentrationen) inkubiert. Zuvor waren bereits die hierfür erforderlichen Verdünnungsreihen in Hankspuffer hergestellt und auf 37°C erwärmt worden. Die Inkubation erfolgte wieder für die Dauer von 30 Minuten im Dunkeln bei 37°C im Brutschrank, anschließend wurde wieder zweimal gespült und zur Messung im Tecan-Fluorimeter 200 µl Hanks-Puffer in jedes Well gegeben.

Die im Folgenden mit „Blank“ bezeichneten Wells bzw. Werte sind „Leerwerte“, das bedeutet, dass sie keine Zellen, kein Peroxid, kein Antioxidans und auch kein DCFH-DA, sondern nur Pufferlösung enthalten.

„Kontrollen“ sind Wells, die Zellen und auch den Farbstoff DCFH-DA, jedoch kein Peroxid oder Antioxidans enthalten, es sei denn, dieses ist entsprechend vermerkt (K\* bzw. K+, siehe in den jeweiligen Abbildungen).

Dieser Versuch wurde jeweils dreimal für jede der 9 Substanzen durchgeführt.

### 2.2.2.3. Versuche zur prooxidativen Wirkung der Polyphenole:

Prinzipiell erfolgte der Versuchsaufbau wie oben beschrieben, nur dass die Polyphenole allein zu den Zellen gegeben wurden, d.h. anders als zuvor OHNE das Peroxid CHP. Eine Reihe wurde jedoch mit 500 µM CHP beschickt, um eine Positiv-Kontrolle für die Fluoreszenz zu erhalten. Es wurden die gleichen Konzentrationen gewählt wie zuvor in den Versuchen zur antioxidativen Wirkung.

Dieser Versuch wurde für die Substanz Genistein dreimal, für die anderen Polyphenole einmal durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
C	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
D	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
E	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
F	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
G	B	K	K*	K+	X1	X2	X3	X4	X5	X6	K	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

**Tabelle 4: Belegung der 96-Well-Versuchsplatten zur Fluoreszenzmessung mit DCFH-DA, Schema sowohl für Versuche zur prooxidativen als auch antioxidativen Wirkung**

**B** = "Blank", d.h. Hanks-Puffer-Lösung in den Wells enthalten, keine Zellen, kein DCFH-DA

**K** = Kontrolle, d.h. nur Zellen in Hanks mit DCFH-DA, kein Peroxid, kein „Antioxidanz“

**K\*** = Zellen in 500µM CHP+DCFH-DA, als Fluoreszenz-Positiv-Kontrolle, kein Antioxidanz anwesend

**K+** = Zellen in maximaler Antioxidanz-Konzentration, kein Peroxid (CHP) anwesend

-> Kontrolle zur Frage nach Eigenfluoreszenz/Fluoreszenzauslösung des vermeintlichen Antioxidanz

**X** = unterschiedliche Konzentrationen (jeweils 6) der zu untersuchenden Polyphenole + 500µM CHP (nur in den Versuchen zur antioxidativen Wirkung, bei den Versuchen zu den prooxidativen Eigenschaften der Substanzen fehlte das CHP).

#### 2.2.2.4. Versuch zur antioxidativen Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol

Aufgrund von Ergebnissen in vorangegangenen Studien (Müller, 2006; Schweda, 2004) war bekannt, dass  $\alpha$ -Tocopherol einen nachhaltigen Schutz der Zelle vor der zytotoxischen Wirkung von CHP bieten kann (u.a. durch Hemmen der Lipidperoxidation).

Somit wurde zusätzlich zum bisherigen Versuchsaufbau ein weiterer gewählt, in dem eine Hälfte (Spalte 1-6, siehe Schema unten) der 96-Well-Platte mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol-angereichertem Medium versetzt wurde, während die andere Hälfte (Spalte 7-12, s.u.) als Kontrollgruppe mit Tocopherol-freiem Medium befüllt wurde.

Anschließend erfolgte eine Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank.

Am Versuchstag wurde die Platte gespült. Der weitere Versuchsaufbau entsprach nun mit Ausnahme der Plattenbelegung dem bisherigen:

Statt wie bisher 6 verschiedener *Polyphenol*-Konzentrationen wurden in diesem Versuchsaufbau 4 verschiedene *CHP*-Konzentrationen auf ihren radiakalbildenden Effekt untersucht (50,100,200,500  $\mu$ M CHP). Dabei wurde pro Konzentration je eine Spalte mit Tocopherol-vorbehandelten Zellen und eine ohne Vitamin E-/Tocopherol-Vorbehandlung belegt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	K	50 $\mu$ M	100	200	500	50 $\mu$ M	100	200	500	K	B
C	B	K	50	100	200	500	50	100	200	500	K	B
D	B	K	50	100	200	500	50	100	200	500	K	B
E	B	K	50	100	200	500	50	100	200	500	K	B
F	B	K	50	100	200	500	50	100	200	500	K	B
G	B	K	50	100	200	500	50	100	200	500	K	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

**Tabelle 5 : Schema zur Plattenbelegung im Vitamin-E-Vorinkubationsversuch**

**Sp.1-6 mit Vit.E-haltigem Medium 24h vorinkubiert, Sp. 7-12 mit Vit.E-freiem Medium befüllt**

### 2.3. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Alle Versuche wurden in der Regel mindestens dreimal wiederholt.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwertes) berechnet und dargestellt.

In den Versuchen zur Proteinbestimmung mit dem Photometer Elx 800<sub>uv</sub> der Firma Bio-TEK wurde die Software „KC junior“ verwendet.

Hier wurde der Mittelwert des Proteingehaltes aus den 12 Wells, die nicht mit CHP behandelt wurden gebildet, gleich 100% gesetzt und diente dann als Kontrolle.

Der Proteingehalt wurde in  $\mu\text{g}/\text{Well}$  berechnet. Der Proteingehalt der Versuchsgruppen (je 6 gleichbehandelte Wells) wurde gemittelt und dann in % der Kontrolle angegeben.

Der EC<sub>50</sub>-Wert entspricht der Konzentration des CHPs, bei der eine Reduktion des Proteingehaltes um 50% auftrat.

In den Versuchen zur Radikalbildung wurden pro Konzentration einer Substanz jeweils 6 Wells gemessen, für die Kontrollen je 12 Wells.

Es wurde zur Datenauswertung des Tecan-Fluorimeters GeniosPro die Software Xfluor4GeniosPro verwendet. Die Werte wurden entweder als Absolutwerte („Fluoreszenz-Units“) oder als Relative Fluoreszenz, d.h. in % der Mittelwerte der 500  $\mu\text{M}$ -CHP-Kontrolle (diese entsprachen dann somit 100%) dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurden Varianz-Analysen durchgeführt, gefolgt vom Dunnet's-Test zur Überprüfung der Signifikanz.

Unterschiede wurden als signifikant betrachtet bei  $p < 0,05$ .

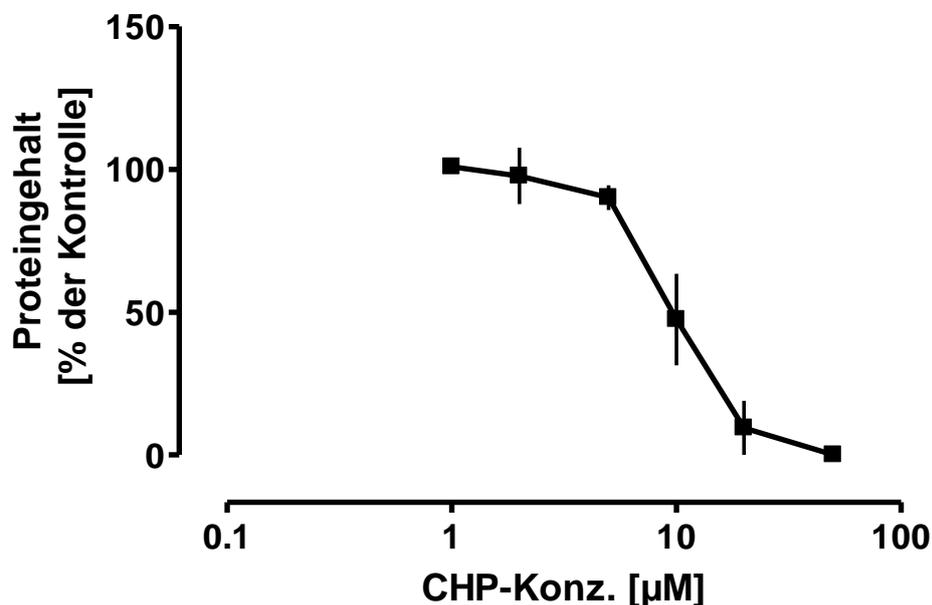
Alle Berechnungen sowie graphischen Darstellungen der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe der Software GraphPadPrism 4.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zytotoxizität von Cumolhydroperoxid

Cumolhydroperoxid (CHP) wurde in dieser Arbeit als Modellsubstanz verwendet, um oxidativen Stress zu induzieren. Zunächst wurde sie auf ihre Zytotoxizität getestet. Hierfür wurde gemessen, welche Konzentrationen von CHP in Kulturen wachstumsgehemmter Zellen zum Ablösen der Zellen und damit zum Zellverlust führen. Als Parameter für die Zahl der Zellen wurde der Zellproteingehalt pro Well verwendet, welcher mit der Lowry-Methode (siehe Material und Methoden) gemessen wurde.

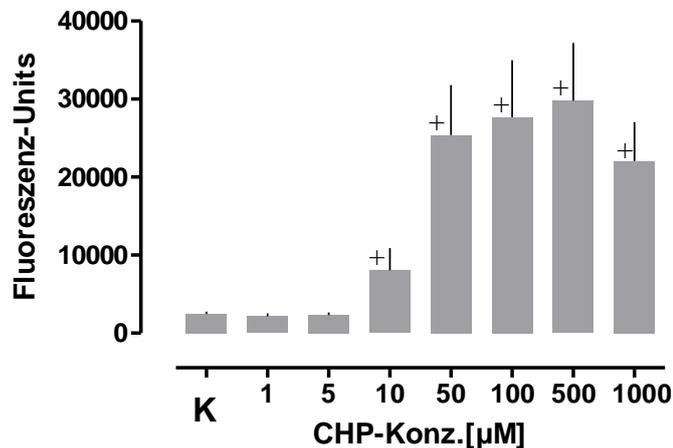
Wie in Abb.1 dargestellt zeigte sich, dass CHP nach 24 Stunden ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu einer Abnahme des Proteingehaltes führte. Bei 10  $\mu\text{M}$  betrug der Zellverlust 50% (=  $\text{EC}_{50}$ -Wert). Spätestens bei 50  $\mu\text{M}$  CHP waren keine Zellen mehr nachweisbar.



**Abb.1:** Zytotoxische Wirkung von CHP auf wachstumsgehemmte C6 -Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Spannweite aus  $n = 2$  Versuchen (je 6 Wells pro Konzentration, Kontrolle: 12 Wells) Expositionszeit 24 Stunden.

### 3.2. Auslösung von oxidativem Stress durch Cumolhydroperoxid



**Abb.2:** Induktion von Radikalbildung durch CHP in C6-Zellen.

„K“ entspricht den unbehandelten Zellen in Hankspuffer.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K dargestellt.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle K mit  $p < 0,05$ .

Es wurde zunächst untersucht, inwieweit das Ausmaß der DCFH-DA-Fluoreszenz von der CHP-Konzentration abhängt.

Hierfür wurden die Zellen nach Aufladen mit 10  $\mu$ M DCFH-DA mit 7 unterschiedlichen CHP-Konzentrationen (je 6 Wells pro Konzentration) inkubiert. Zwei Reihen, d.h. 12 Wells, wurden nur mit Hanks-Puffer versehen und dienten somit als „Kontrolle“ (siehe Versuchsaufbau unter 2.2.2.1.). Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der CHP-Konzentration. Wie in Abb. 2 dargestellt zeigte sich bei 10  $\mu$ M CHP erstmals ein statistisch signifikanter Fluoreszenzanstieg im Vergleich zur Kontrolle. Die maximale Fluoreszenzauslösung fand sich bei 500  $\mu$ M CHP.

Somit wurde die Konzentration von 500  $\mu$ M CHP fortan für alle folgenden Versuche (soweit im Folgenden nicht anders erwähnt) parallel mit je 6 Konzentrationen der Polyphenole verwendet.

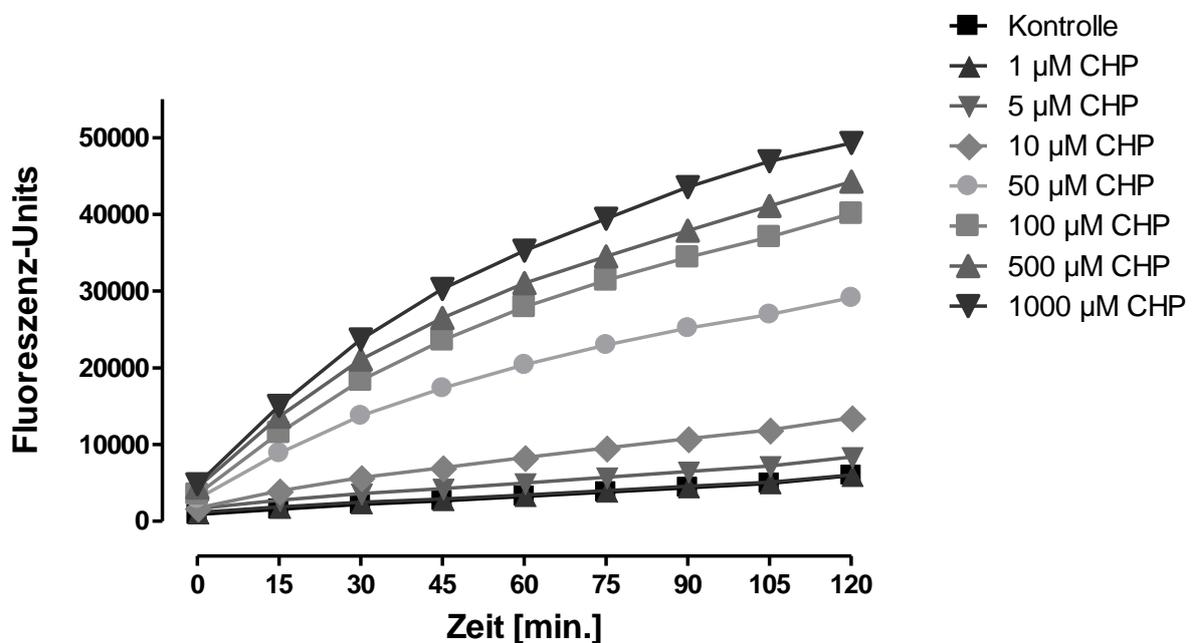
Um die Zeitabhängigkeit der Radikalbildung durch CHP zu charakterisieren wurden die C6-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peroxids inkubiert.

Alle 15 Minuten wurde die Fluoreszenz über die Dauer von 120 Minuten gemessen.

Bei diesem Versuchsaufbau wurde das Peroxid im Medium belassen, d.h. die Zellen sind vor der Messung nicht mehr gewaschen worden.

Es zeigte sich - in Abb. 3 zu erkennen - gleich nach Zugabe des CHP eine konzentrationsabhängig und über die gesamte Expositionsdauer kontinuierlich ansteigende Fluoreszenz. Die kleinste CHP-Konzentration, die zu einem deutlichen Fluoreszenzanstieg führte, war 5  $\mu\text{M}$ .

Basierend auf diesem und dem zuvor durchgeführten Experiment wurde von nun an eine Expositionsdauer von 30 min. durch CHP, sowie eine Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  verwendet.



**Abb.3:** Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der CHP-induzierten Radikalbildung in C6-Zellen.

Mittelwerte aus 6 Wells pro Konzentration (12 Wells für die Kontrolle), zur besseren Darstellbarkeit ohne die Standardabweichung, exemplarisch aus einem der 2 Versuche.

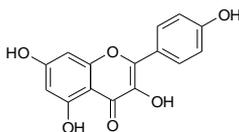
### 3.3. Wirkung von Polyphenolen auf die CHP-induzierte Radikalbildung

Um die Wirkung von Polyphenolen zu quantifizieren wurde der unter 2.2.2.2. beschriebene Versuchsaufbau gewählt. Hierfür wurden je 6 Konzentrationen einer Substanz in gleichzeitiger Anwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  CHP für 30 min. zu den Zellen gegeben, nachdem diese mit 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA aufgeladen wurden. Nach gründlichem Spülen mit Hanks-Puffer wurden nun die Platten im Fluorimeter gemessen.

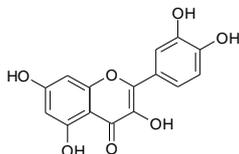
Die erhaltenen Ergebnisse sind als Absolutwerte, „Fluoreszenz-Units“, in Balkendiagrammen dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Dunnets-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

**Abb.4: Strukturformeln der Polyphenole:**

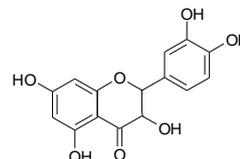
#### Kaempferol



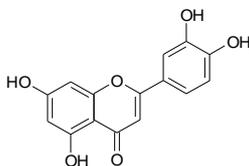
#### Quercetin



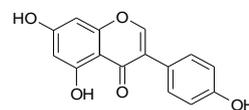
#### Taxifolin



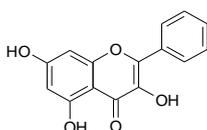
#### Luteolin



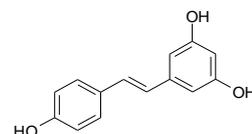
#### Genistein



#### Galangin

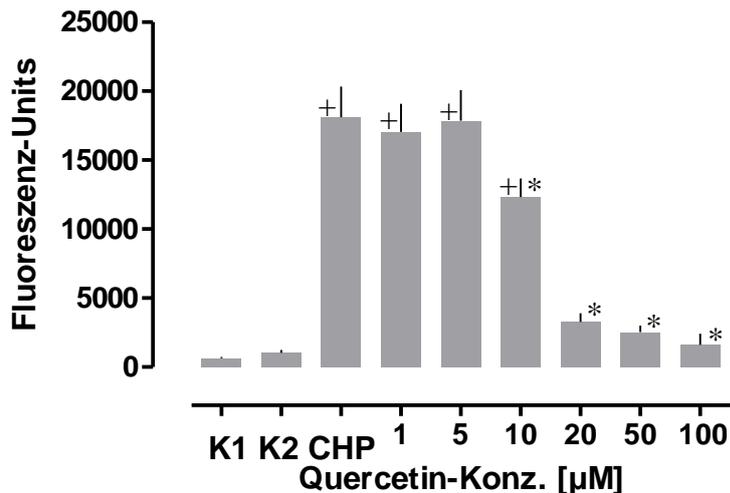


#### Resveratrol



### 3.3.1. Quercetin

In den Versuchen zeigte sich, dass **Quercetin** die CHP-induzierte Fluoreszenz deutlich zu senken vermag. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  **Quercetin** sieht man bereits einen statistisch signifikanten Rückgang der Fluoreszenz verglichen mit der Radikalbildung bei 500  $\mu\text{M}$  CHP alleine. In allen Versuchen steht **K1** für die unbehandelten Zellen in Hanks-Puffer, **K2** für die maximal verwendete Polyphenol-Konzentration, d.h. hier 100  $\mu\text{M}$  **Quercetin**. Bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  **Quercetin** ist die durch CHP ausgelöste Fluoreszenz auf das Niveau der Kontrolle **K1** zurückgegangen und statistisch von dieser nicht mehr signifikant verschieden (wie in der untenstehenden Abbildung 5 zu erkennen). **K2** zeigt, dass auch hohe Konzentrationen von **Quercetin** selbst keine Fluoreszenz auslösen.



**Abb. 5 :** Wirkung von **Quercetin** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 100  $\mu\text{M}$  Quercetin, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 4$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

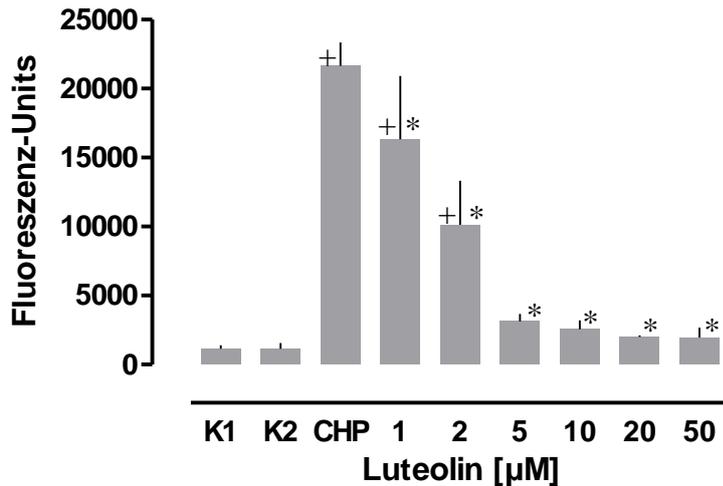
„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.2. Luteolin

**Luteolin** erwies sich als antioxidativ sehr potente Substanz. Bereits bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration, 1  $\mu\text{M}$ , wurde die durch CHP ausgelöste Fluoreszenz statistisch signifikant reduziert.

In Abb.6 ist bei 20  $\mu\text{M}$  Luteolin die Fluoreszenz fast komplett gehemmt, die Werte weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied mehr zu den Kontrollen auf.

**Luteolin** selbst löst keine Fluoreszenz aus (**K2**).



**Abb. 6:** Wirkung von **Luteolin** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 50  $\mu\text{M}$  Luteolin, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

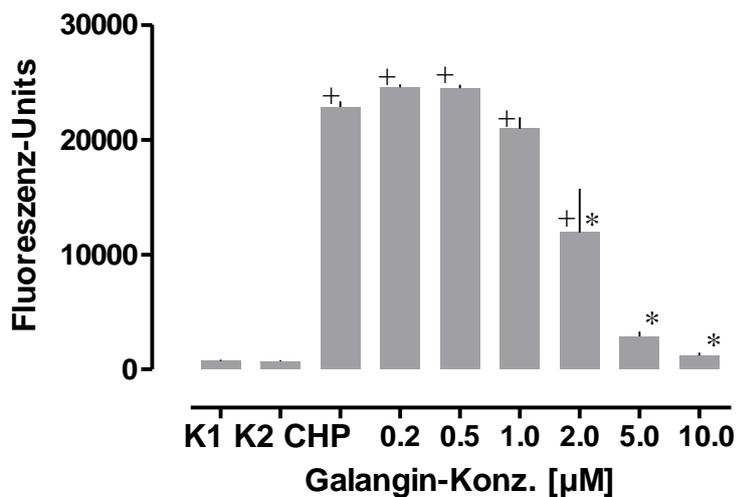
„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.3. Galangin

Auch **Galangin** zeigte einen verhältnismäßig starken antioxidativen Effekt. Ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ging die Fluoreszenz statistisch signifikant zurück.

Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  **Galangin** war die Fluoreszenz schließlich vollständig gehemmt, das heißt es war kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zum Niveau der unbehandelten Kontrollen erkennbar, siehe Abbildung 7.

Die Kontrolle **K2** zeigt, dass auch **Galangin** selbst keine Fluoreszenz auslöst bzw. Radikale bildet.



**Abb. 7:** Wirkung von **Galangin** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 10  $\mu\text{M}$  Galangin, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

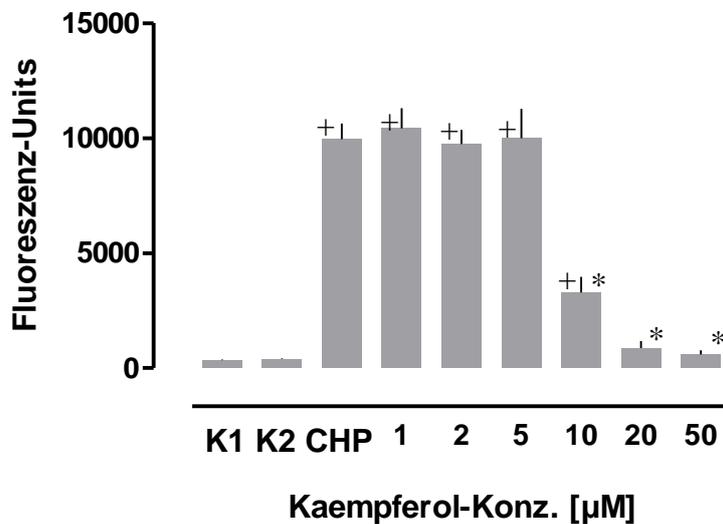
„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.4. Kaempferol

**Kaempferol** zeigt (in Abbildung 8 dargestellt) ebenfalls eine antioxidative, radikalbildungshemmende Wirkung. Konzentrationen von 1, 2, und 5  $\mu\text{M}$  bewirken noch keine statistisch signifikante Fluoreszenzminderung, aber ab 10  $\mu\text{M}$  **Kaempferol** geht die Fluoreszenz/ Radikalbildung statistisch signifikant zurück. Bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  **Kaempferol** ist die Fluoreszenz vollständig gehemmt, die Werte entsprechen denen der Kontrollen (kein statistisch signifikanter Unterschied mehr in ANOVA erkennbar).

**Kaempferol** selbst ist nicht in der Lage Fluoreszenz auszulösen, wie an **K2** zu sehen ist.



**Abb. 8:** Wirkung von **Kaempferol** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 100  $\mu\text{M}$  Kaempferol, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

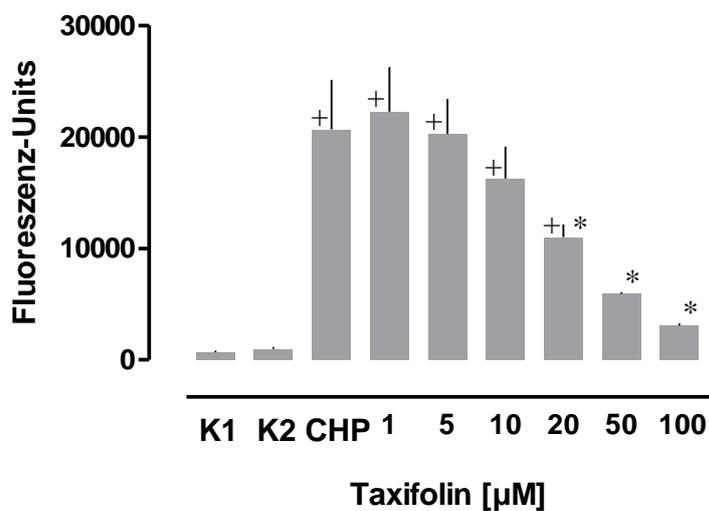
„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.5. Taxifolin

Auch die Substanz **Taxifolin** ist in der Lage Fluoreszenzauslösung durch CHP zu verringern, allerdings in etwas höheren Konzentrationen als bei den zuvor untersuchten Substanzen.

Die Fluoreszenz ist statistisch signifikant erst bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  vermindert, jedoch hier bereits soweit, dass die Fluoreszenzwerte sich statistisch nicht mehr signifikant von denen der Kontrolle K1 unterscheiden (Abb.9).

**K2** zeigt, dass **Taxifolin** selbst nicht fluoreszenzauslösend ist.



**Abb. 9:** Wirkung von **Taxifolin** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 100  $\mu\text{M}$  Taxifolin, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

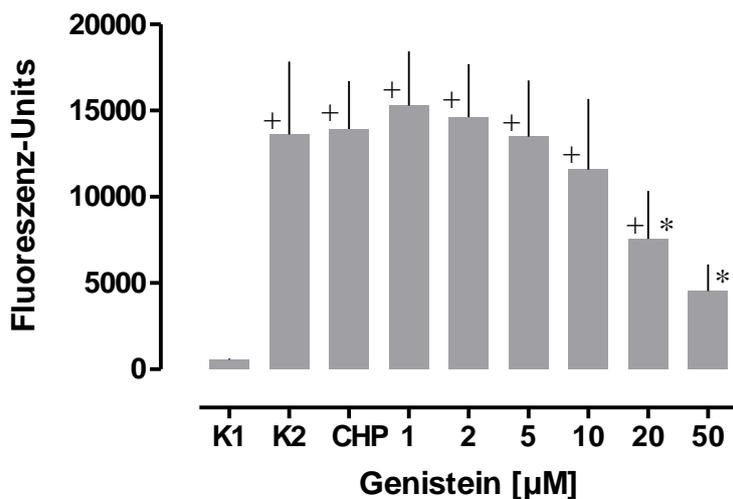
„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.6. Genistein

**Genistein** zeigte eine Besonderheit:

Es war sowohl in der Lage, siehe Abbildung 10, die durch CHP ausgelöste Fluoreszenz zu hemmen („antioxidative“ Wirkung), als auch selbst Fluoreszenz auszulösen („prooxidative“ Wirkung). Dieses ist deutlich erkennbar in Kontrolle **K2** (50  $\mu\text{M}$  **Genistein** ohne CHP auf den Zellen) und zwar statistisch signifikant gesichert in einer Größenordnung vergleichbar mit 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Hemmend auf die durch CHP ausgelöste Fluoreszenz zeigte sich **Genistein** statistisch signifikant ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Bei 50  $\mu\text{M}$  war dann die Radikalbildung statistisch gesehen komplett gehemmt, da kein signifikanter Unterschied mehr zu **K1** bestand.



**Abb.10:** Wirkung von **Genistein** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 50  $\mu\text{M}$  Genistein, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

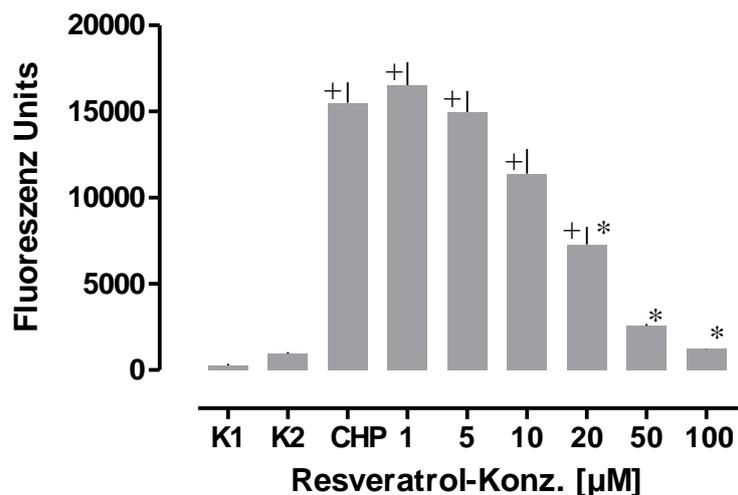
„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.7. Resveratrol (3,4',5-trans-Trihydroxystilben)

**Resveratrol** ist in der Lage, die durch 500  $\mu\text{M}$  CHP ausgelöste Fluoreszenz zu vermindern und zwar statistisch signifikant ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$ . Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  **Resveratrol** ist die Fluoreszenz so weit reduziert, dass sie statistisch nicht mehr vom Niveau der Kontrollen zu unterscheiden ist, dargestellt ist dies in Abbildung 11.

Wie in allen Versuchen steht **K1** auch hier für die unbehandelten Zellen in Hanks-Puffer, **K2** für die maximal verwendete Polyphenol-Konzentration, d.h. hier 100  $\mu\text{M}$  **Resveratrol**. Wie in Abb.11 zu sehen, zeigte sich in **K2** keine deutliche Fluoreszenz verglichen mit **K1**, d.h. **Resveratrol** löst selbst in höheren Konzentrationen keine Fluoreszenz aus, induziert also selbst keine Radikalbildung.



**Abb.11:** Wirkung von **Resveratrol** auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol, „**CHP**“ = 500  $\mu\text{M}$  CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1 dargestellt.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$ ,

„\*“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **CHP**,  $p < 0,05$ .

### 3.3.8. Vergleich der antioxidativen Wirkung der Polyphenole

Alle untersuchten Polyphenole waren in der Lage C6-Zellen vor der Bildung von Radikalen zu schützen, jedoch in unterschiedlich hohen Konzentrationen.

Wie der unten dargestellten Abbildung 12 zum Vergleich der antioxidativen Wirkung der verschiedenen Polyphenole untereinander zu entnehmen ist, sind **Luteolin** ( $IC_{50}$ :  $1,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) und **Galangin** ( $IC_{50}$ :  $2,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) die effektivsten der untersuchten Substanzen, um C6-Zellen vor der Bildung von Radikalen durch CHP-Intoxikation zu schützen.

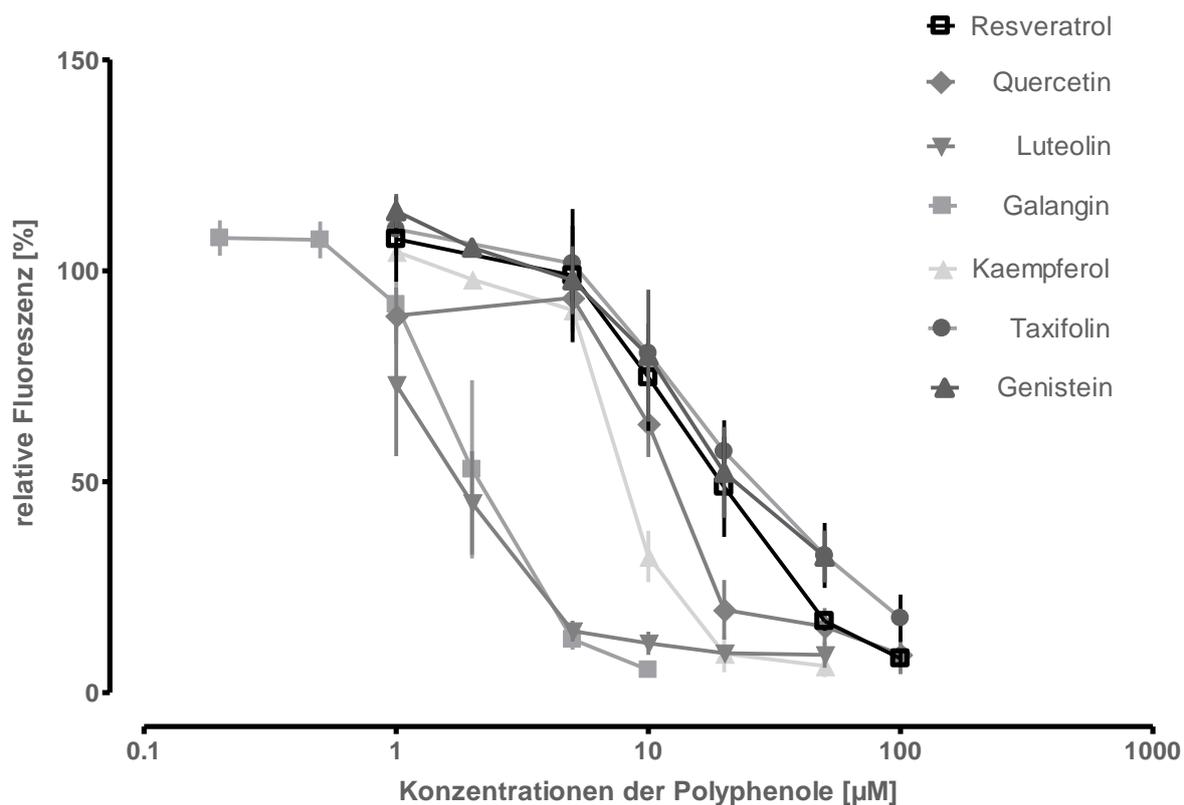
Des Weiteren haben sich **Kaempferol** ( $IC_{50}$ :  $8,0 \pm 0,1$ ) und **Quercetin** ( $IC_{50}$ :  $13,0 \pm 1,2$ ) als antioxidativ wirksam erwiesen, wenn auch höhere Konzentrationen für den gleichen Effekt erforderlich waren als bei den beiden oben genannten.

Auch **Resveratrol** und **Genistein** waren in der Lage, die durch CHP in C6-Zellen ausgelöste Fluoreszenzbildung zu vermindern, allerdings waren hierfür noch höhere Konzentrationen erforderlich ( $IC_{50}$  für **Resveratrol**:  $17,7 \pm 6,8 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50}$  für **Genistein**:  $22,2 \pm 6,8 \mu\text{M}$ ).

**Taxifolin** war mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $30,1 \pm 8,2$  auch - wenn jedoch deutlich schwächer - antioxidativ wirksam.

Wenn man nun also die Polyphenole in Bezug auf ihre antioxidative Wirksamkeit nach ihren  $IC_{50}$ -Werten einordnet und mit der Substanz mit der kleinsten, sprich antioxidativ wirksamsten Konzentration beginnt, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

Luteolin<Galangin<Kaempferol<Quercetin<Resveratrol<Genistein<Taxifolin.



**Abb.12:** Antioxidative Wirkung der untersuchten Polyphenole im Vergleich. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzwerte in Prozent jeweils bezogen auf die maximale Fluoreszenz bei 500 µM CHP (Mittelwerte  $\pm$  SEM von je 3-4 Versuchen), die 100% entspricht .

**Tabelle 6:** Antioxidative Potenz der verschiedenen Polyphenole in den C6-Zell-Versuchen im Vergleich mit einem zellfreien „Trolox equivalent antioxidant capacity“ (TEAC) Assay (Ishge et al., 2001).

Polyphenol	IC50-Werte [µM]	TEAC-Werte [mM] (Ishge et al., 2001)
Luteolin	1.9 $\pm$ 0,5	2,48 $\pm$ 0,23
Galangin	2,1 $\pm$ 0,6	2,08 $\pm$ 0,11
Kaempferol	8,0 $\pm$ 0,1	1,45 $\pm$ 0,08
Quercetin	13,0 $\pm$ 1,2	4,84 $\pm$ 0,45
Resveratrol	17,7 $\pm$ 6,8	2,88 $\pm$ 0,15
Genistein	22,2 $\pm$ 6,8	2,96 $\pm$ 0,49
Taxifolin	30,1 $\pm$ 8,2	3.09 $\pm$ 0,58

Die IC50-Werte sind aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven zur relativen Fluoreszenz entnommen und sagen aus, bei welcher Konzentration (Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3-4 Versuchen) des jeweiligen Polyphenols die bei 500 µM CHP ausgelöste Fluoreszenz um 50 % reduziert ist.

### 3.4. Untersuchung der Polyphenole auf prooxidative Effekte

Nachdem sich im Versuch zur antioxidativen Wirkung von Genistein gezeigt hatte, dass dieses Polyphenol in der eingesetzten Konzentration selbst die Bildung von Radikalen induziert hatte, stellte sich die Frage nach möglichen „pro-oxidativen“ Eigenschaften der Polyphenole und deren Konzentrationsabhängigkeit.

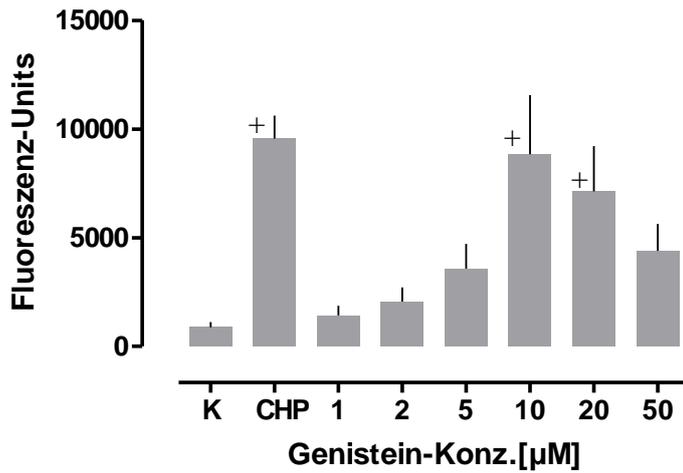
Es war in jedem zuvor durchgeführten Versuch bereits eine sogenannte Positivkontrolle (je 6 Wells pro Platte wurden mit der höchsten verwendeten Konzentration des Polyphenols *ohne* CHP beschickt) untersucht worden, ohne dass sich eine prooxidative Wirkung gezeigt hatte. Es sollte jedoch nun geklärt werden, ob dieses auch für andere Konzentrationen zutrifft.

Der Versuchsaufbau blieb im Prinzip der Gleiche wie bei 3.2.3., nur dass die Inkubation der Zellen jetzt ausschließlich mit den unterschiedlichen Polyphenolen ohne das CHP erfolgte. Es wurde lediglich eine Reihe pro Platte (6 Wells) mit 500  $\mu\text{M}$  CHP beschickt, so dass sich eine Vergleichsmöglichkeit bot.

Der Versuch zur prooxidativen, radikalbildenden Wirkung von Genistein wurde dreimal durchgeführt, für die restlichen Polyphenole mit 6 Wells pro Konzentration je einmal.

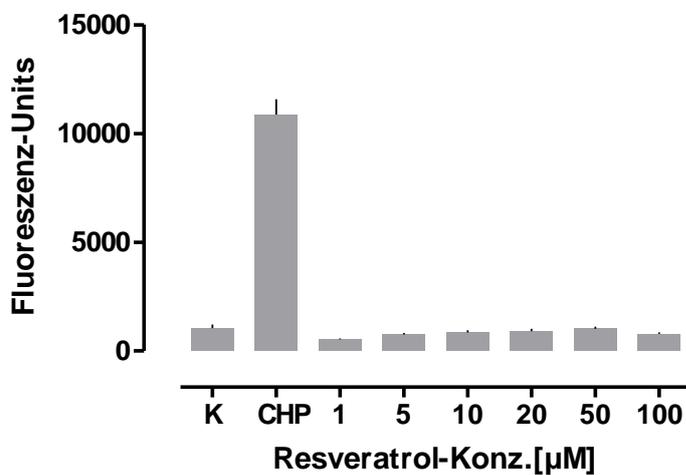
**Genistein** war die einzige Substanz, die eine prooxidative Wirkung zeigte. Dieses geschah konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Genistein zeigte sich bereits eine geringe, dann in höheren Konzentrationen stetig zunehmende Fluoreszenz, die ihr Maximum bei 10  $\mu\text{M}$  hatte. Ab 20  $\mu\text{M}$  Genistein ging die Fluoreszenz allmählich wieder zurück. Statistisch signifikant waren die Werte jedoch nur bei 10 und 20  $\mu\text{M}$  aufgrund von höheren interexperimentellen Schwankungen der absoluten Fluoreszenzwerte.

Die restlichen untersuchten Polyphenole zeigten - auch in höheren Konzentrationen - keine fluoreszenzauslösende Wirkung. Sie haben also allesamt keine prooxidativen Eigenschaften.



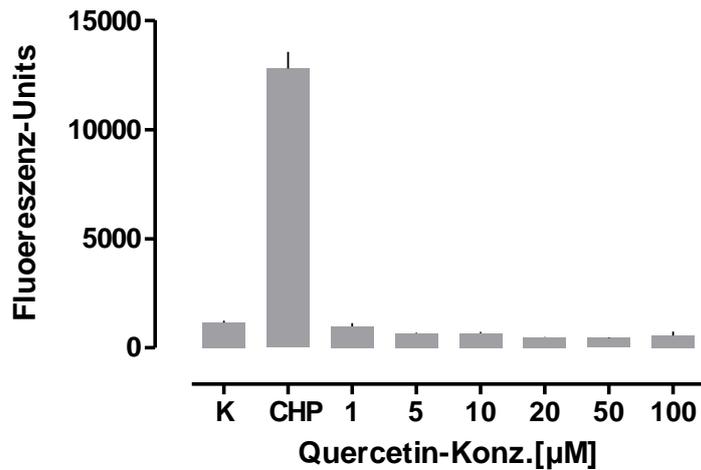
**Abb.13:** Wirkung von **Genistein** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  Versuchen (6 Wells pro Konzentration). **K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500  $\mu$ M CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol). „+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K** mit  $p < 0,05$  ,



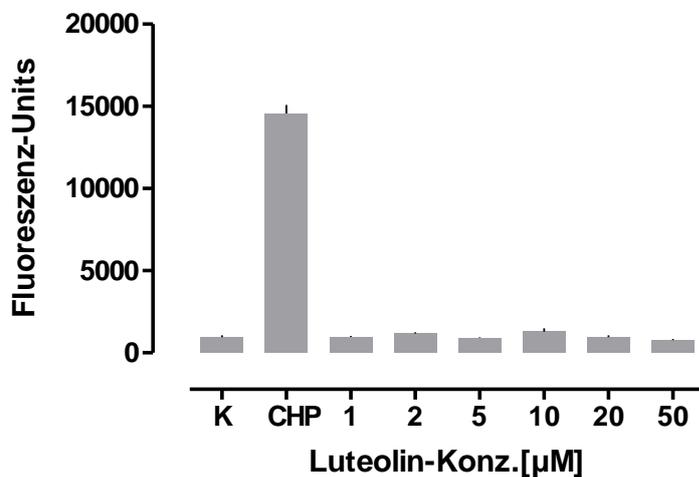
**Abb.14:** Wirkung von **Resveratrol** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 1$  Versuch (6 Wells pro Konzentration). **K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500  $\mu$ M CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)



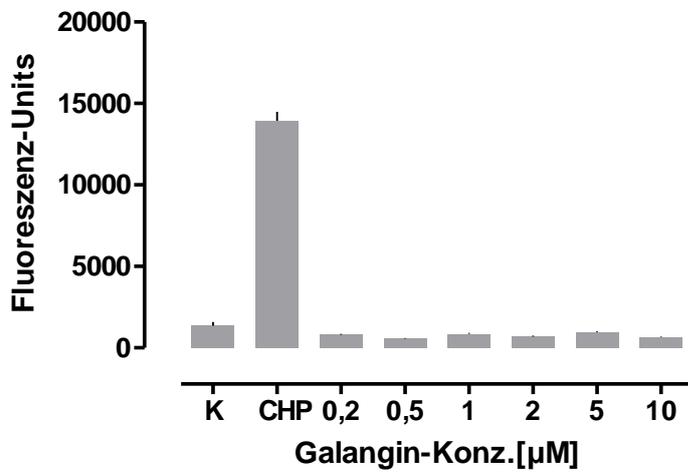
**Abb.15:** Wirkung von **Quercetin** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 1 Versuch (6 Wells pro Konzentration).  
**K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500 µM CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)



**Abb.16:** Wirkung von **Luteolin** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

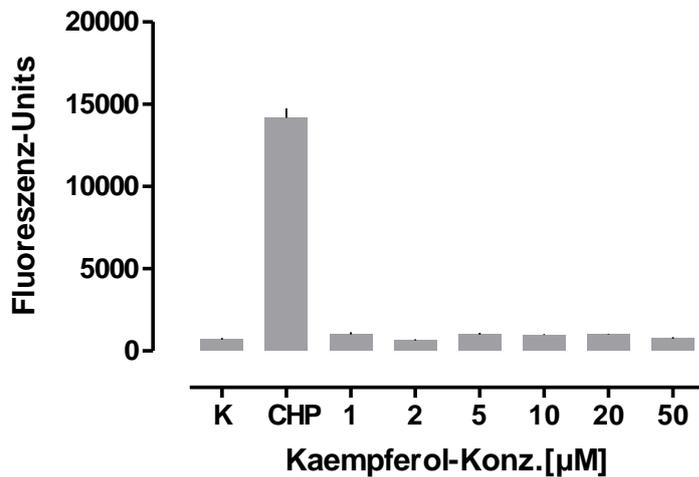
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 1 Versuch (6 Wells pro Konzentration).  
**K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500 µM CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)



**Abb.17:** Wirkung von **Galangin** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 1 Versuch (6 Wells pro Konzentration).

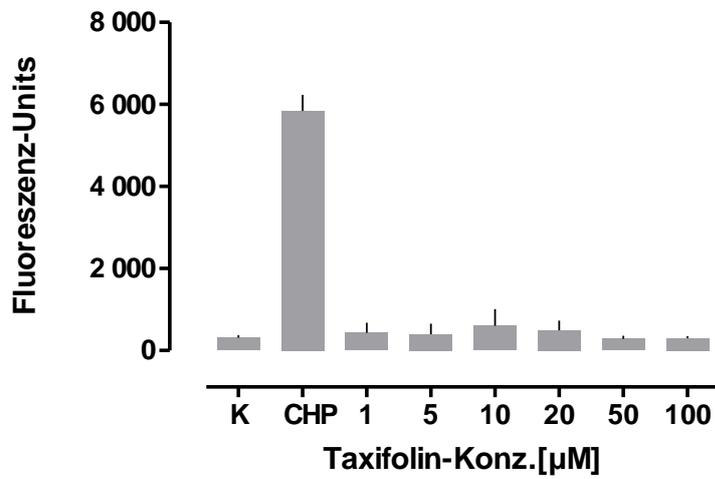
**K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500  $\mu$ M CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)



**Abb.18:** Wirkung von **Kaempferol** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 1 Versuch (6 Wells pro Konzentration).

**K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500  $\mu$ M CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)



**Abb.19:** Wirkung von **Taxifolin** auf die Radikalbildung in C6-Zellen

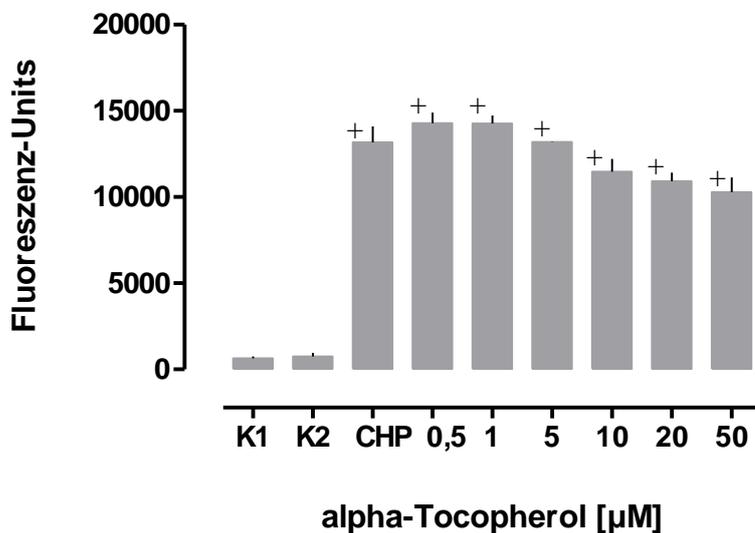
Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 1 Versuch (6 Wells pro Konzentration).  
**K** = Zellen nur mit Hanks-Puffer; **CHP** = 500  $\mu$ M CHP auf den Zellen (ohne Polyphenol)

### 3.5. $\alpha$ -Tocopherol

$\alpha$ -Tocopherol wurde zunächst im gleichen Versuchsaufbau untersucht wie die zuvor beschriebenen Polyphenole.

Abb.20 zeigt, dass  $\alpha$ -Tocopherol bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 50  $\mu$ M keine signifikante Wirkung entfaltete. Mit anderen Worten, bei gleichzeitiger Anwesenheit mit dem Peroxid ist  $\alpha$ -Tocopherol nicht in der Lage, die CHP-induzierte Radikalbildung zu hemmen.

**K2** zeigt zudem, dass das  $\alpha$ -Tocopherol selbst nicht fluoreszenzauslösend ist.



**Abb.20:** Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf die CHP-induzierte Radikalbildung

„**K 1**“ = Zellen in Hanks-Puffer, „**K 2**“ = 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol, „**CHP**“ = 500 $\mu$ M CHP.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n = 4 Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K1.

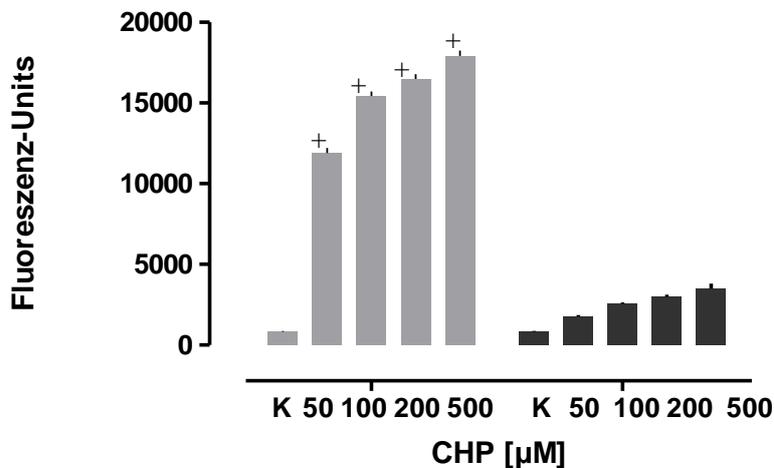
„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu **K1** mit  $p < 0,05$

Anschließend wurde geprüft, ob  $\alpha$ -Tocopherol wirksam ist, wenn die Zellen durch Vorinkubation mit dieser Substanz „aufgeladen“ werden. Hierfür wurde ein besonderer Versuchsaufbau verwendet:

Die Zellen in einer Hälfte der 96-Well-Platte wurden am Tag der Aussaat, also 24 Stunden vor Exposition mit CHP, mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol-haltigem Medium versehen, die andere Hälfte wurde als Kontrollgruppe mit tocopherolfreiem DMEM beschickt.

Am Versuchstag wurden dann zu den Zellen in jeder Hälfte jeweils 4 verschiedene CHP-Konzentrationen (je 6 Wells) gegeben. Der restliche Versuchsaufbau glich dem bisherigen.

Es zeigte sich, siehe Abb.21, dass in den mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol vorbehandelten Zellen deutlich geringere Fluoreszenzwerte vorlagen. Die Radikalbildung wurde in allen verwendeten CHP-Konzentrationen (50, 100, 200, 500  $\mu$ M) jeweils um den Faktor 5 bis 6 reduziert.



**Abb.21:** Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol-Vorinkubation (10 $\mu$ M) auf die CHP-induzierte Radikalbildung

Eine Hälfte der Platte (Spalte 1-6) war mit 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Tocopherol 24 h vorinkubiert worden, die andere Hälfte (Spalten 7-12) in unbehandeltem Medium.

Die Zellen waren am Versuchstag zunächst mit 10  $\mu$ M DCFH-DA aufgeladen und dann 30 min. mit + 50  $\mu$ M, + 100  $\mu$ M, + 200  $\mu$ M, + 500  $\mu$ M CHP inkubiert worden.

„K“ = Zellen in Hanks-Puffer.

Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=3 Versuchen mit je 6 Wells pro Konzentration bzw. 12 Wells für die Kontrolle K.

„+“ bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zu K mit  $p < 0,05$

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde intrazelluläre Radikalbildung mithilfe der Fluorimetrie gemessen.

Es wurde die DCF-Methode verwendet, der hierfür benötigte Fluoreszenzfärbstoff war 2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat. Somit war es möglich den nach Inkubation mit Cumolhydroperoxid (CHP) in C6-Zellen entstandenen oxidativen Stress zu messen.

Dabei gilt es zu beachten, dass diese Methode Radikalbildung im Allgemeinen anzeigt und keinen differenzierteren Nachweis einer spezifischen reaktiven Sauerstoffspezies ermöglicht (Halliwell and Whiteman, 2004).

Den Fluoreszenzmessungen vorangegangen waren Versuche zur konzentrationsabhängigen Zytotoxizität des CHPs. Hier zeigte sich eine deutliche zytotoxische Wirkung nach einer Exposition von 24 Stunden bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  CHP, bei welcher der Proteingehalt bereits um die Hälfte vermindert war. Ergebnisse im vergleichbaren Konzentrationsbereich fanden auch Müller (2008) ( $\text{EC}_{50}$ -Werte: 11-90  $\mu\text{M}$  CHP) und Schweda (2003) ( $\text{EC}_{50}$ : 32,3 $\pm$ 15,2  $\mu\text{M}$  CHP) für C6-Zellen. Dies stimmt ebenfalls mit Ergebnissen von Rüweler (2006) überein, deren Messungen eine halbmaximale Konzentration für die fluoreszenzauslösende Konzentration bei 13  $\mu\text{M}$  CHP in C6-Zellen ergaben. Die maximale Fluoreszenz und somit Auslösung oxidativen Stresses fand sich hier jeweils bei 500  $\mu\text{M}$  CHP, so dass diese letztendlich für die Versuche eingesetzt wurde.

Die zu untersuchenden Polyphenole zeigten sämtlich die Fähigkeit zur Reduktion von oxidativem Stress in C6-Zellen. Alle verhinderten konzentrationsabhängig die Bildung von Radikalen, waren somit antioxidativ wirksam.

Die potenteste Substanz war hierbei Luteolin, welches bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ : 1,9  $\pm$  0,5) die Auslösung der Fluoreszenz deutlich reduzierte, dicht gefolgt von Galangin, welches dies ab einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ : 2,1  $\pm$  0,6) vermochte.

Quercetin verminderte ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ : 13,0  $\pm$  1,2) die Radikalbildung. In der Literatur finden sich bei Hanneken et al. (2006), die ebenfalls mit der DCF-Methode gearbeitet haben, antioxidative Effekte gegenüber 500  $\mu\text{M}$  T-Butyl-Hydroperoxid (t-BOOH) wie folgt: 2 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$  Luteolin zeigten an humanen RPE 159-Zellen ihre halbmaximale Wirksamkeit, an ARPE 19-Zellen waren dagegen 14 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$  Luteolin für den gleichen Effekt erforderlich. Für Galangin fanden Hanneken et al. 26 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$  (RPE-159-Zellen) bzw. 32 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$  (ARPE-19-Zellen) Galangin zur antioxidativen Wirksamkeit gegenüber t-BOOH an  $\text{EC}_{50}$ -Werten. Quercetin zeigte an RPE-159-Zellen eine halbmaximal wirksame Konzentration von 6 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$  und an ARPE-Zellen von 18 $\pm$ 1  $\mu\text{M}$ . Diese Werte sind also durchaus vergleichbar mit den hier gemessenen.

Alia et al. (2005) hatten für Quercetin ähnliche antioxidativ wirksame Konzentrationen gemessen wie hier bzw. bei Hanneken. So reduzierten dort 10  $\mu\text{M}$  Quercetin die durch 200  $\mu\text{M}$  t-BOOH ausgelöste DCF-Fluoreszenz nach 20 minütiger Vorinkubation bereits auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen in humanen Hepatoma HepG2-Zellen.

Auch Kaempferol, Taxifolin und Genistein waren von Hanneken auf ihre antioxidative Wirksamkeit gegenüber T-BOOH untersucht worden, dort jedoch hatte sich keine signifikante antioxidative Wirksamkeit im mikromolaren Bereich finden lassen. Dieses unterscheidet sich von denen in der hier vorliegenden Arbeit weiter gewonnenen Ergebnissen, die auch für diese drei Substanzen antioxidative Wirksamkeit zeigen. So war Kaempferol bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ :  $8,0 \pm 0,1$ ) in der Lage die Fluoreszenzauslösung zu reduzieren und Taxifolin sowie Genistein signifikant ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$  für Taxifolin:  $30,1 \pm 8,2$  bzw. Genistein:  $22,2 \pm 6,8$ ). Genistein zeigte auch bei Record et al. (1995b) und Kruk et al. (2005) einen Radikal-„scavenging“-Effekt.

Resveratrol, wohl eines der am meisten untersuchten Polyphenole, zeigte hier seine halbmaximale antioxidative Wirksamkeit gegenüber 500  $\mu\text{M}$  CHP bei  $17,7 \pm 6,8$   $\mu\text{M}$ . Dieses unterscheidet sich ein wenig von den Ergebnissen bei Riweler (2006), in welcher ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 6,6  $\mu\text{M}$  für die Fluoreszenzhemmung nach der DCF-Methode für C6-Zellen gemessen worden war. Ishige et al. (2000) zeigten an HT-22-Maushippocampus-Zellen einen antioxidativen Effekt von Resveratrol gegenüber 5 mM Glutamat bei einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert 8  $\mu\text{M}$ .  $\alpha$ -Tocopherol zeigte eine besondere antioxidative Wirksamkeit. Es wirkte *nicht* wie die anderen Polyphenole in der zeitgleichen Anwesenheit mit dem Peroxid CHP signifikant radikalhemmend. In einem zweiten Versuchsaufbau jedoch waren die Zellen 24 Stunden zuvor in einem mit  $\alpha$ -Tocopherol angereicherten Medium inkubiert worden, bevor CHP hinzugegeben wurde. Hierbei zeigte sich verglichen mit der Kontrollgruppe ein deutlicher Rückgang der Fluoreszenz um das 5- bis 6-fache.

Erklären lässt sich dieser Unterschied zwischen den Versuchsaufbauten möglicherweise folgendermaßen:  $\alpha$ -Tocopherol wird nur langsam in die Zellen aufgenommen. Erst nach 24 Stunden erreicht die  $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation ihr Maximum, während CHP rasch aus dem Medium in die Zellen aufgenommen wird, und die zytotoxische Wirkung bereits innerhalb der ersten Stunden der Exposition einsetzt (Zielinska et al., 2002; Kussmaul et al., 1999). Die Lipidperoxidation wird durch Reaktion des  $\alpha$ -Tocopherols mit Peroxyl- und Alkoxyradikalen in der Lipidmembran abgebrochen. Dabei entsteht ein Tocopheroxyradikal.

Durch Reaktion des Tocopheryloxylradikals mit anderen in der Zelle vorhandenen Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, GSH oder Ubichinon wird das  $\alpha$ -Tocopherol dann wieder regeneriert (Munteanu et al., 2004).

Für die antioxidative Wirksamkeit von Genistein sind oben bereits Beispiele in der Literatur genannt worden. Bezüglich seiner prooxidativen Fähigkeit, also selbst radikalbildend sein zu können, fanden sich auch bei Rucinska et al. (2008) in NIH 3T3-Zellen, bzw. bei Sanchez et al. (2008) in U937-Zellen, Hinweise. Klein und King (2007) bringen diesen Effekt für Genistein unter anderem mit DNA-Schädigung in Zusammenhang.

Dass ein- und dieselbe Substanz sowohl pro- als auch antioxidativ wirksam sein kann, ist vielfach beschrieben worden. Cotelle et al. (2001) erklären dieses über eine hohe Reaktionsbereitschaft, über Kettenreaktionen in Anwesenheit von Übergangsmetallionen und Autooxidation. Entscheidend für die Art der Wirkung seien die Konzentration, sowie die Art der vorhandenen Sauerstoffspezies, auch die Hydroxylgruppe am B-Ring ist hierfür von Bedeutung. So gilt für Flavanone und Flavone, die die für Flavonoide typische chemische Basisstruktur enthalten, dass sie ohne Hydroxylgruppe weder eine pro- noch eine antioxidative Wirkung entfalten würden (Cotelle et al., 2000). Je mehr OH-Gruppen, desto stärker sei die, z.B. durch Kupferionen initiierte, prooxidative Wirkung.

Die anderen Polyphenole waren nach den auffälligen Werten bei Genistein hinsichtlich seiner gleichzeitig anti- als auch prooxidativen Wirksamkeit sämtlich auf einen möglichen radikalbildenden Effekt in einer eigenen Versuchsreihe getestet worden. Mit der bereits beschriebenen Ausnahme von Genistein waren die Substanzen jedoch nicht radikalauslösend. Untersuchungen diesbezüglich hatten auch Leung et al. (2006) für Luteolin in CH27-Zellen und (2007) für Kaempferol in H460-Zellen mit ebenfalls ausbleibender prooxidativer Wirkung vorgenommen.

In der Literatur (Cotelle, 2001) sind im Wesentlichen drei Wirkmechanismen beschrieben, wie Substanzen oxidativem Stress vorbeugen, also antioxidativ wirksam sein können:

- a) durch Verhindern der Entstehung von Radikalen in der Fenton-Reaktion, z.B. durch Bildung von Chelatkomplexen mit Eisen,
- b) über das Abfangen („scavenging“) von Radikalen, also Schutz vor Akkumulation von Radikalen intrazellulär, sowie
- c) Eingriff in den intrazellulären antioxidativen Stoffwechsel, so z.B. Verhinderung von Lipidperoxidation durch  $\alpha$ -Tocopherol.

In den in dieser Studie durchgeführten Experimenten dürften insbesondere die Verhinderung der Radikalbildung und das Scavenging, aufgrund der Kürze der Inkubationszeit in den Versuchen mit den Polyphenolen, die entscheidende Rolle gespielt haben. Welche der beiden Wirkprinzipien auf die jeweilige Substanz zutrifft, lässt sich anhand der Messung nach der DCF-Methode nicht näher bestimmen. Rice-Evans et al. (1997) und Cotelle (2001) beschreiben ebenfalls für Flavonoide sowohl eine chelatbildende Wirkung als auch die Fähigkeit zum „scavenging“. Genistein und Resveratrol sind nicht in der Lage (Eisen-)Chelatkomplexe zu bilden, wirken jedoch gut als Radikalfänger (Kruk et al., 2005, Murias et al., 2005, Ozgova et al., 2003). Die starke antioxidative Wirksamkeit nach 24 Stunden im Versuch zur Vorinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol kann dagegen durch die Verhinderung von Lipidperoxidation erklärt werden, welches in früheren Studien unter vergleichbaren Bedingungen mit C6-Zellen untersucht worden ist.

Auffällig war, dass die hier durchgeführten In-Vitro-Versuche anhand der C6-Zelllinie hinsichtlich der antioxidativen Potenz von Polyphenolen eine gänzliche andere Reihenfolge hinsichtlich ihrer Potenz untereinander ergaben, als die ansonsten zur Untersuchung antioxidativer Wirksamkeit gerne eingesetzten TEAC-Werte, einem zellfreien Assay. Wie in Tabelle 6 zu erkennen, hat im TEAC-Assay Quercetin die stärkste antioxidative Wirksamkeit, während es in den hier durchgeführten Versuchen nur im mittleren Bereich der antioxidativen Wirkung liegt. Dagegen sind die hier mit Abstand am stärksten antioxidativ wirkenden Substanzen

Luteolin und Galangin in den TEAC-Assays nur mäßig wirksam.

Somit ist zumindest fragwürdig, ob die im TEAC-Assay gewonnenen Erkenntnisse auf zelluläre In-Vitro- oder gar In-Vivo-Systeme übertragbar sind. In der Literatur sind zudem sehr unterschiedliche Ergebnisse für *zellfreie* Versuche zur antioxidativen Wirksamkeit von Polyphenolen zu finden, so dass Aruoma et al. (2003) sogar die Anwendung dieser dort gewonnenen Ergebnisse auf der zellphysiologischen Ebene in Frage stellen.

Inwieweit andererseits an intakten Zellen, wie in dieser Arbeit, beobachtete Effekte zur Prognose pro- bzw. antioxidativer Wirkungen von Polyphenolen *in vivo* beitragen können, müssen weiterführende Untersuchungen ergeben.

## 5. Zusammenfassung

Oxidativer Stress wird immer wieder in Zusammenhang gebracht mit der Entstehung diverser chronischer Krankheiten wie Arteriosklerose, der Carcinogenese und neurodegenerativer Erkrankungen. Vielen sogenannten sekundären Pflanzenstoffen, wie z.B. den Flavonoiden wird ein schützender Effekt vor oxidativem Stress zugesprochen.

In dieser Arbeit sind verschiedene Polyphenole, ausgewählte Flavonoide, das Hydroxystilben Resveratrol, sowie  $\alpha$ -Tocopherol - als eine der wichtigsten Vitamin-E-Komponenten - hinsichtlich einer möglichen Schutzwirkung gegenüber der Auslösung von oxidativem Stress, d.h. ihrer antioxidativen Potenz, getestet worden.

Alle untersuchten Polyphenole haben sich hierbei als antioxidativ wirksam erwiesen.

Sie waren sämtlich in der Lage, den durch Cumolhydroperoxid in C6-Astrogliazellen ausgelösten oxidativen Stress konzentrationsabhängig zu vermindern.

Dieses zeigte sich bereits in niedrigen, mikromolaren Konzentrationen.

In den fluorimetrischen Versuchen zeigten die Substanzen unterschiedliche antioxidative Potenz. Das Flavonoid mit der größten antioxidativen Wirksamkeit war Luteolin mit einer statistisch signifikanten Fluoreszenzhemmung bereits ab einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  und einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $1,9\pm 0,5\mu\text{M}$ . Dicht gefolgt in der Reihe der potentesten antioxidativen Substanzen steht nun Galangin an 2. Stelle bei einer deutlichen Fluoreszenzminderung ab einer Konzentration von  $2\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ :  $2,1\pm 0,6\mu\text{M}$ ). Weiterhin erwiesen sich als antioxidativ gut wirksam Kaempferol ab einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  und einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $8,0\pm 0,1\mu\text{M}$ , sowie Quercetin auch ab  $10\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ :  $13,0\pm 1,2\mu\text{M}$ ).

Das Hydroxystilben Resveratrol zeigte ab einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$  eine statistisch signifikante Wirkung ( $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $17,7\pm 6,8\mu\text{M}$ ), ebenso wie das Isoflavon Genistein ab  $20\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ :  $22,2\pm 6,8\mu\text{M}$ ) und weiterhin, wenn auch weniger potent, das Flavonoid Taxifolin ab einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ -Wert:  $30,1\pm 8,2\mu\text{M}$ ).

$\alpha$ -Tocopherol zeigte bei gleichzeitiger Anwesenheit des Peroxids CHP keine statistisch signifikante Wirksamkeit, wohl aber nach Vorinkubation. Waren die Zellen 24 Stunden lang mit  $\alpha$ -Tocopherol vorbehandelt worden, so zeigte sich eine deutliche antioxidative Wirkung.

Das Isoflavon Genistein zeigte eine Besonderheit. Es war in der Lage, die Zellen vor CHP-induzierter Radikalbildung zu schützen, löste jedoch selbst Radikalbildung aus. Es war somit also nicht nur antioxidativ (ab einer Konzentration von  $20\mu\text{M}$ ), sondern auch pro-oxidativ wirksam (statistisch signifikant ab einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$ ).

Eine derartige prooxidative Wirkung trat bei keinem anderen Polyphenol auf.

Verantwortlich für die antioxidative Wirkung der Polyphenole werden vor allem folgende Mechanismen gemacht: Das Abfangen („scavenging“) freier Radikale, das Verhindern der Radikalbildung wie z.B. durch Bildung von Chelat-Komplexen und der Eingriff in den antioxidativen Stoffwechsel, z.B. durch Up-/Down-Regulation von Enzymen.

Letzteres dürfte aufgrund der verhältnismäßig kurzen Inkubationszeit in den hier durchgeführten Versuchsaufbauten jedoch eher eine untergeordnete Rolle gespielt haben.

Interessant war zudem, dass die hier gewonnenen Ergebnisse in C6-Zellen, im Vergleich mit zellfreien Versuchen zur antioxidativen Wirksamkeit von Polyphenolen wie dem TEAC-Assay, eine ganz andere Reihenfolge hinsichtlich der Potenz dieser Substanzen ergaben.

Somit ist fraglich, inwieweit Ergebnisse aus zellfreien Versuchen auf In-Vitro- oder gar In-Vivo-Modelle anwendbar sind.

## 6. Literaturverzeichnis

Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Bravo, L., Goya, L. (2005). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19: 110-118

Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mut. Res.*, 9-20

Baur, J.A. and Sinclair (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews* 5, 493-506

Benda P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968 Jul.26, 161 (839): 370-1

Cohen, G. (1985). The Fenton Reaction. In Robert A. Greenwald (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 55-64

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 569-590

D'Anna R. (2007). Effects of the phytoestrogen genistein on hot flashes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women, *Menopause* 2007 Jul- Aug 14 (4): 648-55

Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J., Hamprecht, B. (1999). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J.Neurochem.* 72 (6), 2523-2530

Duranteau, J., Chandel, N.S., Kulisz, A., Shao, Z., Schumacker, P.T. (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273 (19): 11619-24.

Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am.J.Clin.Nutr.* 53: 314S-321S

Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc., New York

Halliwell, B. (1990). How to characterise a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* 9:1-32; 1990

Hanneken, A., Lin, F.F., Johnson, J., Maher, P. (2006). Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.* 47, 3164-3177

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

Klein, C.B. and King, A.A., (2007). Genistein genotoxicity. Critical considerations of *in vitro* exposure dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 1-11

Kruk, I., Aboul-Enein, H., Michalska, T., Lichszteid, K., Kladna, A. (2004). Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 2005, 20: 81-89

Leung, H.W.-C., Kuo, C.-L., Yang, W.-H., Lin, C.-H., Lee, H.-Z. (2006). Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 54, 12-18

Leung, H.W.-C., Lin, C.-J., Hour, M.-J., Yang, W.-H., Wang, M.-Y., Lee, H.-Z. (2007). Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2005-2013

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275

Müller, Agnes (2008). Akkumulation von Vitamin E in C6-Rattengliomzellen und zytoprotektive Wirkung gegen oxidativen Stress. Inauguradissertationsarbeit, Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Murias, M., Jäger, W., Handler, N., Erker, T. (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 69: 903-912

Muntaenu, A., Zingg, J. M., Azzi, A. (2004). Anti-atherosclerotic effects of vitamin E - myth or reality? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, 59-76

Ozgoval, S., Hermanek, J., Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1127-1137

Record, I.R., Jannes, M., Dreosti, I.E., King, R.A. (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chemistry Toxicology* 33 (11): 919-22

Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Paganga, G. (1997). Anti-oxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159

Royall, J.A. and Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2'-7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 302, Issue 2, 1 May 1993: 348-355

Rucinska, A., Roszczyk, M., Gabryelak, T. (2008). Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biology International* 2008, August (8): 1019-23

- Rüweler, M. (2006). Zytoprotektive Wirkung von Resveratrol-Analogen gegen oxidativen Stress: Untersuchungen an C6-Gliomazellen in vitro. Diplomarbeit für Pharmazie, CAU Kiel
- Sanchez, Y., Amran, D., Fernandez, C., Blas, E., Aller, P. (2008). Genistein selectively potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human leukemia cells via reactive oxygen species generation and activation of reactive oxygen species-inducible protein kinases (p38-MAPK, AMPK). *International Journal of Cancer* 123, 1205-1214
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., Yamasaki, H. (2002). Plant phenolics antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80
- Schweda, K. (2004). Oxidative Schädigung von C6 Rattengliomzellen durch Wasserstoffperoxid und Cumulhydroperoxid und der Einfluss von Antioxidantien unterschiedlicher Wirkungsweise. Medizinische Dissertation, CAU Kiel
- Shahidi, F. and Wanasundara, P.K.J. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* 32: 67-103
- Sonee, M., Sum, T., Wang, C., Mukherjee, S.K. (2004). The soy isoflavone, Genistein, protects human cortical neuronal cells from oxidative stress. *Neuro. Toxicol.* 25, 885-891
- Spencer A.P., Carson D.S., Crouch M.A. (1999). Vitamin E and coronary artery disease. *Arch. Intern. Med.* 159: 1313-1320
- Starke, P.E. and Faber, J.L. (1985). Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* 260, 10099-10104
- Sun, A.Y., Simonyi, A., Sun, G.Y. (2002). The "French Paradoxon" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad. Biol. & Med.* 32, 314-318
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 286(3): R 431-44

Ulrich, S., Wolter, F., Stein J.W. (2005). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 452-461

Vernadikis, A. and Nidess, R. (1976). Biochemical characteristics of C6 glia cells. *Neurochem. Res.* 1, 385-402

Vroegrop, S. M.; Decker, D. E.; Buxser, S. E. (1995). Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 141-151

Zhang G., Qin L., Shi Y. (2007). Epidemium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women, *J Bone Miner Res.* 2007 Jul. 22(7):1072-9

Zielinska, M., Gülden M., Seibert, H. (2003). Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. *Environ.Toxicol.Pharmacol.* 13, 47-53

## 7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Maser für die Bereitstellung des Themas und eines Arbeitsplatzes im Institut für Toxikologie.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Hasso Seibert für die geduldige und ausdauernde Betreuung, unermüdliche Unterstützung, sowie jederzeit ein offenes Ohr.

Frau Sabine Seibert bin ich unglaublich dankbar für die Anleitung und Hilfe in allen praktischen Fragen der Laborarbeit, sowie die stets freundlichen und aufmunternden Worte.

Auch Herrn Dr. Gülden hiermit meinen Dank für wiederholte Anregungen und Unterstützung.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Gerhard und Ute Tolksdorf, und meinem Mann, Christoph Anker, sei diese Arbeit gewidmet. Ich danke Euch für Eure Liebe und Unterstützung sowie den unerschütterlichen Glauben an mich und an die Vollendung dieser Arbeit.

## 8. Lebenslauf

Anika Anker, geb. Tolksdorf,

geboren am 09.03.1980 in Ratzeburg

1986-1990: Grundschule St.Georgsberg in Ratzeburg

1990-2000: Besuch des Gymnasiums Lauenburgische Gelehrtenschule in Ratzeburg/Ab itur

2000-2001: Freiwilliges Soziales Jahr St. Nicolaiheim Sundsacker bei Kappeln

2001-2004: Studium der Humanmedizin (Vorklinik) mit Physikum an der Universität Rostock

April 2004-Juni 2008: Klinischer Abschnitt Humanmedizin an der CAU-Universität zu Kiel

Februar 2007- Januar 2008: Praktisches Jahr

Juni 2008: Abschluss des Staatsexamens

August 2008 – Dezember 2009: Assistenzärztin Abteilung Innere Medizin, Diako Flensburg

Seit 01.01.2010: Krankenhaus Rendsburg-Eckernförde, Assistenzärztin Medizinische Klinik

