

**Auswirkungen eines moderaten Konsums von nativem oder entalkoholisiertem Rotwein
auf antioxidative Parameter im Blut und DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten
gesunder Proband/inn/en – Ergebnisse einer Interventionsstudie**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften

(Dr.oec.troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 25.07.2003

von

Dipl.-Oecotroph. Bianca Arendt

aus Eichstätt

Referent: PD Dr. R. Goerlich
Koreferent: Prof. Dr. R. Galensa
Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2003
Gedruckt bei: A & A Kopie-Druck-Center, Bonn

Für meine Tochter Felice

Kurzfassung: Auswirkungen eines moderaten Konsums von nativem oder entalkoholisierem Rotwein auf antioxidative Parameter im Blut und DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten gesunder Proband/inn/en – Ergebnisse einer Interventionsstudie

Problemstellung: Oxidativer Stress begünstigt die Entstehung von Herz-Kreislauf-, Tumor- und chronisch entzündlichen Erkrankungen. Rotwein enthält antioxidative Polyphenole und kann daher möglicherweise oxidativem Stress *in vivo* entgegenwirken. Ziel war es, zu prüfen, ob ein Glas Rotwein (RW) nach einmaliger bzw. regelmäßiger Zufuhr beim Menschen antioxidativ wirkt und ob entalkoholisierter Rotwein (ERW) aus derselben Charge vergleichbare Effekte hat.

Studie: A) Je 9 gesunde Nichtraucher/innen nahmen morgens nüchtern einmalig 200 mL RW, 175 mL ERW oder 200 mL Wasser zu sich. Blutentnahmen fanden vor sowie 90 und 360 min nach der Getränkeaufnahme statt. B) 49 gesunde Nichtraucher/innen tranken 6 Wochen lang täglich 200 mL RW oder 175 mL ERW zusätzlich zu ihrer normalen Kost. 25 Kontrollpersonen erhielten kein Studiengetränk. Blutproben wurden vor und nach der Intervention entnommen.

Methoden: In beiden Teilstudien wurden die antioxidative Kapazität (TEAC), der Gesamtphenolgehalt (Folin), Vitamin C, Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma gemessen. Bei B) wurde zusätzlich α -Tocopherol im Serum bestimmt. Endogene sowie durch H_2O_2 induzierte (exogene) DNA-Strangbrüche (SB) in peripheren Leukozyten wurden mit Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) erfasst.

Ergebnisse: A) Der Konsum von RW und ERW führte nach 90 min zu einem vorübergehenden Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus RW mit und ohne Alkohol hinweist. Die Vitamin C-Konzentration nahm 360 min nach dem Konsum von RW ab, stieg bei ERW aber an. Ursachen könnten prooxidative Effekte von Alkohol bzw. Vitamin C-Spareffekte von antioxidativ wirksamen Polyphenolen sein. Die TEAC wurde dadurch nur marginal beeinflusst. Veränderungen von Albumin, Urat und Bilirubin, die in den Gruppen RW, ERW und Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten auftraten, lagen alle innerhalb des Normbereichs und hatten ebenfalls keinen messbaren Effekt auf die TEAC. In der Leukozyten-DNA zeigten sich 360 min nach dem Verzehr von RW und ERW vermehrt endogene SB, was nicht eindeutig auf prooxidative Effekte zurückgeführt werden kann, da gleichzeitig in der Gruppe ERW die exogenen SB reduziert waren.

B) Nach 6 Wochen Intervention führte nur RW, nicht aber ERW zu einem Anstieg der Gesamtphenole im Plasma, was vermutlich auf eine niedrigere Polyphenolkonzentration bei ERW zurückzuführen ist. Gleichzeitig kam es bei RW zu einer Reduktion endogener DNA-Schäden. Exogene SB, TEAC, Vitamin C und α -Tocopherol blieben unverändert. Auch Veränderungen von Urat (Kontrolle) und Bilirubin (ERW) hatten keinen Einfluss auf die TEAC.

Schlussfolgerung: A) Polyphenole aus RW und ERW sind bioverfügbar und führen zu einer vorübergehenden Steigerung des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, können aber die TEAC nicht erhöhen. Eine Zunahme endogener DNA-Schäden deutet auf genotoxische Effekte von RW-Polyphenolen hin, könnte aber auch auf einer Aktivierung von Reparaturenzymen beruhen.

B) Bei regelmäßiger Zufuhr führt nativer RW zu einer Akkumulation von Polyphenolen im Plasma, ohne die TEAC zu verändern. Im Gegensatz zum einmaligen Verzehr wurde das Ausmaß der endogenen DNA-Strangbrüche reduziert, wodurch protektive Effekte gegenüber Tumorerkrankungen möglich sind.

Die Diskrepanz zwischen kurz- und mittelfristigen Effekten von RW lässt sich möglicherweise durch eine Akkumulation unterschiedlicher Polyphenole erklären. Zur Überprüfung wäre eine Quantifizierung einzelner RW-Polyphenole und ihrer Metaboliten im Plasma und in Leukozyten notwendig.

Die Interaktionen von RW-Polyphenolen und der DNA *in vivo* sollten wegen ihres einerseits protektiven, andererseits genotoxischen Potentials näher untersucht werden.

Abstract: Effects of moderate consumption of native or dealcoholised red wine on antioxidant parameters in blood and DNA-strandbreaks in peripheral leukocytes in healthy men and women – results of an intervention trial

Background and objective: Oxidative stress is probably involved in initiation and progression of cardiovascular disease, cancer, and chronic inflammatory processes. Red wine is rich in antioxidant polyphenols and thus might protect from oxidative stress *in vivo*. Aim of this study was to examine if a glass of red wine (RW) consumed once or regularly, respectively, shows antioxidant activity in humans. The effects of dealcoholised red wine (DRW) of the same batch were determined in comparison.

Study: A) 27 healthy non-smokers received a single dose of 200 ml RW, 175 ml DRW or 200 ml water after an overnight fast. Blood samples were drawn before, 90, and 360 min after consumption.

B) 49 subjects ingested 200 ml RW or 175 ml DRW daily over 6 weeks in addition to their normal diet. 25 controls did not receive any study drink. Blood samples were drawn before and after intervention.

Methods: In both parts of the study antioxidant capacity (TEAC), total phenolic content (Folin), vitamin C, albumin, urate, and bilirubin in plasma were determined. In B) α -tocopherol in serum was measured additionally. Endogenous and H₂O₂-induced (exogenous) DNA-strandbreaks (SB) in peripheral leukocytes were assessed by single cell gel electrophoresis (Comet Assay).

Results: A) A transient increase of total phenolics in plasma was observed after consumption of RW or DRW indicating that bioavailability of polyphenols is comparable. Vitamin C decreased 360 min after RW but increased after DRW, which might be due to pro-oxidant effects of alcohol or antioxidant vitamin C-sparing effects of polyphenols, respectively. TEAC was not altered significantly. Changes of albumin, urate, and bilirubin occurring after RW, DRW, and in controls were all within the physiological range and did not affect plasma-TEAC. More endogenous SB were measured 360 min after RW or DRW compared to baseline, which cannot be ascribed to pro-oxidant effects, as exogenous SB were reduced in group DRW at the same time.

B) After 6 weeks intervention RW, but not DRW lead to an increase of total phenolics in plasma, probably due to the lower polyphenol content of DRW. Concurrently endogenous SB were reduced in group RW. Exogenous SB, TEAC, vitamin C, and α -tocopherol remained unchanged. TEAC was not influenced by changes of urate (control) or bilirubin (DRW).

Conclusion: A) Polyphenols from RW and DRW are bioavailable and transiently increase total phenolics in plasma without affecting TEAC. Enhanced endogenous DNA-damage indicates genotoxic effects of RW-polyphenols but might also be due to activation of repair enzymes.

B) When RW is consumed regularly, polyphenols are accumulated in plasma without an increase of TEAC. In contrast to single ingestion endogenous SB are reduced. Thus, tumour-preventing effects of RW are possible.

Discrepancies between short- and midterm effects of RW might be due to accumulation of different polyphenols in plasma and/or cells. To verify this, quantification of concentrations of the most important RW-polyphenols and their metabolites both intra- and extra-cellular would be necessary.

Interactions of RW-polyphenols and DNA *in vivo* would be worth being further examined because they show a protective as well as a genotoxic potential.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
2.1	Oxidativer Stress	2
2.1.1	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	2
2.1.2	Antioxidative Schutzmechanismen	3
2.1.3	Die pathophysiologische Bedeutung von oxidativem Stress	3
2.2	Polyphenole	4
2.2.1	Struktur und Vorkommen	5
2.2.2	Alimentäre Zufuhr	6
2.2.3	Bioverfügbarkeit und Metabolismus	8
2.2.4	Antioxidative Wirkungen	9
2.2.5	Weitere Wirkungen von Polyphenolen	11
2.2.6	Die Bedeutung von Polyphenolen für die menschliche Gesundheit	11
2.3	Rotwein als polyphenolreiches Lebensmittel	12
2.3.1	Polyphenole im Rotwein	12
2.3.2	Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Rotweinpolyphenolen	16
2.3.3	Antioxidative Wirkungen von Rotwein <i>in vitro</i>	19
2.3.4	Antioxidative Wirkungen von Rotwein <i>in vivo</i>	20
2.3.4.1	Akute Effekte nach einmaligem Verzehr	20
2.3.4.2	Antioxidative Wirkungen bei regelmäßiger Aufnahme von Rotwein	21
2.3.4.3	Die Bedeutung des Alkohols für die antioxidative Wirkung von Rotwein <i>in vivo</i>	23
3	Zielsetzung	24
4	Material und Methoden	25
4.1	Studiendesign	25
4.1.1	Fallzahlbestimmung	25

4.1.2	Kurzzeitstudie	26
4.1.2.1	Proband/inn/en	26
4.1.2.2	Durchführung	27
4.1.3	Langzeitstudie	29
4.1.3.1	Proband/inn/en	29
4.1.3.2	Durchführung	29
4.1.3.3	Diätetische Restriktionen	30
4.2	Studiengeränke	30
4.3	Blutentnahme und Probengewinnung	32
4.4	Methoden	33
4.4.1	Erfassung der Polyphenol- und Nährstoffzufuhr	33
4.4.2	Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes im Plasma	34
4.4.2.1	Prinzip	34
4.4.2.2	Praktische Durchführung	34
4.4.3	Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma	36
4.4.3.1	Prinzip	36
4.4.3.2	Praktische Durchführung	37
4.4.4	Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes im Plasma	39
4.4.4.1	Prinzip	39
4.4.4.2	Praktische Durchführung	40
4.4.5	Bestimmung von α -Tocopherol im Serum	41
4.4.6	Bestimmung endogener Antioxidantien im Plasma	41
4.4.7	Detektion von DNA-Strangbrüchen in peripheren Leukozyten	42
4.4.7.1	Prinzip	42
4.4.7.2	Praktische Durchführung	43
4.4.7.3	Auswahl der Messparameter	46
4.4.8	Statistik	47
4.4.8.1	Beschreibung des Proband/inn/enkollektivs	47
4.4.8.2	Ergebnisse	47
5	Ergebnis	49
5.1	Kurzzeitstudie	49
5.1.1	Proband/inn/en	49
5.1.2	Teil A: Antioxidative Kapazität im Plasma	49
5.1.3	Teil B	50
5.1.3.1	Polyphenol- und Nährstoffzufuhr	50
5.1.3.2	Gesamtphenolgehalt im Plasma	51

5.1.3.3	Antioxidative Kapazität im Plasma	51
5.1.3.4	Endogene Antioxidantien im Plasma	52
5.1.3.5	Vitamin C im Plasma	53
5.1.3.6	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	54
5.2	Langzeitstudie	56
5.2.1	Proband/inn/en	56
5.2.2	Polyphenol- und Nährstoffzufuhr	57
5.2.3	Gesamtphenolgehalt im Plasma	59
5.2.4	Antioxidative Kapazität im Plasma	59
5.2.5	Vitamin C im Plasma	59
5.2.6	α -Tocopherol im Serum	60
5.2.7	Endogene Antioxidantien im Plasma	60
5.2.8	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	61
6	Diskussion	63
6.1	Studienaufbau	63
6.2	Methoden	64
6.3	Kurzzeitstudie	65
6.3.1	Polyphenol- und Nährstoffzufuhr	65
6.3.2	Gesamtphenolgehalt im Plasma	66
6.3.3	Antioxidative Kapazität im Plasma	68
6.3.4	Vitamin C im Plasma	69
6.3.5	Endogene Antioxidantien im Plasma	70
6.3.6	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	71
6.4	Langzeitstudie	74
6.4.1	Polyphenol und Nährstoffzufuhr	74
6.4.2	Gesamtphenolgehalt im Plasma	76
6.4.3	Antioxidative Kapazität im Plasma	76
6.4.4	Antioxidantien im Plasma / Serum	77
6.4.5	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten	78
6.5	Vergleich zwischen kurz- und mittelfristigen Effekten	79
6.6	Schlussfolgerung	81
7	Zusammenfassung	84
8	Literaturverzeichnis	86

Anhang A: Fragebogen für Proband/inn/en.....	A1
Anhang B: Liste polyphenolarmer und -reicher Lebensmittel.....	A3
Anhang C: Analysedaten des nativen und entalkoholisierten Rotweins.....	A4
Anhang D: Herstellerangaben zum Mineralwasser für die Kurzzeitstudie.....	A5
Anhang E: Ernährungsprotokoll.....	A6
Anhang F: Polyphenoldatenbank.....	A10

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Wichtige Phenolsäuren in Nahrungsmittelpflanzen	5
Abb. 2:	Flavangrundgerüst	6
Abb. 3:	Strukturformeln im Wein nachgewiesener Polyphenole	13
Abb. 4:	Zellen nach Einzelzell-Gelelektrophorese	45
Abb. 5:	Messung einer Zelle nach Einzelzell-Gelelektrophorese mit dem Comet Assay II-System	46
Abb. 6:	Antioxidative Kapazität im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW) bzw. 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) (Kurzzeitstudie Teil A).....	50
Abb. 7:	Gesamtphenolgehalt im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)	52
Abb. 8:	Vitamin C-Konzentration im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)	54
Abb. 9:	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Intensity (TI) nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) bzw. 200 mL Wasser (Kontrolle)	55
Abb. 10:	Phenolsäure- und Flavonoidzufuhr bei normaler Kost und bei zusätzlicher Aufnahme von 200 mL Rotwein (RW) bzw. 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich	58
Abb. 11:	Gesamtphenolgehalt im Plasma vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein (RW) oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)	59
Abb. 12:	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten, gemessen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese als Tail Intensity (TI) vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Polyphenolgehalte von Rotwein, Weißwein, rotem und weißem Traubensaft.....	15
Tab. 2:	Humanstudien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Rotwein	17
Tab. 3:	Demographische Daten der Proband/inn/en der Kurzzeitstudie	27
Tab. 4:	Demographische Daten der Proband/inn/en der Langzeitstudie	29
Tab. 5:	Polyphenolgehalt und antioxidative Kapazität einer Einzeldosis Rotwein bzw. entalkoholisierten Rotweins (ERW).....	31
Tab. 6:	Polyphenol-, Energie-, Vitamin C- und Alkoholaufnahme der Proband/inn/en der Kurzzeitstudie bei polyphenolarmer Kost am Tag vor der Untersuchung.....	51
Tab. 7:	Antioxidative Kapazität im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 ml entalkoholisiertem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)	52
Tab. 8:	Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) bzw. 200 mL Wasser (Kontrolle)	53
Tab. 9:	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Moment (TM) nach Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)	56
Tab. 10:	Gesamtphenolzufuhr vor (w-1) und während Intervention mit 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle) (w6)	57
Tab. 11:	Energie-, Vitamin C- und Alkoholaufnahme bei normaler Kost (Nullwert, Kontrolle) und bei zusätzlichem Konsum von 200 mL Rotwein bzw. 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich	58
Tab. 12:	Antioxidative Kapazität, Vitamin C- und α -Tocopherol-Konzentration im Plasma bzw. Serum vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)	60
Tab. 13:	Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisiertem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)	61
Tab. 14:	DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Moment (TM) vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)	62

Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat
BMI	Body Mass Index
CAE	Catechinäquivalente
CBMN	Cytokinese-Block Mikronukleustest
d	Tag/e
ERW	Entalkoholisierter Rotwein
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde/n
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KG	Körpergewicht
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
M	Mol/Liter
m	männlich; Meter; Milli-
Max	Maximum
Min	Minimum
min	Minute/n
MW	Arithmetisches Mittel
N, n	Anzahl der Proband/inn/en
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNS	Reaktive Stickstoffverbindungen
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
RT	Raumtemperatur
RW	Rotwein
SCGE	Einzelzell-Gelelektrophorese
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TI / TI ₀ / TI ₃₀₀	Tail Intensity / in unbehandelten Zellen / nach Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂
TM / TM ₀ / TM ₃₀₀	Tail Moment / in unbehandelten Zellen / nach Behandlung mit 300 µM H ₂ O ₂
vs.	versus
w	Woche/n; weiblich

1 Einleitung

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in nahezu allen pflanzlichen Lebensmitteln enthalten sind und damit einen festen Bestandteil der menschlichen Ernährung darstellen (Watzl & Leitzmann 1995). Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass der Verzehr einer polyphenolreichen Kost vor Herz-Kreislauf- und Tumor-Erkrankungen – den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland 2003) – schützen kann. Die protektiven Effekte scheinen zumindest teilweise auf den antioxidativen Wirkungen der Polyphenole zu beruhen (Hollmann 2001).

Rotwein, der sowohl hohe Konzentrationen als auch ein breites Spektrum an phenolischen Komponenten enthält (Soleas *et al.* 1997a; Mattivi *et al.* 2002), gehört in der westlichen Kost zu den wichtigsten Polyphenolquellen (Hertog *et al.* 1995; Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998). Antioxidative Effekte unmittelbar nach einmaligem Rotweinkonsum wurden in zahlreichen Interventionsstudien nachgewiesen (Maxwell *et al.* 1994; Whitehead *et al.* 1995; Miyagi *et al.* 1997; Duthie *et al.* 1998; Simonetti *et al.* 2001), die Wirkungen eines regelmäßigen Rotweinkonsums werden dagegen kontrovers diskutiert (Fuhrman *et al.* 1995; de Rijke *et al.* 1996; Carbonneau *et al.* 1997; Nigdikar *et al.* 1998; Leighton *et al.* 1999; van der Gaag *et al.* 2000).

In einer kontrollierten Interventionsstudie wurden daher die Effekte eines einmaligen bzw. wiederholten moderaten Rotweinkonsums auf den Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Kapazität im Plasma bei gesunden Frauen und Männern überprüft. Um zwischen direkten antioxidativen Effekten der Rotweinpolyphenole und sekundären Wirkungen durch Veränderungen anderer Antioxidantien im Körper differenzieren zu können, wurden außerdem die Konzentrationen von Albumin, Urat, Bilirubin, Vitamin C und α -Tocopherol im Blut bestimmt. Darüber hinaus wurden endogene sowie *ex vivo* durch Wasserstoffperoxid induzierte DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten gemessen, was Hinweise darauf geben sollte, ob Rotweinpolyphenole, die ins Plasma gelangen, auf zellulärer Ebene biologisch relevante Wirkungen zeigen. Um die Bedeutung des Alkohols für die antioxidativen Wirkungen *in vivo* abschätzen zu können, wurde neben nativem Rotwein auch entalkoholisierter Rotwein eingesetzt, der aus derselben Charge hergestellt wurde.

2 Grundlagen

2.1 Oxidativer Stress

Im menschlichen Organismus herrscht ein physiologisches Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Substanzen. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Prooxidantien, spricht man von „oxidativem Stress“ (Sies 1985). Dieser wird als ein wesentlicher Faktor für die Entstehung chronisch degenerativer Erkrankungen diskutiert (Halliwell 1996b; Gaté *et al.* 1999; Salganik 2001).

2.1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Prooxidative Substanzen im Körper, sog. reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS), entstehen durch Oxidationsreaktionen. Sie sind in der Lage, biologische Moleküle (Lipide, Proteine, DNA-Moleküle) zu oxidieren, wodurch diese in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können. Zu den ROS und RNS gehören z.B. Superoxid- ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxyl- ($\bullet OH$), Peroxyl- (RO_2^{\bullet}) und Stickoxidradikale (NO^{\bullet}), aber auch nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorit ($HOCl$) und Peroxynitrit ($ONOO^-$) (Halliwell 1996b).

ROS und RNS sind für den Ablauf verschiedener physiologischer Vorgänge notwendig. Sie entstehen als Nebenprodukte in der Atmungskette, sind ein integraler Bestandteil der unspezifischen Abwehr und spielen darüber hinaus bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle (Halliwell 1996b, Salganik 2001). Exogene Faktoren, die zur Bildung reaktiver Verbindungen im Körper führen, sind UV- und radioaktive Strahlung, Zigarettenrauch, Luftverunreinigungen, Ozon, Medikamente und Toxine (Halliwell 1996b; Block 1999).

Die einzelnen ROS und RNS unterscheiden sich stark in ihrer Reaktivität und damit in ihrem schädlichen Potential (Gutteridge 1994). So ist das Superoxidanion ein schwaches Oxidationsmittel. Es ist instabil und wird rasch in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt (Dismutation). H_2O_2 , das außer durch Dismutation auch durch radikalbildende Enzyme entsteht, ist selbst nur schwach oxidativ und relativ stabil. Es ist gut wasserlöslich und kann rasch durch die Zellmembran diffundieren. In Gegenwart freier Metallionen entstehen durch metallkatalysierte Reaktionen (Fenton-Reaktion, Haber-Weiss-Reaktion) jedoch hochreaktive Hydroxylradikale (Gutteridge 1994; Halliwell 1996b; Gaté *et al.* 1999), die rasch fast alle biologischen Moleküle oxidieren können (Halliwell 1996a).

Hydroxylradikale sind verantwortlich für die DNA-schädigende Wirkung von Wasserstoffperoxid (Duthie *et al.* 1997a) und radioaktiver Strahlung (Anderson *et al.* 2000).

Stickstoffmonoxidradikale können freie Peroxylradikale abfangen und damit die Lipidperoxidation inhibieren (Halliwell 1996b). Bei einem Überschuss an ROS kann aus NO^\bullet und O_2^- jedoch das stark oxidierende und nitrierende Peroxynitrit entstehen (Gutteridge 1994; Halliwell 1996b). Beim Zerfall von ONOO^- werden ebenfalls Hydroxylradikale freigesetzt (Gutteridge 1994; Halliwell 1996b).

2.1.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Zum Schutz vor ROS und RNS steht dem Körper ein breites Spektrum an Antioxidantien zur Verfügung. Nicht-enzymatische Antioxidantien fangen freie Radikale ab (Radikalscavenging) oder verhindern bereits deren Bildung. Wasserlösliche Antioxidantien wie Albumin, Urat, Bilirubin, Vitamin C und Glutathion befinden sich dabei im Plasma oder im Zytosol. Vitamin E, Carotinoide und Ubichinon sind auf Grund ihrer lipophilen Struktur in der Zellmembran lokalisiert (Lunec & Winyard 1998). Polyphenole entfalten ihre antioxidativen Schutzwirkungen vermutlich an der Grenzschicht zwischen der wässrigen Phase und der lipophilen Oberfläche der Zellmembranen (Carbonneau *et al.* 1997).

Antioxidative Enzyme setzen ROS und RNS zu weniger reaktiven Verbindungen um (Gutteridge 1994; Lunec & Winyard 1998), während Speicher- und Transportproteine Metallionen binden und damit die Katalyse der Lipidperoxidation oder anderer radikalbildender Reaktionen (Fenton-Reaktion, Haber-Weiss-Reaktion) verhindern (Gutteridge 1994).

Zusätzlich zu diesen antioxidativen Schutzsystemen verfügt der Körper über Reparaturmechanismen, mit denen oxidierte Lipide, Proteine oder DNA-Bausteine wieder reduziert oder entfernt und abgebaut werden können (Gaté *et al.* 1999; Davies 2000).

2.1.3 Die pathophysiologische Bedeutung von oxidativem Stress

Oxidativer Stress kann aus einer erhöhten Produktion von ROS / RNS oder einem Mangel an Antioxidantien resultieren (Halliwell 1996a) und ist mit verschiedenen pathologischen Prozessen assoziiert. So gilt als gesichert, dass die Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) einen Eckstein in der Atherogenese darstellt (Steinberg 1997; Aviram &

Fuhrman 1998). In der DNA können Einzel- oder Doppelstrangbrüche sowie Modifikationen der Purin- und Pyrimidinbasen auftreten (Lunec & Winyard 1998), wodurch Mutationen und damit die Karzinogenese begünstigt werden (Kasai & Nishimura 1991; Gaté *et al.* 1999). Oxidativer Stress trägt auch zur Gewebeschädigung bei Diabetes, Rheuma, entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Parkinson und Alzheimer bei (Halliwell 1996a; Abuja & Albertini 2001).

Eine ausreichende Zufuhr an Antioxidantien mit der Nahrung könnte oxidativem Stress *in vivo* entgegenwirken und damit protektiv wirken. Epidemiologische Studien zeigen, dass ein hoher Verzehr von Obst, Gemüse, Rotwein und Tee, die reich an Antioxidantien sind, tatsächlich mit einem verminderten Risiko für Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen assoziiert ist (Negri *et al.* 1991; Block *et al.* 1992; Renaud & de Lorgeril 1992; Hertog *et al.* 1993a; Hertog *et al.* 1995; Blot *et al.* 1996; Hertog *et al.* 1996; Potter & Steinmetz 1996; Knekt *et al.* 1997; Geleijnse *et al.* 1999; Johnsen *et al.* 2003; Malin *et al.* 2003). Neben den Vitaminen A, C und E sowie den Carotinoiden werden besonders den Polyphenolen antioxidative Wirkungen zugesprochen (Watzl & Leitzmann 1995).

2.2 Polyphenole

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in fast allen Nahrungsmittelpflanzen vorkommen und damit einen festen Bestandteil der menschlichen Kost darstellen. In der Pflanze erfüllen Polyphenole vielfältige Aufgaben, u.a. Anlocken von Bestäubern sowie Schutz vor Fraßinsekten, Krankheiten, UV-Strahlung und ROS. Als Farb-, Geruchs- und Geschmacksstoffe beeinflussen sie die sensorische Qualität pflanzlicher Lebensmittel (Watzl & Leitzmann 1995). Darüber hinaus zeigen Polyphenole *in vitro* antioxidative und andere pharmakologische Effekte (vgl. Kap. 2.2.4 / 2.2.5). Durch die regelmäßige Zufuhr sind Einflüsse auf die menschliche Gesundheit denkbar (Watzl & Leitzmann 1995; Middleton *et al.* 2000).

2.2.1 Struktur und Vorkommen

Polyphenole werden entsprechend ihrer Struktur in phenolische Säuren, Flavonoide und Stilbene eingeteilt.

Phenolische Säuren basieren auf einer C₆-C₁- (Hydroxybenzoesäuren) oder einer C₆-C₃-Grundstruktur (Hydroxyzimtsäuren) (Abb. 1). Kaffeesäure und Ferulasäure sind die häufigsten phenolischen Komponenten in Nahrungsmittelpflanzen (Watzl & Leitzmann 1995; Yang *et al.* 2001) und liegen meist mit Chinasäure oder Glucose verestert vor (Herrmann 1989; Belitz & Grosch 1992). Gallussäure ist hingegen häufig mit Flavanolen verbunden und stellt in dieser Form eine Hauptkomponente von grünem und schwarzem Tee dar (Poon 1998).

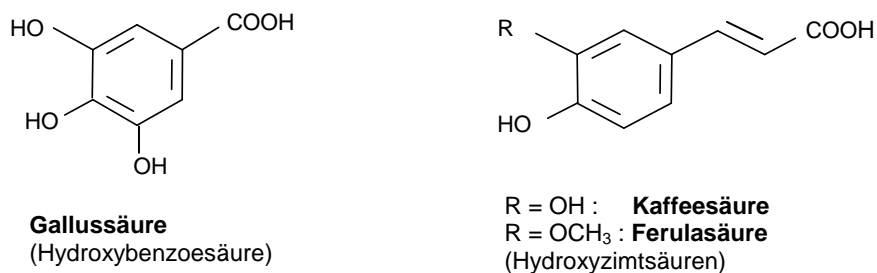


Abb. 1: Wichtige Phenolsäuren in Nahrungsmittelpflanzen

Flavonoide sind mit über 5 000 Vertretern die größte Klasse der phenolischen Verbindungen (Yang *et al.* 2001). Ihre Struktur basiert auf zwei Benzolringen, die durch einen heterozyklischen Pyranring verbunden sind (Flavangerüst = 2-Phenyl-benzo-dihydropyran; Abb. 2). Eine weitere Unterscheidung in Flavonole, Flavanole, Flavone, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavonoide basiert auf Modifikationen des heterozyklischen Pyranrings. Dieser kann an der C4-Position eine Carbonylgruppe besitzen, gesättigt sein oder eine Doppelbindung enthalten. Bei den Isoflavonen ist der B-Ring am C3- statt am C2-Atom des C-Rings gebunden (Belitz & Grosch 1992; Watzl & Leitzmann 1995).

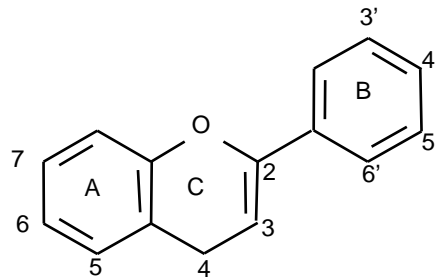


Abb. 2: Flavangrundgerüst

Quercetin, ein *Flavonol*, ist das in Nahrungsmittelpflanzen am weitesten verbreitete Flavonoid (Hertog *et al.* 1992). *Flavan-3-ole* (Catechine) kommen vor allem in Obst, Rotwein, Tee und Schokolade vor (Arts *et al.* 2000a; Arts *et al.* 2000b). In kondensierter Form, d.h. als Di- oder Oligomere (Proanthocyanidine) tragen sie als Gerbstoffe zum adstringierenden Geschmack von unreifen Früchten oder Wein bei (Belitz & Grosch 1992; Waterhouse 2002). *Anthocyane*, die Glykoside der Anthocyanidine, sind für die charakteristische Färbung roter, blauer und violetter Obst- und Gemüsesorten verantwortlich. *Flavone* sind vor allem in Blattgewürzen enthalten, *Flavanone* in Zitrusfrüchten und *Isoflavone* in Leguminosen. In der Pflanze sind Flavanole häufig mit Gallussäure verestert, während die anderen Flavonoide in der Regel als Glykoside vorliegen (Belitz & Grosch 1992; Watzl & Leitzmann 1995).

Stilbene enthalten zwei Phenylkomponenten, die über eine 2-Carbon-Methylenbrücke verbunden sind. Der bekannteste Vertreter ist Resveratrol, das u.a. in Rotwein und Erdnüssen zum Schutz vor Infektionen oder UV-Strahlung gebildet wird (Goldberg *et al.* 1995).

2.2.2 Alimentäre Zufuhr

Zur alimentären Zufuhr von Polyphenolen gibt es bislang nur wenige Angaben, die sich meist auf einzelne Flavonoide beziehen. In den Niederlanden betrug die Aufnahme von drei Flavonolen (Quercetin, Myricetin, Kämpferol) und zwei Flavonen (Apigenin, Luteolin) insgesamt etwa 25 mg/d (Hertog *et al.* 1993a; Hertog *et al.* 1993b). Für Catechine wurden 72 mg/d angegeben (Arts *et al.* 2001). In den USA tragen nach (Bronner & Beecher 1995) Flavanone aus Zitrusfrüchten mehr als 23 mg/d zur Gesamtphenolaufnahme bei.

Von der Arbeitsgruppe um Linseisen und Radtke wurde vor kurzem erstmals eine Datenbank erstellt, in der die Angaben aus knapp 100 Veröffentlichungen zum Flavonoid- und Phenolsäuregehalt verschiedener Lebensmittel zusammengefasst wurden (Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998). Anhand dieser Daten berechneten die Autoren für ein Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie (119 Personen, 19–49 Jahre (a), Bayern) eine Phenolsäurezufuhr von durchschnittlich 222 mg/d, davon 92% als Kaffeesäure. Neben Kaffee zählten Obst, Obstprodukte und –säfte zu den Hauptlieferanten phenolischer Säuren (Radtke *et al.* 1998). Die mittlere Flavonoidaufnahme betrug 54 mg/d (davon 12 mg Flavonole, 8,3 mg Catechine, 13,2 mg Flavanone, 3,7 mg Proanthocyanidine, 2,7 mg Anthocyanidine, 0,7 mg Phloretin). Dabei war Quercetin mit 10,2 mg/d vorherrschend. Die wichtigsten Quellen waren Obst, Obstprodukte und –säfte (Linseisen *et al.* 1997). Die vergleichsweise niedrigen Flavonoidwerte für Bayern lassen sich durch unterschiedliche Verzehrsgewohnheiten, besonders bei schwarzem Tee, erklären (Linseisen *et al.* 1997).

Isoflavonoide und Stilbene wurden nicht berücksichtigt. Da Isoflavonoide fast ausschließlich in Sojaprodukten enthalten sind, haben sie für die Ernährung in westlichen Industrieländern nur eine geringe Bedeutung (Adlercreutz & Mazur 1997; Skibola & Smith 2000). (Skibola & Smith 2000) schätzen die tägliche Aufnahme in Asien, wo viel Soja verzehrt wird, auf 20 - 240 mg/d, in allen anderen Regionen auf 1 - 9 mg/d. Auch Stilbene dürften wegen ihres begrenzten Vorkommens nur in geringen Mengen aufgenommen werden (Goldberg *et al.* 2003).

Die Angaben zur alimentären Polyphenolaufnahme sind nur beschränkt aussagefähig, da der Gehalt in Nahrungsmittelpflanzen je nach Jahreszeit, Sorte, Anbau und Reifezustand variiert. Darüber hinaus existiert bislang keine Standardmethode für die Bestimmung der Polyphenolkonzentration in Lebensmitteln (Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998; Beecher 1999). Trotzdem lässt sich sagen, dass die Zufuhr von Polyphenolen insgesamt deutlich höher liegt als die anderer Antioxidantien wie Vitamin C (105 mg/d), Vitamin E (12 mg/d) und β -Carotin (2,5 mg/d) (Linseisen *et al.* 1997; Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000b).

2.2.3 Bioverfügbarkeit und Metabolismus

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen wurde in zahlreichen Tier- und Humanstudien untersucht (Übersicht bei Scalbert & Williamson 2000). Dabei zeigte sich, dass die Absorption und der Metabolismus wesentlich durch die chemische Struktur der einzelnen Verbindungen bestimmt werden (Scalbert & Williamson 2000).

Polyphenole liegen in der Pflanze meist als Glykoside oder Ester organischer Säuren vor (Watzl & Leitzmann 1995). Im Dickdarm werden sie durch Glykosidasen und Esterasen der Mikroflora hydrolysiert. Die freigesetzten Phenolsäuren und Flavonoide können direkt oder nach weiterem mikrobiellem Abbau zu Phenylcarbonsäuren oder Laktonen absorbiert werden (Rechner *et al.* 2002). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Chlorogensäure (Olthof *et al.* 2001) und Flavonoid-Glykoside (Hollmann *et al.* 1995; Paganga & Rice-Evans 1997; Aziz *et al.* 1998) teilweise bereits im Dünndarm absorbiert werden. Acetylierte Flavonoide wie die Flavanol-Gallatester im Tee scheinen ebenfalls unverändert in die Darmmukosa zu gelangen (Scalbert & Williamson 2000). Es gibt Hinweise aus *in vitro*-Studien, dass nach Abbau der Oligomere durch Magensäure oder durch die intestinale Mikroflora zu Dimeren oder Trimeren auch Proanthocyanidine bioverfügbar sind (Déprez *et al.* 2000; Spencer *et al.* 2001).

Nach der Absorption werden die Polyphenole in Darm, Leber und Nieren rasch zu O-Methylestern, Glucuroniden und Sulfaten metabolisiert (German & Walzem 2000; Scalbert & Williamson 2000; Hollmann 2001). Im Körper liegen sie daher fast ausschließlich in konjugierter Form vor (Manach *et al.* 1998; Goldberg *et al.* 2003). Eine Ausnahme bilden die Anthocyane, die unkonjugiert als Glykoside in Plasma und Urin nachweisbar sind (Miyazawa *et al.* 1999; Bub *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2001).

Die Ausscheidung der Polyphenole erfolgt über die Nieren und die Galle (Scalbert & Williamson 2000). Glucuronide und Sulfate, die über die Galle sezerniert werden, können durch die Darmflora als Aglykone freigesetzt und reabsorbiert werden, so dass ein enterohepatischer Kreislauf entsteht (Scalbert & Williamson 2000; Hollmann 2001).

Die Absorption der Polyphenole erfolgt rasch, maximale Konzentrationen im Plasma werden bereits 1 – 2 h nach der Aufnahme erreicht (Scalbert & Williamson 2000). Ausnahmen bilden Verbindungen wie z.B. Rutin, die erst nach Hydrolyse im Kolon absorbiert werden können (Hollmann *et al.* 1997; Scalbert & Williamson 2000). Die Eliminationszeiten der einzelnen Verbindungen sind unterschiedlich. Während Catechin (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000) und Malvidin-3-glucosid (Bub *et al.* 2001) aus Rotwein sowie Teecatechine (Lee *et al.* 1995)

rasch ausgeschieden werden, liegt die Halbwertszeit der Elimination für Quercetin bei 17 - 25 h (Hollman *et al.* 1996; Hollmann *et al.* 1997). Trotz der kurzen Eliminationszeit einzelner Verbindungen ist eine Akkumulation von Polyphenolen im Plasma bei regelmäßiger Zufuhr polyphenolreicher Lebensmittel möglich (Hollmann *et al.* 1997; Bertelli *et al.* 1998; Donovan *et al.* 1999; van het Hof *et al.* 1999; Boyle *et al.* 2000a; Rechner *et al.* 2002).

Nur ein sehr geringer Anteil (< 0,03 – 10 %) der aufgenommenen Polyphenole ist unverändert oder als Konjugate im Plasma und Urin nachweisbar (z.B. Hollman *et al.* 1995; Lee *et al.* 1995; Hollmann *et al.* 1997; Manach *et al.* 1998; Donovan *et al.* 1999; Bub *et al.* 2001; Donovan *et al.* 2002; Rechner *et al.* 2002; Frank *et al.* 2003). Bei einer Aufnahme von 10 - 100 mg liegen die maximalen Konzentrationen einzelner Verbindungen im Plasma meist unter 1 µM (Scalbert & Williamson 2000). Dies ist vermutlich weniger auf eine geringe Absorptionsrate als vielmehr auf die extensive Metabolisierung zurückzuführen (Rechner *et al.* 2002). Auch eine rasche Anreicherung in verschiedenen Geweben ist denkbar (Bertelli *et al.* 1996; Bub *et al.* 2001).

Neben der chemischen Struktur können andere Lebensmittelkomponenten wie Ballaststoffe, Proteine oder Alkohol das Ausmaß und die Kinetik der Absorption von Polyphenolen beeinflussen (Serafini *et al.* 1997; Manach *et al.* 1998; Scalbert & Williamson 2000; Goldberg *et al.* 2003). Auch die Kombination verschiedener Polyphenole und Vitamine könnte die Absorptionsrate der einzelnen Verbindungen verändern (Boyle *et al.* 2000b). Darüber hinaus wurde in vielen Studien eine hohe interindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik beobachtet (Aziz *et al.* 1998; Boyle *et al.* 2000a; Boyle *et al.* 2000b; Bub *et al.* 2001; de Vries *et al.* 2001; Rechner *et al.* 2002; Frank *et al.* 2003).

2.2.4 Antioxidative Wirkungen

Polyphenole zeigen *in vitro* antioxidative Wirkungen, die auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Sie können Elektronen übertragen und damit andere Substanzen reduzieren, sind aber auch in der Lage, freie Radikale abzufangen. Dabei entstehende phenolische Radikale werden durch das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisiert, so dass sie nicht weiter mit anderen Verbindungen reagieren und damit die Radikalkettenreaktion unterbrechen. Mit Metallionen können Polyphenole katalytisch inaktive Chelatkomplexe bilden, was die Initiation von Radikalkettenreaktionen verhindert (Rice-Evans *et al.* 1996; Cao *et al.* 1997; de Groot & Rauen 1998). Außerdem können Polyphenole andere Antioxidantien wie Vitamin C oder

Vitamin E vor Oxidation schützen bzw. bereits oxidierte Moleküle regenerieren (Rice-Evans *et al.* 1996; Carbonneau *et al.* 1997; de Groot & Rauen 1998; Middleton *et al.* 2000).

Neben diesen direkten antioxidativen Wirkungen können sie verschiedene Enzyme inhibieren, die im Körper zur Freisetzung von ROS führen. Beispiele hierfür sind die Cyclooxygenase, die Lipoxygenase und die Xanthinoxidase (Takahama 1985; de Groot & Rauen 1998; Middleton *et al.* 2000). Darüber hinaus sind verschiedene phenolische Verbindungen in der Lage, die Produktion von ROS durch phagozytierende Zellen zu modulieren (Limasset *et al.* 1993; Robak & Gryglewski 1996; Middleton *et al.* 2000) und damit die zellvermittelte LDL-Oxidation zu inhibieren (de Whalley *et al.* 1990; Aviram & Fuhrman 1998).

Die antioxidative Aktivität verschiedener Phenolsäuren und Flavonoide *in vitro* ist vor allem von der Anzahl und der Lokalisation der Hydroxylsubstituenten und Doppelbindungen im Molekül abhängig. Glykosylierungen und Esterbindungen können die antioxidative Wirkung steigern oder inhibieren. Die antioxidative Aktivität der einzelnen Polyphenole ist häufig höher als die von Ascorbinsäure, α -Tocopherol oder körpereigenen Antioxidantien wie Urat und Albumin (Rice-Evans *et al.* 1996; Cao *et al.* 1997; Kähkönen & Heinonen 2003).

Eine Reihe von Interventionsstudien zeigt, dass polyphenonreiche Lebensmittel, z.B. grüner und schwarzer Tee (Serafini *et al.* 1996), Zwiebeln (Boyle *et al.* 2000b), Fruchtsäfte (Day *et al.* 1997; Arendt *et al.* 2001; Bub *et al.* 2003) oder Rotwein (Kap. 2.3.4) auch *in vivo* antioxidativ wirken können. Auf Grund der raschen und umfangreichen Metabolisierung im Körper scheinen dafür vor allem die Metabolite der aufgenommenen Polyphenole verantwortlich zu sein (Manach *et al.* 1998; Scalbert & Williamson 2000; Goldberg *et al.* 2003).

Für verschiedene Polyphenole wurden *in vitro* allerdings auch prooxidative Effekte nachgewiesen. Diese traten vor allem bei hohen Konzentrationen und/oder in Gegenwart katalytisch aktiver Metallionen wie Cu^{2+} und Fe^{2+} auf (Cao *et al.* 1997; Kähkönen & Heinonen 2003). Da Polyphenole im menschlichen Körper meist Konzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ aufweisen (Scalbert & Williamson 2000) und Metallionen in sequestrierter Form vorliegen (Cao *et al.* 1997), dürften die prooxidativen Wirkungen *in vivo* kaum von Bedeutung sein (Cao *et al.* 1997; Duthie *et al.* 1997a; Duthie *et al.* 1997b; Johnson & Loo 2000; Middleton *et al.* 2000).

2.2.5 Weitere Wirkungen von Polyphenolen

Polyphenole üben neben ihrer antioxidativen Aktivität weitere biochemische und pharmakologische Wirkungen aus. Dazu zählen antiinflammatorische, antiallergische, antivirale, antithrombotische, kardioprotektive und antikarzinogene Effekte. Eine Übersicht über den Stand der Forschung liefern z.B. (Watzl & Leitzmann 1995; Robak & Gryglewski 1996; Rice-Evans & Packer 1998; Middleton *et al.* 2000; Hollmann 2001).

Neben potentiell gesundheitsfördernden Wirkungen zeigen verschiedene Phenolsäuren und Flavonoide, besonders Quercetin, *in vitro* allerdings auch zytotoxische, mutagene und karzinogene Eigenschaften (Middleton & Kandaswami 1992; Sahu & Gray 1993; Sahu & Gray 1994; Breinholt & Dragsted 1998; Skibola & Smith 2000), die möglicherweise auf prooxidative Wirkungen der Polyphenole zurückzuführen sind (Duthie *et al.* 1997b; de Groot & Rauen 1998; Johnson & Loo 2000; Szeto & Benzie 2002). In Tierversuchen wurde aber bis auf wenige Ausnahmen selbst bei hohen Dosierungen kein erhöhtes Auftreten von Neoplasien beobachtet (Übersicht bei Stavric 1984; Formica & Regelson 1995; Middleton *et al.* 2000).

2.2.6 Die Bedeutung von Polyphenolen für die menschliche Gesundheit

Die Bedeutung von Polyphenolen für die menschliche Gesundheit ist bislang unklar. Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die biologischen Wirkungen von Polyphenolen *in vivo* zu, da sie meist mit Aglykonen durchgeführt werden, die im Plasma nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar sind (Hollmann 2001; Goldberg *et al.* 2003). Epidemiologische Studien deuten zwar darauf hin, dass der Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel negativ mit dem Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, bestimmte Tumorarten und anderen chronischen Krankheiten assoziiert ist (z.B. Hertog *et al.* 1995; Keli *et al.* 1996; Hertog *et al.* 1997; Commenges *et al.* 2000; Le Marchand *et al.* 2000; Shaheen *et al.* 2001; Knekt *et al.* 2002; Übersichtsartikel bei Blot *et al.* 1996; Hertog 1996; Adlercreutz & Mazur 1997; Hollmann 2001). Kontrollierte, langfristige, prospektive Interventionsstudien am Menschen, die kausale Zusammenhänge bestätigen könnten, liegen bisher aber nicht vor. Trotzdem werden Polyphenole, insbesondere Flavonoide und polyphenolreiche Pflanzenextrakte bereits als frei verkäufliche Nahrungsergänzungsmittel angeboten (Skibola & Smith 2000). Die Meinungen über den gesundheitlichen Nutzen und die Unbedenklichkeit solcher Präparate gehen weit auseinander. So bezeichnen (Middleton *et al.* 2000) Flavonoide als „remarkably safe nutrients with a wide range of biochemical and

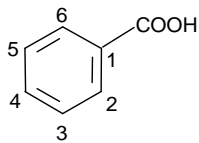
pharmacologic activities that strongly suggest their possible role as health-promoting, disease-preventing dietary supplements“. Andere Autor/inn/en warnen dagegen ausdrücklich vor einer exzessiven Zufuhr von Flavonoiden (Skibola & Smith 2000), da die postulierten therapeutischen Effekte nicht ausreichend belegt seien und da zum anderen nicht hinreichend geklärt ist, ob und bei welchen Aufnahmemengen genotoxische und zytotoxische Effekte von Polyphenolen *in vivo* auftreten können (Skibola & Smith 2000; Ferguson 2001).

2.3 Rotwein als polyphenolreiches Lebensmittel

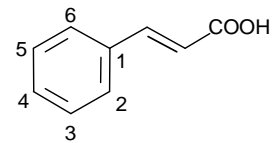
Ein besonderes Forschungsinteresse unter den polyphenolreichen Lebensmitteln gilt dem Rotwein, da dieser nicht nur einen hohen Gesamtphenolgehalt, sondern auch ein breites Spektrum an phenolischen Inhaltsstoffen aufweist (Soleas *et al.* 1997a; Waterhouse & Teissedre 1997; Mattivi *et al.* 2002). Polyphenole werden in Weinstock und Reben synthetisiert, um Insekten für die Bestäubung anzulocken oder die Pflanze vor UV-Strahlung, Krankheiten und Fraßinsekten zu schützen (Burns *et al.*). Im Wein sind sie für Farbe, Geschmack und Haltbarkeit verantwortlich (Waterhouse 2002). Darüber hinaus werden protektive Wirkungen der Rotweinpolyphenole auf die menschliche Gesundheit diskutiert (Kap. 2.2.6).

2.3.1 Polyphenole im Rotwein

Rotwein enthält über 200 verschiedene phenolische Säuren, Flavonoide und Stilbene (German & Walzem 2000). Die wichtigsten Verbindungen sind in Abb. 3 dargestellt. Rotwein ist weitaus komplexer zusammengesetzt als Traubensaft, da ein Teil der phenolischen Inhaltsstoffe erst bei der Fermentation im leicht sauren alkoholischen Milieu aus Schalen, Stielen und Kernen extrahiert wird (Brouillard *et al.* 1997; Di Stefano 1999). Andere entstehen durch den Hefestoffwechsel oder säurekatalysierte Reaktionen (Waterhouse & Teissedre 1997; Di Stefano 1999). Auch Weißwein enthält nur etwa 1/10 so viele Polyphenole wie Rotwein (Frankel *et al.* 1995; Lamuela-Raventós & de la Torre-Boronat 1999), da bei der Herstellung nur der Traubensaft vergoren wird und damit eine Extraktion phenolischer Komponenten aus Schalen, Kernen und Stielen nicht möglich ist (Brouillard *et al.* 1997; Waterhouse 2002).

**Hydroxybenzoesäuren**

Salicylsäure	2: -OH
2,3-Dihydroxybenzoesäure	2, 3: -OH
Gentisinsäure	2, 5: -OH
4-Hydroxybenzoesäure	4: -OH
Protocatechussäure	3, 4: -OH
Vanillinsäure	3: -OCH ₃ , 4: -OH
Gallussäure	3, 4, 5: -OH

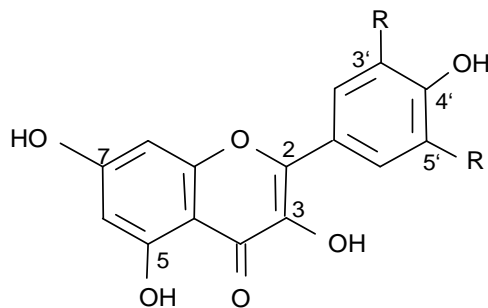
**Hydroxyzimtsäuren**

p-Cumarsäure	4: -OH
Kaffeesäure	3, 4: -OH
Ferulasäure	3: -OCH ₃ , 4: -OH

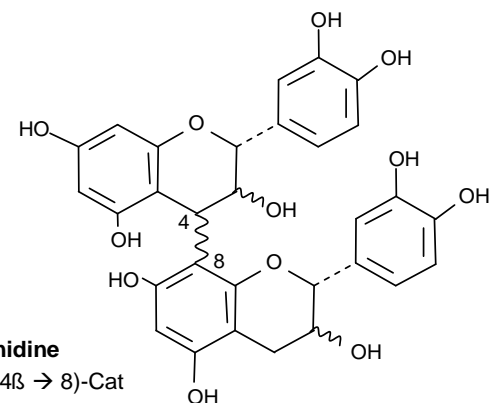
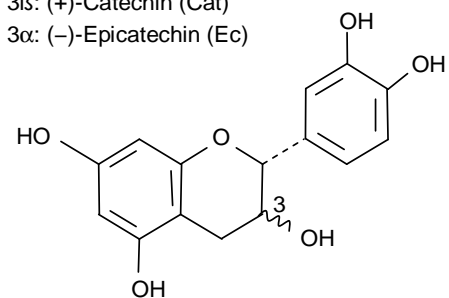
Flavonole

3β: (+)-Catechin (Cat)

3α: (-)-Epicatechin (Ec)

**Flavonole**

Kämpferol:	R ₃ , R ₅ : -H
Quercetin:	R ₃ : -OH, R ₅ : -H
Myricetin:	R ₃ , R ₅ : -OH
Isorhamnetin:	R ₃ : -OCH ₃ , R ₅ : -H

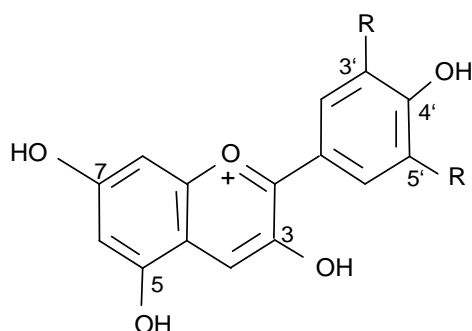
**Procyanidine**

B1: Ec-(4β → 8)-Cat

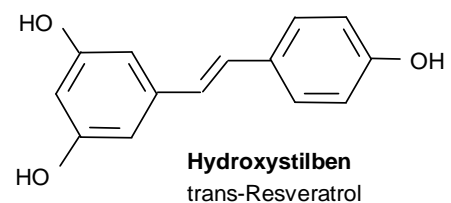
B2: Ec-(4β → 8)-Ec

B3: Cat-(4α → 8)-Cat

B4: Cat-(4α → 8)-Ec

**Anthocyanidine**

Cyanidin:	R ₃ : -OH, R ₅ : -H
Delphinidin:	R ₃ , R ₅ : -OH
Peonidin:	R ₃ : -OCH ₃ , R ₅ : -H
Petunidin:	R ₃ : -OCH ₃ , R ₅ : -OH
Malvidin:	R ₃ , R ₅ : -OCH ₃

**Abb. 3: Strukturformeln im Wein nachgewiesener Polyphenole (nach Böhm 2000)**

Flavanole sind die mengenmäßig wichtigsten Polyphenole im Rotwein (Frankel *et al.* 1995; Waterhouse & Teissedre 1997; Mattivi *et al.* 2002; Waterhouse 2002). Sie liegen als Monomere (Catechin, Epicatechin), Oligomere (Procyanidine) oder Polymere (kondensierte Tannine) vor (Waterhouse & Teissedre 1997; Waterhouse 2002). Epicatechin ist teilweise mit Gallussäure verestert (Waterhouse 2002). Flavanole werden bei der Maischegärung zum größten Teil aus Kernen und Schalen extrahiert (Brouillard *et al.* 1997; Waterhouse 2002), sind aber auch im Fruchtfleisch zu finden (Di Stefano 1999).

Anthocyane sind für die rote Farbe von Trauben und Rotwein verantwortlich. Einfache Glucoside von Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin und Malvidin finden sich hauptsächlich in der Schale der Trauben und werden im Laufe der Maischegärung extrahiert (Brouillard *et al.* 1997; Mattivi *et al.* 2002). Malvidin-3-glucosid (Oenin) ist das wichtigste Pigment in Trauben von *Vitis vinifera* (Brouillard *et al.* 1997; Waterhouse & Teissedre 1997). Bei der Alterung des Weins können Anthocyane polymerisieren oder mit anderen monomeren Phenolen stabilere Pigmente bilden (Brouillard *et al.* 1997; Waterhouse & Teissedre 1997; Waterhouse 2002).

Flavonole werden in der Traubenschale zum Schutz vor UV-Strahlung gebildet (Waterhouse & Teissedre 1997; Goldberg *et al.* 1998b; Di Stefano 1999). Sie liegen in Weintrauben als Glykoside vor, aus denen durch Säurehydrolyse im Wein die Aglykone freigesetzt werden (Teissedre *et al.* 1995; Waterhouse 2002).

Phenolische Säuren sind hauptsächlich in Vakuolen der Traubenzelle enthalten und werden bei der Safftherstellung leicht freigesetzt (Soleas *et al.* 1997a; Di Stefano 1999). Daher sind sie auch in Weißwein und Traubensaft enthalten, wo sie den größten Teil der phenolischen Verbindungen ausmachen (Frankel *et al.* 1995; Lamuela-Raventós & de la Torre-Boronat 1999). Hydroxyzimtsäuren sind in der Traube meist mit Tartrat verestert. Die wichtigste Verbindung ist die Caftarsäure (Tartratester der Kaffeesäure) (Waterhouse 2002). Im Wein werden die Ester hydrolysiert, so dass die Säuren in freier Form vorliegen (Waterhouse 2002). Gallussäure, eine Hydroxybenzoesäure, wird aus den Kernen, der Schale und bei der Lagerung des Weins in Eichenfässern aus dem Holz extrahiert (Frankel *et al.* 1995; Mattivi & Nicolini 1997; Di Stefano 1999; Waterhouse 2002).

Stilbene werden von der Pflanze als Reaktion auf Pilzinfektionen, UV-Licht, Ozon und Verletzungen synthetisiert (Goldberg *et al.* 1995; Bavaresco *et al.* 1999). Der Hauptvertreter

Resveratrol liegt in der Traubenschale als Glucosid vor. Bei der Gärung wird freies Resveratrol gebildet (Bavaresco *et al.* 1999).

Der Gesamtphenolgehalt sowie der mengenmäßige Anteil der einzelnen Polyphenole im Rotwein ist sortenabhängig, wird aber auch durch Anbaubedingungen (Boden, Klima) und kellereitechnische Maßnahmen (z.B. Fermentationsdauer und -temperatur, Ethanol- und SO₂-Konzentration, pH-Wert, Hefestamm, Eichenfass) beeinflusst (Teissedre *et al.* 1995; Goldberg *et al.* 1996; Goldberg *et al.* 1998a; Goldberg *et al.* 1998b; Di Stefano 1999; Arts *et al.* 2000b). Tab. 1 zeigt den Gehalt an Polyphenolen in Rotwein im Vergleich zu Weißwein, rotem und weißem Traubensaft.

Tab. 1: Polyphenolgehalte von Rotwein, Weißwein, rotem und weißem Traubensaft

Polyphenole	Konzentration [mg/L]			
	Rotwein ^a	Weißwein ^a	Traubensaft rot ^c	Traubensaft weiß ^c
Flavonoide				
Flavonole	10 – 203	Spuren	52,9 – 60,4	5,7 – 8,6
Quercetin	5 – 53	0		
Flavanole	48 – 440	15 – 30	33,1 – 51,6	10,7 – 40,3
Catechin	27 – 191	3 – 35		
Epicatechin	21,4 – 128	2 – 21		
Procyanidin	29 – 333	5 – 10		
Anthocyane	20 – 500	0	318,2 – 443,7	n.n.
Cyanidin-3-glucosid	2,8 – 38	0		
Malvidin-3-glucosid	24 – 170	0		
Phenolische Säuren				
Hydroxybenzoesäuren	0 – 260	0 – 100	24,1 – 34,3	3,2 – 4,0
Gallussäure				
Hydroxymitsäuren	62 – 334	130 – 154	165,1 – 203,9	22,5 – 38,0
Kaffeesäure	3 – 18	2,8		
Ferulasäure	19	0,3 – 3,2 ^b		
p-Cumarsäure	7,5 – 22	1 – 2		
Stilbene				
trans-Resveratrol	0,1 – 2,3	0,003 – 2,0	0,1 ^d	n.n. ^d

a: (German & Walzem 2000), die Werte stammen aus verschiedenen Literaturangaben; b: (Pour Nikfardjam 2001); c: (Frankel *et al.* 1998); d: (Pour Nikfardjam *et al.* 2000); bei leeren Feldern keine Angaben vorhanden.

2.3.2 Aufnahme und Bioverfügbarkeit von Rotweinpolyphenolen

Rotwein stellt neben Obst und Gemüse, Fruchtsäften, Kaffee und Tee eine der Hauptquellen für Polyphenole in der menschlichen Ernährung dar (Hertog *et al.* 1995; Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998; Scalbert & Williamson 2000), wobei der Beitrag der einzelnen Lebensmittel stark von den regionalen Verzehrsgewohnheiten abhängt (Hertog *et al.* 1995). In Deutschland ist Rotwein vor allem für die Zufuhr von Catechin, Epicatechin, Proanthocyanidinen (Linseisen *et al.* 1997) und Gallussäure (Radtke *et al.* 1998) von Bedeutung.

Die ernährungsphysiologische Relevanz der Rotweinpolyphenole ist von deren Bioverfügbarkeit abhängig. In Tab. 2 sind Humanstudien zusammengefasst, in denen die Konzentrationen von phenolischen Säuren, Catechin und Anthocyanen in Plasma und Urin nach dem einmaligen Verzehr von Rotwein untersucht wurden.

Die Daten zeigen, dass Polyphenole aus Rotwein vom Menschen rasch absorbiert werden. Innerhalb einer Stunde nach dem Konsum waren erhöhte Plasmaspiegel von phenolischen Säuren (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000; Simonetti *et al.* 2001), Catechin (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000) und verschiedenen Anthocyanen (Bub *et al.* 2001; Frank *et al.* 2003) messbar. Maximale Konzentrationen wurden nach 60 – 240 min erreicht. Catechin und dessen Hauptmetabolit 3'-O-Methylcatechin lagen zu mehr als 98 % als Glucuronsäuren und/oder Sulfate im Plasma vor (Donovan *et al.* 1999), während Anthocyane unverändert als Glucoside in Plasma und Urin zu finden waren (Bub *et al.* 2001; Frank *et al.* 2003). Kaffeesäure wurde sowohl in methylierter Form (Ferulasäure) als auch unverändert nachgewiesen (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000; Simonetti *et al.* 2001), während Gallussäure sofort nach der Absorption zu 4-O-Methylgallussäure umgewandelt wurde (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000). Aussagen zum Grad der Konjugation waren hier nicht möglich, da die phenolischen Säuren erst nach saurer bzw. enzymatischer Hydrolyse bestimmt wurden. Die maximalen Konzentrationen im Plasma lagen für alle untersuchten Verbindungen im nM-Bereich.

Tab. 2: Humanstudien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen aus Rotwein

Polyphenol	Dosis	Quelle	Plasma		Urin	Referenz
			t _{max} [min]	C _{max} [nM]	[%] ^a	
Kaffeensäure	0,9 mg	100 mL RW	60	6,6		(Simonetti <i>et al.</i> 2001)
	1,8 mg	200 mL RW	60	17,9		
	2,7 mg	300 mL RW	60	27,2		
Kaffeensäure	11,0 mg/L	5 mL/kg KG RW	120	84		(Abu-Amsha Caccetta <i>et al.</i> 2000)
		5 mL/kg KG ERW	60	91		
Gallussäure	9,5 mg/L	5 mL/kg KG RW	120	176 ^c		
		5 mL/kg KG ERW	240	184 ^c		
Protocatechussäure	1,6 mg/L	5 mL/kg KG RW	–	n.s.		
		5 mL/kg KG ERW	–	n.s.		
Catechin	35 mg	120 mL RW			3,0 – 10,3	(Donovan <i>et al.</i> 2002)
		120 mL ERW			2,1 – 8,2 (8 h)	
Catechin	35 mg	120 mL RW	86	78		(Bell <i>et al.</i> 2000)
		120 mL ERW	86	75		
Catechin	35 mg	120 mL RW	60	91		(Donovan <i>et al.</i> 1999)
		120 mL ERW		81		
Cyanidin-3-G	2,4 mg	400 mL RW	–	n.n.	0,06 (7 h)	(Frank <i>et al.</i> 2003)
Delphin-3-G	38,2 mg		–	n.n.	0,12 (7 h)	
Malvidin-3-G	184,6 mg		90	38	0,11 (7 h)	
Peonidin-3-G	18,0 mg		90	27	0,84 (7 h)	
Petunidin-3-G	36,4 mg		90	24	0,18 (7 h)	
Malvidin-3-G	68 mg	500 mL RW	50	1,4	< 0,03	(Bub <i>et al.</i> 2001)
	58 mg	500 mL ERW	90	1,5 ^b	(6 h)	
Anthocyane	218 mg	300 mL RW			1,5 – 5,1 (12 h)	(Lapidot <i>et al.</i> 1998)

Delphin: Delphinidin; G: Glucosid; RW: Rotwein; ERW: entalkoholisierter Rotwein; KG: Körpergewicht; a: Ausscheidung in % der aufgenommenen Menge; b: aus der Abbildung geschätzt; c: gemessen als 4-O-Methylgallussäure; n.s.: keine statistisch signifikante Veränderung; n.n.: nicht nachweisbar, unterhalb der Nachweisgrenze

Nach der Absorption werden Rotweinpolyphenole rasch metabolisiert und ausgeschieden. Kaffeensäure war bereits 2 – 4 h nach dem Verzehr von 1 – 2 Gläsern Rotwein nicht mehr im Plasma nachweisbar (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000; Simonetti *et al.* 2001), während die Konzentration von 4-O-Methylgallussäure zu diesem Zeitpunkt noch deutlich erhöht war (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000). Die Halbwertszeit der Elimination für Catechin

aus nativem Rotwein lag bei 3,2 h, bei entalkoholisierem Rotwein betrug sie etwa 4 h (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000). Die höchsten Konzentrationen von Anthocyanen im Urin wurden zwischen 30 min und 6 h nach dem Verzehr gemessen (Lapidot *et al.* 1998; Bub *et al.* 2001; Frank *et al.* 2003).

Trotz der kurzen Eliminationszeit scheint die wiederholte Aufnahme von Rotwein zu einer Akkumulation der Polyphenole im Körper zu führen. So konnten (de Vries *et al.* 2001) bei gesunden Männern und einem Konsum von 750 mL Rotwein täglich nach 4 Tagen einen Anstieg der Quercetin- und Isorhamnetinkonzentration im Nüchternplasma messen. Die Exkretion von 4-O-Methylgallussäure und Ferulasäure im Urin war nach 2 Wochen täglichen Konsums von 375 mL Rotwein bzw. 500 mL entalkoholisierem Rotwein erhöht (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001).

Die Bioverfügbarkeit von Resveratrol aus Rotwein wurde bisher nur bei Ratten untersucht (Bertelli *et al.* 1998). Nach der einmaligen Gabe von 4 mL Rotwein (entsprechend 933 mL bei einem 70 kg schweren Menschen) kam es zu einem raschen Anstieg der Resveratrolkonzentration im Plasma, die Maximalkonzentration nach 1 h lag bei 89 nM. Mit 2 mL Rotwein täglich über einen Zeitraum von 2 Wochen wurden 33 nM erreicht. Zudem reicherte sich Resveratrol in der Leber und den Nieren der Ratten an (Bertelli *et al.* 1998).

Vergleiche zwischen nativem und entalkoholisierem Rotwein bzw. rotem Traubensaft zeigen, dass Ethanol einerseits die Absorption von Malvidin-3-glucosid (Bub *et al.* 2001), andererseits die Elimination von Catechin aus dem Plasma (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000) und die Ausscheidung über die Niere (Donovan *et al.* 2002) beschleunigt. Die Bioverfügbarkeit, berechnet als Fläche unter der Kurve für die Konzentration im Plasma (AUC), wurde dadurch jedoch nicht verändert (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000; Bub *et al.* 2001). Bei (Frank *et al.* 2003) wurden Anthocyane aus Rotwein hingegen nicht nur langsamer, sondern auch in geringerem Umfang absorbiert als aus rotem Traubensaft. Entgegen früheren Annahmen (Ruf *et al.* 1995; Miyagi *et al.* 1997; Serafini *et al.* 1997; Soleas *et al.* 1997a; Duthie *et al.* 1998; Serafini *et al.* 2000) scheinen Polyphenole aus Rotwein damit nicht besser bioverfügbar zu sein als solche aus anderen Lebensmitteln (de Vries *et al.* 2001; Goldberg *et al.* 2003).

2.3.3 Antioxidative Wirkungen von Rotwein *in vitro*

Rotweinpolyphenole als Reinsubstanzen besitzen *in vitro* vielfältige antioxidative Wirkungen (Kap. 2.2.4). Auch Rotwein und Rotweinextrakte können die Kupfer (Cu)- oder Radikal-induzierte Oxidation von LDL (Frankel *et al.* 1993; Kanner *et al.* 1994; Frankel *et al.* 1995; Abu-Amsha *et al.* 1996; Kerry & Abbey 1997; Miyagi *et al.* 1997; Ghiselli *et al.* 1998; Frémont *et al.* 1999; Serafini *et al.* 2000) und Lipiden (Kanner *et al.* 1994) inhibieren. (Rifici *et al.* 1999) konnten Schutzwirkungen gegenüber zellvermittelter LDL-Oxidation nachweisen. Auch die Oxidation von Serumkomponenten durch Superoxidradikale (Durak *et al.* 1999a) und Kupferionen (Abu-Amsha *et al.* 1996) wird durch Rotwein verzögert. Weiterhin sind Rotwein und Rotweinextrakte in der Lage, freie Radikale in wässrigen Systemen abzufangen (Rice-Evans *et al.* 1996; Rechner *et al.* 1997; Soleas *et al.* 1997b; Henn & Stehle 1998; Tubaro *et al.* 1999; Burns *et al.* 2000; Serafini *et al.* 2000) und Eisenionen zu reduzieren (Jamroz & Beltowski 2001). (Lodovici *et al.* 2001) konnten zeigen, dass Rotweinextrakte isolierte DNA aus Heringssperma vor Basenoxidation schützen, wobei sowohl Radikalscavenging als auch Metallchelatierung durch Polyphenole eine Rolle spielen.

Die antioxidative Aktivität von Rotwein und Rotweinextrakten korreliert stark mit dem Gesamtphenolgehalt (Frankel *et al.* 1995; Abu-Amsha *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.* 1996; Rechner *et al.* 1997; Soleas *et al.* 1997b; Henn & Stehle 1998; Burns *et al.* 2000; Serafini *et al.* 2000). Der Stellenwert der einzelnen Polyphenolklassen wird allerdings kontrovers diskutiert (Frankel *et al.* 1995; Vinson & Hontz 1995; Abu-Amsha *et al.* 1996; Rice-Evans *et al.* 1996; Kerry & Abbey 1997; Miyagi *et al.* 1997; Soleas *et al.* 1997b; Tubaro *et al.* 1999; Rigo *et al.* 2000; Lodovici *et al.* 2001). Da Rotwein als gesamtes Lebensmittel eine höhere antioxidative Kapazität aufweist als die Summe der einzelnen Komponenten (Rice-Evans *et al.* 1996), sind synergistische Effekte wahrscheinlich (Kanner *et al.* 1994; Rice-Evans *et al.* 1996; Roig *et al.* 2002). Weißwein und Traubensaft weisen wegen ihres geringeren Polyphenolgehaltes auch eine wesentlich geringere antioxidative Aktivität auf (Kanner *et al.* 1994; Frankel *et al.* 1995; Abu-Amsha *et al.* 1996; Miyagi *et al.* 1997; Rechner *et al.* 1997; Henn & Stehle 1998; Tubaro *et al.* 1999; Serafini *et al.* 2000).

Alkohol scheint hingegen für die antioxidative Wirkung *in vitro* nur eine geringe Rolle zu spielen, da auch entalkoholisierter Rotwein und Rotweinextrakte (Kanner *et al.* 1994; Vinson & Hontz 1995; Kerry & Abbey 1997; Frémont *et al.* 1999; Serafini *et al.* 2000; Lodovici *et al.* 2001) antioxidative Kapazität besitzen. Zudem zeigt Ethanol mit Ausnahme von zwei

Studien, die widersprüchliche Ergebnisse liefern (Schutz zellulärer DNA vor H₂O₂-induzierten Schäden (Fenech *et al.* 1997) bzw. prooxidative Wirkung auf die Cu-induzierte LDL-Oxidation (van Golde *et al.* 1999)), *in vitro* weder anti- noch prooxidative Effekte (Abu-Amscha *et al.* 1996; Kerry & Abbey 1997; Miyagi *et al.* 1997; Durak *et al.* 1999a; Rifici *et al.* 1999; Jamroz & Beltowski 2001; Rifici *et al.* 2002).

2.3.4 Antioxidative Wirkungen von Rotwein *in vivo*

2.3.4.1 Akute Effekte nach einmaligem Verzehr

Studien zur akuten antioxidativen Wirkung von Rotwein zeigen weitgehend übereinstimmende Ergebnisse. So verringerte der einmalige Verzehr von 100 bis 300 mL Rotwein die Cu-induzierte LDL-Oxidation *ex vivo* (Miyagi *et al.* 1997), während die antioxidative Aktivität im Plasma bzw. im Serum der Probanden anstieg (Whitehead *et al.* 1995; Duthie *et al.* 1998; Simonetti *et al.* 2001). (Maxwell *et al.* 1994) und (Öztürk *et al.* 1999) erzielten ähnliche Ergebnisse mit einer Dosis von 5,7 mg/kg bzw. 5,0 mL/kg Körpergewicht (KG). (Cao *et al.* 1998) und (Serafini *et al.* 1998; 2000) konnten eine erhöhte antioxidative Aktivität im Plasma auch nach dem Verzehr von 300 mL entalkoholisierendem Rotwein feststellen.

Darüber hinaus konnten 300 – 400 mL Rotwein, die zu einer fettreichen Mahlzeit getrunken wurden, postprandialen oxidativen Stress (Bildung von Lipidhydroperoxiden, Verbrauch von Vitamin C und α -Tocopherol, verminderte antioxidative Kapazität im Plasma oder erhöhte LDL-Oxidation) sowohl bei gesunden Männern (Ursini *et al.* 1998; Natella *et al.* 2001) als auch bei Diabetikern (Ceriello *et al.* 2001) verhindern.

Eine Ausnahme bildet die Studie von (Abu-Amscha Caccetta *et al.* 2000), bei der der Verzehr von Rotwein (5 mL/kg KG) mit und ohne Alkohol die Cu-induzierte LDL- und Serumoxidation nicht veränderte, obwohl erhöhte Konzentrationen von Kaffeesäure, 4-O-Methylgallussäure und Urat im Plasma gemessen wurden. Die Autor/innen führen dies auf eine zu geringe Konzentration der Rotweinpolyphenole im Plasma zurück.

Sowohl Rotwein als auch entalkoholisierter Rotwein zeigten *in vivo* nur vorübergehende antioxidative Effekte. Diese traten 30 – 180 min nach dem Verzehr ein, Maximalwerte wurden zwischen 30 und 120 min gemessen. Bereits nach 1 – 4 h waren keine signifikanten Unterschiede zu den Ausgangswerten mehr messbar (Maxwell *et al.* 1994; Cao *et al.* 1998; Duthie *et al.* 1998; Serafini *et al.* 1998; Öztürk *et al.* 1999; Natella *et al.* 2001;

Simonetti *et al.* 2001). Der zeitliche Verlauf scheint nach (Simonetti *et al.* 2001) vor allem von der aufgenommenen Menge abhängig zu sein.

Der zeitgleiche Anstieg von antioxidativem Potential und der Konzentration phenolischer Verbindungen im Plasma (Duthie *et al.* 1998; Serafini *et al.* 1998; Simonetti *et al.* 2001) deutet auf eine Veränderung des antioxidativen Potentials durch die Absorption der Rotweinpolyphenole hin. Bioverfügbarkeitsstudien zeigen ebenfalls einen Konzentrationsanstieg verschiedener Polyphenole im Plasma in einem ähnlichen Zeitraum (Kap. 2.3.2). (Day & Stansbie 1995) sowie (Maxwell & Thorpe 2000) weisen jedoch darauf hin, dass Rotwein auch den Uratspiegel im Blut verändern und damit sekundäre antioxidative Wirkungen hervorrufen kann.

2.3.4.2 Antioxidative Wirkungen bei regelmäßiger Aufnahme von Rotwein

Im Gegensatz zu den Studien mit einmaliger Rotwein-Zufuhr, die fast alle eine antioxidative Wirkung nachweisen konnten, führten Langzeitversuche zu kontroversen Ergebnissen.

(Kondo *et al.* 1994) konnten erstmals eine Inhibition der Radikal-induzierten LDL-Oxidation *ex vivo* nach 2 Wochen regelmäßigen Rotweinkonsums nachweisen. Auch bei (Fuhrman *et al.* 1995) wurde die Lipidperoxidation im Plasma und in LDL-Partikeln durch den Verzehr von 400 mL RW täglich gesenkt. Diese Ergebnisse wurden von (Nigdikar *et al.* 1998) bestätigt. Zusätzlich wurden hier Rotweinpolyphenole in Kapseln oder gelöst in Weißwein gegeben, die eine mit Rotwein vergleichbare Wirkung hatten. Auch bei (Chopra *et al.* 2000) verzögerte die Supplementierung von 1 g Rotweinpolyphenolen über 2 Wochen die LDL-Oxidation *ex vivo*. (Leighton *et al.* 1999) kombinierten Rotwein mit mediterraner oder fettreicher Kost. Bei beiden Kostformen führten 240 mL täglich zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität im Plasma und einer Verringerung oxidativer DNA-Schäden in peripheren Leukozyten.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von (Sharpe *et al.* 1995), die nach 10-tägiger Gabe von täglich 200 mL Rotwein keine antioxidativen Wirkungen (LDL-Oxidation, Lipidperoxidation, antioxidative Kapazität im Serum) nachweisen konnten. Auch höhere Dosen von bis zu 4 Gläsern Rotwein täglich über einen Zeitraum von 3 Wochen führten nicht zu einer Veränderung der antioxidativen Kapazität im Serum bzw. im Plasma (van der Gaag *et al.* 2000). Bei (de Rijke *et al.* 1996) wurde alkoholreduzierter Rotwein eingesetzt (550 mL/d, 4 Wochen), der keinen Schutz vor LDL-Oxidation *ex vivo* bot. (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001) erzielten bei Rauchern mit 500 mL entalkoholisierendem Rotwein pro Tag nach

2 Wochen dagegen eine Reduktion von F₂-Isoprostanen (Oxidationsprodukte von Arachidonsäure) im Plasma, während nativer Rotwein mit 13,3 % Alkohol keine Wirkung zeigte. Bei Probanden, die flavonoidarm ernährt wurden, stieg nach (Young *et al.* 2000) die LDL-Oxidation an, ein Traubenschalenextrakt konnte diese oxidativen Veränderungen nicht verhindern. (van Golde *et al.* 1999) stellten sogar prooxidative Effekte nach 2-wöchiger Gabe von täglich 375 mL Rotwein fest.

Auch innerhalb einzelner Studien stimmen die Ergebnisse verschiedener Tests zur Messung antioxidativer Effekte häufig nicht überein. So stieg bei (Carbonneau *et al.* 1997) nach 2-wöchiger Supplementierung von Rotweinpolyphenolen die antioxidative Kapazität im Plasma an, die LDL-Oxidation *ex vivo* blieb jedoch unverändert. Bei (Nigdikar *et al.* 1998) wurde hingegen die Lipidperoxidation durch Rotweinpolyphenole inhibiert, während die antioxidative Kapazität nicht beeinflusst wurde. Die Einnahme von Traubenkernextrakt (110 mg Procyanidine/d über 30 Tage) reduzierte *in vivo* die Bildung von 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG), einem Maß für oxidative DNA-Schäden, in peripheren Lymphozyten, ohne jedoch die Radikalfängerkapazität im Plasma zu erhöhen (Simonetti *et al.* 2002).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten neben antioxidativen Wirkungen auch einen Anstieg phenolischer Säuren (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001) bzw. des Gesamtphenolgehaltes (Fuhrman *et al.* 1995; Nigdikar *et al.* 1998) in Plasma oder LDL nachweisen. Die Autor/inn/en gehen daher davon aus, dass Rotweinpolyphenole direkt für die antioxidativen Effekte verantwortlich sind. (Simonetti *et al.* 2002) führen den von ihnen beobachteten Rückgang der DNA-Oxidation *in vivo* hingegen auf Vitamin E-Späreffekte zurück.

2.3.4.3 Die Bedeutung des Alkohols für die antioxidative Wirkung von Rotwein *in vivo*

Die Bedeutung des Alkohols für die anti- bzw. prooxidative Aktivität von Rotwein *in vivo* ist bisher nicht geklärt. (de Rijke *et al.* 1996) vermuten, dass Alkohol die Absorption von Rotweinpolyphenolen aus dem Darm und damit die antioxidative Wirkung von Rotwein *in vivo* begünstigen könnte. Eine Mehrzahl von Studien deutet jedoch eher auf prooxidative Effekte des Weinalkohols *in vivo* hin (Fuhrman *et al.* 1995; Duthie *et al.* 1998; van Golde *et al.* 1999; van der Gaag *et al.* 2000; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001). Nur bei (Kondo *et al.* 1994) und (Nigdikar *et al.* 1998) wurde die LDL-Oxidation *ex vivo* durch 2-wöchige Interventionen mit 40 bis etwa 60 g Alkohol/d nicht verändert, während (Fenech *et al.* 1997)

sogar Schutzwirkungen von Alkohol gegenüber H₂O₂-induzierten DNA-Schäden vermuten, da gleiche protektive Effekte mit polyphenolreichem Rotwein und polyphenolärmerem Weißwein erreicht wurden.

Vermutlich entscheidet das Verhältnis zwischen dem Alkohol- und dem Polyphenolgehalt eines Rotweins darüber, ob *in vivo* antioxidative, prooxidative oder keine Wirkungen auftreten (van Golde *et al.* 1999; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001). Die kontroversen Ergebnisse der vorliegenden Langzeitstudien sind damit nicht nur durch methodische Unterschiede oder die supplementierten Mengen, sondern auch durch unterschiedliche Zusammensetzung der Weine und Extrakte zu erklären (Nigdikar *et al.* 1998; van Golde *et al.* 1999; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001; Howard *et al.* 2002). Zahlreiche Autor/inn/en fordern daher für künftige Interventionsstudien eine genaue Charakterisierung des Rotweins, um die Aussagekraft zu erhöhen und widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden (Muller & Fuglsang 1997; Waterhouse & Teissedre 1997; Howard *et al.* 2002).

3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob moderate Mengen eines genau charakterisierten Rotweins bei gesunden Männern und Frauen bei einmaligem bzw. regelmäßigem Konsum über mehrere Wochen

- zu einem Anstieg der Polyphenolkonzentration im Plasma führen,
- dadurch der antioxidative Status im Plasma verändert wird und
- periphere Leukozyten vor endogenen sowie exogen durch oxidativen Stress induzierten DNA-Strangbrüchen geschützt werden.

Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob entalkoholisierter Rotwein derselben Charge vergleichbare Wirkungen hat und damit eine alternative Polyphenolquelle zu alkoholhaltigem Rotwein darstellen kann.

4 Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Das vorliegende Projekt gliedert sich in eine Kurzzeit- und eine Langzeitstudie, die von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn geprüft und befürwortet wurden. Die Untersuchungen folgten den Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki, 1989) sowie den EU-Richtlinien der „Good Clinical Practice“. Alle Proband/inn/en gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das Studiendesign war in beiden Fällen kontrolliert, dreiarmlig und monozentrisch. Die Aufteilung in die Gruppen Rotwein (RW), Entalkoholisierter Rotwein (ERW) und Kontrolle (Wasser bzw. kein Studiengetränk) erfolgte randomisiert.

4.1.1 Fallzahlbestimmung

Die Fallzahlbestimmung wurde am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie, Universitätsklinik Bonn, mit Hilfe der Software SAS System berechnet. In der Annahme, dass der intrazelluläre Schutz vor DNA-Strangbrüchen wesentlich von der antioxidativen Kapazität im Plasma abhängt, wurde die Plasma-TEAC als Hauptparameter ausgewählt. Die Fallzahlabeschätzung beruht auf den TEAC-Daten gesunder Proband/inn/en, die in einer zuvor durchgeführten Interventionsstudie bestimmt wurden (Arendt *et al.* 2001).

Kurzzeitstudie

Die mittlere Differenz der TEAC-Werte zwischen zwei Messterminen betrug im Kurzzeitversuch der zu Grunde liegenden Interventionsstudie 0,033mM. Daraus wurde für das vorliegende Projekt eine Fallzahl von 6 Proband/inn/en pro Gruppe (RW, ERW, Kontrolle) berechnet. Hierbei wird eine Änderung der TEAC von mehr als 0,033 mM mit einer Power von mehr als 90 % angezeigt.

Zur statistischen Auswertung mit nichtparametrischen Tests ist eine Fallzahl von $n \geq 7$ erforderlich. Um die Auswertung auch im Fall eines Ausscheidens einzelner Proband/inn/en oder bei Probenverlusten zu gewährleisten, wurde eine Proband/inn/enzahl von 9 Personen pro Gruppe angestrebt.

Langzeitstudie

Die mittlere Standardabweichung für die Differenz der TEAC-Werte zwischen zwei Messterminen betrug in der Langzeitstudie bei (Arendt *et al.* 2001) 0,075 mM. Eine Veränderung um mehr als 0,075 mM wurde als klinisch relevant eingestuft. Eine Proband/inn/enzahl von 25 Personen pro Gruppe (RW, ERW, Kontrolle) kann einen Unterschied in der Veränderung der antioxidativen Kapazität von 0,075 mM mit einer Power von mehr als 90 % zeigen. Auch der Unterschied zwischen zwei Gruppen wird mit einer Power von mehr als 90 % angezeigt. Im Gesamttestverfahren liegt die Power bei 90 %, wenn sich die Wirkung der beiden Studiengetränke RW und ERW von der Kontrollgruppe unterscheidet.

Alle einzelnen Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5 % durchgeführt. Das Gesamttestverfahren hält damit ein Signifikanzniveau von 5 % ein.

4.1.2 Kurzzeitstudie

4.1.2.1 Proband/inn/en

An der Kurzzeitstudie nahmen 27 gesunde Nichtraucher/innen (19 weiblich (w), 8 männlich (m)) zwischen 20 und 50 Jahren teil. Es handelte sich fast ausschließlich um Studierende und Angehörige der Landwirtschaftlichen und der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn, die über Aushänge und einen Aufruf im elektronischen Newsletter der Universität rekrutiert wurden. Der Gesundheitszustand wurde anhand eines Fragebogens (Anhang A) überprüft, der von den Proband/inn/en selbst ausgefüllt und vom einem Arzt der Universitätsklinik Bonn begutachtet wurde.

Ausschlusskriterien waren:

- Schwangerschaft und Stillzeit
- Alter <18 oder >50 Jahre
- Allergien gegen Hühnerei
- Alkoholabusus oder frühere Alkoholabhängigkeit
- Zigarettenkonsum während der vergangenen 6 Monate
- mehr als 10 Stunden Sport pro Woche
- regelmäßige Einnahme von Medikamenten, die die antioxidative Kapazität im Plasma beeinflussen oder durch Interaktion mit Alkohol Nebenwirkungen hervorrufen

- Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (z.B. Multivitaminpräparate, Rotweinkapseln, Bioaktivkonzentrate)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie

Die demographischen Daten des Proband/inn/enkollektivs sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Demographische Daten der Proband/inn/en der Kurzzeitstudie

		Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
Proband/inn/en	n (w / m)	9 (7 / 2)	9 (8 / 1)	9 (6 / 3)
Alter [a]	MW ± SD	27,1 ± 9,0	26,2 ± 3,5	31,4 ± 5,8
	Min – Max	21 – 50	20 – 30	24 – 41
BMI [kg/m²]	MW ± SD	20,8 ± 1,1	21,8 ± 1,9	22,0 ± 2,8
	Min – Max	19,0 – 22,5	18,1 – 24,1	18,9 – 27,0
Sport [h/w]	MW ± SD	3,4 ± 2,9	2,7 ± 3,3	1,9 ± 3,3
	Min – Max	0 – 10	0 – 10	0 – 9

a: Jahre; BMI: Body Mass Index; h/w: Stunden / Woche; n: Anzahl; w: weiblich; m: männlich; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum

4.1.2.2 Durchführung

Die Kurzzeitstudie bestand aus zwei Abschnitten, die mit den gleichen Proband/inn/en und unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Am ersten Teil (A) nahmen nur die Proband/inn/en der Gruppen RW und ERW teil, in Teil B war auch die Kontrollgruppe mit einbezogen. Zwischen Teil A und B lag für die einzelnen Proband/inn/en ein Abstand von mindestens 2 Wochen.

Teil A

Die Proband/inn/en kamen morgens zwischen 7.00 und 8.00 Uhr in die Abteilung für Allgemeine Innere Medizin I der Universitätsklinik Bonn. Ab 20.00 Uhr des Vorabends durfte nur noch Wasser getrunken werden. Am Morgen des Untersuchungstages waren vor der ersten Blutentnahme maximal 400 mL Wasser erlaubt. Sportliche Aktivitäten sollten 12 h vor der ersten Blutentnahme bis zum Ende der Untersuchung vermieden werden. Die erste Blutentnahme erfolgte nüchtern. Unmittelbar danach nahmen die Proband/inn/en je 200 mL RW oder 175 mL ERW zu sich. Weitere Blutentnahmen erfolgten 30, 60, 90 und 120 min nach der Intervention. Unmittelbar nach der 60-min-Blutentnahme durften sich die

Proband/inn/en aus einem Buffet mit polyphenolarmen Lebensmitteln (Weißbrot, Butter, Quark, Joghurt, Käse, Honig, Milch, Früchtetee, Mineralwasser) ein Frühstück zusammenstellen.

Im Plasma wurde die antioxidative Kapazität als Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) gemessen, um abschätzen zu können, ob und zu welchem Zeitpunkt nach dem Konsum von RW bzw. ERW antioxidative Effekte *ex vivo* messbar sind. Zu diesem Zeitpunkt sollten im Teil B weitere antioxidative Parameter gemessen werden, um zu überprüfen, welche Antioxidantien für die Veränderung der TEAC verantwortlich sind und ob die Resistenz peripherer Leukozyten gegenüber oxidativem Stress *in vivo* und *ex vivo* beeinflusst wird.

Um Einflüsse von Polyphenolen aus der Nahrung auszuschließen, wurden die Proband/inn/en gebeten, am Tag vor den Untersuchungen bis zur letzten Blutentnahme auf polyphenolreiche Lebensmittel zu verzichten. Hierzu erhielten sie eine Liste mit polyphenolreichen und -armen Lebensmitteln (Anhang B).

Teil B

Teil B verlief analog zu Teil A. Die Proband/inn/en der Gruppen RW und ERW waren die gleichen wie in Teil A, zusätzlich wurden 9 Kontrollpersonen einbezogen, die 200 mL Mineralwasser tranken. Blutentnahmen fanden vor Aufnahme der Getränke sowie 90 und 360 min danach statt. Zusätzlich zur antioxidativen Kapazität wurden in Teil B der Gesamtphenolgehalt und die Konzentrationen an Vitamin C, Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma sowie DNA-Einzelstrangbrüche in peripheren Leukozyten untersucht. Der Zeitpunkt nach 90 min wurde ausgewählt, da dort im Teil A sowohl bei RW als auch bei ERW die antioxidative Kapazität im Plasma im Vergleich zum Nullwert angestiegen war (Kap. 5.1.2 / Abb. 6). Mit der Blutentnahme nach 360 min sollten evtl. verzögert auftretende antioxidative Effekte erfasst werden.

Zwischen der zweiten und der dritten Blutentnahme durften die Teilnehmer/innen die Klinik verlassen. Bis zum Abschluss der Untersuchungen galten jedoch die gleichen diätetischen Restriktionen wie am Tag vor der Untersuchung.

4.1.3 Langzeitstudie

4.1.3.1 Proband/inn/en

An der Studie nahmen 78 gesunde Nichtraucher/innen (44 w, 34 m) zwischen 20 und 50 Jahren teil. Die Teilnehmer/innen wurden über Aushänge und den elektronischen Newsletter an der Universität Bonn sowie über eine Anzeige in einer lokalen Tageszeitung rekrutiert. Es galten die gleichen Teilnahmebedingungen und Ausschlusskriterien wie in der Kurzzeitstudie (Kap. 4.1.2.1).

Vier Teilnehmer/innen schieden im Verlauf der Langzeitstudie aus. Ein Proband (RW) erschien nicht zur zweiten Blutentnahme, ein weiterer (RW) wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da er angab, im Untersuchungszeitraum mehrmals Zigaretten geraucht zu haben. Je eine Probandin aus Gruppe RW und ERW musste die Studie aus gesundheitlichen Gründen abbrechen. Die demographischen Daten der verbleibenden Proband/inn/en sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Demographische Daten der Proband/inn/en der Langzeitstudie

		Rotwein	Entalkoholisierter Rotwein	Kontrolle
Proband/inn/en	n (w / m)	24 (12 / 12)	25 (15 / 10)	25 (15 / 10)
Alter [a]	MW \pm SD	30,0 \pm 8,3	26,7 \pm 6,4	28,8 \pm 7,1
	Min – Max	20 – 46	20 – 45	20 – 42
BMI [kg/m²]	MW \pm SD	23,5 \pm 3,3	21,9 \pm 2,1	21,4 \pm 2,2
	Min – Max	17,2 – 30,7	18,8 – 26,1	17,8 – 25,5
Sport [h/w]	MW \pm SD	2,2 \pm 2,2	2,0 \pm 2,0	2,9 \pm 2,4
	Min – Max	0 – 6	0 – 6	0 – 8

a: Jahre; BMI: Bodymass Index; h/w: Stunden / Woche; n: Anzahl; w: weiblich; m: männlich; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum

4.1.3.2 Durchführung

Die Langzeitstudie begann mit einer einwöchigen Vorlaufphase, in der noch keine Studiengeränte verzehrt wurden, die diätetischen Restriktionen (Kap. 4.1.3.3) jedoch eingehalten werden sollten. In dieser Phase führten die Teilnehmer/innen ein 7-tägiges Ernährungsprotokoll. Anschließend folgte eine 6-wöchige Interventionsphase, in der die Proband/inn/en täglich je 200 mL RW bzw. 175 mL ERW zusätzlich zu ihrer normalen Kost

zu sich nahmen, während die Proband/inn/en der Kontrollgruppe kein Studiengetränk erhielten. Der Wein sollte etwa 1 h nach dem Abendessen getrunken werden. In den letzten 7 Tagen der Intervention wurde ein zweites Ernährungsprotokoll geführt.

Blutentnahmen wurden zu Beginn und am Ende der Interventionsphase durchgeführt. Die Proband/inn/en kamen morgens zwischen 7.30 und 9.00 Uhr nüchtern in die Abteilung für Allgemeine Innere Medizin I der Universitätsklinik Bonn. Ab 20.00 Uhr des Vorabends durfte nur noch Wasser getrunken werden, am Morgen vor der Blutentnahme waren maximal 400 mL Wasser erlaubt. Zusätzlich sollte 12 h vor der Blutentnahme auf sportliche Aktivitäten verzichtet werden.

4.1.3.3 Diätetische Restriktionen

Die Proband/inn/en sollten ihre normalen Ernährungsgewohnheiten über den ganzen Studienzeitraum beibehalten. Allerdings wurde die tägliche Zufuhr polyphenolhaltiger Getränke auf maximal 2 Tassen (à 150 mL) Kaffee, schwarzen oder grünen Tee sowie auf 2 Gläser Fruchtsaft (à 200 mL) beschränkt. Der Genuss von Multivitamin-, ACE-, Traubensäften und alkoholischen Getränken sowie die Einnahme von Probiotika und Nahrungsergänzungsmitteln waren nicht gestattet. Diese diätetischen Einschränkungen sollten eine Woche vor Studienbeginn bis zum Ende des gesamten Beobachtungszeitraums eingehalten werden.

4.2 Studiengetränke

Für die Studie wurde ein Rotwein der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal (Ahrtal, D) ausgewählt (1999er Marienthaler Klostersgarten, Spätburgunder). Ein Teil des Weines wurde durch Vakuumextraktion entalkoholisiert (Fa. Jung, Rüdesheim, D).

Der native und der entalkoholisierte Rotwein wurden von der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachbereich Weinanalytik und Getränkeforschung, lebensmittelchemisch analysiert (Anhang C). Die einmalige (Kurzzeitstudie) bzw. tägliche (Langzeitstudie) Polyphenolaufnahme aus 200 mL Rotwein bzw. 175 mL entalkoholisiertem Rotwein sowie die antioxidative Kapazität der Getränke sind in Tab. 5 aufgeführt.

Die Kontrollgruppe der Kurzzeitstudie erhielt 200 mL eines natürlichen, mit Kohlensäure versetzten Mineralwassers (Markus Brunnen, Vereinte Mineral- und Heilquellen, Rosbach, D). Zur Zusammensetzung siehe Anhang D.

Tab. 5: Polyphenolgehalt und antioxidative Kapazität einer Einzeldosis Rotwein bzw. entalkoholisierten Rotweins (ERW)

Polyphenole	Rotwein (200 mL)	ERW (175 mL)
Flavonoide	50,4 mg	24,5 mg
davon Catechin	26,5 mg	10,8 mg
Epicatechin	14,4 mg	8,5 mg
Malvidin	8,5 mg	4,7 mg
Peonidin	1,0 mg	0,5 mg
Phenolsäuren	12,4 mg	13,3 mg
davon Gallussäure	8,0 mg	9,4 mg
Kaffeensäure ^a	3,7 mg	3,1 mg
p-Cumarsäure ^b	0,7 mg	0,8 mg
Gesamtphenole^c (CAE)	293,2 mg	271,6 mg
Antioxidative Kapazität (TE)	3,8 mM	2,7 mM

a: aus Caftarinsäure; b: aus p-Cumaroyl-glucosyl-tartrat; c: Folin-Methode; CAE: Catechinäquivalente; TE: Troloxäquivalente

Die Rotweinmenge wurde auf ein Glas (200 mL, 24,2 g Alkohol) festgelegt, um einerseits eine deutliche Erhöhung der Polyphenolzufuhr im Vergleich zur durchschnittlichen diätetischen Aufnahme (Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998) zu erreichen, andererseits aber gesundheitliche Schädigungen durch den enthaltenen Alkohol sowohl bei einmaligem als auch bei regelmäßigem Verzehr über 6 Wochen zu vermeiden (Australian Nutrition Formation 2000; Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000a; United States Department of Agriculture 2000).

Die Aufnahmemenge für entalkoholisierten Rotwein wurde unter der Annahme festgelegt, dass bei der Vakuumextraktion des Rotweins etwa 12 % des Volumens als Alkohol verloren gehen und sich die Konzentration der anderen Komponenten dadurch entsprechend erhöht. 175 mL ERW wären daher äquivalent zu 200 mL nativem Rotwein. Der Polyphenolgehalt wurde jedoch durch die Extraktion verändert. Da eine genaue Analyse der beiden Getränke erst nach Beginn der Studie vorlag, war eine Mengenanpassung nicht mehr möglich.

4.3 Blutentnahme und Probengewinnung

Nach Punktion der Armvene mit einem Butterfly wurde Vollblut in zwei Lithium-Heparin-beschichtete Vakuumentnahmeröhrchen (zur Plasmagewinnung) sowie ein Serumröhrchen ohne Antikoagulans (Vacutainer, Becton-Dickinson, Heidelberg, D) à 6 mL entnommen. Für die weitere Aufarbeitung und Bestimmung wurden die Proben ins Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gebracht.

Eine Plasma- und die Serumprobe wurden sofort nach der Entnahme dunkel in einer Styroporkiste auf Eis gelagert und 30 bis 90 min später für 20 min bei $3\,000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert (Varifuge, Hereaus Instruments, Düsseldorf, D). Das Plasma wurde aufgeteilt und in Eppendorfcaps bei -70 °C (1 200 μL Gesamtphenolgehalt, 500 μL TEAC) bzw. bei -20 °C (500 μL für Albumin, Urat und Bilirubin) eingefroren. Für die Vitamin C-Messung wurden 500 μL Plasma zur Ausfällung der Proteine und zur Stabilisierung der Ascorbinsäure mit 750 μL 5%iger Trichloressigsäure versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 3 min bei $12\,000 \times g$ zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, D). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und bei -70 °C bis zur Analyse eingefroren. Für die α -Tocopherol-Bestimmung wurden 500 μL Serum bei -20 °C eingefroren.

Die Bestimmungen erfolgten innerhalb von 3 Wochen (Gesamtphenolgehalt), einem Monat (Vitamin C), 2 Monaten (Albumin, Urat, Bilirubin und α -Tocopherol) bzw. 4 Monaten (TEAC).

Für die Messung der DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten wurde das zweite Plasmaröhrchen bis zur Durchführung des Tests ca. 60 – 120 min nach der Blutentnahme bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt. Nach (Betti *et al.* 1994) hat eine Lagerung bis zu 24 h unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf das Ergebnis der SCGE.

4.4 Methoden

4.4.1 Erfassung der Polyphenol- und Nährstoffzufuhr

Die Energie-, Alkohol-, Vitamin C- und Polyphenolaufnahme wurde mit Hilfe von Ernährungsprotokollen ermittelt. In der Kurzzeitstudie wurde damit die Einhaltung der polyphenolarmen Diät am Tag vor den Untersuchungen kontrolliert. Dazu wurde ein Ernährungsprotokoll über 24 h geführt. In der Langzeitstudie sollten die Ernährungsgewohnheiten der Proband/inn/en in der Woche vor und in der letzten Woche der Intervention ermittelt werden, um mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen sowie Veränderungen durch die Teilnahme an der Studie, den Weinkonsum oder saisonale Schwankungen zu erfassen. Alle Proband/inn/en erhielten dazu ein standardisiertes Ernährungsprotokoll, in dem polyphenolreiche Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Tee und Fruchtsäfte detailliert aufgelistet waren (Anhang E). Die Protokolle wurden mit der Ernährungssoftware DGE-PC Professional, Version 2.7 (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Bonn, D), ausgewertet, die auf dem Bundeslebensmittelschlüssel (BLS) basiert.

Für die Ermittlung der Phenolsäure- und Flavonoidaufnahme wurde eine eigene Datenbank zusammengestellt (Anhang F). Grundlage war die Polyphenoldatenbank von (Linseisen *et al.* 1997) und (Radtke *et al.* 1998), in der über 100 verschiedene Literaturangaben zum Polyphenolgehalt zusammengefasst sind. Diese wurde für die vorliegende Arbeit durch neuere Daten ergänzt. Die Quercetin- und Kämpferoldaten für Tomatensoße, -suppe, Ketchup und Tomatenpüree stammen aus den Untersuchungsergebnissen von (Stewart *et al.* 2000). Die Catechin- und Epicatechingehalte für Äpfel, rote Weintrauben (Arts *et al.* 2000a) und Schwarztee (Arts *et al.* 2000b) wurden den Arbeiten einer niederländischen Gruppe entnommen, die neben der Sortenvielfalt auch die Verzehr- und Einkaufsgewohnheiten der Verbraucher/innen bei der Auswahl der Proben berücksichtigen.

Bei der Auswertung der Ernährungsprotokolle wurden nur die Phenolsäuren und Flavonoide berücksichtigt, die mengenmäßig den größten Anteil in den verzehrten Lebensmitteln und in den Studiengetränken ausmachen. Als Hauptvertreter der Flavonoide wurden Kämpferol, Quercetin, Myricetin (Flavonole), Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Gallocatechin (Flavanole), Naringenin (Flavanon), Cyanidin, Peonidin, Petunidin und Malvidin (Anthocyanidine) ausgewählt. Aus der Gruppe der Phenolsäuren wurden Salicyl-, p-Hydroxybenzoe-, Gallus-, Syringa- und Ellagsäure (Hydroxybenzoesäuren) sowie p-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure (Hydroxyzimtsäuren) berücksichtigt. Alle Werte wurden als Aglykone in mg/kg bzw. mg/L berechnet.

4.4.2 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes im Plasma

Der Gesamtphenolgehalt im Plasma wurde colorimetrisch bestimmt (Singleton & Rossi 1965). Um eine Störung durch Plasmaproteine zu vermeiden, wurden die Proben mit leichten Modifikationen wie bei (Serafini *et al.* 1998) aufbereitet.

4.4.2.1 Prinzip

Das Verfahren basiert auf der Oxidation phenolischer Hydroxylgruppen durch das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Das Reagenz selbst wird reduziert, wobei ein blauer Molybdän-Wolfram-Komplex entsteht. Die Intensität der blauen Färbung wird anhand der Absorption bei 765 nm photometrisch gemessen. Die Farbreaktion wird proportional zur Konzentration der phenolischen Komponenten in einer Probe verstärkt. Der Gesamtphenolgehalt wird in Catechin-Äquivalenten (mg CAE/L) angegeben.

Bei der Verwendung von Plasmaproben sind vor der Bestimmung mehrere Hydrolyse- und Extraktionsschritte notwendig. Dabei werden zunächst die konjugierten Polyphenole durch Salzsäure hydrolysiert. Dann erfolgen eine Trennung der Polyphenole von den Lipiden und eine Extraktion durch Natriumhydroxid und Methanol. Die Plasmaproteine werden durch meta-Phosphorsäure ausgefällt und mittels Zentrifugation entfernt. Die Polyphenole aus dem Pellet werden mit Aceton extrahiert und die Überstände zusammen analysiert (Serafini *et al.* 1998).

4.4.2.2 Praktische Durchführung

Geräte

- Wasserbad (Kottermann, Ketz-Hansingen, D)
- Zentrifuge 1.0 R (Heraeus Instruments, Düsseldorf, D)
- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, D)
- Inkubator IR 1500 (Bio Flow Technik, Meckenheim, D)
- UV/Vis Spektralphotometer U-2000 (Hitachi, USA)
- Membranfilter Acrodisc[®] 4 mm mit 0,45 µm Nylon Membran (Gelman Laboratory, USA)
- Halbmikroküvetten (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Reagenzien

- **Salzsäure** 1M (Merck, Darmstadt, D)

- **NaOH in 75%igem Methanol** 2M

8 g Natriumhydroxid (Sigma Aldrich, Steinheim, D) wurden in 25 mL *aqua demin.* gelöst und zu 75 mL Methanol (Merck) gegeben.

- **Meta-Phosphorsäure** 2M

100 g meta-Phosphorsäure (40 %) (Merck) wurden in 250 mL *aqua demin.* gelöst.

- **Aceton-Lösung**

Aceton (Roth, Karlsruhe, D) wurde 1:2 (v/v) mit *aqua demin.* verdünnt. Die Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

- **Natriumcarbonat-Lösung** 75 g/L

75 g Na₂CO₃ (Fluka, Buchs, CH) wurden in 1 L *aqua demin.* gelöst und bei 4 °C gelagert.

- **Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung** 1:10

Zu einem Teil Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Fluka) wurden 9 Teile *aqua demin.* gegeben. Die Verdünnung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt und bis zum Einsatz dunkel gelagert.

- **Catechin-Stammlösung** 500 mg/L

23,35 mg Catechinhydrat (entsprechen 23 mg Catechin) (Sigma Aldrich) wurden in 900 µL Ethanol (Merck) gelöst und mit 45,1 mL *aqua demin.* gemischt. Die Stammlösung wurde in Aliquots von 1 200 µL bis zur Analyse bei –20 °C eingefroren.

Analysenansatz

Die Proben wurden bei 22 °C im Wasserbad aufgetaut und 5 min bei 12 000 × g zentrifugiert (Eppendorf). Je 500 µL des Überstandes wurden in ein Röhrchen überführt, in das zuvor 1 mL 1 M HCl vorgelegt wurde. Nach 1 min kräftigem Vortexen der Proben erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurde 1 mL NaOH-Methanol-Lösung zugegeben und für 3 min gevortext. Die Proben wurden erneut bei 37 °C für 30 min in den Inkubator gestellt. Nach Zugabe von 1 mL meta-Phosphorsäure wurden die Proben 3 min gevortext und anschließend für 10 min bei 1 500 × g zentrifugiert (Heraeus Instruments). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde mit 1 mL Aceton-Lösung versetzt, gemischt und für 10 min bei 2 700 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand zusammengegeben, gemischt

und erneut für 3 min bei $2\,700 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde der Überstand der Proben filtriert (Acrodisc[®]).

Jeweils 200 μL der Probe wurden in eine Küvette pipettiert und mit 1 mL Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung versetzt. Anschließend wurden 800 μL Natriumcarbonat-Lösung zugegeben und die Proben für 2 Stunden lichtgeschützt bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 765 nm gegen *aqua demin.* Für jede Probe erfolgte eine Doppelbestimmung.

Die Absorption des Blindwertes (*aqua demin.*, ebenso aufbereitet wie die Proben) wurde von der Absorption der Proben subtrahiert. Zur Erstellung der Eichgeraden dienten Catechin-Standardlösungen (5; 10; 15; 20; 30; 50 mg/L), die aus einer Stammlösung (500 mg/L) an jedem Versuchstag frisch hergestellt wurden. Die Probenabsorption wurde in die Gleichung der Eichgeraden eingesetzt und die Gesamtphenolkonzentration in der Plasmaprobe berechnet.

4.4.3 Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte mittels der TEAC-Methode von (Miller *et al.* 1993), modifiziert nach (Arendt *et al.* 2001).

4.4.3.1 Prinzip

Metmyoglobin induziert in Gegenwart von H_2O_2 die Bildung eines stabilen Radikalkations aus 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS). Die Intensität der blaugrünen Färbung von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ wird anhand der Absorption bei 734 nm gemessen. In Gegenwart von Antioxidantien wird die Farbreaktion proportional zur Konzentration verzögert. Die antioxidative Kapazität der zu untersuchenden Substanz wird in Relation zur Standardsubstanz Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure), einer wasserlöslichen, synthetischen Form von Vitamin E, angegeben (mM).

4.4.3.2 Praktische Durchführung

Geräte

- Chromatographiesäule Econocolumn (Biorad, München, D)
50 cm lang, 2,5 cm Durchmesser, gepackt mit Sephadex G 15 (Sigma Aldrich), Trennlänge ≥ 35 cm. Dazu wurden 60 – 70 g Sephadex G 15 für 12 h in *aqua bidest.* gequollen, anschließend entgast und auf die Säule gegeben. Zur Trennung wurde die Säule mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) equilibriert. Die Säule wurde bei 4 °C mit 0,2 % Natriumazid gelagert.
- UV/Vis Spektralphotometer U-2000 (Hitachi)
- Halbmikroküvetten (Sarstedt)

Reagenzien

- **PBS** 5 mM, isoton mit 145 mM NaCl, pH = 7,4
9,55 g PBS-Pulver (Sigma Aldrich) mit 9,467 g NaCl wurden auf 2 L *aqua bidest.* aufgefüllt, der pH-Wert mit NaCl und HCl eingestellt.

- **Metmyoglobin** ca. 140 μ M

Metmyoglobin entsteht durch die Oxidation von Myoglobin mit Kaliumhexacyanoferrat(III).

Myoglobinlösung 400 μ M

0,1424 g equines Herzmuskel-Myoglobin (Sigma Aldrich) wurden in 20 mL PBS (Raumtemperatur; RT) gelöst.

Kaliumhexacyanoferrat(III) 740 μ M

4,878 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ (Sigma Aldrich) wurden in 20 mL PBS (RT) gelöst.

Beide Lösungen wurden gemischt und 15 min lichtgeschützt inkubiert (RT), das entstandene Metmyoglobin zur Reinigung über die Sephadex-Säule gegeben und die braune Metmyoglobinfraktion aufgefangen. Die Absorption der Metmyoglobinlösung wurde bei 490, 560 und 580 nm gegen Luft gemessen und die Konzentration nach den Whitburn-Gleichungen berechnet.

Whitburn-Gleichungen (Miller *et al.* 1993)

$$[\text{Met-Mb}] = 146 \times A_{490\text{nm}} - 108 \times A_{560\text{nm}} + 2,1 \times A_{580\text{nm}}$$

$$[\text{FerryI-Mb}] = -62 \times A_{490\text{nm}} + 242 \times A_{560\text{nm}} - 123 \times A_{580\text{nm}}$$

$$[\text{MbO}_2] = 2,8 \times A_{490\text{nm}} - 127 \times A_{560\text{nm}} + 153 \times A_{580\text{nm}}$$

Mb = Myoglobin, $A_{x \text{ nm}}$ = Absorption der Lösung bei der Wellenlänge x nm

Die Konzentration von Metmyoglobin beträgt in der Regel > 95 % des gesamten Hämproteins und sollte bei etwa 140 μM liegen. Die konzentrierte Lösung ist bei -20°C bis zu 6 Monate, bei 4°C etwa 5 Tage haltbar.

- **Wasserstoffperoxidlösung** 0,9 mM

50 μL einer 30%igen H_2O_2 -Lösung (Sigma Aldrich) wurden mit 4,95 mL *aqua bidest.* verdünnt. Anschließend wurden 0,5 g dieser Verdünnung mit *aqua bidest.* auf 50 g aufgefüllt. Die H_2O_2 -Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt und täglich frisch zubereitet.

- **Trolox-Stammlösung** 2,5 mM

31,286 mg Trolox (Sigma Aldrich) wurden in 2,5 mL NaOH (0,2 M) gelöst. Nacheinander wurden langsam 2,5 mL *aqua bidest.* und 30 mL PBS zugegeben. Der pH 7,4 wurde mit HCl (0,1 M) eingestellt, anschließend wurde mit PBS auf 50 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Sie kann bis zu 6 Monate gelagert werden.

- **ABTS-Stammlösung** 5mM

54,86 mg ABTS (Sigma Aldrich) wurden in 20 mL PBS gelöst. Lichtgeschützt ist die Lösung bei 4°C bis zu 3 Tagen haltbar.

Aus den Stammlösungen wurden täglich die verdünnten Arbeitslösungen hergestellt.

Dazu wurde

die Metmyoglobinlösung mit PBS auf 90 μM verdünnt,

3,75 mL ABTS-Stammlösung mit PBS auf 100 mL aufgefüllt (187,5 μM),

1,5 mL Troloxlösung im Wasserbad (24°C) aufgetaut und Standardverdünnungen von 0,5 bis 2,5 mM mit PBS hergestellt.

Analysenansatz

Das Plasma wurde im Wasserbad (24°C) aufgetaut und bei $10\,000 \times g$ für 10 min zentrifugiert (Eppendorf), um Trübungen zu beseitigen. Der Überstand diente zur Messung der antioxidativen Kapazität.

ABTS, Metmyoglobin und H_2O_2 wurden im Wasserbad auf 24°C erwärmt.

1 200 μL ABTS-Lösung mit

50 μL Metmyoglobin und

15 μL Standard, Probe bzw. Puffer für den Leerwert

wurden 15 min im Dunklen bei Zimmertemperatur inkubiert. Alle Proben wurden im Dreifachansatz bestimmt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 μL H_2O_2 gestartet. Die Absorption wurde bei 734 nm gemessen. Sobald der Leerwert eine Absorption von 0,5 erreicht hatte, was nach etwa 5 – 7 min der Fall war, wurde die Messreihe abgelesen. Da die Absorption sehr rasch ansteigt, muss das Ablesen jeder Probe nach exakt der gleichen Zeit erfolgen. Günstig ist ein Takt von 15 Sekunden für das Einpipettieren der H_2O_2 -Lösung und das Ablesen des Wertes.

Die Absorption (Abs) der einzelnen Proben wurde auf den Leerwert bezogen:

$$(\text{Abs}_{\text{Leerwert}} - \text{Abs}_{\text{Probe}}) / \text{Abs}_{\text{Leerwert}} = \text{Inhibition [\%]}$$

Der TEAC-Wert wurde aus der Inhibition mit Hilfe der Trolox-Standardgeraden berechnet.

Um die Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen zu minimieren, wurde bei jeder Messung ein Standardplasma mitgeführt. Dieses war aliquotiert bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Der TEAC-Wert des Standardplasmas für eine Messreihe wurde auf den Mittelwert dieses Standards über alle Messungen bezogen. Die Plasmaproben der Messreihe wurden nach demselben Faktor korrigiert.

4.4.4 Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes im Plasma

Der Vitamin C-Gehalt im Plasma wurde nach (Lowry *et al.* 1945), wie bei (Speitling *et al.* 1992) beschrieben, ermittelt.

4.4.4.1 Prinzip

Ascorbinsäure wird durch Kupfersulfat zu Dehydroascorbinsäure und Diketogulonsäure oxidiert, welche im weiteren Verlauf mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu einem Zwischenprodukt reagieren. Diese Verbindung lagert sich unter Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure zu einem farbigen Osazon um. Aus der Absorption bei 520 nm kann mit Hilfe einer Standardgeraden die Konzentration an Vitamin C berechnet werden. Dabei wird die reduzierte Ascorbinsäure zusammen mit der oxidierten Dehydroascorbinsäure als Vitamin C erfasst.

4.4.4.2 Praktische Durchführung

Geräte

- Wasserbad (Kottermann)
- Zentrifuge 1.0 R (Heraeus Instruments)
- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf)
- UV/Vis Spektralphotometer U-2000 (Hitachi)
- Halbmikroküvetten (Sarstedt)

Reagenzien

- **Dinitrophenylhydrazinlösung** 2,2 %

1,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Merck) wurden in 50 mL 9 N Schwefelsäure (Roth) gelöst und filtriert.

- **Messschwefelsäure**

Zu 100 mL *aqua demin.* wurden 875 mL konz. H₂SO₄ (Merck) hinzugefügt und mit *aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt.

- **Thioharnstofflösung** 5 %

5 g Thioharnstoff (Merck) wurden in ca. 20 mL *aqua demin.* gelöst und auf 100 mL aufgefüllt.

- **Kupfersulfatlösung** 0,024 M

0,6 g CuSO₄ * 5 H₂O (Merck) wurden in 100 mL *aqua demin.* gelöst.

- **Trichloressigsäure** 5 %

10 g Trichloressigsäure (Merck) wurden in 200 mL *aqua demin.* gelöst.

- **DNP-Reagenz**

1 Volumenteil 5%ige Thioharnstofflösung wurde mit 1 Volumenteil Kupfersulfatlösung und 20 Volumenteilen 2,2%iger DNP-Lösung gemischt.

- **Ascorbinsäure-Stammlösung** 100mg/dL

20 mg Ascorbinsäure (Sigma Aldrich) wurden in 20 mL 5%iger Trichloressigsäure gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren.

- **Ascorbinsäurelösung für die Qualitätskontrolle** 1 mg/dL

10 mg Ascorbinsäure wurden in 100 mL 5%iger Trichloressigsäure gelöst. Daraus wurden 10 mL Lösung entnommen, mit 5%iger Trichloressigsäure auf 100 mL aufgefüllt, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren.

Analysenansatz

Die aufbereiteten Plasmaproben wurden bei 22 °C im Wasserbad aufgetaut und 5 min bei 12 000 × g zentrifugiert (Eppendorf). Zu 375 µL des Probenüberstandes wurden 125 µL DNP-Reagenz pipettiert, gemischt und 1 h im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Kühlung im Eisbad wurden 500 µL Messschwefelsäure hinzupipettiert, kräftig gevortext und die Proben 20 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden in Küvetten überführt und im Spektralphotometer bei 520 nm gegen Messschwefelsäure gemessen. Die Absorption des Blindwertes (*aqua demin.*, ebenso aufbereitet wie die Proben) wurde von der Absorption der Proben und der Eichwerte subtrahiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur Erstellung der Eichgeraden dienten Ascorbinsäure-Standardlösungen (0,2; 0,6; 1,2; 2,0; 3,0; 4,0 mg/dL), die aus einer Stammlösung (100 mg/dL) an jedem Versuchstag frisch hergestellt und im Verlauf der Analyse wie Plasmaproben behandelt wurden. Die Probenabsorption wurde in die Gleichung der Eichgeraden eingesetzt und die Ascorbinsäure-Konzentration in den Plasmaproben berechnet.

Als Qualitätskontrolle diente die Ascorbinsäurelösung mit einer Konzentration von 1 mg/dL, die bei jeder Analysencharge mitgeführt wurde.

4.4.5 Bestimmung von α -Tocopherol im Serum

α -Tocopherol wurde nach einer Arbeitsvorschrift, die am Institut für Diabetesforschung, Düsseldorf, standardisiert wurde, mittels HPLC, gekoppelt mit einem Diodenarray-Detektor, bestimmt (Referenzbereich 6 - 18 mg/L).

4.4.6 Bestimmung endogener Antioxidantien im Plasma

Die Bestimmung von Albumin, Urat und Bilirubin wurde am Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universität Düsseldorf, durchgeführt. Albumin wurde immunonephelometrisch (Referenzbereich 3,5 – 5,0 g/dL), Urat enzymatisch-colorimetrisch (Referenzbereich 2,4 – 7,0 mg/dL) und Bilirubin mit der DPD (2,5-Dichlor-phenyl-diazoniumsalz)-Methode (Referenzbereich 0 – 1,1 mg/dL) gemessen.

4.4.7 Detektion von DNA-Strangbrüchen in peripheren Leukozyten

DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten wurden mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Single-cell gel electrophoresis; SCGE oder Comet Assay) gemessen. Dabei handelt es sich um eine semiquantitative Methode, mit der DNA-Strangbrüche in primären oder kultivierten Zellen mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Ursprungs gemessen werden können. Ursprünglich wurde die SCGE für die Untersuchung von Schäden durch radioaktive Strahlung entwickelt, heute werden auch genotoxische und antioxidative Effekte verschiedener Substanzen *in vitro* und *in vivo* mit der SCGE untersucht (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Fairbairn *et al.* 1995; Møller & Loft 2002). Einen Überblick über die zahlreichen Einsatzmöglichkeiten und -formen der SCGE liefern z.B. (Kassie *et al.* 2000; Collins 2002) und (Olive 2002). In der vorliegenden Studie wurde nach der Anleitung von (Bauch *et al.* 1999) gearbeitet, die auf der Methode von (Östling & Johanson 1984) basiert.

4.4.7.1 Prinzip

Eine Einzelzellsuspension wird auf Objektträgern in Agarose eingebettet. Nach dem Gelieren der Agarose werden die Zellen mit phospatgepufferter Salzlösung (PBS) (Kontrollen) oder einer Wasserstoffperoxidlösung (Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen) inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Detergens lysiert, um Membranen und Proteine zu entfernen. Danach werden die Zellen einer Elektrophorese unterworfen. Brüche in den DNA-Molekülen stören deren komplexe Struktur, so dass entspannte Teile der DNA im Verlauf der Elektrophorese zur Anode wandern können. Eine Färbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff macht die Migration der DNA als „Kometen“ mit einem stark fluoreszierenden Kopf und einem schwächer leuchtenden Schweif fluoreszenzmikroskopisch sichtbar. Die SCGE gilt als sensitive Methode, die geeignet ist, oxidativen Stress und die Wirkung nutritiver Antioxidantien *in vitro* sowie *in vivo* zu untersuchen (Collins *et al.* 1997; Aruoma 1999; Kassie *et al.* 2000; Møller & Loft 2002).

Im Gegensatz zu anderen Protokollen wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Isolierung von mononukleären Zellen verzichtet und stattdessen Vollblut eingesetzt. Dadurch sollten Störfaktoren bei der Aufarbeitung gering gehalten und die *in vivo*-Situation möglichst genau wiedergegeben werden.

4.4.7.2 Praktische Durchführung

Geräte

- Objektträger (Merck)
- Mega Horizontal Gelbox Safety (Molecular Bio-Products, San Diego, USA)
- Spannungsquelle Power Pac 1000 (BioRad)
- Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RB (Leica, Bensheim, D)
- CCD-Kamera (Cohu, San Diego, USA)
- Bildanalysesystem Comet Assay II (Perceptive Instruments, Suffolk, GB)

Reagenzien

- **PBS** 10 mM, pH = 7,4

9,55 g (1 Päckchen) PBS-Pulver (Sigma Aldrich) wurden mit *aqua bidest.* auf 1 L aufgefüllt.

- **Agarose** 0,1 % bzw. 0,75 % in PBS

0,01 g bzw. 0,075 g niedrig schmelzende Agarose (Serva, Heidelberg, D) wurden in 10 mL PBS kurz aufgeköcht. Anschließend wurde die Lösung im Wasserbad für 20 min auf 80 °C gehalten und vor der Verwendung auf 60 °C (Vorbeschichtung) bzw. 42 °C (Auftragen der Zellen) abgekühlt.

- **Wasserstoffperoxid** 300 µM

51,6 µL einer 30%igen H₂O₂-Lösung (Sigma Aldrich) wurden in 5 mL PBS gegeben. Anschließend wurden 391 µL dieser Stammlösung in 130 mL PBS auf eine Konzentration von 300 µM verdünnt. Die H₂O₂-Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

- **Lyselösung**

25,0 g Natriumlaurylsulfat (SDS), 10,0 g N-Lauroylsarcosinat und 7,305 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (alle Sigma Aldrich), wurden mit *aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde zuvor mit 10 M NaOH auf 9,5 eingestellt.

- **Elektrophoresepuffer**

14,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D), 5,6 g Borat (Merck) und 0,74 g EDTA (Sigma Aldrich) wurden mit *aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 8,3.

- **Propidiumiodid** 25 µM

Es wurde eine Stammlösung von Propidiumiodid (Sigma Aldrich) hergestellt (1 mg/mL in *aqua bidest.*). 3,08 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Amersham Pharmacia Biotech) und 1,468 g NaCl wurden in 200 mL *aqua bidest.* gelöst. 4,175 mL der Propidiumiodid-

Stammlösung wurden zugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde mit *aqua demin.* auf 250 mL aufgefüllt.

Analysenansatz

Vorbeschichtung der Objektträger

Die Objektträger wurden mit jeweils 500 µL der 0,1%igen Agarose vollständig bedeckt und auf einer Wärmeplatte bei 75 °C etwa 20 min getrocknet. Die vorbeschichteten Objektträger sind bei 4 °C eine Woche haltbar.

Behandlung der Zellen

Um DNA-Strangbrüche durch UV-Strahlung zu vermeiden, wurde das Labor abgedunkelt. Alle Inkubationsschritte wurden in einer Styroporkiste mit Deckel durchgeführt.

Zehn µL heparinisiertes Vollblut wurden in 90 µL PBS (37 °C) gegeben. Nach der Zugabe von 500 µL 0,75%iger Agarose (40 – 45 °C) wurde die Mischung sofort auf einen Objektträger aufgetragen. Die Agarose gelierte 10 min im Dunklen auf einer Kühlplatte bei 4 °C.

Die Objektträger wurden danach für 20 min in 300 µM Wasserstoffperoxid inkubiert, um oxidative DNA-Schäden in den Leukozyten zu induzieren. Nach (Benítez-Bribiesca & Sánchez-Suártez 1999) handelt es sich dabei hauptsächlich um Einzelstrangbrüche. Kontrollen wurden für den gleichen Zeitraum in PBS getaucht. Die Behandlung fand im Eiswasserbad statt, um eine Reparatur der oxidativ induzierten DNA-Schäden zu verhindern (Collins *et al.* 1995). Danach wurden die Gele 15 min in Lyselösung (15 °C) gegeben und anschließend 5 min in *aqua demin.* (4 °C) gewaschen.

Elektrophorese

Die Objektträger wurden in die Elektrophoresekammer gelegt und mit dem Elektrophoresepuffer (4 °C) gerade bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte für 4 min bei 1 V/cm (Elektrodenabstand 39 cm). Die Bedingungen wurden so gewählt, dass auch die Kometen der unbehandelten Zellen erkennbare Schweife aufwiesen. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle durch H₂O₂ induzierten DNA-Strangbrüche durch eine weitere Migration der DNA in den Schweif sichtbar werden. Typische Kometen von Zellen mit und ohne H₂O₂-Belastung zeigt Abb. 4.

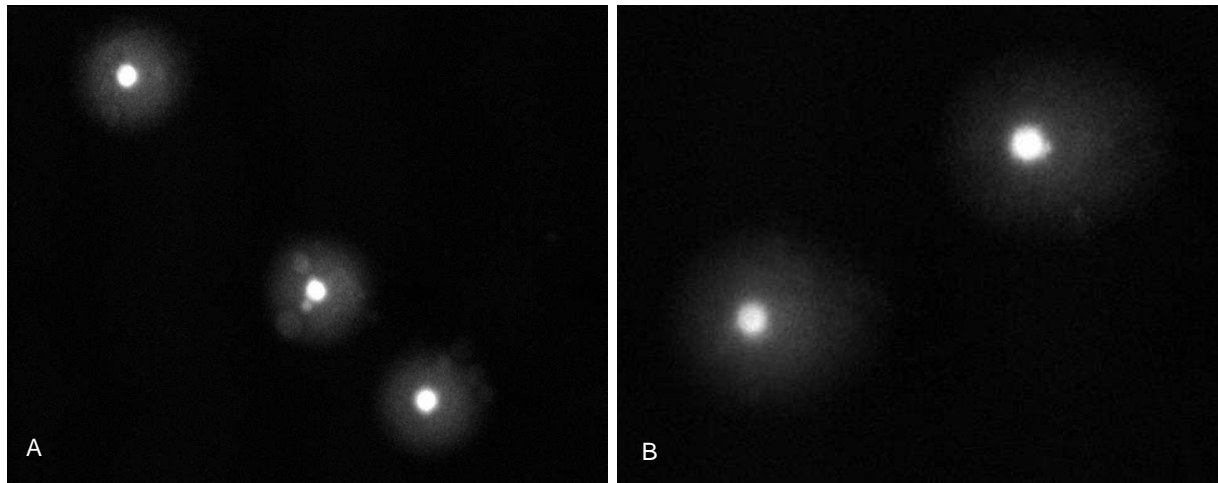


Abb. 4: Zellen nach Einzelzell-Gelelektrophorese. 400-fache Vergrößerung, angefärbt mit Propidiumiodid. A: Unbehandelte Zellen; B: Nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid (300 μM , 20 min, 4 °C).

Haltbarmachen der Gele

Die Gele wurden anschließend noch einmal für 10 min in *aqua demin.* (4 °C) gewaschen und dann auf einer Wärmeplatte bei etwa 50 °C für 20 – 30 min getrocknet. Die fertigen Präparate wurden bis zur Messung bei –20 °C aufbewahrt.

Messung

Die Mikrogele wurden 10 min in *aqua bidest.* bei Zimmertemperatur rehydriert und mit je 150 μL Propidiumiodid-Lösung gefärbt. Nach 20 min Inkubation im Dunklen bei 4 °C wurden die Kometen bei 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (Leica), ausgestattet mit einer 50-W-Quecksilberlampe und einem Filter zur Grünanregung, sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm Comet Assay II (Perceptive Instruments) gemessen, das über die CCD-Kamera (Cohu) mit dem Mikroskop verbunden war. Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen gemessen. Für die weiteren Berechnungen wurde das arithmetische Mittel der 50 Einzelwerte herangezogen. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei Verlust einzelner Gele im Verlauf der Aufarbeitung wurde im verbleibenden Gel die doppelte Anzahl an Zellen gemessen.

4.4.7.3 Auswahl der Messparameter

Das Programm Comet Assay II bietet eine Reihe von Parametern an, mit denen die Verteilung der DNA in Kopf und Schweif der Kometen beschrieben wird. In Abb. 5 sind diese anhand einer Beispielmessung dargestellt.

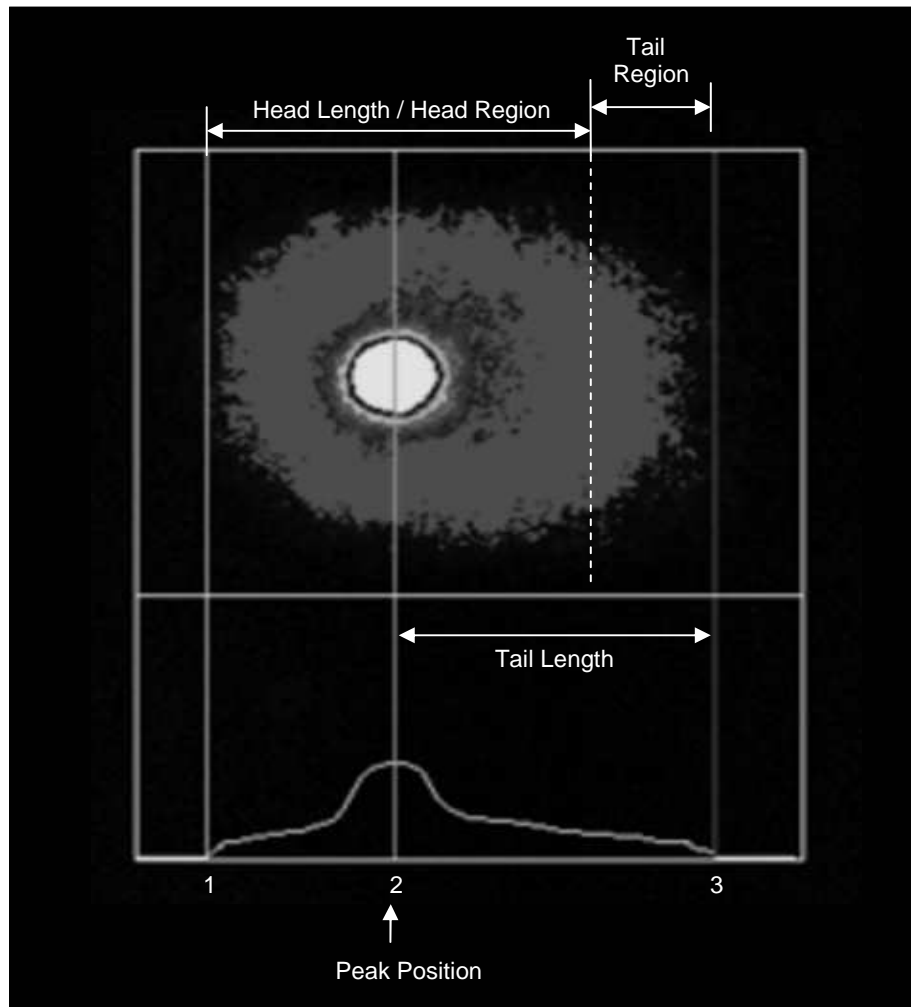


Abb. 5: Messung einer Zelle nach Einzelzell-Gelelektrophorese mit dem Comet Assay II-System.

Die äußeren Linien begrenzen das Messfenster, in dem die Zelle in Falschfarben dargestellt wird. Die linke (1) und die rechte Linie (3) im Messfenster markieren die Ausdehnung des Kometen, die mittlere Linie (2) den Punkt der höchsten Fluoreszenz (Peak Position). Die Länge des Kopfes (Head Length) entspricht dem doppelten Abstand zwischen 1 und 2, die Länge des Schweifs (Tail Length) dem Abstand zwischen 2 und 3. Alle Punkte innerhalb der Kopfreion gehören zur Intensität des Kopfes (Head Intensity), zwischen dem Ende der Kopfreion und dem Ende des Kometen liegt die Schweifregion, die Summe der Punkte darin bildet die Schweifintensität (Tail Intensity).

In der Literatur werden üblicherweise die Länge des Schweifs (Tail Length), der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Tail Intensity, TI^1) oder das Tail Moment (TM^2), ein Produkt aus der Länge des Schweifs und dem Anteil der DNA im Schweif, angegeben. Da die Tail Length nur begrenzt mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche korreliert ist (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Fairbairn *et al.* 1995), wurde in der vorliegenden Studie auf die Auswertung dieses Parameters verzichtet.

Tail Intensity und Tail Moment in unbehandelten Zellen (TI_0 , TM_0) entsprechen den endogenen, bereits im Körper vorliegenden DNA-Schäden. DNA-Strangbrüche, die durch *ex vivo*-Behandlung mit H_2O_2 verursacht werden (TI_{300} , TM_{300} ; exogene Strangbrüche) entsprechen der Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen (Riso *et al.* 1999).

4.4.8 Statistik

4.4.8.1 Beschreibung des Proband/inn/enkollektivs

Für Alter, BMI und sportliche Aktivität wurden das arithmetische Mittel (MW), die Standardabweichung (SD) sowie Minimum und Maximum berechnet. Zum Vergleich zwischen den Gruppen wurden der Kruskal-Wallis- und der Mann-Whitney-U-Test wie in Kap. 4.4.8.2 beschrieben angewandt.

4.4.8.2 Ergebnisse

Für die Auswertung der Daten wurden ausschließlich verteilungsunabhängige, nichtparametrische Tests verwendet. Der Vergleich zwischen den Gruppen RW, ERW und Kontrolle zu einem bestimmten Untersuchungstermin erfolgte mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis. Bei signifikanten Unterschieden wurden je zwei Gruppen mit dem U-Test nach Mann und Whitney verglichen. Veränderungen innerhalb der Gruppen wurden mit Hilfe des

¹ Tail Intensity = Fluoreszenzintensität im Schweif / Fluoreszenzintensität des gesamten Kometen in %

² Im Handbuch für das Programm Comet Assay II wird die Formel zur Berechnung des Tail Moment angegeben als: Tail Moment = Tail Intensity [%] / Sum Comet Intensity [%] * (Tail Centre of Gravity – Peak Position), wobei Sum Comet Intensity = Gesamtfluoreszenzintensität des Kometen, Tail Centre of Gravity = Summe der Strecken aller Fluoreszenzpunkte der Schweifregion / Anzahl der Messpunkte und Peak Position = Bereich der höchsten Fluoreszenzintensität. Die Angabe erfolgt in willkürlichen Einheiten.

Wilcoxon-Signed-Rank-Tests untersucht. Für alle Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Soweit nicht anders vermerkt, wurden in Text und Tabellen das arithmetische Mittel (MW), Standardabweichungen (SD), Minimum (Min) und Maximum (Max) angegeben. Als bevorzugte Diagramme wurden Boxplots gewählt, die auf dem Median, den Quartilen und Extremwerten basieren. Die Box stellt den Interquartilbereich mit 50 % der Werte dar. Die von der Box ausgehenden Linien führen jeweils bis zum höchsten und bis zum niedrigsten Wert, ohne dass Ausreißer und Extremwerte berücksichtigt werden. Die quer über die Box gelegte Linie gibt die Lage des Medians wieder. Ausreißer¹ und Extremwerte² sind als einzelne Datenpunkte dargestellt. In Linien- und Balkendiagrammen sind MW und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) eingezeichnet.

¹ Fälle mit Werten, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind

² Fälle mit Werten, die mehr als 3 Boxlängen von der oberen oder unteren Kante der Box entfernt sind

5 Ergebnis

5.1 Kurzzeitstudie

5.1.1 Proband/inn/en

Alle 18 Proband/inn/en der Gruppen Rotwein (RW) und entalkoholisierter Rotwein (ERW) nahmen sowohl am ersten (A) als auch am zweiten Teil (B) der Kurzzeitstudie teil. In Teil A war es bei einigen Proband/inn/en wegen Venenproblemen nicht möglich, zu allen Zeitpunkten Blutproben zu entnehmen. In Teil B standen die 90-Minuten-Werte zweier Probandinnen aus der Kontrollgruppe durch Probenverluste bei der Aufarbeitung nicht zur Verfügung. Die jeweiligen Proband/inn/enzahlen sind in den Abbildungen und Tabellen angegeben.

Der Altersdurchschnitt war bei den Kontrollpersonen höher ($31,4 \pm 5,8$ a) als in den Gruppen RW ($27,1 \pm 9,0$ a; $p = 0,050$) und ERW ($26,2 \pm 3,5$ a; $p = 0,040$). Hinsichtlich Body Mass Index (BMI) und sportlicher Aktivität gab es keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3).

5.1.2 Teil A: Antioxidative Kapazität im Plasma

Am Teil A der Studie nahmen nur die Proband/inn/en der Gruppen RW und ERW teil. Gemessen wurde die antioxidative Kapazität im Plasma. Zu keinem Zeitpunkt gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen RW und ERW. 30, 60 und 90 min nach dem Verzehr von RW war die antioxidative Kapazität gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht. Bei ERW war dies nach 90 min der Fall. Nach 120 min lagen die Mittelwerte in beiden Gruppen noch über dem Nullwert, die Differenzen waren jedoch nicht statistisch signifikant (RW: $p = 0,063$; ERW: $p = 0,173$) (Abb. 6).

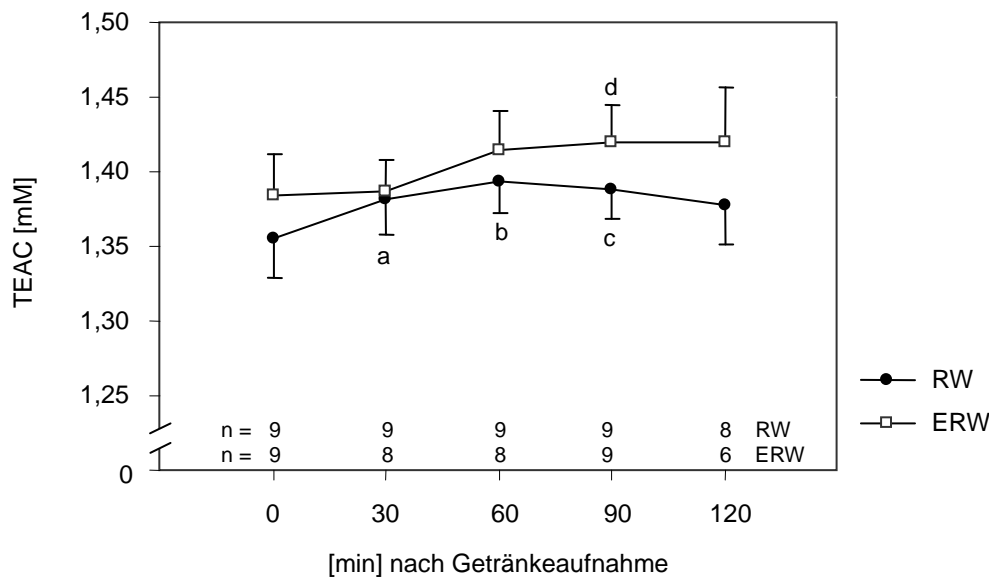


Abb. 6: Antioxidative Kapazität im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW) bzw. 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) (Kurzzeitstudie Teil A) (MW \pm SEM). TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity. a-d: statistisch signifikanter Unterschied zum Nullwert (p = a: 0,012; b: 0,011; c: 0,021; d: 0,015).

5.1.3 Teil B

An Teil B der Kurzzeitstudie nahm auch die Kontrollgruppe teil. Vor dem Verzehr der Getränke gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen RW, ERW und Kontrolle hinsichtlich der diätetischen Polyphenolaufnahme oder der gemessenen antioxidativen Parameter.

5.1.3.1 Polyphenol- und Nährstoffzufuhr

Die Teilnehmer/innen nahmen am Tag vor den Untersuchungen insgesamt im Durchschnitt $2,1 \pm 5,3$ mg Flavonoide, $20,8 \pm 46,2$ mg Phenolsäuren mit der Nahrung auf. Die Energiezufuhr lag bei $1\,769 \pm 561$ kcal, die Vitamin C- und Alkoholaufnahme bei $31,8 \pm 26,3$ g bzw. $0,4 \pm 1,8$ g. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen RW, ERW und Kontrolle gab es nicht (Tab. 6).

Tab 6: Polyphenol-, Energie-, Vitamin C- und Alkoholaufnahme der Proband/inn/en der Kurzzeitstudie bei polyphenolarmer Kost am Tag vor der Untersuchung

	Phsr [mg]	Flavo [mg]	Gesphe [mg]	Energie [kcal]	Vitamin C [g]	Alkohol [g]
Rotwein (n = 9)						
MW	26,6	1,6	28,1	1 718	29,5	0,0
SD	63,9	4,8	63,3	483	29,3	0,0
Min	0,0	0,0	0,0	1 060	2,4	0,0
Max	191,7	14,3	191,7	2 700	89,1	0,0
Entalkoholisierter Rotwein (n = 9)						
MW	17,6	2,1	19,7	1 610	27,4	1,0
SD	36,9	5,4	41,8	204	21,4	2,9
Min	0,0	0,0	0,0	1 360	4,9	0,0
Max	106,4	16,5	122,9	2 000	62,3	8,8
Kontrolle (n = 9)						
MW	17,5	2,8	20,3	2 040	40,6	0,0
SD	34,9	6,5	35,5	875	29,6	0,0
Min	0,0	0,0	0,0	1 150	4,3	0,0
Max	95,2	17,5	96,5	3 770	87,0	0,0

Phsr: Phenolsäuren; Flavo: Flavonoide; Gesphe: Polyphenole gesamt; kcal: Kilokalorien;
n: Anzahl der Proband/inn/en

5.1.3.2 Gesamtphenolgehalt im Plasma

Der Verzehr von RW und ERW führte nach 90 min zu einem Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, der sowohl gegenüber dem Nullwert als auch gegenüber der Kontrollgruppe signifikant war. Nach 360 min lag die Gesamtphenolkonzentration in allen drei Gruppen über dem Ausgangswert. Unterschiede zwischen RW, ERW und Kontrolle wurden zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet (Abb. 7).

5.1.3.3 Antioxidative Kapazität im Plasma

Im Gegensatz zu Teil A veränderte sich die antioxidative Kapazität im Plasma in keiner Gruppe gegenüber dem Ausgangswert. Ein Anstieg 90 min nach dem Verzehr von entalkoholisiertem Rotwein lag an der Signifikanzgrenze ($p = 0,051$). Auch zwischen RW, ERW und Kontrolle gab es keine Unterschiede (Tab. 7).

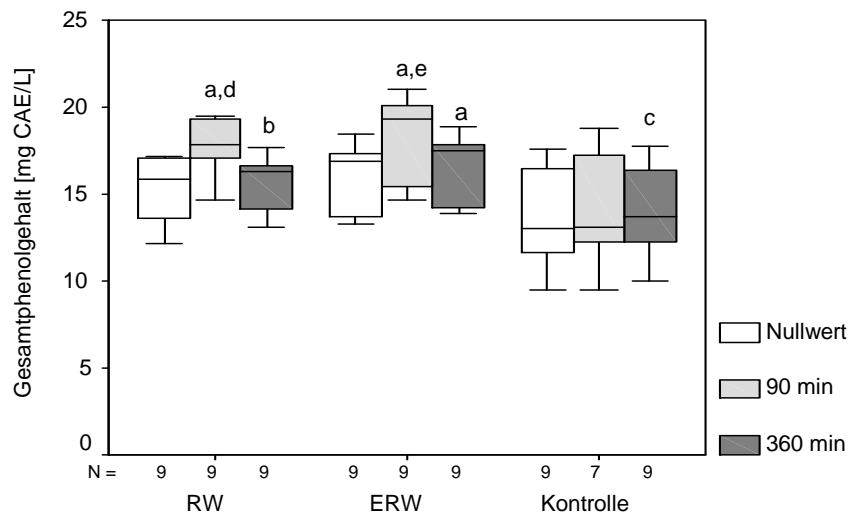


Abb. 7: Gesamtphenolgehalt im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle). CAE: Catechinäquivalente; N: Anzahl der Proband/inn/en; a-d: statistisch signifikante Unterschiede, a-c: zum Nullwert ($p = a: 0,008$; $b: 0,021$; $c: 0,011$), d,e: zur Kontrollgruppe ($p = d: 0,042$; $e: 0,016$).

Tab. 7: Antioxidative Kapazität im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 ml entalkoholisierendem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)

	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [mM]								
	Rotwein			Entalkoholisierter Rotwein			Kontrolle		
	Nullwert	90 min	360 min	Nullwert	90 min	360 min	Nullwert	90 min	360 min
n	9	9	9	9	9	9	9	7	9
MW	1,22	1,25	1,23	1,25	1,28	1,24	1,23	1,26	1,24
SD	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07	0,05	0,05	0,04
Min	1,09	1,15	1,15	1,14	1,14	1,14	1,19	1,21	1,21
Max	1,34	1,35	1,39	1,39	1,39	1,34	1,33	1,34	1,34

n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum

5.1.3.4 Endogene Antioxidantien im Plasma

Die Albuminkonzentration im Plasma änderte sich nach dem Verzehr von RW und ERW nicht, stieg aber in der Kontrollgruppe 90 min nach dem Trinken an. Rotwein erhöhte die Uratkonzentration 90 min nach der Aufnahme, während ERW und Wasser keine Wirkung auf diesen Parameter hatten. Die Bilirubinkonzentration im Plasma stieg in der Kontrollgruppe nach 90 min signifikant an. In den Gruppen RW und ERW lag der Bilirubinspiegel 360 min nach dem Getränkekonsum unterhalb des Ausgangswertes. Unterschiede zwischen den Gruppen RW, ERW und Kontrolle gab es bei keinem der drei Parameter (Tab. 8).

Tab. 8: Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) bzw. 200 mL Wasser (Kontrolle)

	Albumin [g/dL]			Urat [mg/dL]			Bilirubin [mg/dL]		
	Nullwert	90 min	360 min	Nullwert	90 min	360 min	Nullwert	90 min	360 min
Rotwein									
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MW	4,1	4,4	4,4	4,6	5,3 ^b	4,5	0,7	0,7	0,5 ^d
SD	0,5	0,4	0,5	1,0	1,0	0,9	0,4	0,4	0,3
Min	3,6	3,7	3,6	3,5	4,4	3,4	0,3	0,3	0,3
Max	4,8	5,1	5,0	6,2	6,9	5,8	1,7	1,5	1,2
Entalkoholisierter Rotwein									
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9
MW	4,4	4,4	4,4	4,8	4,9	4,5	0,7	0,7	0,5 ^e
SD	0,4	0,5	0,6	1,2	1,1	1,0	0,3	0,2	0,3
Min	3,8	3,6	3,7	3,5	3,6	3,1	0,3	0,4	0,2
Max	5,1	5,0	5,2	7,0	7,0	6,4	1,2	1,1	1,0
Kontrolle									
n	9	7	9	9	7	9	9	7	9
MW	4,1	4,3 ^a	4,4	4,6	4,9	4,4	0,5	0,6 ^c	0,5
SD	0,4	0,3	0,5	1,1	1,2	1,1	0,2	0,3	0,2
Min	3,7	3,9	3,6	3,3	3,2	3,0	0,3	0,4	0,3
Max	4,8	4,9	5,1	6,7	6,9	6,6	1,1	1,2	1,0

n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum, a-e: statistisch signifikante Unterschiede zum Nullwert ($p = a: 0,028; b: 0,007; c: 0,046; d: 0,027; e: 0,010$).

5.1.3.5 Vitamin C im Plasma

In der Gruppe RW nahm die Vitamin C-Konzentration im Plasma 360 min nach dem Verzehr gegenüber dem Ausgangswert ab. Bei ERW stieg sie zum selben Zeitpunkt statistisch signifikant an. Unterschiede zwischen RW, ERW und Kontrolle gab es nicht (Abb. 8).

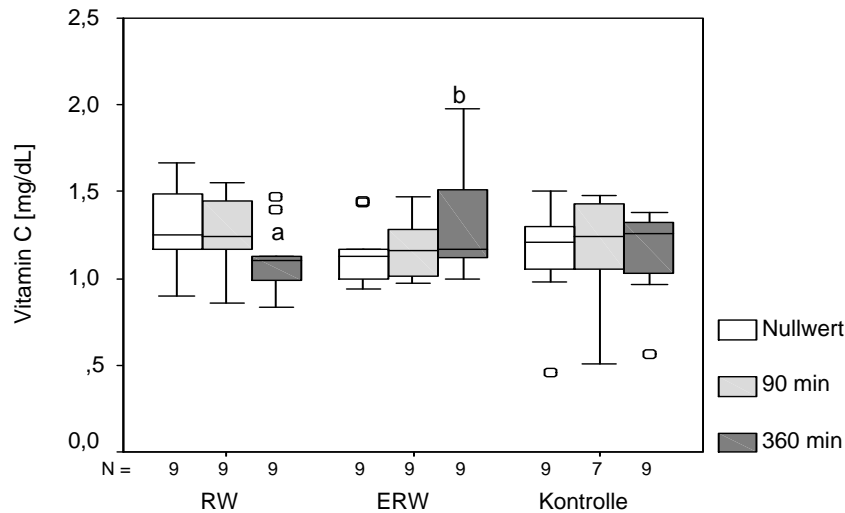


Abb. 8: Vitamin C-Konzentration im Plasma nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle). Ausreißer und Extremwerte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt. N: Anzahl der Proband/inn/en; a,b: statistisch signifikante Unterschiede zum Nullwert (p = a: 0,008; b: 0,017).

5.1.3.6 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Die Ergebnisse für Tail Intensity und Tail Moment zeigten große Übereinstimmung. Die endogenen DNA-Strangbrüche (TI_0 , TM_0) stiegen 360 min nach dem Konsum von Rotwein und entalkoholisierendem Rotwein gegenüber dem Nullwert an. In der Gruppe ERW lag der 90 min-Wert ebenfalls über dem Ausgangswert. In der Kontrollgruppe gab es keine Veränderungen. Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (Abb. 9A, Tab. 9).

Die *ex vivo* durch 300 μ M H_2O_2 induzierten DNA-Strangbrüche (TI_{300} , TM_{300}) veränderten sich nur in der Gruppe ERW. Sie nahmen 360 min nach dem Konsum sowohl gegenüber dem Nullwert als auch gegenüber der Kontroll- und der Rotweingruppe ab (Abb. 9B, Tab. 9).

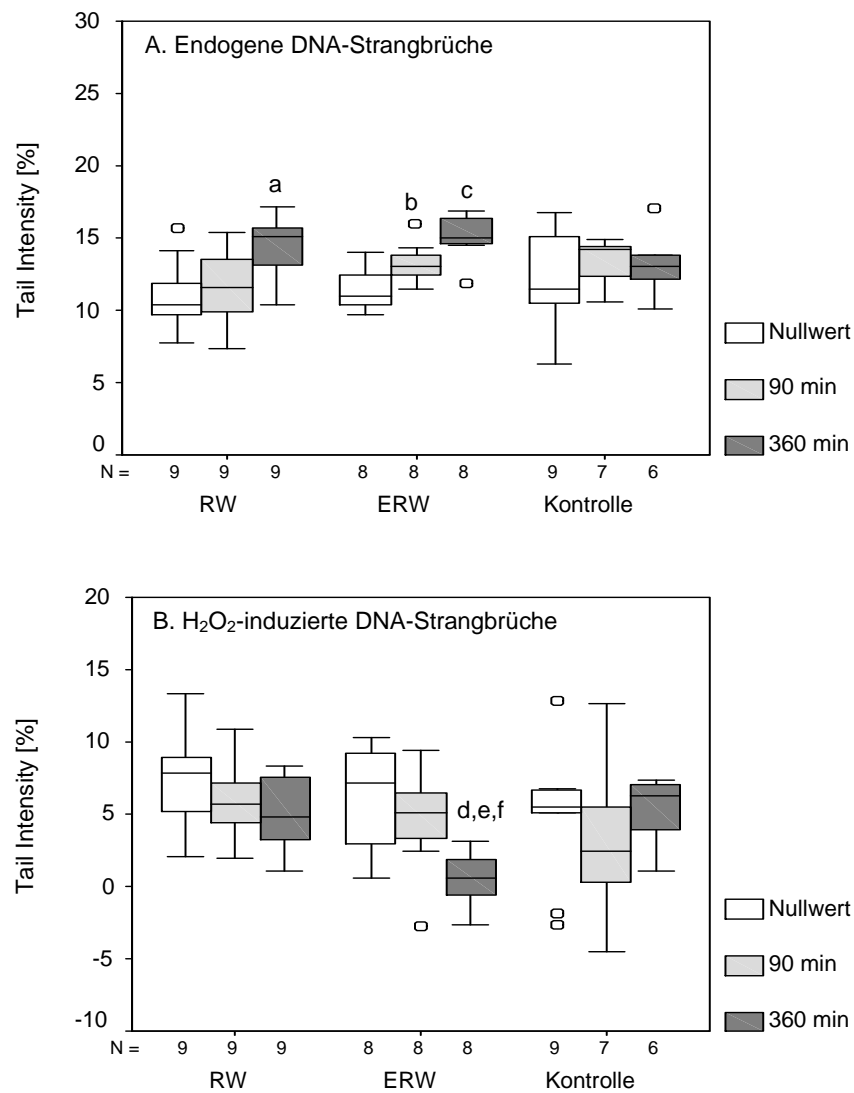


Abb. 9: DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Intensity (TI) nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) bzw. 200 mL Wasser (Kontrolle). A: in unbehandelten Zellen (TI₀); B: *ex vivo* induziert durch H₂O₂ (300 µM, 20 min, 4 °C) (TI₃₀₀). Ausreißer und Extremwerte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt. a-f: statistisch signifikante Unterschiede, a-d: zum Nullwert (p = a: 0,038; b: 0,050; c: 0,012; d: 0,036), e: zur Kontrollgruppe (p = 0,005), f: zur Gruppe RW (p = 0,002).

Tab. 9: DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Moment (TM) nach Verzehr von 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) oder 200 mL Wasser (Kontrolle)

	TM ₀			TM ₃₀₀		
	Nullwert	90 min	360 min	Nullwert	90 min	360 min
Rotwein						
n	9	9	9	9	9	9
MW	1,86	2,03	2,61 ^a	1,69	1,39	1,22
SD	0,48	0,43	0,43	0,92	0,65	0,67
Min	1,23	1,31	1,89	0,38	0,41	0,28
Max	2,60	2,59	3,15	3,35	2,68	2,31
Entalkoholisierter Rotwein						
n	8	8	8	8	8	8
MW	1,98	2,36 ^b	2,67 ^c	1,43	1,05	0,21 ^{d,e,f}
SD	0,33	0,23	0,24	0,78	0,87	0,45
Min	1,64	2,16	2,19	0,25	-0,62	-0,61
Max	2,64	2,81	2,97	2,37	2,36	0,90
Kontrolle						
n	9	7	6	9	7	6
MW	2,19	2,43	2,33	1,15	0,78	1,21
SD	0,67	0,43	0,44	1,07	1,23	0,52
Min	1,05	1,76	1,84	-0,48	-0,88	0,40
Max	3,08	2,86	3,02	3,20	2,91	1,65

TM₀: endogene Strangbrüche; TM₃₀₀: ex vivo induziert durch H₂O₂ (300 µM, 20 min, 4 °C); n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum; a-f: statistisch signifikante Unterschiede, a-d: zum Nullwert (p = a: 0,024; b: 0,050; c: 0,012, d: 0,036), e: zur Kontrollgruppe (p = 0,008), f: zur Gruppe Rotwein (p = 0,004).

5.2 Langzeitstudie

5.2.1 Proband/inn/en

Die Gruppe RW hatte mit $23,5 \pm 3,3$ kg/m² einen höheren BMI als die Gruppen ERW ($21,9 \pm 2,1$ kg/m²; p = 0,046) und Kontrolle ($21,4 \pm 2,2$; p = 0,017). Der durchschnittliche BMI der Proband/inn/en veränderte sich über den Interventionszeitraum nicht. Auch der Unterschied zwischen den Gruppen war nach 6 Wochen weiterhin signifikant (RW $23,5 \pm 3,4$ kg/m²; ERW $21,9$ kg/m², p = 0,032; Kontrolle $21,4 \pm 2,3$, p = 0,016). Beim Alter und der körperlichen Aktivität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 4).

5.2.2 Polyphenol- und Nährstoffzufuhr

In der Woche vor der Intervention gab es bei der Phenolsäure-, Flavonoid- und Gesamtphenolzufuhr keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Interventionsphase stiegen alle drei Werte bei RW und ERW an. Auch in der Kontrollgruppe wurden nach 6 Wochen mehr Phenolsäuren und Gesamtpolyphenole aufgenommen als zu Beginn. Die Phenolsäure- und Gesamtphenolzufuhr unterschied sich auch während der Intervention nicht zwischen den Gruppen. Die durchschnittliche Flavonoidaufnahme lag bei ERW hingegen höher als in der Kontrollgruppe, bei RW höher als bei ERW und Kontrolle. Die Gesamtphenolaufnahme ist in Tab. 10 dargestellt, die Phenolsäure- und Flavonoidzufuhr in Abb. 10.

Tab. 10: Gesamtphenolzufuhr vor (w-1) und während Intervention mit 200 mL Rotwein (RW), 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle) (w6)

	Gesamtphenolzufuhr [mg/d]					
	Rotwein		Entalkoholisierter Rotwein		Kontrolle	
	w-1	w6	w-1	w6	w-1	w6
n	24	24	25	25	25	25
MW	136,7	211,8 ^a	162,5	222,5 ^b	124,8	176,7 ^c
SD	81,2	90,8	94,4	117,7	80,2	111,8
Min	13,6	22,4	30,5	70,5	9,7	16,7
Max	291,5	385,8	445,3	444,6	348,6	505,2

n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum; a-c: statistisch signifikante Unterschiede zwischen w-1 und w6 ($p = a: < 0,001$; $b: 0,005$; $c: 0,035$).

Zu Beginn der Studie gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen RW, ERW und Kontrolle bei der durchschnittlichen Energie-, Alkohol- und Vitamin C-Aufnahme. Die einzige Veränderung im Interventionszeitraum war ein Anstieg der Alkoholzufuhr bei täglichem Konsum von nativem Rotwein im Vergleich zum Ausgangswert sowie zu den Proband/inn/en aus ERW und Kontrollgruppe (Tab. 11).

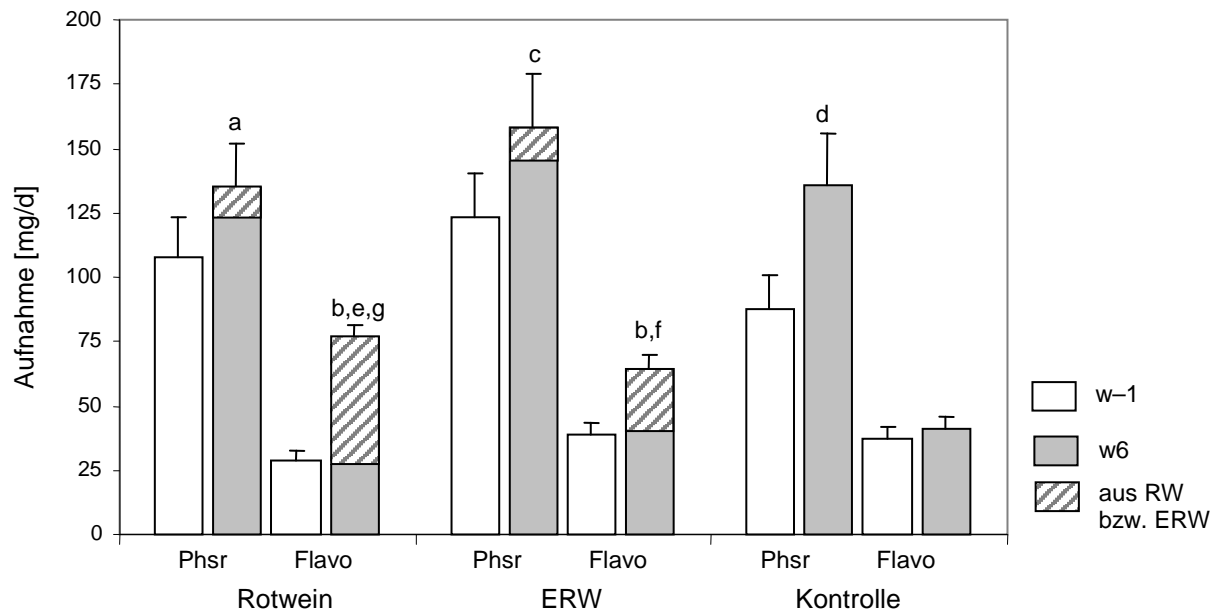


Abb. 10: Phenolsäure- und Flavonoidzufuhr bei normaler Kost und bei zusätzlicher Aufnahme von 200 mL Rotwein (RW) bzw. 175 mL entalkoholisierem Rotwein (ERW) täglich. (MW \pm SEM). Die Kontrollgruppe erhielt kein Studiengetränk. Die Daten wurden durch 7-Tages-Ernährungsprotokollen ermittelt, die in der Woche vor (w-1) und in der 6. Woche der Intervention (w6) von den Proband/inn/en ausgefüllt wurden. Phsr: Phenolsäuren; Flavo: Flavonoide; a-g: statistisch signifikante Unterschiede in der Gesamtaufnahme, a-d: zu w-1: (p = a: 0,014; b: < 0,001; c: 0,019; d: 0,025), e, f: zur Kontrollgruppe (p = e: < 0,001; f: 0,005), g: zur Gruppe ERW (p = 0,005).

Tab. 11: Energie-, Vitamin C- und Alkoholaufnahme bei normaler Kost (Nullwert, Kontrolle) und bei zusätzlichem Konsum von 200 mL Rotwein bzw. 175 mL entalkoholisierem Rotwein (ERW) täglich

	Energie [kcal/d]		Vitamin C [mg/d]		Alkohol [g/d]	
	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w
Rotwein (n = 24)						
MW	1 869	1 924	183,4	171,1	7,5	28,1 ^{a,b,c}
SD	443	515	92,4	92,4	8,3	5,4
Min	1 290	1 260	62,3	50,6	0,0	24,2
Max	3 260	2 870	404,0	407,0	25,8	44,6
Entalkoholisierter Rotwein (n = 25)						
MW	1 922	1 945	163,6	198,0	5,8	6,5
SD	445	637	80,8	112,8	7,1	7,7
Min	1 160	971	68,4	37,8	0,0	1,1
Max	2 770	3 810	342,0	452,0	24,9	29,9
Kontrolle (n = 25)						
MW	1 862	1 950	165,6	199,9	6,1	6,9
SD	464	545	74,0	113,8	6,6	6,7
Min	1 040	1 070	43,3	58,3	0,0	0,0
Max	3 250	2 980	337,0	567,0	25,5	22,1

kcal: Kilokalorien; n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum, a-c: statistisch signifikante Unterschiede, a: zum Nullwert; b: zur Kontrollgruppe; c: zur Gruppe ERW (alle p < 0,001).

5.2.3 Gesamtphenolgehalt im Plasma

Weder vor noch nach der Intervention gab es einen Unterschied zwischen den Proband/inn/engruppen. Nach 6 Wochen regelmäßigen Rotweinverzehrs stieg der Gesamtphenolgehalt im Plasma im Vergleich zum Ausgangswert an, während sich die Werte bei ERW und in der Kontrollgruppe nicht signifikant veränderten (Abb. 11).

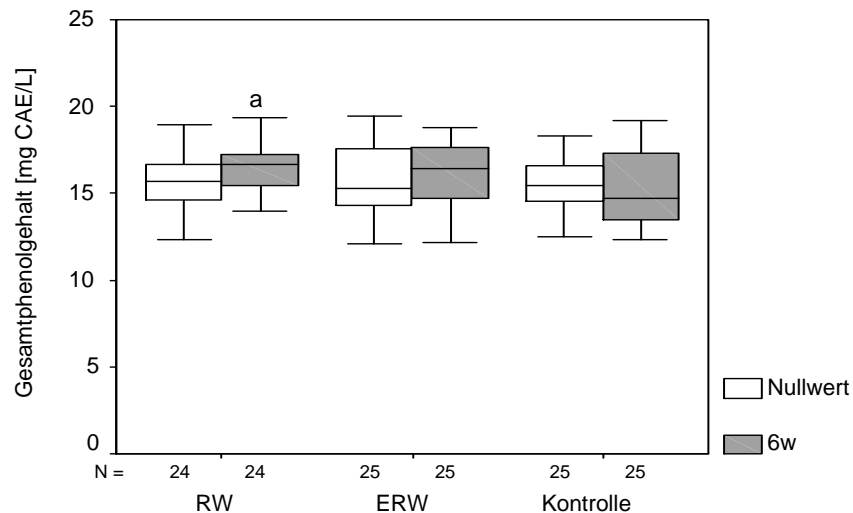


Abb. 11: Gesamtphenolgehalt im Plasma vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein (RW) oder 175 mL entalkoholisierendem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle). 6w: nach 6 Wochen Intervention; a: statistisch signifikanter Unterschied zum Nullwert ($p = 0,002$).

5.2.4 Antioxidative Kapazität im Plasma

Die TEAC-Werte der Gruppen RW, ERW und Kontrolle unterschieden sich weder vor noch nach 6 Wochen Intervention voneinander. Auch gegenüber den Ausgangswerten veränderte sich das antioxidative Potential im Plasma nicht signifikant (Tab. 12).

5.2.5 Vitamin C im Plasma

Die durchschnittliche Vitamin C-Konzentration im Plasma der Proband/inn/en aus den Gruppen RW, ERW und Kontrolle zeigte weder vor noch nach der Intervention statistisch signifikante Unterschiede (Tab. 12).

5.2.6 α -Tocopherol im Serum

Die durchschnittlichen α -Tocopherol-Gehalte in den Gruppen RW, ERW und Kontrolle unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt voneinander. Nach 6 Wochen Intervention zeigten sich auch keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Nullwert (Tab. 12).

Tab. 12: Antioxidative Kapazität, Vitamin C- und α -Tocopherol-Konzentration im Plasma bzw. Serum vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisierendem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle).

	TEAC [mM]		Vitamin C [mg/dL]		α -Tocopherol [mg/L]	
	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w
Rotwein (n = 24)						
MW	1,47	1,45	1,30	1,35	11,3	11,3
SD	0,06	0,04	0,28	0,26	3,0	3,0
Min	1,37	1,39	0,81	0,84	7,4	7,8
Max	1,59	1,53	1,98	1,90	17,4	18,1
Entalkoholisierter Rotwein (n = 25)						
MW	1,44	1,42	1,43	1,42	11,2	11,5
SD	0,08	0,07	0,36	0,39	2,6	2,7
Min	1,24	1,32	0,93	0,71	6,3	5,9
Max	1,56	1,59	2,17	1,99	16,5	17,3
Kontrolle (n = 25)						
MW	1,46	1,43	1,48	1,57	11,2	11,0
SD	0,08	0,07	0,29	0,28	2,9	2,7
Min	1,32	1,28	0,76	1,07	7,4	7,0
Max	1,64	1,57	2,00	2,36	16,7	16,2

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; im Plasma; Vitamin C: im Plasma; α -Tocopherol: im Serum; n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum

5.2.7 Endogene Antioxidantien im Plasma

Die Gruppen RW, ERW und Kontrolle unterschieden sich weder vor noch nach der Interventionsphase hinsichtlich der Albumin-, Urat- oder Bilirubinkonzentration im Plasma. Der Uratgehalt im Plasma stieg in der Kontrollgruppe nach 6 Wochen im Vergleich zum Ausgangswert an. Bei ERW sank die Bilirubinkonzentration. Weitere Veränderungen der endogenen Antioxidantien wurden nicht beobachtet (Tab. 13).

Tab. 13: Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein, 175 mL entalkoholisierendem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)

	Albumin [g/dL]		Urat [mg/dL]		Bilirubin [mg/dL]	
	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w	Nullwert	6 w
Rotwein (n = 24)						
MW	4,22	4,30	4,69	4,88	0,68	0,61
SD	0,40	0,36	1,17	1,16	0,28	0,35
Min	3,30	3,30	3,20	2,70	0,20	0,20
Max	4,90	5,10	6,80	7,30	1,20	1,90
Entalkoholisierter Rotwein (n = 25)						
MW	4,26	4,12	4,44	4,48	0,68	0,59 ^b
SD	0,42	0,63	1,08	0,94	0,33	0,27
Min	3,70	3,20	3,20	2,90	0,30	0,20
Max	5,20	5,50	7,30	7,00	2,00	1,30
Kontrolle (n = 25)						
MW	4,20	4,24	4,40	4,73 ^a	0,64	0,62
SD	0,40	0,54	1,24	1,46	0,33	0,35
Min	3,60	3,40	2,20	2,60	0,20	0,20
Max	5,00	5,70	6,90	8,20	1,70	1,60

n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum; a,b: statistisch signifikante Unterschiede zum Nullwert ($p = a: 0,035$; $b: 0,022$).

5.2.8 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Durch Verluste von Gelen im Verlauf der SCGE standen in den Gruppen ERW und Kontrolle jeweils nur die Daten von 21 Proband/inn/en zur Verfügung. Weder vor noch nach der Intervention gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Parameter für DNA-Strangbrüche. Der Vergleich zwischen dem Null- und dem 6-Wochen-Wert ergab bei Kontrolle und ERW keine Veränderungen. Nach 6 Wochen täglichem Verzehr von einem Glas Rotwein nahmen die endogenen DNA-Strangbrüche (TI_0 ; TM_0) ab, während sich die H_2O_2 -induzierten Schäden (TI_{300} ; TM_{300}) nicht veränderten (Abb. 12, Tab. 14).

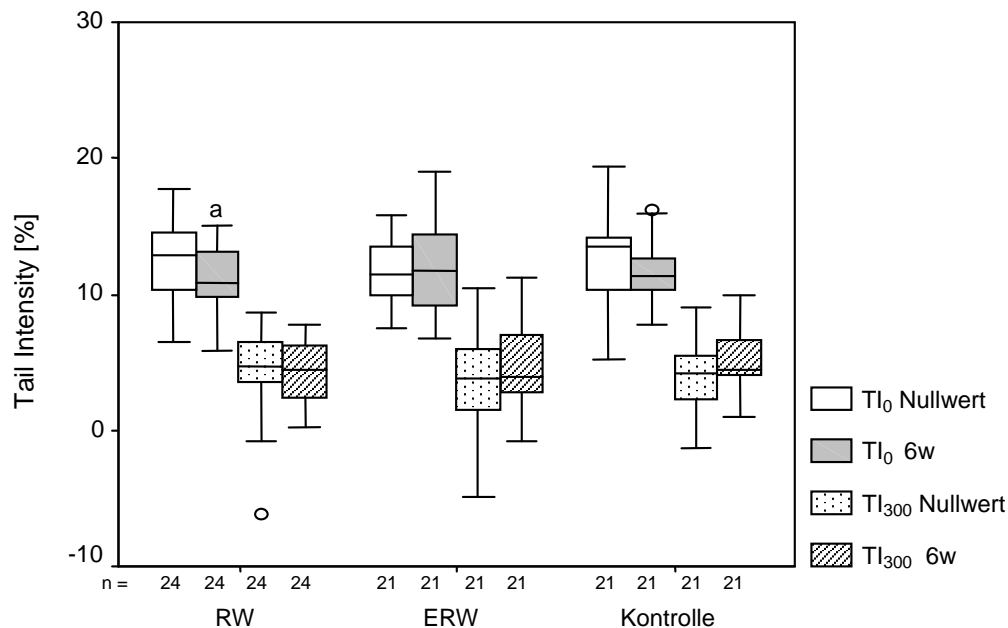


Abb. 12: DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten, gemessen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese als Tail Intensity (TI) vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein (ERW) täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle). Ausreißer und Extremwerte sind als einzelne Datenpunkte dargestellt. TI_0 : endogene Strangbrüche; TI_{300} : *ex vivo* induziert durch H_2O_2 (300 μM , 20 min, 4 °C); 6w: nach 6 Wochen Intervention; a: statistisch signifikanter Unterschied zum Nullwert ($p = 0,026$).

Tab. 14: DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten als Tail Moment (TM) vor und nach 6 Wochen Intervention mit 200 mL Rotwein oder 175 mL entalkoholisiertem Rotwein täglich bzw. ohne Studiengetränk (Kontrolle)

	TM_0		TM_{300}	
	Nullwert	6w	Nullwert	6w
Rotwein (n = 24)				
MW	2,18	1,88 ^a	1,02	0,96
SD	0,56	0,48	0,69	0,49
Min	1,06	0,90	-1,22	0,10
Max	3,13	2,59	2,04	1,62
Entalkoholisierter Rotwein (n = 21)				
MW	1,97	2,05	0,87	0,92
SD	0,56	0,70	0,72	0,65
Min	1,11	0,99	-0,95	-0,26
Max	2,89	3,65	2,30	2,22
Kontrolle (n = 21)				
MW	2,22	1,95	0,95	1,18
SD	0,79	0,49	0,54	0,50
Min	0,86	1,15	0,00	0,19
Max	3,28	2,91	1,65	2,20

TM_0 : endogene Strangbrüche; TM_{300} : *ex vivo* induziert durch H_2O_2 (300 μM , 20 min, 4 °C); n: Anzahl der Proband/inn/en; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum; 6w: nach 6 Wochen Intervention; a: statistisch signifikanter Unterschied zum Nullwert ($p = 0,037$).

6 Diskussion

Oxidativer Stress wird als ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Tumor-, Herz-Kreislauf-, chronisch entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Rotwein ist reich an antioxidativen Polyphenolen, die oxidativen Stress *in vivo* vermindern und damit präventiv wirken könnten. In der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob der einmalige bzw. regelmäßige moderate Konsum von nativem bzw. entalkoholisierem Rotwein bei gesunden Nichtraucher/innen den Gesamtphenolgehalt im Plasma erhöht und ob dadurch antioxidative Parameter im Blut sowie endogene und exogene durch H₂O₂ induzierte DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten beeinflusst werden. Dazu wurden zwei Interventionsstudien an gesunden Nichtraucher/innen durchgeführt. In einer Kurzzeitstudie wurden die akuten Effekte nach einmaligem Verzehr von 200 mL Rotwein (RW) oder 175 mL entalkoholisierem Rotwein (ERW) im Vergleich zu 200 mL Wasser (Kontrolle) gemessen. In einer Langzeitstudie tranken die Proband/innen die gleichen Mengen RW bzw. ERW 6 Wochen lang täglich zusätzlich zu ihrer normalen Kost, während die Kontrollgruppe kein Studiengetränk erhielt.

6.1 Studienaufbau

Um die antioxidativen Wirkungen von Rotwein *in vivo* unter möglichst realitätsnahen Bedingungen untersuchen zu können, wurde für die Intervention ein kommerzieller Ahr-Rotwein mit mittlerem Polyphenolgehalt und mittlerem antioxidativem Potential eingesetzt (Tab. 5 / Anhang C). Darüber hinaus sollten die Proband/innen, abgesehen von den Studiengetränken, ihre normalen Ernährungsgewohnheiten beibehalten. Das dreiarmlige Design der Studie erlaubt Aussagen über die Wirkungen von Rotwein und entalkoholisierem Rotwein im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen Rotwein und entalkoholisierem Rotwein sollte darüber hinaus die Rolle des Alkohols für die antioxidativen Wirkungen *in vivo* klären. Da der Polyphenolgehalt des Rotweins durch die Vakuumextraktion verändert wurde (Tab. 5), sind die Ergebnisse der beiden Interventionen in dieser Hinsicht nur beschränkt aussagefähig.

Das parallele kontrollierte Design ist für Interventionsstudien mit nutritiven Antioxidantien besser geeignet als ein Cross-over, da zeitliche Effekte, die unabhängig von der Intervention auftreten können, anhand der Daten der Kontrollgruppe erkennbar werden (Møller & Loft

2002). In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich Ernährungsprotokolle geführt, um zu überprüfen, ob die Verzehrsgewohnheiten der Proband/inn/en in der Langzeitstudie konstant blieben oder ob Veränderungen der Polyphenol- oder Vitamin C-Aufnahme die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. In der Kurzzeitstudie wurde mit den Ernährungsprotokollen die Einhaltung der polyphenolarmen Diät am Tag vor den Untersuchungen kontrolliert.

6.2 Methoden

Die Bioverfügbarkeit der Polyphenole wurde anhand des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, gemessen mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz, überprüft. Da Plasmaproteine die Bestimmung stören, wurden diese wie bei (Serafini *et al.* 1998) beschrieben entfernt. Nur so ist ein Einsatz der Methode für Plasmaproben möglich. Im Gegensatz zur Quantifizierung einzelner Verbindung mittels HPLC oder anderer chromatographischer Methoden werden beim Gesamtphenolgehalt auch unbekannte Metaboliten sowie Substanzen, deren Konzentrationen in der Einzelbestimmung unterhalb der Nachweisgrenze liegen, erfasst. Allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die Methode nicht spezifisch für Polyphenole ist, sondern auch andere reduzierende Substanzen, vor allem Vitamin C, erfasst werden können (Scalbert & Williamson 2000; Serafini M & Maiani G 2001, persönliche Mitteilung). Um solche Störungen zu kontrollieren, wurde in der vorliegenden Studie auch die Vitamin C-Konzentration im Plasma gemessen.

Die antioxidative Kapazität (TEAC) im Plasma dient als Parameter für den extrazellulären antioxidativen Status. Dieser wird dadurch besser wiedergegeben als durch die Messung einzelner Antioxidantien im Plasma, da auch unbekannte Verbindungen sowie Synergieeffekte zur Gesamtwirkung beitragen können (Ghiselli *et al.* 2000). Die gleichzeitige Bestimmung von Albumin, Urat, Bilirubin, Vitamin C und α -Tocopherol, die zusammen etwa 55 bis 90 % der TEAC im Plasma ausmachen (Miller *et al.* 1993; Cao & Prior 1998), erlaubt eine Unterscheidung zwischen direkten antioxidativen Wirkungen der Rotweinpolyphenole und sekundären Effekten durch Veränderung anderer Antioxidantien. In der Kurzzeitstudie wurde auf die Bestimmung von α -Tocopherol verzichtet, da innerhalb weniger Stunden nicht mit einer Änderung der Konzentrationen zu rechnen ist (Pietta *et al.* 1998).

Die biologische Relevanz der TEAC ist allerdings unklar. Zum einen wird die Radikalfängerkapazität gegenüber ABTS gemessen, einem Radikal, das relativ stabil ist und *in vivo* nicht vorkommt (Prior & Cao 1999). Zum anderen resultiert ein Anstieg der TEAC nicht unbedingt aus antioxidativen Effekten einer Intervention, sondern könnte auch eine Antwort auf erhöhten oxidativen Stress darstellen. Sinnvolle Aussagen sind daher nur in Verbindung mit anderen antioxidativen Parametern möglich (Prior & Cao 1999).

Um zu überprüfen, inwieweit sich Veränderungen des Polyphenolgehaltes und der antioxidativen Kapazität im Plasma auf zellulärer Ebene auswirken, wurden DNA-Schäden in peripheren Leukozyten mit der SCGE gemessen. Während DNA-Strangbrüche in unbehandelten Zellen das Gleichgewicht zwischen auftretenden Schäden und Reparaturmechanismen *in vivo* widerspiegeln, wird bei *ex vivo*-Behandlung mit H₂O₂ vor allem die intrazelluläre Radikalfängerkapazität erfasst (Duthie *et al.* 1996; Riso *et al.* 1999; Møller & Loft 2002). Die differenzierte Betrachtung von endogenen und durch H₂O₂-Behandlung induzierten exogenen DNA-Schäden kann daher Hinweise darauf geben, ob Polyphenole intrazellulär ausschließlich antioxidative Wirkungen zeigen oder ob DNA-Schäden auch durch andere Mechanismen, z.B. Stabilisierung der DNA (Duthie & Dobson 1999) oder Aktivierung von Reparaturmechanismen (Anderson *et al.* 2000; Ferguson 2001), beeinflusst werden könnten. Obwohl (Duthie *et al.* 1996) und (Riso *et al.* 1999) die Genauigkeit der Messung endogener DNA-Strangbrüche anzweifeln, konnten andere Arbeitsgruppen eine Reduktion von DNA-Schäden *in vivo* durch polyphenol- (Lean *et al.* 1999; Boyle *et al.* 2000b) bzw. carotinoidreiche Lebensmittel (Pool-Zobel *et al.* 1997) nachweisen, so dass der Parameter für die Untersuchung antioxidativer Wirkungen von Rotweinpolyphenolen geeignet erscheint.

6.3 Kurzzeitstudie

6.3.1 Polyphenol- und Nährstoffzufuhr

Die Proband/inn/en der Kurzzeitstudie nahmen am Tag vor der Untersuchung im Durchschnitt 23 ± 47 (0 – 192) mg Polyphenole auf (Kap. 5.1.3.1). Dieser Wert liegt deutlich unter der Aufnahme bei normaler Ernährung, wie sie für die Teilnehmer/innen der Langzeitstudie vor der Intervention (141 mg/d) (Tab. 10) und für ein bayerisches Kollektiv der Nationalen Verzehrsstudie (276 mg/d) (Linseisen *et al.* 1997; Radtke *et al.* 1998)

berechnet wurde. Die vergleichsweise geringe Polyphenolaufnahme in der vorliegenden Studie zeigt, dass die Proband/inn/en die Vorgabe polyphenolarmer Kost eingehalten hatten. Auch die geringe Vitamin C- (31,8 g) und Alkoholaufnahme (nur eine Probandin der Gruppe ERW hatte ein Glas Sekt getrunken) deutet auf eine gute Compliance bei den diätetischen Restriktionen hin.

Die Energieaufnahme am Tag vor der Untersuchung lag mit durchschnittlich 1 749 kcal bei Frauen und 1 812 kcal bei Männern unterhalb der Richtwerte der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2 300 kcal/d bzw. 2 900 kcal/d) für die Altersgruppe zwischen 25 und 50 Jahren (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000a). Da es sich bei den Proband/inn/en fast ausschließlich um Studierende und Universitätsangehörige mit ernährungswissenschaftlichem oder medizinischem Hintergrund handelte, ist eine zu geringe Nahrungsaufnahme (Undereating) auf Grund der eingeschränkten Lebensmittelauswahl wahrscheinlicher als eine Unterschätzung der Verzehrsmengen (Underrecording). Da die Polyphenolzufuhr nur etwa 1/6 bis 1/12 der Menge betrug, die mit einer normalen Mischkost aufgenommen werden (s. oben), ist aber auch im Falle eines Underrecordings nicht mit Störeinflüssen durch am Vortag aufgenommene Polyphenole zu rechnen.

6.3.2 Gesamtphenolgehalt im Plasma

Der Gesamtphenolgehalt im Plasma stieg 90 min nach der Aufnahme von Rotwein (+17 %) bzw. entalkoholisiertem Rotwein (+15 %) im Vergleich zum Ausgangswert an. Nach 360 min war die Gesamtphenolkonzentration immer noch höher als vor der Intervention, jedoch war der Unterschied wesentlich geringer (+2,8 % bzw. +3,8 %) (Abb. 7). Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die 30 min nach dem Verzehr von 100 mL Rotwein (Duthie *et al.* 1998) bzw. 50 min nach Aufnahme 113 mL ERW (Serafini *et al.* 1998) ebenfalls einen vorübergehenden Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma messen konnten. Dass die Veränderungen in beiden Studien größer waren als in der vorliegenden Arbeit (+28 % bzw. +42 %), deutet darauf hin, dass die maximale Konzentration im Plasma nicht erst nach 90 min, sondern möglicherweise schon vorher erreicht wurde. (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000) konnten nach Aufnahme von Rotwein oder ERW (5 ml/kg KG) keine Veränderungen des Gesamtphenolgehaltes im Plasma messen. Allerdings wurde bei (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000) eine Proteinfällung und Polyphenolextraktion, wie bei (Serafini *et al.* 1998) beschrieben, nicht durchgeführt, so dass dieses Ergebnis nicht aussagefähig ist

(vgl. Kap. 6.2). Dass sich die Phenolkonzentrationen im Plasma 90 min nach der Zufuhr von nativem und entalkoholisierendem Rotwein nicht signifikant unterschieden, unterstützt die Annahme, dass Ethanol die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen beim Menschen nicht wesentlich beeinflusst (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000; Bub *et al.* 2001). Unklar ist, ob der Gesamtphenolgehalt zwischen 90 und 360 min wieder absinkt, weil die Polyphenole rasch ausgeschieden werden oder im Gewebe akkumulieren (Bub *et al.* 2001).

Der erhöhte Gesamtphenolgehalt im Plasma nach 360 min kann nicht eindeutig auf den Konsum von Rotwein bzw. ERW zurückgeführt werden, da auch in der Kontrollgruppe eine Veränderung in einer vergleichbaren Größenordnung (+2,8 %) auftrat. Die Ursache für die erhöhte Gesamtphenolkonzentration in der Kontrollgruppe ist unklar. Da das Folin-Ciocalteu-Reagenz nicht spezifisch für Polyphenole ist, sind Störungen durch andere reduzierende Substanzen, vor allem Vitamin C, möglich (vgl. Kap. 6.2). Da nach 360 min der Gesamtphenolgehalt im Plasma jedoch in allen drei Gruppen anstieg, während der Vitamin C-Spiegel sank (RW), anstieg (ERW) oder unverändert blieb (Kontrolle) (Abb. 8), kann auch zu diesem Zeitpunkt Vitamin C als Ursache für den Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma ausgeschlossen werden.

Denkbar ist auch ein geringer Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma durch das Mittagessen zwischen der zweiten und der dritten Blutentnahme. Die Proband/inn/en sollten sich weiterhin polyphenolarm ernähren, da Polyphenole jedoch in fast allen pflanzlichen Lebensmitteln enthalten sind, ist eine völlig polyphenolfreie Kost kaum zu realisieren. Neunzig Minuten nach der Intervention hatte die Aufnahme von 62,8 mg (RW) bzw. 37,8 mg (ERW) Polyphenolen zu einem Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma um etwa 15 % geführt. Daher könnte ein Anstieg um etwa 3 %, wie er nach 360 min beobachtet wurde, theoretisch durch 10 mg Polyphenole in der Nahrung hervorgerufen werden. Diese Menge wird bereits mit knapp 30 g Zwiebeln erreicht, die z.B. unerkannt als Gewürz in nicht selbst zubereiteten Gerichten enthalten gewesen sein könnten. Zudem liegen für zahlreiche „erlaubte“ Lebensmittel, wie z.B. Gebäck oder Nudeln, bisher keine Analysedaten zum Polyphenolgehalt vor. Diese Lebensmittel könnten vor allem phenolische Säuren enthalten (Rechner *et al.* 2002) und damit zu einem Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma führen. Da die Polyphenolaufnahme am Untersuchungstag nicht durch Ernährungsprotokolle kontrolliert wurde, sind Fehler auf Grund mangelnder Compliance nicht völlig auszuschließen. Um solche Störungen zu vermeiden, sollten in künftigen Studien ausschließlich standardisierte Mahlzeiten verwendet werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Rotweinpolyphenole unabhängig vom Alkoholgehalt rasch absorbiert werden, eine einmalige Zufuhr jedoch nur eine temporäre Steigerung des Gesamtphenolgehaltes im Plasma bewirkt.

6.3.3 Antioxidative Kapazität im Plasma

Antioxidative Effekte unmittelbar nach einmaligem Verzehr von Rotwein, entalkoholisiertem Rotwein bzw. Rotweinextrakten auf Plasma, Serum (Maxwell *et al.* 1994; Whitehead *et al.* 1995; Cao *et al.* 1998; Duthie *et al.* 1998; Serafini *et al.* 1998; Durak *et al.* 1999b; Öztürk *et al.* 1999; Serafini *et al.* 2000; Natella *et al.* 2001; Simonetti *et al.* 2001) oder LDL (Miyagi *et al.* 1997) konnten in zahlreichen Kurzzeitstudien nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Arbeit war die antioxidative Kapazität im Plasma 30, 60 und 90 min nach dem Verzehr von 200 mL Rotwein sowie 90 min nach der Aufnahme von 175 mL entalkoholisiertem Rotwein gegenüber dem Ausgangswert erhöht (Teil A).

Allerdings waren diese Effekte nicht reproduzierbar. In Teil B kam es bei den gleichen Proband/inn/en unter denselben Versuchsbedingungen zwar nach 90 min zu einem Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, anders als bei (Serafini *et al.* 1998) und (Duthie *et al.* 1998) wurde die antioxidative Kapazität im Plasma jedoch nicht signifikant verändert (Tab. 7). (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000) wiesen erhöhte Phenolsäurekonzentrationen im Plasma nach einmaligem Verzehr von Rotwein und entalkoholisiertem Rotwein nach, ohne dass ein Schutz vor Cu-induzierter LDL- oder Serumoxidation erreicht wurde. Die Autor/inn/en gehen davon aus, dass die Konzentration der Rotweinpolyphenole im Blut zu gering war, um *ex vivo* antioxidative Effekte hervorzurufen. Dass in Teil B der vorliegenden Studie bei ERW mit $p = 0,051$ das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ nur knapp überschritten wurde, weist darauf hin, dass antioxidative Effekte vorhanden gewesen sein könnten, die aber zu gering waren, um eine konsistente Steigerung der Plasma-TEAC zu bewirken.

Auch die geringe Größe des Proband/inn/enkollektivs könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse von Teil A und B verantwortlich gewesen sein. So kam es in Teil A sowohl bei RW als auch bei ERW 90 min nach der Intervention bei 8 von 9 Personen zu einem Anstieg der TEAC. In Teil B war dies in der Gruppe RW nur noch bei 7 von 9 Personen der Fall. In der Gruppe ERW standen nur 7 Werte zur Verfügung, davon wurde in 4 Fällen ein Anstieg gemessen. Bei einer größeren Stichprobe hätten solche kleinen Verschiebungen möglicherweise nicht zu einem Verlust der Signifikanz geführt. Ein weiterer Störfaktor

könnte das Frühstück 60 min nach dem Verzehr der Getränke gewesen sein, bei dem auch proteinreiche Lebensmittel (Milch, Milchprodukte) angeboten wurden. (Serafini *et al.* 1996) konnten zeigen, dass die Zugabe von Milch zu grünem und schwarzem Tee antioxidative Wirkungen *in vivo* inhibiert. Da die Zusammensetzung des Frühstücks nicht protokolliert wurde, kann eine höhere Proteinzufuhr bei Teil B im Vergleich zu Teil A als Ursache für das Ausbleiben antioxidativer Wirkungen im Plasma nicht ausgeschlossen werden.

6.3.4 Vitamin C im Plasma

Die Vitamin C-Konzentration im Plasma nahm 360 min nach dem Verzehr von nativem Rotwein im Vergleich zum Ausgangswert ab (Abb. 8). Vergleichbare Untersuchungen gibt es hierzu bislang nicht. Eine mögliche Erklärung liefern die Ergebnisse verschiedener Tier- (Yunice *et al.* 1984; Suresh *et al.* 1999) und Humanstudien (Lecomte *et al.* 1994; van der Gaag *et al.* 2000), die auf einen erhöhten Vitamin C-Verbrauch durch den Alkoholmetabolismus schließen lassen. Da Vitamin C wasserlöslich ist, könnte zudem eine erhöhte Diurese, wie sie von (Donovan *et al.* 2002) nach dem Verzehr alkoholhaltigen Rotweins beobachtet wurde, die Ausscheidung von Vitamin C beschleunigt haben. Nach (Pietta *et al.* 1998) haben möglicherweise auch Polyphenole direkt einen Einfluss auf die Vitamin C-Konzentration im Plasma. Die Autor/inn/en konnten zeigen, dass der Vitamin C-Spiegel im Plasma gesunder Probanden 1 – 4 h nach der Aufnahme von Teecatechinen sank, danach aber wieder das Ausgangsniveau erreichte.

Dass die Vitamin C-Konzentration im Plasma in der vorliegenden Studie 360 min nach dem Verzehr von entalkoholisierem Rotwein erhöht war, spricht jedoch gegen diese Hypothese. Vielmehr scheinen die Rotweinpolyphenole in Abwesenheit von Alkohol Vitamin C-sparend zu wirken. Dabei könnte unter anderem eine Stabilisierung der Ascorbinsäure, Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat und ein geringerer metabolischer Verbrauch von Vitamin C eine Rolle spielen (Middleton *et al.* 2000). Kurzfristige Veränderungen des Vitamin C-Gehaltes im Plasma durch entalkoholisierten Rotwein wurde bisher jedoch nicht beobachtet (Cao *et al.* 1998; Serafini *et al.* 1998). Der Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen könnte auf Differenzen im Polyphenolgehalt und –muster der Weine beruhen. Bei (Cao *et al.* 1998) wurde der entalkoholisierte Rotwein zudem nicht nüchtern, sondern in einem proteinhaltigen Getränk gereicht, was die Resorption der Polyphenole beeinflusst haben könnte.

Signifikante Einflüsse von Vitamin C auf die Gesamtphenolmessung sind unwahrscheinlich, da der höchste Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma nach 90 min gemessen wurde, während Veränderungen der Vitamin C-Konzentration erst nach 360 min auftraten. Auch die antioxidative Kapazität im Plasma wurde durch Veränderungen des Vitamin C-Spiegels nicht beeinflusst.

6.3.5 Endogene Antioxidantien im Plasma

Albumin, das etwa 30 – 40 % (Miller *et al.* 1993; Cao & Prior 1998) zur TEAC im Plasma beiträgt, stieg nur in der Kontrollgruppe 90 min nach der Wasseraufnahme an (Tab. 8). Die antioxidative Kapazität im Plasma wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst.

In der Rotweingruppe kam es 90 min nach der Intervention zu einem Anstieg der Uratkonzentration im Plasma, die sich jedoch im physiologischen Bereich bewegte (Tab. 8). Dies ist durch einen erhöhten Purinabbau beim Alkoholmetabolismus (Yamanaka 1996), eine verminderte renale Uratausscheidung durch erhöhte Laktatkonzentrationen (Yamanaka 1996; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000) sowie durch Purine im Rotwein (Natella *et al.* 2001) zu erklären. Einige Autor/inn/en vermuten, dass auch nicht-alkoholische Komponenten von Rotwein den Uratspiegel im Blut steigern können (Day & Stansbie 1995; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2000; Natella *et al.* 2001). Wie bei (Cao & Prior 1998) und (Serafini *et al.* 1998) wurden in der vorliegenden Studie jedoch keine Veränderungen der Uratkonzentration im Plasma nach Aufnahme von ERW beobachtet, so dass der Effekt nach Konsum von RW auf den Alkohol zurückzuführen sein dürfte.

Da Urat eines der wichtigsten Antioxidantien im Körper darstellt, könnte die Steigerung des Uratspiegels einen großen Teil der antioxidativen Wirkungen von Rotwein *in vivo* ausmachen (Day & Stansbie 1995; Maxwell & Thorpe 2000). In der vorliegenden Arbeit führte jedoch 90 min nach der Aufnahme von Rotwein weder die erhöhte Konzentration von Gesamtphenolen (+17 %) noch von Urat (+15 %) zu einer signifikanten Veränderung der antioxidativen Kapazität im Plasma. Dies legt nahe, dass die TEAC-Methode nicht sensitiv genug ist, um antioxidative Wirkungen von Rotwein *in vivo* zu erfassen. Auch bei (Cao *et al.* 1998) wurde die TEAC nach dem Verzehr von 300 mL entalkoholisiertem Rotwein nicht verändert, obwohl das Eisenreduzierende Potential (FRAP) und die Fähigkeit, Sauerstoffradikale abzufangen (ORAC), im Serum anstiegen.

Die Veränderungen des Bilirubinspiegels in der Kontrollgruppe nach 90 min und bei RW und ERW nach 360 min (Tab. 8) beruhen vermutlich auf physiologischen Schwankungen. Nach einem Labormanual (vitamin be classic + new media 2003) sollten Blutproben für die Bilirubinbestimmung nur morgens entnommen werden, da die Konzentration „beträchtliche Tagsschwankungen“ zeigt. Bilirubin macht insgesamt nur etwa 1 % der antioxidativen Kapazität im Plasma aus, so dass Veränderungen nur bei pathophysiologisch erhöhten Werten eine Rolle für die TEAC spielen dürften (Woodford & Whitehead 1998). Die Durchschnittswerte lagen in allen drei Gruppen zu jedem Zeitpunkt innerhalb des Normbereiches, so dass Wirkungen auf die antioxidative Kapazität im Plasma nicht zu erwarten sind.

6.3.6 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Endogene DNA-Schäden in peripheren Leukozyten stiegen 360 min nach dem Verzehr von einem Glas Rotwein oder entalkoholisierendem Rotwein signifikant an. Gleichzeitig nahm das Ausmaß der H₂O₂-induzierten Strangbrüche in der Gruppe ERW ab, während sie in der Gruppe RW unverändert blieb (Abb. 9 / Tab. 9).

Der Anstieg der basalen DNA-Schäden ist schwer zu erklären. Er steht im Widerspruch zu einer Studie von (Fenech *et al.* 1997), bei der nach einmaligem Verzehr von 300 mL Rot- oder Weißwein eine Reduktion der basalen DNA-Schäden in peripheren Lymphozyten, gemessen mit dem Cytokinese-Block-Mikronukleustest (CBMN), beobachtet wurde. Auch mit anderen Methoden konnten bisher keine prooxidativen Effekte von Rotwein *in vivo* nachgewiesen werden. Nur (van Golde *et al.* 1999) beobachteten nach 2-wöchigem Konsum von 375 mL Rotwein/d eine erhöhte Oxidierbarkeit von LDL *ex vivo*. Da die Studie nicht kontrolliert war, ist ihre Aussagekraft jedoch beschränkt.

Da die endogenen DNA-Schäden bei nativem und entalkoholisierendem Rotwein gleichermaßen anstiegen, können genotoxische Wirkungen durch Ethanol, wie sie von (Greenrod & Fenech 2003) *in vitro* (CBMN) nachgewiesen wurden, als Ursache ausgeschlossen werden. Da in beiden Gruppen die Gesamtphenolkonzentration im Plasma angestiegen war und andere Weinkomponenten wie Glycerin und Tartrat keine DNA-schädigenden Effekte auf humane Lymphozyten zeigen (Greenrod & Fenech 2003), sind vermutlich die Rotweinpolyphenole bzw. deren Metabolite für die vermehrten DNA-Strangbrüche *in vivo* verantwortlich. Dass diese erst nach 360 min messbar waren, während die Peak-Konzentration der Gesamtphenole

nach 90 min erreicht wurde, deutet auf eine Verzögerung der intrazellulären Effekte hin, wie sie auch bei (Boyle *et al.* 2000b) beobachtet wurde. Genotoxische Wirkungen von Polyphenolen *in vivo* wurden bisher allerdings nicht beobachtet. *In vitro* führte die Inkubation mit verschiedenen Polyphenolen erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen zwischen 25 und 1 000 μM zu vermehrten DNA-Strangbrüchen (SCGE) bei Lymphozyten (Duthie *et al.* 1997b; Szeto & Benzie 2002) und Jurkat-T-Zellen (Johnson & Loo 2000). (Pool-Zobel *et al.* 1999) beobachteten bei kultivierten Kolon-Karzinomzellen mit der SCGE zwar DNA-schädigende Effekte eines Anthocyanextrakts aus roten Trauben, die Ergebnisse waren aber nicht reproduzierbar.

Da DNA-Strangbrüche als Zwischenprodukte bei der Basen- oder Nukleotid-Excisionsreparatur entstehen, könnten die vermehrten endogenen DNA-Schäden nach dem Verzehr von RW und ERW auch auf einer Aktivierung von Reparaturenzymen durch Polyphenole (Duthie & Dobson 1999) beruhen. Um zu klären, welche Mechanismen für den beobachteten Anstieg der DNA-Strangbrüche *in vivo* verantwortlich sind, wäre in zukünftigen Studien eine Modifikation der SCGE sinnvoll, bei der die Oxidation von Purin- und Pyrimidinbasen (Collins *et al.* 1993; Giovanelli *et al.* 2000) und die Aktivität von Reparaturenzymen (Collins *et al.* 1995) erfasst werden können.

Methodische Fehler als Ursache für das unerwartete Ansteigen der endogenen DNA-Strangbrüche, z.B. durch unterschiedliche Aufarbeitung der Proben an unterschiedlichen Tagen (Riso *et al.* 1999) können weitgehend ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Belastung der Leukozyten durch Verwendung von Vollblut anstelle von isolierten Zellen minimiert, die Versuchsbedingungen (Temperatur, Lichteinwirkung) waren konstant. Zudem wurden an jedem Versuchstag Proband/inn/en aus mindestens zwei der drei Interventionsgruppen (RW, ERW, Kontrolle) untersucht, so dass mit signifikanten Einflüssen von Interassay-Abweichungen auf nur eine der Gruppen nicht zu rechnen ist.

Im Gegensatz zu den endogenen DNA-Schäden nahmen die H_2O_2 -induzierten Strangbrüche nach dem Konsum von entalkoholisiertem Rotwein ab, was auf antioxidative und/oder DNA-stabilisierende Wirkungen (Duthie & Dobson 1999) von nicht-alkoholischen Rotweinkomponenten *ex vivo* schließen lässt. Bei (Fenech *et al.* 1997) nahmen H_2O_2 -induzierte DNA-Schäden 1 – 3 h nach der Aufnahme von Rot- und Weißwein ab. Hierfür könnten neben den Polyphenolen auch andere Inhaltsstoffe des Weins wie Glycerin und Tartrat verantwortlich sein (Fenech *et al.* 1997; Greenrod & Fenech 2003). Auch der erhöhte Vitamin C-Gehalt im Plasma 360 min nach dem Verzehr von ERW (Abb. 8) könnte eine Erklärung liefern.

Schutzwirkungen von Vitamin C vor oxidativen DNA-Schäden in Leukozyten wurden *in vitro* (Noroozi *et al.* 2000; Fabiani *et al.* 2001) sowie *ex vivo* nach dem Verzehr (Übersicht bei Møller & Loft 2002) bereits mehrfach nachgewiesen. Zudem konnte (Lenton *et al.* 1999) in einer Untersuchung an Lymphozyten von 105 gesunden Proband/inn/en zeigen, dass die intrazelluläre Vitamin C-Konzentration invers mit oxidative DNA-Schäden *in vivo*, gemessen an Hand von Basenoxidaionsprodukten, korreliert ist. Unklar ist allerdings, wieso das Absinken des Vitamin C-Spiegels in der Gruppe RW in der gleichen Größenordnung (RW: $-0,2 \pm 0,2$ mg/dL; ERW: $+0,2 \pm 0,3$ mg/dL) nicht analog die Empfindlichkeit der Leukozyten gegenüber H_2O_2 erhöhte. Um die Bedeutung von Vitamin C für die exogenen DNA-Strangbrüche abschätzen zu können, wäre eine Messung der intrazellulären Vitamin C-Konzentrationen sinnvoll. Zudem sollte das Verhältnis zwischen reduzierter Ascorbinsäure und oxidiertes Dehydroascorbinsäure bestimmt werden, da nur so eine Aussage über oxidativen Stress *in vivo* möglich ist (Duthie 1999).

Der scheinbare Widerspruch zwischen erhöhten endogenen DNA-Schäden und einer Schutzwirkung gegenüber oxidativem Stress *ex vivo* nach dem Verzehr von entalkoholisierem Rotwein lässt sich durch die unterschiedlichen Bedingungen zum Zeitpunkt der Schädigung erklären. Solange sich die Leukozyten im Körper befinden, wird ihre DNA durch das gesamte Spektrum an intra- und extrazellulären enzymatischen und nicht-enzymatischen antioxidativen Mechanismen vor oxidativen DNA-Schäden geschützt (Kap. 2.1.2). Darüber hinaus können bereits entstandene Schäden durch Reparaturenzyme beseitigt werden (Gaté *et al.* 1999; Davies 2000). Die mit der SCGE erfassten DNA-Strangbrüche spiegeln damit nicht nur das Verhältnis zwischen pro- und antioxidativen Substanzen, sondern auch zwischen entstandenen und reparierten DNA-Schäden wider (Duthie *et al.* 1996). Durch die niedrige Temperatur (4 °C) bei der *ex vivo*-Behandlung mit H_2O_2 werden antioxidative und Reparaturenzyme inaktiviert, so dass hierbei ausschließlich die Wirkungen von nicht-enzymatischen Radikalfängern und Metallchelatoren erfasst werden (Duthie *et al.* 1996; Riso *et al.* 1999). Durch die vielfältigen biologischen Wirkungen der Polyphenole (Robak & Gryglewski 1996; Middleton *et al.* 2000; Ferguson 2001), ist denkbar, dass *in vivo* die Aktivität von antioxidativen Enzymen und Reparaturmechanismen moduliert werden, so dass es vermehrt zu DNA-Strangbrüchen kommt. Dagegen könnten in H_2O_2 -behandelten Zellen die nicht-enzymatischen Antioxidantien (Polyphenole und/oder Vitamin C) nach Konsum von ERW einen messbaren Schutz vor oxidativen DNA-Schäden

bieten. Um diese Hypothese überprüfen zu können, müssten die Aktivität der entsprechenden Enzyme sowie die Konzentrationen der intrazellulären Antioxidantien bestimmt werden.

6.4 Langzeitstudie

6.4.1 Polyphenol- und Nährstoffzufuhr

Die Phenolsäure- und Flavonoidzufuhr der Proband/inn/en betrug vor der Intervention durchschnittlich 106 ± 77 (Median 84) bzw. 35 ± 20 (30) mg/d (Abb. 10 / Tab. 10). Sie war damit niedriger als in einem repräsentativen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie, in dem täglich im Mittel 222 mg Phenolsäuren (Radtke *et al.* 1998) und 54 mg Flavonoide (Linseisen *et al.* 1997) aufgenommen wurden. Die Differenz bei den Flavonoiden lässt sich vor allem durch Hesperitin, Isorhamnetin, Luteolin, Phloretin, Proanthocyanidin und Delphinidin erklären, die in der vorliegenden Studie bei der Berechnung der Flavonidaufnahme nicht erfasst wurden. Sie machen bei (Linseisen *et al.* 1997) zusammen etwa 13,5 mg der täglich aufgenommenen Flavonoide aus. Gentisin-, Protochatechus-, Sinapin- und Vanillinsäure, die in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurden, tragen hingegen mit etwa 2 mg/d (Radtke *et al.* 1998) nur wenig zur Gesamtphenolsäurezufuhr bei. Die geringe Phenolsäureaufnahme dürfte daher vor allem durch die Restriktion des Kaffee- und Fruchtsaftverzehr (Kap. 4.1.3.3) zu erklären sein. Diese Lebensmittel zählen in Deutschland zu den wichtigsten Lieferanten für Phenolsäuren (Radtke *et al.* 1998).

Darüber hinaus lag die Energieaufnahme mit durchschnittlich etwa 1 900 kcal/d (Tab. 11) deutlich unterhalb der Richtwerte der DGE (vgl. Kap. 6.3.1). Da sich das Körpergewicht nicht signifikant veränderte, muss man davon ausgehen, dass die Verzehrsmengen von den Proband/inn/en unterschätzt wurden. Ein solches Underreporting durch Underrecording wird bei Ernährungserhebungen häufig beobachtet (Livingstone & Black 2003) und lässt daher nicht auf eine mangelnde Validität der Ernährungsprotokolle schließen. Da das Underreporting in den Gruppen RW, ERW und Kontrolle vor Beginn sowie während der Intervention gleichermaßen auftrat, handelt es sich um einen systematischen Fehler, der die Interpretation der Ergebnisse nicht beeinflusst.

Der Verzehr von Rotwein und entalkoholisierem Rotwein führte zu einem deutlichen Anstieg der Flavonoidaufnahme gegenüber dem Ausgangswert, aber auch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem lag die Flavonoidzufuhr in der Gruppe RW höher als bei ERW (Abb. 10), was sich durch den unterschiedlichen Polyphenolgehalt der beiden Getränke (Tab. 5) erklären lässt. Für die Phenolsäureaufnahme spielten dagegen vor allem die Ernährungsgewohnheiten der Proband/inn/en eine Rolle, der Beitrag von RW und ERW zur Phenolsäureaufnahme war gering. Entsprechend unterschied sich die Phenolsäurezufuhr in den Gruppen RW und ERW nicht von der Kontrollgruppe. Im Vergleich zum Ausgangswert kam es im Interventionszeitraum in allen drei Gruppen zu einem Anstieg, was auf saisonale Schwankungen der Verzehrsgewohnheiten oder Veränderungen des Ernährungsverhaltens durch die Teilnahme an der vorliegenden Studie (Møller & Loft 2002) schließen lässt. Da Phenolsäuren den größten Teil der Polyphenole ausmachen, gilt gleiches für die Gesamtphenolaufnahme (Tab. 10). Die beobachteten Effekte auf die DNA in der Gruppe Rotwein (Kap. 5.2.8) sind damit eher auf die enthaltenen Flavonoide als auf die Phenolsäuren zurückzuführen.

Die Vitamin C-Aufnahme der Proband/inn/en war mit 160 mg/d (Tab. 11) bedarfsdeckend (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000a) und veränderte sich im Verlauf der Studie nicht signifikant, so dass Einflüsse der Vitamin C-Zufuhr auf die Studienergebnisse nicht zu erwarten sind.

Die Compliance für die Alkoholrestriktion war gering. Vor bzw. während der Intervention verzichteten nur 22 bzw. 28 der 74 Proband/inn/en völlig auf alkoholische Getränke, auch in der Rotweingruppe wurde zusätzlich Alkohol getrunken (Tab. 11). Die durchschnittliche Alkoholaufnahme der Proband/inn/en – abgesehen von der Intervention mit Rotwein – lag mit durchschnittlich 5,8 – 7,5 g/d jedoch unterhalb der in Deutschland üblichen Verzehrmenge von 12,3 g/d bei Frauen und 20,9 g/d bei Männern (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000b). Da die Alkoholzufuhr gering war und sich in den Gruppen ERW und Kontrolle im Verlauf der Studie nicht veränderte, sind signifikante Einflüsse auf die Ergebnisse unwahrscheinlich.

6.4.2 Gesamtphenolgehalt im Plasma

Der Gesamtphenolgehalt im Plasma stieg im Gegensatz zur Kurzzeitstudie nur in der Rotweingruppe an, während er nach 6 Wochen täglichen Konsums von entalkoholisiertem Rotwein unverändert blieb (Abb. 11). Auch (Fuhrman *et al.* 1995) und (Nigdikar *et al.* 1998) konnten eine Steigerung des Gesamtphenolgehaltes in Plasma bei regelmäßigem Verzehr von nativem Rotwein nachweisen. Außerdem stiegen der Gesamtphenolgehalt in LDL-Partikeln (Fuhrman *et al.* 1995; Nigdikar *et al.* 1998) und die Konzentration einzelner Polyphenole im Plasma (Leighton *et al.* 1999; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001). Dagegen stimmt der unveränderte Gesamtphenolgehalt in der Gruppe ERW nicht mit den Ergebnissen anderer Interventionsstudien überein, bei denen auch entalkoholisierter Rotwein und Rotweinkapseln die Konzentration von Gesamtphenolen (Nigdikar *et al.* 1998) und einzelnen phenolischen Säuren (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001) im Plasma steigern konnten. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die geringe Zufuhrmenge von 175 mL/d in der vorliegenden Studie sein. Bei (Nigdikar *et al.* 1998) erhielten die Probanden 375 mL entalkoholisierten Rotwein bzw. die extrahierten Polyphenole aus dieser Menge, bei (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001) waren es 500 mL entalkoholisierter Rotwein.

Die unterschiedliche Wirkung von RW und ERW basiert wahrscheinlich auf dem vergleichsweise höheren Polyphenolgehalt im Rotwein (Tab. 5). Der unterschiedliche Alkoholgehalt dürfte hingegen keine Rolle spielen. Zwar gehen einige Autor/inn/en davon aus, dass Alkohol die Absorption von Rotweinpolyphenolen verbessert (Ruf *et al.* 1995; Miyagi *et al.* 1997; Duthie *et al.* 1998; Serafini *et al.* 2000), aktuelle Bioverfügbarkeitsstudien konnten dies jedoch nicht bestätigen (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000; Bub *et al.* 2001; Donovan *et al.* 2002; Frank *et al.* 2003; Goldberg *et al.* 2003).

6.4.3 Antioxidative Kapazität im Plasma

Der erhöhte Gesamtphenolgehalt im Plasma nach dem Verzehr von Rotwein führte nicht zu einem Anstieg der antioxidativen Kapazität, auch bei entalkoholisiertem Rotwein gab es keine Veränderungen der TEAC (Tab. 12). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen nach täglichem Konsum von 180 mL Rotwein über 10 Tage (Sharpe *et al.* 1995) bzw. von vier Gläsern über 3 Wochen (van der Gaag *et al.* 2000) keine Veränderungen der Serum-TEAC gemessen werden konnten. (Simonetti *et al.* 2002) weisen darauf hin, dass homöostatische Mechanismen mittelfristig eine Veränderung der antioxidativen Kapazität im

Plasma verhindern könnten. Dem gegenüber stehen jedoch die Beobachtungen von (Nigdikar *et al.* 1998), wonach die 2-wöchige Supplementierung von 1 – 2 g Rotweinpolyphenolen pro Tag einen Anstieg der TEAC im Plasma bewirkt. Auch Interventionsstudien, in denen andere antioxidative Wirkungen von Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein oder Rotweinextrakten mit anderen Parametern wie LDL-Oxidation, Lipidperoxidation oder F₂-Isoprostanen überprüft wurden, liefern kontroverse Ergebnisse (Kap. 2.3.4.2). Neben methodischen Differenzen ist dafür vermutlich die unterschiedliche Polyphenolaufnahme in den einzelnen Studien verantwortlich (Nigdikar *et al.* 1998; van Golde *et al.* 1999; Howard *et al.* 2002).

6.4.4 Antioxidantien im Plasma / Serum

Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die Zufuhr von Rotwein zu einem Anstieg der Uratkonzentration im Blut führte (van der Gaag *et al.* 2000; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001), konnten in der vorliegenden Studie wie bei (Struck *et al.* 1994) keine Veränderungen des Uratspiegels nachgewiesen werden (Tab. 13). Dies liegt vermutlich an der geringeren täglichen Zufuhr von 200 mL (vorliegende Studie) bzw. 180 mL (Struck *et al.* 1994) im Vergleich zu 375 mL (Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001) bzw. 4 Gläsern Rotwein (van der Gaag *et al.* 2000). Unerwartet kam es in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Uratkonzentration im Plasma. Die Veränderungen bewegten sich jedoch im Normbereich und hatten offensichtlich keinen Einfluss auf die Plasma-TEAC. Auch der leichte Rückgang des Plasma-Bilirubinspiegels in der Gruppe ERW (Tab. 13) ist vermutlich auf physiologische Schwankungen zurückzuführen und wegen des geringen Beitrags des Bilirubins zur antioxidativen Kapazität im Plasma nicht von Bedeutung. Auch die Albuminkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse, da sie in allen Gruppen unverändert blieb (Tab. 13).

Die Konzentrationen von Vitamin C im Plasma und α -Tocopherol im Serum wurden durch die regelmäßige Zufuhr von Rotwein und ERW nicht beeinflusst (Tab. 12). Dies entspricht den Ergebnissen der meisten anderen Interventionsstudien, in denen die Konzentrationen der beiden Vitamine im Blut nach täglichem Verzehr von Rotwein, entalkoholisierendem Rotwein oder Extrakten über mehrere Wochen untersucht wurden (Struck *et al.* 1994; Fuhrman *et al.* 1995; de Rijke *et al.* 1996; Chopra *et al.* 2000; van der Gaag *et al.* 2000; Abu-Amsha Caccetta *et al.* 2001). Mit signifikanten Einflüssen von Vitamin C oder α -Tocopherol auf die Ergebnisse für den Gesamtphenolgehalt und die TEAC-Messung ist damit nicht zu rechnen.

6.4.5 DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten

Während die endogenen DNA-Schäden bei regelmäßigem Verzehr von entalkoholisierendem Rotwein und in der Kontrollgruppe unverändert blieben, nahmen sie bei Rotwein im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ab (Abb. 12 / Tab. 14). Das Ausmaß der Strangbrüche, die *ex vivo* durch 300 μM H_2O_2 induziert wurden, veränderte sich hingegen in keiner der Gruppen. (Leighton *et al.* 1999) berichten nach einer 4-wöchigen Intervention mit 240 mL Rotwein täglich, kombiniert mit mediterraner oder fettreicher Kost, ebenfalls von einer Reduktion basaler DNA-Schäden, gemessen als 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) in peripheren Leukozyten. Die Wirkungen sind vermutlich auf die Polyphenole zurückzuführen, da auch die Supplementierung eines alkoholfreien Traubenkernextraktes (Simonetti *et al.* 2002) oder eine polyphenolreiche Diät, basierend auf grünem Tee und Zwiebeln (Lean *et al.* 1999), vor endogenen DNA-Schäden schützen können.

Während endogene DNA-Schäden durch den regelmäßigen moderaten Konsum von Rotwein abnahmen, konnten *ex vivo* durch H_2O_2 -induzierte DNA-Strangbrüche nicht verringert werden. (Pool-Zobel *et al.* 1997) machten bei Supplementierung von carotinoidreichen Gemüsesäften eine ähnliche Beobachtung, liefern dafür aber keine Erklärung. Möglicherweise ist die intrazelluläre Konzentration der Polyphenole ausreichend, um *in vivo* vor oxidativen DNA-Schäden zu schützen, aber zu gering, um unphysiologisch hohe Konzentrationen von H_2O_2 *ex vivo* abzufangen. Denkbar ist auch, dass der endogene protektive Effekt nicht (nur) auf direkte antioxidative Wirkungen zurückzuführen ist. Polyphenole könnten die endogene ROS-Produktion verringern, z.B., indem sie Enzyme wie die Lipoxygenase, Cyclooxygenase oder Xanthinoxidase inhibieren (Middleton *et al.* 2000). Auch die ROS-Produktion durch Makrophagen und Granulozyten kann durch Polyphenole inhibiert werden (de Whalley *et al.* 1990; Limasset *et al.* 1993; Robak & Gryglewski 1996; Aviram & Fuhrman 1998; Middleton *et al.* 2000). Diese Hinweise stammen jedoch aus *in vitro*-Studien. *Ex vivo* konnten in der vorliegenden Studie nach wiederholtem Konsum von RW oder ERW keine Veränderungen beim Respiratory Burst von Monozyten und Granulozyten festgestellt werden (Ellinger 2003). Zudem könnten DNA-stabilisierende Wirkungen (Duthie & Dobson 1999) oder eine beschleunigte Reparatur (Anderson *et al.* 2000; Ferguson 2001) *in vivo* vor DNA-Schäden schützen. Anhand der vorliegenden Daten können jedoch keine Aussagen über die zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen getroffen werden.

In der Gruppe ERW blieben die endogenen und H₂O₂-induzierten DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten unverändert. Dies ist plausibel, da weder der Gesamtphenolgehalt noch die Konzentrationen antioxidativer Vitamine im Plasma bzw. Serum durch den regelmäßigen Konsum des entalkoholisierten Rotweins beeinflusst wurden.

6.5 Vergleich zwischen kurz- und mittelfristigen Effekten

Der Verzehr von einem Glas RW oder ERW führte zu einem akuten Anstieg des Gesamtphenolgehaltes im Plasma, was die Beobachtungen anderer Autor/inn/en unterstützt, dass Alkohol für die Resorption von Polyphenolen nicht entscheidend ist (Donovan *et al.* 1999; Bell *et al.* 2000; Donovan *et al.* 2002; Bub *et al.* 2003; Goldberg *et al.* 2003). Bei regelmäßiger Zufuhr führte jedoch nur nativer Rotwein mittelfristig zu einer messbaren Akkumulation von phenolischen Komponenten im Plasma, was auf den höheren Flavonoidgehalt des Rotweins zurückzuführen sein dürfte.

In der Langzeitstudie wurde die TEAC in der Gruppe RW trotz eines Anstiegs der Gesamtphenolkonzentration im Plasma um durchschnittlich 5 % in der Gruppe RW nicht signifikant verändert. Dies könnte auf homöostatische Mechanismen für die antioxidative Kapazität hindeuten (Simonetti *et al.* 2002). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die TEAC-Methode nicht sensitiv genug ist, um bei gesunden Personen antioxidative Effekte nach Konsum von polyphenolreichen Lebensmitteln nachzuweisen (Cao & Prior 1998; Lean *et al.* 1999). Dies wird durch die Ergebnisse der Kurzzeitstudie gestützt, bei der trotz eines deutlich höheren Anstiegs des Gesamtphenolgehaltes im Plasma um etwa 15 %, der bei Rotwein zudem mit einer erhöhten Uratkonzentration einherging, kein reproduzierbarer Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma nachzuweisen war.

Die Messung von DNA-Strangbrüchen in peripheren Leukozyten lieferte widersprüchliche Ergebnisse. 360 min nach dem einmaligen Verzehr von Rotwein und entalkoholisiertem Rotwein stiegen die endogenen DNA-Schäden an, was auf direkte oder indirekte prooxidative Eigenschaften der Rotweinpolyphenole hindeutet. Im Gegensatz dazu kam es in der Langzeitstudie zu einer Reduktion der endogenen DNA-Strangbrüche. Dies war nur in der Gruppe RW der Fall, in der auch der Gesamtphenolgehalt im Plasma angestiegen war, was die Vermutung unterstützt, dass die Rotweinpolyphenole für die beobachteten Effekte verantwortlich sind.

Die Diskrepanz bei den Ergebnissen der SCGE in der Kurz- und Langzeitstudie deutet darauf hin, dass nach 6 Wochen regelmäßigen Konsums von Rotwein andere Polyphenole in Plasma und Zellen vorliegen als kurz nach der einmaligen Aufnahme. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Eliminationszeiten der einzelnen Polyphenole und ihrer verschiedenen Metaboliten (Donovan *et al.* 1999; Scalbert & Williamson 2000; Rechner *et al.* 2002) erklären. Hinweise darauf liefert auch eine Studie von (Boyle *et al.* 2000a), in der 4 - 7 h nach einer einmaligen Supplementierung von 500 mg Rutin hauptsächlich Quercetin, aber nur Spuren von Kämpferol und Isorhamnetin im Plasma gesunder Proband/inn/en nachgewiesen wurden. Dagegen führte die regelmäßige Einnahme über 6 Wochen zu einem 10-fachen Anstieg der Isorhamnetinkonzentration im Plasma, der Kämpferolspiegel stieg auf das 3-fache, während sich Quercetin nur um den Faktor 2,5 erhöhte. Um fundierte Aussagen in Bezug auf die vorliegende Studie treffen zu können, wären jedoch die Identifikation und Quantifizierung einzelner Rotweinpolyphenole und ihrer Metabolite im Plasma und in den Leukozyten notwendig.

Darüber hinaus könnte auch der Zeitpunkt des Rotweinkonsums (morgens nüchtern bzw. nach dem Abendessen) für die unterschiedlichen Effekte in der Kurz- und Langzeitstudie entscheidend gewesen sein (Natella *et al.* 2001). In zwei verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine fettreiche Mahlzeit die Lipidhydroperoxidkonzentration im Plasma gesunder Probanden steigert (Ursini *et al.* 1998) und mit einer Abnahme des Vitamin C-Spiegels im Plasma sowie von α -Tocopherol in LDL einhergeht (Natella *et al.* 2001). Zudem war die Empfindlichkeit von LDL gegenüber Cu-induzierter Oxidation erhöht (Natella *et al.* 2001). Die Gabe von 300 mL (Ursini *et al.* 1998) bzw. 400 mL Rotwein (Natella *et al.* 2001) zu den Mahlzeiten konnte diesen Effekten entgegenwirken. Möglicherweise wurden durch den Konsum von Rotwein in der Langzeitstudie unmittelbar nach dem Essen prooxidative Effekte der Abendmahlzeiten vermindert, was nach 6 Wochen zu einer messbaren Reduktion endogener DNA-Schäden führte. In der Kurzzeitstudie hingegen tranken die Proband/inn/en den Rotwein auf nüchternen Magen, wodurch andere Effekte der Rotweinpolyphenole zum Tragen kamen.

Obwohl nach 6-wöchigem Konsum von Rotwein der Gesamtphenolgehalt im Plasma anstieg und die endogenen DNA-Strangbrüche in Leukozyten abnahmen, waren die Zellen *ex vivo* nicht besser gegen H_2O_2 -induzierten oxidativen Stress geschützt als vor der Intervention, was die Annahme von (Duthie & Dobson 1999) und (Anderson *et al.* 2001) unterstützt, dass DNA-schützende Wirkungen von Polyphenolen nicht nur auf antioxidativen Effekten

beruhen. Auch die antioxidative Kapazität und die Konzentration von Vitamin C, α -Tocopherol und endogenen Antioxidantien im Blut blieben unverändert. Dies bestätigt die Vermutung aus der Kurzzeitstudie, dass weniger die Polyphenole, sondern eher andere Antioxidantien, z.B. Vitamin C, für die protektiven Effekte gegenüber H_2O_2 *ex vivo* verantwortlich sind.

6.6 Schlussfolgerung

Polyphenole aus Rotwein und entalkoholisierem Rotwein sind für den Menschen bioverfügbar, werden jedoch rasch ausgeschieden oder im Gewebe angereichert, was sich nach einmaligem Konsum der Getränke in einer vorübergehenden Erhöhung des Gesamtphenolgehaltes im Plasma widerspiegelt. Die Polyphenolkonzentrationen im Plasma sind zu gering, um eine konsistente Steigerung der antioxidativen Kapazität, gemessen als TEAC, zu erreichen. Ein vermehrtes Auftreten von endogenen DNA-Schäden in peripheren Leukozyten 360 min nach der Intervention mit RW bzw. ERW deutet erstmals auf genotoxische Effekte von Rotweinpolyphenolen *in vivo* hin. Diese sind nicht eindeutig auf prooxidative Wirkungen zurückzuführen, da ERW gleichzeitig in der Lage ist, oxidativem Stress *ex vivo* entgegenzuwirken.

Im Gegensatz dazu führt eine mittelfristige regelmäßige Aufnahme von nativem, aber nicht von entalkoholisierem Rotwein, zur Anreicherung von Polyphenolen im Plasma und schützt DNA von Leukozyten vor oxidativen Schäden *in vivo*, ohne die antioxidative Kapazität im Plasma zu verändern.

Dass das Auftreten endogener bzw. exogener DNA-Strangbrüche durch den Verzehr von Rotwein (Kurz- und Langzeitstudie) sowie entalkoholisierem Rotwein (Kurzzeitstudie) beeinflusst wird, deutet darauf hin, dass Polyphenole aus dem Plasma in periphere Leukozyten aufgenommen werden und dort biologisch relevante Effekte auslösen können.

Der Unterschied zwischen kurz- und mittelfristigen Effekten von Rotwein auf endogene DNA-Schäden in peripheren Leukozyten könnte auf der Akkumulation unterschiedlicher Polyphenole bzw. von deren Metaboliten beruhen, deren Wirkungen zum Teil stark voneinander abweichen. Um dies zu überprüfen, sollten in zukünftigen Studien neben dem Gesamtphenolgehalt auch einzelne phenolische Verbindungen in Plasma und Zellen

untersucht werden. Auch die Verzehrsgewohnheiten könnten für die genotoxischen bzw. DNA-schützenden Effekte entscheidend sein. Regelmäßig ein Glas Rotwein abends nach dem Abendessen zu trinken scheint dabei günstiger zu sein als der einmalige Verzehr der gleichen Menge morgens nüchtern. Da auch entalkoholisierter Rotwein in der Kurzzeitstudie zu vermehrten endogenen DNA-Strangbrüchen führte, scheint nicht der Alkohol, sondern eher die Polyphenole für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

Im Gegensatz zu Rotwein führt ERW bei wiederholtem moderatem Konsum weder zu einer Akkumulation von Polyphenolen im Plasma noch zu anti- oder prooxidativen Effekten. Die fehlende Wirkung ist eher auf die geringere Polyphenolkonzentration des entalkoholisierten Rotweins als auf den niedrigeren Alkoholgehalt zurückzuführen. In zukünftigen Studien zur Wirkung von nativem im Vergleich zu entalkoholisiertem Rotwein sollte daher auf eine identische Zusammensetzung der beiden Getränke geachtet werden. Da bei der Vakuumextraktion Polyphenolverluste nicht zu vermeiden sind, wäre der Einsatz von entalkoholisertem Rotwein, dem wie in Untersuchungen von (Bell *et al.* 2000) und (Donovan *et al.* 1999) die ursprüngliche Alkoholmenge zugesetzt wird, sinnvoll.

Die Diskrepanz zwischen dem vermehrten Auftreten endogener DNA-Schäden bei RW und ERW einerseits und einem signifikanten (Teil A) bzw. tendenziellen (Teil B) Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma nach dem Verzehr von Rotwein oder entalkoholisiertem Rotwein unterstreicht, dass sich anhand der TEAC im Plasma keine Aussagen über physiologische Effekte auf zellulärerer Ebene treffen lassen. Da zudem auch deutliche Veränderungen des Gesamtphenolgehaltes von Urat oder Vitamin C im Plasma mit der TEAC nicht erfasst wurden, scheint dieser Parameter für Interventionsstudien mit Lebensmitteln bei gesunden Proband/inn/en nicht geeignet zu sein.

Die biologische Relevanz der vorliegenden Daten ist unklar. Das vermehrte Auftreten endogener DNA-Schäden nach dem Verzehr von Rotwein und entalkoholisiertem Rotwein weist nicht zwingend auf genotoxische Effekte *in vivo* hin. Da bei der DNA-Reparatur vorübergehende Strangbrüche entstehen, könnte z.B. auch eine erhöhte Aktivität von Reparaturenzymen, die langfristig DNA-Schäden vermindert, in der SCGE zu einem Anstieg von endogenen DNS-Strangbrüchen führen (Duthie *et al.* 1996). Zudem stiegen die endogenen DNA-Schäden nur in der Kurzzeitstudie an, in der die Proband/inn/en den Rotwein bzw. entalkoholisierten Rotwein morgens nüchtern zu sich nahmen, was nicht den üblichen Verzehrsgewohnheiten entspricht.

Der einmalige Verzehr von entalkoholisierendem Rotwein schützt *ex vivo* die DNA peripherer Leukozyten vor H₂O₂-induzierten Strangbrüchen, was darauf hindeutet, dass das intrazelluläre antioxidative Potential durch ERW erhöht werden kann. Der sekundäre Anstieg von Vitamin C durch die Polyphenole aus entalkoholisierendem Rotwein scheint dabei ein wichtiger Faktor zu sein. Protektive Effekte gegenüber oxidativem Stress wurden jedoch nur *ex vivo* bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von H₂O₂ gemessen. Damit dürften sie *in vivo* wenig relevant sein, sofern keine Erkrankungen vorliegen, die mit erhöhtem oxidativem Stress einhergehen.

Durch die Reduktion von endogenen DNA-Schäden könnte der regelmäßige Konsum von Rotwein zu bzw. unmittelbar nach den Mahlzeiten vor Tumorerkrankungen schützen (Duthie *et al.* 1996). Auf Grund des Gefahrenpotentials einerseits und der möglichen protektiven Effekte andererseits sollten die Wirkungen von Rotwein auf endogene DNA-Schäden genauer untersucht werden. Da DNA-Strangbrüche in peripheren Leukozyten nicht unbedingt die Situation in anderen Geweben widerspiegeln, sollten dabei auch Zellen aus tumorgefährdeten Organen wie Blase, Rektum, Kolon oder Haut berücksichtigt werden (Duthie *et al.* 1996; Halliwell 2000).

7 Zusammenfassung

Rotwein ist ein polyphenolreiches Lebensmittel, dem vor allem auf Grund seiner antioxidativen Kapazität gesundheitsfördernde Eigenschaften zugesprochen werden. Humanstudien zur antioxidativen Wirkung von Rotwein *in vivo* liefern jedoch kontroverse Ergebnisse.

In einer Interventionsstudie mit gesunden Nichtraucher/inne/n wurde daher untersucht, ob moderater Konsum von Rotwein den Gesamtphenolgehalt im Plasma steigern kann und ob dadurch die antioxidative Kapazität im Plasma sowie die Konzentrationen verschiedener Antioxidantien im Blut beeinflusst werden. Darüber hinaus wurden antioxidative Wirkungen auf Leukozyten durch die Messung endogener sowie *ex vivo* durch Wasserstoffperoxid induzierter DNA-Strangbrüche erfasst. Da Rotwein auf Grund seines Alkoholgehaltes bei langfristigem regelmäßigem Konsum gesundheitliche Risiken birgt, sollte außerdem geprüft werden, ob entalkoholisierter Rotwein, der aus demselben Rotwein hergestellt wurde, vergleichbare Wirkungen hat und damit eine alternative Polyphenolquelle darstellen kann. Akute Effekte nach einmaligem Verzehr und mittelfristige Effekte nach mehrwöchigem regelmäßigem Konsum wurden differenziert betrachtet.

Nativer Rotwein führte sowohl bei einmaligem als auch bei regelmäßigem Verzehr zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtphenolkonzentration im Plasma, während die antioxidative Kapazität nur marginal verändert wurde. Ein vermehrtes Auftreten von DNA-Strangbrüchen *in vivo* und eine gleichzeitige Abnahme von Vitamin C im Plasma weist auf akute prooxidative und genotoxische Effekte von Rotwein hin. Ein mehrwöchiger Konsum reduzierte hingegen endogene DNA-Schäden und wirkt damit protektiv. Die Resistenz peripherer Leukozyten vor exogenem oxidativem Stress wurde durch nativen Rotwein weder akut noch mittelfristig verändert.

Polyphenole aus entalkoholisiertem Rotwein waren kurzfristig ebenso bioverfügbar wie solche aus nativem Rotwein, die antioxidative Kapazität im Plasma wurde dadurch tendenziell erhöht. Auch bei entalkoholisiertem Rotwein kam es akut zu einer Steigerung endogener DNA-Schäden, während exogene Strangbrüche reduziert wurden. Dies dürfte zumindest teilweise auf die Radikalfängerkapazität von Vitamin C zurückzuführen sein, da Vitamin C gleichzeitig – möglicherweise durch Sparwirkungen der Rotweinpolyphenole – im Plasma anstieg. Im Gegensatz zu nativem Rotwein führte entalkoholisierter Rotwein bei

mehrwöchigem Konsum weder zu einer Akkumulation von Polyphenolen im Plasma noch zu antioxidativen oder DNA-schützenden Wirkungen.

Da Wirkungen auf die DNA nur in Verbindung mit einem veränderten Gesamtphenolgehalt im Plasma auftraten, ist davon auszugehen, dass Rotweinpolyphenole in peripheren Leukozyten aufgenommen werden und dort zellphysiologisch relevante Effekte ausüben. Die Diskrepanz zwischen messbaren Effekten auf DNA-Strangbrüche in Leukozyten und dem Ausbleiben von TEAC-Veränderungen macht deutlich, dass die antioxidative Kapazität im Plasma nur geringe Aussagekraft über die anti- oder prooxidativen Wirkungen von Nahrungsmittelpolyphenolen *in vivo* hat.

Die Wirkungen von nativem und entalkoholisiertem Rotwein auf die Leukozyten-DNA sind widersprüchlich. Während der Anstieg endogener DNA-Schäden nach einmaligem Verzehr von Rotwein und entalkoholisiertem Rotwein auf genotoxische Effekte hindeutet, scheint nativer Rotwein mittelfristig vor DNA-Strangbrüchen *in vivo* zu schützen. Da endogene DNA-Schäden die Karzinogenese begünstigen, sollten die Mechanismen und die physiologische Relevanz der DNA-schützenden Effekte von Rotwein einerseits und des genotoxische Potentials andererseits in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

- Abu-Amsha Caccetta R, Burke V, Mori TA, Beilin LJ, Puddey IB, Croft KD (2001) *Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects.* Free Radic Biol Med 30(6): 636-642
- Abu-Amsha Caccetta R, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB (2000) *Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability.* Am J Clin Nutr 71: 67-74
- Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ (1996) *Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine.* Clin Sci 91: 449-458
- Abuja PM, Albertini R (2001) *Methods of monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins.* Clin Chim Acta 306: 1-17
- Adlercreutz H, Mazur W (1997) *Phyto-oestrogens and Western diseases.* Ann Med 29(2): 95-120
- Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE (2000) *Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids.* Free Radic Res 33: 91-103
- Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, Packer JE (2001) *Green tea catechins partially protect DNA from $\cdot\text{OH}$ radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals.* Carcinogenesis 22(8):1189-1193
- Arendt BM, Boetzer AM, Winkler P, Lemoch H, Rockstroh JK, Berthold HK, Spengler U, Goerlich R (2001) *Plasma antioxidant capacity of HIV-seropositive and healthy subjects during long-term ingestion of fruit juices or a fruit-vegetable-concentrate containing antioxidant polyphenols.* Eur J Clin Nutr 55: 786-792
- Arts ICW, Hollman PC, Bueno de Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D (2001) *Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study.* Int J Cancer 92(2): 298-302
- Arts ICW, van den Putte B, Hollmann PCH (2000a) *Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods.* J Agric Food Chem 48: 1746-1751
- Arts ICW, Van den Putte B, Hollmann PCH (2000b) *Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk.* J Agric Food Chem 48: 1752-1757
- Aruoma OI (1999) *Antioxidant actions of plant food: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy.* Free Radic Res 30: 419-427
- Australian Nutrition Foundation (2000) *Nutrition Australia.* abrufbar im November 2000 und Juli 2003 unter www.NutritionAustralia.org/Food_Facts/FAQ/red_wine_and_heart_disease_faq.asp
- Aviram M, Fuhrman B (1998) *Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis.* Atherosclerosis 137 Supplement: S45-S50
- Aziz AA, Edwards CA, Lean MEJ, Crozier A (1998) *Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O- β -glucoside and isorhamnetin-4'-O- β -glucoside by human volunteers after the consumption of onions.* Free Radic Res 29: 257-269

- Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller W-U, Streffer C (1999) *Optimization and standardization of the "Comet Assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells*. *Strahlenther Onkol* 175(7): 333-340
- Bavaresco L, Fregoni C, Cantù E, Trevisan M (1999) *Stilbene compounds: from the grapevine to the wine*. *Drugs Exp. Clin Res XXV(2/3)*: 57-63
- Beecher GR (1999) *Flavonoids in foods*. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (Hrsg.). *Antioxidant food supplements in human health*. San Diego: Academic Press.
- Belitz H-D, Grosch W (1992) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
- Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE (2000) *(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine*. *Am J Clin Nutr* 71: 103-108
- Benítez-Bribiesca L, Sánchez-Suártez P (1999) *Oxidative damage, bleomycin, and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes*. *Ann N Y Acad Sci* 887: 133-149
- Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L (1998) *Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity*. *Drugs Exp Clin Res* 24: 133-138
- Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP (1996) *Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats*. *Int J Tissue React* 18(2-3): 67-71
- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R (1994) *Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects*. *Mutat Res* 307(1): 323-333
- Block G (1999) *Emerging role of nutrition in chronic disease prevention: a look at the data, with an emphasis on vitamin C*. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (Hrsg.). *Antioxidant food supplements in human health*. San Diego / London: Academic Press. S. 45-54
- Block G, Patterson B, Subar A (1992) *Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. *Nutr Cancer* 17: 1-29
- Blot WJ, Chow W-H, McLaughlin JK (1996) *Tea and cancer: a review of the epidemiological evidence*. *Eur J Cancer Prevent* 5: 425-438
- Böhm H (2000) *Das Französische Paradoxon - Gesundheit durch Phenole des Weins? Teil 1: Phenolische Inhaltsstoffe von Wein*. *Ernährungs-Umschau* 47(2): 44-49
- Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Hinselwood DC, Kyle JA, Collins AR (2000a) *Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study*. *Eur J Clin Nutr* 54(10): 774-82.
- Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Kyle JAM, Collins AR (2000b) *Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal*. *Eur J Nutr* 39: 213-223
- Breinholt V, Dragsted LO (1998) *Structure-cytotoxicity relationships for dietary flavonoids*. In *Vitr Mol Toxicol* 11: 193-206
- Bronner WE, Beecher GR (1995) *Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates*. *J Chromatogr* 705: 247-256
- Brouillard R, George F, Fougérousse A (1997) *Polyphenols produced during red wine ageing*. *Biofactors* 6: 403-410

- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G (2003) *Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage*. J Nutr Biochem 14: 90-98
- Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K (2001) *Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice*. Eur J Nutr 40(3): 113-120
- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean MEJ, Duthie GG, Crozier A (2000) *Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines*. J Agric Food Chem 48: 220-230
- Cao G, Prior RL (1998) *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum*. Clin Chem 44(6): 1309-1315
- Cao G, Russel RM, Lischner N, Prior RL (1998) *Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women*. J Nutr 128(12): 2383-2390
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic Biol Med 22(5): 749-760
- Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, Dedeieu F, Descomps B (1997) *Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location*. Eur J Clin Nutr 51(10): 682-690
- Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R, Tonutti L, Taboga C (2001) *Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes*. Eur J Clin Invest 31(4): 322-328
- Chopra M, Fitzsimons PEE, Strain JJ, Thurnham DI, Howard AN (2000) *Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations*. Clin Chem 46: 1162-1170
- Collins A, Dušinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Rašlová K, Vaughan N (1997) *Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications*. Environ. Mol. Mutagen. 30: 139-146
- Collins AR (2002) *The comet assay. Principles, applications, and limitations*. Methods Mol Biol 203: 163-77.
- Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ (1995) *The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells*. Mutat Res 336: 69-77
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL (1993) *Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA*. Carcinogenesis 14: 1733-1735
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF (2000) *Intake of flavonoids and risk of dementia*. Eur J Epidemiol 16(4): 357-363
- Davies KJA (2000) *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. IUBMB Life 50: 279-289
- Day A, Stansbie D (1995) *Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate*. Clin Chem 41(9): 1319-1320

- Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D (1997) *Effect of concentrated grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation*. *Ann Nutr Metab* 41(6): 353-357
- de Groot H, Rauen U (1998) *Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids*. *Fundam Clin Pharmacol* 12: 249-255
- de Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AF (1996) *Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers*. *Am J Clin Nutr* 63(3): 329-334
- de Vries JHM, Hollman PCH, van Amersfoort I, Olthof MR, Katan MB (2001) *Red wine is a poor source of bioavailable flavonols in men*. *J Nutr* 131: 745-748
- de Whalley CV, Rankin SM, Hoult JRS, Jessup W, Leake DS (1990) *Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages*. *Biochem Pharmacol* 39(11): 1743-1750
- Déprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A (2000) *Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids*. *J Nutr* 130: 2733-2738
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2000a) *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE), Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE) (Hrsg.). Frankfurt am Main: Umschau/Braus
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2000b) *Ernährungsbericht 2000*. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) (Hrsg.). Frankfurt am Main: DGE
- Di Stefano R (1999) *Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines*. *Drugs Exp Clin Res* 2/3: 53-56
- Donovan JL, Bell JRC, Kasim- Karakas SE, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL (1999) *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *J Nutr* 129: 1662-1668
- Donovan JL, Kasim-Karakas S, German JB, Waterhouse AL (2002) *Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption*. *Br J Nutr* 87(1): 31-37
- Durak I, Avcı A, Kacmaz M, Büyükkocak S, Cimen MYB, Elgün S, Öztürk HS (1999a) *Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol*. *Curr Med Res Opin* 15(4): 316-320
- Durak I, Cimen MYB, Büyükkocak S, Kacmaz M, Öztürk HS (1999b) *The effect of red wine on blood antioxidant potential*. *Curr Med Res Opin* 15(3): 208-213
- Duthie GG (1999) *Determination of activity of antioxidants in human subjects*. *Proc Nutr Soc.* 58: 1015-1024
- Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, McJenkinson A, McPhail DB, Steele GM (1998) *The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers*. *Eur J Clin Nutr* 52: 733-736
- Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL (1997a) *Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes*. *Mutat Res* 393: 223-231
- Duthie SJ, Dobson VL (1999) *Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro*. *Eur J Nutr* 38: 28-34

- Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL (1997b) *The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells*. *Mutat Res* 390: 141-151
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR (1996) *Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes*. *Cancer Res* 59: 1291-1295
- Ellinger S (2003) *Untersuchungen zur Wirkung einer einmaligen und regelmäßigen Polyphenolaufnahme durch moderaten Rotweinkonsum auf das Apoptoseverhalten von T-Lymphozyten und die Phagozytose- und Burstaktivität von Granulozyten und Monozyten ex vivo (Abstract PI-49)*. *Proc Germ Nutr Soc* 5: 52
- Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Morozzi G (2001) *Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes*. *Nutr Cancer* 39(2): 284-291
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) *The comet assay: a comprehensive review*. *Mutat Res* 339: 37-59
- Fenech M, Stockley C, Aitken C (1997) *Moderate wine consumption protects against hydrogen peroxide-induced DNA damage*. *Mutagenesis* 12(4): 289-296
- Ferguson LR (2001) *Role of plant polyphenols in genomic stability*. *Mutat Res* 475: 89-111
- Formica JV, Regelson W (1995) *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. *Food Chem Toxicol* 33(12): 1061-1080
- Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R, Bitsch I (2003) *Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice*. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 423-435
- Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL (1998) *Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins*. *J Agric Food Chem* 46(3): 834-838
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) *Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine*. *Lancet* 341: 454-457
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL (1995) *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein*. *J Agric Food Chem* 43: 890-894
- Frémont L, Belguendouz L, Delpal S (1999) *Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids*. *Life Sci* 64(26): 2511-2521
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M (1995) *Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid-peroxidation*. *Am J Clin Nutr* 61(3): 549-554
- Gaté L, Paul J, Nguyen Ba G, Tew KD, Tapiero H (1999) *Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants*. *Biomed Pharmacother* 53: 169-180
- Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC (1999) *Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study*. *Arch Intern Med* 159(18): 2170-2174
- German BJ, Walzem RL (2000) *The health benefits of wine*. *Ann Rev Nutr* 20: 561-593
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C (1998) *Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine*. *J Agric Food Chem* 46(2): 361-367
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C (2000) *Total antioxidant capacity is a tool to assess redox status: a critical view and experimental data*. *Free Radic Biol Med* 29(11): 1106-1114

- Giovanelli L, Testa G, De Filippo C, Cheynier V, Clifford MN, Dolara P (2000) *Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo.* Eur J Clin Nutr 39: 207-212
- Goldberg DM, Karumanchiri A, Tsang E, Soleas GJ (1998a) *Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences.* Am J Enol Viticulture 49(1): 23-34
- Goldberg DM, Ng E, Yan J, Karumanchiri A, Soleas GJ, Diamandis EP (1996) *Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars.* J Wine Res 7(1): 13-24
- Goldberg DM, Tsang E, Karumanchiri A, Soleas GJ (1998b) *Quercetin and p-coumaric acid concentrations in commercial wines.* Am J Enol Viticulture 49(2): 142-151
- Goldberg DM, Yan J, Ng E, Diamandis EP, Karumanchiri A, Soleas GJ, Waterhouse AL (1995) *A global survey of trans-resveratrol concentrations in commercial wines.* Am J Enol Viticulture 46(2): 159-165
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ (2003) *Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects.* Clin Biochem 36: 79-87
- Greenrod W, Fenech M (2003) *The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide- and ionizing radiation-induced DNA damage in vitro.* Mutagenesis 18(2): 119-126
- Gutteridge JMC (1994) *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection.* Chem Biol Interact 91: 133-140
- Halliwell B (1996a) *Antioxidants in human health and disease.* Ann Rev Nutr 16: 33-50
- Halliwell B (1996b) *Commentary. Oxidative stress, Nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans.* Free Radic Res 25(1): 57-74
- Halliwell B (2000) *Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?* Am J Clin Nutr 72: 1082-1087
- Henn T, Stehle P (1998) *Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke.* Ernährungs-Umschau 45: 308-313
- Herrmann K (1989) *Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods.* Crit Rev Food Sci Nutr 28(4): 315-347
- Hertog MG, Bueno-de-Mesquita HB, Fehily AM, Sweetnam PM, Elwood PC, Kromhout D (1996) *Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5(9): 673-677
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993a) *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.* Lancet 342(8878): 1007-1011
- Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D (1997) *Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk.* Lancet 349(9053): 699
- Hertog MGL (1996) *Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids.* Proc Nutr Soc 55: 385-397
- Hertog MGL, Hollmann PCH, Katan MB (1992) *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands.* J Agric Food Chem 40: 2379-2383

- Hertog MGL, Hollmann PCH, Katan MB, Kromhout D (1993b) *Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands*. Nutr Cancer 20: 21-29
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB (1995) *Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study*. Arch Int Med 155: 381-386
- Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995) *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr 62: 1276-1282
- Hollman PCH, van den Gaag M, Mengelers MJB, van Trijp JMP, de Vries JHM, Katan MB (1996) *Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man*. Free Radic Biol Med 21(5): 703-707
- Hollmann PCH (2001) *Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?* J Sci Food Agric 81: 842-852
- Hollmann PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB (1995) *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr 32: 1276-1282
- Hollmann PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP, van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB (1997) *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. FEBS Lett 418: 152-156
- Howard A, Chopra M, Thurnham DI, Strain JJ, Fuhrman B, Aviram M (2002) *Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components?* Med Hypotheses 59(1): 101-104
- Jamroz A, Beltowski J (2001) *Antioxidant capacity of selected wines*. Med Sci Monitor 7(6): 1198-1202
- Johnsen SP, Overvad K, Stripp C, Tjønneland A, Husted SE, Sørensen HT (2003) *Intake of fruit and vegetables and the risk of ischemic stroke in a cohort of Danish men and women*. Am J Clin Nutr 78: 57-64
- Johnson MK, Loo G (2000) *Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA*. Mutat Res 459(3): 211-218
- Kähkönen MP, Heinonen M (2003) *Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons*. J Agric Food Chem 51(3): 628-633
- Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE (1994) *Natural antioxidants in grapes and wines*. J Agric Food Chem 42: 64-69
- Kasai H, Nishimura S (1991) *Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance*. In: Sies H (Hrsg.). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press. S. 99-116
- Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S (2000) *Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies*. Mutat Res 463: 13-31
- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D (1996) *Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study*. Arch Intern Med 156(6): 637-642
- Kerry NL, Abbey M (1997) *Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro*. Atherosclerosis 135(1): 93-102

- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A (1997) *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms*. Am J Epidemiol 146(3): 223-230
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A (2002) *Flavonoid intake and risk of chronic disease*. Am J Clin Nutr 76: 560-568
- Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, Tanahashi H, Koda H, Amachi T, Itakura H (1994) *Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine*. Lancet 344: 1152
- Lamuela-Raventós RM, de la Torre-Boronat MC (1999) *Beneficial effects of white wines*. Drugs Exp. Clin Res XXV(2/3): 121-124
- Lapidot T, Harel S, Granit R, Kanner J (1998) *Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine*. J Agric Food Chem 46: 4297-4302
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN (2000) *Intake of flavonoids and lung cancer*. J Natl Cancer Inst 92(2): 154-160
- Lean MEJ, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A (1999) *Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA*. Diabetes 48: 176-181
- Lecomte E, Herberth B, Pirolet P, Chancerelle Y, Arnaud J, Musse N, Paille R, Siest G, Artur Y (1994) *Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators*. Am J Clin Nutr 60: 255-261
- Lee M-J, Wang Z-Y, Li H, Chen L, Sun Y, Gobbo S, Balentine DA, Yang CS (1995) *Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 4: 393-399
- Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Pérez DD, Strobel P, San Martín A, Urzua U, Díez MS, Fonca R, Castillo O, Mizón C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germain A (1999) *Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans*. Drugs Exp Clin Res XXV(2/3): 133-141
- Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, Payette H, Wagner JR (1999) *Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes*. Carcinogenesis 20(4): 607-613
- Limasset B, Doucen C, Dore J, Ojasoo T, Damon M, Paulet AC (1993) *Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils: Multivariate analysis of structure activity relationships (SAR)*. Biochem Pharmacol 44: 1243-1248
- Linseisen J, Radtke J, Wolfram G (1997) *Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie*. Z Ernährungswiss 36: 403-412
- Livingstone MB, Black AE (2003) *Markers of the validity of reported energy intake*. J Nutr 133(Suppl. 3): 895S-920S
- Lodovici M, Guglielmi F, Casalini C, Meoni M, Cheynier V, Dolara P (2001) *Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine*. Eur J Clin Nutr 40: 74-77
- Lowry OH, Lopez JA, Bessey OA (1945) *Determination of ascorbic acid in small amounts of serum*. J Biol Chem 160: 609-615
- Lunec J, Winyard P (1998) *Reactive oxygen species: associated pathology*. J Int Fed Clin Chem 10(2): 42-44

- Malin AS, Qi D, Shu XO, Gao YT, Friedman JM, Jin F, Zheng W (2003) *Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer*. *Int J Cancer* 105(3): 413-418
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C (1998) *Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties*. *FEBS Lett* 426: 331-336
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T (2001) *Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in blood as the intact forms*. *J Agric Food Chem* 49(3): 1546-1551
- Mattivi U, Nicolini G (1997) *Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines*. *Biofactors* 6: 445-448
- Mattivi U, Zulian C, Nicolini G, Valenti L (2002) *Wine, biodiversity, technology, and antioxidants*. *Ann N Y Acad Sci* 957: 37-56
- Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G (1994) *Red wine and antioxidant activity in serum*. *Lancet* 344(8916): 193-194
- Maxwell S, Thorpe G (2000) *Impact of red wine on antioxidant status in vivo*. *Eur Heart J* 21: 1482-1485
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A (1993) *The single cell gel electrophoresis (comet assay): A European review*. *Mutat Res* 288: 47-63
- Middleton E, Kandaswami C (1992) *Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions*. *Biochem Pharmacol* 43(6): 1167-1179
- Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol Rev* 52: 673-751
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clin Sci* 84: 407-412
- Miyagi Y, Miwa K, Inoue H (1997) *Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice*. *Am J Cardiol* 80: 1627-1631
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K (1999) *Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans*. *J Agric Food Chem* 47: 1083-1091
- Møller P, Loft S (2002) *Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies*. *Am J Clin Nutr* 76(2): 303-310
- Muller CJ, Fuglsang KC (1997) *Red wine but not white: the importance of fully characterizing wines used in health studies*. *Am J Clin Nutr* 66: 447-451
- Natella F, Ghiselli A, Guidi A, Ursini F, Scaccini C (2001) *Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation*. *Free Radic Biol Med* 30(9): 1036-1044
- Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, D'Avanzo B, Parazzini F (1991) *Vegetable and fruit consumption and cancer risk*. *Int J Cancer* 48(3): 350-354
- Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN (1998) *Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo*. *Am J Clin Nutr* 68: 258-265

- Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly IE, Lean MEJ (2000) *Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion*. Eur J Clin Nutr 54: 143-149
- Olive PL (2002) *The comet assay. An overview of techniques*. Methods Mol Biol 203: 179-194
- Olthof MR, Hollmann PC, Katan MB (2001) *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. J Nutr 131(1): 66-71
- Östling O, Johanson KJ (1984) *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun 123: 291-298
- Öztürk HS, Kacmaz M, Cimen MYB, Durak I (1999) *Red wine and black grape strengthen blood antioxidant potential*. Nutrition 15(11/12): 954-955
- Paganga G, Rice-Evans CA (1997) *The identification of flavonoids as glycosides in human plasma*. FEBS Lett 401: 78-82
- Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E (1998) *Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status*. Biochem Mol Biol Int 46(5): 895-903
- Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G (1997) *Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods*. Carcinogenesis 18(9): 1847-1850
- Pool-Zobel BL, Bub A, Schröder N, Rechkemmer G (1999) *Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells*. Eur J Clin Nutr 38: 227-234
- Poon GK (1998) *Analysis of catechins in tea extracts by LC/MS (electro-spray ionization)*. J Chromatogr 794: 63-74
- Potter JD, Steinmetz K (1996) *Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents*. IARC Sci Publ 139: 61-90
- Pour Nikfardjam MS (2001) *Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung* [Dissertation]. Giessen: Justus-von-Liebig Universität, Institut für Oenologie und Getränkeforschung der Forschungsanstalt Geisenheim
- Pour Nikfardjam MS, Schmitt K, Rühl EH, Patz C-D, Dietrich H (2000) *Untersuchung rebsortenreiner Traubensäfte auf den Gehalt an Resveratrol-Derivaten*. Dt Lebensmittel-Rundschau Jhg 96(9): 319-324
- Prior RL, Cao G (1999) *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*. Free Radic Biol Med 27(11/12): 1173-1181
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (1998) *Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie*. Z Ernährungswiss 37: 190-197
- Rechner A, Patz C-D, Dietrich H (1997) *Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke*. Flüssiges Obst Jhg. 64(2): 62-65
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002) *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radic Biol Med 33(2): 220-235
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet 339(8808): 1523-1526
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic Biol Med 20(7): 933-956
- Rice-Evans CA, Packer L (1998) *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker

- Rifici VA, Schneider SH, A.K. K (2002) *Lipoprotein oxidation mediated by J74 murine macrophages is inhibited by individual red wine polyphenols but not by ethanol*. J Nutr 132(9): 2532-2537
- Rifici VA, Stephan EM, Schneider SH, A.K. K (1999) *Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL*. J Am Coll. Nutr 8(2): 137-143
- Rigo A, Vianello F, Clementi G, Rosetto M, Scarpa M, Vrhovsek U, Mattivi U (2000) *Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines*. J Agric Food Chem 48: 1996-2002
- Riso P, Santangelo A, Porrini M (1999) *The comet assay for the evaluation of cell resistance to oxidative stress*. Nutrition Research 19(3): 325-333
- Robak J, Gryglewski RJ (1996) *Bioactivity of flavonoids*. Pol J Pharmacol 48: 555-564
- Roig R, Cascón E, Arola L, Bladé C, Salvadó MJ (2002) *Procyanidins protect FaO cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress*. Biochim Biophys Acta 1572: 25-30
- Ruf JC, Berger JL, Renaud S (1995) *Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15(1): 140-144
- Sahu SC, Gray GC (1993) *Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin*. Cancer Lett 70(1-2): 73-79
- Sahu SC, Gray GC (1994) *Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation*. Cancer Lett 85(2): 159-164
- Salganik R (2001) *The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population*. J Am Coll. Nutr 20(5): 464S-472S
- Scalbert A, Williamson G (2000) *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J Nutr 130: 2073S-2085S
- Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A (1996) *In vivo antioxidant effect of green and black tea in man*. Eur J Clin Nutr 50(1): 28-32
- Serafini M, Laranjinha JAN, Almeida LM, Maiani G (2000) *Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans*. J Nutr Biochem 11: 585-590
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A (1997) *Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions*. J Agric Food Chem 45(8): 3148-3151
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A (1998) *Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans*. J Nutr 128: 1003-1007
- Shaheen SO, Sterne JA, Thompson RL, Songhurst CE, Margetts BM, Burney PG (2001) *Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study*. Am J Respir. Crit. Care Med 164(10 Pt 1): 1823-1828
- Sharpe PC, McGrath LT, McClean E, Young IS, Archbold GPR (1995) *Effect of red wine consumption on lipoprotein (a) and other risk factors for atherosclerosis*. Q J Med 88: 101-108
- Sies H (1985) *Oxidative stress: Introductory remarks*. In: Sies H (Hrsg.). Oxidative Stress. London: Academic Press. S. 1-8
- Simonetti P, Ciappellano S, Gardana C, Bramati L, Pietta P (2002) *Procyanidins from Vitis vinifera seed: in vivo effects on oxidative stress*. J Agric Food Chem 50: 6217-6221

- Simonetti P, Gardana C, Pietta P (2001) *Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake*. J Agric Food Chem 49(12): 5964-5968
- Singleton VL, Rossi JA, Jr (1965) *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Am J Enol Viticulture 16: 144-158
- Skibola CF, Smith MT (2000) *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*. Free Radic Biol Med 29(3/4): 375-383
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997a) *Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention*. J Clin Lab Anal 11: 287-313
- Soleas GJ, Tomlinson G, Diamandis EP, Goldberg DM (1997b) *Relative contributions of polyphenolic constituents to the antioxidant status of wines: Development of a predictive model*. J Agric Food Chem 45: 3995-4003
- Speitling A, Hüppe R, Kohlmeier M, Matiaske B, Stelte W, Thefeld W, Wetzel S (1992) *VERA-Schriftenreihe*. Kübler W, Anders H-J, Heeschen W, Kohlmeier M (Hrsg.). Niederkleen: Wiss. Fachverlag Dr. Fleck. S. 100-102
- Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Srai SK, Debnam ES, Rice-Evans C (2001) *Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine*. Biochem Biophys Res Commun 285(3): 588-593
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2003) *Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2001*. Abrufbar im Juli 2003 unter www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm
- Stavric B (1984) *Mutagenic food flavonoids*. Fed Proc 43: 2454-2458
- Steinberg D (1997) *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem 272: 20963-20966
- Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean ME, Crozier A (2000) *Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products*. J Agric Food Chem 48(7): 2663-2669
- Struck M, Watkins T, Tomeo A, Halley J, Bierenbaum M (1994) *Effect of red and white wine on serum lipids, platelet aggregation, oxidation products and antioxidants: a preliminary report*. Nutr Res 14: 1811-1819
- Suresh MV, Lal JJ, Sreeranjit kumar CV, Indira M (1999) *Ascorbic acid metabolism in rats and guinea pigs after the administration of ethanol*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 124(2): 175-179
- Szeto YT, Benzie IF (2002) *Effects of dietary antioxidants on human DNA ex vivo*. Free Radic Res 36(1): 113-118
- Takahama U (1985) *Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function*. Phytochemistry 24: 1143-1146
- Teissedre PL, Waterhouse AL, Frankel EN (1995) *Principal phenolic phytochemicals in French Syrah and Grenache Rhone wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins*. J Int Sci Vigne Vin 29: 205-212
- Tubaro F, Rapuzzi P, Ursini F (1999) *Kinetic analysis of antioxidant capacity of wine*. Biofactors 9: 37-47
- Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bittolo Bon G, Sevanian A (1998) *Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis*. Free Radic Biol Med 25(2): 250-252

- United States Department of Agriculture (USDA) (2000) *Nutrition and your health: Dietary guidelines for Americans*. Abrufbar im November 2000 unter www.health.gov/dietaryguidelines/dga2000/dietGD.pdf
- van der Gaag MS, van den Berg R, van den Berg H, Schaafsma G, Hendriks HF (2000) *Moderate consumption of beer, red wine and spirits has counteracting effects on plasma antioxidants in middle-aged men*. Eur J Clin Nutr 54(7): 586-591
- van Golde PHM, Sloots LM, Vermeulen WP, Wielders JPM, Hart HC, Bouma BN, van de Weil A (1999) *The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine*. Atherosclerosis 147: 365-370
- van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB (1999) *Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption*. Proc Soc Exp Biol Med 220: 203-209
- Vinson JA, Hontz BA (1995) *Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines*. J Agric Food Chem 43: 401-403
- vitamin be classic + new media (2003) *Labormanual*. Abrufbar im Juli 2003 unter <http://www.vitamin.be/labor-bo/b/3.html>
- Waterhouse AL (2002) *Wine phenolics*. Ann N Y Acad Sci 957: 21-36
- Waterhouse AL, Teissedre PL (1997) *Levels of phenolics in California varietal wines*. In: Watkins TR (Hrsg.). Wine. Nutritional and Therapeutic Benefits. Washington DC: American Chemical Society. S. 12-23
- Watzl B, Leitzmann C (1995) *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Stuttgart: Hippokrates-Verlag
- Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A (1995) *Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum*. Clin Chem 41(1): 32-35
- Woodford FP, Whitehead TP (1998) *Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful?* Ann Clin Biochem 35: 48-56
- Yamanaka H (1996) *Alcohol ingestion and hyperuricemia (Abstract)*. Nippon Rinsho 54(12): 3369-73.
- Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark HL (2001) *Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*. Ann Rev Nutr 21: 381-406
- Young JF, Dragsted LO, Daneshvar B, Lauridsen ST, Hansen M, Sandström B (2000) *The effect of grape-skin extract on oxidative status*. Br J Nutr 84: 505-513
- Yunice AA, Hsu JM, Fahmy A, Henry S (1984) *Ethanol-ascorbate interrelationship in acute and chronic alcoholism in the guinea pig*. Proc Soc Exp Biol Med 177(2): 262-271

1.1 Anhang A: Fragebogen für Proband/inn/en

Name:

Anschrift:

Telefon:

E-mail:

Geburtsdatum:

Geschlecht:

Zutreffendes bitte ankreuzen

	Ja	Nein
1.2 Schwangerschaft und Stillzeit		
Nehmen Sie orale Kontrazeptive („Pille“) ein?		
Sind Sie schwanger?		
Stillen Sie?		
1.3 Erkankungen		
Leiden Sie unter Bluthochdruck?		
Leiden Sie unter Hyperurikämie (erhöhte Harnsäurewerte) / Gicht?		
Leiden Sie an einer Störung des Fettstoffwechsels (Cholesterin, Triglyceride)?		
Leiden Sie an einer Lebererkrankung?		
Leiden Sie an einer Erkrankung der Bauchspeicheldrüse?		
Leiden Sie an einer Erkrankung des Magen-Darm-Traktes?		
Leiden Sie an Nierenfunktionsstörungen?		
Leiden Sie an Autoimmunerkrankungen (z.B. Morbus Addison, Lupus Erythematodes, Diabetes Typ I, Hashimoto Thyreoditis, primäres Myxödem, Colitis Ulcerosa, Rheumatoide Arthritis)?		
Leiden Sie unter sonstigen Erkrankungen des Immunsystems?		
Leiden Sie im Moment unter einer Infektionskrankheit?		
Leiden Sie unter Essstörungen?		
Leiden Sie unter einer Hühnereiweißallergie?		

Zutreffendes bitte ankreuzen

	Ja	Nein
Haben Sie sonstige gesundheitliche Probleme?		
Wenn ja, welche?		
1.4 Medikamente		
Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?		
Wenn ja, welche?		
1.5 Genussmittel und Drogen		
Trinken Sie mehr als 1 L Bier, 0,5 L Wein, oder 0,1 L Spirituosen täglich?		
Nehmen Sie BTMG-pflichtige Drogen?		
Rauchen Sie?		
Wenn ja, wieviel? Zigaretten pro Tag		
Haben Sie in den letzten 6 Monaten geraucht?		
1.6 Nahrungsergänzungsmittel		
Nehmen Sie Nahrungsergänzungsmittel ein (z.B. Vitaminpräparate, Fischöl- oder Rotweinkapseln, Bioaktivkonzentrate, Mineralstofftabletten, Eiweißpräparate)?		
Wenn ja, welche?		
1.7 Sport		
Treiben Sie regelmäßig Sport?		
Wenn ja, wie oft? Stunden pro Woche		
1.8 Teilnahme an anderen Studien		
Nehmen Sie im Moment an einer anderen klinischen Studie teil?		
Haben Sie während der vergangenen 30 Tage an einer anderen klinischen Studie teilgenommen?		

Anhang B: Liste polyphenolarmer und –reicher Lebensmittel

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

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

Anhang C: Analysedaten des nativen und entalkoholisierten Rotweins

Jahrgang		1999	
Bezeichnung		Marienthaler Klostergarten QbA	
Rebsorte		Spätburgunder	
		Rotwein	entalkoholierter Rotwein
Dichte		0,9936	1,0105
Alkohol vorhanden	% Vol	12,08	0,61
Extrakt	g/L	25,4	33,2
zuckerfreier Extrakt	g/L	20,7	27,6
Zucker vor Inversion	g/L	4,7	5,5
Zucker nach Inversion	g/L	4,7	5,6
Glucose	g/L	1,13	1,14
Fructose	g/L	1,21	1,27
pH - Wert		3,51	3,44
Gesamtsäure	g/L	4,6	5,0
flüchtige Säure	g/L	0,66	0,56
Weinsäure	g/L	1,63	2,59
Äpfelsäure	g/L	0,23	n.n.
Milchsäure	g/L	1,67	2,03
Citronensäure	g/L	n.n.	n.n.
Shikimisäure	mg/L	9,0	14,0
freie SO ₂	mg/L	8,0	8,0
Reduktone	mg/L	4,0	2,0
Gesamt SO ₂	mg/L	63	102
Gallussäure	mg/L	40,1	53,5
Caftar Säure	mg/L	32,4	31,4
p-CGT	mg/L	10,4	12,1
Catechin	mg/L	132,3	61,7
Epicatechin	mg/L	71,8	48,2
Päonidinglucosid	mg/L	7,8	4,4
Malvidinglucosid	mg/L	63,2	39,8
Gesamtphenole Folin	mg/L	1.466	1.552
TEAC	mmol/L	19,2	15,3

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; p-CGT: p-Coumaroyl-glucosyl-tartrat; n.n.: nicht nachweisbar

Die Analysen wurden freundlicherweise von der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung, unter der Leitung von Prof. Dr. H. Dietrich durchgeführt.

Anhang D: Herstellerangaben zum Mineralwasser für die Kurzzeitstudie

Markus Brunnen, natürliches Mineralwasser

Mit Kohlensäure versetzt, enteisent

Aus dem Markus Brunnen, Rosbach

Still

Kationen		
Natrium (Na ⁺)	mg/L	45,1
Kalium (K ⁺)	mg/L	3,1
Magnesium (Mg ²⁺)	mg/L	34,2
Calcium (Ca ²⁺)	mg/L	89,1
Anionen		
Chlorid (Cl ⁻)	mg/L	90,2
Sulfat (SO ₄ ²⁻)	mg/L	10,1
Hydrogencarbonat (HCO ₃ ⁻)	mg/L	411,0

Anhang E: Ernährungsprotokoll

Ernährungsprotokoll vom bis

Name: _____
 Adresse: _____
 Alter (Jahre): _____
 Größe (cm): _____
 Gewicht zu Beginn: _____ kg
 Gewicht am Ende: _____ kg
 Protokolltage: _____

ProbandIn Nr. _____

Beachten Sie bitte beim Ausfüllen:

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

Lebensmittel	Anzahl	Sum	Kücheneinheit
Brot			
Graubrot			Scheibe 40 g
Weißbrot, Toast			Scheibe 25 g
1/2 Brötchen			Stück 25 g
1/2 Vollkornbrötchen			Stück 30 g
Vollkornbrot			Scheibe 45 g
Knäcke, Zwieback			Scheibe 10 g
Brotaufstrich			
Butter			Teelöffel 5 g
Margarine			Teelöffel 5 g
Margarine halbfett			Teelöffel 5 g
Wurst			Portion 25 g
Wurst fettreduziert			Portion 25 g
Käse unter 20% Fett			Portion 30 g
Käse 20-40% Fett			Portion 30 g
Käse über 40% Fett			Portion 30 g
Süße Aufstriche			
Honig			Teelöffel 10 g
Nußnougatcreme			Portion 20 g
Konfitüre, Gelee			
Aprikose			Teelöffel 10 g
Pfirsich			Teelöffel 10 g
Sauerkirsche			Teelöffel 10 g
Pflaumen			Teelöffel 10 g
Erdbeer			Teelöffel 10 g

Himbeer			Teelöffel 10 g
Brombeer			Teelöffel 10 g
Heidelbeer			Teelöffel 10 g
Johannisbeere rot			Teelöffel 10 g
Johann. schwarz			Teelöffel 10 g
Hagebutte			Teelöffel 10 g
Sonst. Marmeladen			Teelöffel 10 g
Frühstücksallerlei			
Magerquark			Esslöffel 30 g
Speisequark			Esslöffel 30 g
Eier			Stück 60 g
Haferflocken, trocken			Esslöffel 10 g
Müsli, trocken			Esslöffel 15 g
Frischkornbrei			Tasse 125 g
Cornflakes, trocken			Tasse 20 g
Frühstückscerealien			Tasse 30 g
Heiße Getränke			
Kaffee			Tasse 150 g
Tee schwarz			Tasse 125 g
Tee grün			Tasse 125 g
Mate-Tee			Tasse 125 g
Pfefferminztee			Tasse 125 g
Kräutertee			Tasse 125 g
Malzkaffee			Tasse 150 g
Kakao			Tasse 150 g

Milch und Milchprodukte			
Kondensmilch			Teelöffel 5 g
Trinkmilch 3,5% Fett			Glas 200 g
Trinkmilch 1,5% Fett			Glas 200 g
Buttermilch			Tasse 150 g
Joghurt mit Früchten 3,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt mit Früchten 1,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt 3,5 % Fett			Becher 150 g
Joghurt 1,5 % Fett			Becher 150 g
Quark mit Früchten			Esslöffel 30 g
Quark mit Kräutern			Esslöffel 30 g
Rahm, Schmand			Esslöffel 25 g
Fleisch, Geflügel			
Kotelett, Schnitzel			Portion 125 g
Steak, Schnitzel natur			Portion 125 g
Putenschnitzel			Stück 125 g
Braten			Portion 125 g
Gulasch, Ragout			Portion 125 g
Bratwurst			Stück 150 g
Würstchen, Bockwurst, Wiener			Stück 125 g
Fleisch-, Kochwurst			Portion 100 g
Frikadelle, Klops			Stück 100 g
Eisbein, Haxe			Portion 130 g
1/2 Hähnchen			Stück 300 g
Leber, Herz, Niere			Portion 125 g
Mett, Gehacktes			Portion 125 g
Tatar, Schabefleisch			Portion 70 g
Speck, Bauchfleisch			Scheibe 50 g
Fisch			
Fisch, gekocht			Portion 150 g
Fisch, gebraten			Portion 150 g
Fischstäbchen			Stück 30 g
Fischkonserven			Dose 180 g
Fisch, geräuchert			Stück 70 g
Rollmops, Matjes			Stück 90 g
Krustentiere			Portion 100 g
Beilagen			
Kartoffeln			Stück 80 g
Kartoffelpüree			Portion 150 g
Klöße, Knödel			Stück 80 g
Bratkartoffeln			Portion 150 g
Pommes frites			Portion 100 g
Kartoffelpuffer			Stück 70 g
Reis, gekocht			Tasse 100 g
Naturreis, gekocht			Tasse 100 g
Eiernudeln, gekocht			Tasse 100 g
Nudeln ohne Ei, gekocht			Tasse 100 g
Vollkornnudeln, gekocht			Tasse 100 g

Soßen			
Bratensoße			Portion 60 g
Tomatensoße			Portion 60 g
Hackfleischsoße			Esslöffel 20 g
Béchamelsoße			Portion 60 g
Pilzsoße mit Sahne			Portion 60 g
Fertig- und Schnellgerichte			
Pizza			Stück 300 g
Döner Kebab			Portion 350 g
Nudelaufguss (Schinken, Käse)			Portion 350 g
Hamburger			Portion 150 g
Gemüseburger			Portion 200 g
Getreidebratling			Portion 200 g
Gemüse			
Blattgemüse			
Spinat tiefgefroren			Portion 150 g
Bleichsellerie			Portion 150 g
Sellerie			Portion 150 g
Mangold			Portion 150 g
Kohlgemüse			
Blumenkohl			Portion 150 g
Broccoli			Portion 150 g
Chinakohl			Portion 150 g
Grünkohl / Braunkohl			Portion 150 g
Kohlrabi			Portion 150 g
Rosenkohl			Portion 150 g
Rotkohl / Blaukraut			Portion 150 g
Weißkohl / Weißkraut			Portion 150 g
Sprossen- und Lauchgemüse			
Artischocken			Portion 150 g
Fenchel			Portion 150 g
Spargel weiß			Portion 200 g
Porree / Lauch			Portion 200 g
Zwiebeln			Portion 30 g
Knoblauch			Portion 2 g
Fruchtgemüse			
Aubergine			Portion 150 g
Okra			Portion 150 g
Paprika grün			Portion 150 g
Paprika gelb			Portion 150 g
Paprika rot			Portion 150 g
Tomaten			Stück 60 g
Wurzel- und Knollengemüse			
Rote Rübe / Rote Bete			Portion 150 g
Weißer Rübe			Portion 150 g
Mohrrübe			Portion 150 g
Pastinake			Portion 150 g
Schwarzwurzel			Portion 150 g
Knollensellerie / Wurzelsellerie			Portion 150 g

Pilze			
Champignons			Portion 100 g
Sonst. Pilze			Portion 100 g
Hülsenfrüchte			
Bohnen grün gegart			Portion 150 g
Erbsen gegart			Portion 60 g
Wachsbohnen gegart			Portion 150 g
Bohnen dick, Konserve			Portion 150 g
Sojabohnen gegart			Portion 150 g
Bambussprossen gegart			Portion 150 g
Kichererbsen gegart			Portion 150 g
Suppen, Eintöpfe			
Klare Suppe			Teller 300 g
Erbsen-, Linsen-suppe, Konserve			Teller 250 g
Champignoncremesuppe			Teller 320 g
Gemüsesuppe (Minestrone)			Teller 350 g
Tomatensuppe			Teller 300 g
Französische Zwiebelsuppe			Teller 300 g
Eintopf			Teller 450 g
Salat			
Rettich			Portion 150 g
Radieschen			Portion 100 g
Gurke			Portion 100 g
Chicoree			Portion 50 g
Endivien			Portion 50 g
Eisbergsalat			Portion 50 g
Feldsalat (Rapunzel)			Portion 50 g
Kopfsalat			Portion 50 g
Romanasalat			Portion 50 g
Kresse frisch			Portion 150 g
Oliven grün			Portion 20 g
Oliven schwarz			Portion 20 g
Kartoffelsalat			Portion 150 g
Fleischsalat			Portion 50 g
Heringssalat			Portion 50 g
Essiggurken			Portion 100 g
Alkoholfreie Getränke			
Fruchtsaft, Nektar			
Apfel Fruchtsaft			Glas 200 g
Apfel Fruchtnektar			Glas 200 g
Birne Fruchtsaft			Glas 200 g
Birne Nektar			Glas 200 g
Aprikose Nektar			Glas 200 g
Pfirsich Nektar			Glas 200 g
Sauerkirsche Nektar			Glas 200 g
Pflaumen Nektar			Glas 200 g
Himbeere Nektar			Glas 200 g
Traubensaft rot			Glas 200 g
Traubensaft weiß			Glas 200 g

Johannisbeere rot Nektar			Glas 200 g
Johannisbeere schwarz Nektar			Glas 200 g
Holunderbeere Fruchtsaft			Glas 200 g
Ananas Fruchtsaft			Glas 200 g
Ananas Nektar			Glas 200 g
Banane Nektar			Glas 200 g
Mango Fruchtsaft			Glas 200 g
Mango Nektar			Glas 200 g
Maracuja Nektar			Glas 200 g
Orange Fruchtsaft			Glas 200 g
Orange Nektar			Glas 200 g
Grapefruit Fruchtsaft			Glas 200 g
Grapefruit Nektar			Glas 200 g
Gemüsesaft			Glas 200 g
Softdrinks			
Limonaden			Glas 200 g
Diätgetränke			Glas 200 g
Colagetränke (coffeinhaltig)			Glas 200 g
Cola light			Glas 200 g
Cola Mix			Glas 200 g
Malzbier			Glas 330 g
Wasser, Mineralwasser			Glas 200 g
Alkoholische Getränke			
Bier			Glas 300 g
Bier alkoholfrei			Glas 300 g
Weißwein			Glas 130 g
Rotwein			Glas 130 g
Roséwein			Glas 130 g
Sekt			Glas 100 g
Apfelwein			Glas 130 g
Likörweine			Glas 50 g
Liköre			Schnapsglas 20 g
Spirituosen			Schnapsglas 20 g
Obst			
Kern-, Steinobst			
Apfel			Stück 125 g
Orange / Apfelsine			Stück 150 g
Grapefruit			Portion 125 g
Mandarine, Clementine			Stück 40 g
Birne			Stück 140 g
Quitte			Portion 125 g
Aprikose /Marille			Portion 125 g
Pfirsich			Portion 125 g
Süßkirsche			Portion 125 g
Kirschen Konserve			Portion 125 g
Pflaumen			Portion 35 g
Beerenobst			
Erdbeere			Portion 125 g
Himbeere			Portion 125 g
Brombeere			Portion 125 g

Anhang F: Polyphenoldatenbank**Flavonoide**

	Flavonoidgehalt [mg/kg] bzw. [mg/L]											
	Kae	Que	Myr	Cat	Ecat	EgC	GC	Nar	Cy	Päo	Pet	Mal
Obst												
Apfel	2,2	32,2		9,5 ^a	81,4 ^a	1,0	4,2					
Apfelsaft		12,1	0,0	12,7					56,3			
Apfelsine		43,2							145,2			
Apfelsinensaft		7,8	0,0						44,0			
Aprikose	1,5	10,2		46,0	151,8	0,0	0,0					
Aprikosenmarmelade	1,1	14,1										
Aprikosensaft	0,5	10,5										
Birne	2,0	11,7		5,5	23,3	0,0	0,0					
Birnenensaft		1,9		2,3	14,7							
Brombeeren	12,2	44,7		14,0	112,0	0,0	0,0		866,8			
Erdbeeren	18,0	21,0		33,8	1,9	0,0	0,7					
Erdbeermarmelade	10,0	5,3										
Grapefruit	0,0	14,4		48,0					541,4			
Grapefruitsaft		4,9	0,0						254,3			
Heidelbeeren		25,6		11,7	12,7	0,0	0,0		111,9	330,8	152,0	370,9
Himbeeren	16,7	23,7		8,3	35,5	0,0	0,0		614,0			
Johannisbeeren, rot		15,0		6,5	5,2	2,4	4,7					
Johannisb., schwarz	0,5	69,1		4,0	1,7	3,5	2,0		651,8			
Kirsche, sauer	7,6	8,4		15,6	98,2	5,3	19,0					
Kirsche, süß	2,0	7,7		13,4	33,9	0,0	0,0		377,9	0,3		
Kiwi	1,4	1,7										
Passionsfruchtsaft												
Pfirsich	1,2	1,8		85,0	6,3	3,0	4,0					
Pfirsichmarmelade	1,5	4,4										
Pflaume	3,4	9,1		16,2	7,4	0,0	0,0					
Pflaumenmarmelade		12,7										
Pflaumensaft				84,0								
Preiselbeeren	0,6	156,0	13,9						320,7	68,3		
Stachelbeeren				21,5	2,0	0,0	0,0					
Traubensaft		4,2	6,2	4,1	1,1			0,9				
Weintrauben, rot	0,5	24,1	7,1	89,4 ^b	86,4 ^b			3,1		61,0	74,7	233,3
Weintrauben, weiß	3,1	22,2	2,3									
Zitrone		28,8							13,2			
Zitronensaft		10,9							8,8			

	Flavonoidgehalt [mg/kg] bzw. [mg/L]											
	Kae	Que	Myr	Cat	Ecat	EgC	GC	Nar	Cy	Päo	Pet	Mal
Gemüse												
Aubergine	0,0	0,0										
Blumenkohl	1,0	0,5										
Bohnen, grün	6,0	34,0										
Bohnen, weiß	0,0	20,0	26,0									
Brokkoli	58,0	22,0										
Endivie	46,0	1,3										
Grünkohl	105,5	60,0										
Kopfsalat	1,0	14,0										
Möhre			0,0									
Paprika			0,0									
Porree	55,8	5,1										
Radieschen	6,2	1,0										
Rettich	6,2	0,0										
Rosenkohl	7,4	0,5										
Rotkohl	0,0	5,1										
Schnittlauch	9,3	245,0										
Tomate	1,0	8,0										
Tomatensaft	0,2	13,0	0,0									
Weißkohl	0,7	0,6										
Wirsing	2,0	1,0										
Zwiebel	1,0	347,0										
Tomatensoße	0,1 ^c	6,5 ^c										
Tomatensuppe	nd ^c	1,1 ^c										
Tomatenpüree	0,6 ^c	29,9 ^c										
Ketchup	0,1 ^c	5,9 ^c										
Getränke												
Rotwein	0,3	5,7	6,4	109,8	30,7	20,6			1,6			7,4
Schokoladenmilch		1,3	0,0									
Sherry	0,0	0,2										
Schwarzer Tee (Aufguss)	13,1	17,3	5,7	6,1 ^d	26,6 ^d	28,8 ^d	12,6 ^d					
Bier		0,0	0,0	1,7	0,6							
Weißwein		0,0	0,4	18,3	6,6				0,0			0,0

Kae: Kämpferol; Que: Quercetin; Myr: Myricetin; Cat: Catechin; Ecat: Epicatechin; EgC: Epigallocatechin; GC: Gallocatechin; Nar: Naringenin; Cy: Cyanidin; Päo: Päonidin; Pet: Petunidin; Mal: Malvidin; nd: nicht nachweisbar

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Daten von (Linseisen et al. 1997) übernommen. a: nach (Arts et al. 2000a), arithmetisches Mittel aus 7 verschiedenen Apfelsorten; b: nach (Arts et al. 2000a); c: nach (Stewart et al. 2000); d: nach (Arts et al. 2000b), arithmetisches Mittel aus 8 verschiedenen Teesorten

Phenolsäuren

	Phenolsäuregehalt [mg/kg] bzw. [mg/L]							
	Sal	p-Hb	Gal	Syr	Ellag	p-Cum	Kaf	Fer
Obst								
Ananas	21,0					15,9	3,7	
Ananassaft						0,4		1,0
Apfel	2,8			22,5		8,7	57,5	2,2
Apfelsaft			1,8			11,7	22,6	0,9
Apfelsine	23,0					5,0	50,0	10,0
Apfelsinensaft							0,5	0,5
Aprikose	25,8					2,7	85,1	4,9
Aprikosensaft		0,3				0,7	7,4	
Birne	2,7					16,6	76,8	0,0
Birnensaft						1,3	46,6	
Brombeeren	18,6	7,9	19,7		2010,0	6,4	22,8	4,4
Erdbeeren	13,6	12,6			226,6	0,0	3,0	0,5
Grapefruit	6,8					0,0	40,0	
Heidelbeeren	16,4		1,5			1,6	946,8	3,7
Himbeeren	51,4	20,0	14,3		650,1	4,8	3,0	2,9
Himbeersaft					9,6			
Johannisbeeren, rot	50,6	20,2	0,0			2,9	3,2	1,0
Johannisb, schwarz	30,0	3,0	19,8			11,5	39,9	9,2
Johannisb, weiß		12,0	20,5					
Kakifrukt			189,9				384,0	520,0
Kirsche, sauer	8,5					81,6	120,6	1,6
Kirsche, süß	8,5	4,3				149,2	160,9	2,6
Kiwi	1,6						384,0	
Passionsfrucht	1,4		0,0					
Pfirsich	5,9					0,9	158,5	1,2
Pfirsichsaft		0,1				0,1	2,0	0,5
Pflaume	2,1	1,3				15,6	247,8	8,9
Preiselbeeren	16,4							
Rhabarber	1,3					6,0	0,8	0,5
Stachelbeeren		0,9	0,5			10,1	18,5	2,3
Traubensaft			1,4		14,9	3,9	80,6	2,4
Weintrauben, rot	4,7	0,0	0,2			175,3	700,8	
Weintrauben, weiß	4,7	0,0	0,2					
Zitrone	1,8					6,0		

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

Sal: Salicylsäure; p-Hb: p-Hydroxybenzoesäure; Gal: Gallussäure; Syr: Syringasäure; Ellag: Ellagsäure; p-Cum: p-Cumarsäure; Kaf: Kaffeesäure; Fer: Ferulasäure

Alle Daten nach (Radtke *et al.* 1998)

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum guten Gelingen dieses Projektes beigetragen haben:

PD Dr. Roland Goerlich, der die zündende Idee zur Durchführung einer Weinstudie hatte und der diese Arbeit mit so viel Begeisterung betreut hat

Prof. Dr. Rudolf Galensa für sein Interesse an dem Projekt und die Übernahme des Koreferates

Dipl.-Oecotroph. Sabine Ellinger für die hervorragende Zusammenarbeit in allen Phasen der Studie. Ganz besonders danke ich ihr für ihre Kollegialität und ihre Bereitschaft, ohne zu Zögern einzuspringen, wann immer „Not an der Frau“ war

Prof. Dr. Heinrich Enbergs und Frau Prof. Dr. Helga Sauerwein, die uns ermöglicht haben, in ihren Laborräumen unsere Versuche durchzuführen

Prof. Dr. Ulrich Spengler, der das Projekt als Prüfarzt betreut hat und mir viele Anregungen für die Interpretation der Ergebnisse gegeben hat

Dipl.-Oecotroph. Klaudia Kekic für die Bestimmung von Gesamtphenolgehalt und Vitamin C im Plasma und die Auswertung der vielen Ernährungsprotokolle

Dipl.-Oecotroph. Leonie Geus ebenfalls für die zuverlässige Auswertung der Ernährungsprotokolle

Frau Birgit Stimper für ihre Geduld und die guten Tips im Labor

Dr. Rolf Fimmers, der uns mit seinem statistischen Know-how bei der Fallzahlabeschätzung, der Konzeption des Studiendesigns und der Auswertung der Daten unterstützt hat

Dr. Thomas Bauch und Prof. Dr. Wolfgang-Ulrich Müller, Institut für Medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinik Essen, die mich bei der Etablierung und Auswertung des Comet Assay nicht nur fachlich kompetent sondern auch sehr nett und geduldig unterstützt haben

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

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

Dr. F. Susanto, Diabetesforschungsinstitut Düsseldorf, für die Bestimmung von α -Tocopherol im Serum

Frau Dr. Kolbe-Busch, Inst. für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Düsseldorf, für die Bestimmung von Albumin, Urat und Bilirubin im Plasma

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich allen Probandinnen und Probanden für ihre engagierte, unentgeltliche Teilnahme an der Studie und vor allem das Durchhaltevermögen derjenigen, die über 6 Wochen den entalkoholisierten Wein getrunken haben

der Friedrich-Ebert-Stiftung, die mir durch ein Stipendium diese Arbeit ermöglicht hat

der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal für die großzügige Bereitstellung des Weines

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

der Deutschen Weinakademie, Mainz, für die Finanzierung der Probandenversicherung

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

der Pressestelle der Universität Bonn, die für uns die Werbetrommel gerührt und uns damit geholfen hat, genügend Freiwillige für die Untersuchungen zu finden

Christian „Faxe“ Mohr, der mir in letzter Sekunde die mühselige Suche nach Rechtschreibfehlern und besseren Formulierungen erspart hat

und am aller meisten meinen beiden Lieben, Farrukh und Felice, die so lange darauf gewartet haben, dass ich endlich wieder was anderes im Kopf habe...

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bianca Maria Arendt
Wohnort: D-53111 Bonn
Geburtsdatum: 10. September 1971
Geburtsort: Eichstätt, Bayern

Ausbildung

1977 - 1983 Grund- und Teilhauptschule St. Walburg, Eichstätt
1983 - 1987 Realschule Maria-Ward, Eichstätt
1987 - 1991 Apian-Gymnasium, Ingolstadt
1991 - 1992 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Bonn
1992 - 1999 Studium der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften, Universität Bonn
1998 - 1999 Praktische Diplomarbeit
Antioxidatives Potential im Plasma gesunder und HIV-infizierter Personen nach Verzehr polyphenolreicher Getränke
Arbeitsgruppe Physiologische und Vergleichende Immunologie, Universität Bonn
2000 - 2003 Dissertationsprojekt
Antioxidative Wirkungen von Rotwein bei gesunden Proband/inn/en
Arbeitsgruppe Physiologische und Vergleichende Immunologie, Universität Bonn
Stipendiatin der Friedrich-Ebert-Stiftung

Weitere Forschungsprojekte

1994 - 1995 *Antioxidative Aktivität von Nitrit bei der Metmyoglobin induzierten Lipid-peroxidation*
Königliche Veterinär- und Landbauhochschule, Kopenhagen, Dänemark
Im Rahmen eines ERASMUS Austausches
2001 - 2003 *Oxidativer Stress bei Immobilisierung und hypokalorischer Ernährung bei gesunden jungen Männern*
Arbeitsgruppe Physiologische und Vergleichende Immunologie, Universität Bonn
Als Teilprojekt der *Short Term Bed Rest Study for Integrated Physiology* der Europäischen Weltraumagentur (ESA) und des Deutschen Instituts für Luft- und Raumfahrt (DLR)

Berufstätigkeit

06/2002 Online-Moderatorin zum Thema *Rotwein* bei www.was-wir-essen.de
aid-infodienst, Bonn
2003 - Datenmanagement und Öffentlichkeitsarbeit für das GLOWA-Volta Projekt
Zentrum für Entwicklungsforschung (ZEF), Universität Bonn