

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE
PROF. DR. RAINER RUPPRECHT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG VON ANTHOCYANEN UND PROCYANIDINEN
AUF DIE CYTOCHROM P450-ISOENZYME 1A2 UND 2C19

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Michael Stang

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE
PROF. DR. RAINER RUPPRECHT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

WIRKUNG VON ANTHOCYANEN UND PROCYANIDINEN
AUF DIE CYTOCHROM P450-ISOENZYME 1A2 UND 2C19

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Michael Stang

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Göran Hajak

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wilhelm Schulte-Mattler

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 2012

Teile der vorliegenden Arbeit waren Gegenstand des Zeitschriftenbeitrags:

Sand, P.G., Dreiseitel, A., Stang, M., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G.: Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents, *Phytotherapy Research*, 24, 2010, S. 304-07

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1. Der Beitrag von Flavonoiden zur Ernährung.....	8
1.1.1. Einteilung, Vorkommen, Aufnahme.....	8
1.1.2. Stoffwechsel und Bioverfügbarkeit.....	11
1.1.3. Gesundheitlicher Nutzen.....	13
1.1.4. Aufnahme von Flavonoiden aus „neuen Lebensmitteln“.....	14
1.1.5. Beispiele unerwünschter Wirkungen von Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln.....	17
1.2. Cytochrom P450-Enzyme.....	18
1.2.1. Einteilung und Vorkommen	18
1.2.2. Funktion.....	19
1.2.3. Substrate, Induktoren und Inhibitoren.....	20
2. ZIELSETZUNG	22
3. METHODIK	23
3.1. Flavonoide und Referenzsubstanzen.....	23
3.2. Luminometrischer Nachweis der CYP450-Aktivität.....	24
3.2.1. Messung der CYP1A2-Aktivität.....	26
3.2.2. Messung der CYP2C19-Aktivität.....	30
3.3. Auswertung der Messergebnisse.....	33
4. ERGEBNISSE	35
4.1. Effekte auf die CYP1A2-Aktivität.....	35
4.1.1. Konzentrationsabhängigkeit.....	35
4.1.2. IC ₅₀ -Werte zu CYP1A2.....	38
4.1.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und in vitro-Effekten.....	41
4.2. Effekte auf die CYP2C19-Aktivität.....	42
4.2.1. Konzentrationsabhängigkeit.....	42
4.2.2. IC ₅₀ -Werte zu CYP2C19.....	45
4.2.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und in vitro-Effekten.....	48
5. DISKUSSION	50
5.1. Inhibition von CYP1A2.....	50
5.2. Effekte auf die CYP2C19-Aktivität.....	52
5.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und Effekten auf das Cytochrom P450-System.....	55
5.4. Beurteilung der Effektstärken – klinische Relevanz.....	58
5.4.1. Risiko von Lebensmittel-Medikament-Interaktionen.....	58
5.4.2. Inhibition von CYP1A2 und CYP2C19.....	59
5.4.3. Induktion von CYP1A2 und CYP2C19.....	63

5.4.4. CYP450-Polymorphismen.....	65
5.4.5. Antikarzinogene Effekte von Flavonoid-Interaktionen mit dem Cytochrom P450-System.....	66
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	72
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	91
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
DANKSAGUNG.....	95
LEBENS LAUF.....	96

1. EINLEITUNG

1.1. Der Beitrag von Flavonoiden zur Ernährung

1.1.1. Einteilung, Vorkommen, Aufnahme

Die Flavonoide zählen zur Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Hierunter fallen Stoffwechselprodukte, die nicht primär der Photosynthese, dem Pflanzenwachstum oder ihrer Entwicklung dienen. Flavonoide sind zugleich mit über 4000 Einzelverbindungen die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole, also aromatische Strukturen, die zwei oder mehr Hydroxylgruppen enthalten (Watzl & Rechkemmer 2001; Mason 2007; Mozzicafreddo et al. 2009). Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen Ringen (A und B, Abb. 1) und einem O-heterozyklischen Ring (C, Abb. 1). Anhand struktureller Unterschiede am C-Ring lassen sich Flavonoide in sechs verschiedene Gruppen einteilen: Anthocyanidine, Flavanole, Flavonole, Flavanone, Flavone und Isoflavone (Abb. 1).

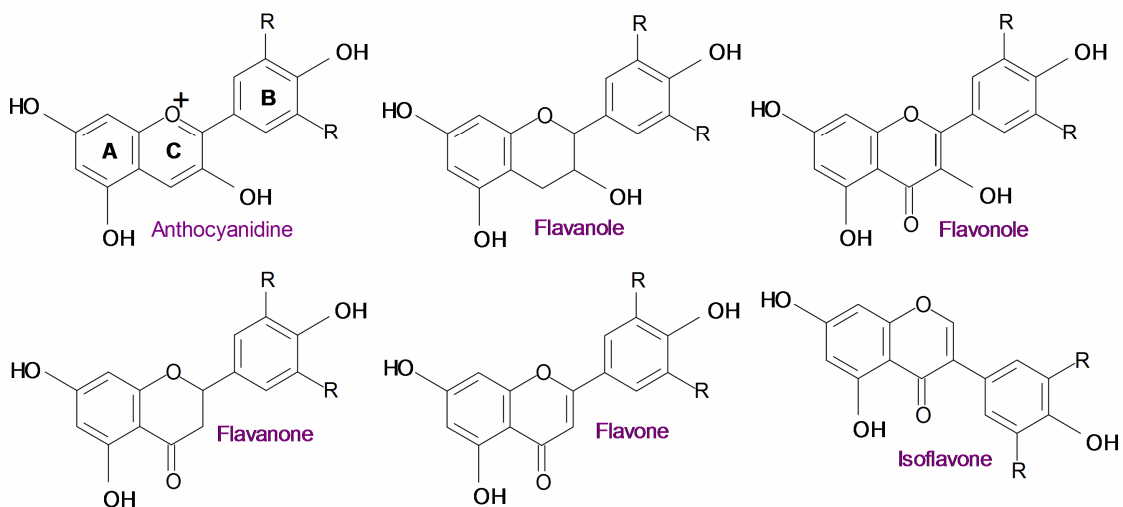


Abbildung 1: Hauptgruppen der Flavonoide
(Vgl. Watzl & Rechkemmer 2001)

Mit Ausnahme der Flavanole kommen Flavonoide in der Natur als Glykoside vor. Dabei gehen mehr als 80 verschiedene Zucker eine Verbindung mit Flavonoiden ein (Watzl & Rechkemmer 2001).

Eine besondere Bedeutung unter den Flavonoiden kommt Anthocyanen und Procyanidinen zu, da die gesundheitsfördernde Wirkung vieler pflanzlicher Lebensmittel mit ihnen in Zusammenhang gebracht wird (Mason 2007; Neto 2007; Gerhauser 2008).

Anthocyanidine (Aglykone) und Anthocyanine (Glykoside) bilden die beiden Untergruppen der Anthocyane (griechisch, anthos = Blüte, kyanos = blau). Diese stellen die größte Gruppe an wasserlöslichen Farbpigmenten mit dem Spektrum rot-blau-schwarz in Pflanzen dar. Die Farbe vieler Obst- und Gemüsesorten erklärt sich durch ein Absorptionsmaximum der Anthocyane bei einer Wellenlänge von 465-560nm (Watzl et al. 2002).

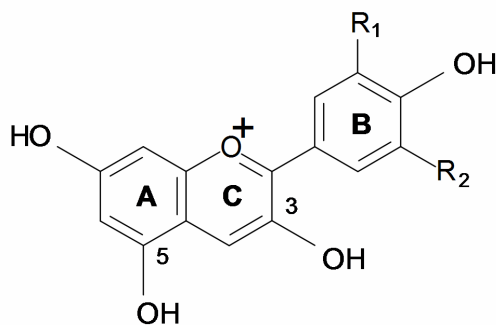


Abbildung 2: Grundstruktur der Anthocyane
(Vgl. Watzl et al. 2002)

Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden weisen alle Anthocyane eine positive Ladung am C-Ring auf (Abb. 2). Während das Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster des B-Rings variabel ist, erfolgt die Glykosylierung konstant an der OH-Gruppe in Position 3 des C-Rings bzw. an Position 5 des A-Rings (Watzl et al. 2002, Abb. 2). Glukose, Galaktose, Arabinose und Rhamnose bilden jeweils die Mono-, Di- und Trisaccharide. Die Glykoside von Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin kommen in Pflanzen am häufigsten vor (Watzl et al. 2002).

Neben den Anthocyanen stellen Flavanole die häufigsten Flavonoide in der menschlichen Nahrung dar (Ferreira & Slade 2002; Tapiero et al. 2002). Procyanidine sind oligomere Flavanole, wobei die in dieser Arbeit untersuchten Procyanidine B1 und B2 aus diastereomeren Flavanol-Dimeren bestehen (Abb. 3).

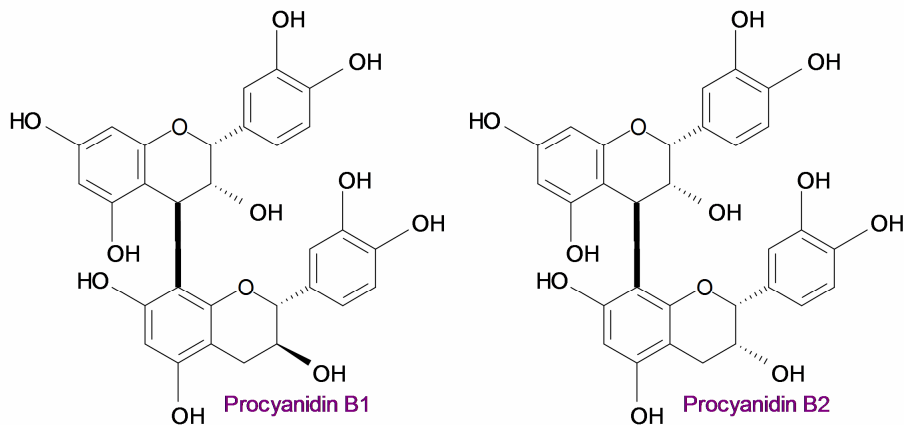


Abbildung 3: Procyanidin B1 und B2
(Vgl. Kang et al. 2008; Tanaka et al. 2008)

Schwankungen in der Menge täglich aufgenommener Flavonoide erklären sich unter anderem durch die Abhängigkeit des Flavonoidgehalts einer Pflanze von der Pflanzensorte und von klimatischen Faktoren. Da die Flavonoidsynthese lichtabhängig ist, wirkt sich auch die Jahreszeit zum Zeitpunkt der Ernte auf den Gehalt in Obst und Gemüse aus. So enthält im August geernteter Kopfsalat drei- bis fünfmal mehr Flavonoide als im April geernteter (Watzl & Rechkemmer 2001). Reich an Anthocyanen sind vor allem rot, violett und blau gefärbte Beeren, Trauben sowie Rotkohl (Cooke et al. 2005). Apfelbeeren enthalten ca. 1480mg, Holunderbeeren 749 mg, Blaubeeren 588mg, Schwarze Johannisbeeren 476mg, Rotkohl 322mg, Kirschen 117 mg und rote Zwiebeln 13mg Anthocyane in 100g Frischgewicht (Nyman & Kumpulainen 2001; Wu et al. 2006; Mason 2007). In die menschliche Nahrung gelangen Anthocyane auch als zugelassener Lebensmittelzusatzstoff unter der E-Nummer 163 (Zusatzstoff-Verkehrsverordnung 1998).

Procyanidine sind pro 100g Frischgewicht in besonders hohen Mengen z.B. in Zimt (8108mg), Hirse (1920mg), Kakao (1636mg), Moosbeeren (419mg) oder Rotwein (313mg) enthalten (Gu et al. 2004). Grüner Tee beinhaltet ca. 132mg,

Kirschen 12mg, Äpfel 9mg und Holunderbeeren 1mg der oligomeren Flavane in 100g Frischgewicht (Mason 2007).

Der tägliche Pro-Kopf-Konsum von Anthocyanen wurde ursprünglich in Industrienationen auf durchschnittlich 180 – 215mg geschätzt (Kühnau 1976). Neuere Berechnungen aus US-amerikanischen Erhebungen gehen nur von einer täglichen Aufnahme von 12,5mg aus (Wu et al. 2006). Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass die tatsächliche Aufnahme stark von soziodemographischen und Lifestyle-bedingten Faktoren (Chun et al. 2007), sowie der saisonalen Verfügbarkeit von anthocyanreichem Obst und Gemüse abhängig ist (Wu et al. 2006). Bereits mit dem Konsum eines Glases Rotwein (100ml) werden 24-35mg Anthocyane aufgenommen. Durch regelmäßigen Obstverzehr können deutlich höhere Aufnahmemengen (mehrere hundert mg/Tag) erzielt werden (Watzl et al. 2002).

Der Verzehr von oligomeren und polymeren Flavanolon wird in den USA auf 53,6 mg/Tag/Person geschätzt. Davon sind 6,4mg Dimere wie Procyanidin B1 und B2 (Gu et al. 2004). Je nach Ernährungsgewohnheiten können z.B. Personen, die Nahrungsergänzungsmittel verwenden eine Aufnahme von mehreren hundert Milligramm Procyanidinen am Tag erreichen (Prior & Gu 2005).

1.1.2. Stoffwechsel und Bioverfügbarkeit

Zu Aufnahme und Metabolismus von Anthocyanen im menschlichen Organismus wird postuliert, dass ein Teil als Glykoside (Anthocyanine) bereits im Magen unter Beteiligung der Bilitranslocase absorbiert wird und über die Leber in den Blutkreislauf gelangt (Passamonti et al. 2002). Im Jejunum erfolgt mutmaßlich eine weitere Aufnahme über den Natrium-abhängigen Glukose-Cotransporter SGLT1. Zudem kommt es im Dünndarm wahrscheinlich zu einer Hydrolyse der Anthocyanine, wodurch deren Aglykone (Anthocyanidine) entstehen. Diese werden ebenfalls absorbiert (Arts et al. 2004; McGhie & Walton 2007). Schließlich wird angenommen, dass Anthocyanine, die das Kolon erreichen, von der dortigen

mikrobiellen Flora zu phenolischen Säuren abgebaut werden (McGhie & Walton 2007).

Tabelle 1: Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen

Material	Anthocyan-Dosis	c _{max} (a)	Urinausscheidung (b)	Referenz
Rotwein (300ml)	218mg	k.A.	5,1% (12h)	Lapidot et al. 1998
Holunderbeeren-Extrakt (25g)	1500mg	100ng/ml (0,5h)	k.A.	Cao & Prior 1999
Schwarze Johannisbeeren-Konzentrat (33mg/kg KG)	236mg	0,12µM (1,25-1,75h)	0,11% (8h)	Matsumoto et al. 2001
Blaubeer-Pulver (100g)	1200mg	0,029µM (4h)	k.A.	Mazza et al. 2002
Holunderbeeren-Extrakt (12g)	720mg	0,097µM (1,2h)	0,06% (24h)	Milbury et al. 2002
Blaubeeren (189g)	690mg	k.A.	0,004% (6h)	Wu et al. 2002
Rotwein (400ml)	180mg	43ng/ml (1,5h)	0,23% (7h)	Frank et al. 2003
Roter Traubensaft (400ml)	284mg	100ng/ml (0,5h)	0,18% (7h)	Frank et al. 2003
Schwarze Johannisbeeren-Saft (4,4g; 2,7g; 2,7g)	1239mg 716mg 746mg	53ng/ml (0,75h) 16ng/ml (0,75h) 32 ng/ml (1,5h)	0,07% (4h) 0,05% (4h) 0,05% (4h)	Nielsen et al. 2003
Erdbeeren (200g)	76mg	k.A.	1,8% (24h)	Felgines et al. 2003
Apfelbeeren-Extrakt (7,1g)	721mg	0,096µM (2,8h)	0,15% (24h)	Kay et al. 2004

(a): maximale Plasmakonzentration; in Klammern: Zeit bis zum Erreichen von c_{max}

(b): in Prozent der aufgenommenen Menge; in Klammern: Zeit zwischen Einnahme und Messung

In bisherigen Studien lagen je nach oral aufgenommener Menge von Anthocyanen die maximalen Plasmakonzentrationen beim Menschen zwischen 0,029µM und 0,12µM bzw. zwischen 16ng/ml und 100ng/ml (Tab. 1). Nur ein geringer Anteil der aufgenommenen Anthocyane (0,004% - 5,1%) wird mit dem Urin ausgeschieden (Tab.1). Hieraus ist auf eine geringe Bioverfügbarkeit von Anthocyanen geschlossen worden (Watzl et al. 2002). Ein Hauptgrund dafür könnte der Abbau der Anthocyanine durch die intestinale Mikroflora sein (Fleischhut et al. 2006). Als weitere Faktoren kommen in Betracht: eine Hydrolyse der Zuckerkomponente vor der Absorption oder die bekannte Instabilität bei neutralem pH-Wert (Watzl et al. 2002). Die Bioaktivität von Metaboliten der Anthocyane kann derzeit nicht ausgeschlossen werden (Tsuda et al. 1999; McGhie & Walton 2007).

Auch die Daten zu Stoffwechsel und Bioverfügbarkeit von Procyanidinen sind noch unvollständig. Es finden sich Hinweise dafür, dass zumindest monomere und kleine oligomere Procyanidine vom menschlichen Darm aufgenommen werden (Nandakumar et al. 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Procyanidine den Magen unbeschadet passiert und im Dünndarm für Absorption und Metabolismus zur Verfügung steht (Rios et al. 2002). Zudem ist bekannt, dass Procyanidine im Dickdarm ebenfalls zu phenolischen Säuren abgebaut werden (Déprez et al. 2000). Etwa 1-2% der oral aufgenommenen Menge an Flavanolen werden mit intakter Grundstruktur wieder ausgeschieden (Watzl & Rechkemmer 2001). Plasmakonzentrationen beim Menschen bewegen sich im nanomolaren Bereich und erreichen zwei Stunden nach der Einnahme von 2g Traubenextrakt für Procyanidin B1 $10,6 \pm 2,5$ nM (Sano et al. 2003), bzw. für Procyanidin B2 nach der oralen Aufnahme von 0,375g Kakao/kg KG 41 ± 4 nM (Holt et al. 2002).

1.1.3. Gesundheitlicher Nutzen

In den vergangenen Jahren haben zahlreiche Studien ergeben, dass Anthocyane einen gesundheitlichen Nutzen aufweisen können. Dank des Abfangens von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmolekülen (Watzl et al. 2002) verhindern Anthocyane die oxidative Schädigung von DNS, Proteinen und Lipiden (Fukumoto & Mazza 2000; Mazza et al. 2002; Zheng & Wang 2003). Besonders günstig erscheint diese schützende Eigenschaft der Anthocyane für postmitotische neuronale Zellen des Gehirns, die nach oxidativer Schädigung nicht in größerem Umfang ersetzt werden können (Lau et al. 2005). Dieser Mechanismus könnte bei Tieren einen verminderten motorischen und kognitiven Leistungsabfall im Alter bei anthocyanreicher Ernährung erklären (Galli et al. 2002; Joseph et al. 2005; Lau et al. 2005). Neben den antioxidativen Eigenschaften sind auch entzündungshemmende Effekte beobachtet worden (Wang et al. 1999), die unter anderem das mikrovaskuläre Endothel schützen (Youdim et al. 2002). Vasoprotektive Effekte der Anthocyane im Tierversuch werden zudem einer Senkung der Triglyceride und des Cholesterins sowie einer Erhöhung des HDL-

Cholesterins im Serum zugeschrieben (Watzl et al. 2002; Kwon et al. 2007). Eine negative Korrelation der Flavonoidaufnahme mit dem Sterblichkeitsrisiko für Herz-Kreislaufkrankungen könnte damit erklärt werden (Mason 2007; Mink et al. 2007; Hooper et al. 2008). Eine Verbesserung des Sehvermögens durch Anthocyane wird mit einer Stimulierung der Regeneration von Rhodopsin erklärt (Matsumoto et al. 2003; Ghosh & Konishi 2007). Schließlich sprechen zahlreiche experimentelle Studien für eine antikarzinogene Aktivität von Anthocyanen, wenngleich epidemiologische Studien entsprechende Effekte beim Menschen nicht eindeutig beweisen (Wang & Stoner 2008). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Induktion der TNF- α -Produktion und Modulation der Immunantwort in aktivierten Makrophagen (Wang & Mazza 2002).

Den Procyanidinen werden ebenfalls zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Sie erniedrigen z.B. den Plasmaspiegel und reduzieren die Oxidation von LDL-Cholesterin und senken somit das Arterioskleroserisiko (Mazur et al. 1999; Aviram & Fuhrman 2002; Quesada et al. 2009). Auch hemmen Procyanidine die Thrombozytenfunktion (Murphy et al. 2003). Diese Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung für das „französische Paradoxon“ (Rasmussen et al. 2005): Demnach korreliert maßvoller Konsum von procyanidinhaltigem Rotwein in der französischen Bevölkerung, trotz einer vergleichsweise fettreichen Ernährung, mit einer niedrigen Inzidenz an koronarer Herzkrankheit (Renaud & de Lorgeril 1992). Neben antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkungen (Rasmussen et al. 2005) werden Procyanidinen ebenfalls antikarzinogene (Nandakumar et al. 2008) und antibakterielle (Watzl & Rechkemmer 2001) Aktivitäten zugeschrieben.

1.1.4. Aufnahme von Flavonoiden aus „neuen Lebensmitteln“

Der vielfach propagierte gesundheitliche Nutzen von Procyanidinen und Anthocyanen hat zu einem breiten Angebot dieser Substanzen in Form von Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln geführt, wie z.B. Traubenkernextrakt mit oligomeren Procyanidinen (OPC), Grüntee-, Holunder-

oder Zimtextrakt (Hahn 2006). Damit wurden dem Verbraucher neue Möglichkeiten eröffnet die Flavonoidaufnahme zu steigern, zugleich wurde aber auch das Risiko für unerwünschte Wirkungen erhöht.

Der Begriff Nahrungsergänzungsmittel bezeichnet in Deutschland ein „Lebensmittel, das 1. dazu bestimmt ist, die allgemeine Ernährung zu ergänzen, 2. ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellt und 3. in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Pastillen, Tabletten, Pillen und anderen ähnlichen Darreichungsformen, (...) zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen, in den Verkehr gebracht wird“ (Nahrungsergänzungsmittelverordnung 2004). Ihrem äußeren Erscheinungsbild nach können diese Erzeugnisse durchaus Ähnlichkeit mit Arzneimitteln und anderen „apothekenüblichen Waren“ aufweisen (Schroeter 2001).

Für Funktionelle Lebensmittel („functional food“) existiert bislang weder in der Europäischen Union noch in den USA eine gesetzliche Definition. Lediglich Japan hat als bislang einziges Land mit dem im Jahr 1991 eingeführten Terminus „foods for specified health use“ (FOSHU) für diese Kategorie von Lebensmitteln eine eigene rechtliche Grundlage geschaffen (Shimizu 2002). Allgemein sind funktionelle Lebensmittel dadurch charakterisiert, dass sie über ihre Ernährungs- und Genussfunktion hinaus einen gesundheitlichen Zusatznutzen aufweisen. Dazu zählen auch modifizierte bzw. mit gesundheitswichtigen Stoffen angereicherte Lebensmittel (Schroeter 2001).

Mehrere Untersuchungen zum Verbraucherverhalten bestätigen inzwischen einen hohen Akzeptanzgrad von Nahrungssupplementen in der Bevölkerung (Hahn 2006). So gaben bei einer Erhebung in Niedersachsen im Jahr 1998 36,1% der Befragten an, Nahrungsergänzungsmittel zu konsumieren (Wolters & Hahn 2001). Einer anderen Untersuchung in Deutschland zufolge lag der Anteil im Erhebungszeitraum 1997 bis 1999 bei 43,1% (Beitz et al. 2004). Frauen konsumieren dabei deutlich häufiger Supplemente als Männer (Wolters & Hahn 2001; Beitz et al. 2004). Ebenso wurde deutlich, dass gut ausgebildete und gesundheitsbewusste Personen eher Nahrungsergänzungsmittel verwenden als Personen mit einem ungünstigen Ernährungs- und Gesundheitsverhalten (Hahn

2006). Offenbar verstehen viele Konsumenten Supplemente nicht primär als Ausgleich für eine unzureichende Ernährung, sondern erwarten vielmehr von „functional food“ und Nahrungsergänzungsmitteln einen gesundheitlichen Zusatznutzen, etwa den „Abbau von Stress“ oder die Verhinderung von Krankheiten (Read et al. 1989; Wolters & Hahn 2001). Aus anderen Studien geht hervor, dass Supplemente signifikant häufiger bei vorhandenen gesundheitlichen Beeinträchtigungen im Sinne eines therapeutischen „Adjuvans“ verwendet werden (Klipstein-Grobusch et al. 1998).

Der Umsatz von Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln betrug im Jahr 2007 in den USA, Europa und Asien zusammen etwa 72 Milliarden US-Dollar. Bis 2012 soll der Umsatz jährlich um weitere 5,7% steigen (Datamonitor's report 2008). In Deutschland betrug der Marktanteil funktioneller Lebensmittel im Jahr 2001 5-10% aller Lebensmittel und soll Prognosen zufolge weiter ansteigen (Wolters et al. 2001). Alleine für Lebensmittelfarbstoffe auf Anthocyanbasis werden jährlich ca. 65 Millionen Tonnen Trebern aus Weintrauben produziert (Malien-Aubert et al. 2001). Da der gesundheitliche Nutzen von sekundären Pflanzenstoffen wie den Flavonoiden erst seit Anfang der 1990er Jahre Beachtung findet, stellt die Vermarktung solcher Produkte einen relativ neuen Trend dar (Hahn 2006). Dementsprechend waren in Verbraucherbefragungen Bekanntheitsgrad und Akzeptanz von Flavonoiden im Vergleich zu lang eingesetzten Inhaltsstoffen wie Vitaminen oder Mineralstoffen deutlich niedriger (GfK Marktforschung 1998; Menrad 2005). So wussten mehr als 80% der Befragten um einen gesundheitlichen Effekt von Kalzium, und mehr als 40% der Befragten um einen gesundheitlichen Effekt probiotischer Kulturen. Dagegen war ein gesundheitlicher Effekt von Flavonoiden weniger als 20% der Befragten bekannt (Bech-Larsen et al. 2001). Es ist anzunehmen, dass sich der Marktanteil von Flavonoiden mit steigendem Bekanntheitsgrad erhöhen wird. Nach Schätzungen beträgt der durchschnittliche Flavonoidkonsum bereits jetzt 1 Gramm pro Tag und Person. Die Hauptquellen dafür stellen gegenwärtig Früchte, Getränke (Fruchtsäfte, Wein Tee, Kaffee, Schokolade und Bier) sowie in geringerem Maße Gemüse und Getreide dar (Kroon & Williamson 2005).

Insbesondere Beeren sind reichhaltige Quellen von Anthocyanen (Cooke et al. 2005).

1.1.5. Beispiele unerwünschter Wirkungen von Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln

Da die Zulassung eines pflanzlichen Arzneimittels mit erheblichem Aufwand verbunden ist, werden viele Pflanzenextrakte als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben. Die rechtliche Stellung als Lebensmittel schließt jedoch eine potentiell gesundheitsgefährdende Wirkung dieser Produkte nicht aus (Hahn 2006).

Ein prominentes Beispiel hierfür bietet Zimt, der wegen seiner möglicherweise blutzuckersenkenden Wirkung unter anderem von Personen mit Typ 2-Diabetes vermehrt eingesetzt wird (Dugoua et al. 2007). Vor allem Cassia-Zimt enthält Cumarine, für die die europäische Aromenrichtlinie eine Maximalkonzentration von zwei Milligramm pro Kilogramm Lebensmittel vorschreibt. Dieser Wert wird jedoch in vielen zimthaltigen Produkten deutlich überschritten (Lungarini et al. 2008). Wegen der hepatotoxischen und wahrscheinlich kanzerogenen Wirkung der Cumarine machte das Bundesinstitut für Risikobewertung daher unlängst auf eine zu hohe Cumarinbelastung durch den direkten Verzehr von Zimt aufmerksam (Bundesinstitut für Risikobewertung 2006).

Anfang 2009 warnte das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit vor dem Erzeugnis „Fortodol“, in dem Nimesulid, flavonoidhaltiger Gelbwurzelextrakt und DL-Phenylalanin nachgewiesen wurden. Der Verzehr des als Nahrungsergänzungsmittel vertriebenen Präparates kann zu schweren Leberschädigungen führen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2009).

Unerwünschte Wirkungen von Grapefruitsaft wiederum gehen zurück auf Interaktionen zwischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Arzneimitteln (Kiani & Imam 2007). Als Hauptgrund für die gesteigerte Bioverfügbarkeit zahlreicher Medikamente bei gleichzeitiger Einnahme von Grapefruitsaft wird die Hemmung der Cytochrom P450-Aktivität durch die im Saft enthaltenen Furanocumarine und Flavonoide angenommen (Tassaneeyakul et al. 2000; Uno & Yasui-Furukori 2006).

Saft aus Granatäpfeln, dem ein antioxidatives Potential zugesprochen wird, könnte ebenfalls über eine Beeinflussung des Cytochrom P450-Systems Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln nehmen (Faria et al. 2008). Er ist reich an Anthocyanen (Miguel et al. 2004) und Procyanidinen (de Pascual-Teresa et al. 2000) zu deren Wechselwirkung mit dem Cytochrom P450-Enzymsystem bislang keine Erkenntnisse vorliegen.

1.2. Cytochrom P450-Enzyme

1.2.1. Einteilung und Vorkommen

Die Cytochrom P450-Enzyme sind Hämproteine, die überwiegend im glatten endoplasmatischen Reticulum von Leber und Dünndarm exprimiert werden (Nelson & Cox 2001). Ihr Name verweist auf ihr Absorptionsmaximum bei 450nm *in vitro* (Ortiz de Montellano 1995). Zusammen bilden sie eine Superfamilie von Monooxygenasen, die bei Menschen, Tieren, Pflanzen und Prokaryonten vorkommen. Beim Menschen sind über 50 Proteine aus dieser Familie aus Duplikationen hervorgegangen (Berg et al. 2003). Jedes Isoenzym der 50-60 kDa schweren Cytochrom P450-Enzyme trägt das Präfix CYP. Danach folgt eine arabische Ziffer (1, 2, 3, etc.) für die Familie, ein Großbuchstabe (A, B, C, etc.) für die Subfamilie und wieder eine arabische Zahl zur Definition des Isoenzym (Wijnen et al. 2007). Der Verwandtschaftsgrad von Isoenzymen geht aus dem Grad der Übereinstimmung in der Abfolge ihrer Aminosäurekette hervor (Brøsen 1996).

CYP1A2 wird primär in der Leber exprimiert (Wijnen et al. 2007) und beträgt dort 10-15 Prozent des gesamten P450-Gehaltes (Brøsen 1996). Auch CYP2C19 wird in der Leber exprimiert. Auf die CYP2C-Enzyme 19 und 9 entfallen dort rund 20% der gesamten Cytochrom P450-Aktivität (Wijnen et al. 2007).

Neben CYP1A2 und CYP2C19 sind CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 sowie CYP3A5 pharmakologisch relevant, da sie zusammen über 90 Prozent aller Medikamente metabolisieren (Slaughter & Edwards 1995; Wilkinson 2005).

1.2.2. Funktion

Als Monooxygenasen katalysieren Cytochrom P450-Enzyme Reaktionen, bei denen nur eines der beiden Sauerstoffatome des O₂ in das Substratmolekül eingebaut wird, während das andere zu H₂O reduziert wird. Die für diese Hydroxylierungsreaktionen notwendigen Reduktionsäquivalente werden von NADH oder NADPH bereitgestellt, in der Regel aber von einem Eisen-Schwefel-Protein an P450 übergeben (Nelson & Cox 2001). Die P450-Enzyme sind beim Menschen unter anderem an der Synthese von Cholesterin, Gallensalzen, Prostacyklinen und Thromboxan A₂ beteiligt (Lynch & Price 2007). Auch die Synthese von Steroidhormonen aus der Nebennierenrinde (Glucocorticoide, Aldosteron) und von Geschlechtshormonen aus Hoden (Testosteron) und Eierstöcken (Östrogene) geschieht Cytochrom P450-abhängig. Damit nimmt das Enzymsystem Einfluss auf Stoffwechselforgänge, Elektrolytkonzentrationen im Blut, die geschlechtliche Entwicklung und viele andere Körperfunktionen (Nelson & Cox 2001).

Eine weitere Funktion liegt in der Entgiftung von zahlreichen Medikamenten und Karzinogenen, einschließlich des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs Benzopyren aus Zigarettenrauch, und anderer körperfremder Substanzen (Xenobiotika). Die Hydroxylierung von Xenobiotika ermöglicht deren Konjugation mit stark polaren Stoffen wie Glucuronat oder Sulfat und fördert damit ihre Wasserlöslichkeit und Ausscheidung. Die tatsächliche Wirkdauer vieler Medikamente hängt davon ab, wie schnell sie von P450-Enzymen inaktiviert werden (Nelson & Cox 2001; Berg et al. 2003). Neben der schützenden Funktion der P450-Familie kann jedoch durch eine metabolische Aktivierung von harmlosen Vorläufersubstanzen auch die Entstehung von toxischen Stoffwechselprodukten, wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, aromatischen und heterozyklischen Aminen oder Mykotoxinen, gefördert werden (Landi et al. 1999; Berg et al. 2003; Wijnen et al. 2007).

CYP1A2 ist dabei aktiv am Metabolismus von Medikamenten und Präkarzinogenen beteiligt, wohingegen CYP2C19 nur in den Metabolismus von Medikamenten eingreift (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006).

1.2.3. Substrate, Induktoren und Inhibitoren

Unterschiede in der Aminosäureabfolge der verschiedenen CYP-Enzyme spiegeln sich in unterschiedlichen Substratspezifitäten wieder (Berg et al. 2003). Teils kann es auch zur Überlappung von Substratspezifitäten verschiedener CYP-Enzyme kommen (Brøsen 1996).

CYP1A2 ist an der Biotransformation von Koffein und zahlreichen Arzneistoffen beteiligt. Bekannte Substrate sind u.a. das Neuroleptikum Clozapin, das trizyklische Antidepressivum Imipramin, das Analgetikum Paracetamol, der Bronchodilatator Theophyllin und der Betablocker Propranolol (Brøsen 1996; Lynch & Price 2007). Zu den Enzyminduktoren von CYP1A2 zählen z.B. das Antiepileptikum Carbamazepin, das Barbiturat Phenobarbital und das Antibiotikum Rifampicin sowie Tabak. Mehrere Arzneistoffe inhibieren hingegen die Aktivität von CYP1A2. In diese Gruppe fallen das Antiarrhythmikum Amiodaron, der H₂-Blocker Cimetidin, der Gyrasehemmer Ciprofloxacin und der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluvoxamin (Lynch & Price 2007). Diese verzögern den Abbau von CYP1A2-Substraten und erhöhen somit deren Konzentration im Organismus.

Schätzungen zufolge gewährleisten CYP2C19 und CYP2C9 zusammen den Metabolismus von ca. 18% aller derzeit verwendeten Medikamente (Rosemary & Adithan 2007). Substrate von CYP2C19 umfassen unter anderem Antiepileptika (Phenytoin, Phenobarbital), Anxiolytika (Diazepam), Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Citalopram) und Säureblocker (Omeprazol) (Brøsen 1996; Lynch & Price 2007; Rosemary & Adithan 2007). Das Antiepileptikum Carbamazepin und das Antibiotikum Rifampicin wirken als Induktoren von CYP2C19 und können dadurch Wirkungen von anderen Arzneimitteln schmälern. Beispiele für Inhibitoren des Enzyms bilden das Antidepressivum Fluvoxamin, das Tuberkulostatikum Isoniazid und der Protease-Inhibitor Ritonavir (Lynch & Price 2007).

Aus einer Hemmung oder Induktion des Cytochrom P450-Systems können vielfältige unerwünschte Arzneimittelwirkungen resultieren (Brøsen 1996) und sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Parameter von

Medikamenten beeinflusst werden (Tassaneeyakul et al. 2000; Dahan & Altman 2004; Spina & de Leon 2007). Bestimmte Lebensmittel kommen als Auslöser solcher Effekte in Betracht, darunter Grapefruitsaft (Tassaneeyakul et al. 2000). Bestandteile des Saftes hemmen dabei das Cytochrom P450-Enzym CYP3A4 im Dünndarm, wodurch es zu einer deutlichen Verminderung des präsystemischen Metabolismus und somit zu einer erhöhten Plasmakonzentration von Medikamenten kommt. Die am stärksten hiervon betroffenen Arzneimittel sind Kalziumkanal-Antagonisten, Benzodiazepine, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und Cyclosporine (Dahan & Altman 2004). Als Hemmstoffe der Cytochrom P450-Aktivität im Grapefruitsaft wurden Furanocumarine sowie die Flavonoide Naringin, Quercetin und Kaempferol identifiziert (Tassaneeyakul et al. 2000). Ebenso besitzen Bestandteile von schwarzem Himbeersaft, Traubensaft, Maulbeerensaft (Kim et al. 2006), Rotwein (Chan et al. 1998) und mutmaßlich Moosbeerensaft (Rindone & Murphy 2005) eine hemmende Wirkung auf P450-Enzyme.

Das Bekanntwerden solcher Medikament-Lebensmittel-Interaktionen hat die Sorgen vor Risiken, die von funktionellen Lebensmitteln und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen ausgehen können, wachsen lassen. Selbst wenn das primäre Lebensmittel sicher erscheint, ist oft nicht absehbar wie Nahrungsergänzungsmittel wirken, in denen einzelne chemische Stoffe in stark konzentrierter Form enthalten sind (Hahn 2006). Für die toxikologische Beurteilung von Flavonoiden ist der Effekt auf Cytochrom P450-Enzyme ein unverzichtbarer Aspekt (Hodek et al. 2002; Moon et al. 2006). Es wurde zwar bereits gezeigt, dass Anthocyane selbst nicht von Cytochrom P450-Enzymen metabolisiert werden (Fleschhut et al. 2006), ihre Fähigkeit CYP1A2 oder CYP2C19 zu hemmen, wurde bisher jedoch noch nicht geprüft. Die vorliegende Arbeit erweitert diesen Kenntnisstand und untersucht zugleich die Effekte von Procyanidinen auf beide Isoenzyme.

2. ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wechselwirkungen von 16 Anthocyanen und zwei Procyanidinen mit den Cytochrom P450-Isoenzymen 1A2 und 2C19 *in vitro* zu quantifizieren. Hierzu sollten substanzspezifische Inhibitionsparameter ermittelt werden. Darüber hinaus sollten Zusammenhänge aufgezeigt werden zwischen den strukturellen Merkmalen von Testsubstanzen und der gemessenen Effektstärke. Schließlich sollte unter Berücksichtigung der hier gewonnenen Ergebnisse und anderer bereits bekannter Einflussgrößen die Relevanz des Konsums von Anthocyanen und Procyanidinen für die Arzneimittelsicherheit neu eingeschätzt werden.

3. METHODIK

3.1. Flavonoide und Referenzsubstanzen

Insgesamt wurden Wechselwirkungen von 18 Flavonoiden mit den Cytochrom P450-Enzymen CYP1A2 und CYP2C19 untersucht. Darunter fallen sechs Anthocyanidine (Cyanidin, Malvidin, Delphinidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin), sieben Anthocyanine mit einem Zuckerrest (Cyanidin-3-O-glucosid [Kuromanin], Cyanidin-3-O-galactosid [Ideain], Cyanidin-3-O-rutinosid [Keracyanin], Malvidin-3-O-glucosid [Oenin], Malvidin-3-O-galactosid, Delphinidin-3-O-glucosid [Myrtillin], Peonidin-3-O-glucosid), drei Anthocyanine mit zwei Zuckerresten (Cyanidin-3,5-di-O-glucosid [Cyanin], Malvidin-3,5-di-O-glucosid [Malvin], Pelargonidin-3,5-di-O-glucosid [Pelargonin]) sowie die beiden Procyanidine B1 und B2. Alle Testsubstanzen wurden von Extrasynthese (Genay, Frankreich) bezogen.

Um den Effekt der verwendeten Flavonoide auf die untersuchten Cytochrom P450-Enzyme zu Referenzen in Beziehung zu setzen, wurde zudem je eine Substanz mit bekannter inhibitorischer Wirkung erfasst (Positivkontrolle). Für CYP1A2 diente α -Naphthoflavin als Vergleichsinhibitor (Yin et al. 2000; Cho et al. 2003) und Fluvoxamin für CYP2C19 (Brøsen 1996; Jeppesen et al. 1996). Beide Substanzen stammten von Sigma-Aldrich (Schnelldorf) (Tab. 4, 5).

In den Experimenten mit CYP1A2 wurden alle Testsubstanzen in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und verdünnt. Dies war im Versuchsaufbau zu CYP2C19 nicht möglich, da sich DMSO als vergleichsweise potenter Inhibitor dieses Enzyms erwies. Hier wurden die Versuchsstoffe in DMSO/H₂O (1:4) gelöst.

Die Flavonoide wurden in UV-undurchlässigen Cups bei -20°C gelagert, α -Naphthoflavin und Fluvoxamin wurden im Kühlschrank bei 4-7°C aufbewahrt und DMSO wurde bei Raumtemperatur gelagert.

3.2. Luminometrischer Nachweis der CYP 450-Aktivität

Zum Nachweis von CYP1A2- und CYP2C19-Enzymaktivität wurden isoenzymspezifische P450-Glo™ Screening Systeme von Promega (Mannheim) eingesetzt (Cali et al. 2006). In beiden Assays werden Membran-Präparationen aus Baculovirus-transfizierten Insektenzellen verwendet. Sie enthalten rekombinantes humanes Cytochrom P450, P450 Reduktase sowie zusätzlich im CYP2C19-Assay Cytochrom b5. Als Negativkontrolle dienen Membranen ohne Cytochrom P450-Aktivität, die aus Baculovirus-transfizierten Wildtyp-Insektenzellen stammen (Promega Corporation 2007). Die Bedingungen des Assays leiten sich aus früheren Arbeiten ab (Phillips & Shephard 1998; Miller et al. 2000). Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und an den Vorgaben des Herstellers ausgerichtet.

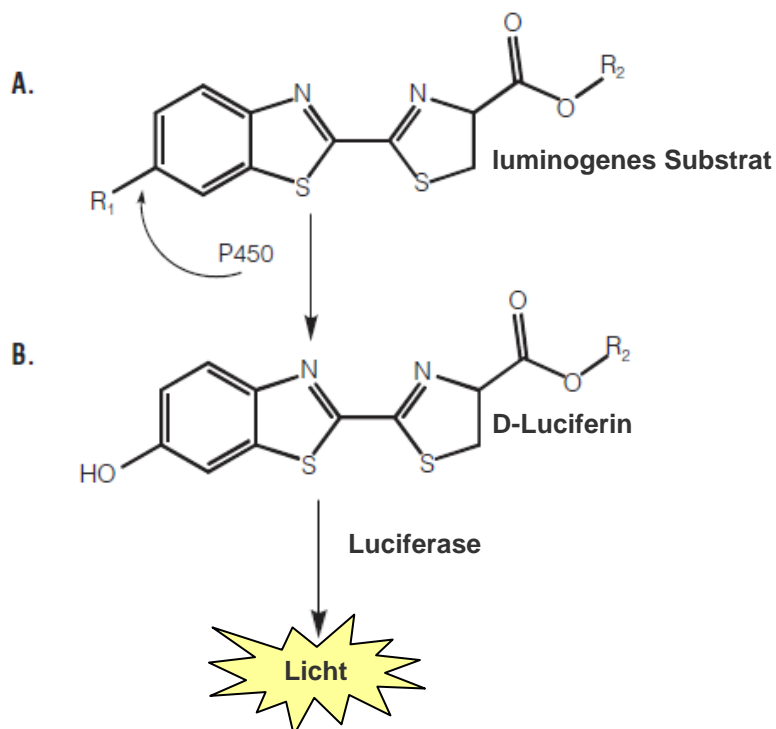


Abbildung 4: Chemische Hauptreaktionen des P450 Screening Systems: Umwandlung eines luminogenen Substrats zu D-Luciferin durch das Cytochrom P450-Isoenzym (A) und Abbau des D-Luciferin unter Abgabe eines stabilen Lichtsignals in der Luciferase-Reaktion (B)
(Vgl. Cali et al. 2005)

Zunächst wird ein luminogenes Substrat mit dem Cytochrom P450-Enzym inkubiert. Dieses Substrat ist ein Derivat von Leuchtkäfer-Luciferin [D-Luciferin; (S)-4,5-Dihydro-2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-thiazol-4-carbonsäure], dessen Reste R_1 und R_2 die Selektivität für das jeweilige Cytochrom-Isoenzym bedingen. Die eingesetzten Luciferinderivate Luciferin-ME [(S)-4,5-Dihydro-2-(6-methoxybenzothiazol-2-yl)-thiazol-4-carbonsäure; CYP1A2-Assay] und Luciferin-H EGE [(S)-4,5-Dihydro-2-(benzothiazol-2-yl)-thiazol-4-carbonsäureethylenglycolester; CYP2C19-Assay] werden durch das entsprechende Cytochrom P450-Enzym in Leuchtkäfer-Luciferin umgewandelt (Reaktion A, Abb. 4). Eingeleitet wird die erste Hauptreaktion durch Zugabe des „NADPH Regeneration System“, das aus NADP^+ , Glukose-6-Phosphat, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und MgCl_2 besteht. Die Cytochrom P450-Reaktion wird somit uneingeschränkt mit NADPH versorgt, das als Elektronenquelle für Oxidierungen dient. Die NADPH-Regenerierung (Abb. 5) gewährleistet, dass ein Überschuss an NADPH auch dann noch vorliegt, wenn Testsubstanzen eine Neusynthese hemmen sollten (Promega Corporation 2007).

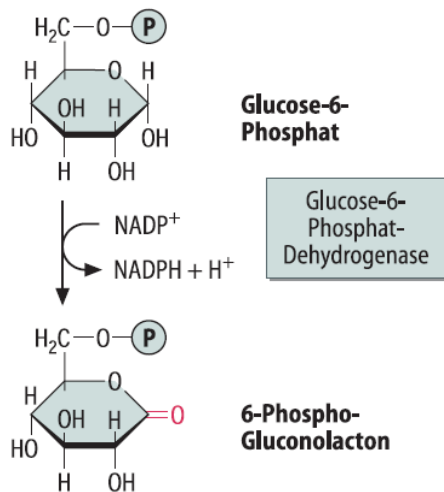


Abbildung 5: NADPH-Regenerierung
(Vgl. Löffler 2005)

Das aus der Cytochrom P450-Reaktion entstandene D-Luciferin ist im Gegensatz zu den verwendeten Derivaten ein Substrat der Leuchtkäfer-Luciferase (Reaktion B, Abb. 4). Im nächsten Schritt wird mit der Zugabe des „Luciferin Detection Reagent“ die Reaktion gestoppt und das gebildete D-Luciferin für die Abgabe

eines stabilen Lichtsignals genutzt (Cali 2003). In Gegenwart von ATP, Magnesium und Sauerstoff katalysiert die Leuchtkäfer-Luciferase die oxidative Decarboxylierung von D-Luciferin. Es entsteht dabei Oxyluciferin und ein gelbgrünes Lichtsignal mit einer maximalen Wellenlänge von 560 nm (Contag et al. 1998; Gheysens & Gambhir 2005; Berger et al. 2008, Abb. 6).

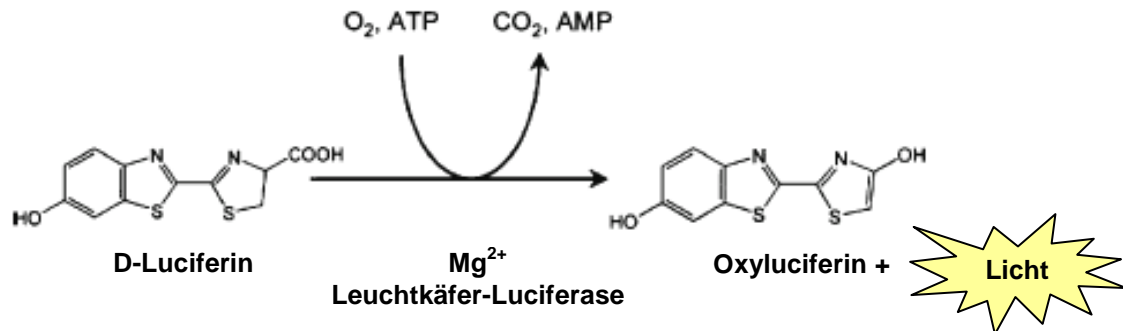


Abbildung 6: Luciferase-Reaktion: Umwandlung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Beteiligung von O₂, ATP und Mg²⁺ mit Entstehung von CO₂, AMP sowie einem stabilen Lichtsignal (Vgl. Berger et al. 2008)

Das entstehende Lichtsignal eignet sich zur Überwachung der Cytochrom P450-Aktivität, da die Menge des produzierten Lichts proportional zur Menge des D-Luciferins ist, das in der Vorläufer-Reaktion entstanden ist (Worzella et al. 2004). Wird durch Zugabe einer Testsubstanz (z.B. Anthocyan) ein stärkeres Lichtsignal ausgelöst als in der Negativkontrolle, so zeigt dies eine Aktivierung des Cytochrom P450-Enzyms durch die Substanz an. Fällt das Signal hingegen schwächer aus, so liegt eine Hemmung des Enzyms vor.

3.2.1. Messung der CYP1A2-Aktivität

Das Testsystem zu CYP1A2 setzte sich zusammen aus CYP1A2 (10mg Protein/ml) mit Reduktase, Kontrollmembranen (5mg Protein/ml), Luciferin-ME (5mM), „P450-Glo™“ Puffer, „Luciferin Detection Reagent“, Kaliumphosphat-Puffer (1M; pH 7,4), luciferinfreiem Wasser, Lösung A „NADPH Regeneration System“ (26mM NADP⁺, 66mM Glukose-6-Phosphat, 66mM MgCl₂) und Lösung B „NADPH Regeneration System“ (40U/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in

5mM Natriumcitrat [pH 5,5]). Das gefriergetrocknete „Luciferin Detection Reagent“ wurde zunächst in dem P450-Glo™ Puffer gelöst. Somit lagen alle Bestandteile des Assays in flüssiger Form vor. Um eine Aktivitätsminderung der einzelnen Komponenten durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu verhindern, wurden diese in kleinere Aliquots aufgeteilt und bei -20°C, bzw. bei -70°C (CYP1A2 mit Reduktase sowie die Kontrollmembranen), aufbewahrt.

Anthocyane und Procyanidine wurden von Extrasynthese (Genay, Frankreich) als Trockensubstanz geliefert und anschließend in DMSO gelöst. Mit Ausnahme von drei Flavonoiden wurde für alle Testsubstanzen eine 100mM-Stammlösung erstellt. Aufgrund geringer Ausgangsmengen wurde für Petunidin eine 50mM-, für Peonidin-3-O-glucosid und Procyanidin B1 eine 25mM-Stammlösung angefertigt. Aus den Stammlösungen wurden durch Verdünnung mit DMSO die Testkonzentrationen von 0,4mM, 1,0mM, 2,0mM, 10mM und 20mM gewonnen. Bei einzelnen Substanzen mussten zusätzliche, höhere Konzentrationen (25mM, 40mM) hergestellt werden um die halbmaximale Hemmung ermitteln zu können. Im Versuchsansatz wurde durch die Zugabe weiterer Reagenzien nochmals um den Faktor 50 verdünnt. Somit ergaben sich Endkonzentrationen von 8µM, 20µM, 40µM, 200µM und 400µM, sowie 500µM oder gegebenenfalls 800µM. Gelöste Flavonoide wurden bei -20°C dunkel gelagert. Der Vergleichshemmstoff α -Naphthoflavin wurde in den Endkonzentrationen 0,2nM, 2nM, 20nM, 200nM und 20µM verwendet und bei 4-7°C aufbewahrt.

Zu Beginn eines jeden Versuchszyklus wurde das „CYP1A2 Reaction Mixture“ und das „CYP1A2 NADPH Regeneration System“ in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration und Reihenfolge gemischt (Tab. 2). Die angegebenen Mengen beziehen sich auf einen Reaktionsansatz.

Tabelle 2: Zusammensetzung der „CYP1A2 Reaction Mixture“ und des „CYP1A2 NADPH Regeneration System“
(Vgl. Promega Corporation 2007)

a) CYP1A2 Reaction Mixture:

- luciferinfreies Wasser	6,0µl
- 1M Kaliumphosphat-Puffer	5,0µl
- 5mM Luciferin-ME	1,0µl
- CYP1A2-Membranen	0,5µl

12,5µl

b) CYP1A2 NADPH Regeneration System:

- luciferinfreies Wasser	22,0µl
- Lösung A	2,5µl
- Lösung B	0,5µl

25,0µl

Die „Reaction Mixture“ wurde bis Reaktionsbeginn auf Eis gelagert, um einen Aktivitätsverlust des CYP1A2-Enzyms zu vermeiden. Das NADPH Regenerations-System konnte bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Anschließend wurde mit Pipettierschritten auf einer 96-well Mikrotiterplatte fortgefahren. Zunächst wurden 11,5µl luciferinfreies Wasser in jede der zu messenden Vertiefungen vorgelegt. 1µl DMSO wurde in die ersten drei Vertiefungen zur Bestimmung eines Rohwertes zugegeben. In die weiteren Vertiefungen wurde 1µl der in DMSO gelösten Testsubstanzen (z.B. Anthocyane) eingebracht. Pro Platte konnten maximal zwei Substanzen in sechs verschiedenen Konzentrationen gemessen werden, wobei jede Konzentration dreifach bestimmt wurde.

Im nächsten Schritt wurden 12,5µl der aufgetauten „CYP1A2 Reaction Mixture“ in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Der enthaltene Kaliumphosphat-Puffer

diente zur Stabilisierung des pH-Werts bei 7,4 +/- 0,1. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes für zehn Minuten bei Raumtemperatur.

Die CYP1A2-Reaktion wurde mit Einbringen von jeweils 25µl des „NADPH Regeneration System“ in die Vertiefungen gestartet. Durch die damit einsetzende Bereitstellung von NADPH wandelt CYP1A2 in einer Dealkylierungsreaktion Luciferin-ME zu D-Luciferin um (Abb. 7). Daraufhin wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

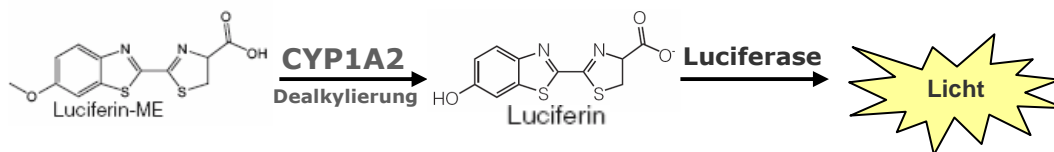


Abbildung 7: Hauptreaktionen des CYP1A2-Assays: CYP1A2-abhängige Dealkylierung von Luciferin-ME zu Luciferin und Entstehung eines Lichtsignals durch den Abbau des Luciferin in der Luciferase-Reaktion
(Vgl. Worzella et al. 2004)

Durch Zugabe von 50µl des „Luciferin Detection Reagent“ pro Reaktionsansatz wurde die Cytochrom P450-Reaktion beendet. Gleichzeitig wurde das in der vorangegangenen Reaktion entstandene D-Luciferin durch die enthaltene Luciferase in Oxyluciferin umgewandelt. Dabei entstand ein Lichtsignal mit $\lambda_{\text{max}}=560\text{nm}$ (Abb. 6, 7). Es folgte eine weitere Inkubationphase von 20 Minuten bei Raumtemperatur.

In dieser Zeit stabilisierte sich das zu messende Lichtsignal, so dass es in einem Anthos Lucy 1 Mikroplatten Luminometer (Anthos Labtech, Salzburg, Österreich) quantifiziert werden konnte. Die CYP1A2-Aktivität wurde in Relativen Lichteinheiten (RLU) abgelesen.

Nach jedem Einbringen einer neuen Lösung wurde gründlich gemischt. Pipettiert wurde im Abstand von zwölf Sekunden, entsprechend den Zeitabständen zwischen zwei Messungen. Somit wurde gewährleistet, dass die Inkubationszeiten für alle Messwerte gleich lang waren. In Vorversuchen war, wie vom Hersteller angegeben, auch bei längerer Inkubation ein konstantes Lichtsignal beobachtet worden. Auf längere Inkubationszeiten wurde verzichtet, um einem Zerfall der

Flavonoide vorzubeugen. Auch von einer Verkürzung der Versuchszeit wurde Abstand genommen, da die ermittelten Werte dann zu klein bzw. zu instabil für eine vernünftige Auswertung gewesen wären.

Die Cytochrom P450-unabhängige Hintergrundlumineszenz des Assays lag im Test bei <2 Prozent.

3.2.2. Messung der CYP2C19-Aktivität

Die Versuche zu CYP2C19 entsprechen in weiten Teilen denen des CYP1A2-Assays. Das CYP2C19 Screening System (Promega, Mannheim) umfasste CYP2C19 (2,8mg Protein/ml) mit Reduktase und Cytochrom b5, Kontrollmembranen (5mg Protein/ml), Luciferin-H EGE (5mM), „Luciferin Detection“ Puffer, „Luciferin Detection Reagent“, Kaliumphosphat-Puffer (1M; pH 7,4), luciferinfreies Wasser, Lösung A „NADPH Regeneration System“ (26mM NADP⁺, 66mM Glukose-6-Phosphat, 66mM MgCl₂) und Lösung B „NADPH Regeneration System“ (40U/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 5mM Natriumcitrat [pH 5,5]). Anstelle des „P450-Glo™“ Puffers wurde in den Versuchen zu CYP2C19 der „Luciferin Detection“ Puffer verwendet, um das gefriergetrocknete „Luciferin Detection Reagent“ in Lösung zu bringen.

Als Endkonzentrationen der Anthocyane und Procyanidine im Ansatz wurden wiederum 8µM, 20µM, 40µM, 200µM und 400µM gewählt. Bei einzelnen Substanzen mussten zusätzliche Konzentrationen von 100µM, 500µM, 700µM, und/oder 800µM gemessen werden, um aussagekräftige Hemmkurven zu gewinnen. Der Vergleichsinhibitor Fluvoxamin wurde in den Konzentrationen 2nM, 20nM, 100nM, 200nM, 500nM, 1µM, 2µM und 20µM eingesetzt.

Als nachteilig bei der Durchführung des Experiments erwies sich die starke Hemmwirkung des Lösungsmittels DMSO auf die CYP2C19-Aktivität. Es bewirkte eine Verringerung der Lumineszenz auf <32 Prozent des Vergleichswertes mit Wasser. Dies erforderte eine Reduktion des DMSO-Anteils im Testansatz. Da die Flavonoide in den benötigten Konzentrationen in Wasser allein nicht gelöst werden konnten, wurde eine Verringerung des DMSO im Ansatz auf ein Fünftel

der ursprünglichen Menge vorgenommen. Die jeweiligen Testkonzentrationen der Anthocyanine, Anthocyanidine, Procyanidine und auch von Fluvoxamin wurden somit in einer Lösung mit dem DMSO/Wasser-Verhältnis 1:4 eingebracht. Durch diese Maßnahme konnte ein deutlich geringerer Lumineszenzverlust erzielt werden. Das Lichtsignal erreichte noch mehr als 77 Prozent des Wertes ohne DMSO.

Analog zu den Versuchen mit CYP1A2 beginnt der Versuchszyklus mit dem Erstellen der „CYP2C19 Reaction Mixture“ und des „CYP2C19 NADPH Regeneration System“. Der Anteil Luciferin-H EGE und CYP2C19 wurde gegenüber den Herstellerangaben verdoppelt (Tab. 3). Die entsprechende Menge wurde an luciferinfreiem Wasser eingespart, nachdem in Vorversuchen bei Einhaltung der Vorgaben kein ausreichendes Lichtsignal zu erzielen gewesen war. Die beschriebene Hemmwirkung von DMSO stellt einen wesentlichen Grund für das schwache Signal dar.

Tabelle 3: Zusammensetzung der „CYP2C19 Reaction Mixture“ und des „CYP2C19 NADPH Regeneration System“
(Vgl. Promega Corporation 2007)

a) CYP2C19 Reaction Mixture:

- luciferinfreies Wasser	9,4µl
- 1M Kaliumphosphat-Puffer	2,5µl
- 10mM Luciferin-H EGE	0,1µl
- CYP2C19-Membranen	0,5µl

12,5µl

b) CYP2C19 NADPH Regeneration System:

- luciferinfreies Wasser	22,0µl
- Lösung A	2,5µl
- Lösung B	0,5µl

25,0µl

Für den weiteren Versuchsablauf wurde eine 96-well Mikrotiterplatte verwendet. Zunächst wurden 11,5µl luciferinfreies Wasser in jede der zu messenden Vertiefungen vorgelegt. 1µl DMSO/H₂O (1:4) wurde in die ersten drei Vertiefungen zur Bestimmung eines Rohwertes zugegeben. In die weiteren Vertiefungen wurde 1µl der in DMSO/H₂O (1:4) gelösten Testsubstanzen (z.B. Anthocyane) eingebracht.

Im nächsten Schritt wurden 12,5µl der aufgetauten „CYP2C19 Reaction Mixture“ pro Reaktionsansatz hinzu pipettiert und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die CYP2C19-Reaktion wurde mit Einbringen von jeweils 25µl des „NADPH Regeneration System“ in die Vertiefungen gestartet. Durch die damit einsetzende Bereitstellung von NADPH wandelt CYP2C19 in einer Hydroxylierungsreaktion Luciferin-H EGE zu Luciferin EGE [(S)-4,5-Dihydro-2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-thiazol-4-carbonsäureethylenglycolester] um (Abb. 8). Daraufhin wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

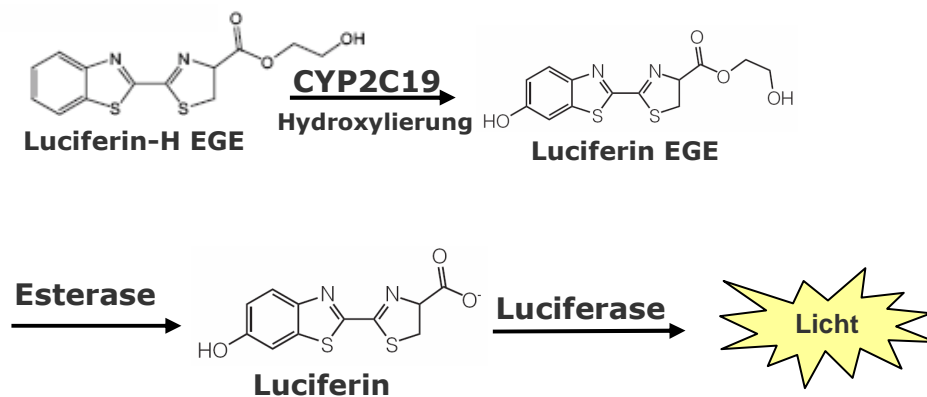


Abbildung 8: Hauptreaktionen des CYP2C19-Assays: CYP2C19-abhängige Hydroxylierung von Luciferin-H EGE zu Luciferin EGE und anschließender Abbau zu Luciferin in einer Esterase-Reaktion. Entstehung eines Lichtsignals durch den Abbau des Luciferin in der Luciferase-Reaktion
(Vgl. Cali et al. 2006)

Durch Zugabe von 50µl des „Luciferin Detection Reagent“ in alle verwendeten Vertiefungen wurde die Cytochrom P450-Reaktion beendet. Gleichzeitig wurde das in der vorangegangenen Reaktion entstandene Luciferin EGE zu D-Luciferin, und durch die enthaltene Luciferase weiter in Oxyluciferin umgewandelt. Im letzten

Schritt entstand ein Lichtsignal mit $\lambda_{\max}=560\text{nm}$ (Abb. 6, 8). Darauf folgte eine weitere Inkubationphase von 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Danach wurde die 96-well Platte in das Luminometer eingestellt und die CYP2C19-Aktivität in Relativen Lichteinheiten (RLU) abgelesen.

Der zeitliche Ablauf orientierte sich an den Empfehlungen des Herstellers, wobei für die Inkubationszeiten analoge Überlegungen zum CYP1A2-Assay galten.

Die Cytochrom P450-unabhängige Hintergrundlumineszenz des Assays betrug 5,3%.

3.3. Auswertung der Messergebnisse

Die als relative Lichteinheiten (RLU) aufgezeichneten Messergebnisse dienen zur Aktivitätsbestimmung als Ausdruck der Oxidierung von D-Luciferin zu Oxyluciferin (Berger et al. 2008), dem letzten Reaktionsschritt im Versuchsablauf. D-Luciferin wiederum entstand in beiden Assays durch die Cytochrom P450-Reaktion, jedoch auf unterschiedlichen Wegen. Während CYP1A2 Luciferin-ME in das Leuchtkäfer-Luciferin umwandelte, stammte D-Luciferin im CYP2C19-Versuch aus Luciferin-H EGE.

Infolgedessen kann die Hemmung der Aktivität von CYP1A2 und CYP2C19 durch die Flavonoide anhand folgender Gleichung quantifiziert werden:

$$\% A = 100 \times \left(\frac{A_I}{A_{DMSO}} \right)$$

Hierbei entspricht %A dem Prozentsatz an verbleibender Cytochrom P450-Aktivität nach Einwirkung der Testsubstanzen, A_I entspricht der Aktivität in Gegenwart eines Inhibitors und A_{DMSO} bezeichnet die Enzymaktivität ohne Inhibitor (Negativkontrolle).

Jede Testsubstanz wurde in mindestens fünf verschiedenen Konzentrationsstufen gemessen. Reichte die höchste Konzentration noch nicht für eine 50%-ige Hemmung des Enzyms aus, oder war der Aktivitätsabfall zwischen zwei Werten zu drastisch, so wurden noch weitere Konzentrationen in die Messung

aufgenommen. Dabei wurden für alle Konzentrationsstufen jeweils drei Werte pro Experiment bestimmt. Die gesamte Versuchsreihe wurde für jede Substanz mindestens einmal und bis zu dreimal wiederholt, um die Streuung zu berücksichtigen. Aus den mehrmaligen Dreifachbestimmungen wurde für jede Konzentrationsstufe einer Testsubstanz ein Mittelwert von %A errechnet. Diese dienten zur Ermittlung der Konzentration, bei der 50% der maximalen CYP1A2- und CYP2C19-Aktivität gehemmt werden (IC_{50}). Dafür wurde ein nicht-lineares Regressionsmodell herangezogen („sigmoidal dose-response – variable slope“) mit der Gleichung

$$E_t = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) * \text{Steigung}}}$$

(Prism V. 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA). Dabei ist X der Logarithmus der Konzentration und E_t die Antwort der Enzymaktivität. E_t verläuft vom Punkt der niedrigsten Aktivität (E_{\min}) auf einer sigmoiden Kurve zum Aktivitätsmaximum (E_{\max}).

Für die Substanzen mit biphasischer Aktivität wurde eine Anpassung der zuvor von Anger et al. (2005) vorgeschlagenen Gleichung vorgenommen:

$$E_t = 100 + \frac{E_{\max} - 100}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) * \text{SteigungA}}} - \frac{100 + (E_{\max} - 100) / 1 + 10^{(\log EC_{50} - X) * \text{SteigungA}}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) * \text{SteigungB}}}$$

Hierbei ist unter Einbeziehung zweier Steigungen (A und B) der Gesamteffekt (E_t) durch ein relatives Maximum (E_{\max}) definiert, das 100% Aktivität übersteigt.

Um einen mutmaßlichen Struktureffekt der Zuckerkomponenten von Anthocyanen auf die Enzymhemmung zu prüfen, wurden die Testsubstanzen nach der Anzahl ihrer Zuckerreste, d.h. in Anthocyanidine, Anthocyanidin-mono-glykoside und Anthocyanidin-di-glykoside, unterteilt. Die Mittelwerte der Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) verglichen und für multiple Vergleiche korrigiert (Dunn's Multiple Comparison Test). Die statistische Signifikanz wurde bei $p = 0,05$ angesetzt.

Zur Darstellung der chemischen Struktur von Flavonoiden diente ISIS/Draw v. 2.1.4 (MDL Information Systems, CA, USA).

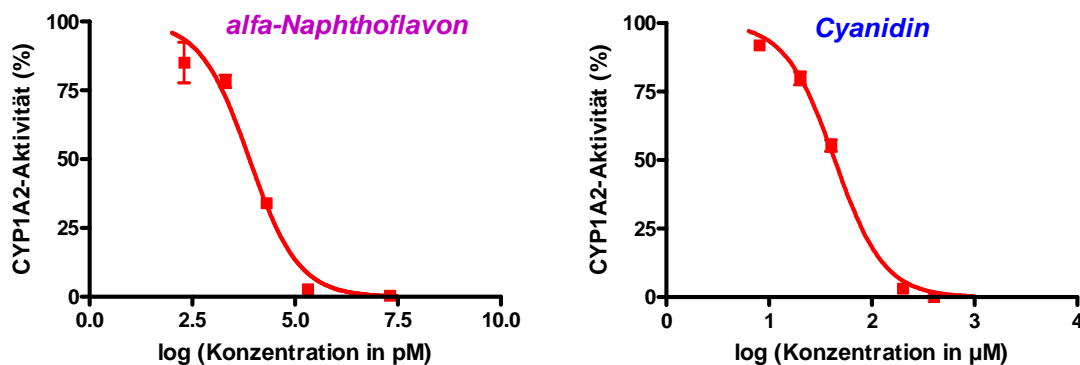
4. ERGEBNISSE

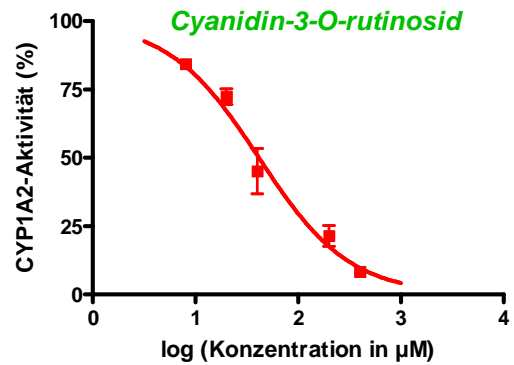
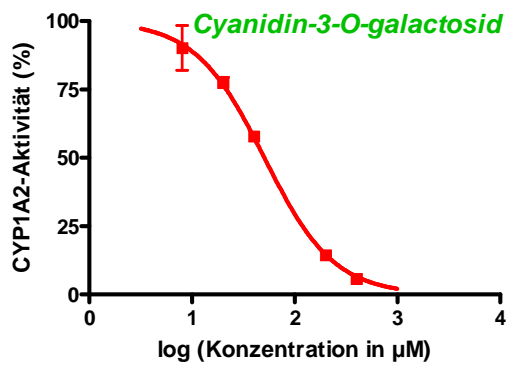
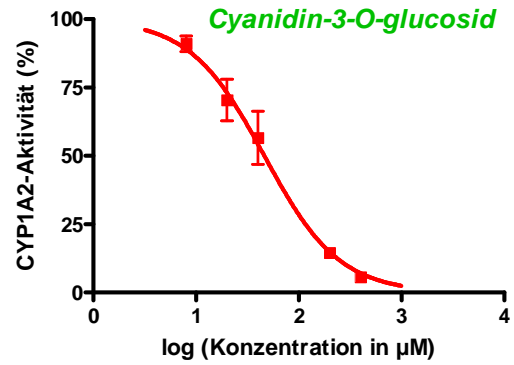
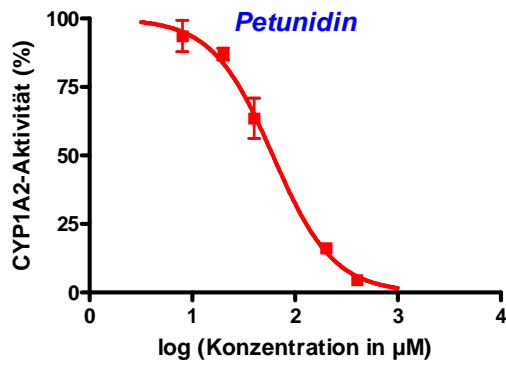
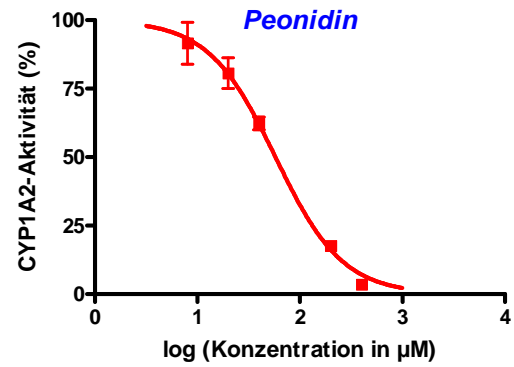
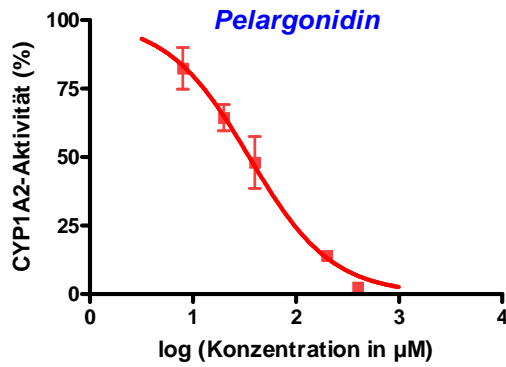
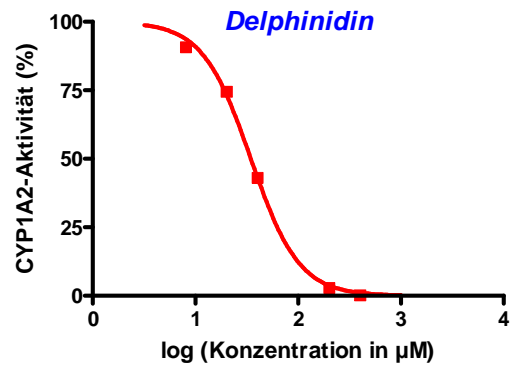
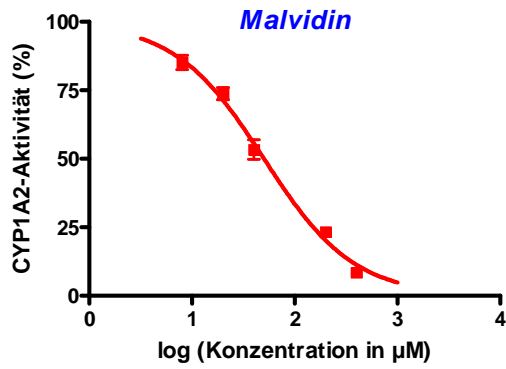
Insgesamt wurde die Wirkung von 18 Flavonoiden auf die Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme CYP1A2 und CYP2C19 untersucht. Dabei handelte es sich um sechs Anthocyanidine, zehn Anthocyanine und zwei Procyanidine. Für die Mehrzahl der Substanzen konnte die Konzentration der halbmaximalen Hemmung (IC_{50}) ermittelt werden. Bei den Anthocyaninen Cyanin, Malvin und Pelargonin mussten Inhibitions-Kenngrößen für CYP2C19 geschätzt werden, da die Regressionskurven in dieser Gruppe nicht konvergierten. Die halbmaximale Hemmung wurde darüber hinaus für zwei bekannte Inhibitoren der Enzyme errechnet, α -Naphthoflavon (CYP1A2) und Fluvoxamin (CYP2C19).

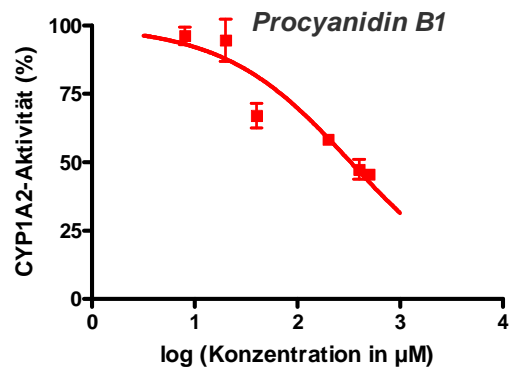
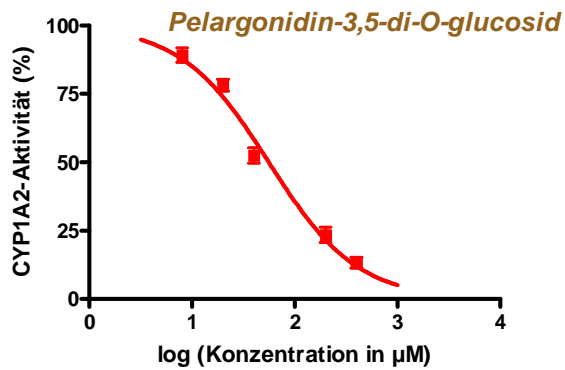
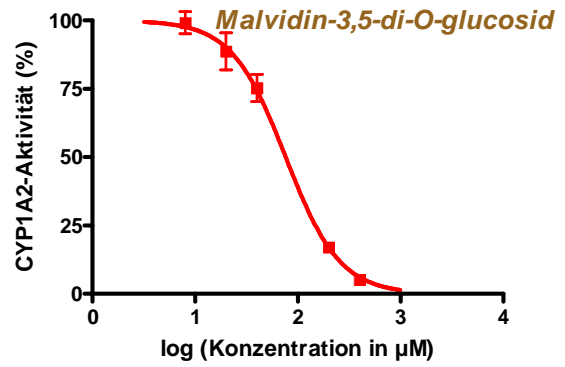
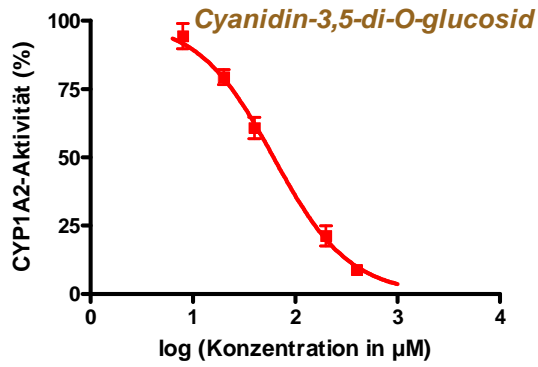
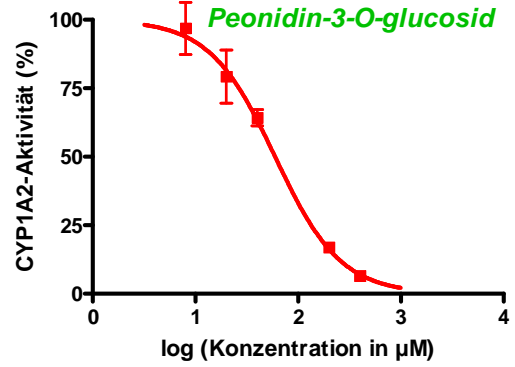
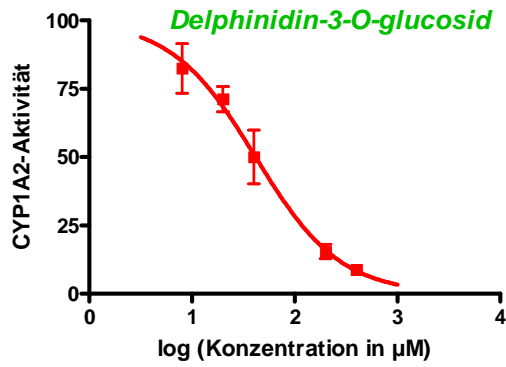
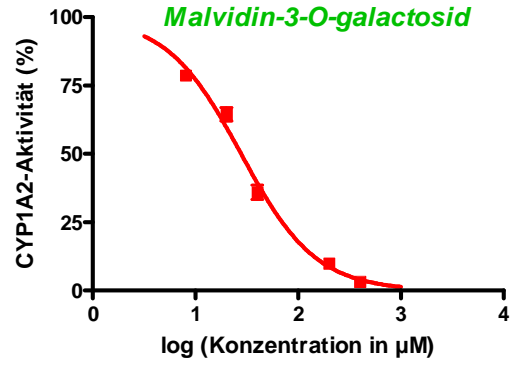
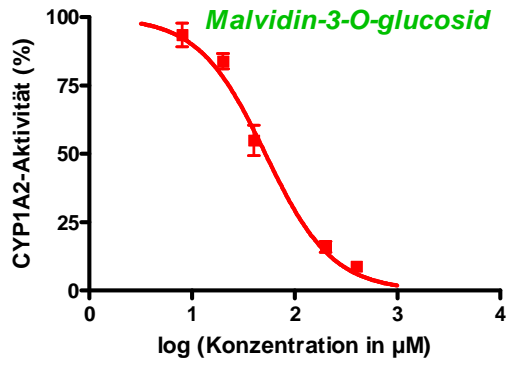
4.1. Effekte auf die CYP1A2-Aktivität

4.1.1. Konzentrationsabhängigkeit

Für alle Testsubstanzen ergab sich eine Abschwächung der CYP1A2-Aktivität mit steigender Konzentration (Abb. 9). In den Graphen sind die Mittelwerte von zwei bis vier Dreifachbestimmungen mit ihrer Standardabweichung abgebildet. Der Abfall der CYP1A2-Aktivität konnte für alle Substanzen anhand eines sigmoiden Kurvenmodells dargestellt werden.







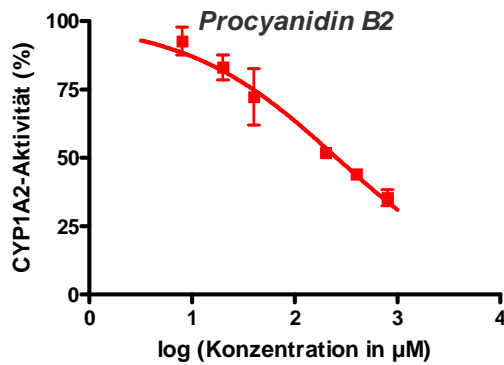


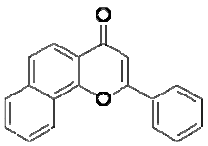
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Inhibition von CYP1A2 durch 19 Testsubstanzen: Regressionskurven durch 5-6 Mittelwerte aus 2-4 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung

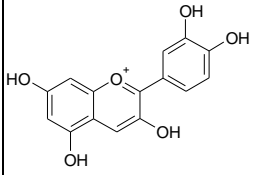
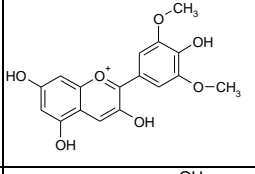
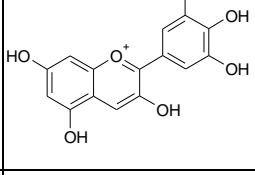
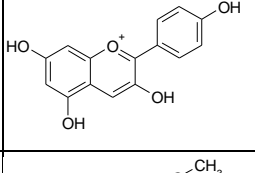
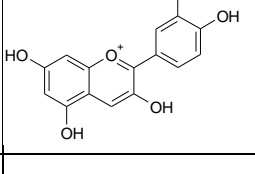
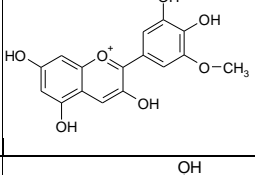
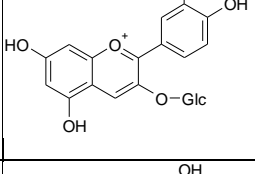
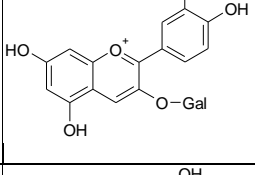
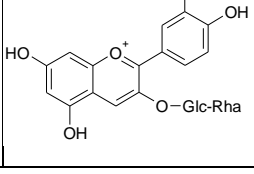
4.1.2. IC_{50} -Werte zu CYP1A2

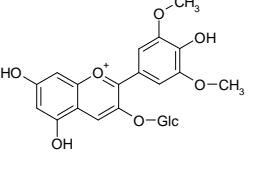
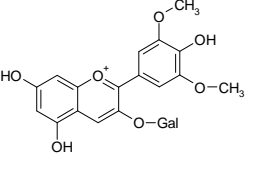
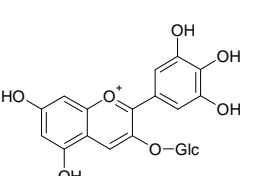
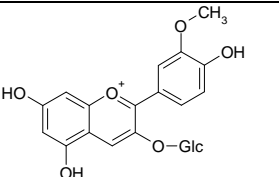
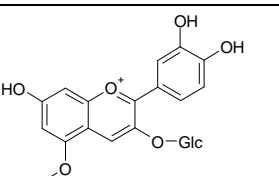
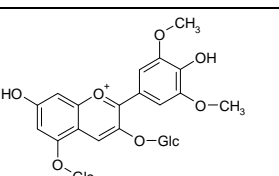
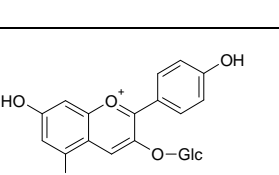
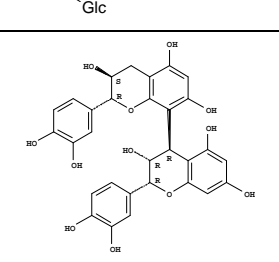
Die IC_{50} -Werte der untersuchten Flavonoide bewegen sich zwischen 27,83µM für Malvidin-3-O-galactosid und 330,7µM für Procyanidin B1 (Tab. 4). Nach Malvidin-3-O-galactosid erzielten Delphinidin ($IC_{50} = 34,62\mu\text{M}$) und Pelargonidin ($IC_{50} = 35,29\mu\text{M}$) die besten Hemmstärken. Zu den schwächeren Inhibitoren zählten Petunidin ($IC_{50} = 60,78\mu\text{M}$), Cyanin ($IC_{50} = 61,45\mu\text{M}$), Malvin ($IC_{50} = 76,24\mu\text{M}$) und Procyanidin B2 ($IC_{50} = 257,2\mu\text{M}$). Die Ergebnisse der weiteren Flavonoide Keracyanin ($IC_{50} = 41,49\mu\text{M}$), Myrtillin ($IC_{50} = 41,64 \mu\text{M}$), Cyanidin ($IC_{50} = 43,54\mu\text{M}$), Kuromanin ($IC_{50} = 46,32\mu\text{M}$), Malvidin ($IC_{50} = 50,28\mu\text{M}$), Ideain ($IC_{50} = 50,67\mu\text{M}$), Oenin ($IC_{50} = 51,83\mu\text{M}$), Pelargonin ($IC_{50} = 55,94\mu\text{M}$), Peonidin ($IC_{50} = 57,79\mu\text{M}$) und Peonidin-3-O-glucosid ($IC_{50} = 59,66\mu\text{M}$) lagen innerhalb dieses Wertebereichs.

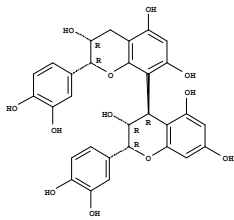
Der Vergleichsinhibitor α -Naphthoflavon erzielte einen IC_{50} -Wert von 0,00777µM.

Tabelle 4: IC_{50} -Werte zu CYP1A2

Testsubstanz	Strukturformel	Stoffgruppe	IC_{50}
α -Naphthoflavon		(Referenzsubstanz)	0,00777µM

Cyanidin		Anthocyanidin	43,54µM
Malvidin		Anthocyanidin	50,28µM
Delphinidin		Anthocyanidin	34,62µM
Pelargonidin		Anthocyanidin	35,29µM
Peonidin		Anthocyanidin	57,79µM
Petunidin		Anthocyanidin	60,78µM
Cyanidin-3-O-glucosid (Kuromanin)		Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)	46,32µM
Cyanidin-3-O-galactosid (Ideain)		Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)	50,67µM
Cyanidin-3-O-rutinosid (Keracyanin)		Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)	41,49µM

<p>Malvidin-3-O-glucosid (Oenin)</p>		<p>Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>51,83µM</p>
<p>Malvidin-3-O-galactosid</p>		<p>Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>27,83µM</p>
<p>Delphinidin-3-O-glucosid (Myrtillin)</p>		<p>Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>41,64µM</p>
<p>Peonidin-3-O-glucosid</p>		<p>Anthocyanidin-mono-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>59,66µM</p>
<p>Cyanidin-3,5-di-O-glucosid (Cyanin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>61,45µM</p>
<p>Malvidin-3,5-di-O-glucosid (Malvin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>76,24µM</p>
<p>Pelargonidin-3,5-di-O-glucosid (Pelargonin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>55,94µM</p>
<p>Procyanidin B1</p>		<p>Procyanidin</p>	<p>330,7µM</p>

Procyanidin B2		Procyanidin	257,2µM
----------------	---	-------------	---------

4.1.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und in vitro-Effekten

Zur Prüfung von möglichen Zusammenhängen zwischen chemischer Struktur und biologischen Effekten der Testsubstanzen wurden die Mittelwerte aus IC₅₀-Werten für strukturell verwandte Flavonoide verglichen.

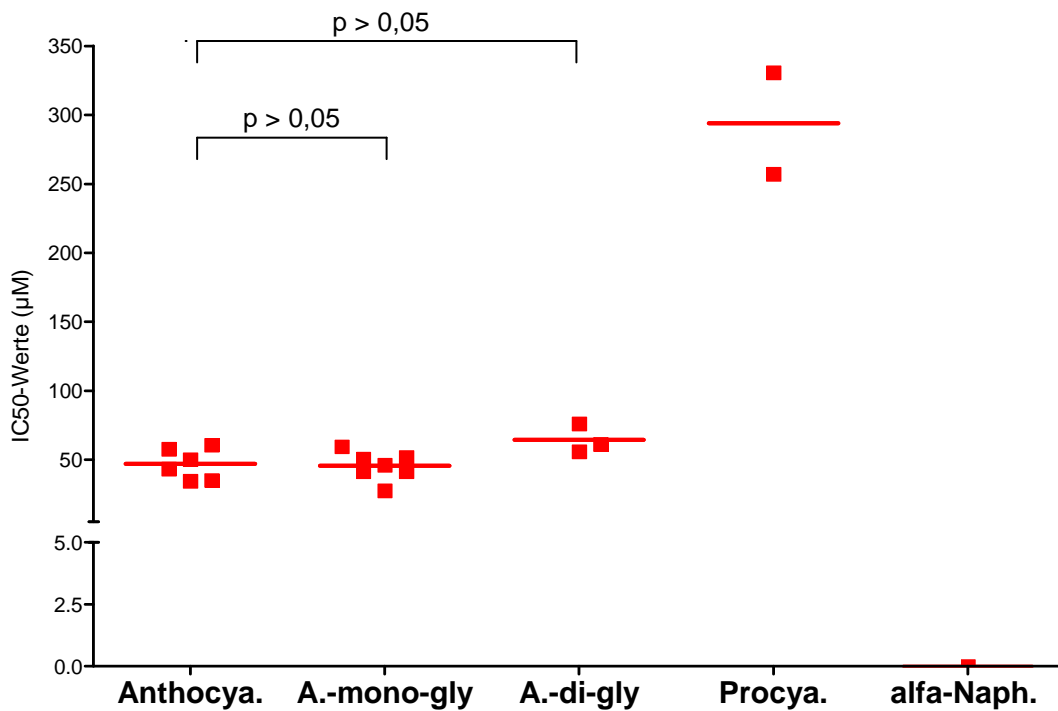


Abbildung 10: Ausmaß der CYP1A2-Hemmung in Abhängigkeit von strukturellen Merkmalen der Testsubstanzen: Anthocyanidine (Anthocya.), Anthocyanidin-mono-glykoside (A.-mono-gly), Anthocyanidin-di-glykoside (A.-di-gly), Procyanidine (Procya.) und α -Naphthoflavin (alfa-Naph.)

Es erfolgte eine Unterteilung in Anthocyanidine, Anthocyanidin-mono-glykoside, Anthocyanidin-di-glykoside und Procyanidine (Abb. 10). Für die Anthocyanidine

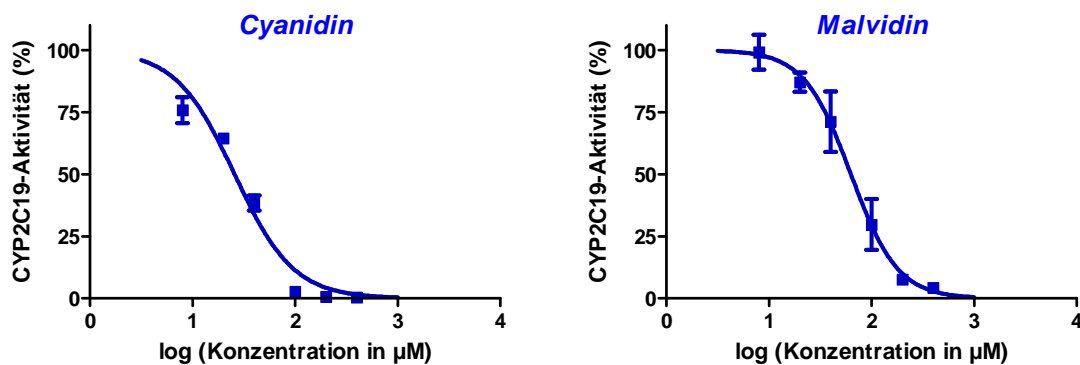
($34,62\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 60,78\mu\text{M}$) ergab sich ein Mittelwert von $47,05 \pm 11,13\mu\text{M}$, für die Monoglykoside ($27,83\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 59,66\mu\text{M}$) ein Mittelwert von $45,63 \pm 10,09\mu\text{M}$, für die Diglykoside ($55,94\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 76,24\mu\text{M}$) ein Mittelwert von $64,54 \pm 10,30\mu\text{M}$ und für die Procyanidine ($\text{IC}_{50} = 257,2\mu\text{M}$ und $330,7\mu\text{M}$) ein Mittelwert von $294,0 \pm 51,97\mu\text{M}$.

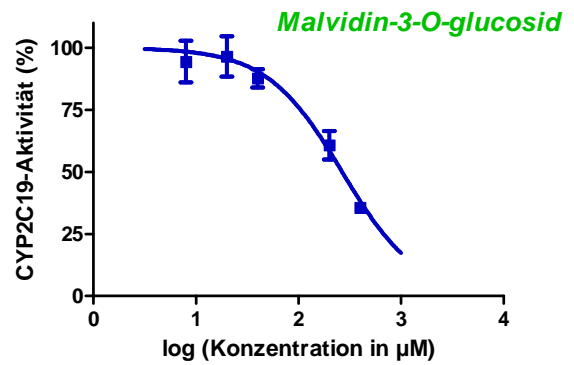
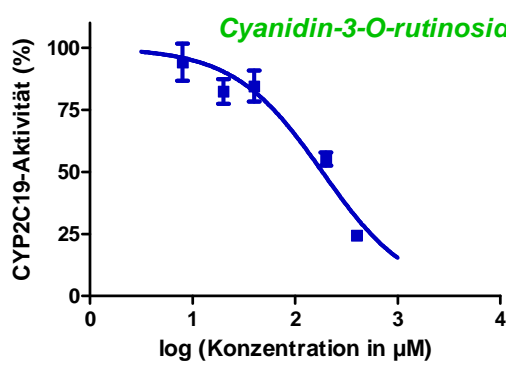
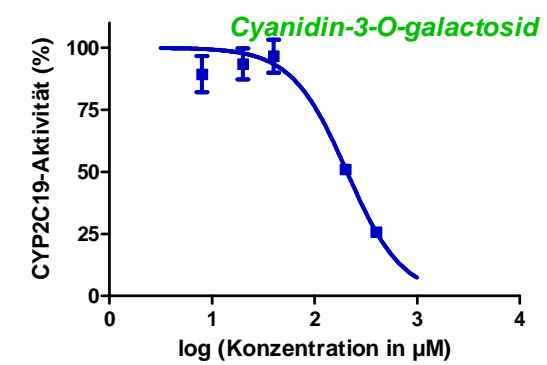
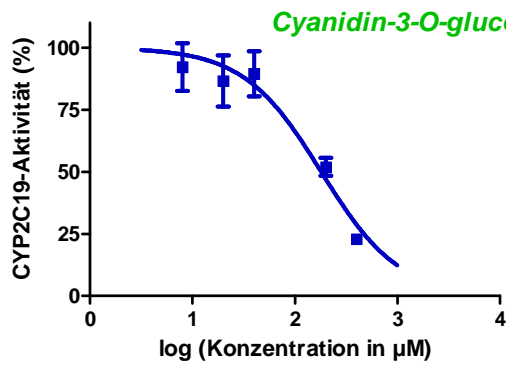
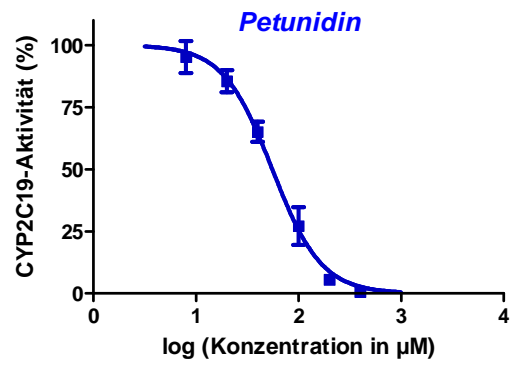
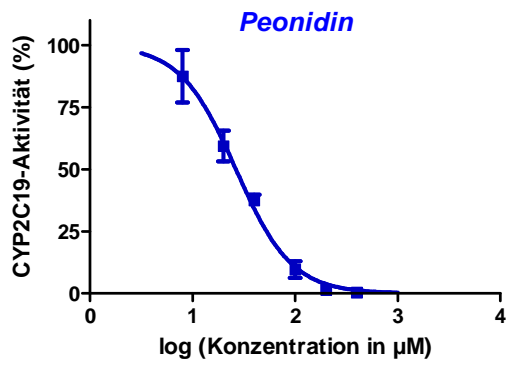
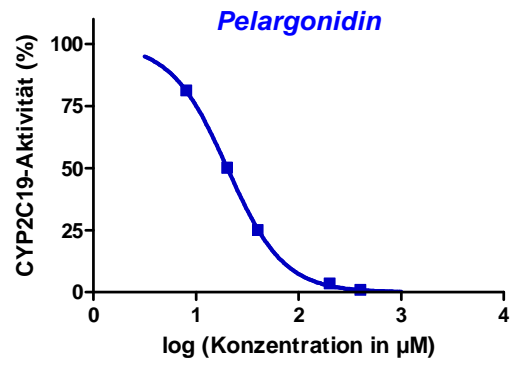
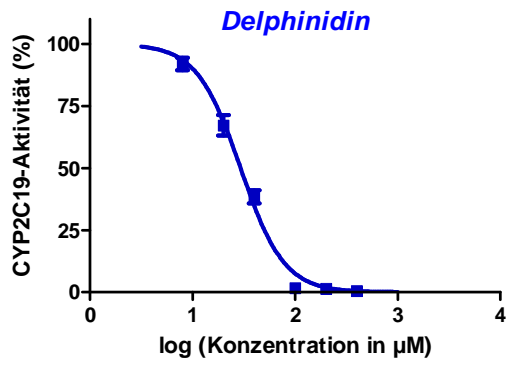
Somit waren die Procyanidine die schwächsten Hemmstoffe, gefolgt von Anthocyanidin-di-glykosiden, Anthocyanidinen und Anthocyanidin-mono-glykosiden. Gruppenunterschiede zwischen Anthocyanen mit unterschiedlicher Anzahl von Zuckerresten erreichten dabei nicht das Signifikanzniveau ($p > 0,05$, ANOVA, Abb. 10).

4.2. Effekte auf die CYP2C19-Aktivität

4.2.1. Konzentrationsabhängigkeit

Für alle Anthocyanidine, Anthocyanidin-mono-glykoside und Procyanidine ergab sich eine Abschwächung der CYP2C19-Aktivität mit steigender Konzentration (Abb. 11). Die Ergebnisse beruhen auf Mittelwerten von zwei bis drei Dreifachbestimmungen mit zugehöriger Standardabweichung. Der Abfall der CYP2C19-Aktivität konnte für alle Substanzen anhand des sigmoiden Kurvenmodells dargestellt werden.





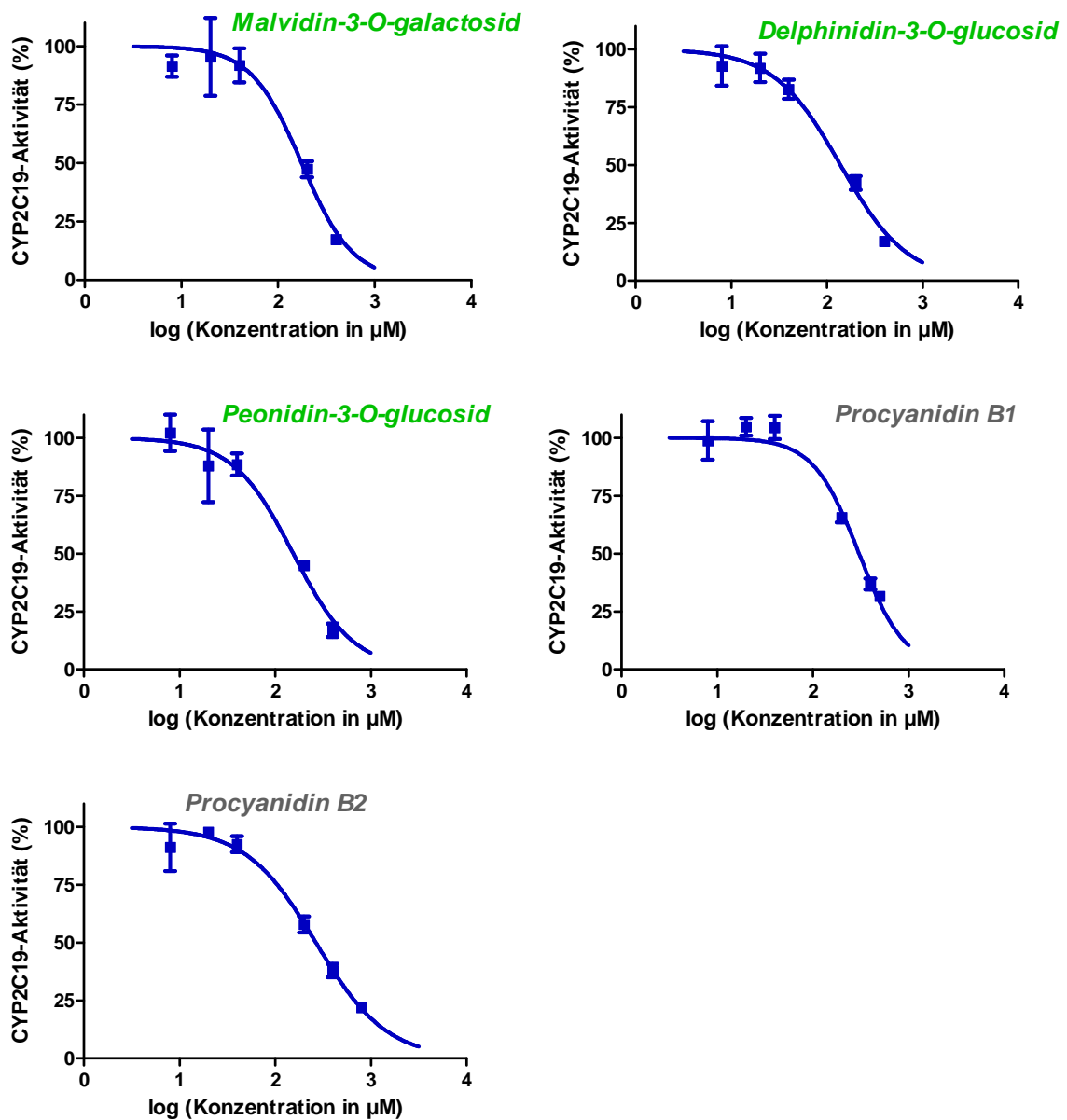


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Inhibition von CYP2C19 durch 15 Testsubstanzen: Regressionskurven durch 5-6 Mittelwerte aus 2-3 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung

Die Referenzsubstanz Fluvoxamin bewirkte in niedrigen Konzentrationen zunächst eine Steigerung der CYP2C19-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (Ansatz mit Lösungsmittel) auf 124,2%. Erst bei höheren Testkonzentrationen ($\geq 200\text{nM}$) fiel die Aktivität des Enzyms ab (Abb. 12). Heterogene Effekte wurden auch für Malvin, Pelargonin und Cyanin beobachtet, jedoch in geringerem Ausmaß (Maximalwerte 111,5%, 108,5% und 104,6%, Abb. 12). Für die Berechnung des IC_{50} -Wertes von Fluvoxamin und den Anthocyanidin-di-glykosiden diente ein bimodales Kurvenmodell, das ein relatives Aktivitätsmaximum $>100\%$ vor

Einsetzen der Inhibition postulierte (Anger et al. 2005). Dadurch wurde die Berechnung eines falsch hohen IC_{50} -Werts vermieden ($IC_{50} = 0,48\mu M$ bei Anwendung eines einfach sigmoiden Kurvenverlaufs ohne Berücksichtigung der initialen Aktivitätssteigerung, $IC_{50} = 0,40\mu M$ bei Anwendung des bimodalen Modells). Die Regressionskurven für Cyanin, Malvin und Pelargonin konvergierten nicht, die jeweiligen IC_{50} -Werte wurden daher aus den Verbindungslinien der Mittelwerte in Abbildung 12 geschätzt.

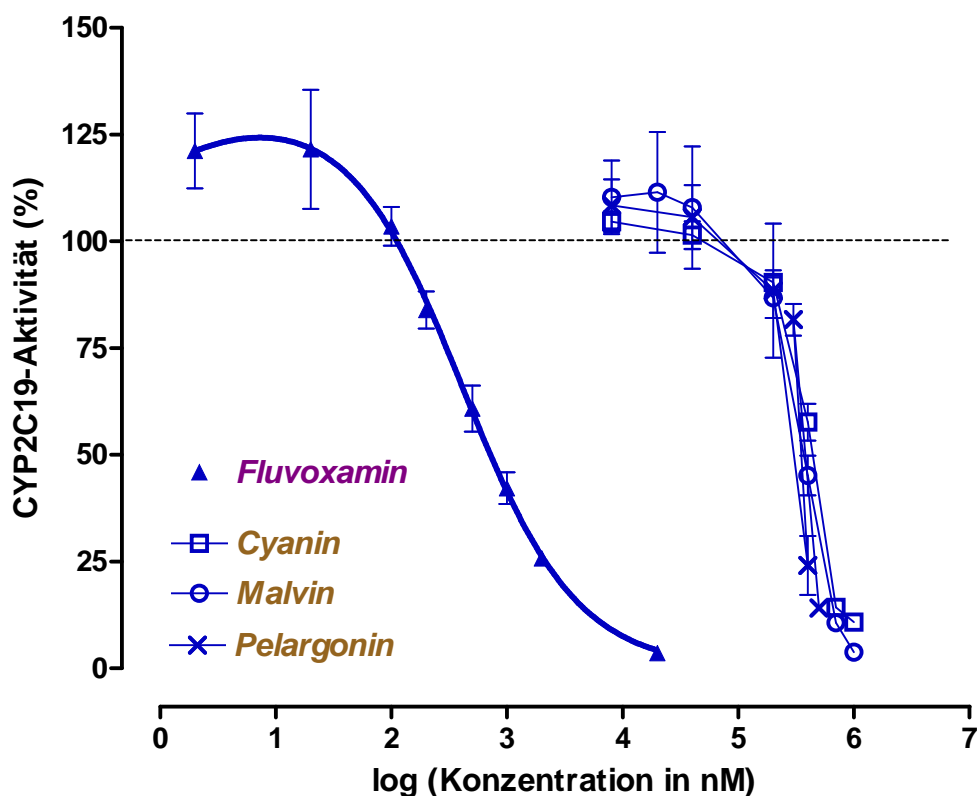


Abbildung 12: Heterogene Effekte von Fluvoxamin, Cyanin, Malvin und Pelargonin auf die CYP2C19-Aktivität: Biphaseische Regressionskurven durch 6-8 Mittelwerte aus 2-3 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung

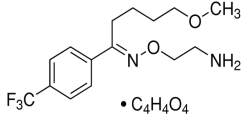
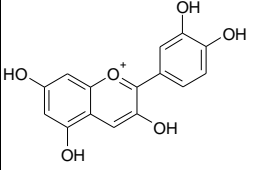
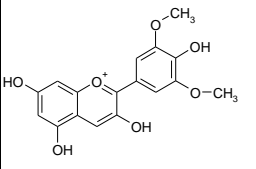
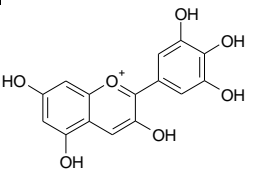
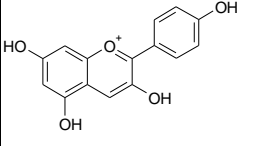
4.2.2. IC_{50} -Werte zu CYP2C19

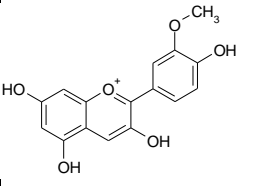
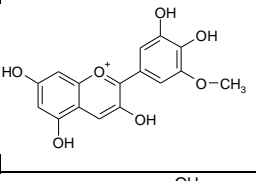
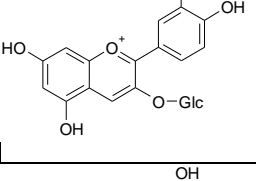
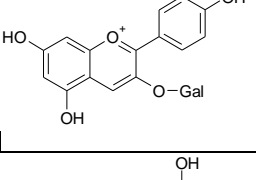
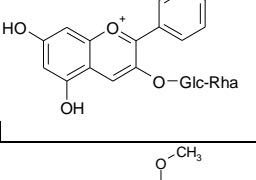
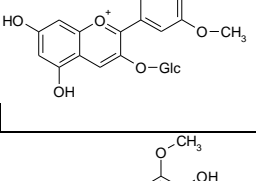
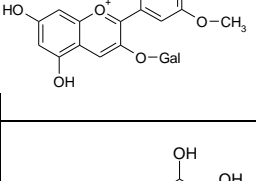
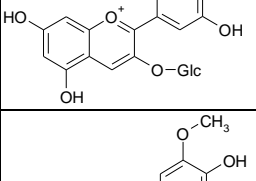
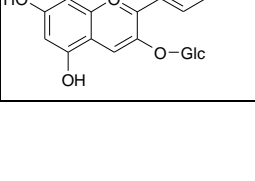
In der Reihenfolge abfallender Effektstärke wurden die Flavonoide angeführt von Pelargonidin ($IC_{50} = 20,23\mu M$), Cyanidin ($IC_{50} = 25,76\mu M$), Peonidin ($IC_{50} =$

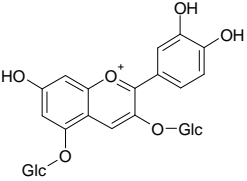
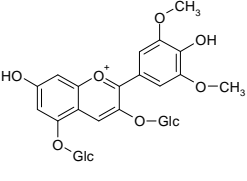
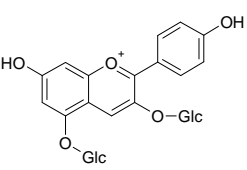
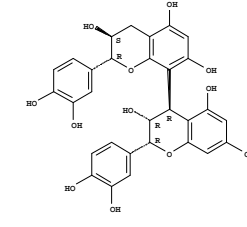
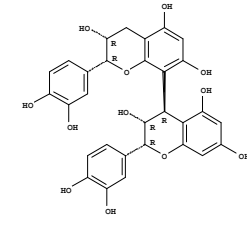
26,49 μ M) und Delphinidin (IC_{50} = 29,38 μ M) (Tab. 5). Zu den schwächeren Inhibitoren zählten Oenin (IC_{50} = 266,7 μ M), Procyanidin B2 (IC_{50} = 266,7 μ M), Procyanidin B1 (IC_{50} = 304,3 μ M) und die Anthocyanidin-di-glykoside Cyanin, Malvin und Pelargonin (IC_{50} jeweils > 316 μ M). Niedrigere IC_{50} -Werte wurden für Petunidin (IC_{50} = 55,59 μ M), Malvidin (IC_{50} = 62,95 μ M), Myrtillin (IC_{50} = 138,0 μ M), Peonidin-3-O-glucosid (IC_{50} = 154,5 μ M), Malvidin-3-O-galactosid (IC_{50} = 175,8 μ M), Kuromanin (IC_{50} = 180,3 μ M), Keracyanin (IC_{50} = 184,5 μ M) und Ideain (IC_{50} = 207,0) bestimmt.

Der Vergleichsinhibitor Fluvoxamin erzielte einen IC_{50} -Wert von 0,4036 μ M. Die halbmaximale Induktion (EC_{50}) von CYP2C19 wurde bei einer Fluvoxaminkonzentration von 0,75nM erreicht.

Tabelle 5: IC_{50} -Werte zu CYP2C19

<i>Testsubstanz</i>	<i>Strukturformel</i>	<i>Stoffgruppe</i>	<i>IC_{50}</i>
Fluvoxamin	 • C ₄ H ₄ O ₄	(Referenzsubstanz)	0,4036μM
Cyanidin		Anthocyanidin	25,76μM
Malvidin		Anthocyanidin	62,95μM
Delphinidin		Anthocyanidin	29,38μM
Pelargonidin		Anthocyanidin	20,23μM

Peonidin		Anthocyanidin	26,49µM
Petunidin		Anthocyanidin	55,59µM
Cyanidin-3-O-glucosid (Kuromanin)		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	180,3µM
Cyanidin-3-O- galactosid (Ideain)		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	207,0µM
Cyanidin-3-O- rutinosid (Keracyanin)		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	184,5µM
Malvidin-3-O-glucosid (Oenin)		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	266,7µM
Malvidin-3-O- galactosid		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	175,8µM
Delphinidin-3-O- glucosid (Myrtillin)		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	138,0µM
Peonidin-3-O-glucosid		Anthocyanidin-mono- glykosid (Anthocyanin)	154,5µM

<p>Cyanidin-3,5-di-O-glucosid (Cyanin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>>316µM</p>
<p>Malvidin-3,5-di-O-glucosid (Malvin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>>316µM</p>
<p>Pelargonidin-3,5-di-O-glucosid (Pelargonin)</p>		<p>Anthocyanidin-di-glykosid (Anthocyanin)</p>	<p>>316µM</p>
<p>Procyanidin B1</p>		<p>Procyanidin</p>	<p>304,3µM</p>
<p>Procyanidin B2</p>		<p>Procyanidin</p>	<p>266,7µM</p>

4.2.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und in vitro-Effekten

Zur Ermittlung von Zusammenhängen zwischen chemischer Struktur und biologischen Effekten der Testsubstanzen wurden die Mittelwerte aus IC_{50} -Werten für strukturell verwandte Flavonoide verglichen. Da die biphasischen Regressionskurven der Anthocyanidin-di-glykoside nicht konvergiert hatten, hätten allenfalls die aus den Verbindungslinien geschätzten IC_{50} -Werte für diese Substanzen herangezogen werden können (Abb. 12). Auf einen statistischen Vergleich dieser Schätzwerte mit den übrigen Messwerten wurde verzichtet.

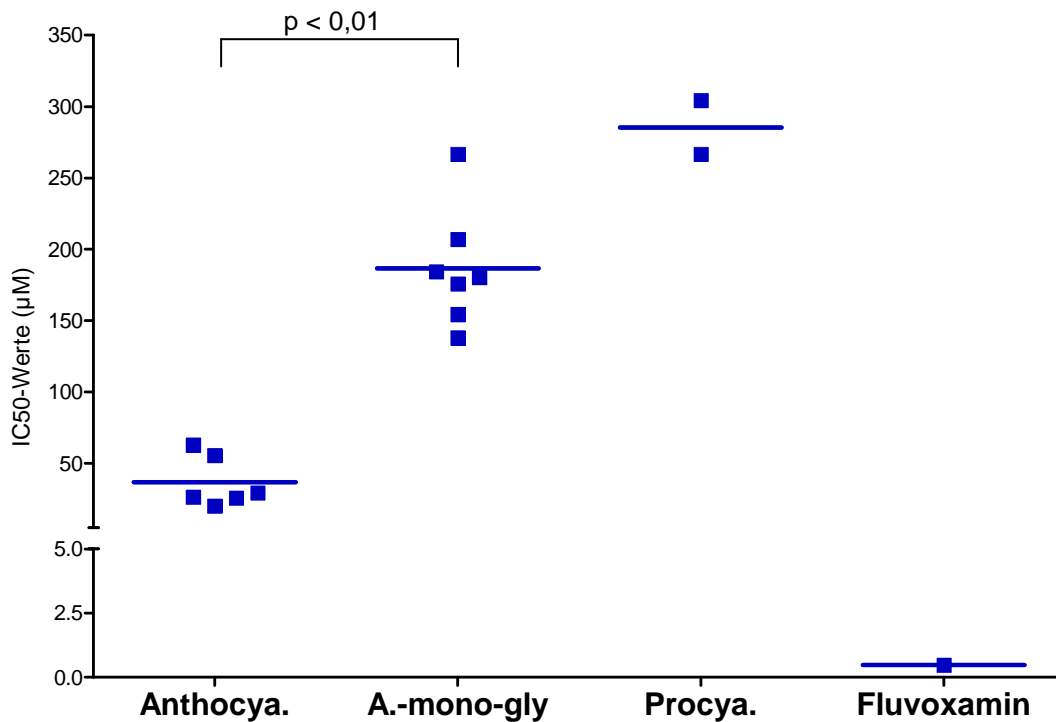


Abbildung 13: Ausmaß der CYP2C19-Hemmung in Abhängigkeit von strukturellen Merkmalen der Testsubstanzen: Anthocyanidine (Anthocya.), Anthocyanidin-mono-glykoside (A.-mono-gly), Procyanidine (Procya.) und Fluvoxamin

Es erfolgte eine Unterteilung in Anthocyanidine, Anthocyanidin-mono-glykoside und Procyanidine (Abb. 13). Für die Anthocyanidine ($20,23\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 62,95\mu\text{M}$) ergab sich ein Mittelwert von $36,73 \pm 17,86\mu\text{M}$, für die Monoglykoside ($138,0\mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} \leq 266,7\mu\text{M}$) ein Mittelwert von $186,7 \pm 41,60\mu\text{M}$ und für die Procyanidine ($\text{IC}_{50} = 266,7\mu\text{M}$ und $304,3\mu\text{M}$) ein Mittelwert von $285,5 \pm 26,59\mu\text{M}$. Für die Anthocyanidin-di-glykoside überschritten die geschätzten IC_{50} -Werte $316\mu\text{M}$.

Das Vorhandensein oder Fehlen eines Zuckerrestes am Anthocyan bewirkt dabei einen signifikanten Unterschied in der Höhe des IC_{50} -Wertes und somit im Ausprägungsgrad der CYP2C19-Inhibition ($p < 0,01$, ANOVA, Abb. 13).

5. DISKUSSION

5.1. Inhibition von CYP1A2

Flavonoide können prinzipiell sowohl als Induktoren als auch als Inhibitoren des Cytochrom P450-Systems fungieren (Hodek et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde eine zunehmende Hemmung der CYP1A2-Aktivität mit steigender Konzentration von Anthocyanidinen, Anthocyaninen und Procyanidinen beobachtet. Dabei lagen die ermittelten IC_{50} -Werte der Anthocyane zwischen $27,83\mu\text{M}$ und $76,24\mu\text{M}$, die IC_{50} -Werte der Procyanidine bei $257,2\mu\text{M}$ und $330,7\mu\text{M}$. Die verwendete Vergleichssubstanz α -Naphthoflavin, ein starker Inhibitor von CYP1A2 (Yin et al. 2000; Cho et al. 2003), erzielte einen IC_{50} -Wert von $0,00777\mu\text{M}$. Seine hemmende Wirkung lag damit um den Faktor 3500 höher als der Effekt des wirkungsstärksten Flavonoids Malvidin-3-O-galactosid ($27,83\mu\text{M}$). Vergleichswerte aus anderen Versuchsreihen liegen bei $0,04\text{--}2\mu\text{M}$ (Shader et al. 1999; Kim et al. 2005).

Das Spektrum bekannter Inhibitoren umfasst neben α -Naphthoflavin das Antidepressivum Fluvoxamin mit einem IC_{50} -Wert von $0,2\mu\text{M}$ (Brøsen et al. 1993), das Methylxanthin-Derivat Furafyllin mit IC_{50} -Werten von $0,2\text{--}6\mu\text{M}$ (Testino & Patonay 2003; Walsky & Obach 2004; Kim et al. 2005) und das Antibiotikum Ciprofloxacin mit einem IC_{50} von $135\mu\text{M}$ (Zhang et al. 2008). Dessen Wirkstärke ist mit der von Anthocyanen und Procyanidinen aus der eigenen Untersuchung am ehesten vergleichbar.

Arbeiten zur Hemmung von CYP1A2 durch andere Flavonoide (Flavone, Flavanone, Xanthone) liefern sowohl höhere als auch deutlich niedrigere IC_{50} -Werte (Tab. 6). Vor allem die Flavone Flavon ($0,07\mu\text{M}$), Acacetin ($0,08\mu\text{M}$), Chrysin ($0,2\mu\text{M}$) und Diosmetin ($0,44\mu\text{M}$) übertreffen die Hemmeigenschaften der Anthocyane und Procyanidine. Für Apigenin, Galangin, Isoxanthohumol, Morin, Luteolin, Xanthohumol, Kaempferol, Quercetin, Naringenin, Myricetin, Fisetin, Hesperetin und Hesperidin werden dagegen IC_{50} -Werte zwischen $1,35\mu\text{M}$ und

489µM genannt (Lee et al. 1998; Zhai et al. 1998; Doostdar et al. 2000; Henderson et al. 2000, Tab. 6).

Tabelle 6: CYP1A2-Hemmung durch Flavonoide

Verbindung	IC ₅₀ (µM)	Versuchssystem (a)	Referenz
Flavon	0,07	Hu Ex	Zhai et al. 1998
5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon (Acacetin)	0,08	Hu Ex	Doostdar et al. 2000
5,7-Dihydroxyflavon (Chrysin)	0,2	Hu Ms	Lee et al. 1998
5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavon (Diosmetin)	0,44	Hu Ex	Doostdar et al. 2000
5,7,4'-Trihydroxyflavon (Apigenin)	1,35	Hu Ms	Lee et al. 1998
3,5,7-Trihydroxyflavon (Galangin)	3,1	Hu Ms	Lee et al. 1998
Isoxanthohumol	4,5	Hu Ex	Henderson et al. 2000
3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavon (Morin)	9,5	Hu Ms	Lee et al. 1998
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (Luteolin)	13,4	Hu Ms	Lee et al. 1998
Xanthohumol	31,4	Hu Ex	Henderson et al. 2000
3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon (Kaempferol)	73,4	Hu Ms	Lee et al. 1998
3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon (Quercetin)	169	Hu Ms	Lee et al. 1998
5,7,4'-Trihydroxyflavanon (Naringenin)	182	Hu Ms	Lee et al. 1998
3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavon (Myricetin)	185	Hu Ms	Lee et al. 1998
3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (Fisetin)	237	Hu Ms	Lee et al. 1998
5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon (Hesperetin)	272	Hu Ms	Lee et al. 1998
Hesperetin-7-rutinosid (Hesperidin)	489	Hu Ms	Lee et al. 1998

(a): IC₅₀-Werte wurden mit humanen (Hu) lebermikrosomalen (Ms) oder rekombinanten (Ex) CYP-Präparationen bestimmt

Standardisierter Johanniskrautextrakt (*Hypericum perforatum*), ein flavonoidhaltiges Antidepressivum, vermag eine Wirkabschwächung anderer Arzneimittel über Induktion von CYP3A4 und P-Glykoprotein auszulösen (Mannel 2004; Zhou et al. 2004). Dabei können durch die verschiedenen Inhaltsstoffe des Johanniskrauts auch weitere CYP-Enzyme induziert sowie inhibiert werden (Zhou et al. 2004). Für die Hemmung von CYP1A2 durch Hyperforin, Hypericin sowie die Flavone I3,I18-Biapigenin und Quercetin aus Johanniskraut wurden IC₅₀-Werte von >100µM, >100µM, 3,7µM bzw. 7,5µM bestimmt (Obach 2000). Hyperforin und

Hypericin sind demnach schwächere, die beiden Flavone geringfügig stärkere Inhibitoren von CYP1A2 als die Flavonoide der vorliegenden Arbeit.

Verglichen mit pharmakologisch aktiven Inhaltsstoffen aus Grapefruitsaft werden ungleich größere Mengen an Anthocyanen und Procyanidinen benötigt, um 50% der Cytochrom P450-Enzymaktivität zu hemmen. Die inhibitorische Wirkung der Furanocumarine Bergamottin, 6',7'-Dihydroxybergamottin, GF-I-1 und GF-I-4 bezieht sich primär auf CYP3A4 (Tassaneeyakul et al. 2000; Uno & Yasui-Furukori 2006; Kiani & Imam 2007). Für diese Stoffe wurden IC_{50} -Werte zwischen $0,003\mu M$ und $1,7\mu M$ ermittelt, wobei die Furanocumarin-Dimere GF-I-1 und GF-I-4 die stärksten Inhibitoren darstellten (Tassaneeyakul et al. 2000). Ihre IC_{50} -Werte liegen etwa 10.000x niedriger als die hier bestimmten Werte von Anthocyanen und Procyanidinen. Furanocumarine aus Grapefruitsaft hemmen aber mit IC_{50} -Werten zwischen $0,3\mu M$ und $5\mu M$ auch CYP1A2 um den Faktor 100 stärker als Anthocyane und Procyanidine (Tassaneeyakul et al. 2000).

Es muss jedoch angemerkt werden, dass die ermittelten IC_{50} -Werte nicht uneingeschränkt mit IC_{50} -Werten anderer Arbeiten verglichen werden können, da unterschiedliche Assaybedingungen, z.B. mittels Co-Inhibition durch Begleitsubstanzen, auch unterschiedliche Resultate liefern können (Walsky & Obach 2004).

5.2. Effekte auf die CYP2C19-Aktivität

Mit einer Inhibition von CYP2C19 sind zahlreiche Fälle von Medikamentenresistenz, unerwünschten Arzneimittelwirkungen und lebensbedrohlichen Medikamenteninteraktionen in Verbindung gebracht worden (Mahlberg et al. 2004; Tahir 2004; Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006; Ailawadhi et al. 2007; Levin et al. 2008).

Analog zu den Beobachtungen für CYP1A2 wurde eine zunehmende Hemmung der CYP2C19-Aktivität bei steigenden Konzentrationen von Anthocyanidinen, Anthocyanidin-mono-glykosiden und Procyanidinen festgehalten. Dabei bewegten sich die ermittelten IC_{50} -Werte der Anthocyane zwischen $20,23\mu M$ und $266,7\mu M$, die IC_{50} -Werte der Procyanidine lagen bei $266,7\mu M$ und $304,3\mu M$.

IC₅₀-Werte der gleichen Größenordnung lieferten auch Untersuchungen an anderen Cytochrom P450-Enzymen. So erzielten Anthocyane für CYP3A4 IC₅₀-Werte zwischen 12,2µM und 249,0µM, für CYP2D6 Werte zwischen 55µM und 266µM sowie für CYP2C9 Werte zwischen 12,1µM und 233,5µM. Bei Procyanidinen ergaben sich IC₅₀-Werte von 539,8µM und 779,9µM für CYP3A4 und von >800µM für CYP2D6 (Dreiseitel et al. 2008; Dreiseitel et al. 2009; Ramírez Pérez 2009). Anthocyane waren damit durchweg stärkere Inhibitoren der Aktivität von CYP3A4, CYP2D6 und CYP2C19 als die Procyanidine B1 und B2. Die eigenen Befunde zu CYP1A2 bestätigen ebenfalls diese Unterschiede innerhalb der Testsubstanzreihe.

Die Vergleichssubstanz Fluvoxamin, ein moderater Inhibitor von CYP2C19 (Brøsen 1996; Jeppesen et al. 1996), erzielte einen IC₅₀-Wert von 0,40µM. Pelargonidin, das wirkungsstärkste Flavonoid, war demnach mit einem IC₅₀-Wert von 20,23µM ein 50-fach schwächerer Hemmstoff der CYP2C19-Aktivität als Fluvoxamin.

Zu weiteren bekannten CYP2C19-Inhibitoren zählt (+)-N-3-Benzylrivanol (IC₅₀= 0,4µM), ein Derivat von Nirvanol, dem Metabolit des Antiepileptikums Mephenytoin (Walsky & Obach 2003; Kim et al. 2005; Jansson et al. 2006). Der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol ist hingegen mit IC₅₀-Werten von 5,6µM (Shader et al. 1999) bzw. 17,8µM (Kim et al. 2005) ein nur geringfügig stärkerer CYP2C19-Inhibitor als die hier untersuchten Anthocyane.

Auch für einzelne Flavonoide ist eine Inhibition von CYP2C19 vorbeschrieben: Dabei stellen verschiedene aus der Baikal-Helmkrautwurzel (*Radix Scutellariae*) isolierte Vertreter relativ schwache Inhibitoren der CYP2C19-Aktivität dar (IC₅₀ > 50 µM). Sie wirken stärker auf die Isoenzyme CYP3A4, CYP2C9 und CYP1A2 mit IC₅₀-Werten zwischen 0,7 und 51,3µM (Kim et al. 2002).

Auch das Flavon Quercetin, das unter anderem in Äpfeln vorkommt, und die Ginsenoside Rd und Rb2 aus Ginseng (*Panax ginseng*) weisen für CYP2C19 mikromolare IC₅₀-Werte auf (46µM, 46µM und 62µM) (He et al. 2006).

Vergleichbare Resultate liefern Inhaltsstoffe des Johanniskrauts: Hyperforin (IC₅₀ = 31µM), Hypericin (IC₅₀ = 37µM) und I3,II8-Biapigenin (IC₅₀ = 28µM) (Obach 2000).

Wenn inhibitorische Effekte der Furanocumarine GF-I-1 und GF-I-4 aus Grapefruitsaft auf CYP3A4 als Referenz betrachtet werden, fällt die Effektstärke bei Anthocyanen und Procyanidinen für CYP2C19 etwa 10.000-fach niedriger aus. Auch CYP2C19 wird von Furanocumarinen etwa 100-fach stärker gehemmt als von den hier geprüften Flavonoiden (Tassaneeyakul et al. 2000).

Die Anthocyanidin-di-glykoside (Pelargonin, Malvin und Cyanin) sowie Fluvoxamin zeigten eine heterogene Wirkung auf CYP2C19. Während sie in höheren Konzentrationen die Aktivität des Enzyms inhibierten, führten sie in niedrigen Konzentrationen zu einer Steigerung der CYP2C19-Aktivität im Vergleich zum Leerwert (Messungen nur mit Lösungsmittel).

Auch in früheren Arbeiten konnten heterogene Effekte von Flavonoiden auf die Cytochrom P450-Aktivität beobachtet werden. So führten Polyphenole verschiedener Teesorten in geringen Konzentrationen zu einer Steigerung und in höheren Konzentrationen zu einer Hemmung der CYP1A1- und CYP1A2-Aktivität (Obermeier et al. 1995; Anger et al. 2005). Flavonoide aus Mariendisteln (*Silybum marianum*) zeigten den gleichen Effekt gegenüber CYP3A4 (Zuber et al. 2002). Eine heterogene Wirkung gegenüber CYP2C19 wurde für Extrakte aus Johanniskraut und *Ginkgo biloba* festgestellt (Hellum et al. 2009). Ebenso können Medikamente wie das Antiepileptikum Carbamazepin, das Neuroleptikum Haloperidol und das Antihistaminikum Terfenadin substratabhängig entweder als Induktoren oder als Inhibitoren von CYP3A4 wirken (Stresser et al. 2000). Gleiches gilt für das Antiarrhythmikum Amiodaron und den Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten Zafirlukast gegenüber CYP2C9 (Heimark et al. 1992; Shader et al. 1999; Egnell et al. 2003). Insgesamt finden sich monomodale Effekte auf die Cytochrom P450-Aktivität deutlich häufiger. Es muss jedoch die Möglichkeit eingeräumt werden, dass heterogene Effekte in anderen Arbeiten nicht aufgefallen sein könnten, wenn Konzentrationsstufen außerhalb des Induktionsbereichs gewählt worden sind.

Die Berechnung bimodaler Effekte wurde bisher nur in einzelnen Arbeiten versucht. Die IC_{50} - und EC_{50} -Werte der heterogen wirkenden Substanzen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Anpassung der zuvor von Anger et al. (2005) vorgeschlagenen Gleichung berechnet.

Besonders ausgeprägt waren heterogene Effekte bei der Vergleichssubstanz Fluvoxamin. Das bislang als reiner CYP2C19-Inhibitor eingestufte Antidepressivum (Brøsen 1996; Jeppesen et al. 1996) führte bei einer Konzentration von 0,75nM zu halbmaximaler Induktion (EC_{50}) des Enzyms. Es ist einer früheren Untersuchung zu entnehmen, dass durch geringe Konzentrationen von Fluoxetin, einem weiteren selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, eine grenzwertige Induktion von CYP2C19 *in vitro* beobachtet werden kann (McGinnity et al. 2006). In höheren Konzentrationen gilt auch Fluoxetin als moderater Inhibitor von CYP2C19 (Brøsen 1996; Jeppesen et al. 1996).

5.3. Zusammenhang von Flavonoidstruktur und Effekten auf das Cytochrom P450-System

Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Ringen und einem O-heterozyklischen Ring, dessen strukturelle Unterschiede zur Einteilung in die verschiedenen Untergruppen geführt haben (Abb. 1; Abb. 14). Die Kombination von Flavonoidstrukturen, gebundenen Zuckern und Acylierung bedingt ihre Komplexität und erklärt ihre strukturelle Vielfalt (Erdman et al. 2007). Mit Ausnahme der Flavanole, zu denen die Procyanidine zählen, kommen Flavonoide in der Natur als Glykoside vor (Watzl & Rechkemmer 2001). Vom menschlichen Körper werden Anthocyane als Glykoside und - nach Hydrolyse der Zuckerkomponente im Darm - auch als Aglykone aufgenommen (McGhie & Walton 2007).

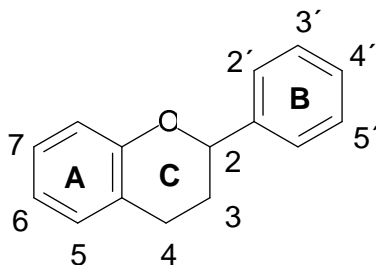


Abbildung 14: Grundstruktur der Flavonoide
(Vgl. Erdman et al. 2007)

Zusammenhänge zwischen Strukturmerkmalen von Flavonoiden und ihren biologischen Effekten, wie Antioxidation, Antiproliferation oder Enzym-Inhibition, sind bereits postuliert worden (Depeint et al. 2002).

So haben frühere Untersuchungen auf eine inverse Beziehung zwischen der Flavonoid-Glykosylierung und dem Effekt der Substanzen auf antioxidative Eigenschaften hingewiesen (Rice-Evans et al. 1996; Lazzé et al. 2003). Eine 3',4'-Hydroxylierung des B-Rings und 3-Hydroxylierung des C-Rings von Anthocyanen (z.B. Cyanidin, Delphinidin) scheint sich hingegen besonders positiv auf das antioxidative Potential auszuwirken (Noda et al. 2002; Hanamura et al. 2005; Choi et al. 2007; Yi et al. 2010, Abb. 14).

Für den antiproliferativen Effekt von Flavonoiden sollen die Carbonyl-Gruppe und die fehlende Sättigung des C-Rings sowie die Position des gebundenen B-Rings entscheidend sein, und die besondere Rolle von Flavonen bzw. Flavonolen erklären (Depeint et al. 2002). Die Glykosylierung wiederum soll, unabhängig von der Art oder Position des Zuckers, zu einer deutlichen Effektabschwächung führen (Depeint et al. 2002; Jing et al. 2008). Schließlich wird angenommen, dass die Acylierung von Anthocyanen deren antiproliferative Wirkung negativ beeinflusst (Jing et al. 2008). Den größten östrogenartigen Effekt zeigen dagegen Isoflavone und Flavonoide mit zwei bis vier unmethylierten OH-Gruppen an Position 6, 7 und 4' (Zand et al. 2000).

Auch die Interaktion von Flavonoiden und Enzymen wird von Strukturmerkmalen beeinflusst. So hängt z.B. das inhibitorische Potential von Anthocyanen gegenüber der α -Glucosidase von der Acylierung mit Kaffee- oder Ferulasäure ab (Matsui et al. 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind die früher beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Flavonoiden und CYP-Enzymen von besonderem Interesse. Die inhibitorische Aktivität von Flavonen gegenüber CYP3A4 wird demnach durch 7- und 4'-Hydroxylierung erhöht, während Hydroxylierung an Position 2' und 3', Methoxylierung an Position 4' sowie die Isoflavon-Grundstruktur zu einer Effektabschwächung führen (Tsujimoto et al. 2009). CYP1A2 wird besonders stark von planen Molekülen mit kleinem Volumen/Oberflächen-Verhältnis inhibiert. Entsprechend stellen Flavanone und Flavanole, bei denen der B-Ring beinahe senkrecht zum restlichen Molekül

ausgerichtet ist (keine C2,C3-Doppelbindung), die schwächsten Inhibitoren dar (Hodek et al. 2002). Für die Hydroxylierung des B-Rings von Flavonen wurde keine Auswirkung auf die Inhibition von CYP1B1 beobachtet. Jedoch führt dieses Strukturmerkmal zu einer gesteigerten Hemmung von CYP1A1 und zu einer abgeschwächten Hemmung von CYP1A2 (Kim* et al. 2005). Auch eine Glykosylierung und Methoxylierung von Flavonoiden hat in früheren Untersuchungen zu einer drastischen Abnahme der inhibitorischen Aktivität gegenüber CYP1A2 geführt (Hodek et al. 2002).

Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss der Glykosylierung von Anthocyanen auf die CYP1A2-Hemmstärke festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht auch im Gegensatz zu Untersuchungen zur Hemmung von CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 durch Anthocyane, bei denen eine signifikante Abschwächung des inhibitorischen Potentials in Folge der Glykosylierung beobachtet wurde (Dreiseitel et al. 2008; Dreiseitel et al. 2009; Ramírez Pérez 2009; Sand et al. 2010). Für CYP2C19 lag in der vorliegenden Arbeit der IC_{50} -Mittelwert der Anthocyanidin-mono-glykoside mit $186,7 \pm 41,60 \mu\text{M}$ etwa fünffach höher als der Mittelwert der Anthocyanidine ($36,73 \pm 17,86 \mu\text{M}$). Glykosylierte Anthocyane hemmten damit die CYP2C19-Aktivität signifikant schwächer als Anthocyanidine ohne Zuckerrest ($p < 0,01$).

Weitere für die Inhibition von CYP1A2 und CYP2C19 relevante Strukturmerkmale der untersuchten Anthocyane konnten in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden. Diese Beurteilung unterliegt aber Einschränkungen, die aus vereinfachten Modellen ohne Simulation der Wechselwirkungen resultieren. Dementsprechend sind die Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen als vorläufig zu interpretieren.

5.4. Beurteilung der Effektstärken – klinische Relevanz

5.4.1. Risiko von Lebensmittel-Medikament-Interaktionen

Schätzungen zufolge nehmen Personen in Industrienationen durchschnittlich ca. 1g Flavonoide am Tag mit der Nahrung auf (Kroon & Williamson 2005). Hiervon entfällt ein wachsender Anteil auf Nahrungsergänzungsmittel: Einer von drei US-Amerikanern nimmt täglich Nahrungsergänzungsmittel zu sich (Millen et al. 2004). Im Jahr 1997 verwendeten geschätzte 15 Millionen erwachsene US-Amerikaner Phytopräparate und/oder hoch dosierte Vitamine gleichzeitig mit verschreibungspflichtigen Medikamenten (Eisenberg et al. 1998). In Deutschland konsumieren inzwischen über 40% der Bevölkerung Nahrungsergänzungsmittel (Beitz et al. 2004). Ärzten gegenüber wird der Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln durch Patienten nicht immer preisgegeben (Cheung et al. 2007). Es muss davon ausgegangen werden, dass besonders bei der großen Zahl älterer Konsumenten von Nahrungsergänzungsmitteln (Qato et al. 2008), deren Gebrauch häufig mit der Einnahme von Arzneimitteln zusammenfällt. Damit gewinnt auch die toxikologische Einordnung von Pflanzenextrakten an klinischer Bedeutung. Zwar wurden Traubenkernextrakte, die mit oligomeren Procyanidinen (OPC) angereichert sind, in den USA generell als sicher eingestuft. Dabei stützt sich die klinische Evidenz aber vor allem auf Untersuchungen in kleinen Populationen oder mit kurzen Beobachtungszeiträumen (Espín et al. 2007). Überdies können hohe Dosen von Traubenkernextrakt zytotoxisch wirken (Shao et al. 2006) und entgiftende Enzyme *in vitro* hemmen (Nagai et al. 2009). Im Gegensatz zu den strikten Auflagen zum Nachweis der Unbedenklichkeit von Arzneimitteln vor dem Inverkehrbringen gelten für Nahrungsergänzungsmittel auch in den USA vergleichsweise liberale Bestimmungen. Während konventionelle Lebensmittel, allgemein als sicher anerkannte Lebensmittel (generally recognized as safe, GRAS) und natürlich vorkommende Inhaltsstoffe prinzipiell als sicher eingestuft werden, muss für neue Lebensmittelzusatzstoffe der Hersteller die Unbedenklichkeit beweisen. Dafür werden keine klinischen Humandaten benötigt, Tierstudien sind ausreichend (Hathcock 2001).

Zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von anthocyan- und procyanidinhaltigen Extrakten werden inzwischen zur Förderung der Gesundheit angeboten. Diesen Flavonoiden werden antioxidative, antiinflammatorische, neuroprotektive und antikarzinogene Aktivitäten zugesprochen (Rasmussen et al. 2005; Kang et al. 2006; Shukitt-Hale et al. 2007; Zafra-Stone et al. 2007; Nandakumar et al. 2008).

Zu möglichen gesundheitsschädigenden Wirkungen als Folge von Lebensmittel-Medikament-Interaktionen liegen aktuell nur begrenzt Daten vor. Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Kräuter, Gewürze und Tees, die eine komplexe Mischung aus pflanzlichen Wirkstoffen enthalten, bergen bereits ein beträchtliches Potential die Aktivität von Stoffwechsel-Enzymen wie CYP450 zu modulieren (Dresser & Bailey 2003; Harris et al. 2003). Nachgewiesen wurden solche Wechselwirkungen u.a. für Grapefruitsaft, Rotwein und schwarzen Maulbeerensaft (Chan et al. 1998; Guo et al. 2000; Offman et al. 2001; Dahan & Altman 2004; Kim et al. 2006).

Sicherheitsbedenken beziehen sich aber nicht nur auf „klassische“ Lebensmittel sondern auch auf Pflanzenextrakte und angereicherte Reinsubstanzen, die zum Teil in unphysiologisch hoher Dosierung über Nahrungsergänzungsmittel aufgenommen werden können (Mason 2007). Empfehlungen oder Richtwerte zur täglichen Aufnahmemenge existieren für viele dieser Substanzen nicht oder entbehren wissenschaftlich begründeter Beurteilungskriterien (Kügel et al. 2007). Bei der toxikologischen Beurteilung von Pflanzenextrakten werden behelfsweise die geschätzte Aufnahmemenge, veränderte Bioverfügbarkeit der Pflanzeninhaltsstoffe sowie Erfahrung aus traditioneller Verwendung („history of use“) herangezogen. Grundsätzlich erscheint aber ein Stufenschema sinnvoll, das sich orientiert an medizinischer Evidenz, in Form von *in vitro*- und Tierversuchen, epidemiologischen Daten sowie prospektiven klinischen Studien (Hathcock 2001; Schilter et al. 2003).

5.4.2. Inhibition von CYP1A2 und CYP2C19

Eine Spezifität der untersuchten Anthocyane und Procyanidine für CYP1A2 oder für CYP2C19 konnte nicht festgestellt werden: Die Substanzen hemmten die

Enzymaktivität jeweils mit ähnlichen mikromolaren IC_{50} -Werten. Als relativ spezifische Inhibitoren von CYP1A2 gelten α -Naphthoflavon und Furafyllin, während für CYP2C19 kein vollständig spezifischer Inhibitor verfügbar ist (Venkatakrisnan et al. 2001). Omeprazol ist zwar relativ spezifisch für das Isoenzym, es hemmt aber in höheren Konzentrationen auch CYP2C9, CYP3A4 und CYP2D6 (Ko et al. 1997).

Die Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen kann zu klinisch relevanten Lebensmittel-Medikament-Interaktionen (Fujita 2004) und Medikament-Medikament-Interaktionen (Murray 1999) führen. Etliche häufig verordnete Arzneimittel sind von solchen Effekten betroffen: Der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Simvastatin (Williams & Feely 2002), das orale Antidiabetikum Repaglinid (Scheen 2007), die Makrolid-Antibiotika Erythromycin und Clarithromycin (Westphal 2000), die Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin und Paroxetin (Spina et al. 2008) sowie die β -Blocker Metoprolol und Carvedilol (Brodde & Kroemer 2003). Auch Wechselwirkungen verschiedener Antiepileptika mit Chemotherapeutika, die zu verminderter Tumor-Kontrolle oder unvorhergesehener Toxizität führen können, werden über das Cytochrom P450-System vermittelt (Vecht et al. 2003).

Besonders anfällig für Interaktionen sind Medikamente mit geringer therapeutischer Breite (Lin & Lu 1998). Um therapeutisch wirksame sowie nicht-toxische Plasmaspiegel eines Arzneimittels zu erreichen, sollte in diesen Fällen therapeutisches „Drug Monitoring“ (Medikamentenüberwachung) Anwendung finden (Poirier & Cheymol 1998; Widmer et al. 2008).

Gängige Hilfsmittel zur Erstabschätzung des Interaktionspotentials verschiedener Substanzen sind *in vitro*-Versuche (Venkatakrisnan et al. 2001) und Computermodelle (Crivori & Poggesi 2006). Dabei sind Informationen zu Spezifität von CYP-Substraten und -Inhibitoren, Protein-Strukturen („homology modelling“) und individuellen CYP-Expressionsmustern aus molekularen Analysen hilfreich, um die Wahrscheinlichkeit von Arzneimittel-Wechselwirkungen anzugeben (Murray 1999).

Für Medikamente die von CYP1A2 metabolisiert werden, wurden klinisch relevante Interaktionen mit dem Cholinesterase-Inhibitor Tacrin beobachtet, der zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit eingesetzt wird (Bentué-Ferrer et al. 2003; Peng et al. 2004). Klinisch bedeutsam ist ebenfalls die Hemmung von CYP1A2 durch den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluvoxamin (Preskorn 1997; Spina et al. 2008). Bei Co-Medikation ist in beiden Fällen eine erhöhte Toxizität gängiger Medikamente wie Clozapin, Imipramin, Paracetamol, Theophyllin und Propranolol zu befürchten, die CYP1A2-Substrate darstellen (Brøsen 1996; Lynch & Price 2007).

α -Naphthoflavon und Furaflavin, die nicht klinisch eingesetzt werden, gelten neben Fluvoxamin als starke Inhibitoren von CYP1A2 (Venkatakrisnan et al. 2001). Verglichen mit diesen drei Substanzen sind Anthocyane und Procyanidine deutlich schwächere Hemmstoffe. Auch für andere sekundäre Pflanzenstoffe sind zum Teil um mehrere Größenordnungen niedrigere IC_{50} -Werte bzgl. CYP1A2 ausgewiesen (Lee et al. 1998; Zhai et al. 1998; Doostdar et al. 2000). Besonders deutlich wird die relativ schwache Inhibition durch Anthocyane und Procyanidine im Vergleich zu Furanocumarinen aus Grapefruitsaft, die nanomolare IC_{50} -Werte aufweisen (Tassaneeyakul et al. 2000). Interaktionen mit Grapefruitsaft betreffen mindestens 20 verschiedene Medikamente, u.a. das Antihistaminikum Terfenadin, das Immunsuppressivum Cyclosporin und den Calciumantagonisten Verapamil (Arayne et al. 2005). Einzelne CYP1A2-vermittelte Interaktionen zwischen Lebens- und Arzneimitteln wurden zwar beobachtet, die meisten dieser Effekte waren jedoch wenig dramatisch und rührten von Medikamenten mit einer geringen therapeutischen Breite (Harris et al. 2003).

Bekannt sind die inhibitorischen Wirkungen des Antidepressivums Fluvoxamin sowohl auf CYP2C19 als auch CYP1A2 (Venkatakrisnan et al. 2001). Daraus können klinisch bedeutsame Wechselwirkungen mit Substraten des 2C19-Isoenzym resultieren (Preskorn 1997; Spina et al. 2008). Zu letzteren zählen Phenobarbital, Diazepam, Citalopram und Omeprazol (Brøsen 1996; Lynch & Price 2007; Rosemary & Adithan 2007).

Gegenüber Fluvoxamin erzielten in der vorliegenden Arbeit Anthocyane und Procyanidine deutlich schwächere Effekte. Ein weiterer prominenter Hemmstoff

von CYP2C19 ist der Protonenpumpeninhibitor Omeprazol (Venkatakrishnan et al. 2001). Das Risiko CYP-vermittelter Interaktionen des häufig verschriebenen Arzneimittels wird jedoch als gering eingestuft (Andersson 1996). Auch im Vergleich zu IC₅₀-Werten von Omeprazol sind die Effekte der hier untersuchten Anthocyane schwächer (Shader et al. 1999; Kim et al. 2005). Für zahlreiche andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind ebenfalls IC₅₀-Werte im mikromolaren Bereich ausgewiesen (Obach 2000; Kim et al. 2002; He et al. 2006). Klinisch relevante Interaktionen, wie für die Furanocumarine aus Grapefruitsaft beschrieben (Tassaneeyakul et al. 2000; Arayne et al. 2005), sind jedoch eher bei IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich zu erwarten.

Selbst unter der Annahme einer hohen Bioverfügbarkeit der untersuchten Flavonoide scheint ihr Interaktionspotential bezüglich der CYP-Enzyme also geringer zu sein als bei bestimmten pharmakologisch aktiven sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Medikamenten. In der Praxis wurden selbst nach Aufnahme sehr hoher Mengen an Anthocyanen und Procyanidinen bislang nur nanomolare Konzentrationen der Substanzen im menschlichen Plasma nachgewiesen (Holt et al. 2002; Sano et al. 2003; McGhie & Walton 2007). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in bisherigen Studien nur Einmalgaben untersucht wurden und auch die Effekte von aktiven Metaboliten nicht hinreichend erforscht sind.

Gestützt werden die Befunde der vorliegenden Arbeit durch die Ergebnisse einer neueren kontrollierten klinischen Studie, in der kein Einfluss des Konsums von Moosbeerensaft auf die Plasmakonzentrationen der Medikamente Tizanidin, Midazolam und Warfarin gemessen wurde, ohne erkennbare Inhibition der CYP-Enzyme 1A2, 2C9 oder 3A4 (Lilja et al. 2007). Zuvor hatten Fallberichte einen Zusammenhang zwischen dem Konsum von Moosbeerensaft und gesteigerter antikoagulativer Effekte des Vitamin K-Antagonisten Warfarin nahe gelegt (Pham & Pham 2007). Moosbeeren enthalten pro 100 Frischgewicht ca. 66mg Cyanidin-mono-glykosid und 72mg Peonidin-mono-glykosid (Wu et al. 2006).

Es ist zudem vorstellbar, dass CYP1A2 und CYP2C19, die überwiegend in der Leber exprimiert werden (Wijnen et al. 2007), ohnehin in geringerem Maße

Modulationen durch Nahrungsbestandteile ausgesetzt sind als andere CYP-Isoformen, die stärker in der Darmwand exprimiert werden (Ducharme et al. 1995; Brøsen 1996; Wangensteen et al. 2003). Schätzungen zufolge könnte die Polyphenol-Konzentration im Darmlumen nach Aufnahme von 300ml Wein bis zu 3mM erreichen (Watzl & Rechkemmer 2001). Eine präsystemische Beeinflussung des Metabolismus von Medikamenten dürfte dort eher stattfinden und könnte z.B. über CYP3A4 vermittelt werden.

Die aktuelle Datenlage spricht somit gegen klinisch bedeutsame Interaktionen von den verwendeten Flavonoiden und CYP1A2/CYP2C19, solange die Leberfunktion nicht deutlich eingeschränkt oder die Enzymfunktion nicht aus anderen Gründen beeinträchtigt ist, z.B. durch inaktivierende genetische Varianten (Shao et al. 2009).

5.4.3. Induktion von CYP1A2 und CYP2C19

Eine Induktion von CYP1A2 durch Anthocyane und Procyanidine wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Interaktionen zwischen Arzneimitteln und anthocyanhaltigen Getränken durch Aktivierung von CYP1A2, wie sie z.B. für Traubensaft und das Schmerzmedikament Phenacetin beobachtet wurden (Xiao Dong et al. 1999), sind demnach vermutlich auf andere Inhaltsstoffe als Anthocyane zurückzuführen. Ebenso kann die CYP1A2-Induktion durch Brokkoli und Rosenkohl (Pantuck et al. 1979; Kall et al. 1996) anhand der Untersuchungsergebnisse nicht durch den Anthocyan Gehalt der Kreuzblütler erklärt werden.

Für Pelargonin, Malvin und Cyanin wurde in geringer Konzentration eine Induktion von CYP2C19 beobachtet. Da bisherige bimodale Kurvenmodelle bei heterogenen Effekten nur für den Sonderfall $| \text{Steigung A} | = | \text{Steigung B} |$ gelten, hätte eine Berechnung zu falsch hohen IC_{50} -Werten geführt. Deshalb wurde eine Anpassung der von Anger et al. (2005) vorgeschlagenen Gleichung dahingehend vorgenommen, dass auch zwei unterschiedliche Steigungen berücksichtigt werden

können. Dadurch konnten der IC_{50} -Wert und der EC_{50} -Wert von Fluvoxamin exakt bestimmt werden. Nachdem die biphasischen Kurven für die Anthocyanidin-di-glykoside aber nicht konvergierten, lassen sich keine EC_{50} -Werte für diese Substanzen angeben. Hier erreichte die Enzymaktivität maximal 111,5% des Leerwertes, entsprechend erscheint das Induktionspotential im Vergleich zur Inhibition nicht besonders groß. Angesichts der geringen Konzentrationen die von Anthocyanen in menschlichem Plasma erreicht werden (Tab. 1), wäre im Falle der Anthocyanidin-di-glykoside theoretisch zunächst mit einer Induktion von CYP2C19 zu rechnen.

Fluvoxamin führte demgegenüber zu einer Aktivitätssteigerung von CYP2C19 auf 124,2% ($EC_{50} = 0,75\text{nM}$). Bislang wurde das Antidepressivum ausschließlich als CYP2C19-Inhibitor eingestuft (Brøsen 1996; Jeppesen et al. 1996). Eine grenzwertige Induktion von CYP2C19 wurde *in vitro* auch durch geringe Konzentrationen von Fluoxetin, einem weiteren selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, beobachtet (McGinnity et al. 2006). Das klinisch häufig eingesetzte Fluvoxamin erreicht in der therapeutischen Dosis von 100-300mg/Tag Plasmakonzentrationen im Menschen von 20-500ng/ml (Perucca et al. 1994). Eine direkte Beziehung zwischen der Plasmakonzentration des Antidepressivums und seiner klinischen Wirkung konnte bisher nicht eindeutig festgestellt werden, weshalb therapeutisches Drug Monitoring nur für ausgewählte Patienten empfohlen wird: Personen mit eingeschränkter Leberfunktion und Patienten, die auf therapeutische Dosen entweder nicht ansprechen oder bei denen toxische Effekte beobachtet werden (Rasmussen & Brøsen 2000). Auch inaktivierende genetische Polymorphismen von CYP2D6, die den Metabolismus von Fluvoxamin verlangsamen (Carrillo et al. 1996), lassen ein Kontrollieren der Plasmakonzentration sinnvoll erscheinen. Aufgrund des inhibitorischen Potentials von Fluvoxamin gegenüber CYP2C19 wird von der Kombination mit CYP2C19-Substraten abgeraten (Rasmussen & Brøsen 2000). Die Empfehlung kann zusätzlich mit der hier beobachteten Induktion des Enzyms gerechtfertigt werden. Vorbeschriebene Fälle von CYP450-Induktion betreffen u.a. ein Absinken der Plasmaspiegel von Chemotherapeutika bei Co-Medikation mit bestimmten Antiepileptika (Yap et al. 2008). Auch herabgesetzte Plasmakonzentrationen des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol durch Johanniskraut-vermittelte CYP3A4-

und 2C19-Induktion wurden beobachtet (Wang et al. 2004). Auch die Wirksamkeit oraler Kontrazeptiva kann durch gesteigerte Enzymaktivitäten beeinflusst werden (Back & Orme 1990; Shenfield 1993). Ähnliche Effekte sind theoretisch sowohl für Fluvoxamin als auch für Anthocyanidin-di-glykoside vorstellbar.

5.4.4. CYP450-Polymorphismen

Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450-Enzymen nehmen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus von Medikamenten und somit deren gewünschte sowie unerwünschte Wirkungen (Wijnen et al. 2007). Die Frequenz von polymorphen Cytochrom P450-Formen in der Bevölkerung ist für CYP1A2 und CYP2C19 hoch. Die klinisch bedeutendsten Varianten der beiden Enzyme sind CYP1A2*1F, CYP1A2*1K, CYP2C19*2, CYP2C19*3 und CYP2C19*17 (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006). Je nach Phänotyp unterscheidet man zwischen Personen, die einzelne CYP-Substrate schnell (extensive metabolizer, EM) oder langsam (poor metabolizer, PM) abbauen können (Desta et al. 2002). Ungefähr 50% der Kaukasier metabolisieren aufgrund genetischer Polymorphismen CYP1A2-Substrate nur langsam (PM) oder mäßig schnell (intermediate metabolizer, IM) (Landi et al. 1999). Für CYP2C19 verfügen 77 Prozent der kaukasischen Bevölkerung über eine gute (EM), 20% über eine mäßige (IM) und drei Prozent über eine schwache (PM) Enzymaktivität (Wijnen et al. 2007). Bei asiatischen Menschen liegt der Anteil der PM sogar bei 15-30% (Poolsup et al. 2000). Diese interindividuellen und ethnischen Unterschiede der CYP-Aktivität können beim Einsatz von Medikamente mit geringer therapeutischer Breite klinische Relevanz erlangen (Ghotbi et al. 2007). Enzymatische Fehlfunktionen können dabei zu deutlich erhöhten Plasmaspiegeln von Medikamenten wie Omeprazol (Tomalik-Scharte et al. 2008), Benzodiazepinen (Fukasawa et al. 2007) und vielen anderen psychotropen Medikamenten führen (Brøsen 1996). Besonders ungünstig können sich solche Effekte auswirken, wenn die Cytochrom P450-Funktion durch weitere Faktoren wie z.B. Alter, Leberfunktionsstörungen oder Enzymhemmung eingeschränkt ist (Desta et al. 2002; Wijnen et al. 2007). So kann es bei einzelnen Medikamenten im Sinne der

Arzneimittelsicherheit bzw. des Behandlungserfolges sinnvoll erscheinen, eine Genotypisierung des Patienten zur anschließenden Dosisanpassung durchzuführen (Tomalik-Scharte et al. 2008).

Die hier gewonnenen Inhibitions- bzw. Induktionskenngößen beruhen auf Messungen an Wildtyp-Enzymen. Für Personen mit ohnehin schwacher Enzymfunktion (PM und IM) gelten damit andere Kriterien in der Beurteilung des Interaktionspotentials von Flavonoiden und Cytochrom P450-Enzymen. Auch für Personen mit normaler Enzymfunktion kann aber eine klinisch relevante Beeinflussung des Cytochrom P450-Systems durch die untersuchten Flavonoide, selbst unter Berücksichtigung der existierenden Daten zur Bioverfügbarkeit, nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Mehrzahl der Erfahrungsberichte zur Anwendung von Anthocyanen und Procyanidinen fällt positiv aus, eine systematische Auswertung der Inzidenz von Nebenwirkungen fehlt aber. Dringend erforderlich sind auch prospektive Humanstudien zur Pharmakokinetik, insbesondere nach langfristiger Einnahme von anthocyan- und procyanidinreichen Produkten. Erst unter naturalistischen Bedingungen lassen sich die Wechselbeziehungen von Anthocyanen, Procyanidinen und anderen pflanzlichen Inhaltsstoffen begreifen.

5.4.5. Antikarzinogene Effekte von Flavonoid-Interaktionen mit dem Cytochrom P450-System

Wegen der wichtigen Rolle der Cytochrom P450-Enzyme bei der Aktivierung und Inaktivierung von Karzinogenen und Chemotherapeutika spielen sie eine bedeutende Rolle für die Ätiologie von Krebserkrankungen und beeinflussen zugleich die Krebstherapie (Oyama et al. 2004; Rooseboom et al. 2004). In früheren Arbeiten wurde eine Überexpression verschiedener CYP-Enzyme u.a. in malignen Brust-, Prostata- oder Darmtumoren nachgewiesen, sowie ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapeutika bei erhöhter hepatischer CYP-Expression (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006). Daraus ergeben sich drei potentielle Strategien für die zukünftige Krebstherapie und -prävention durch Cytochrom P450-Inhibition: a) die Hemmung der Umwandlung von

Chemotherapeutika zu inaktiven Metaboliten, b) die Einflussnahme auf die Metabolisierung von hormonellen Vorläufersubstanzen zu aktiven Wachstumshormonen und c) das Verhindern der Entstehung von aktiven Karzinogenen aus Präkarzinogenen (Bruno & Njar 2007). Die erste erfolgreiche Klasse von Krebsmedikamenten, die die spezifische CYP-Inhibition zum Ziel haben, sind Hemmstoffe der Aromatase (CYP19), wie z.B. Exemestan und Letrozol. Aromatasehemmer führen zu einer verminderten Östrogen-Synthese und dienen zur Therapie von hormonsensitivem Brustkrebs (Brodie & Njar 2000). In klinischen Studien werden inzwischen auch Inhibitoren von CYP17, die zu verminderter Androgen-Synthese führen, bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom eingesetzt (Attard et al. 2005). Der Vitamin D-Metabolit Calcitriol, der von CYP24 inaktiviert wird, hemmt die Proliferation, unterstützt die Differenzierung und induziert die Apoptose von Kolon- und Prostatakrebszellen (Deeb et al. 2007; Purnapatre et al. 2008). Präklinische Untersuchungen legen nahe, dass die Wirksamkeit von CYP24-Inhibitoren (z.B. das Flavonoid Genestein) in der Therapie und Prävention von Krebserkrankungen klinisch geprüft werden sollte (Bruno & Njar 2007).

Zahlreiche experimentelle Studien sprechen für eine antikarzinogene Aktivität von Anthocyanen und Procyanidinen *in vitro*. Beobachtet wurden antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften, eine Beeinflussung des Stoffwechsels von Karzinogenen, reduzierte Zellproliferation, Angiogenese und Invasivität sowie Induktion von Apoptose und Differenzierung (Gerhauser 2008; Nandakumar et al. 2008; Wang & Stoner 2008).

Die hier beobachtete Inhibition von CYP-Enzymen kann ebenfalls als antikarzinogene Aktivität der untersuchten Flavonoide gedeutet werden. Mehrere Cytochrom P450-Isoenzyme sind an der Umwandlung von Präkarzinogenen in ihre aktiven Metabolite beteiligt (Tab. 7). CYP1A2 nimmt dabei eine zentrale Stellung ein, während CYP2C19 am Abbau von zahlreichen Medikamenten, aber nicht von bekannten Karzinogenen mitwirkt. Zu den Substraten von CYP1A2 zählen insbesondere aromatische und heterozyklische Amine, die in Verbrennungsprodukten wie Zigarettenrauch oder auf Kohle gegrillten

Lebensmitteln vorkommen (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006, Tab. 7).

Tabelle 7: Cytochrom P450-aktivierte Präkarzinogene (Vgl. Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg 2006)

<i>Enzyme</i>	<i>Aktivierte Karzinogene</i>
CYP1A1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe: Benzopyren, DMBA, PhIP
CYP1A2	Aryl- und heterozyklischen Amine: 4-Amino-biphenyl, 2-Acetylaminofluoren, NDEA, NDMA, PhIP, IQ, Aflatoxin B1
CYP1B1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe: Benzopyren, DMBA, Benzanthracen, 3-Methylcholanthren, Estradiol
CYP2A6	N-Nitrosamine: NNK, NNAL, NDEA, NNN, NATB, Aflatoxin B1, 1,3-Butadien, 2,6-Dichlorobenzonitril
CYP2B6	Aflatoxin B1 und 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon
CYP2E1	Benzen, Kohlenstofftetrachlorid, Chloroform, Styren, Vinylchlorid, Vinylbromid, NDMA, NNK
CYP3A4/5/7	Aflatoxin B1, Aflatoxin G1, Benzopyren, Naphthalen, NNN, 6-Amino-Chrysen, 1-Nitropyren, Estradiol, Senecionin, Stergmatocystin

DMBA: 7,12-Dimethylbenzanthracen; IQ: 2-Amino-3-Methylimidazo(4,5-f)quinolin; NATB: N-Nitrosoanatabin; NDEA: N-Nitrosodiethylamin; NDMA: N-Nitrosodimethylamin NNAL: 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanol; NNK: 4-(Methylnitrosoamin)-1-(3-Pyridyl)-1-butanon; NNN: N-9-Nitrosornicotin; PhIP: 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo(4,5-b)pyridin;

Mehrere *in vivo*-Studien an Mäusen und Ratten deuten auf präventive Effekte von Anthocyanen bei Haut-, Ösophagus- und Darmtumoren hin (Wang & Stoner 2008), während Procyanidine vor Haut-, Brust-, Prostata- und Darmkrebs schützen sollen (Nandakumar et al. 2008). Auch chemotherapeutische Effekte von Anthocyanen wurden beobachtet. So inhibierten Cyanidin-3-glukosid und Peonidin-3-glukosid in Mäusen Wachstum und Metastasierung von Tumoren, die zuvor durch subkutane Injektion von Lungenkrebszellen induziert wurden (Chen et al. 2005; Ding et al. 2006). Ebenso wurde bei Mäusen mit procyanidinreicher Diät ein verlängertes Überleben sowie eine geringere Metastasierungsrate nach der subkutanen Injektion von Brustkrebszellen beobachtet (Mantena et al. 2006).

Im Gegensatz hierzu fehlt gegenwärtig eine Evidenz für Anti-Tumor-Effekte von Anthocyanen und Procyanidinen beim Menschen in Form von epidemiologischen Daten sowie klinischen Humanstudien. Es wurde zwar bereits gezeigt, dass bestimmte Parameter der oxidativen Schädigung (freie Radikale, DNA-Schäden, etc.) durch flavonoidhaltige Ernährung positiv beeinflusst werden können (Nandakumar et al. 2008; Wang & Stoner 2008), eine definitive Aussage über klinisch wirksame Effekte von Flavonoiden auf Tumorerkrankungen lässt sich aber noch nicht treffen. Während in einer neueren epidemiologischen Studie ein

Zusammenhang zwischen flavonoidreicher Ernährung und Tumorzinzidenz verneint wird (Wang et al. 2009), wird die negative Korrelation von Apfel-Konsum und der Häufigkeit von Kolonkarzinomen durch den Flavonoidgehalt des Kernobstes erklärt (Gerhauser 2008; Koch et al. 2009). Ob die inverse Beziehung zwischen Obst- und Gemüsekonsum und Inzidenz von Tumorerkrankungen (Kale et al. 2008) auf den Flavonoidreichtum dieser Lebensmittel zurückzuführen ist, bleibt also weiterhin ungewiss.

Das Cytochrom P450-System wurde bislang überwiegend mit unerwünschten Effekten in Verbindung gebracht, es könnte theoretisch aber auch als Erklärung für erwünschte antikarzinogene Funktionalitäten von Anthocyanen und Procyanidinen dienen. Die vorliegende Arbeit hat ergeben, dass Anthocyane und Procyanidine in nanomolaren Konzentrationen keine effektiven Inhibitoren der CYP-Aktivität darstellen. Als Begründung für die antikarzinogene Wirkung der Flavonoide *in vitro* kommt dieser Mechanismus damit eher nicht in Betracht. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Rolle von Cytochromen in der Tumorphroliferation detaillierter darstellen zu können.

Abschließend kann festgehalten werden, dass keine nennenswerte CYP-inhibitorische Aktivität von den ausgewählten Anthocyanen und Procyanidinen ausgeht. Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf kommerzielle Extrakte und den Konsum frischer Früchte übertragen lassen, ist u.a. von möglichen additiven Effekten anderer sekundärer Pflanzenstoffe abhängig zu machen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Cytochrom P450-Enzyme CYP1A2 und CYP2C19 sind für den Metabolismus und die Sicherheit zahlreicher Medikamente von entscheidender Bedeutung. Zu möglichen Wechselwirkungen mit den Inhaltsstoffen von Fruchtexttrakten, und speziell mit Flavonoiden, ist dabei noch wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht die Modulation der CYP1A2- sowie der CYP2C19-Aktivität durch 18 Anthocyane und Procyanidine mittels eines chemilumineszenten Assays. Die Testsubstanzen hemmten konzentrationsabhängig die CYP1A2-Aktivität mit IC_{50} -Werten für Anthocyane zwischen 27,8 μ M und 76,2 μ M, sowie Werten von 257,2 μ M und 330,7 μ M für Procyanidine. Die Messungen an CYP2C19 ergaben für Anthocyane IC_{50} -Werte zwischen 20,2 μ M und >316 μ M, sowie für Procyanidine Werte von 266,7 μ M und 304,3 μ M. Ein signifikanter Einfluss der Glykosylierung von Anthocyanen auf die Pharmakokinetik ergab sich lediglich für CYP2C19: wurden Anthocyane nach der Anzahl ihrer Zuckerreste gruppiert, so folgten in absteigender inhibitorischer Effektstärke auf Anthocyanidine zunächst die Anthocyanine mit einem Zuckerrest, dann die Procyanidine und schließlich die Anthocyanine mit zwei Zuckerresten. Letztere ließen eine bimodale Funktionalität erkennen und fungierten in niedriger Konzentration als Induktoren von CYP2C19. Nebenbefundlich wurde eine bimodale Einflussnahme erstmals auch für die Referenzsubstanz Fluvoxamin beschrieben.

Verglichen mit den Daten zur Hemmung von CYP3A4 durch Furanocumarine aus Grapefruitextrakt, wurde eine um das 10.000-fache schwächere Wirkung von Anthocyanen und Procyanidinen beobachtet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Wechselwirkungen zwischen mehreren Einzelsubstanzen auch die Cytochromaktivitäten in komplexer Weise beeinflussen. Die hier vorgestellten *in vitro* Ergebnisse liefern einen wertvollen Beitrag zur Einschätzung toxizitätsrelevanter Eigenschaften von anthocyanreichen Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln. Demnach ist das Risiko für ernährungsbedingte Wechselwirkungen mit Medikamenten in Bezug auf Anthocyane und Procyanidine

um mehrere Größenordnungen niedriger als bei anderen pharmakologisch aktiven sekundären Pflanzeninhaltsstoffen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ailawadhi, S., Sung, K.W., Carlson, L.A., Baer, M.R.: Serotonin syndrome caused by interaction between citalopram and fentanyl, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32, 2007, S. 199-202

Andersson, T.: Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on omeprazole, lansoprazole and pantoprazole, *Clinical Pharmacokinetics*, 31, 1996, S. 9-28

Anger, D.L., Petre, M.A., Crankshaw, D.J.: Heteroactivation of cytochrome P450 1A1 by teas and tea polyphenols, *British Journal of Pharmacology*, 145, 2005, S. 926-33

Arayne, M.S., Sultana, N., Bibi, Z.: Grape fruit juice-drug interactions, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18, 2005, S. 45-57

Arts, I.C., Sesink, A.L., Faassen-Peters, M., Hollman, P.C.: The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides, *The British Journal of Nutrition*, 91, 2004, S. 841-47

Attard, G., Beldegrun, A.S., de Bono, J.S.: Selective blockade of androgenic steroid synthesis by novel lyase inhibitors as a therapeutic strategy for treating metastatic prostate cancer, *BJU International*, 96, 2005, S. 1241-46

Aviram, M., Fuhrman, B.: Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 2002, S.146-61

Back, D.J., Orme, M.L.: Pharmacokinetic drug interactions with oral contraceptives, *Clinical Pharmacokinetics*, 18, 1990, S. 472-84

Bech-Larsen, T., Grunert, K.G., Poulsen, J.B.: The acceptance of Functional Foods in Denmark, Finland and the United States, MAPP working paper 73, The Aarhus School on Business, 2001

Beitz, R., Mensink, G.B., Rams, S., Döring, A.: Vitamin- und Mineralstoffsupplementierung in Deutschland, *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 47, 2004, S. 1057-65

Bentué-Ferrer, D., Tribut, O., Polard, E., Allain, H.: Clinically significant drug interactions with cholinesterase inhibitors: a guide for neurologists, *CNS Drugs*, 17, 2003, S. 947-63

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: Biochemie, 5. Auflage, Spektrum, Heidelberg 2003

Berger, F., Paulmurugan, R., Bhaumik, S., Gambhir, S.S.: Uptake kinetics and biodistribution of ¹⁴C-D-luciferin – a radiolabeled substrate for the firefly luciferase catalyzed bioluminescence reaction: impact on bioluminescence based reporter gene imaging, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 35, 2008, S. 2275-85

Brodde, O.E., Kroemer, H.K.: Drug-drug interactions of beta-adrenoceptor blockers, *Arzneimittelforschung*, 53, 2003, S. 814-22

Brodie, A.M., Njar, V.C.: Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment, *Steroids*, 65, 2000, S. 171-79

Brøsen, K.: Are pharmacokinetic drug interactions with the SSRIs an issue?, *International Clinical Psychopharmacology*, 11, 1996, S. 23-27

Brøsen, K., Skjelbo, E., Rasmussen, B.B., Poulsen, H.E., Loft, S.: Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2, *Biochemical Pharmacology*, 45, 1993, S. 1211-14

Bruno, R.D., Njar, V.C.: Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2007, S. 5047-60

Bundesinstitut für Risikobewertung: Verbraucher, die viel Zimt verzehren, sind derzeit zu hoch mit Cumarin belastet. Gesundheitliche Bewertung des BfR Nr. 043/2006 vom 16. Juni 2006, 2006, S. 1-13

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit warnt vor dem Präparat "Fortodol", Pressemitteilung vom 19.03.2009, 2009

Cali, J.J., Ma, D., Sobol, M., Good, T., Liu, D.: P450-GloTM CYP2C19 and CYP2D6 assay and screening systems: the method of choice for in vitro P450 assays, *Promega Cell Notes*, 14, 2006, S. 20-24

Cali, J.: Screen for CYP450 inhibitors using P450-GloTM luminescent cytochrome P450 assays, *Promega Cell Notes*, 7, 2003, S. 2-4

Cali, J., Sobol, M., Ma, D., Liu, D.: Screen for cytochrome P450 activity using a luminescent assay, *Promega Cell Notes*, 13, 2005, S. 8-10

Cao, G., Prior, R.L.: Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an Elderberry extract, *Clinical Chemistry*, 45, 1999, S. 574–76

Carrillo, J.A., Dahl, M.L., Svensson, J.O., Alm, C., Rodríguez, I., Bertilsson, L.: Disposition of fluvoxamine in humans is determined by the polymorphic CYP2D6

and also by the CYP1A2 activity, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 60, 1996, S. 183-90

Chan, W.K., Nguyen, L.T., Miller, V.P., Harris, R.Z.: Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine, *Life Sciences*, 62, 1998, S. 135-42

Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Chiang, C.L., Yang, S.F., Hsieh, Y.S.: Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo, *Nutrition and Cancer*, 53, 2005, S. 232-43

Cheung, C.K., Wyman, J.F., Halcon, L.L.: Use of complementary and alternative therapies in community-dwelling older adults, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13, 2007, S. 997-1006

Choi, E.H., Chang, H.J., Cho, J.Y., Chun, H.S.: Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2007, S. 1873-81

Cho, U.S., Park, E.Y., Dong, M.S., Park, B.S., Kim, K., Kim, K.H.: Tight-binding inhibition by α -naphthoflavone of human cytochrome P450 1A2, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648, 2003, S. 195-202

Chun, O.K., Chung, S.J., Song, W.O.: Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults, *The Journal of Nutrition*, 137, 2007, S. 1244-52

Contag, P.R., Olomu, I.N., Stevenson, D.K., Contag, C.H.: Bioluminescent indicators in living mammals, *Nature Medicine*, 4, 1998, S. 245-47

Cooke, D., Steward, W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T.: Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity?, *European Journal of Cancer*, 41, 2005, S. 1931-40

Crivori, P., Poggesi, I.: Computational approaches for predicting CYP-related metabolism properties in the screening of new drugs, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 2006, S. 795-808

Dahan, A., Altman, H.: Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability - mechanism, extent and relevance, *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 2004, S. 1-9

Datamonitor's report: Functional Food, Drinks and Ingredients: Consumer Attitudes and Trends. Exploring the Drivers and Inhibitors of Functional Food and Drink Consumption in Europe, North America and Asia, 2008

Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S.: Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics, *Nature Reviews. Cancer*, 7, 2007, S. 684-700

de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C.: Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 2000, S. 5331-37

Depeint, F., Gee, J.M., Williamson, G., Johnson, I.T.: Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities, *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 2002, S. 97-103

Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A.: Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids, *The Journal of Nutrition*, 130, 2000, S. 2733–38

Desta, Z., Zhao, X., Shin, J.G., Flockhart, D.A.: Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism, *Clinical Pharmacokinetics*, 41, 2002, S. 913-58

Ding, M., Feng, R., Wang, S.Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B.H., Shi, X.: Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 2006, S. 17359-68

Doostdar, H., Burke, M.D., Mayer, R.T.: Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1, *Toxicology*, 144, 2000, S. 31–38

Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G.: Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4, *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 2008, S. 1428-33

Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Rogler, G., Piberger, H., Hajak, G., Sand, P.G.: Anthocyanins and anthocyanidins are poor inhibitors of CYP2D6, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31, 2009, S. 3-9

Dresser, G.K., Bailey, D.G.: The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions, *European Journal of Clinical Investigation*, 33, 2003, S. 10-16

Ducharme, M.P., Warbasse, L.H., Edwards, D.J.: Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 57, 1995, S. 485–91

Dugoua, J.J., Seely, D., Perri, D., Cooley, K., Forelli, T., Mills, E., Koren, G.: From type 2 diabetes to antioxidant activity: a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 2007, S. 837-47

Egnell, A.C., Eriksson, C., Albertson, N., Houston, B., Boyer, S.: Generation and evaluation of a CYP2C9 heteroactivation pharmacophore, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307, 2003, S. 878–87

Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M., Kessler, R.C.: Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey, *The Journal of the American Medical Association*, 280, 1998, S. 1569-75

Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J.: Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC, *The Journal of Nutrition*, 137, 2007, S. 718-37

Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A.: Nutraceuticals: facts and fiction, *Phytochemistry*, 68, 2007, S. 2986-3008

Faria, A., Monteiro, R., Azevedo, I., Calhau, C.: Comment on safety and antioxidant activity of a pomegranate ellagitannin-enriched polyphenol dietary supplement in overweight individuals with increased waist size, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2008, S. 12143-44

Felgines, C., Talavéra, S., Gonthier, M.P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.L., Rémésy, C.: Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans, *The Journal of Nutrition*, 133, 2003, S. 1296–301

Ferreira, D., Slade, D.: Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles, *Natural Product Reports*, 19, 2002, S. 517-41

Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S.E.: Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro, *European Journal of Nutrition*, 45, 2006, S. 7-18

Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R., Bitsch, I.: Bioavailability of anthocyanins-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81, 2003, S. 423–35

Fujita, K.: Food-drug interactions via human cytochrome P450 3A (CYP3A), *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 20, 2004, S. 195-217

Fukasawa, T., Suzuki, A., Otani, K.: Effects of genetic polymorphism of cytochrome P450 enzymes on the pharmacokinetics of benzodiazepines, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32, 2007, S. 333–341

Fukumoto, L.R., Mazza, G.: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, S. 3597-604

Galli, R.L., Shukitt-Hale, B., Youdim, K.A., Joseph, J.A.: Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 2002, S. 128-32

Gerhauser, C.: Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components, *Planta Medica*, 74, 2008, S. 1608-24

GfK Marktforschung: Functional Food findet Anhänger. In: *Lebensmittelzeitung*, 41, 1998, S. 63-64

Gheysens, O., Gambhir, S.S.: Studying molecular and cellular processes in the intact organism. In: Rudin, M. (Hrsg.): *Progress in Drug Research. Imaging in Drug Discovery and Early Clinical Trials*, 62, Birkhäuser-Verlag, Basel 2005, S. 134-42

Ghosh, D., Konishi, T.: Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 2007, S. 200-08

Ghotbi, R., Christensen, M., Roh, H.K., Ingelman-Sundberg, M., Aklillu, E., Bertilsson, L.: Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 63, 2007, S. 537-46

Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L.: Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption, *The Journal of Nutrition*, 134, 2004, S. 613-17

Guo, L.Q., Fukuda, K., Ohta, T., Yamazoe, Y.: Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A4 activity, *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 2000, S. 766-71

Hahn, A.: *Nahrungsergänzungsmittel*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2006

Hanamura, T., Hagiwara, T., Kawagishi, H.: Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 2005, S. 280-86

Harris, R.Z., Jang, G.R., Tsunoda, S.: Dietary effects on drug metabolism and transport, *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 2003, S. 1071-88

Hathcock, J.: Dietary supplements: how they are used and regulated, *The Journal of Nutrition*, 131, 2001, S. 1114-17

Heimark, L.D., Wienkers, L., Kunze, K., Gibaldi, M., Eddy, A.C., Trager, W.F., O'Reilly, R.A., Goulart, D.A.: The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 51, 1992, S. 398-407

Hellum, B.H., Hu, Z., Nilsen, O.G.: Trade herbal products and induction of CYP2C19 and CYP2E1 in cultured human hepatocytes, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 2009, S. 58-63

Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R.: In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*, *Xenobiotica*, 30, 2000, S. 235–51

He, N., Xie, H.G., Collins, X., Edeki, T., Yan, Z.: Effects of individual ginsenosides, ginkgolides and flavonoids on CYP2C19 and CYP2D6 activity in human liver microsomes, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33, 2006, S. 813-15

Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M.: Flavonoids – potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chemico-Biological Interactions*, 139, 2002, S. 1–21

Holt, R.R., Lazarus, S.A., Sullards, M.C., Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., Hammerstone, J.F., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., Keen, C.L.: Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 2002, S. 798–804

Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A.: Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 2008, S. 38-50

Jansson, B., Elsherbiny, D., Simonsson U.S.: Enantiospecific separation and quantitation of mephenytoin and its metabolites nirvanol and 4'-hydroxymephenytoin in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 2006, S. 463-72

Jeppesen, U., Gram, L.F., Vistisen, K., Loft, S., Poulsen, H.E., Brøsen, K.: Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 1996, S. 73-78

Jing, P., Bomser, J.A., Schwartz, S.J., He, J., Magnuson, B.A., Giusti, M.M.: Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2008, S. 9391-98

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Casadesus, G.: Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 2005, S. 313-16

Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S.: Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level, *Phytotherapy Research*, 22, 2008, S. 567-77

Kall, M.A., Vang, O., Clausen, J.: Effects of dietary broccoli on human in vivo drug metabolizing enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism, *Carcinogenesis*, 17, 1996, S. 793-99

Kang, N.J., Lee, K.W., Lee, D.E., Rogozin, E.A., Bode, A.M., Lee, H.J., Dong, Z.: Cocoa procyanidins suppress transformation by inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase, *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 2008, S. 20664-73

Kang, T.H., Hur, J.Y., Kim, H.B., Ryu, J.H., Kim, S.Y.: Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia, *Neuroscience Letters*, 391, 2006, S. 168-72

Kay, C.D., Mazza, G., Holub, B.J., Wang, J.: Anthocyanin metabolites in human urine and serum, *The British Journal of Nutrition*, 91, 2004, S. 933-42

Kiani, J., Imam, S.Z.: Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs, *Nutrition Journal*, 6, 2007, S. 1-9

Kim, H., Yoon, Y.J., Shon, J.A., Cha, I.J., Shin, J.G., Liu, K.H.: Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A4 activity, *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 2006, S. 521-23

Kim*, H.J., Lee, S.B., Park, S.K., Kim, H.M., Park, Y.I., Dong, M.S.: Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes, *Archives of Pharmacal Research*, 28, 2005, S. 1114-21

Kim, J.Y., Lee, S., Kim, D.H., Kim, B.R., Park, R., Lee, B.M.: Effects of flavonoids isolated from *scutellariae radix* on cytochrome P-450 activities in human liver microsomes, *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 65, 2002, S. 373-81

Kim, M.J., Kim, H., Cha, I.J., Park, J.S., Shon, J.H., Liu, K.H., Shin, J.G.: High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes in vitro using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2005, S. 2651-58

Klipstein-Grobusch, K., Kroke, A., Voß, S., Boeing, H.: Einfluß von Lebensstilfaktoren auf die Verwendung von Supplementen in der Brandenburger Ernährungs- und Krebsstudie, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 1998, S. 38-46

Koch, T.C., Briviba, K., Watzl, B., Fähndrich, C., Bub, A., Rechkemmer, G., Barth, S.W.: Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: impact of juice

constituents and obesity, *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 2009, S. 1289-302

Ko, J.W., Sukhova, N., Thacker, D., Chen, P., Flockhart, D.A.: Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms, *Drug Metabolism and Disposition*, 25, 1997, S. 853-62

Kroon, P., Williamson, G.: Polyphenols: dietary components with established benefits to health?, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2005, S. 1239-40

Kügel, J.W., Hahn, A., Delewski, M., Winters, J.: *Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung*, Verlag C. H. Beck, München 2007

Kühnau, J.: The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 1976, S. 117-91

Kwon, S.H., Ahn, I.S., Kim, S.O., Kong, C.S., Chung, H.Y., Do, M.S., Park, K.Y.: Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins, *Journal of medicinal food*, 10, 2007, S. 552-56

Landi, M.T., Sinha, R., Lang, N.P., Kadlubar, F.F.: Human cytochrome P4501A2, IARC Scientific Publications, 148, 1999, S. 173-95

Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., Kanner, J.: Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1998, S. 4297-302

Lau, F.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A.: The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging, *Neurobiology of Aging*, 26, 2005, S. 128-132

Lazzé, M.C., Pizzala, R., Savio, M., Stivala, L.A., Prosperi, E., Bianchi, L.: Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells, *Mutation Research*, 535, 2003, S. 103-15

Lee, H., Yeom, H., Kim, Y.G., Yoon, C.N., Jin, C., Choi, J.S., Kim, B.R., Kim, D.H.: Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids, *Biochemical Pharmacology*, 55, 1998, S. 1369-75

Levin, T.T., Cortes-Ladino, A., Weiss, M., Palomba, M.L.: Life-threatening serotonin toxicity due to a citalopram-fluconazole drug interaction: case reports and discussion, *General Hospital Psychiatry*, 30, 2008, S. 372-77

Lilja, J.J., Backman, J.T., Neuvonen, P.J.: Effects of daily ingestion of cranberry juice on the pharmacokinetics of warfarin, tizanidine, and midazolam - probes of CYP2C9, CYP1A2, and CYP3A4, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81, 2007, S. 833-39

Lin, J.H., Lu, A.Y.: Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications, *Clinical Pharmacokinetics*, 35, 1998, S. 361-90

Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie*, 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005

Lungarini, S., Aureli, F., Coni, E.: Coumarin and cinnamaldehyde in cinnamon marketed in Italy: A natural chemical hazard?, *Food Additives and Contaminants*, 25, 2008, S. 1297-305

Lynch, T., Price, A.: The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, Interactions, and Adverse Effects, *American Family Physician*, 76, 2007, S. 391-96

Mahlberg, R., Kunz, D., Sasse, J., Kirchheiner, J.: Serotonin syndrome with tramadol and citalopram, *The American Journal of Psychiatry*, 161, 2004, S. 1129

Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M.J.: Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, S. 170-76

Mannel, M.: Drug interactions with St John's wort: mechanisms and clinical implications, *Drug Safety*, 27, 2004, S. 773-97

Mantena, S.K., Baliga, M.S., Katiyar, S.K.: Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells, *Carcinogenesis*, 27, 2006, S. 1682-91

Mason, P.: *Dietary Supplements, Third Edition*, Pharmaceutical Press, London 2007

Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K.: alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, S. 1952-56

Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., Tsuda, T.: Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, S. 1546-51

Matsumoto, H., Nakamura, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S., Hirayama, M.: Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, S. 3560-63

Mazur, A., Bayle, D., Lab, C., Rock, E., Rayssiquier, Y.: Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro, *Atherosclerosis*, 145, 1999, S.421-22

Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., Holub, B.J.: Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, S. 7731–37

McGhie, T.K., Walton, M.C.: The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding, *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 2007, S. 702–13

McGinnity D.F., Berry, A.J., Kenny J.R., Grime, K., Riley, R.J.: Evaluation of time-dependent cytochrome P450 inhibition using cultured human hepatocytes, *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 2006, S. 1291-300

Menrad, K.: Die Zukunft von Funktional Food aus der Perspektive der Wissenschaft. In: Gedrich, K., Karg, G., Oltersdorf, U. (Hrsg.): *Functional Food – Forschung, Entwicklung und Verbraucherakzeptanz*, Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, 1, 2005, S. 53-80

Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., Martins, D.: Anthocyanin Concentration of “Assaria” Pomegranate Fruits During Different Cold Storage Conditions, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 2004, S. 338-42

Milbury, P.E., Cao, G., Prior, R.L., Blumberg, J.B.: Bioavailability of elderberry anthocyanins, *Mechanisms of Ageing and Development*, 123, 2002, S. 997–1006

Millen, A.E., Dodd, K.W., Subar, A.F.: Use of vitamin, mineral, nonvitamin, and nonmineral supplements in the United States: The 1987, 1992, and 2000 National Health Interview Survey results, *Journal of the American Dietetic Association*, 104, 2004, S. 942-50

Miller, V.P., Stresser, D.M., Blanchard, A.P., Turner, S., Crespi, C.L.: Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 919, 2000, S. 26-32

Mink, P.J., Scrafford, C.G., Barraji, L.M., Harnack, L., Hong, C.P., Nettleton, J.A., Jacobs, D.R., Jr.: Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 2007, S. 895–909

Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E.: Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, *Toxicology In Vitro*, 20, 2006, S.187-210

Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Cecarini, V., Eleuteri, A.M., Angeletti, M.: Homology modeling and docking analysis of the interaction between polyphenols and mammalian 20S proteasomes, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49, 2009, S. 401-09

Murphy, K.J., Chronopoulos, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., Turner, A.H., Mann, N.J., Sinclair A.J.: Dietary flavanols and procyanidin oligomers

from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 2003, S. 1466-73

Murray, M.: Mechanisms and significance of inhibitory drug interactions involving cytochrome P450 enzymes (review), *International Journal of Molecular Medicine*, 3, 1999, S. 227-38

Nagai, M., Fukamachi, T., Tsujimoto, M., Ogura, K., Hiratsuka, A., Ohtani, H., Hori, S., Sawada, Y.: Inhibitory effects of herbal extracts on the activity of human sulfotransferase isoform sulfotransferase 1A3 (SULT1A3), *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 2009, S. 105-09

Nahrungsergänzungsmittelverordnung vom 24. Mai 2004 (Bundesgesetzblatt I, S. 1011), geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 17. Januar 2007 (Bundesgesetzblatt I, S. 46), 2004

Nandakumar, V., Singh, T., Katiyar, S.K.: Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins, *Cancer Letters*, 269, 2008, S. 378-87

Nelson, D., Cox, M.: *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2001

Neto, C.C.: Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases, *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 2007, S. 652-64

Nielsen, I.L., Dragsted, L.O., Ravn-Haren, G., Freese, R., Rasmussen, S.E.: Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, S. 2813–20

Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, L.: Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and Pelargonidin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, S. 166-71

Nyman, N.A., Kumpulainen, J.T.: Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2001, S. 4183-87

Obach, R.S.: Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294, 2000, S. 88-95

Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S.: Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities, *Xenobiotica*, 25, 1995, S. 575-84

Offman, E.M., Freeman, D.J., Dresser, G.K., Munoz, C., Bend, J.R., Bailey, D.G.: Red wine-cisapride interaction: comparison with grapefruit juice, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70, 2001, S. 17-23

Ortiz de Montellano, P.R.: The 1994 Bernhard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450, *Drug Metabolism and Disposition*, 23, 1995, S. 1181-87

Oyama, T., Kagawa, N., Kunugita, N., Kitagawa, K., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Suzuki, R., Kinaga, T., Yashima, Y., Ozaki, S., Isse, T., Kim, Y.D., Kim, H., Kawamoto, T.: Expression of cytochrome P450 in tumor tissues and its association with cancer development, *Frontiers in Bioscience*, 9, 2004, S. 1967-76

Pantuck, E.J., Pantuck, C.B., Garland, W.A., Min, B.H., Wattenberg, L.W., Anderson, K.E., Kappas, A., Conney, A.H.: Stimulatory effect of brussels sprouts and cabbage on human drug metabolism, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 25, 1979, S. 88-95

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F.: The interaction of anthocyanins with bilitranslocase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 2002, S. 631-36

Peng, J.Z., Rimmel, R.P., Sawchuk, R.J.: Inhibition of murine cytochrome P4501A by tacrine: in vitro studies, *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 2004, S. 805-12

Perucca, E., Gatti, G., Spina, E.: Clinical pharmacokinetics of fluvoxamine, *Clinical Pharmacokinetics*, 27, 1994, S. 175-90

Pham, D.Q., Pham, A.Q.: Interaction potential between cranberry juice and warfarin, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64, 2007, S. 490-94

Phillips, I.R., Shephard, E.A. (Hrsg.): *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 107, Totowa 1998

Poirier, J.M., Cheymol, G.: Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations, *Clinical Pharmacokinetics*, 35, 1998, S. 461-73

Poolsup, N., Li Wan Po, A., Knight, T.L.: Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25, 2000, S. 197-220

Preskorn, S.H.: Clinically relevant pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. An overview with emphasis on pharmacokinetics and effects on oxidative drug metabolism, *Clinical Pharmacokinetics*, 32, 1997, S. 1-21

Promega Corporation: P450-Glo™ Screening Systems. Technical Bulletin. TB340. INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS V9770, V9790, V9880, V9890, V9800 AND V9910, Madison 2007

Prior, R.L., Gu, L.: Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet, *Phytochemistry*, 66, 2005, S. 2264-80

Purnapatre, K., Khattar, S.K., Saini, K.S.: Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs, *Cancer Letters*, 259, 2008, S. 1-15

Qato, D.M., Alexander, G.C., Conti, R.M., Johnson, M., Schumm, P., Lindau, S.T.: Use of prescription and over-the-counter medications and dietary supplements among older adults in the United States, *The Journal of the American Medical Association*, 300, 2008, S. 2867-78

Quesada, H., Del Bas, J.M., Pajuelo, D., Díaz, S., Fernandez-Larrea, J., Pinent, M., Arola, L., Salvadó, M.J., Bladé, C.: Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver, *International Journal of Obesity*, 33, 2009, S. 1007-12

Ramírez Pérez, J.: Anthocyane: Enzymatische Hemmung in vitro (CYP2C9) und Verträglichkeit in vivo, Fassung vom 08.09.2009, interne Weitergabe, 2009, S. 1-77

Rasmussen, B.B., Brøsen, K.: Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors?, *Therapeutic Drug Monitoring*, 22, 2000, S. 143-54

Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K., Poulsen, L.: Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease, *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 2005, S. 159-74

Read, M.H., Bock, M.A., Carpenter, K., Medeiros, D., Ortiz, M., Raab, C., Schutz H., Sheehan, E., Williams, D.K.: Health beliefs and supplement use: adults in seven western states, *Journal of the American Dietetic Association*, 89, 1989, S. 1812-13

Renaud, S., de Lorgeril, M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 339, 1992, S. 1523–26

Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 1996, S. 933–56

Rindone, J.P., Murphy, T.W.: Warfarin-Cranberry Juice Interaction Resulting in Profound Hypoprothrombinemia and Bleeding, *American Journal of Therapeutics*, 13, 2005, S. 283-84

Rios, L.Y., Bennett, R.N., Lazarus, S.A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G.: Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 2002, S. 1106–10

Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sundberg, M.: Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, *Oncogene*, 25, 2006, S. 1679-91

Rooseboom, M., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P.: Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs, *Pharmacological Reviews*, 56, 2004, S. 53-102

Rosemary, J., Adithan, C.: The pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: ethnic variation and clinical significance, *Current Clinical Pharmacology*, 2, 2007, S. 93-107

Sand, P.G., Dreiseitel, A., Stang, M., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G.: Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents, *Phytotherapy Research*, 24, 2010, S. 304-07

Sano, A., Yamakoshi, J., Tokutake, S., Tobe, K., Kubota, Y., Kikuchi, M.: Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract, *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 67, 2003, S. 1140–43

Scheen, A.J.: Drug-drug and food-drug pharmacokinetic interactions with new insulinotropic agents repaglinide and nateglinide, *Clinical Pharmacokinetics*, 46, 2007, S. 93-108

Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A.G., Korver, O., Smit, F., Walker, R.: Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 2003, S. 1625–49

Schroeter, K.A.: Lebensmittelrechtliche Aspekte: Abgrenzungsfragen, Rechtssetzungsbedarf, Werbung (Health Claims). In: Preuß, A. (Hrsg.): Funktionelle Lebensmittel – Lebensmittel der Zukunft. Erwartungen, Wirkungen, Risiken, Behr's Verlag, Hamburg 2001, S. 113-21

Shader, R.I., Granda, B.W., von Moltke, L.L., Giancarlo, G.M., Greenblatt, D.J.: Inhibition of human cytochrome P450 isoforms in vitro by zafirlukast, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20, 1999, S. 385-88

Shao, J.G., Jiang, W., Li, K.Q., Lu, J.R., Sun, Y.Y.: Blood concentration of pantoprazole sodium is significantly high in hepatogenic peptic ulcer patients, especially those with a poor CYP2C19 metabolism, *Journal of Digestive Diseases*, 10, 2009, S. 55-60

Shao, Z.H., Hsu, C.W., Chang, W.T., Waypa, G.B., Li, J., Li, D., Li, C.Q., Anderson, T., Qin, Y., Schumacker, P.T., Becker, L.B., Hoek, T.L.: Cytotoxicity induced by grape seed proanthocyanidins: role of nitric oxide, *Cell Biology and Toxicology*, 22, 2006, S. 149-58

Shenfield, G.M.: Oral contraceptives. Are drug interactions of clinical significance?, *Drug Safety*, 9, 1993, S. 21-37

Shimizu, T.: Newly established regulation in Japan: foods with health claims, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11, 2002, S. 94–96

Shukitt-Hale, B., Carey, A.N., Jenkins, D., Rabin, B.M., Joseph, J.A.: Beneficial effects of fruit extracts on neuronal function and behavior in a rodent model of accelerated aging, *Neurobiology of Aging*, 28, 2007, S. 1187-94

Slaughter, R.L., Edwards, D.J.: Recent advances: the cytochrome P450 enzymes, *The Annals of Pharmacotherapy*, 29, 1995, S. 619-24

Spina, E., de Leon, J.: Metabolic drug Interactions with newer antipsychotics: A comparative review, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100, 2007, S. 4-22

Spina, E., Santoro, V., D'Arrigo, C.: Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update, *Clinical Therapeutics*, 30, 2008, S. 1206-27

Stresser, D.M., Blanchard, A.P., Turner, S.D., Erve, J.C., Dandeneau, A.A., Miller, V.P., Crespi, C.L.: Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates, *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 2000, S. 1440–48

Tahir, N.: Serotonin syndrome as a consequence of drug-resistant infections: an interaction between linezolid and citalopram, *Journal of the American Medical Directors Association*, 5, 2004, S. 111-13

Tanaka, T., Matsuo, Y., Yamada, Y., Kouno, I.: Structure of polymeric polyphenols of cinnamon bark deduced from condensation products of cinnamaldehyde with catechin and procyanidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2008, S. 5864–70

Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N., Mathé, G.: Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 2002, S. 200-07

Tassaneeyakul, W., Guo, L.Q., Fukuda, K., Ohta, T., Yamazoe, Y.: Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 378, 2000, S. 356-63

Testino, S.A., Patonay, G.: High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 2003, S. 1459-67

Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Fuhr, U., Kirchheiner, J.: The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes, *The Pharmacogenomics Journal*, 8, 2008, S. 4-15

Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T.: Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats, *FEBS Letters*, 449, 1999, S. 179–82

Tsujimoto, M., Horie, M., Honda, H., Takara, K., Nishiguchi, K.: The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 2009, S. 671-76

Uno, T., Yasui-Furukori, N.: Effect of grapefruit juice in relation to human pharmacokinetic study, *Current Clinical Pharmacology*, 1, 2006, S. 157-61

Vecht, C.J., Wagner, G.L., Wilms, E.B.: Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs, *Lancet Neurology*, 2, 2003, S. 404-09

Venkatakrisnan, K., Von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J.: Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models, *Journal of Clinical Pharmacology*, 41, 2001, S. 1149-79

Walsky, R.L., Obach, R.S.: Validated assays for human cytochrome P450 activities, *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 2004, S. 647-60

Walsky, R.L., Obach, R.S.: Verification of the selectivity of (+)N-3-benzylrivanol as a CYP2C19 inhibitor, *Drug Metabolism and Disposition*, 31, 2003, S. 343

Wangensteen, H., Molden, E., Christensen, H., Malterud, K. E.: Identification of epoxybergamottin as a CYP3A4 inhibitor in grapefruit peel, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 58, 2003, S. 663-68

Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, D.L.: Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from Tart Cherries, *Journal of Natural Products*, 62, 1999, S. 294-96

Wang, J., Mazza, G.: Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 macrophages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, S. 4183-89

Wang, L., Lee, I.M., Zhang, S.M., Blumberg, J.B., Buring, J.E., Sesso, H.D.: Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 2009, S. 905-12

Wang, L.S., Stoner, G.D.: Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Letters*, 269, 2008, S. 281-90

Wang, L.S., Zhou, G., Zhu, B., Wu, J., Wang, J.G., Abd El-Aty, A.M., Li, T., Liu, J., Yang, T.L., Wang, D., Zhong, X.Y., Zhou, H.H.: St John's wort induces both cytochrome P450 3A4-catalyzed sulfoxidation and 2C19-dependent hydroxylation of omeprazole, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 75, 2004, S. 191-97

Watzl, B., Briviba, K., Rechkemmer, G.: Anthocyane, *Ernährungsumschau*, 49, 2002, S. 148-50

Watzl, B., Rechkemmer, G.: Flavonoide, Ernährungsumschau, 48, 2001, S. 498-502

Webb, G.P.: Dietary Supplements & Functional Foods, Blackwell Publishing Ltd, Oxford 2006

Westphal, J.F.: Macrolide - induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin, British Journal of Clinical Pharmacology, 50, 2000, S. 285-95

Widmer, N., Csajka, C., Werner, D., Grouzmann, E., Decosterd, L.A., Eap, C.B., Biollaz, J., Buclin, T.: Principles of therapeutic drug monitoring, Revue Médicale Suisse, 4, 2008, S. 1644-48

Wijnen, P.A., Op den Buijsch, R.A., Drent, M., Kuipers, P.M., Neef, C., Bast, A., Bekers, O., Koek, G.H.: Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms, Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 26, 2007, S. 211-19

Wilkinson, G.R.: Drug metabolism and variability among patients in drug response, The New England Journal of Medicine, 352, 2005, S. 2211-21

Williams, D., Feely, J.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors, Clinical Pharmacokinetics, 41, 2002, S. 343-70

Wolters, M., Hahn, A.: Nährstoffsupplemente aus Sicht des Konsumenten, Ernährungsumschau, 48, 2001, S. 136-41

Wolters, M., Siekmann, D., Hahn, A.: Functional Foods – Aktuelle Situation und Perspektiven, Zeitschrift für Ernährungsökologie, 2, 2001, S. 36-46

Worzella, T., Larson, B., Cali, J., Gallagher, A., Matthews, E.: Miniaturizing luminescent P450-Glo™ Assays for HTS, Promega Cell Notes, 10, 2004, S. 6-9

Wu, X., Cao, G., Prior, R.L.: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry, The Journal of Nutrition, 132, 2002, S. 1865–71

Wu, X.W., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L.: Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 2006, S. 4069-75

Xiao Dong, S., Zhi Ping, Z., Zhong Xiao, W., Chong Shu, C., Fattore, C., Gatti, G., D'Urso, S., Perucca, E.: Possible enhancement of the first-pass metabolism of phenacetin by ingestion of grape juice in Chinese subjects, British Journal of Clinical Pharmacology, 48, 1999, S. 638-40

Yap, K.Y., Chui, W.K., Chan, A.: Drug interactions between chemotherapeutic regimens and antiepileptics, *Clinical Therapeutics*, 30, 2008, S.1385-407

Yi, L., Chen, C.Y., Jin, X., Mi, M.T., Yu, B., Chang, H., Ling, W.H., Zhang, T.: Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity, *FEBS Letters*, 584, 2010, S. 583-90

Yin, H., Racha, J., Li, S.Y., Olejnik, N., Satoh, H., Moore, D.: Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation, *Xenobiotica*, 30, 2000, S. 141-54

Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., Joseph, J.A.: Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 2002, S. 282-88

Zand, R.S., Jenkins, D.J., Diamandis, E.P.: Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds, *Breast Cancer Research and Treatment*, 62, 2000, S. 35-49

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D.: Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention, *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, 2007, S. 675-83

Zhai, S., Dai, R., Friedman, F.K., Vestal, R.E.: Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids, *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 1998, S. 989-92

Zhang, L., Wei, M.J., Zhao, C.Y., Qi, H.M.: Determination of the inhibitory potential of 6 fluoroquinolones on CYP1A2 and CYP2C9 in human liver microsomes, *Acta Pharmacologica Sinica*, 29, 2008, S. 1507-14

Zheng, W., Wang, S.Y.: Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, S. 502-09

Zhou, S., Chan, E., Pan, S.Q., Huang, M., Lee, E.J.: Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort, *Journal of Psychopharmacology*, 18, 2004, S. 262-76

Zuber, R., Modrianský, M., Dvorák, Z., Rohovský, P., Ulrichová, J., Simánek, V., Anzenbacher, P.: Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities, *Phytotherapy Research*, 16, 2002, S. 632-38

Zusatzstoff-Verkehrsverordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 269), die zuletzt durch die Verordnung vom 11. Juni 2009 (BGBl. I S. 1277) geändert worden ist, 1998

TABELLEN- UND ABILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen.....	12
Tabelle 2:	Zusammensetzung der „CYP1A2 Reaction Mixture“ und des „CYP1A2 NADPH Regeneration System“.....	28
Tabelle 3:	Zusammensetzung der „CYP2C19 Reaction Mixture“ und des „CYP2C19 NADPH Regeneration System“.....	31
Tabelle 4:	IC ₅₀ -Werte zu CYP1A2.....	38
Tabelle 5:	IC ₅₀ -Werte zu CYP2C19.....	46
Tabelle 6:	CYP1A2-Hemmung durch Flavonoide.....	51
Tabelle 7:	Cytochrom P450-aktivierte Präkarzinogene.....	68
Abbildung 1:	Hauptgruppen der Flavonoide.....	8
Abbildung 2:	Grundstruktur der Anthocyane.....	9
Abbildung 3:	Procyanidin B1 und B2.....	10
Abbildung 4:	Chemische Hauptreaktionen des P450 Screening Systems: Umwandlung eines luminogenen Substrats zu D-Luciferin durch das Cytochrom P450-Isoenzym (A) und Abbau des D-Luciferin unter Abgabe eines stabilen Lichtsignals in der Luciferase-Reaktion (B).....	24
Abbildung 5:	NADPH-Regenerierung.....	25
Abbildung 6:	Luciferase-Reaktion: Umwandlung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Beteiligung von O ₂ , ATP und Mg ²⁺ mit Entstehung von CO ₂ , AMP sowie einem stabilen Lichtsignal	26
Abbildung 7:	Hauptreaktionen des CYP1A2-Assays: CYP1A2-abhängige Dealkylierung von Luciferin-ME zu Luciferin und Entstehung eines Lichtsignals durch den Abbau des Luciferin in der Luciferase-Reaktion.....	29
Abbildung 8:	Hauptreaktionen des CYP2C19-Assays: CYP2C19-abhängige Hydroxylierung von Luciferin-H EGE zu Luciferin EGE und anschließender Abbau zu Luciferin in einer Esterase-Reaktion. Entstehung eines Lichtsignals durch den Abbau des Luciferin in der Luciferase Reaktion....	32
Abbildung 9:	Konzentrationsabhängige Inhibition von CYP1A2 durch 19 Testsubstanzen: Regressionskurven durch 5-6 Mittelwerte aus 2-4 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.....	35
Abbildung 10:	Ausmaß der CYP1A2-Hemmung in Abhängigkeit von strukturellen Merkmalen der Testsubstanzen: Anthocyanidine (Anthocya.), Anthocyanidin-mono-glykoside (A.-mono-gly), Anthocyanidin-di-glykoside (A.-di-gly), Procyanidine (Procya.) und α-Naphthoflavon (alfa-Naph.).....	41
Abbildung 11:	Konzentrationsabhängige Inhibition von CYP2C19 durch 15 Testsubstanzen: Regressionskurven durch 5-6 Mittelwerte aus 2-3 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.....	42
Abbildung 12:	Heterogene Effekte von Fluvoxamin, Cyanin, Malvin und	

	Pelargonin auf die CYP2C19-Aktivität: Biphasische Regressionskurven durch 6-8 Mittelwerte aus 2-3 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.....	45
Abbildung 13:	Ausmaß der CYP2C19-Hemmung in Abhängigkeit von strukturellen Merkmalen der Testsubstanzen: Anthocyanidine (Anthocya.), Anthocyanidin-mono- glykoside (A.-mono-gly), Procyanidine (Procya.) und Fluvoxamin.....	49
Abbildung 14:	Grundstruktur der Flavonoide.....	55

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A _i	Enzymaktivität in Gegenwart eines Inhibitors
A _{DMSO}	Enzymaktivität ohne Inhibitor (Negativkontrolle)
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
CA	Kalifornien
C _{max}	maximale Konzentration
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Kennzeichnung von Lebensmittelzusatzstoffen
EC ₅₀	effektive Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung
EGE	Ethylenglycolester
EM	extensive metabolizer
E _{max}	maximale Enzymaktivität
E _{min}	minimale Enzymaktivität
E _t	konzentrationsabhängige Enzymaktivität
et al.	und andere
EU	Europäische Union
FOSHU	Foods for Specified Health Use
g	Gramm
GF-I-1	4-[[6-Hydroxy-7[[1-[(1-hydroxy-1-methyl)ethyl]-4-methyl-6-(7-oxo-7H-furo-[3,2-g][1]benzopyran-4-yl)-4-hexenyl]oxy]-3,7-dimethyl-2-octenyl]oxy]-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on
GF-I-4	4-[[6-Hydroxy-7[[4-methyl-1-(1-methylethenyl)-6-(7-oxo-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-4-yl)-4-hexenyl]oxy]-3,7-dimethyl-2-octenyl]oxy]-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on
GRAS	generally recognized as safe
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasserstoffmonoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	Hyoxymethylglutaryl-Coenzym A
Hrsg.	Herausgeber
Hu Ms	humanen lebermikrosomale CYP-Präparationen
Hu Ex	humanen rekombinante CYP-Präparationen
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration mit halbmaximaler Hemmung
IM	intermediate metabolizer
IQ	2-Amino-3-Methylimidazo(4,5-f)quinolin
k.A.	keine Angabe
KG	Körpergewicht
l	Liter

LDL	Low Density Lipoprotein
M	Mol/Liter
m	Meter
ME	Methoxy-
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADP+	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NATB	N-Nitrosoanatabin
NDEA	N-Nitrosodiethylamin
NDMA	N-Nitrosodimethylamin
NNAL	4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosoamin)-1-(3-Pyridyl)-1-butanon
NNN	N-9-Nitrosonornicotin
O ₂	Sauerstoff
OH	Hydroxygruppe
OPC	oligomere Procyanidine
p	p-Wert in der Wahrscheinlichkeitsrechnung
pH	Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PhIP	2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo(4,5-b)pyridin
PM	poor metabolizer
RLU	Relative Light Unit
SGLT1	Natrium/Glucose-Cotransporter 1
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit (Maß für Enzymaktivität)
US(A)	United States (of America)
UV	ultraviolett
V _{max}	maximale Umsatzrate
λ	Wellenlänge
λ _{max}	maximale Wellenlänge

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation habe ich an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie am Bezirksklinikum der Universität Regensburg angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Klein dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie anzufertigen,

Herrn Prof. Dr. Hajak für die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas,

Herrn Dr. Sand für die ausgezeichnete Betreuung im Labor, seine Geduld und die kritische Korrektur der Rohfassung,

sowie dem gesamten Laborteam, allen voran Frau Andrea Dreiseitel für die unschätzbare Unterstützung bei theoretischen und praktischen Problemen bei der Laborarbeit.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Stang Martin Michael
Geboren am 10.02.1985 in Passau
Familienstand: ledig
Nationalität: österreichisch
Wohnort: Am Bergholz 17
94121 Salzweg

SCHULAU SBILDUNG:

1991 – 1995 Grundschule Straßkirchen
1995 – 2004 Auersperg-Gymnasium Passau

HOCHSCHULAU SBILDUNG:

2004 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg
09.2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PSYCHIATRISCHE FAMULATUR:

08.2008 Prim. Dr. Gössler, Kinder- und Jugendpsychiatrie,
Krankenhaus Hietzing, Wien

PRAKTISCHES JAHR:

08.2009 – 12.2009 Prof. Dr. Elsner, Innere Medizin, Klinikum Passau
12.2009 – 01.2010 Prof. Dr. Grimm, Chirurgie, Klinikum Passau
01.2010 – 02.2010 Prof. Dr. Boulos, Chirurgie, University College Hospital,
London
03.2010 – 04.2010 Prof. Dr. Grimm, Chirurgie, Klinikum Passau
04.2010 – 08.2010 Dr. Rauscher, Allgemeinmedizin, Regensburg