

Einfluss von Karotten- und Tomatensaft-Konsum auf Colonicarcinogenese-relevante Faecesmarker beim Menschen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Universität Hohenheim

und

Institut für Ernährungsphysiologie
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
Karlsruhe

vorgelegt von
Kerstin Schnäbele

aus Karlsruhe
2005

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: PD Dr. med. (SU) Karlis Briviba
2. berichtende Person: Prof. Dr. med. Hans Konrad Biesalski
Eingereicht am: 16.11.2005
Mündliche Prüfung am: 11.05.2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 31.01.2006 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Persönliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen selbstständig verfasst zu haben.

Freising, 02.11.2005

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
III	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
IV	TABELLENVERZEICHNIS	XI
1	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
2	EINLEITUNG	5
2.1	Colorectale Carcinogenese	5
2.1.1	Genetische Faktoren	5
2.1.2	Ernährung und colorectale Carcinogenese	10
2.1.2.1	Risikofaktoren	10
2.1.2.2	Protektive Faktoren	12
2.2	Intestinale Gewebemöostase	14
2.2.1	Proliferation	14
2.2.2	Zelltod (Apoptose und Nekrose)	15
2.3	Coloncarcinogenese-relevante Faecesmarker	18
2.3.1	Faeceswasser-Untersuchungen	18
2.3.2	Enzymatische Aktivität der Mikroflora	19
2.3.3	Gallensäuren	21
2.3.4	Kurzkettige Fettsäuren	24
2.4	Carotinoide in der menschlichen Ernährung	25
2.4.1	Struktur, Vorkommen, Eigenschaften	25
2.4.2	Bioverfügbarkeit, Resorption und Metabolismus	28
2.4.3	Funktionen und Wirkungen von Carotinoiden	30
2.4.4	Molekulare Wirkungsmechanismen von Carotinoiden auf die Carcinogenese	31
2.4.4.1	Antioxidative Wirkungen	31
2.4.4.2	Immunmodulierende Wirkungen	33
2.4.4.3	Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus	34
2.4.4.4	Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung	35

2.4.4.5	Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation	36
2.4.5	Carotinoide und Dickdarmcarcinogenese	37
2.5	Zielsetzung der Arbeit	38
3	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1	Chemikalien, Reagenzien	39
3.2	Lösungen	42
3.3	Verbrauchsmaterialien	43
3.4	Geräte	44
3.5	Zelllinie HT-29	45
3.6	Methoden	46
3.6.1	Studiendesign der Humaninterventionsstudie mit carotinoidreichen Gemüsesäften	46
3.6.2	Aufarbeitung von Faeces-Proben	47
3.6.3	Faeces-Untersuchungen	47
3.6.3.1	Bestimmung des Stuhl-Wassergehaltes	47
3.6.3.2	HPLC-Analyse der Faeces-Carotinoide	48
3.6.3.3	HPLC-Analyse von Malondialdehyd (MDA) im Stuhl	49
3.6.4	Faeceswasser-Gewinnung	50
3.6.5	Zellkultur	50
3.6.6	MTT-Test	51
3.6.7	Faeceswasser-Untersuchungen	51
3.6.7.1	Cytotoxizität	51
3.6.7.2	Proliferation	52
3.6.7.3	HPLC-Analyse von Gallensäuren in Faeceswasser	52
3.6.7.4	GC-Analyse von kurzkettigen Fettsäuren	54
3.6.7.5	Bestimmung der β -Glucosidase- und β -Glucuronidase- Aktivität in Faeceswasser	54
3.6.8	Gewinnung von Faeces-Lipidextrakten	55
3.6.9	Extrakt-Untersuchungen	56
3.6.9.1	Cytotoxizitätstests	56
3.6.9.2	Durchflusscytometrische Analysen	56
3.6.10	Alternatives Faeceswasser-Modell	58
3.7	Statistische Auswertung der Daten	58

4	ERGEBNISSE	61
4.1	Probandendaten	61
4.2	Daten aus der Ernährungserhebung	61
4.3	Studiendesign – Crossover	62
4.4	Faeces-Untersuchungen	63
4.4.1	Stuhlgewicht, Stuhl-Wassergehalt	63
4.4.2	Carotinoid-Gehalte in Faeces und Faeceswasser	63
4.4.3	Stabilität von Carotinoiden in Faeces und Faeceswasser	65
4.4.4	Faeces-MDA-Gehalt	66
4.5	Faeceswasser-Experimente	66
4.5.1	Faeceswasser-pH-Wert	67
4.5.2	Cytotoxizität	67
4.5.3	Proliferation	69
4.5.4	Konzentrationen von Gallensäuren in steril-filtrierte Faeceswasser	71
4.5.5	Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) in steril- filtrierte Faeceswasser	73
4.5.6	β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität in unfiltriertem Faeceswasser	75
4.5.7	Einflussfaktoren auf die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser	75
4.6	Faeces-Lipidextrakte	77
4.6.1	Cytotoxische Wirkung von Faeces-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen	77
4.6.2	Durchflussscytometrische Analysen zur Wirkung von Faeces- Lipidextrakten auf HT-29 Zellen	78
4.7	Alternatives Faeceswasser-Modell	82
5	DISKUSSION	84
5.1	Faeces-Analysen	84
5.1.1	Allgemeine Faeces-Parameter	84
5.1.2	Carotinoid-Gehalte in Faeces und Faeceswasser	85
5.1.3	Stabilität von Faeces- und Faeceswasser-Carotinoiden	86
5.1.4	Faeces-Malondialdehyd (MDA)-Gehalt	87
5.2	Faeceswasser-Untersuchungen	88

5.2.1	Cytotoxische Wirkung von Faeceswasser	88
5.2.2	Antiproliferative Wirkung von Faeceswasser	90
5.2.3	Gallensäuren in Faeceswasser	92
5.2.4	Faeceswasser-pH-Wert	95
5.2.5	Kurzkettige Fettsäuren in Faeceswasser	96
5.2.6	Bakterielle Enzymaktivitäten in Faeceswasser	98
5.2.7	Einflussfaktoren auf die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser	100
5.3	Einsatz von Faeces-Lipidextrakten in der Zellkultur	102
5.3.1	Wirkung von Faeces-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen	102
5.3.2	Durchflusscytometrische Analysen	103
5.4	Alternatives Faeceswasser-Modell	105
5.5	Probanden und Studiendesign der Humaninterventionsstudie ...	106
5.6	Schlussbetrachtung und Ausblick	107
6	LITERATURVERZEICHNIS	109
7	TABELLENANHANG	130
	LEBENS LAUF	137
	DANKSAGUNG	139

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AACC	American Association of Cereal Chemists
AGA	American Gastroenterological Association
ATBC	Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group
AP-1	Activator protein 1
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC-Gen	Adenomatous polyposis coli gene
BFA	Brefeldin A
BFEL	Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel
BHT	Butylhydroxytoluen
BMC	4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin
BMI	Body Mass Index
BP	Bandpassfilter
CA	Cholsäure (cholic acid)
CDCA	Chenodesoxycholsäure (chenodeoxycholic acid)
CIN	Chromosomeninstabilität
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
D	Depletion
DCA	Desoxycholsäure (deoxycholic acid)
DCCE	Dicyclohexil-18crown-6-ether
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
EC	Effective concentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylen diamine tetraacetic acid)
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas associated death domain
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Foetales Kälberserum (fetal calf serum)
FHC	Fetal human colon

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FS	Fettsäure
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
FW	Faeceswasser
FW-M	Faeceswasser-Medium
GC	Gaschromatographie
ges	gesamt
GJC	Gap junctional communication
GS	Gallensäure
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High density lipoprotein
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses colorectales Krebsyndrom (hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome)
HPFS	Health Professionals Follow-Up Study
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance/pressure liquid chromatography)
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Inhibition concentration
IGF-I	Insulinabhängiger Wachstumsfaktor I (insulin-like growth factor I)
IL-2	Interleukin 2
IOM	Institute of Medicine
K	Karottensaft
KH	Kohlenhydrate
KI	Karottensaft-Intervention
LCA	Lithocholsäure (lithocholic acid)
LDL	Low density lipoprotein
LEF	Lymphoid enhancing factor
LPE	Lipidextrakt
MAM	Methylazoxymethanol
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase

MMR	Mutation mismatch repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Messdaten
NAD(P)H	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-phosphat)
NHS	Nurses` Health Study
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PES	Polyethersulfon
PI	Propidiumiodid
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids)
RP-HPLC	Reversed phase-high performance/pressure liquid chromatography
RSA	Rinderserumalbumin
r	Korrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SE	Standardfehler (standard error)
ST	Staurosporin
T	Tomatensaft
TCF	T-cell factor
TGF	Transforming growth factor
THF	Tetrahydrofuran
TI	Tomatensaft-Intervention
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U	Umdrehungen
UDCA	Ursodesoxycholsäure (ursodeoxycholic acid)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	Volume per volume

VLDL	Very low density lipoprotein
WCRF	World Cancer Research Fund
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless type
w/v	Weight per volume

III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1: Mögliche Entstehungswege der colorectalen Carcinogenese	9
Abb. 2.2: Signalwege der Apoptose	17
Abb. 2.3: Umwandlung von primären in sekundäre Gallensäuren durch die Darmflora	22
Abb. 2.4: Einteilung der Carotinoide in Abhängigkeit ihres Oxidationsstatus	26
Abb. 2.5: Wechselwirkungen von Carotinoiden mit reaktiven Sauerstoffspezies	32
Abb. 3.1: Studiendesign der Humaninterventionsstudie im Überblick	47
Abb. 4.1: Faeces-Carotinoid-Gehalte nach 14-tägiger Depletion und Gemüsesaft-Intervention	64
Abb. 4.2: Stabilität von Faeces-Carotinoiden am Beispiel von β -Carotin und Lycopin	65
Abb. 4.3: Cytotoxischer, dosisabhängiger Effekt der FW-Proben von zwei repräsentativen Probanden in Abhängigkeit der Studienphasen	68
Abb. 4.4: Antiproliferative Wirkungen von FW-Proben eines repräsentativen Probanden auf HT-29 Zellen nach einer Inkubation von fünf Tagen	70
Abb. 4.5: Konzentrationen von Gallensäuren in steril-filtrierte Faeceswasser in Abhängigkeit der Studienphasen	72
Abb. 4.6: Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren in steril-filtrierte Faeceswasser	73
Abb. 4.7: Korrelationen zwischen Faeceswasser-pH und den Konzentrationen der beiden kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Butyrat	74
Abb. 4.8: Regressionsmodelle zur Bedeutung von Einflussfaktoren auf die cytotoxische und antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser	76
Abb. 4.9: Dot-Plots der durchflusscytometrischen Analyse von HT-29 Zellen nach 2h-Inkubation mit verschiedenen Testmedien	79
Abb. 4.10A/B: Apoptose- und Nekroserate [%] von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation mit Faeces-Lipidextrakten aus den Depletions- und nachfolgenden Saft-Interventionsphasen	81

Abb. 4.11: Signifikante Korrelationen zwischen den EC ₂₅ - und IC ₅₀ - Werten von Faeceswasser und Faeceswasser-Medium	82
---	----

IV TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 4.1: Anthropometrische Probanden-Daten	61
Tab. 4.2: Vergleich der Nährstoffaufnahme der Probanden zwischen den fünf Studieneinheiten ohne Berücksichtigung der Nährstoffzufuhr aus Karotten- und Tomatensaft	62
Tab. 4.3: Faeces-Parameter in Abhängigkeit der Studienphasen	63
Tab. 4.4: Faeces-MDA-Gehalt in Abhängigkeit der Saft-Interventionen.....	66
Tab. 4.5: pH-Wert von unfiltriertem Faeceswasser in Abhängigkeit der Studienphasen	67
Tab. 4.6: Cytotoxische Wirkung von steril-filtrierte FW-Proben auf HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	69
Tab. 4.7: Einfluss der Saft-Interventionen auf die antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte FW-Proben auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	71
Tab. 4.8: Aktivität bakterieller Enzyme in Faeceswasser in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	75
Tab. 4.9: Cytotoxizität von Faeces-Lipidextrakten nach 24h-Inkubation in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	77
Tab. 4.10: Cytotoxische und antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte FW-M-Proben auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	83
Tab. 7.1: Carotinoid-Gehalte im Stuhl in Abhängigkeit der Studienphasen	130
Tab. 7.2: Prozentualer Anteil der all- <i>trans</i> -Isomere von β -Carotin und Lycopin in Faeces- und Plasma-Proben der entsprechenden Saft-Interventionen sowie in Karotten- und Tomatensaft	131
Tab. 7.3: Stabilität von β -Carotin und Lycopin in Faeces- und FW-Proben von zwei Probanden über einen Zeitraum von acht Monaten	131
Tab. 7.4: Cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser in Abhängigkeit der Saft-Interventionen	132
Tab. 7.5: Konzentrationen von verschiedenen Gallensäuren in steril-filtrierte Faeceswasser	132

Tab. 7.6: Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren in steril-filtriertem Faeceswasser	133
Tab. 7.7: Signifikante bzw. tendenzielle Korrelationen zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Parametern	133
Tab. 7.8: Einflussfaktoren auf die cytotoxische und antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser	135
Tab. 7.9: Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroseraten von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation mit Kontrollmedien	136
Tab. 7.10: Einfluss von Faeces-Lipidextrakten auf Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroserate von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation in Abhängigkeit der Studienphasen	136

1 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Colorectaler Krebs stellt weltweit eine der häufigsten Tumorerkrankungen dar. Die meisten colorectalen Tumoren sind sporadisch und entwickeln sich somatisch in Epithelzellen aufgrund genetischer Veränderungen. Prozesse im Lumen des Gastrointestinaltraktes sind für die Entstehung colorectaler Tumoren von großer Bedeutung und die Analyse von Faeces bzw. verschiedener Faeces-Präparationen stellt eine nicht invasive Möglichkeit zur Beurteilung von protektiven und Risikofaktoren der colorectalen Carcinogenese dar.

Ernährungsfaktoren können die Tumorentwicklung maßgeblich beeinflussen. Ein hoher Obst- und Gemüseverzehr wird häufig mit einem erniedrigten colorectalen Krebsrisiko in Verbindung gebracht. Krebsprotektive Wirkungen von Obst und Gemüse werden auf darin enthaltene Substanzen mit potenziell anticarcinogenen Eigenschaften wie Ballaststoffe, Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe, z.B. Carotinoide, zurückgeführt. Die protektiven Mechanismen, insbesondere die, welche im gastrointestinalen Lumen eine Rolle spielen, sind noch nicht ausreichend geklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte anhand einer Humaninterventionsstudie mit Karotten- und Tomatensaft-Konsum untersucht werden, ob eine carotinoidreiche Ernährung, insbesondere reich an β -Carotin und Lycopin, Colonicarcinogenese-relevante Prozesse im Lumen des Gastrointestinaltraktes modifizieren kann. Dazu sollten verschiedene Faecesmarker etabliert und eingesetzt werden.

In der randomisierten Interventionsstudie im Crossover-Design konsumierten 22 gesunde, männliche Probanden bei ansonsten carotinoidarmer Ernährung täglich 330ml Karotten- oder Tomatensaft über einen Zeitraum von zwei Wochen. Bei den Saft-Interventionen gingen 14-tägige Depletionsphasen mit carotinoidarmer Ernährung voraus. Am Ende jeder Studienphase wurde von zwölf Probanden 48h-Stuhl gesammelt, aus dem verschiedene Präparationen wie unfiltriertes bzw. steril-filtriertes Faeceswasser (FW) und Faeces-Lipidextrakte für den Einsatz im Zellkultursystem gewonnen wurden. Bei Untersuchungen zur Wirkung dieser Präparationen auf Colonadenocarcinomzellen (HT-29) und zur Bestimmung der Aktivität bakterieller Enzyme in FW kamen spektralphotometrische und durchflusscytometrische Methoden zum Einsatz. HPLC-Analysen dienten zur Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Gallensäuren in FW und der Carotinoid- sowie Malondialdehyd (MDA)-Gehalte in Faeces-Proben. Die FW-Konzentrationen der wichtigsten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) wurden gaschromatographisch erfasst.

Der Verzehr von Karotten- bzw. Tomatensaft führte zu einem deutlichen Anstieg der Faeces-Gehalte an β - und α -Carotin bzw. Lycopin sowie der Carotinoid-Konzentrationen in unfiltriertem FW. In der sich anschließenden Depletionsphase gingen die Faeces- bzw. FW-Gehalte der entsprechenden Carotinoide wieder auf ihre Ausgangswerte zurück. Eine Veränderung des Faeces-MDA-Gehaltes durch

die Karotten- und Tomatensaft-Interventionen konnte nicht beobachtet werden. FW zeigte eine deutliche dosisabhängige cytotoxische Wirkung auf HT-29 Zellen, die jedoch durch Karotten- und Tomaten-Konsum nicht merklich verändert wurde. Darüber hinaus konnte die proliferationshemmende Wirkung von FW durch die Saft-Interventionen nicht beeinflusst werden. Somit scheinen andere luminalen Komponenten stärkere Effekte als Carotinoide auf diese Parameter auszuüben. Weder die Konzentration der erfassten Gallensäuren (GS) noch das FW-GS-Profil waren nach Karotten- und Tomatensaft-Konsum verändert. Auch die bakterielle β -Glucosidase bzw. Glucuronidase-Aktivität änderte sich nicht durch die Saft-Interventionen. Während Tomatensaft-Konsum den FW-pH nicht signifikant beeinflusste, wurde dieser durch Karottensaft-Konsum erniedrigt. Obwohl die FW-Acetat- und -Butyrat-Konzentration zur Erniedrigung des FW-pH-Wertes beitragen, waren die SCFA vermutlich nicht für die beobachtete pH-Wert-Änderung nach Karottensaft-Konsum verantwortlich. FW-SCFA-Konzentrationen bzw. das SCFA-Verhältnis wurden nicht signifikant verändert. Welche Substanzen an der Abnahme des FW-pH nach Karottensaft-Konsum beteiligt waren, sollte in nachfolgenden Analysen geklärt werden. Weder die FW-GS- und -SCFA-Konzentrationen noch die Aktivität der untersuchten bakteriellen Enzyme nahmen Einfluss auf die cytotoxische Wirkung von FW. Mit zunehmendem Anteil der primären Gallensäuren Chol- und Chenodesoxycholsäure nahm dessen cytotoxische Wirkung, ungeachtet der verschiedenen Studienphasen, jedoch ab. Laut multipler Regressionsanalyse wichtige Einflussfaktoren für die wachstumshemmende FW-Wirkung sind wahrscheinlich v.a. der Faeces-MDA-Gehalt und die bakterielle β -Glucosidase-Aktivität. Ob die aufgeführten Parameter direkten Einfluss auf die cytotoxische bzw. antiproliferative FW-Wirkung nehmen oder indirekte Marker für z.B. die Aktivität der individuellen Mikroflora darstellen, sollte nachfolgend untersucht werden. Darüber hinaus sollten weitere Experimente klären, welche luminalen Komponenten letztendlich für die FW-Wirkungen im Zellkultursystem verantwortlich sind.

Karotten- und Tomatensaft-Konsum erhöhten deutlich die cytotoxische Wirkung von Faeces-Lipidextrakten in HT-29 Zellen, vermutlich bedingt durch Apoptoseinduktion. Welche Mechanismen dieser Wirkung zugrunde liegen und welche *In-vivo*-Bedeutung sie hat, sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei jungen, gesunden Probanden bei ausgewogener Energie- und Makronährstoffzufuhr eine zweiwöchige Intervention mit carotinoidreichen Säften nur geringe Änderungen in Colonicarcinogenese-relevanten luminalen Prozessen hervorruft. Fehlende Wirkungen auf die toxischen und antiproliferativen Eigenschaften von FW, Lipidperoxidation in Faeces, FW-GS- und SCFA-Konzentrationen und die Aktivität einiger bakterieller Enzyme weisen darauf hin, dass entsprechende physiologische Prozesse unter den beschriebenen Ausgangsbedingungen durch eine carotinoidreiche Ernährung nicht beeinflusst werden und andere anticarcinogene Mechanismen von größerer Bedeutung sind.

SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common tumor diseases in the world. Most of the colorectal tumors are sporadic and develop somatically in epithelial cells. Processes occurring in the lumen of the gastrointestinal tract are of great importance for the development of colorectal tumors. The analysis of faeces and various faecal preparations represents a non-invasive possibility to assess protective and risk factors of colorectal carcinogenesis.

Nutritional factors can markedly affect tumor development. A high intake of fruits and vegetables is often associated with a reduced risk of colorectal cancer. Protective effects of fruits and vegetables are attributed to ingredients, such as fibers, vitamins, and secondary plant products (e.g. carotenoids), which have potential anticarcinogenic properties. The protective mechanisms, especially those which play a role in the gastrointestinal lumen, are insufficiently clarified at present. The aim of this study was to investigate, by means of a human intervention trial with carrot and tomato juice consumption, whether a diet rich in carotenoids, especially high in β -carotene and lycopene, can modify processes relevant to colon carcinogenesis in the gastrointestinal lumen. Therefore, several faecal markers had to be established and used in this study.

In the randomized crossover trial, 22 healthy male subjects on a low-carotenoid diet consumed 330ml of carrot or tomato juice daily for a period of two weeks. The two juice intervention periods were preceded by two-week depletion phases. At the end of each study period the stool of twelve volunteers was collected over a 48-hour period. This stool was used to produce some preparations such as non-filtered and sterile-filtered faecal water, as well as faecal lipid extracts, in order to use them in cell culture systems. Spectral photometric and flow cytometric methods were used to determine the effects of the above-mentioned preparations on colon adenocarcinoma cells (HT-29), as well as to determine the activities of the bacterial enzymes β -glucosidase and β -glucuronidase in faecal water. HPLC methods were used to measure the concentrations of several bile acids in faecal water, as well as to determine the concentrations of carotenoids and malondialdehyde (MDA) in faecal samples. The concentrations of the major short chain fatty acids (SCFA) were measured via gas chromatography.

Consumption of carrot juice led to a marked increase of β -carotene and α -carotene in faeces and in non-filtered faecal water, as did lycopene after consumption of tomato juice. In the succeeding depletion phases, the contents of those carotenoids in faeces and faecal water returned to their initial values. Changes in faecal MDA concentrations by carrot and tomato juice interventions could not be observed.

Faecal water showed high, dose-dependent cytotoxic effects on HT-29 cells. Those effects were, however, not markedly changed by carrot and tomato juice consumption. Furthermore, growth inhibition of faecal water could not be affected by juice interventions. Therefore, other luminal components than carotenoids seem to have a stronger influence on these parameters. Neither bile acid concentrations nor the bile acid profile in faecal water changed after carrot and tomato juice consumption. Bacterial activities of β -glucosidase and β -glucuronidase also did not change. While tomato juice consumption did not significantly affect the pH value of faecal water, this value was, however, decreased by carrot juice consumption. Although faecal water concentrations of acetate and butyrate contributed to the decrease in faecal water pH values, SCFA were probably not responsible for the observed pH changes after carrot juice consumption. SCFA concentrations in faecal water and SCFA proportions did not change significantly. Further analyses should clarify, which substances were involved in the decrease of faecal water pH. Neither bile and SCFA concentrations, nor the activities of tested bacterial enzymes, had any influence on the cytotoxic effects of sterile-filtered faecal water. These cytotoxic effects, however, decreased with increasing proportions of the primary bile acids cholic and chenodesoxycholic acid, independent of the study phases. As determined by multiple regression analysis, the most probable leading factors for the growth inhibitory effects of faecal water are the faecal MDA content and bacterial β -glucosidase activity. Further studies should investigate whether the parameters mentioned directly influence cytotoxic and antiproliferative effects of faecal water or if those parameters are indirect markers for the activity of individual microflora. Further experiments should also clarify which luminal components are ultimately responsible for the effects of faecal water in cell cultures.

Carrot and tomato juice consumption strongly increased the cytotoxic effects of faecal lipid extracts in HT-29 cells, likely caused by the induction of apoptosis. Which mechanisms account for these effects and the consequences of these effects in the *in vivo* situation should be investigated in further studies.

This work shows that two-week interventions with carotenoid-rich juices lead only to minor changes in luminal processes relevant to colon carcinogenesis in young healthy volunteers on an energy- and macronutrient-balanced diet. Lacking effects on 1) the toxic and antiproliferative properties of faecal water, 2) lipid peroxidation in faeces, 3) the bile and SCFA concentrations in faecal water, and 4) bacterial enzyme activities indicate that related physiological effects can not be influenced by a diet rich in carotenoids under the just described conditions. Other anticarcinogenic mechanisms seem to be of greater importance.

2 EINLEITUNG

2.1 Colorectale Carcinogenese

Colorectaler Krebs¹ stellt die zweithäufigste Krebs-Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Deutschland steht hinsichtlich der Erkrankungsrate mit jährlichen Neuerkrankungen von über 66.000 im Vergleich zu anderen EU-Ländern an erster Stelle [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004]. Das Lebenszeit-Risiko für colorectalen Krebs liegt in der Gesamtbevölkerung bei 5%, bis zu einem Alter von 70 Jahren entwickelt jedoch nahezu die Hälfte der westlichen Bevölkerung ein Adenom [Fodde *et al.* 2001]. Bei der Entwicklung eines colorectalen Tumors spielen neben genetischen Veränderungen und Polymorphismen auch Lebensstilfaktoren, insbesondere die Ernährung, eine wichtige Rolle.

2.1.1 Genetische Faktoren

Die Mehrzahl aller colorectalen Tumoren entsteht sporadisch, d.h. zufällig, während schätzungsweise nur 10-20% auf erblich bedingte genetische Veränderungen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse colorectale Krebsyndrom (HNPCC) sowie andere Krebserkrankungen mit familiärer Vorgeschichte zurückgehen [Lynch und Lynch 1998]. 1990 veröffentlichten Fearon und Vogelstein ein weitgehend anerkanntes und nachfolgend mit spezifischen molekularen Signalwegen ergänztes Modell für die colorectale Carcinogenese (siehe Abb. 2.1 Seite 9). Demnach entstehen Colontumoren in einem Mehrstufenprozess durch progressive Akkumulation spezifischer genetischer Veränderungen. Diese verhelfen initiierten Zellen zu Wachstumsvorteilen gegenüber anderen Zellen und führen zur Transformation des normalen Colonepithels zum benignen Adenom und schließlich zum invasiven Adenocarcinom (Adenom-Carcinom-Sequenz).

¹ Tumoren von Colon (Dickdarm) und Rectum (Mastdarm) werden in der Literatur häufig unter dem Begriff colorectaler Krebs zusammengefasst.

Mutationen in drei Klassen von Genen können in der Keimbahn auftreten und zu erblichen Prädispositionen für Krebs führen oder in einzelnen somatischen Zellen vorkommen und die Entstehung sporadischer Tumoren verursachen:

1. Protooncogene

Protooncogene werden durch Genamplifikationen, chromosomale Translokationen und Punktmutationen zu Oncogenen und fördern das Zellwachstum. Aktivierende somatische Mutationen in einem Allel reichen im Allgemeinen für einen selektiven Wachstumsvorteil einer Zelle aus [Vogelstein und Kinzler 2004]. Mutationen im Protooncogen *k-ras* kommen beispielsweise in ca. 50% der colorectalen Carcinome vor und treten bereits in früheren Adenom-Stadien auf [Tejpar und Van Cutsem 2002]. Proteine der Ras-Familie sind an der Signaltransduktion über MAP-Kinasen² beteiligt. K-Ras ist ein Guanosin triphosphat (GTP)-bindendes Protein an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran mit GTPase-Aktivität. Durch GTP-Bindung aktiviertes K-Ras interagiert mit Signalmolekülen, die das Zellwachstum fördern, und wird normalerweise durch GTP-Hydrolyse schnell wieder inaktiviert. Durch Mutation wird die GTPase-Aktivität gestört und K-Ras bleibt im aktivierten Zustand. Bei Patienten mit colorectalen Tumoren mit mutiertem *k-ras* Gen wurden auch in angrenzender, aber histologisch normaler Mucosa, *k-ras* Mutationen gefunden; daher könnten diese als Biomarker zur frühen Diagnose dienen [Leslie *et al.* 2002, Zhu *et al.* 1997].

2. Tumor-Suppressorgene

Tumor-Suppressorgene sind nach bestimmten Mutationen nicht mehr in der Lage, das Zellwachstum zu regulieren. Für den selektiven Vorteil einer Zelle müssen in der Regel beide Allele des Suppressorgens inaktiviert werden, wobei die Deletion eines Allels häufig aus dem Verlust eines ganzen Chromosoms oder Chromosomenarms hervorgeht [Vogelstein und Kinzler 2004]. Veränderungen im Tumor-Suppressorgen *APC* scheinen ein frühes Ereignis innerhalb der Adenom-Carcinom-Sequenz darzustellen, da *APC*-Mutationen oder Allelverluste am Chromosom 5q in 40-80% der colorectalen Carcinome und ähnlich häufig in colorectalen Adenomen beobachtet werden [zusammengefasst in Leslie *et al.* 2002]. Keimbahnmutationen im *APC*-Gen und nachfolgende somatische Mutation bzw. Deletion des gesamten Chromosomenabschnittes im zweiten *APC*-Allel verursachen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung macht ca. 1% aller Colonkrebsfälle aus. Bei den betroffenen Patienten entwickeln sich bereits in jungen Jahren hunderte bis tausende colorectale Adenome [Gryfe *et al.* 1997]. Die hauptsächliche tumorhemmende Funktion

² MAP-Kinase=mitogen-activated protein kinase

von APC besteht vermutlich in der Regulation des zellulären Spiegels von β -Catenin, einem Signalmolekül im Wnt-Signalweg³ [Fodde *et al.* 2001]. Veränderungen im *APC*-Gen führen zur intrazellulären Akkumulation von freiem β -Catenin. Dies bildet im Zellkern Komplexe mit Transkriptionsfaktoren (TCF und LEF)⁴ und führt zur gesteigerten Expression von Genen wie *Cyclin D1* und dem Oncogen *c-myc*, die das Zellwachstum und die Zellzyklus-Progression fördern und dadurch zur Tumorbildung beitragen. APC könnte über die Regulation der Stabilität und zellulären Lokalisation von β -Catenin auch die Zelladhäsion kontrollieren. Außerdem assoziiert APC mit dem Microtubuli-Cytoskelett und spielt vermutlich bei der Chromosomen-Trennung in der Mitose eine Rolle. *APC*-Mutationen tragen damit möglicherweise zur Chromosomeninstabilität bei [Fodde *et al.* 2001].

p53 ist ein Transkriptionsfaktor mit Tumor-Suppressor-Aktivität und wird z.B. durch γ -Strahlung und ultraviolette Strahlung induziert [Grady und Markowitz 2002]. P53 kann als Antwort auf genotoxischen Stress bei DNA-Schädigung die Zellproliferation blockieren, die DNA-Reparatur induzieren und den Zelltod fördern, wenn eine DNA-Reparatur nicht möglich ist. *p53* ist daher vermutlich an der Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt. Genetische Veränderungen im *p53*-Gen bzw. 17p-Allelverlust wurden in 4-26% der Adenome, in ca. 50% invasiver Loci in adenomatösen Polypen und in 50-75% von Adenocarcinomen beobachtet. Diese Häufigkeitsverteilung spricht dafür, dass eine Inaktivierung des P53-Proteins die Transformation von Adenomen in Carcinome begünstigt [Leslie *et al.* 2002].

3. DNA-Reparaturgene

DNA-Reparaturgene können nach Mutation nicht mehr für eine fehlerfreie DNA-Replikation sorgen, was zu genetischen Veränderungen in Protooncogenen und Tumor-Suppressorgenen führen kann [Gryfe *et al.* 1997]. Die Inaktivierung des Mismatch-Reparatur-Systems (MMR)⁵ führt zu Mikrosatelliteninstabilität. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen aus Di-, Tri- oder Tetranukleotiden, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen, aber in definierter Zahl vorkommen. Durch Mutationen bedingte Anomalien (z.B. Deletionen, Insertionen und Basen-Fehlpaarungen) dieser Mikrosatelliten werden als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Das autosomal-dominant vererbte hereditäre nicht-polypöse Krebsyndrom (HNPCC) wird durch Keimbahnmutationen in Mismatch-Reparaturgenen, v.a. in *hMSH2* oder *hMLH1*, verursacht und stellt mit einer Prävalenz von

³ Wnt=wingless-type; Wnts sind von an der Kryptenbasis vorkommenden Myofibroblasten sezernierte Glycoproteine, die an Rezeptoren von Krypten-Epithelzellen binden und die Stabilität von β -Catenin regulieren.

⁴ TCF=T-cell factor, Lef=lymphoid enhancing factor

⁵ MMR=mismatch repair

3-6% unter den colorectalen Krebsfällen die häufigste erblich bedingte Erkrankung dar [Grady und Markowitz 2002]. HNPCC-Patienten entwickeln im Gegensatz zu FAP-Patienten nur wenige Adenome, deren Risiko zur malignen Transformation jedoch sehr hoch ist [Lynch und Lynch 1998]. Die häufigste Genmutation bei MSI-positiven colorectalen Tumoren liegt im *TGF β Typ II-Rezeptor (RII)*-Tumor-Suppressorgen [Grady und Markowitz 2002] vor. Weitere durch MSI betroffene Gene sind z.B. *IGFII* (insulin-like growth factor)-*Rezeptor* und der Transkriptionsfaktor *E2F4*.

Bei der Entstehung eines sporadischen colorectalen Carcinoms nehmen schätzungsweise 80-85% der Tumoren den von Fearon und Vogelstein postulierten Verlauf. Dieser ist durch genetische Instabilität auf Chromosomenebene gekennzeichnet und häufig mit der Inaktivierung oder dem Verlust spezifischer Tumorsuppressorgene wie *APC* (Chromosom 5q), *DCC*, *SMAD2* und *SMAD4* (18q) und *p53* (17p) verbunden [Reinacher-Schick und Schmiegel 2002]. Dagegen weisen 10-15% der sporadischen Tumoren aufgrund defekter DNA-Reparatur genetische Instabilität auf DNA-Ebene, nachgewiesen als MSI, auf.

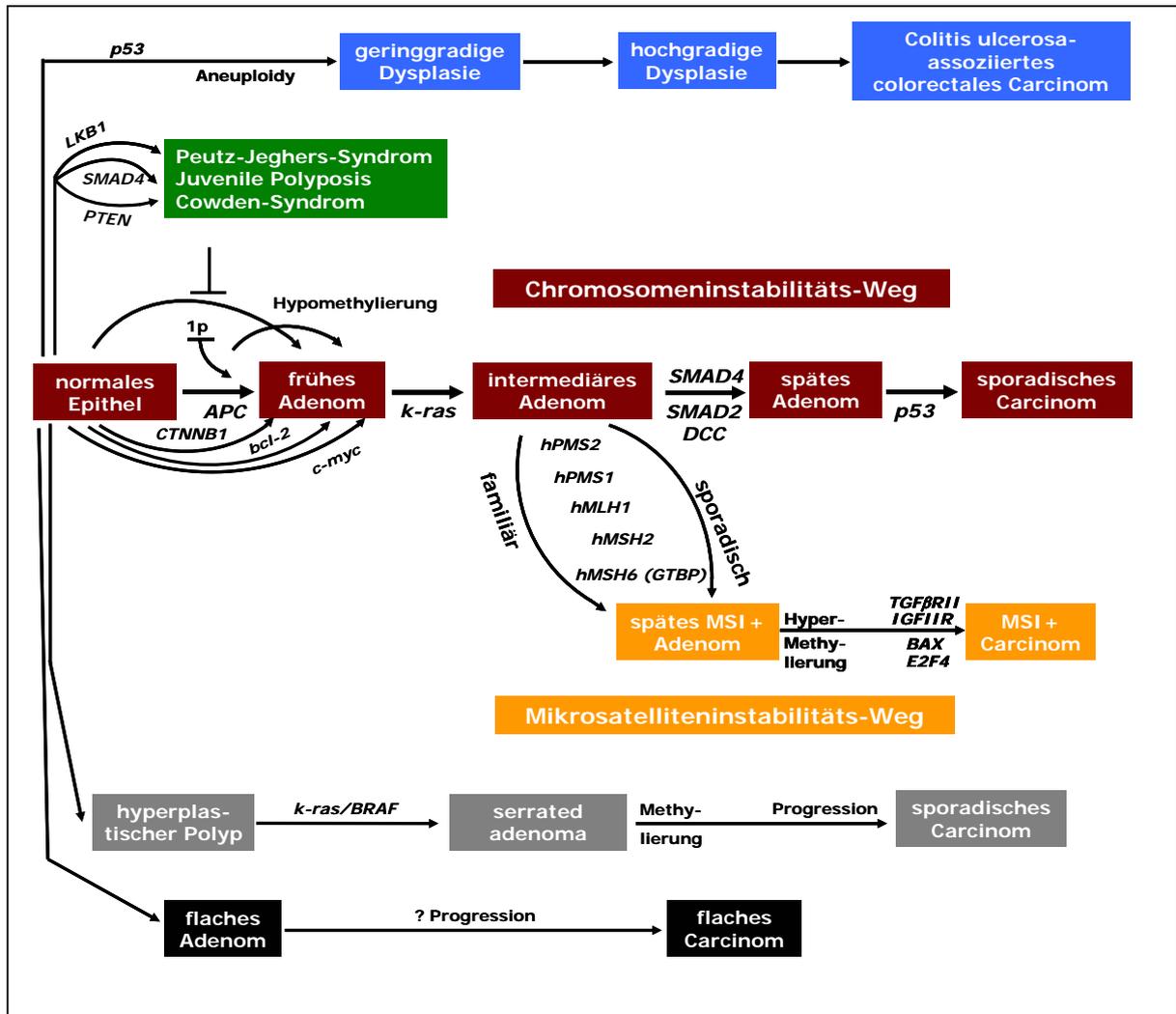


Abb. 2.1: Mögliche Entstehungswege der colorectalen Carcinogenese [modifiziert nach Ilyas *et al.* 1999]. Die molekularen Mechanismen des Chromosomen- und Mikrosatelliteninstabilitäts-Weges sind bisher am besten charakterisiert. Die Mehrheit der colorectalen Carcinome folgt der Adenom-Carcinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein und zeigt chromosomale Instabilität (CIN, ■). Obwohl die meisten Carcinome mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI+, ■) auch aus colorectalen adenomatösen Polyphen entstehen, kann sich vermutlich ein Teil der MSI-positiven Tumoren aus hyperplastischen Polyphen über sogenannte „serrated adenoma“ (=gezahnte Adenome) entwickeln (■, Details siehe Huang *et al.* 2004). Neben Patienten mit erblich bedingten genetischen Veränderungen wie FAP, HNCPP und hamartomatösen Polyposissyndromen (z.B. Peutz-Jeghers-Syndrom, siehe ■) haben auch Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa ein erhöhtes Risiko für colorectalen Krebs (siehe ■). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von weiteren, in der colorectalen Carcinogenese nachweisbaren, genetischen Veränderungen verzichtet.

2.1.2 Ernährung und colorectale Carcinogenese

Internationale Unterschiede in der Inzidenz und Mortalität von Colonkrebs und ein Anstieg des Risikos in Bevölkerungsgruppen, die von risikoarmen in risikoreiche Gebiete auswandern (Migrationsstudien), deuten auf eine wichtige Rolle von Lebensstilfaktoren, insbesondere Ernährungsgewohnheiten, in der Ätiologie dieser Krebsart hin [Flood *et al.* 2000].

2.1.2.1 Risikofaktoren

Ergebnisse aus zahlreichen epidemiologischen Studien weisen darauf hin, dass der Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch einen Risikofaktor für colorectalen Krebs darstellt [Norat *et al.* 2002, WCRF 1997]. Der Verzehr von 80g rotem bzw. verarbeitetem Fleisch pro Tag kann nach einer Metaanalyse von Norat *et al.* das colorectale Risiko um 25 bzw. 65% erhöhen [Norat *et al.* 2002]. In einer prospektiven Kohortenstudie zeigten Personen, die Rind-, Schweine-, oder Lammfleisch als Hauptgericht fünf oder mehrmals die Woche verzehrten, ein um 3,6-fach erhöhtes Risiko für Colonkrebs, während Geflügel- und Fischverzehr keine Risikofaktoren darstellten [Giovannucci *et al.* 1994b]. Eine mögliche Erklärung könnte die endogene Produktion von carcinogen wirkenden *N*-Nitroso-Verbindungen sein, die durch Verzehr von rotem, nicht aber von weißem Fleisch gefördert wird [Bingham *et al.* 1996, Bingham *et al.* 2002]. Rotes Fleisch stellt eine gute Quelle für Häm-Eisen dar, das beim Menschen im Gegensatz zu anorganischem Eisen einen Anstieg von *N*-Nitroso-Verbindungen im Stuhl zur Folge hat [Cross *et al.* 2003]. Auch in gepökelten und geräucherten Fleischwaren finden sich *N*-Nitroso-Verbindungen bzw. Nitrit zur Konservierung, das die intestinale Nitrosierung erhöhen kann [Cross und Sinha 2004]. Bei hohen Temperaturen entstehen beim Braten und Grillen von Fleisch potenziell carcinogene heterozyklische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die häufig erst nach metabolischer Aktivierung genotoxisch sind. Genetische Polymorphismen der beteiligten Enzyme wie Cytochrom P4501A2 und *N*-Acetyltransferasen (NAT1, NAT2) können möglicherweise das Risiko für colorectalen Krebs modifizieren [Chen *et al.* 1998, Lang *et al.* 1994, Welfare *et al.* 1997]. Sie beeinflussen vermutlich auch das durch Rauchen bedingte erhöhte Risiko für adenomatöse Polypen [Potter 1999].

Darüber hinaus wurde vermutet, dass der Fettgehalt von Fleisch das Risiko für colorectalen Krebs beeinflusst, da die Fettaufnahme über eine Steigerung der Gallensäureexkretion die luminale Konzentration von den als Tumorpromotoren angesehenen sekundären Gallensäuren (siehe Abschnitt 2.3.3) im Colon erhöht [Nagengast *et al.* 1995].

Möglicherweise hängt der Einfluss der Aufnahme von Fett auf das colorectale Krebsrisiko von dessen Zusammensetzung ab. Eine hohe Aufnahme von tierischen gesättigten Fetten und mehrfach ungesättigten ω -6-Fettsäuren (PUFA) förderten im Tiermodell die carcinogen-induzierte Tumorentwicklung [Reddy 1992]. Dagegen scheint eine hohe Aufnahme von ω -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure (bzw. Fischöl) eine krebsprotektive Wirkung zu haben [Bartsch *et al.* 1999, Caygill *et al.* 1996]. Während ω -6-PUFAs die Colonicarcinogenese unter anderem über eine Steigerung der Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und p21*ras* fördern konnten, hemmen ω -3-Fettsäuren die Expression von COX-2 [Bartsch *et al.* 1999]. COX-2 stellt eine Isoform der Cyclooxygenasen (Enzyme des Prostaglandinstoffwechsels) dar. Sie kommt im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 im normalen Intestinum nicht vor, wird aber in den meisten Colontumoren vermehrt synthetisiert und kann durch Wachstumsfaktoren und bei Inflammation durch Cytokine induziert werden [Romano und Claria 2003]. COX-2 scheint eine Schlüsselrolle bei der colorectalen Tumorentstehung infolge APC-Mutation zu spielen [Hsi *et al.* 1999]. Die in epidemiologischen Studien beobachtete Reduktion der Colonkrebsmortalität um 40-50% nach langjähriger regelmäßiger Einnahme von nicht-steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten wird mit deren Wirkung als Cyclooxygenase-Inhibitoren in Verbindung gebracht [Giovannucci *et al.* 1994a, Giovannucci *et al.* 1995b].

Epidemiologische Studien zeigen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Gesamtfettaufnahme und colorectalem Krebs nur in Abhängigkeit der Energiezufuhr [Howe *et al.* 1997, Potter 1999]. Neben einer hohen Energieaufnahme werden auch ein hoher Body Mass Index (BMI) und Adipositas sowie geringe körperliche Aktivität mit einem erhöhten Colonkrebsrisiko in Verbindung gebracht [Giovannucci *et al.* 1995a]. Körperliche Aktivität könnte die Darmperistaltik anregen, die intestinale Passage beschleunigen und damit die Kontaktzeit eines potenziellen Carcinogens mit der Darmschleimhaut reduzieren [Friedenreich 2001]. Körperliche Inaktivität und Übergewicht erhöhen das Risiko für eine Hyperinsulinämie, die mit einem erhöhten Colonkrebsrisiko in Verbindung gebracht wird. Insulin und der insulinabhängige Wachstumsfaktor IGF-I beeinflussen *in vitro* die Proliferation und Apoptose (siehe Abschnitt 2.2.2) von Colonicarcinomzellen und könnten daher in die Carcinogenese eingreifen [Giovannucci 2001].

Auch ein hoher Alkoholkonsum erhöht möglicherweise das Risiko für colorectalen Krebs [Cho *et al.* 2004, WCRF 1997]. Die Metabolisierung zum cytotoxischen Acetaldehyd könnte unter anderem für die tumorfördernde Wirkung von Ethanol verantwortlich sein. Darüber hinaus könnte die durch chronischen Alkoholkonsum verursachte Induktion von Cytochrom P450E1 zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und anderer Substanzen, die in die Carcinogenese involviert sind, führen [Seitz *et al.* 1998].

Eine geringe Folataufnahme, insbesondere in Kombination mit hohem Alkoholkonsum und geringer Methioninaufnahme, kann das Risiko für colorectalen Krebs ebenfalls erhöhen [Giovannucci *et al.* 1995c]. Ein Mangel an Folat und Methionin führt zu Störungen in der DNA-Methylierung, die über Veränderungen in der Transkription zu einer Aktivierung von Protooncogenen führen könnte.

2.1.2.2 Protektive Faktoren

Nach Schätzungen von Willett könnten 50-80% der Todesfälle aufgrund von colorectalen Krebserkrankungen durch diätetische Veränderungen vermieden werden [Willett 1995]. In diesem Abschnitt werden die wichtigsten protektiven Nahrungsfaktoren diskutiert.

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Obst- und Gemüseverzehr und colorectalem Krebsrisiko untersucht. Die Evaluierung der Studienergebnisse durch den World Cancer Research Fund (WCRF) führte zu der Schlussfolgerung, dass ein hoher Gemüseverzehr das Risiko für colorectalen Krebs senkt, während die Daten zum Einfluss des Obstkonsums inkonsistent sind [WCRF 1997]. Eine Metaanalyse zeigte, dass durch eine Erhöhung des Obst- bzw. Gemüseverzehrs um 100g/Tag das colorectale Krebsrisiko durchschnittlich um 6 bzw. 9% gesenkt werden kann [Riboli und Norat 2003]. Zahlreiche Mechanismen werden für eine krebsprotektive Wirkung von Gemüse und Obst in Betrachtung gezogen, da diese Nahrungsmittel unter anderem Ballaststoffe und Substanzen wie Carotinoide und andere sekundäre Pflanzenstoffe, Vitamin C und E und Selen mit potenziell anticarcinogenen Eigenschaften enthalten [Steinmetz und Potter 1991]. Krebsprotektive molekulare Wirkungsmechanismen, die in Zusammenhang mit dem Obst- und Gemüseverzehr stehen, wie die Interaktion von Mikronährstoffen mit Prozessen im Metabolismus von Carcinogenen, Schutz der DNA-Integrität und Beteiligung an der intrazellulären Kommunikation [WHO 2003], werden am Beispiel der Carotinoide in Abschnitt 2.4.3ff genauer vorgestellt.

Die Rolle von Ballaststoffen als protektive Faktoren der colorectalen Carcinogenese wird zurzeit kontrovers diskutiert. Ballaststoffe stellen eine äußerst heterogene Gruppe aus zahlreichen Substanzen dar. Nach einer aktualisierten Definition der American Association of Cereal Chemists (AACC) sind Ballaststoffe essbare Pflanzenbestandteile oder analoge Kohlenhydrate⁶, die gegenüber der Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und teilweise oder vollständig im Dickdarm fermentiert werden.

⁶ Analoge Kohlenhydrate entsprechen chemisch den natürlich vorkommenden Kohlenhydraten und entstehen durch chemische oder physikalische Prozesse (z.B. Hitzeeinwirkung) bei der Verarbeitung von Nahrungsmitteln oder bei der chemischen Synthese. Zu den analogen Kohlenhydraten zählen z.B. resistente Maltodextrine, resistente Kartoffeldextrine, Methylcellulose und andere.

Dazu gehören Polysaccharide wie Cellulose, Hemicellulosen, Pectine, Polyfructosen, Gummis, Schleime und Oligosaccharide, analoge Kohlenhydrate wie resistente Stärke, Lignine und damit assoziierte Substanzen wie Wachse und Phytate [De Vries 2003]. Ballaststoffe fördern nach der AACC günstige physiologische Effekte wie Laxation und Verminderung des Blutcholesterol- oder Blutglucose-spiegels. Burkitt postulierte erstmals 1971 günstige Effekte einer hohen Ballaststoffaufnahme auf Darmerkrankungen, einschließlich Colonkrebs [Burkitt 1971]. Seitdem haben zahlreiche Studien eine inverse Assoziation zwischen Ballaststoffaufnahme und Colonkrebsrisiko beobachtet. Mechanismen wie Erhöhung des Stuhlvolumens und daraus resultierende Verdünnung potenzieller Carcinogene, Verringerung der Transitzeit und damit Kontaktzeit der Mucosa mit Carcinogenen, Erniedrigung des intraluminalen pH-Wertes, Verminderung der Absorption von Faeces-Carcinogenen und günstige Veränderungen der Mikroflora (siehe 2.3.2ff) werden für eine krebsschutzende Wirkung von Ballaststoffen verantwortlich gemacht [Übersicht in AGA 2000]. Die protektiven Effekte von Ballaststoffen auf die colorectale Carcinogenese wurden jedoch durch die Ergebnisse mehrerer Studien wie NHS (Nurses` Health Study, [Fuchs *et al.* 1999]) und PPT (Polyp Prevention Trial, [Schatzkin *et al.* 2000]) in Frage gestellt. Positive Effekte einer Ballaststoff-Supplementierung auf die Rezidivrate von Polypen konnten wiederholt nicht nachgewiesen werden [Alberts *et al.* 2000, Bonithon-Kopp *et al.* 2000, Schatzkin *et al.* 2000]. Zwei neuere Studien, die EPIC⁷-Studie mit einem heterogenen Probandenkollektiv von über 500.000 Freiwilligen in 22 europäischen Zentren [Bingham *et al.* 2003] und PLCO (Prostate Lung Colorectal and Ovarian Screening Trial, [Peters *et al.* 2003]) zeigten jedoch eine inverse Beziehung zwischen der Ballaststoffaufnahme und dem Colonkrebs-Risiko.

Durch Fällung cytotoxisch wirkender Gallensäuren und freier Fettsäuren im Darmlumen könnte auch Calcium für protektive Effekte auf die colorectale Carcinogenese verantwortlich sein [Govers *et al.* 1996, Lapre *et al.* 1993b]. Epidemiologische Studien zeigten häufig nur einen schwach senkenden bzw. keinen Einfluss auf das colorectale Krebsrisiko [WCRF 1997]. Die prospektiven Kohortenstudien NHS und HPFS (Health Professionals Follow-Up Study) beobachteten jedoch ein reduziertes Risiko für distalen Colonkrebs bei einer Calciumaufnahme von >1250mg/Tag [Wu *et al.* 2002]. In einer Interventionsstudie wurde eine statistisch signifikante moderate Reduktion (15-20%) der Rezidivrate von colorectalen Adenomen durch Calcium-Supplementierung (1200mg/Tag, über 3-4 Jahre) festgestellt [Baron *et al.* 1999].

⁷ EPIC: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

2.2 Intestinale Gewebemöostase

Die colorectale Krebsentstehung hängt von zahlreichen Ernährungsfaktoren ab. Das menschliche Colon ist kontinuierlich einem komplexen Gemisch aus verschiedenen Komponenten ausgesetzt, die direkt aus der Nahrung stammen oder durch digestive, mikrobielle und sekretorische Prozesse entstehen und die intestinale Gewebemöostase entscheidend beeinflussen können.

2.2.1 Proliferation

Die Proliferation spielt als zellulärer Parameter eine bedeutende Rolle in der Carcinogenese, da eine gesteigerte Proliferationsrate initiierten Zellen zur clonalen Expansion verhelfen kann [Gryfe *et al.* 1997]. Eine gesteigerte Zellproliferation im Colon wird als frühes Ereignis in der Adenom-Carcinom-Sequenz angesehen [Vogelstein und Kinzler 1993]. Das intestinale Epithel gehört mit einer Selbsterneuerung alle 3-6 Tage zu den schnell proliferierenden Geweben mit hohem Zellumsatz, so dass die Kontrolle der Zellproliferation und des Zelltodes besonders wichtig ist für die Gewebemöostase. Mit einer Rate von ca. 200 Zellen/mm² pro Stunde werden beim Menschen gealterte Epithelzellen in das Colonlumen abgestoßen [Johnson 2002]. Zur Erhaltung der Mucosaintegrität entstehen im Colon nahe der Kryptenbasis aus pluripotenten Stammzellen - vermutlich durch asymmetrische Teilung - neue Stammzellen und Tochterzellen, die sich in der Proliferationszone zunächst teilen und entlang der Krypten zur luminalen Oberfläche wandern, wobei sie Differenzierungs-Prozessen unterliegen. An der luminalen Colonkrypten-Oberfläche sterben die ausdifferenzierten Zellen durch Apoptose (siehe 2.2.2) ab, wenn sie die Bindung an die Extrazellulärmatrix verlieren. Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen dieser Abschilferung und der Erneuerung der Kryptenzellen führt zur Hyperproliferation und zur Ausweitung der Proliferationszone auf die gesamten Krypte [Wilson *et al.* 1990]. Menschen mit einem erhöhten Risiko für colorectalen Krebs, wie z.B. Patienten mit FAP oder sporadischen adenomatösen Polypen und Colonicarcinomen, zeigen eine entsprechend höhere Mucosa-Zellproliferation [Stadler *et al.* 1988b, Terpstra *et al.* 1987]. Auch bei anderen Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko für die Colonicrebsentwicklung in Verbindung gebracht werden, wie eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährung oder Colitis ulcerosa, wurde eine erhöhte Proliferation der Mucosa beobachtet [Biasco *et al.* 1990, Segal 1998].

Eine Stimulation der proliferativen Aktivität des Colonepithels könnte zum Teil durch cytotoxische Mechanismen, die zu einem gesteigerten Zellverlust an der Epitheloberfläche führen, über einen kompensatorischen Anstieg der mitotischen

Aktivität der Krypten vermittelt werden [Rafter *et al.* 2004]. Solche Überlegungen führten zur Entwicklung von Versuchen zur Beurteilung der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser (siehe Abschnitt 2.3.1) auf Colonzellen *in vitro*.

2.2.2 Zelltod (Apoptose und Nekrose)

Unkontrolliertes Wachstum kann nicht nur durch eine Erhöhung der Zellproliferation, sondern auch durch eine verminderte Zelltodrate verursacht werden. Der eukaryotische Zelltod kann in zwei unterschiedlichen Formen auftreten: Apoptose und Nekrose. Die Nekrose ist eine passive pathologische Form des Zelltodes, die im Allgemeinen durch schwere Zellschädigungen wie mechanische Verletzung, Hyperthermie, Ischämie, Hypoxie oder Einwirkung chemischer Noxen auftritt und in der Regel viele benachbarte Zellen gleichzeitig betrifft. Dagegen stellt die Apoptose - auch als programmierter Zelltod bezeichnet - einen aktiven, genetisch kontrollierten, physiologischen Prozess der Selbstzerstörung dar, der bei gealterten oder geschädigten Zellen auftritt [Grodzicky und Elkon 2002]. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und normalen Gewebemöostase und hat auch pathophysiologische Bedeutung. Entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Zöliakie werden z.B. mit einer erhöhten Apoptoserate im Gastrointestinaltrakt in Verbindung gebracht [Sun *et al.* 1998], während bei Krebs- und Autoimmunerkrankungen Zellen gekennzeichnet sind durch eine verminderte Fähigkeit, in Apoptose zu gehen [Thompson 1995]. So wiesen z.B. Zellen normaler Colonmucosa-Proben von Patienten mit Colonkrebs-Vorgeschichte oder FAP eine reduzierte Fähigkeit auf, in Apoptose zu gehen, im Vergleich zu Probanden ohne Vorgeschichte hinsichtlich neoplastischer Veränderungen [Bedi *et al.* 1995].

Im Unterschied zur Nekrose folgt die Apoptose einem Muster morphologischer und biochemischer Veränderungen, unabhängig vom jeweiligen initiiierenden Ereignis. Sie ist gekennzeichnet durch Umlagerung von Phosphatidylserin-Resten von der Innen- an die Außenseite der Zellmembran, Ausstülpung von Bläschen an der Membran (apoptotic blebs), Kondensation von Zytoplasma und Zellorganellen, nukleärer Chromatinkondensation und spezifischer DNA-Fragmentierung durch Endonucleasen in Vielfache von 180-200 Basenpaaren [Grodzicky und Elkon 2002]. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen bleibt bei apoptotischen Zellen die Zellmembran intakt; sie zerfallen ohne extrazelluläre Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile in sog. Apoptosekörperchen (apoptotic bodies). Diese werden *in vivo* von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert, ohne eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervorzurufen. Apoptosestimuli stellen unter anderem Entzug von Wachstumsfaktoren, Veränderungen in der Extrazellulärmatrix, DNA-Schäden, Pathogene, Toxine, oxidativer Stress, Stickstoffoxide und entzündungsvermittelnde Prozesse dar [Que und Gores 1996].

Ausgelöst werden apoptotische Vorgänge im Wesentlichen über die in Abb. 2.2 dargestellten Signalwege. Ein Signalweg wird vermittelt durch Bindung von extrazellulären Liganden an sog. Todesrezeptoren wie Fas (Apo-1/CD95). Durch Bindung der entsprechenden Liganden (z.B. Cytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder Fas-Ligand) an den Todesrezeptor wird die Bildung eines Signalkomplexes aus Rezeptor, FADD (Fas associated death domain) und Procaspase-8 initiiert, der seinerseits zur Aktivierung von verschiedenen Caspasen führt [Watson 2004]. Caspasen sind spezifische Cystein-Proteasen, die als inaktive Proenzyme synthetisiert und autokatalytisch (z.B. Caspase-8 und -9) bzw. durch Initiatorcaspasen wie Caspase-8 aktiviert werden (siehe Abb. 2.2). Zielmoleküle aktivierter Caspasen sind neben inaktiven Caspasen z.B. DNA-Reparaturenzyme wie PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) oder Komponenten des Cytoskeletts wie Actin und die Proteinkinase C.

Der zweite mitochondriale Signalweg der Apoptose kann z.B. durch DNA-schädigende Substanzen, cytotoxischen Stress oder durch Mangel an essentiellen Wachstumsfaktoren aktiviert werden [Johnson 2002]. Die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien stellt ein Schlüsselereignis in diesem Signalweg dar und wird kontrolliert durch die Proteine der Bcl-2 Familie [Watson 2004]. Während Bcl-2 und Bcl-X_L antiapoptotische Mitglieder sind, tragen Bid, Bak und Bax zur Induktion von Apoptose bei. Im Cytosol bildet Cytochrom C mit APAF-1 (apoptotic protease activating factor) und Procaspase-9 einen Proteinkomplex, wodurch Caspase-9 autokatalytisch und nachfolgend weitere Caspasen aktiviert werden. Auch *APC* und *p53*, Gene, die eine wichtige Rolle in der Carcinogenese spielen (siehe Abschnitt 2.1.1ff), sind an der Regulation der Apoptose beteiligt. So kann P53 bei Zellen, deren DNA-Schäden nicht innerhalb der durch Zellzyklusarrest verlängerten G1-Phase behoben werden konnten, Apoptose induzieren. *In vitro* konnte durch P53 die Bcl-2 Synthese gehemmt und die Bax-Synthese gesteigert werden [Lu *et al.* 1996]. Die Transfektion von *APC* in HT-29 Coloncarcinomzellen mit homozygot mutierten *APC*-Allelen führte zu einer deutlichen Wachstumshemmung durch Apoptoseinduktion und zur Herunterregulation von COX-2 [Hsi *et al.* 1999].

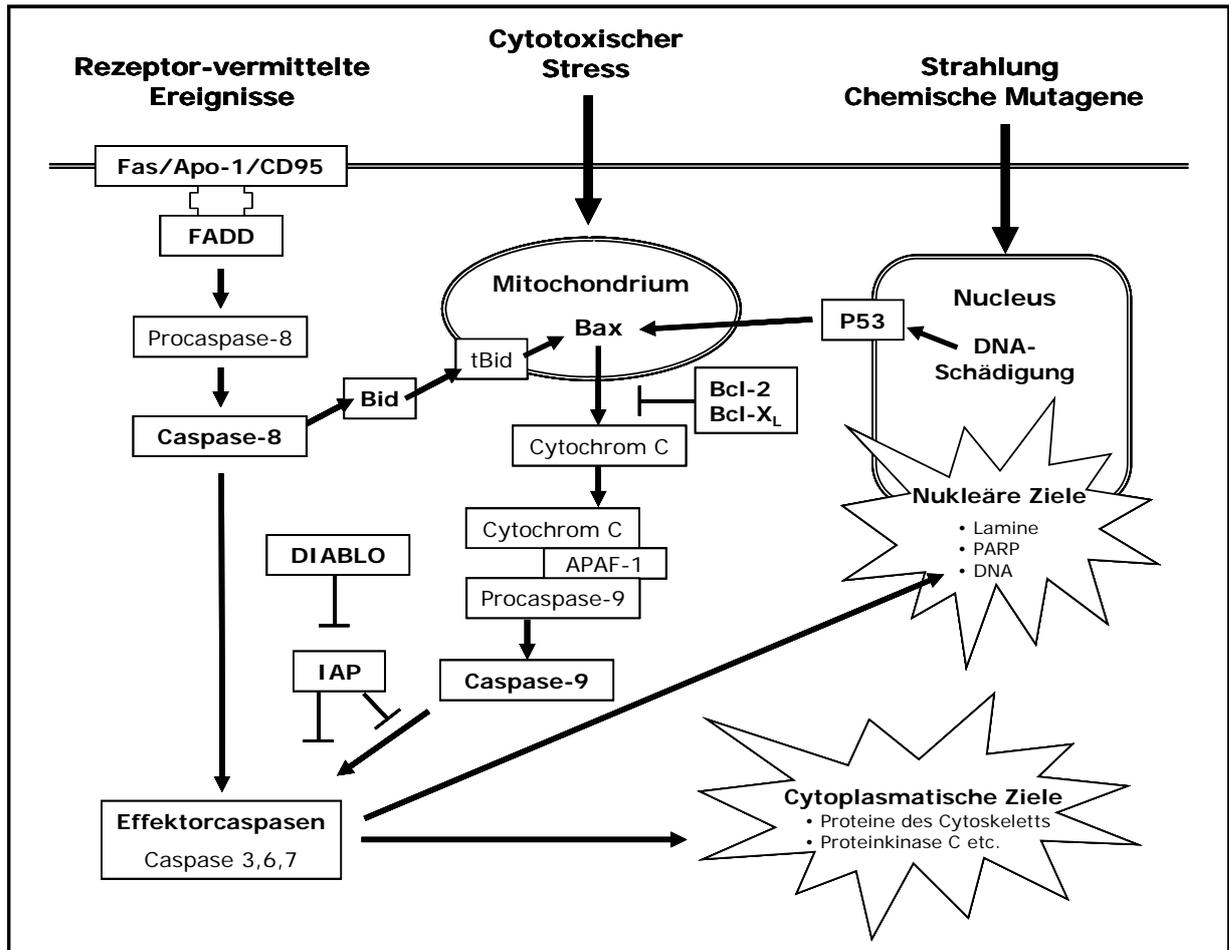


Abb. 2.2: Signalwege der Apoptose [vereinfachte Darstellung, modifiziert nach Johnson *et al.* 2002]. Während in Typ I-Zellen wie Thymocyten Bcl-2 die Fas-induzierte Apoptose nicht verhindern kann, wird in manchen Zellen (Typ II, z.B. Hepatocyten) auch der mitochondriale Signalweg über Aktivierung (Spaltung) des Bid-Proteins durch Caspase-8 aktiviert. In diesem Fall kann die Fas-induzierte Apoptose durch Bcl-2 blockiert werden, da Caspase-8 nicht ausreichend Effektorcaspasen aktivieren kann, um eine Zelle zu töten [Watson 2004]. Expressionsprodukte anderer Gene, die den programmierten Zelltod verhindern wie NF κ B, können Proteine der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis proteins) an bestimmte Caspasen binden und sie damit hemmen. Die unterschiedliche Verteilung von Bcl-2 und Bak in den Colonkrypten lässt vermuten, dass diese Proteine eine wichtige Rolle für die Regulation der Apoptose im Colonepithel spielen. Während Bcl-2 in der Proliferationszone synthetisiert wird, findet sich Bax in der oberen Kryptenhälfte v.a. an der Kryptenoberfläche in Zellen, die sich nicht mehr teilen [Hague *et al.* 1997].

Im Dünndarmepithel tritt an der luminalen Colonkryptenoberfläche neben der Apoptose zur Abstoßung von Epithelzellen ins Darmlumen (Anoikis) eine permanent zu beobachtende sogenannte spontane Apoptose auf, die auf Zellen der Stammzellregion beschränkt ist und als regulatorischer Mechanismus der Stammzellhomöostase angesehen wird [Renehan *et al.* 2002]. In den Colonkrypten tritt spontane Apoptose seltener auf (nur ca. 1/10 im Vergleich zur Apoptose-rate im Dünndarm), und apoptotische Zellen finden sich über die gesamte Kryptenoberfläche verteilt [Potten *et al.* 1997].

Darüber hinaus synthetisieren Colonstammzellen das antiapoptotisch wirkende Bcl-2, wodurch das Überleben dieser Zellen, auch mit genetischen Schäden, begünstigt wird und die Ausbildung hyperplastischer Krypten zur Folge haben könnte. Möglicherweise tritt Colonkrebs daher wesentlich häufiger als Dünndarmkrebs auf [Potten *et al.* 1997].

2.3 Colonicarcinogenese-relevante Faecesmarker

Die Erforschung von Ernährungseinflüssen auf die Dickdarmkrebs-Entstehung wird dadurch erschwert, dass die Entwicklung eines malignen colorectalen Carcinoms aufgrund kumulativer genetischer Veränderungen meistens Jahrzehnte benötigt. Daher ist die Entwicklung geeigneter Biomarker für Dickdarmkrebs von besonderem Interesse. Im Gegensatz zu histologischen Biomarkern wie Polypenbildung oder Vorkommen einer hochgradigen Dysplasie werden in Humaninterventionsstudien häufig nicht invasive molekulare Biomarker in Blut oder Faeces untersucht. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Biomarker sind in den nachfolgenden Abschnitten genauer beschrieben.

2.3.1 Faeceswasser-Untersuchungen

Es gibt wichtige Hinweise darauf, dass Faktoren im Darmlumen, die die Darmmucosa schädigen, maßgeblich an der Entwicklung von Colontumoren beteiligt sind. Freie reaktive und lösliche Komponenten beeinflussen das intestinale Epithel wahrscheinlich stärker als Substanzen, die an eine unlösliche Matrix wie Ballaststoffe oder an die Bakterienmasse gebunden sind [Rafter *et al.* 2004]. Die wässrige Phase einer Stuhlprobe (Faeceswasser, FW) liefert eine direkte Einschätzung des Potenzials einer Faeces-Probe, Schäden an der Colonmucosa zu verursachen. Sie wurde genutzt, um Erkenntnisse über mögliche Prozesse, die in die Colonicarcinogenese involviert sind wie Cytotoxizität und Genotoxizität, zu gewinnen [Gill und Rowland 2002]. Im Tiermodell zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen der diätabhängigen FW-Cytotoxizität und der *In-vivo*-Zellproliferation des Colonepithels [Lapre *et al.* 1993a]. Daher wird die Cytotoxizität von Faeceswasser immer häufiger in Interventionsstudien als Biomarker für das Colonicarcinogeneserisiko genutzt [Geltner-Allinger *et al.* 1989, Glinghammar *et al.* 1997, Govers *et al.* 1996, Rafter *et al.* 1987]. Einige Interventionsstudien mit Ernährungsformen, die mit einem erhöhten oder verminderten colorectalen Krebsrisiko assoziiert werden (siehe 2.1.2ff), konnten die FW-Cytotoxizität entsprechend modulieren. So reduzierte z.B. diätetisches Calcium die FW-Cytotoxizität vermutlich durch Fällen löslicher Gallensäuren und Fettsäuren [Govers *et al.* 1996, Lapre *et al.* 1993b, Van der Meer *et al.* 1991, Van der Meer *et al.* 1997].

Der Wechsel von einer Milchprodukte-reichen Ernährung zu einer Milchprodukte-freien Diät führte zu einem Anstieg der FW-Cytotoxizität, möglicherweise bedingt durch eine verminderte Calciumaufnahme [Glinghammar *et al.* 1997]. Die FW-Cytotoxizität von Probanden mit einer fettreichen, calciumarmen und ballaststoffarmen Ernährung war höher als die von Probanden unter einer fettarmen, calciumreichen und ballaststoffreichen Diät [Rafter *et al.* 1987]. Bei gesunden Probanden wurde eine gesteigerte Proliferation von Mucosazellen aus rectalen Biopsien durch einen erhöhten Fettverzehr (Maiskeimöl) beobachtet, die gleichzeitig mit einem Anstieg der Konzentration von Gallensäuren in Faeceswasser assoziiert war [Stadler *et al.* 1988b]. Eine hohe Aufnahme von Häm aus rotem Fleisch steigerte bei Ratten die Cytotoxizität von Faeceswasser und die Colonzellproliferation [Sesink *et al.* 1999, Sesink *et al.* 2000]. Versuche zur genotoxischen Aktivität von Faeceswasser gaben Informationen zur Exposition von Colonepithelzellen gegenüber potenziellen Carcinogenen und unterstützten die Annahme, dass diese Faeces-Fraktion wichtig bei der Vermittlung der Effekte von Nahrungskomponenten auf die maligne Transformation im Colon ist [Venturi *et al.* 1997]. Eine fettreiche, fleischreiche und ballaststoffarme Ernährung erhöhte das genotoxische Potenzial von Faeceswasser [Rieger *et al.* 1999]. Glinghammar *et al.* beobachteten bei der Umstellung einer Milchprodukte-reichen auf eine Milchprodukte-freie Diät trotz Anstieg der FW-Cytotoxizität keinen Einfluss auf die genotoxische Wirkung von Faeceswasser. Lipidkomponenten aus Faeceswasser können AP-1 (activator protein 1) aktivieren, einen Transkriptionsfaktor, der mit der Promotion neoplastischer Transformationen in Verbindung gebracht wird [Glinghammar *et al.* 1999].

2.3.2 Enzymatische Aktivität der Mikroflora

Durch zahlreiche Studien wurde die Darmflora mit der Ätiologie von Colonkrebs in Verbindung gebracht und diese Beobachtungen bilden die theoretische Basis für den Einsatz von Darmflora-Biomarkern (Faeces-Biomarkern) [Gill und Rowland 2002].

Jeder gesunde erwachsene Mensch besitzt eine individuelle, weitgehend stabile Mikroflora mit >400 bisher identifizierten Bakterienspezies, die Konzentrationen von bis zu 10^{12} Zellen pro Gramm Darminhalt im Colon erreichen können [Reuter 2001]. In der Colonflora Erwachsener überwiegen obligat anaerobe Bakterien wie Bacteroides, Bifidobakterien, Eubakterien, Clostridien und andere, mit individuell variierenden dominierenden Spezies. Die individuelle Flora kann sich unter gewissen Umständen, z.B. bei akuter Diarrhoe und Antibiotikabehandlung, oder durch eine Ernährungsumstellung verändern [Guarner und Malagelada 2003].

Die Mikroflora kann bedeutende Effekte auf das Colonepithel ausüben. Sie verhindert die Besiedelung des Darms mit pathogenen Keimen (Barrierefunktion) und ist an der Regulation der intestinalen Immunfunktion, einschließlich Toleranz, beteiligt [Mai und Morris 2004]. Sie trägt außerdem zur Erhöhung der Stuhlmasse und damit vermutlich zur Verkürzung der Transitzeit und zur Verminderung der Exposition des intestinalen Lumens mit toxischen Substanzen bei. Die Umsetzung von Substanzen aus der Nahrung durch die intestinale Mikroflora kann zu luminalen pH-Veränderungen führen. Die Mikroflora produziert als gesundheitsfördernd geltende Substanzen wie kurzkettige Fettsäuren (siehe 2.3.4), aber auch schädliche Substanzen (Acetaldehyd und andere) und erleichtert die Metabolisierung und Aufnahme von Nahrungskomponenten wie Phytoöstrogenen und Vitaminen [Mai und Morris 2004]. Darüber hinaus führt sie zur Transformation und/oder Exkretion von toxischen bzw. potenziell carcinogenen Substanzen wie sekundären Gallensäuren (siehe 2.3.3), Nitrosaminen und heterocyclischen Aminen. Daher werden bakterielle Enzyme, wie Azoreduktase, Nitroreduktase, 7- α -Dehydroxylase (siehe 2.3.3), β -Glucuronidase und β -Glucosidase, die eine wichtige Rolle bei der Carcinogenaktivierung spielen, mit Colonkrebs in Verbindung gebracht [Goldin und Gorbach 1976, Mastromarino *et al.* 1976]. Azoreduktase katalysiert die reduktive Spaltung von Azoverbindungen, die zum Teil toxische, mutagene oder carcinogene Wirkung zeigen. Nitroreduktase ist an der Umwandlung von aromatischen Nitro-Verbindungen zu Aminen beteiligt, die ebenfalls häufig toxisch, mutagen oder carcinogen sind [Nakamura *et al.* 2002].

Die bakterielle β -Glucosidase kann zahlreiche, sehr unterschiedliche pflanzliche Glycoside hydrolysieren. Dabei können carcinogen wirkende Aglycone wie Azoxymethan und Cycasin freigesetzt werden, die in glycosidischer Form inaktiv sind [Steer *et al.* 2000]. Auch die protektive intestinale Mucusschicht könnte durch Einwirkung bakterieller β -Glucosidasen beeinträchtigt werden [Johansson *et al.* 1990]. Ein Anstieg der β -Glucosidase-Aktivität kann jedoch auch als gesundheitsfördernder Effekt angesehen werden, da dieses Enzym zur Freisetzung von Flavonoiden mit antimutagenen, antioxidativen, anticancerogenen und immunstimulierenden Eigenschaften führt [Wollowski *et al.* 2001].

Viele toxische und carcinogene Substanzen, auch endogen produzierte Komponenten wie Steroide, werden durch die Leber metabolisiert und anschließend mit Glucuronsäure konjugiert, bevor sie über die Galle in den Dünndarm ausgeschieden werden. Im Colon kann die bakterielle β -Glucuronidase die Konjugate hydrolysieren und damit die ursprünglichen Komponenten oder die entsprechenden hepatischen Metaboliten freisetzen. Das Colonicarcinogen DMH (1,2-Dimethylhydrazin) wird z.B. in der Leber zu Methylazoxymethanol (MAM) metabolisiert und zum Teil als Konjugat in die Galle ausgeschüttet. Durch bakterielle Hydrolyse der Konjugate entsteht im Colon wieder freies MAM. Keimfreie Ratten, die mit DMH oder MAM behandelt werden, entwickeln weniger Colontumoren als konven-

tionelle Tiere. Der Einsatz eines Glucuronidase-Inhibitors, verabreicht in Verbindung mit dem Carcinogen, reduziert signifikant die Zahl von Tumoren im Ratten-colon [Gill und Rowland 2002]. Bevölkerungsgruppen mit einem hohen Risiko für colorectalen Krebs weisen eine hohe Aktivität dieses Enzyms auf. Darüber hinaus ist die faecale β -Glucuronidase-Aktivität bei Colonkrebspatienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht [Kim und Jin 2001]. Die β -Glucuronidase-Aktivität kann durch die Ernährung moduliert werden. So steigerte eine fett- bzw. proteinreiche Diät bei Ratten die Aktivität dieses Enzyms [Reddy *et al.* 1977]. Im Vergleich zu Vegetariern zeigten Menschen beim Verzehr gemischter Kost ebenfalls eine erhöhte faecale β -Glucuronidase-Aktivität [Goldin *et al.* 1980]. Der Verzehr von Weizenkleie, Haferkleie und Vollkornroggen sowie Supplementierung mit *Lactobacillus acidophilus* reduzierte in Humanstudien dagegen die β -Glucuronidase-Aktivität [Goldin *et al.* 1980, Grasten *et al.* 2000, Reddy *et al.* 1992]. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die β -Glucuronidase der Mikroflora eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Colonkrebs spielt.

2.3.3 Gallensäuren

Die häufigsten Gallensäuren (GS) beim Menschen sind die Chenodesoxycholsäure (CDCA) und die hydrophilere Cholsäure (CA, siehe Abb. 2.3). Diese primären Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert, mit Glycin oder Taurin konjugiert und mit der Galle in den Dünndarm ausgeschieden, wo sie eine wichtige Rolle bei der Verdauung und Absorption von Nahrungslipiden spielen. Über 95% der konjugierten primären Gallensäuren, die bei intestinalem pH vollkommen ionisiert vorliegen, werden überwiegend aktiv durch einen Na^+ -abhängigen Transport im terminalen Ileum rückresorbiert und gelangen über die Portalvene erneut zur Leber (enterohepatischer Kreislauf) [Meier und Stieger 2002]. Diese enterohepatische Zirkulation übersteigt deutlich die GS-Synthese aus Cholesterin [Hofmann 1999]. Die restlichen 2-5% gelangen ins Colon und werden überwiegend durch die intestinale Flora dekonjugiert und durch 7- α -Dehydroxylierung zu den hydrophoberen sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) metabolisiert.

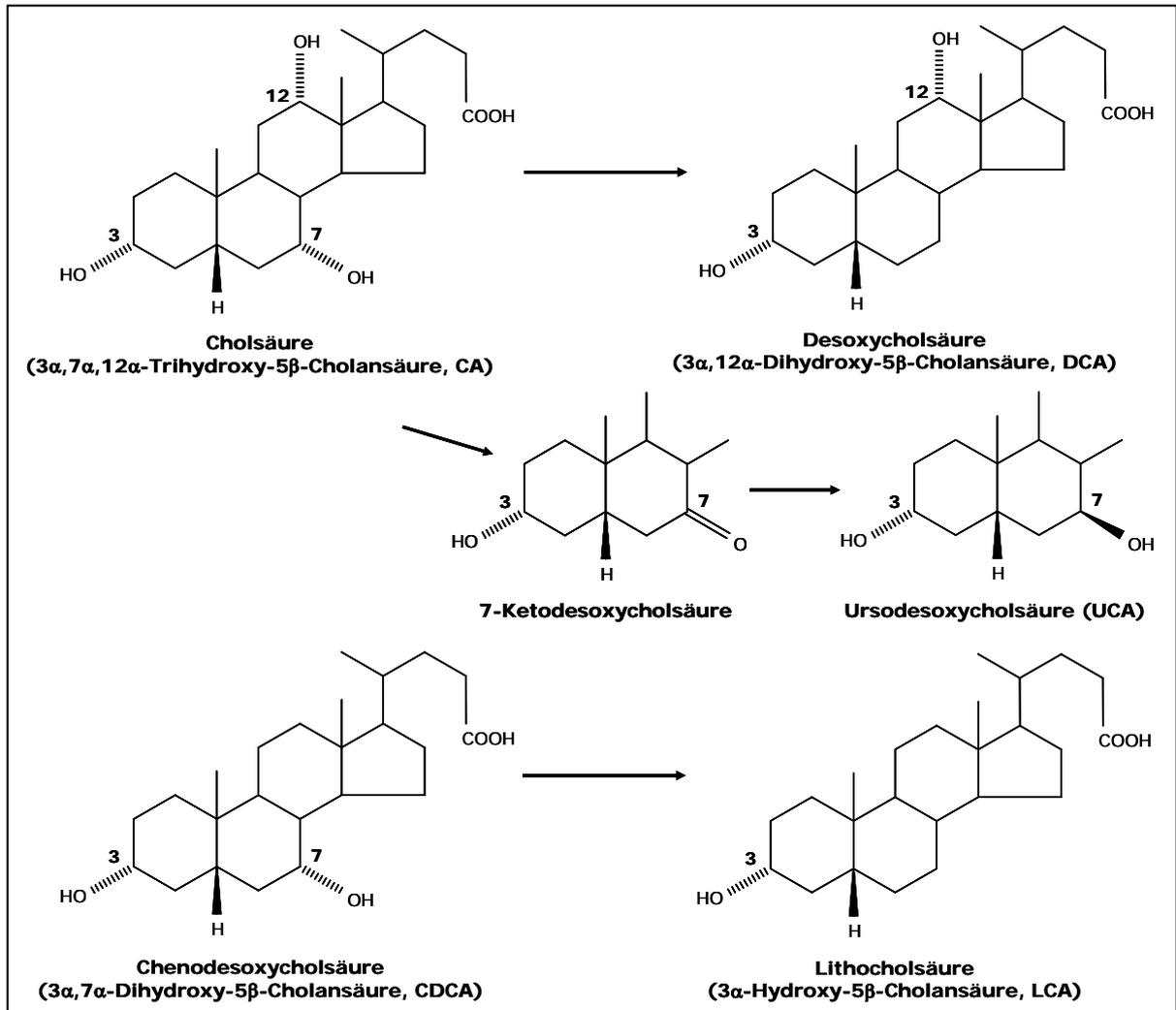


Abb. 2.3: Umwandlung von primären Gallensäuren in sekundäre Gallensäuren durch die Darmflora. Dargestellt sind ausschließlich die in dieser Arbeit erfassten Gallensäuren [nach [Macdonald *et al.* 1983]].

DCA und LCA, die über 80% der faecalen Gallensäuren ausmachen, wird eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Colonkrebs durch Wirkung als Tumorpromotoren zugeschrieben [Gill und Rowland 2002, Nagengast *et al.* 1995]. Sie können z.B. als Tumorpromotoren bei der chemisch induzierten Carcinogenese in Ratten wirken [Cohen *et al.* 1980, Reddy und Watanabe 1979]. In Humanstudien wiesen Patienten mit colorectalen Neoplasien höhere Konzentrationen von sekundären Gallensäuren in Faecesmaterial oder Darmflüssigkeit aus Colonoskopien als Probanden mit normalem Colon auf [Imray *et al.* 1992, Kishida *et al.* 1997]. Außerdem zeigten Patienten mit Colontumoren neben einer erhöhten Mucosazellproliferation höhere DCA- und LCA-Konzentrationen in Faeceswasser im Vergleich zu Probanden ohne pathologischen Befund [Stadler *et al.* 1988b]. Einige Studien haben gezeigt, dass die Konzentrationen von Gallensäuren in Faeceswasser durch Ernährungsinterventionen modifiziert werden können.

Dabei wurde eine gesteigerte Konzentration an Gallensäuren in Faeceswasser bei einer Ernährung, die mit einem erhöhten Colonkrebsrisiko in Verbindung gebracht wird, beobachtet [Geltner-Allinger *et al.* 1989, Rafter *et al.* 1987]. Es scheint sogar möglich zu sein, durch diätetische Modifikationen die Konzentrationen von Gallensäuren in Faeceswasser zu erhöhen, ohne den Gesamt-GS-Gehalt im Stuhl zu beeinflussen [Rafter *et al.* 1987]. Eine diätinduzierte Erhöhung der Konzentration an Gallensäuren im Colon führte bei Ratten zu einer erhöhten FW-Cytotoxizität, verbunden mit einem Anstieg der Colonzellproliferation [Lapre und Van der Meer 1992].

Aus *In-vitro*-Studien sind zahlreiche biologische und metabolische Effekte, insbesondere der sekundären Gallensäuren LCA und DCA, bekannt. Einige Gallensäuren wirkten cytotoxisch auf menschliche Colontumorzelllinien wie HT-29, HCT-116 und T-84 [Latta *et al.* 1993, van Munster *et al.* 1993]. LCA zeigte die stärkste Wirkung, gefolgt von CDCA und DCA, während CA in Konzentrationen bis 400µM nicht cytotoxisch war [Latta *et al.* 1993]. Die Cytotoxizität wird dabei häufig mit den relativen hydrophoben Eigenschaften der Gallensäuren in Verbindung gebracht [Lapre *et al.* 1992, Powell *et al.* 2001].

Die Mechanismen der Tumorpromotion durch Gallensäuren sind bisher unklar. Durch die Zellschädigung könnte infolge kompensatorischer Zellproliferation die Tumorbildung durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Mutagenen oder durch Proliferation bereits initiiertter Zellen gefördert werden [De Kok und van Maanen 2000]. Sekundäre Gallensäuren konnten in hohen Konzentrationen (>300µM) DNA-Schäden in Colonadenocarcinomzellen induzieren [Venturi *et al.* 1997]. Durch DCA konnten *in vitro* auch an der Wachstumsregulation beteiligte Gene wie *COX-2* [Glinghammar und Rafter 2001, Zhang *et al.* 1998] und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 [Qiao *et al.* 2000] und NFκB [Payne *et al.* 1998] aktiviert werden. Darüber hinaus wurde vermutet, dass sekundäre Gallensäuren die colorectale Carcinogenese beeinflussen, indem sie zur Selektion apoptoseresistenter Epithelzellen führen [Hague *et al.* 1995, Payne *et al.* 1995]. Zellen aus der morphologisch normalen Colonmucosa von Colonkrebspatienten zeigten *in vitro* nach Behandlung mit Natriumdesoxycholat eine verminderte Apoptoseinduktion im Vergleich zu Zellen gesunder Probanden [Bernstein *et al.* 1999, Garewal *et al.* 1996]. Im Gegensatz zu den anderen Gallensäuren stellt die Ursodesoxycholsäure (UDCA, Stereoisomer der CDCA), die durch intestinale Bakterien gebildet wird, vermutlich eher eine chemopräventive Substanz dar, die die Tumorentwicklung bei Ratten hemmen kann [Narisawa *et al.* 1998]. *In vitro* hemmte die nicht cytotoxische UDCA die Zellproliferation von Colonadenocarcinomzellen, induzierte aber keine Apoptose [Martinez *et al.* 1998].

2.3.4 Kurzkettige Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) Essigsäure (C_2), Propionsäure (C_3) und Buttersäure (C_4) sind die Hauptendprodukte der bakteriellen Fermentation und machen ca. 90% der kurzkettigen Fettsäuren im Dickdarm aus [Johnson 2002]. Sie haben eine trophische Wirkung auf die Darmschleimhaut, stimulieren den Blutfluss in der Colonmucosa und die Sauerstoffaufnahme, fördern die Na^+ - und Wasserresorption im Colon und wirken wahrscheinlich protektiv gegen Inflammation und Krebs (zusammengefasst in Mortensen und Clausen 1996). Protoniert sind die SCFA fettlöslich und können schnell durch die Zellmembran diffundieren [Wachtershauser und Stein 2000]. Die SCFA liegen im Colon mit einem pK_S -Wert von ca. 4,8 bei physiologischem pH zu etwa 99% als Anion vor [Mortensen und Clausen 1996]. Die Mechanismen zur SCFA-Resorption sind bisher nicht vollständig geklärt. Neben der nicht-ionischen Diffusion werden die SCFA-Anionen vermutlich über einen Carrier-vermittelten $SCFA^-HCO_3^-$ -Austausch in die Colonocyten aufgenommen [Wachtershauser und Stein 2000]. Dieser Austausch an der luminalen Membran wird wahrscheinlich über den Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) vermittelt [Gill *et al.* 2005]. In menschlichem Colonadenom- und -carcinomgewebe wurde eine verminderte MCT1-Expression in Abhängigkeit der Tumor-Malignität beobachtet [Lambert *et al.* 2002]. In den meisten Carcinomgewebe-Proben mit niedrigem MCT1-Spiegel war gleichzeitig der Glucose-Transporter GLUT1 mit hoher Affinität zu Glucose exprimiert, während bei normalen Gewebe-Proben der Glucose-Transporter GLUT2 mit niedriger Glucoseaffinität detektiert wurde [Lambert *et al.* 2002]. Möglicherweise findet im Zuge der malignen Transformation bei Colonepithelzellen eine Umstellung im Metabolismus von Butyrat auf Glucose zur Nutzung als Energiequelle statt. Auch die in dieser Arbeit verwendete Colonepithelzelllinie HT-29 zeigt einen gestörten Glucosemetabolismus mit hohem Glucoseverbrauch [Rousset 1986]. Darüber hinaus wurde für SCFA ein Na^+ -gekoppelter Transporter (SLC5A8) identifiziert. *SLC5A8* stellt ein Tumorsuppressorgen dar, das bei Colonkrebs ebenfalls herunterreguliert wird [Miyachi *et al.* 2004].

SCFA spielen eine zentrale Rolle in der Colonomöostase und werden als Regulatoren der Proliferation der Colonmucosa angesehen. Insbesondere Butyrat wird *in vivo* von den Colonepithelzellen zu 70-90% metabolisiert, als Energiequelle benutzt und übt trophische Effekte auf die Colonmucosa aus [Wachtershauser und Stein 2000]. Dagegen hemmen einige SCFA *in vitro* die Proliferation von Colontumorzellen und induzieren Differenzierung und Apoptose, wobei Butyrat die stärkste Wirkung zeigt, gefolgt von Propionat [Gamet *et al.* 1992, Hague *et al.* 1995]. Die Behandlung der in dieser Arbeit eingesetzten undifferenzierten HT-29 Zellen mit 5mM Na-Butyrat führte zur Isolierung eines Zellclons (HT-29 Clon 19A) aus permanent differenzierten Zellen [Augeron und Laboisie 1984].

Die gegensätzlichen Effekte von Butyrat auf normale und neoplastische Colono-cyten könnten auf Unterschieden in der Verfügbarkeit alternativer Energiequellen (z.B. Glucose) bzw. Veränderungen im Butyratmetabolismus von Tumorzellen beruhen, was zur Akkumulation von intrazellulärem Butyrat und damit zur Wachstumshemmung führen könnte [Singh *et al.* 1997].

Die meisten *In-vitro*-Studien über mögliche krebsschutzmechanismen von SCFA wurden mit Butyrat durchgeführt. In HT-29 Zellen hemmte Butyrat *in vitro* die Proliferation durch Induktion eines G1-Phase-Arrests im Zellzyklus [Kobayashi *et al.* 2003] und induzierte unabhängig von *p53*, das bei dieser Zelllinie in mutierter Form vorliegt, Apoptose [Heerdt *et al.* 1994]. Über eine nicht-kompetitive Hemmung der Histon-Deacetylase kann Butyrat zur Histon-Hyperacetylierung führen, was eine Veränderung der Chromatinstruktur zur Folge hat und z.B. die Genexpression von *ras*, *c-myc* und des Zellzyklusinhibitors *p21* in HT-29 Zellen (siehe 2.1.1) modulieren kann [Wu *et al.* 2001]. Butyrat nimmt außerdem Einfluss auf inflammatorische Prozesse. Über eine Hemmung der Histon-Deacetylase konnte Butyrat in HT-29 Zellen auch die COX-2-Aktivierung durch TNF- α unterdrücken [Tong *et al.* 2004]. Die Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B über TNF- α konnte in Colonepithelzellen von M. Crohn-Patienten durch Butyrat deutlich vermindert werden [Segain *et al.* 2000].

2.4 Carotinoide in der menschlichen Ernährung

2.4.1 Struktur, Vorkommen, Eigenschaften

Carotinoide stellen im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitete Farbstoffe dar, die von Pflanzen, Algen, Bakterien und Pilzen synthetisiert und über die Nahrung in den tierischen und menschlichen Organismus aufgenommen werden. Aufgrund der chemischen Struktur werden die Carotinoide in Carotine - reine Kohlenwasserstoff-Verbindungen - und in die sauerstoffhaltigen Xantophylle unterteilt.

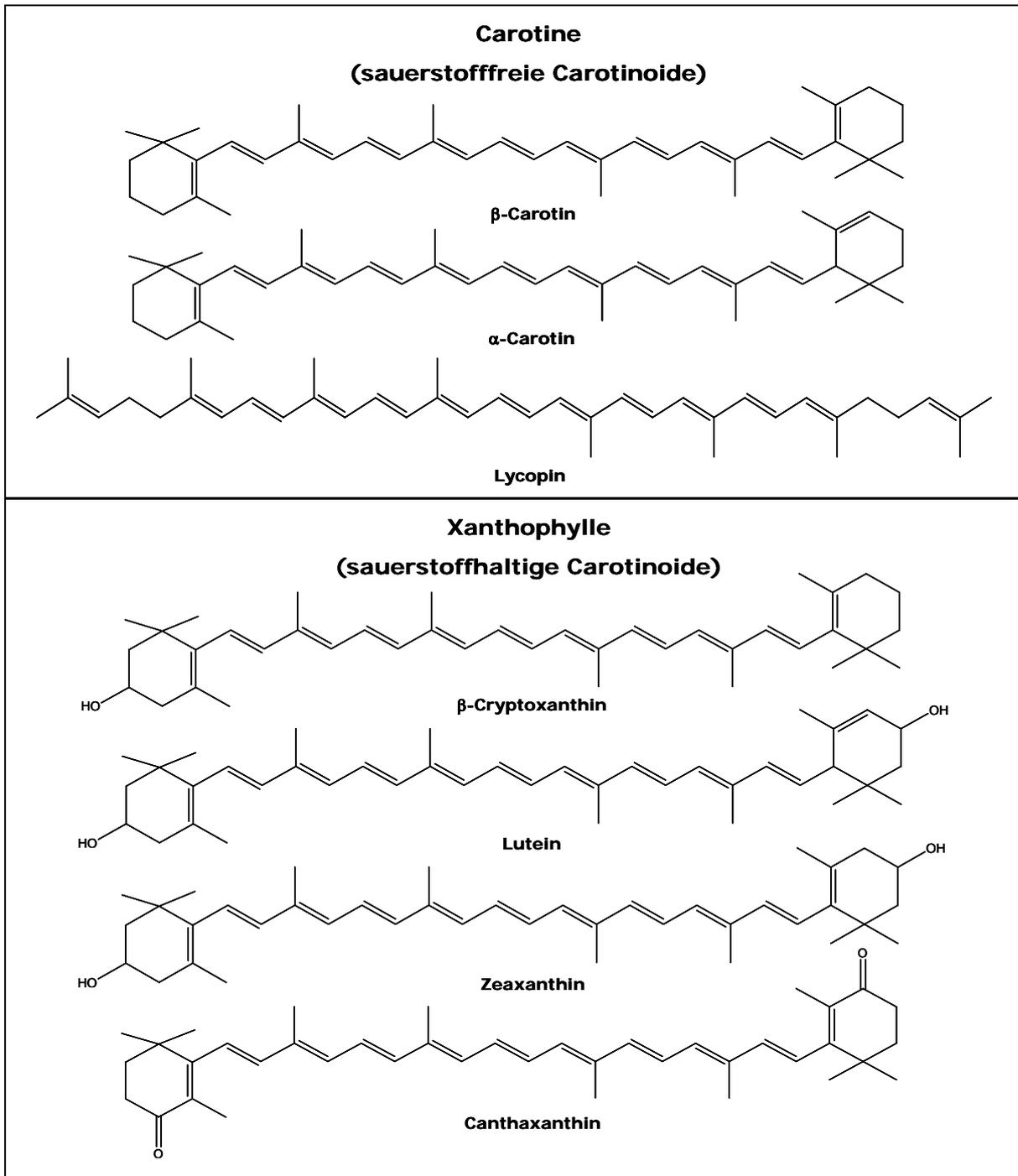


Abb. 2.4: Einteilung der Carotinoide in Abhängigkeit ihres Oxidationsstatus. In Pflanzen kommen Carotinoide in erster Linie als all-*trans*-Isomere vor [Castenmiller und West 1998]. Durch Nahrungsmittelverarbeitung, insbesondere Erhitzen, kann cis-Isomerisierung stattfinden. Carotine weisen eine bedeutend höhere Hitzestabilität auf als Xanthophylle [Watzl und Bub 2001]. Lycopin wird als erstes farbiges Carotinoid in der Biosynthese vieler anderer natürlicher Carotinoide betrachtet. Primäre Carotinoide wie β -Carotin, Lutein und Zeaxanthin werden für die Photosynthese benötigt, während sekundäre Carotinoide aus Früchten und Blüten wie α -Carotin, Lycopin und Canthaxanthin nicht direkt mit dem Überleben einer Pflanze in Verbindung gebracht werden [Delgado-Vargas und Paredes-López 2003].

Carotinoide bestehen aus einem symmetrisch aufgebauten Tetraterpengerüst aus acht Isopreneinheiten und stellen aufgrund ihrer langen Kohlenwasserstoffketten stark lipophile Verbindungen dar, die im Organismus vor allem in Biomembranen und in Lipoproteinen zu finden sind. In höheren Pflanzen finden sich Carotinoide in Geweben und Blättern für die Photosynthese in den Chloroplasten; in Früchten und alternden Blättern kommen sie in den Chromoplasten vor. Carotinoide können frei, verestert und in nicht kovalenten Komplexen mit Proteinen vorliegen. Durch Absorption von bestimmten Anteilen des sichtbaren Lichts durch die konjugierten Doppelbindungen sind Carotinoide farbig, meist gelb, orange oder rot. Während grünblättriges Gemüse, in dem das Farbspektrum der Carotinoide durch Chlorophyll überdeckt wird, vor allem Xanthophylle enthält, finden sich Carotine überwiegend in orange-gelb-rottem Obst und Gemüse. Außer Obst und Gemüse trägt beim Menschen auch der Verzehr von Fischen (z.B. Lachs), Meeresfrüchten, Pilzen und Eiern sowie von Milch und Milchprodukten zur Carotinoid-Versorgung bei [Elmadfa und Majchrzak 1998, Ollilainen *et al.* 1989]. Carotinoide werden außerdem als Futtermittel-Zusatzstoffe und Lebensmittelfarbstoffe z.B. in Margarine, Butter, Limonaden und Fruchtkonserven und in Vitaminpräparaten eingesetzt. Bei gemischter Kost beträgt die durchschnittliche Carotinoid-Zufuhr ohne Supplementierung ca. 5-6mg/Tag [Pelz *et al.* 1998], wobei das Carotinoid-Spektrum und die Konzentrationen der Carotinoide im Blutplasma von den individuellen Ernährungsgewohnheiten abhängen [Muller *et al.* 1999, Watzl und Bub 2001]. Von den über 600 identifizierten Carotinoiden können bis zu 50 vom Menschen aus der Nahrung resorbiert und metabolisiert werden, während im menschlichen Blut bisher 34 Carotinoide, einschließlich Isomeren und Metaboliten, nachgewiesen werden konnten [Khachik *et al.* 1997]. Die häufigsten Carotinoide im Plasma stellen β -Carotin, Lycopin, Lutein, β -Cryptoxanthin, α -Carotin und Zeaxanthin dar. Neuere Daten aus verschiedenen europäischen Ländern zeigen Plasmakonzentrationen für β -Carotin in einem Bereich von 0,06-2,20 μ mol/l; bei Lycopin 0,04-2,06 μ mol/l; Lutein 0,07-1,00 μ mol/l; β -Cryptoxanthin 0-1,41 μ mol/l; α -Carotin 0-0,96 μ mol/l und für Zeaxanthin 0,01-0,51 μ mol/l [Al Delaimy *et al.* 2004, Olmedilla *et al.* 2001]. α - und β -Carotin werden in Deutschland hauptsächlich über Karotten, Lutein über grünes Gemüse und Salat und Zeaxanthin über Mais aufgenommen. Tomaten und Tomatenprodukte stellen die Hauptquelle für Lycopin dar. Paprika und Orangen bzw. Orangensaft sind die wichtigsten β -Cryptoxanthin-Quellen [Pelz *et al.* 1998].

2.4.2 Bioverfügbarkeit, Resorption und Metabolismus

Die Absorption der Carotinoide erfolgt entsprechend der intestinalen Lipidaufnahme. Nach Freisetzung aus der jeweiligen Lebensmittelmatrix werden Carotinoide in Anwesenheit von Fett und Gallensäuren in Lipidtröpfchen emulgiert, anschließend in gemischte Micellen aus Gallensäuren, freien Fettsäuren, Monoglyceriden und Phospholipiden eingelagert und vermutlich im Dünndarm über passive Diffusion entlang des Konzentrationsgefälles aufgenommen [Yeum und Russell 2002]. In Abhängigkeit des jeweiligen Carotinoids und zahlreicher anderer Faktoren können so maximal 50-70% der zugeführten Carotinoid-Menge resorbiert werden. Die Zubereitung eines Lebensmittels (z.B. thermische Behandlung), die mechanische Zerkleinerung der Nahrung und der pH-Wert im Magen spielen eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden [Watzl und Bub 2001]. Der Verzehr von verarbeiteten Lebensmitteln wie gekochten (pürierten) Karotten oder Tomatenpaste führt beispielsweise zu einem deutlich höheren Anstieg der Plasma-Carotinoidspiegel als die Aufnahme entsprechender Carotinoid-Mengen aus rohen Karotten bzw. Tomaten [Gartner *et al.* 1997, Rock *et al.* 1998]. Andere Nahrungsbestandteile können die Verfügbarkeit von Carotinoiden ebenfalls beeinflussen. Ungenügende Lipidzufuhr, erniedrigter Gallenfluss und die Aufnahme von Ballaststoffen (z.B. Pectin) können die Verfügbarkeit von Carotinoiden vermindern [Biesalski *et al.* 2002, Rock und Swendseid 1992]. Auch der Verzehr von mit Pflanzensterolen angereicherter Margarine und nicht-resorbierbaren Saccharosepolyestern behindert die intestinale Carotinoid-Resorption [Weststrate und Meijer 1998, Weststrate und van het Hof 1995]. Carotinoide können sich gegenseitig in ihrer Aufnahme hemmen, indem sie wahrscheinlich um die micelläre und intestinale Aufnahme sowie den lymphatischen Transport konkurrieren. So hemmen sich Lutein und β -Carotin in ihrer Aufnahme. β -Carotin reduziert außerdem die Absorption von Canthaxanthin und kann die Lycopinaufnahme erhöhen, dagegen beeinflussen Canthaxanthin und Lycopin die Aufnahme von β -Carotin nicht [Johnson *et al.* 1997, van het Hof *et al.* 2000, Yeum und Russell 2002].

Vermutlich ist auch die Isomerenform von Carotinoiden für deren intestinale Aufnahme von Bedeutung. Im Plasma liegt β -Carotin hauptsächlich als *all-trans*-Isomer vor. Unterschiede im Serumanstieg der Isomere nach oraler Gabe von β -Carotin in *all-trans*- und *9-cis*-Form deuten an, dass *all-trans*- β -Carotin intestinal selektiv resorbiert werden könnte. Alternativ könnte eine Isomerisierung des *cis*-Isomers zu *all-trans*- β -Carotin zwischen Nahrungsaufnahme und Erscheinen im Plasma stattfinden [Stahl *et al.* 1993, You *et al.* 1996]. Auch Lycopin findet sich in der Natur primär in der *all-trans*-Konfiguration, während die *cis*-Formen über 50% des gesamten Lycopins im menschlichen Serum und in den Geweben ausmachen können [Clinton *et al.* 1996, Stahl *et al.* 1992].

In den Enterocyten werden die Carotinoide bzw. ihre Metabolite (v.a. Retinylester) in Chylomikronen eingebaut und über die Lymphe ins Blut transportiert. Auf dem Weg zur Leber wird bereits ein Teil der Carotinoide beim Abbau der Chylomikronen durch endothelständige Lipoproteinlipasen freigesetzt. Die verbleibenden Carotinoide werden mit den Chylomikronen-Remnants durch die Leber aufgenommen, die für den weiteren Transport VLDL (very low density lipoproteins) sezerniert. Die VLDL werden im Plasma zu LDL (low density lipoproteins) umgebaut und in extrahepatische Gewebe aufgenommen. Während die lipophilen Carotine vor allem in VLDL und LDL transportiert werden, finden sich die polareren Xanthophylle zu etwa gleichen Teilen in LDL und HDL (high density lipoproteins) verteilt. Gewebe mit hoher Zahl an LDL-Rezeptoren wie Leber, Testes und Nebennieren und das Fettgewebe akkumulieren Carotinoide vermutlich passiv [Yeum und Russell 2002]. Die Unterschiede in den Carotinoidkonzentrationen bzw. im Carotinoid-Muster deuten jedoch darauf hin, dass auch andere Faktoren eine Rolle bei der Carotinoid-Aufnahme in verschiedene Gewebe spielen. So reichern sich beim Menschen selektiv, z.B. Lutein und Zeaxanthin in der Macula⁸ des Auges, und Lycopin im Hodengewebe an [Watzl und Bub 2001].

Provitamin-A-Carotinoide wie β -Carotin, α -Carotin und β -Cryptoxanthin werden bereits in der intestinalen Mucosa zum Teil in Vitamin A⁹ umgewandelt. Ca. 50-60 Carotinoide zeigen Provitamin-A-Aktivität, wobei β -Carotin das wichtigste Provitamin in der menschlichen Ernährung darstellt. Das Enzym β -Carotin-15,15`-Oxygenase katalysiert die zentrale symmetrische Spaltung von β -Carotin zu zwei Molekülen Retinal und kommt nicht nur in den Enterocyten, sondern z.B. auch in Leber und Lunge vor [Biesalski *et al.* 2002]. Retinal kann reversibel zu Retinol reduziert und zu Retinylestern verestert oder irreversibel zu Retinsäure oxidiert werden. Daneben kann eine asymmetrische oxidative Spaltung von β -Carotin zur Bildung von Apocarotenalen verschiedener Kettenlänge führen, wobei die Aldehyde nachfolgend ebenfalls zu Retinal bzw. zu Retinsäure metabolisiert werden können. Von Kiefer *et al.* wurde ein Enzym identifiziert, das die asymmetrische oxidative Spaltung von β -Carotin an der 9` ,10` -Doppelbindung katalysiert und zur Bildung von β -Apo-10` -Carotenal und β -Ionon führt [Kiefer *et al.* 2001]. β -Apocarotenale können aber auch durch Cooxidation über Lipoxygenasen, Autoxidation oder Reaktion mit freien Radikalen entstehen [Yeum und Russell 2002].

Neueren Daten zufolge haben 12 μ g β -Carotin oder 24 μ g anderer Provitamin-A-Carotinoide die gleiche biologische Vitamin-A-Aktivität wie 1 μ g Retinol (retinol activity equivalent) [IOM 2000].

⁸ Macula lutea: Gelber Fleck der Netzhaut, Region des schärfsten Sehens.

⁹ Vitamin A: Als Vitamin A werden hier die Verbindungen bezeichnet, die alle Wirkungen des Vitamins zeigen (Retinol, Retinal, Retinylester).

Im Gegensatz zu Vitamin A verursacht eine Supplementierung von β -Carotin in hoher Dosis z.B. bei erythropoetischen Protoporphyrinen¹⁰ keine Hypervitaminose oder Teratogenität, was andeutet, dass die β -Carotin-Spaltung zu Vitamin A streng reguliert wird [Bachmann *et al.* 2002].

2.4.3 Funktionen und Wirkungen von Carotinoiden

Neben ihrer Bedeutung als Farbstoffe in Blüten und Früchten haben Carotinoide als lichtsammelnde Pigmente eine wichtige Funktion in der Photosynthese und schützen Chlorophyll außerdem vor der photooxidativen Zerstörung. Xanthophylle besitzen aufgrund ihres hydroxylierten Iononrings keine Provitamin-A-Wirkung, ausgenommen β -Cryptoxanthin, das nur an einem Iononring hydroxyliert ist. Als Provitamine haben Carotinoide Bedeutung beim Sehprozess und sind an der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. Doch auch von Carotinoiden ohne Provitamin-A-Wirkung sind zahlreiche Schutzwirkungen bekannt (siehe 2.4.4ff). In Fall- und Kohortenstudien zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Inzidenz von Lungenkrebs und der β -Carotin-Aufnahme aus Obst und Gemüse bzw. der β -Carotin-Plasmakonzentration [van Poppel und Goldbohm 1995]. Auch in mehreren prospektiven Studien wurde eine negative Korrelation zwischen der Carotinoid-Aufnahme und dem Lungenkrebsrisiko beobachtet [Holick *et al.* 2002, Michaud *et al.* 2000], wobei die Daten aus zwei US-Kohortenstudien auf eine positive Wirkung vor allem von α -Carotin und Lycopin hinweisen [Michaud *et al.* 2000]. Interventionsstudien konnten protektive Carotinoid-Effekte jedoch nicht bestätigen [ATBC 1994, Hennekens *et al.* 1996, Lee *et al.* 1999, Omenn *et al.* 1996]. Eine mehrjährige Supplementierung mit β -Carotin führte bei starken Rauchern bzw. bei Asbest-exponierten Personen sogar zu einer Erhöhung des Lungenkrebsrisikos [ATBC 1994, Omenn *et al.* 1996]. Ein hoher Verzehr von Tomaten und Tomatenprodukten mit Lycopin als Hauptcarotinoid war in mehreren epidemiologischen Studien mit einem verminderten Risiko für Prostatakrebs verbunden [Etminan *et al.* 2004, Giovannucci 2002]. Der dreiwöchige Verzehr von Tomatenextrakt oder Tomatensoße (30mg Lycopin/Tag) steigerte den apoptotischen Zelltod in Tumoren von Prostatakrebspatienten [Kim *et al.* 2003, Kucuk *et al.* 2002]. Daten aus einer prospektiven Studie lassen vermuten, dass Carotinoide, insbesondere β -Carotin und Lycopin, auch vor der Entwicklung von Brustkrebs schützen [Sato *et al.* 2002].

¹⁰ Erythropoetische Protoporphyrinurie: Durch eine angeborene Störung in der Biosynthese von Häm kommt es unter anderem zur Anreicherung von Protoporphyrin in der Haut. Die bei dieser Krankheit auftretenden Hautläsionen stammen vermutlich von der lichtinduzierten Anregung von Protoporphyrin und der nachfolgenden Entstehung von Singulett-Sauerstoff (siehe Abschnitt 2.4.4.1) und/oder freien Radikalen.

Die Ergebnisse aus Observationsstudien, die für protektive Effekte eines hohen Obst- und Gemüseverzehrs, reich an Carotinoiden (vor allem β -Carotin), auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen sprachen [Kohlmeier und Hastings 1995], konnten Interventionsstudien mit β -Carotin wiederum nicht bestätigen [ATBC 1994, Hennekens *et al.* 1996, Omenn *et al.* 1996]. In einer großen europäischen Studie war bei den Probanden der Lycopin-Gehalt im Fettgewebe invers mit dem Herzinfarkttrisiko korreliert; β -Carotin schien zu diesem protektiven Effekt nicht beizutragen [Kohlmeier *et al.* 1997]. Bei Rauchern mit hoher Lycopinaufnahme wurde in der Rotterdam-Studie ein erniedrigtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen beobachtet [Klipstein-Grobusch *et al.* 2000]. Dagegen zeigten Untersuchungen der WHS (Women`s Health Study) und NHS keine signifikante Assoziation zwischen der Aufnahme von Lycopin und dem Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen [Osganian *et al.* 2003, Sesso *et al.* 2003]. Der Verzehr von Tomatenprodukten schien jedoch protektiv zu wirken [Sesso *et al.* 2003]. Lycopin (60mg/Tag über drei Monate) konnte in einer Humaninterventionsstudie die LDL-Cholesterolkonzentration im Plasma vermindern. *In vitro* konnten Lycopin und β -Carotin bei Makrophagen die Aktivität der HMGCoA-Reduktase¹¹, einem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, hemmen und die Aktivität von LDL-Rezeptoren erhöhen [Fuhrman *et al.* 1997].

Aufgrund der selektiven Akkumulation von Lutein und Zeaxanthin in der Auglinse und der Macularegion der Netzhaut wurde vermutet, dass diese Xanthophylle als Antioxidanzien im Auge vor Schäden durch reaktive Sauerstoffverbindungen bzw. freie Radikale, die mit der Kataraktentwicklung und altersabhängigen Maculadegeneration in Verbindung gebracht werden, schützen [Krinsky *et al.* 2003].

2.4.4 Molekulare Wirkungsmechanismen von Carotinoiden auf die Carcinogenese

Zahlreiche *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien zur Erforschung der Wirkung von Carotinoiden auf die Carcinogenese auf molekularer Ebene wurden durchgeführt und folgende Wirkungsmechanismen werden in diesem Zusammenhang diskutiert:

2.4.4.1 Antioxidative Wirkungen

Carotinoide besitzen die Fähigkeit zur Inaktivierung (Quenching) von Singulett-sauerstoff (1O_2 , siehe Abb. 2.5), eine Verbindung, die durch photochemische Reaktionen bei der Lichtabsorption entstehen kann, aber auch vermehrt durch phagozytierende Leukocyten im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr gebildet

¹¹ HMGCoA=3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A

wird. Singulett-Sauerstoff ist hochreaktiv und kann wie andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS, z.B. Hydroxyl-, Peroxyl- und Superoxidanionradikale) Nucleinsäuren, Aminosäuren und ungesättigte Fettsäuren oxidieren und damit die Entstehung von Arteriosklerose bzw. Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs fördern [Watzl und Bub 2001]. Carotinoide können auf diese Weise auch triplett-angeregte Verbindungen (angeregte Photosensitizer wie Chlorophyll, Protoporphyrin), die zur Erzeugung von Radikalen und $^1\text{O}_2$ beitragen, desaktivieren. Bei Patienten mit erythropoetischer Protoporphyrinose (siehe 2.4.2) kann eine β -Carotin-Supplementierung in hoher Dosierung zur Prävention von lichtinduzierten Hautläsionen eingesetzt werden [Mathews-Roth 1993]. In Humanstudien konnte auch der Schutz durch Carotinoide vor UV-Licht-induzierten Erythemen bestätigt werden [Gollnick *et al.* 1996, Heinrich *et al.* 2003, Stahl *et al.* 2000a]. *In vitro* zeigte β -Carotin in physiologischen Konzentrationen ($0,5\mu\text{M}$ - $5\mu\text{M}$) bei menschlichen Hautfibroblasten jedoch auch prooxidative Wirkung mit einem Anstieg der UVA-induzierten Stressantwort [Obermueller-Jevic *et al.* 1999]. Aus epidemiologischen oder Interventionsstudien gibt es bisher keine eindeutigen Belege für eine Hautkrebs-präventive Wirkung von Carotinoiden beim Menschen [Biesalski und Obermueller-Jevic 2001, Sies und Stahl 2004].

Carotinoide können als Radikalfänger, wie in Abb. 2.5 dargestellt, auch zur Hemmung der Lipidperoxidation durch Desaktivierung von Peroxylradikalen (ROO^\bullet) beitragen.

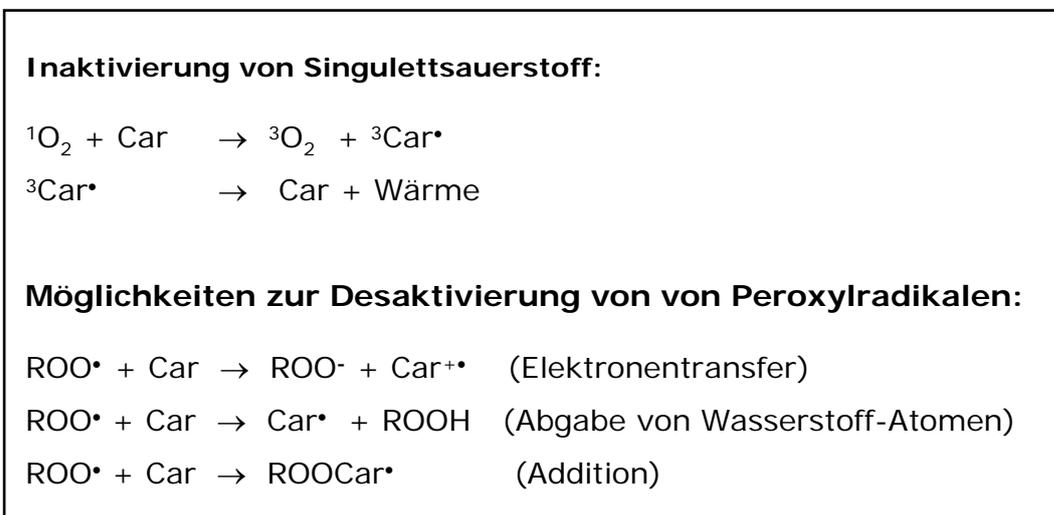


Abb. 2.5: Wechselwirkungen von Carotinoiden mit reaktiven Sauerstoffspezies. Die Inaktivierung von $^1\text{O}_2$ erfolgt durch Energieübertragung auf die Carotinoide, die vorübergehend in einen angeregten Triplettzustand übergehen und über Abgabe von Wärme wieder in ihren Grundzustand zurückkehren. Carotinoide können in einem ersten Schritt außerdem Peroxylradikale abfangen, wodurch aus Carotinoid-Molekülen z.B. langlebige $\text{Car}^{+\bullet}$ -Radikale und resonanzstabilisierte Peroxylcarotinoid-Radikale entstehen [Young und Lowe 2001]. $\text{Car}^{+\bullet}$ -Radikale können z.B. durch Reaktionen mit Ascorbinsäure und Vitamin E regeneriert werden.

Die Desaktivierung der Radikale hängt jedoch vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck ab. *In vitro* können Carotinoide bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, wie er unter physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben vorherrscht, effektive Antioxidanzien darstellen. Bei hohem Sauerstoffpartialdruck (physiologisch z.B. in der Lunge) könnten, insbesondere bei hohen Carotinoid-Konzentrationen, durch Autoxidation der Carotinoide jedoch auch Produkte entstehen, die prooxidativ wirken [Young und Lowe 2001]. Während in Humanstudien eine Carotinoid-Supplementierung den Schutz vor LDL-Oxidation und oxidativer DNA-Schädigung *ex vivo* nicht verbessern konnte [Collins *et al.* 1998, Hininger *et al.* 2001], wurde bei erhöhtem Verzehr von carotinoidreichen Gemüse- und Obstarten eine verstärkte Hemmung der Lipidperoxidation und der oxidativen DNA-Schädigung beobachtet [Bub *et al.* 2000, Chopra *et al.* 2000, Porrini und Riso 2000, Thompson *et al.* 1999, Visioli *et al.* 2003]. Die Oxidation von LDL wird als ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Arteriosklerose und damit Herz-Kreislauf-Erkrankungen angesehen.

2.4.4.2 Immunmodulierende Wirkungen

Eine Stimulation des Immunsystems fördert die effektive Bekämpfung von Krebszellen und in den Körper eindringender Mikroorganismen, die zum Teil auch die Tumorentstehung begünstigen [Hughes 1999]. Immunmodulatorische Effekte von Carotinoiden beruhen möglicherweise zum Teil auf ihren antioxidativen Eigenschaften. Da die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten eine Funktion in der Immunabwehr darstellt, sind immunkompetente Zellen wie phagozytierende Leukozyten häufiger von Verschiebungen im Gleichgewicht zwischen Prooxidanzien und Antioxidanzien betroffen bzw. enthalten im Allgemeinen auch höhere Konzentrationen an mit der Nahrung zugeführten Antioxidanzien als andere Zellen [Meydani *et al.* 1995]. Langzeit-Supplementierung mit β -Carotin (30mg/Tag) konnte vor UVA-induzierter Immunsuppression schützen [Biesalski und Obermueller-Jevic 2001]. Außerdem erhöhte eine langfristige β -Carotin-Supplementierung (50mg jeden zweiten Tag über zwölf Jahre) die natürliche Killerzellaktivität, allerdings nur bei Männern über 65 Jahre [Santos *et al.* 1996]. Bei jüngeren Männern (18-60 Jahre) war die Expression von Adhäsions- und MHCII-Molekülen (major histocompatibility complex, zur Antigenpräsentation) sowie die *ex vivo*-Sekretion von TNF- α in Blutmonozyten nach einer β -Carotin-Supplementierung von 15mg/Tag über 26 Tage erhöht [Hughes *et al.* 1997]. Lycopin (bzw. Tomatensaft) zeigte bei ansonsten carotinoidarmer Ernährung in Humaninterventionsstudien eine deutliche immunstimulierende Wirkung [Watzl *et al.* 1999, Watzl *et al.* 2003]. Bei guter Carotinoid-Versorgung konnte durch Tomatensaft-Konsum jedoch keine Stimulation von Immunfunktionen beobachtet werden [Watzl *et al.* 2000].

Auf welchen Mechanismen immunmodulierende Carotinoid-Effekte beruhen und ob diese auf bestimmte Carotinoide zurückgehen, ist bisher unklar [Watzl und Bub 2001].

2.4.4.3 Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus

Durch Oxidations- und Reduktionsreaktionen sowie Hydrolyse wandeln Phase-I-Enzyme wie Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP) und Hydroxylasen apolare, lipophile Stoffe durch Einführung oder Demaskierung funktioneller Gruppen in polare, hydrophilere Substanzen um. Diese können nachfolgend durch von Phase-II-Enzymen wie UDP-Glucuronosyl-Transferasen¹², Sulfotransferasen, Acetyltransferasen und Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysierte Konjugationsreaktionen in wasserlösliche Derivate überführt und anschließend ausgeschieden werden. Während Phase-I-Enzyme zum Teil zur Aktivierung von Procarcinogenen führen, können Phase-II-Enzyme die Entgiftung aktivierter Carcinogene beschleunigen. In Tierstudien induzierten einige Carotinoide Cytochrom-P450-Enzyme (Übersicht in Sharoni *et al.* 2004). Während β -Carotin, Lutein und Lycopin keine Effekte zeigten, induzierten Canthaxanthin und Astaxanthin in Ratten die Cytochrom-P450-Enzyme CYP1A1 und CYP1A2; ähnliche Effekte wurden durch β -Apo-8'-Carotenal beobachtet. Lycopingabe führte bei Ratten dosisabhängig (0,001-0,1g/kg) zur Induktion von Leber CYP1A1/2, 2B1/2 und 3A [Breinholt *et al.* 2000]. Beim Menschen waren Plasma-Luteinspiegel negativ mit der CYP1A2-Aktivität assoziiert, während Lycopinspiegel positiv mit der Enzymaktivität korreliert waren [Le Marchand *et al.* 1997]. Paolini *et al.* [1999] beobachteten in den Lungen von Ratten, die mit β -Carotin in hoher Dosis (500mg/kg Körpergewicht) supplementiert wurden, einen signifikanten Anstieg der Cytochrome CYP1A1/2, CYP2A1, CYP2B1 und CYP3A1. Ob β -Carotin oder Zerfallsprodukte für diese Effekte verantwortlich waren, ging aus dieser Studie nicht hervor [Paolini *et al.* 1999].

Die Carotinoide Canthaxanthin und Astaxanthin konnten bei Ratten Phase-II-Enzyme wie p-Nitrophenol-UDP-Glucuronosyltransferase und NAD(P)H:Quinonoxidoreductase¹³ induzieren [Sharoni *et al.* 2004]. Der hemmende Effekt von Lycopin auf die durch 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen-induzierte Tumorentwicklung in den Backentaschen von Hamstern wurde mit einem Anstieg der Spiegel von Glutathion, Glutathionperoxidase und -reduktase sowie dem Phase-II-Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) in der Backentaschen-Schleimhaut in Verbindung gebracht [Bhuvanewari *et al.* 2001, Sharoni *et al.* 2004].

¹² UDP=Uridin-5'-diphosphat

¹³ NAD(P)H=reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (-phosphat)

2.4.4.4 Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung

Zahlreiche *In-vitro*-Studien haben eine antiproliferative Wirkung von mehreren Carotinoiden wie β -Carotin, α -Carotin, Canthaxanthin - unabhängig von der Umwandlung in Vitamin A - auf verschiedene menschliche Tumorzelllinien, einschließlich Colonicarcinomzellen, nachgewiesen [Amir *et al.* 1999, Briviba *et al.* 2001, Onogi *et al.* 1998]. Häufiger war die beobachtete Proliferationshemmung verbunden mit einer Apoptoseinduktion [Briviba *et al.* 2001, Palozza *et al.* 1998]. Auch Lycopin hemmte *in vitro* die Proliferation mehrerer Krebszellarten, darunter Brust-, Lungen- und Endometriumkrebszellen, wobei Lycopin im Vergleich zu α - und β -Carotin eine stärkere antiproliferative Wirkung zu haben schien [Levy *et al.* 1995]. In mehreren Studien war die Wachstumshemmung von Lycopin mit einer Verzögerung der Zellzyklusprogression verbunden [Amir *et al.* 1999, Karas *et al.* 2000, Nahum *et al.* 2001]. β -Carotin induzierte eine ähnliche Zellzyklusverzögerung in der G1-Phase in normalen menschlichen Fibroblasten [Stivala *et al.* 2000]. Bei einer *In-vitro*-Untersuchung von Brustkrebszellen (MCF-7) konnte eine Wachstumsstimulation durch IGF-I durch physiologische Konzentrationen von Lycopin deutlich reduziert werden, ohne apoptotischen oder nekrotischen Zelltod zu induzieren. Gleichzeitig wurde ein Anstieg in membran-assoziierten IGF-Bindungsproteinen, die die IGF-I-Rezeptoraktivierung negativ regulieren, beobachtet [Karas *et al.* 2000]. Beim Menschen wurde eine starke inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von gekochten Tomaten und dem zirkulierenden IGF-I beobachtet [Mucci *et al.* 2001]. Erhöhte IGF-I-Spiegel werden mit einem gesteigerten Risiko für Lungen-, Dickdarmkrebs und maligne Prostatatumoren in Verbindung gebracht [Sandhu *et al.* 2002, Yu *et al.* 1999]. Bei Frettchen verhinderte eine neunwöchige Lycopin-Supplementierung in niedriger und hoher Dosis die Zellhyperproliferation und die Verminderung von Apoptose in den Lungen der dem Zigarettenrauch ausgesetzten Tiere [Liu *et al.* 2003a]. Dagegen führte β -Carotin in hoher, nicht physiologischer Dosierung zu einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors AP-1, zu einem verminderten Retinsäurespiegel¹⁴ und zu einer verminderten Expression des Retinsäurerezeptors RAR β im Lungengewebe der Tiere, verbunden mit einer verstärkten Proliferation und squamösen Metaplasien [Liu *et al.* 2000, Wang und Russell 1999]. Diese Effekte könnten das in Interventionsstudien beobachtete erhöhte Lungenkrebsrisiko für Raucher und Asbest-exponierte Personen nach β -Carotin-Supplementierung [ATBC 1994, Omenn *et al.* 1996] zumindest teilweise erklären. In der radikalreichen Atmosphäre in den Lungen von Rauchern könnten vermehrt unerwünschte oxidative

¹⁴ Retinsäure bzw. ihre Metabolite können durch Bindung an die nukleären Retinsäurerezeptoren RAR (Retinoic Acid Receptor) und RXR (Retinoid X Receptor) die Genexpression von verschiedenen Wachstumshormonrezeptoren, Oncogenen, Zell-Zellinteraktionsfaktoren (z.B. Laminin und Fibronectin), Interleukinen und Cytokinen regulieren, die Wachstum und Differenzierung von Geweben beeinflussen [Biesalski *et al.* 2002].

Metabolite von β -Carotin wie Apocarotenale und β -Carotin-5,6-Epoxid entstehen, die möglicherweise für die beobachteten Effekte verantwortlich sind [Wang und Russell 1999]. Zigarettenrauch und pharmakologische β -Carotin-Dosen erhöhten in einer nachfolgenden Studie die CYP1A1/2-Spiegel im Lungengewebe von Frettchen [Liu *et al.* 2003b]. Die Autoren vermuteten, dass diese Effekte zur metabolischen Aktivierung von Carcinogenen und zu einem erhöhten Retinsäurekatabolismus und damit zur Förderung der Lungencarcinogenese führen. Unterschiede in der Wirkung von Lycopin und β -Carotin in den Frettchenstudien könnten durch die unterschiedlichen Carotinoid-Spiegel im Lungengewebe (LG) nach Supplementierung mit Lycopin (1,2 $\mu\text{mol/kg}$ LG) und β -Carotin (26 $\mu\text{mol/kg}$ LG) bedingt sein [Liu *et al.* 2003a].

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Carotinoide wie β -Carotin, Canthaxanthin und Lutein die Zelldifferenzierung von normalen Epithelzellen und Tumorzellen induzieren können [Gross *et al.* 1997, Rock *et al.* 1995]. Die Kombination von niedrigen Lycopin-Konzentrationen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zeigte synergistische Effekte auf die Zelldifferenzierung und Zellproliferation von promyeloischen Leukämiezellen (HL-60) [Amir *et al.* 1999].

2.4.4.5 Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation

Die interzelluläre Kommunikation über gap junctions¹⁵ (GJC) spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Im Gegensatz zu normalen Zellen zeigen Tumorzellen in der Regel nur eine geringe interzelluläre Kommunikation, wodurch der Austausch von Faktoren zur gegenseitigen Wachstumskontrolle erschwert bzw. unterbrochen ist [Bertram 1999]. Tumorpromotoren wie z.B. Phorbol ester und Phenobarbital können *in vitro* die Kommunikation über gap junctions blockieren. Oncogene wie *ras* können die GJC herunterregulieren, während Tumor-Suppressorgene sie stimulieren [Stahl *et al.* 2002]. Carotinoide fördern *in vitro* in einigen Zellarten die interzelluläre Kommunikation über gap junctions und induzieren die Synthese von Connexin 43, einer Komponente der gap junctions-Struktur. Ihre Wirkungen sind unabhängig von ihrer Provitamin-A-Aktivität, da neben α - und β -Carotin auch Lycopin und Xanthophylle wie β -Cryptoxanthin, Canthaxanthin und Lutein bzw. ihre Metabolite stimulierende Effekte auf die GJC zeigten [Sies und Stahl 1997, Stahl *et al.* 2000b, Zhang *et al.* 1992]. Durch Stimulation der GJC konnten Carotinoide wie β -Carotin und Canthaxanthin *in vitro* auch die chemisch induzierte neoplastische Transformation von Zellen hemmen [Bertram *et al.* 1991].

¹⁵ Gap junctions: Kanäle zwischen benachbarten Zellen, die eine direkte Zell-Zellkommunikation erlauben durch Austausch von niedermolekularen Nähr- und Botenstoffen.

2.4.5 Carotinoide und Dickdarmcarcinogenese

Zahlreiche *In-vitro*-Untersuchungen (siehe 2.4.4ff) und Tierstudien zur chemisch induzierten Colonicarcinogenese [Bertram *et al.* 1991, Krinsky 1991, Narisawa *et al.* 1996] sprechen für eine protektive Rolle von Carotinoiden. Beim Menschen wurden in colorectalen Adenomen aus Biopsiematerial niedrigere Carotinoidkonzentrationen im Vergleich zu Gewebe von Kontrollprobanden festgestellt, möglicherweise bedingt durch Carotinoid-Depletion bei erhöhtem oxidativem Stress im Colon [Muhlhofer *et al.* 2003]. Humaninterventionsstudien, die Carotinoide bzw. andere Pflanzen-Inhaltsstoffe als isolierte Substanzen auf krebsprotektive Wirkungen hin untersuchten, waren bisher jedoch weniger vielversprechend. So zeigten Supplementierungen mit β -Carotin bzw. β -Carotin in Kombination mit Vitamin E (α -Tocopherol) und/oder Vitamin C keinen Effekt auf die Inzidenz von colorectalen Adenomen und Carcinomen [Albanes *et al.* 2000, ATBC 1994, Greenberg *et al.* 1994]. Darüber hinaus bewirkte eine Supplementierung mit β -Carotin weder bei Patienten mit Colonpolypen bzw. Colonkrebs, noch bei gesunden Probanden eine Modulation der Proliferation von Colonepithelzellen [Frommel *et al.* 1995]. Zu β -Carotin und Colonkrebs liegen aus epidemiologischen Studien keine einheitlichen Daten vor, und nur wenige Studien zeigen einen signifikanten (geringen) Effekt dieses Carotinoids auf das Colonkrebsrisiko [van Poppel und Goldbohm 1995]. In einer neueren klinischen Studie war, ähnlich wie bei Untersuchungen zu β -Carotin und dem Lungenkrebsrisiko (siehe 2.4.3ff), das Risiko für das Wiederauftreten eines colorectalen Adenoms bei prädisponierten Menschen durch Rauchen in Kombination mit Alkoholkonsum sowie einer Supplementierung mit β -Carotin (25mg/Tag) erhöht. Es verdoppelte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Probanden ohne Alkohol- und Zigarettenkonsum [Baron *et al.* 2003]. Dagegen zeigte sich eine inverse Assoziation zwischen dem Verzehr von Karotten und dem colorectalen Krebsrisiko, mit einer kalkulierten Risikoreduktion von über 20% durch eine zusätzliche Portion der meisten Gemüsearten, einschließlich Karotten und Tomaten [Franceschi *et al.* 1998]. In einer italienischen Fall-Kontrollstudie war der Tomatenverzehr mit einem erniedrigten Risiko für Krebsarten des Gastrointestinaltraktes, einschließlich des Colons und Rectums, assoziiert [Franceschi *et al.* 1994].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die in Abschnitt 2.4.5 dargestellten unterschiedlichen Studiendaten beim Menschen über die Bedeutung von Carotinoiden in der colorectalen Carcinogenese zeigen, dass es wichtig ist, nicht nur die Effekte einer isolierten Nahrungskomponente, sondern ihre Wirkungen in chemisch komplexen Lebensmitteln, in denen sie natürlicherweise vorkommt, zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten anhand einer Humaninterventionsstudie mit Karotten- und Tomatensaft-Konsum untersucht werden, ob und über welche Mechanismen eine carotinoidreiche Ernährung, insbesondere reich an β -Carotin und Lycopin, zu Veränderungen im Entstehungsprozess von Dickdarmkrebs führen kann. Dazu sollten verschiedene für die Colonicarcinogenese relevante Faecesmarker etabliert und eingesetzt werden, z.B. Expositionsmarker wie Gallensäurekonzentrationen in Faeceswasser und Messungen zur biologischen Aktivität verschiedener Faecespräparationen im Zellkultursystem. Darüber hinaus sollten die erfassten Parameter dahingehend untersucht werden, inwieweit sie durch Karotten- oder Tomatensaft-Konsum beeinflusst werden und ob sie als nicht invasive Biomarker geeignet sind, um mögliche Krebsrisiko-modulierende Wirkungen einer carotinoidreichen Ernährung im Colon nachweisen zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Chemikalien, Reagenzien

Verwendete Chemikalien und Reagenzien waren, wenn nicht anders beschrieben, von höchst erhältlichem Reinheitsgrad. Lösungsmittel für Extraktionen und HPLC-Analyse wurden in „HPLC gradient grade“-Qualität bezogen. Materialien und Geräte, die für Faeces- und FW-Analysen eingesetzt wurden, sind detailliert in den nachfolgenden Abschnitten (siehe 3.6.3.2ff).

β-Carotin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
β-Cryptoxanthin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
3-Nitrobenzoesäure	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ameisensäure (96%)	Merck KGaA, Darmstadt
Annexin-V-Fluos	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BHT (Butyliertes Hydroxytoluol/2, [6]-Di-tert-Buthyl-p-cresol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BMC (4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
CaliBRITE™ Beads	BD Biosciences, Heidelberg
Chenodesoxycholsäure (CDCA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cholsäure (CA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DCCE (Dicyclohexil-18crown-6-ether)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Desoxycholsäure (DCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dichlormethan	Merck KGaA, Darmstadt
Diethylether (stabilisiert mit ca. 7ppm 2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco`s Modified Eagle Medium, High Glucose (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig, 100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Foetales Kälber Serum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Karottensaft	Schoenenberger Pflanzensäfte GmbH & Co KG, Magstadt
Lithocholsäure (LCA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lutein	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Lycopin	BASF, Ludwigshafen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mycofluor TM Mycoplasma Detection Kit	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande

Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂ , wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
n-Hexan	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (5000 E Penicillin / 5000 µg/l Streptomycin)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenolphthalein	Riedel-de Haen/Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenolphthalein β-D-Glucuronid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf- kirchen
Phosphatpuffer (PBS ohne Natriumbicarbonat)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatpuffer (PBS, ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺ , ohne Natriumbicarbonat)	Invitrogen, Karlsruhe
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf- kirchen
p-Nitrophenylglucosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf- kirchen
Nystatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf- kirchen
Propidiumiodid (PI)	Molecular Probes Europe BV, Lei- den, Niederlande
Salzsäure (HCl, 32%).	Merck KGaA, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf- kirchen
Tetrahydrofuran (THF)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Thiobarbitursäure	Merck KGaA, Darmstadt

Tomatensaft	Schoenenberger Pflanzensäfte GmbH & Co KG, Magstadt
Trifluoressigsäure (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
TritonR X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (2,5 g/l Trypsin, 0,38 g/l EDTA*4Na)	Invitrogen, Karlsruhe
Ursodesoxycholsäure (UCA)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Zeaxanthin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

3.2 Lösungen

Acetatpuffer

0,1M Natriumacetat in H₂O_{dest.}, pH 4,5.

Annexin-V-Markierungslösung

Pro Versuchsansatz direkt vor Anfärbung der Proben aus 5µl Annexin-V-Fluos-Stammlösung (gebrauchsfertige Lösung, aufbewahrt bei -20°C), 250µl Inkubationspuffer und 5µl PI-Lösung (siehe S.43) hergestellt.

BMC-Lösung

5mM 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin in Acetonitril.

DCCE-Lösung

5mM Dicyclohexil-18crown-6-ether in Acetonitril.

Glycinpuffer

0,3M in H₂O_{dest.}, pH 10,4.

Inkubationspuffer

10mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂ gelöst in H₂O_{bidest.}, pH 7,4; aufbewahrt bei +4°C und vor Gebrauch auf RT gebracht.

Lösung A

4,27M NaCl, 2,5% HCl (v/v) in H₂O_{bidest.}.

0,1M Phosphat-Puffer

KH₂PO₄ in H₂O_{bidest.} mit 1N NaOH eingestellt auf pH 7,0.

Lysepuffer

100g Natriumdodecylsulfat (SDS) und 3ml 32%ige HCl pro Liter autoklaviertem H₂O_{dest.}, lichtgeschützt gelagert bei RT.

MTT-Gebrauchslösung

MTT 5mg/ml in PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺, aliquotiert und dunkel gelagert bei -20°C, wurde für Cytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen kurz vor Gebrauch 1:11 in Kompletmedium verdünnt.

Propidiumiodid-Lösung (PI)

Propidiumiodid 50µg/ml H₂O_{bidest.} lichtgeschützt gelagert bei +4°C.

Thymolblaulösung (2% (v/v))

1g Thymolblau vorgelöst in 96%igem Ethanol, mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt auf 50ml, gelagert bei +4°C.

3.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten Plastibrand ^R 12,5x12,5x45mm	Brand, Wertheim
Membranfilter Durapore [®] (Polyvinylidenfluorid) 0,65µm; 5,0µm	Millipore GmbH, Eschborn
Mikrotiterplatten (96-well Cellstar ^R , steril, mit Flachboden)	Greiner Bio-One GmbH, Fricken- hausen
Multischalen (24-well Cell Culture Cluster, steril, mit Flachboden)	Corning Costar, Bodenheim

Polypropylenröhrchen (steril, 15ml/50ml)	VWR International GmbH, Bruchsal
Polystyrolröhrchen 12x75mm	BD Biosciences, Heidelberg
Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5/2ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss und Deckel 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter Millex™ – GP steril, Porengröße 0,22µm Polysulfon (PES)	Millipore GmbH, Eschborn
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer 25x89mm)	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Ultrazentrifugenröhrchen Nalgene™ UltraPlus™ (Polypropylen-Copolymer 13x64mm)	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen Nunclon™ Surface T80/T25	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark

3.4 Geräte

CO ₂ -Inkubator BB 6220	Heraeus Instruments, Fellbach
CO ₂ -Inkubator Forma Scientific	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe
Durchflussscytometer FACS-Calibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Filterhalter (FM 025/0 aus Edelstahl)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Eppendorfszentrifuge HERMLE Z160M	HERMLE-Labortechnik, Wehingen
Fluoreszenz-Spectral-Photometer SPECTRAFluorPlus (Mikrotiterplatten-Reader)	Tecan GmbH, Crailsheim
Freezer (-86 °C) Forma Scientific	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe
Hamiltonspritze 250µl, 100µl, 25µl	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA
Mikrotiterplattenschüttler THERMOstar	BMG LabTechnologies, Offenburg

Neubauer Zählkammer (Hämacytometer)	Karl Hecht KG, Sondheim
Phasenkontrastmikroskop Leica DMLS	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Rotationsverdampfer Laborota 4003	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Sicherheitswerkbank Gelaire ^R TC A 48	Flow Laboratories GmbH, Mecken- heim
Spektralphotometer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 20	Perkin Elmer, Überlingen
Stomacher®400	Lab ₃ , Northampton, England
Ultra Turrax T25 (Jahnke & Kunkel GmbH & Co KG)	IKAR -Labortechnik, Staufen i. Br.
Ultrazentrifuge Optima TM XL-100K	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge GS 6KR	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

3.5 Zelllinie HT-29

HT-29 Zellen (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) stammen ursprünglich von einem Colonadenocarcinom, 1964 isoliert von J. Fogh aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau. Unter Standardkulturbedingungen (z.B. bei Inkubation mit glucose- und serumhaltigem Medium) sind HT-29 Zellen morphologisch undifferenziert, unpolarisiert und wachsen in Form eines Multilayers. Nach Modifikation der Kulturbedingungen, z.B. Entzug von Glucose aus dem Nährmedium und Ersatz durch Galactose oder Inosin, zeigen HT-29 Zellen eine Enterocyten-ähnliche Differenzierung. Sie bilden unter anderem ein polarisiertes Monolayer und entwickeln mit zunehmender Passage tight junctions und einen typischen apikalen Bürstensaum [Chantret *et al.* 1988, Pinto *et al.* 1982].

3.6 Methoden

3.6.1 Studiendesign der Humaninterventionsstudie mit carotinoideichen Gemüsesäften

Für diese Studie wurden 22 gesunde, männliche Probanden im Alter von 20 bis 44 Jahren aus dem Raum Karlsruhe rekrutiert. Alle Personen waren Nichtraucher und nahmen keine Medikamente oder Supplemente ein. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg genehmigt, und alle Studienteilnehmer gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab (Studiendesign und -durchführung Dr. med. A. Bub, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BFEL), Karlsruhe, 2000).

Die randomisierte Studie wurde in Form eines Crossover-Designs durchgeführt (siehe Abb. 3.1). Die tägliche Ernährung der Probanden unterlag dabei keinen Einschränkungen. Die Probanden wurden jedoch angewiesen, den Verzehr von Früchten und Gemüse mit hohem Carotinoid-Gehalt während der gesamten Studiendauer von zehn Wochen zu vermeiden; detaillierte Ernährungsanweisungen siehe Muller *et al.* [Muller *et al.* 1999]. Einer anfänglichen 14-tägigen Depletionsphase (D1) schloss sich eine 14-tägige Gemüsesaft-Intervention (I1) an. Gruppe A (zwölf Probanden) konsumierte in dieser Zeit täglich 330ml Karottensaft und nahm damit $27,1 \pm 2,4$ mg β -Carotin und $13,1 \pm 1,1$ mg α -Carotin auf. Gruppe B (n=12) verzehrte parallel 330ml Tomatensaft pro Tag, der $37,0 \pm 3,0$ mg Lycopin und $1,6 \pm 0,1$ mg β -Carotin enthielt (Messdaten der Karotten- bzw. Tomatensaft-Analyse mit je n=3; Angaben von PD Dr. med. (SU) Briviba (BFEL, Karlsruhe)). Die Gemüsesäfte wurden stets zu den Hauptmahlzeiten verzehrt. Nach einer erneuten Depletionsphase über zwei Wochen (D2) konsumierte Gruppe A in der zweiten Interventionsphase (I2) Karottensaft (330ml/Tag), Gruppe B Tomatensaft (330ml /Tag). Die Studie endete nach zwei weiteren Wochen Depletion (D3). Am letzten Tag jeder Studienphase wurde allen Probanden Blut abgenommen, zwölf Probanden (sechs aus jeder Gruppe) sammelten am Ende jeder Studienphase über 48h ihren Stuhl in Gefriertoiletten (-40°C). Der 48h-Stuhl wurde gewogen und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Während der Stuhlsammelperiode sowie zwei Tage zuvor bekamen die Probanden unter Berücksichtigung ihres Energiebedarfs eine vom Institut zubereitete, kontrollierte Diät, um den Einfluss von anderen, von den Saft-Interventionen unabhängigen, diätetischen Faktoren weitestgehend auszuschließen.

Die zugehörigen Ernährungsprotokolle wurden mit dem Programm Prodi® 4.4 expert (wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart) von Dr. med. A. Bub (BFEL Karlsruhe) ausgewertet und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

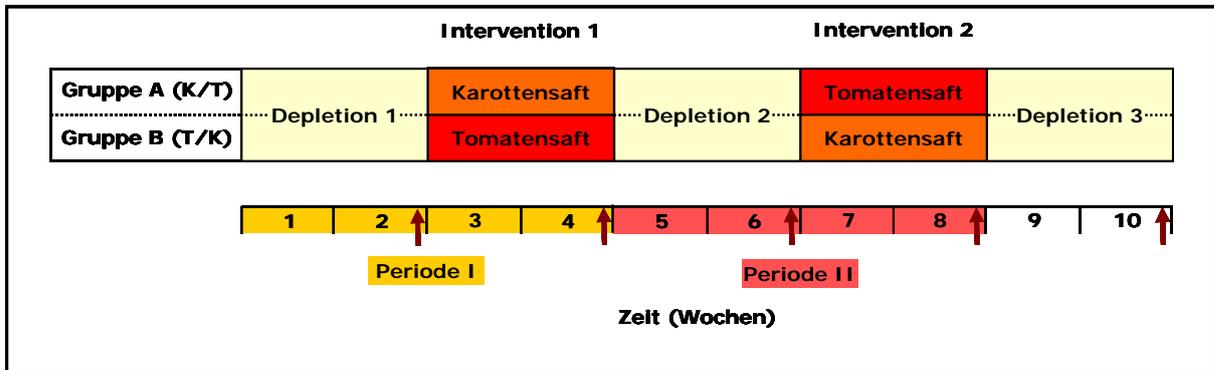


Abb. 3.1: Studiendesign der Humaninterventionsstudie im Überblick. Die Studie umfasste insgesamt fünf Studieneinheiten. Während der letzten 48h jeder Studieneinheit erfolgte die Stuhlsammlung (↑).

Alle Probanden nahmen an den fünf verschiedenen Studienphasen teil, nur ein Proband (aus Gruppe B (T/K)) hatte am Ende der dritten Depletionsphase keinen Stuhlgang.

3.6.2 Aufarbeitung von Faeces-Proben

Zur Aufarbeitung wurden die einzelnen Stuhlproben zunächst über Nacht bei +4°C und kurz vor Aufarbeitungsbeginn bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Anschließend konnten die Proben mittels Stomacher® 400 5min bei +4°C homogenisiert und danach aliquotiert werden. Bis zur Weiterverarbeitung, wie in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben, wurden die Proben auf Eis gestellt.

3.6.3 Faeces-Untersuchungen

3.6.3.1 Bestimmung des Stuhl-Wassergehaltes

Nach Überführung von 1-2g der homogenisierten Faeces-Proben in vorgewogene 15ml-Polypropylenröhrchen wurde der Stuhl 5h bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Faeces-Wassergehalt (%) nach erneuter Gewichtsbestimmung des Röhrchens errechnet.

3.6.3.2 HPLC-Analyse der Faeces-Carotinoide

Für die HPLC-Analyse wurden 10 ($\pm 0,1$)g-Aliquots der homogenisierten Faeces-Proben mit je 10ml BHT-Lösung (0,022mg BHT/ml PBS) versetzt, um die darin enthaltenen Carotinoide zu stabilisieren. Danach wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Carotinoid-Extraktion bei -80°C gelagert.

Extraktion

Die aufgetauten Faeces-Proben wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gründlich vermischt, auf ein Gesamtvolumen von 40ml gebracht und daraus ein 5ml-Aliquot für die Carotinoid-Extraktion mit Diethylether entnommen. Der Rest der Proben wurde mit flüssigem Stickstoff erneut tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Verbesserung der Extrahierbarkeit wurden 1-2ml Ethanol und gesättigte NaCl-Lösung eingesetzt. Zur Trennung von wässriger und organischer Phase wurden die Proben stets nach Ausschütteln mit ca. 5ml Diethylether (mindestens 3x) bei 1000xg und $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die vereinigte Etherphase wurde bei ca. 30°C und 430mbar am Rotationsverdampfer eingeengt, unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und bis zur HPLC-Analyse über Nacht bei -20°C gelagert. Für die HPLC-Analytik wurden die Proben in THF vorgelöst, in mobiler Phase A (siehe unten) aufgenommen und anschließend in das HPLC-System injiziert.

HPLC-Analyse

In einem Routineverfahren zur Carotinoid-Analyse nach Briviba *et al.* wurden sechs Carotinoide bestimmt [Briviba *et al.* 2001]. Zur chromatographischen Trennung dieser Carotinoide wurden folgende Geräte verwendet:

Pumpensystem:	Kontron System 522 (Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)
Detektor:	Photodiodenarray-Detektor Shimadzu SPD-M10AV (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)

Die Carotinoid-Analyse erfolgte mittels Umkehrphasen (RP)-HPLC unter Verwendung einer Suplex pKb 100 Säule ($5\mu\text{m}$, $250 \times 4,6\text{mm}$, Supelco, Bellfonte, Pennsylvania, USA) unter folgenden Bedingungen:

Vorsäule:	C ₁₈ Nova-Pak® (4µm Guard-Pak™, Waters GmbH, Eschborn)
Mobile Phase	A: Methanol/Acetonitril/2-Propanol 44/52/2, v/v/v, 1% Essigsäure v/v B: Methanol/Wasser 10/90, v/v
Gradient:	0-8min 92% A, 8-19min 92% A → 94% A, 19-20min A 94% → 100% A, 20-47min 100% A
Flussrate:	1ml/min
Temperatur:	RT
Injektionsvolumen:	100µl
UV/vis-Detektion:	450nm

In einem HPLC-Lauf konnten folgende Carotinoide erfasst werden: Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin einschließlich Isomere, α -Carotin, β -Carotin und Isomere. Die Identifizierung der Carotinoide erfolgte mit Hilfe ihrer Retentionszeiten und UV/Vis-Spektren. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde mit Hilfe der Software Class-M10A Version 1.64 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) durchgeführt; zur Berechnung der Carotinoidkonzentrationen dienten Kalibrierungskurven von Standardlösungen.

3.6.3.3 HPLC-Analyse von Malondialdehyd (MDA) im Stuhl

Malondialdehyd wird häufig als Marker für die Lipidperoxidation eingesetzt. Die Analyse des Faeces-MDA-Gehaltes wurde unter der Leitung von PD Dr. med. (SU) K. Briviba am Institut für Ernährungsphysiologie, BFEL, Karlsruhe durchgeführt [Briviba *et al.* 2004]. Dazu wurden 0,1ml der (wie in Abschnitt 3.6.3.2 beschriebenen) vorbereiteten Faeces-Proben 0,68ml H₂O_{bidest.}, 20µl BHT-Lösung (50g/l Ethanol), 70µl Trifluoressigsäure und 0,5ml Thiobarbitursäure (14g/l) zugesetzt. Das Gemisch wurde anschließend 45min bei 95°C inkubiert und 10min bei 1000xg zentrifugiert.

Die MDA-Analyse aus dem Überstand erfolgte mittels RP-HPLC unter folgenden Bedingungen:

Säule:	4x250mm RP C ₁₈ (Vydac, Hesperia, Californien, USA)
Mobile Phase	KH ₂ PO ₄ (0,05M; pH 5,5)/Methanol 65/35, v/v
Flussrate:	0,75ml/min
Temperatur:	RT

Injektionsvolumen:	50µl
Detektor:	Shimadzu RF-535 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)
Fluoreszenz- Detektion:	Anregung 515nm Emission 550nm

3.6.4 Faeceswasser-Gewinnung

Je nach verfügbarer Stuhlmenge wurde pro Probe 100-150g ($\pm 0,05$ g) homogener Stuhl in vorgewogene Ultrazentrifugen (UZ)-Röhrchen überführt und 2h bei $+4^{\circ}\text{C}$ und $60.000\times g$ zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, vereinigt, in flüssigem Stickstoff sofort tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Um die Sterilität zu gewährleisten, wurde für den Einsatz in Zellkulturversuchen (Abschnitt 3.6.3.2) ein Teil des Faeceswassers (FW) schrittweise über Filter mit 5,0, 0,65 bzw. 0,22µm Porengröße steril-filtriert. Da Carotinoide jedoch nach der Filtration von Faeceswasser nicht mehr detektiert werden konnten, wurden ergänzend auch Zellkulturversuche mit unsterilen – nachfolgend als unfiltriert bezeichneten - carotinoidhaltigen FW-Proben durchgeführt, bei denen Grobpartikel über Filtration durch ein Edelstahlsieb (Porengröße ca. 2mm) entfernt wurden. Unfiltrierte FW-Aliquots dienten außerdem für pH-Wert-Bestimmungen. Alle FW-Proben wurden bis zum Einsatz in der Zellkultur aliquotiert gelagert bei -80°C .

3.6.5 Zellkultur

Die Kultivierung von HT-29 Zellen erfolgte in T80-Zellkulturflaschen in Komplettmedium (DMEM unter Zusatz von 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO_2 und 37°C . Ein Mediumwechsel wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Bei 80-100 % Konfluenz wurde eine Subkultivierung durchgeführt. Dazu wurden alle erforderlichen Reagenzien im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach zweimaligem Waschen mit je 1ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden die Zellen mit 1,5ml Trypsin/EDTA (Inkubationszeit 3-7min bei 37°C) vom Flaschenboden abgelöst. Nach Beenden des Trypsinierungs-Prozesses durch Zugabe von 10ml Komplettmedium wurden die Zellen sorgfältig suspendiert und bei $200\times g$ 5min zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10ml frischem Medium resuspendiert und entsprechende Aliquots zur erneuten Kultivierung verwendet werden. Zur Aussaat von Zellen für nachfolgende Versuche wurden Zellzahl und Vitalität mittels Neubauerzählkammer nach Anfärbung

nekrotischer Zellen mit Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein blauer DNA-Farbstoff, welcher nur bei Verlust der Membranintegrität in eine Zelle eindringen kann. Die Vitalität der verwendeten HT-29 Zellen (Passage 11-28) lag bei 95-100%. Regelmäßige enzymatische Mycoplasmentests ergaben keine Hinweise auf eine Kontamination der verwendeten HT-29 Zellen mit Mycoplasmen.

3.6.6 MTT-Test

Cytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen wurden mit Hilfe des MTT-Tests durchgeführt. MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches mittels mitochondrialer Dehydrogenasen ausschließlich durch vitale, metabolisch aktive Zellen in blaue, wasserunlösliche Formazankristalle umgewandelt wird. Nach Zugabe eines geeigneten Lysepuffers konnte die Farbstoffumsetzung photometrisch quantifiziert werden.

3.6.7 Faeceswasser-Untersuchungen

3.6.7.1 Cytotoxizität

Für Cytotoxizitätsmessungen wurden 60.000 vitale Zellen pro Vertiefung in 96-well-Mikrotiterplatten in einem Volumen von 100µl Komplettmedium ausgesät. Die äußeren Reihen der verwendeten Platten wurden mit 200µl PBS/Vertiefung befüllt, um Volumenverluste durch Verdunstung gering zu halten. Nach Erreichen von 100% Konfluenz (drei Tage nach der Aussaat) wurden die Zellen für 24h mit FW-Proben in Dreifachbestimmung in folgenden Konzentrationen inkubiert: 20%, 10%, 5%, 2,5%, 2%, 1% und 0% (=Negativ-Kontrolle) in Komplettmedium (v/v). Zur Vermeidung von Pilzkontaminationen wurde bei Versuchen mit unfiltrierten FW-Proben das Komplettmedium mit Nystatin (50 Einheiten/ml) versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testmedienüberstände abgesaugt und durch je 100µl MTT-Gebrauchslösung ersetzt. Nach einstündiger Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37°C wurde die MTT-Umsetzung durch Zugabe von 150µl Lysepuffer/well beendet und die Mikrotiterplatten bis zur vollständigen Lösung der gebildeten Formazankristalle bei 300U/min und 37°C geschüttelt. Um Flüssigkeitsverdunstung zu vermeiden, wurden die Mikrotiterplatten zuvor sorgfältig in Folie eingepackt. Nach ein bis zwei Tagen konnte die MTT-Umsetzung bei einer Wellenlänge von 560nm (Referenz 690nm) gegen den Leerwert (100µl MTT-Gebrauchslösung ohne Zellen, n=3) spektralphotometrisch quantifiziert werden.

Für die weitere Datenauswertung wurde die Vitalität der behandelten Zellen folgendermaßen errechnet: Absorptionswerte nach Abzug des mittleren Leerwertes/Mittelwert der Absorptionen der unbehandelten Kontrolle*100%.

Die Cytotoxizitätsexperimente mit den FW-Proben eines Probanden wurden stets zeitgleich durchgeführt.

3.6.7.2 Proliferation

Pro Proliferationstest wurden vier 96-well-Mikrotiterplatten mit 5.000 vitalen Zellen/well in 100µl Komplettmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Auch bei diesem Testsystem wurden die äußeren Vertiefungen der eingesetzten Mikrotiterplatten mit je 200µl PBS versehen, um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung zu vermeiden. Am Tag darauf (Tag 0), erfolgte die Testsubstanz-Zugabe in Dreifachbestimmung mit je 100µl FW-Probe 10%, 5%, 2%, 1% und 0,5% (v/v) in Komplettmedium. Auch im Proliferationstest wurden die verschiedenen FW-Proben eines Probanden parallel untersucht. Das Zellwachstum in Abhängigkeit der FW-Behandlung wurde nach ein, zwei und fünf Tagen Inkubation bestimmt. Zusätzlich wurde am Tag 0 zur Erfassung eines Basiswertes die MTT-Umsetzung unbehandelter Zellen gemessen. Bei der Platte mit Zellen, die fünf Tage mit Testmedien behandelt werden sollten, erfolgte am zweiten Tag ein Medienwechsel mit den entsprechenden frisch angesetzten Testmedien. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit (Tag 0, 1, 2, 5) wurden wie in Abschnitt 3.6.7.1 beschrieben die MTT-Zugabe und Vorbereitungen zur photometrischen Messung der MTT-Umsetzung bei 560nm durchgeführt.

3.6.7.3 HPLC-Analyse von Gallensäuren in Faeceswasser

Probenvorbereitung

Um konjugierte Gallensäuren zu hydrolysieren, wurden je 200µl steril-filtrierter FW-Proben zunächst 2h bei 80°C mit 1ml 1M KOH-Methanol (20/80 v/v) inkubiert. Nach pH-Neutralisierung mit je 100µl HCl (32% (v/v)) und Eindampfen bis zur Trockne unter einem Stickstoffstrom wurden die Proben in 5ml 0,1M Phosphat-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Festphasenextraktion mit Oasis® HLB-Extraktionssäulen (30mg, Waters GmbH, Eschborn). Dazu wurden die Säulen mit je 2ml 100% Methanol und 5ml 0,1M Phosphat-Puffer konditioniert und nach Zugabe der jeweiligen Probe mit 2ml Phosphat-Puffer gewaschen. Zur Eluierung der Gallensäuren diente 4ml Methanol (100%). Die Proben wurden bei +80°C unter Stickstoff eingengt und nach quantitativer Überführung mittels 150µl KOH-Methanol (1,8mmol KOH/l Methanol) und 200µl Methanol in 1,5ml-Reaktionsgefäße und erneutem Eindampfen unter Stickstoff bei -20°C über Nacht eingefroren. Die Proben-Derivatisierung erfolgte am Tag darauf nach einer modifizierten Methode von Guldutuna *et al.* durch Zugabe von je 50µl BMC-Lösung und DCCE-Lösung und Inkubation von 1h bei 37°C [Guldutuna *et al.* 1993]. An-

schließlich wurden die Proben 10min auf Eis abgekühlt, 3min bei 800xg zentrifugiert und 1min später Aliquots in das HPLC-System injiziert. Da der Derivatisierungsprozess nicht abgestoppt wurde, erfolgten alle Arbeitsschritte unter strenger Einhaltung der Zeitangaben.

Für die HPLC-Analyse der Gallensäuren wurde das in Abschnitt 3.6.3.2 beschriebene HPLC-System durch einen Fluoreszenzdetektor (Shimadzu Model RF-535) und einen Integrator zur quantitativen Chromatogramm-Auswertung (D-2500 Chromato-Integrator, Merck-Hitachi) ergänzt.

Die RP-HPLC-Analyse der Gallensäuren erfolgte mit:

Säule:	C ₁₈ 5µm, 250 x 4,6mm (Vydac, Hesperia, Californien, USA)
Mobile Phase	A: Wasser/Acetonitril 60/40, v/v B: Acetonitril/Methanol/Butanol 47/23/30, v/v/v
Gradient:	0-5min 80% A, 5-15min → 75% A, 15-25min → 70% A, 25-30min 70% A, 30-35min → 50% A, 35-36min 50% A, 36-40min → 40% A, 40-41min → 30% A, 41-45min → 20% A, 45-55min → 0% A, 55-57min → 75% A, 57-75min 75% A
Flussrate:	1ml/min
Temperatur:	RT
Injektionsvolumen:	20µl
Fluoreszenz-Detektion:	Anregung 340nm Emission 410nm

In einem HPLC-Lauf wurden folgende Gallensäuren erfasst: Ursodesoxycholsäure (UDCA), Cholsäure (CA), Chenodesoxycholsäure (CDCA), Desoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA). Zur Identifizierung und Quantifizierung dieser Gallensäuren wurde stets ein Standard mitgeführt. Dazu wurden aus einer Stammlösung (Gemisch der oben genannten Gallensäuren in einer Konzentration von je 0,05mM in Methanol) 50µl Aliquots hergestellt, zur Trockne eingedampft und bis zur Derivatisierung bei -20°C gelagert. In Vorversuchen lag die Wiederfindungsrate der einzelnen Gallensäuren aus dem Standardgemisch bei mindestens 80% (Daten nicht gezeigt).

3.6.7.4 GC-Analyse von kurzkettigen Fettsäuren

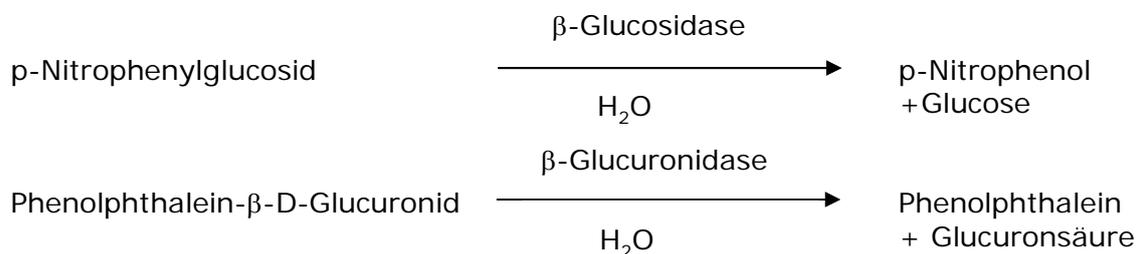
Probenvorbereitung

Zur Proteinfällung wurden je 300µl FW-Probe mit 30µl 96%iger Ameisensäure 15min bei RT inkubiert und 5-10min bei 16.000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und für die Analyse auf Trockeneis an die tierärztliche Hochschule Hannover versendet. Dort wurde am Institut für Physiologie die Analyse in Doppelbestimmung mit dem Gaschromatograph HP5890 II (Hewlett-Packard, Böblingen) mit automatischem Injektor (HP 7673 II) und Flammenionisations-Detektor auf einer gepackten Glassäule (Länge 1,8m; Innendurchmesser 2mm) durchgeführt. Als Füllmaterial wurde Chromosorb WAW 80/100 mesh mit 20% Neopentyl-Glycol-Succinat und 2% Ortho-Phosphorsäure (Analyt GmbH & Co KG, Müllheim) verwendet. Die Flussraten der Brenngase Wasserstoff und synthetische Luft betragen 30 bzw. 420ml/min. Als Trägergas diente Stickstoff (Reinheit 5,0) mit einem Gesamtfluss von ca. 25ml/min. Die Trennung erfolgte isotherm bei einer Ofentemperatur von 130°C, Injektortemperatur von 220°C und Detektortemperatur von 250°C, um eine schnelle Verdampfung der Proben zu erzielen. Zur quantitativen Auswertung der Chromatogramme diente ein Integrator (HP 3396 II).

3.6.7.5 Bestimmung der β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität in Faeceswasser

Die Aktivität der beiden bakteriellen Enzyme in Faeceswasser wurde nach einer modifizierten Methode von Hylla *et al.* bestimmt [Hylla *et al.* 1998].

Testprinzipien



β -Glucosidase

Die bei -80°C gelagerten unfiltrierten FW-Proben wurden zunächst bei RT aufgetaut und 10-fach mit Acetatpuffer verdünnt. Pro Versuchsansatz wurden in Doppelbestimmung je $100\mu\text{l}$ der verdünnten Proben und je $800\mu\text{l}$ Acetatpuffer in $1,5\text{ml}$ -Reaktionsgefäße pipettiert, vermischt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Durch Zugabe von je $100\mu\text{l}$ p-Nitrophenylglucosid ($0,01\text{M}$ in Acetatpuffer) wurde die Reaktion gestartet und nach 15, 30, 45, 60 und 75min (bei 37°C) mit je $500\mu\text{l}$ Glycinpuffer abgestoppt. Die Proben wurden bis zur spektralphotometrischen Messung der p-Nitrophenolbildung bei 400nm im Dunkeln auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde der Basiswert der enzymatischen Reaktion (0min, $n=2$) bestimmt, wobei hier der Glycinpuffer bereits vor Zugabe der entsprechenden FW-Probe ins Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Die β -Glucosidase-Aktivität wurde mit Hilfe von p-Nitrophenol-Standardkurven berechnet und in Form des Substratumsatzes [$\text{mg}/\text{h}\cdot\text{ml}$ FW] angegeben.

β -Glucuronidase

Parallel zur β -Glucosidase erfolgte ebenfalls in Doppelbestimmung die Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase. Dazu wurden die unfiltrierten FW-Aliquots fünffach mit Acetatpuffer verdünnt und davon je $400\mu\text{l}$ sowie $400\mu\text{l}$ Acetatpuffer in 15ml -Polypropylenröhrchen überführt. Vor der Zugabe von je $100\mu\text{l}$ Phenolphthalein- β -D-Glucuronid wurden die Proben auf 37°C erwärmt. Nach 15, 30, 45, 60 und 75min bei 37°C wurde die Reaktion mit 5ml eines 1:1 Gemisches aus Glycin-Puffer und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ abgestoppt und bis zur spektralphotometrischen Erfassung der Phenolphthalein-Bildung bei 552nm im Dunkeln auf Eis gestellt.

Phenolphthalein-Standardkurven dienten zur Berechnung der β -Glucuronidase-Aktivität [mg gebildetes Phenolphthalein/ $\text{h}\cdot\text{ml}$ FW].

3.6.8 Gewinnung von Faeces-Lipidextrakten

Die Herstellung von Faeces-Extrakten für den Einsatz im Zellkultursystem erfolgte wie in Abschnitt 3.6.3.2 beschrieben mit Hilfe von Diethylether. Auch hier wurden je 5ml aus den mit BHT-Lösung versetzten homogenisierten Stuhlproben für die Extraktion eingesetzt. Nach Eindampfen der vereinigten Etherphase bis zur Trockne und Zwischenlagerung bei -80°C wurden die Proben in je $150\mu\text{l}$ Tetrahydrofuran (THF) durch Vortexen vollständig gelöst und $20\mu\text{l}$ -Aliquots mittels Hamiltonspritze ($25\mu\text{l}$ Volumen) entnommen. Die Aliquotierung wurde auf Eis durchgeführt, um Verdunstung von THF zu vermeiden. Nach Abdampfen unter Stickstoff wurden die Proben bis zum Einsatz in Zellkulturversuchen erneut bei -80°C aufbewahrt.

3.6.9 Extrakt-Untersuchungen

3.6.9.1 Cytotoxizitätstests

Die Zellaussaat erfolgte wie bei den Cytotoxizitäts-Untersuchungen mit Faeceswasser (Abschnitt 3.6.7.1). Bei 100% Konfluenz wurden die Zellen für 24h mit den Faeces-Extrakten (Herstellung siehe 3.6.8) inkubiert. Dazu wurden die Faeces-Extrakte zunächst in je 500µl Komplettmedium mittels Ultra Turrax 5min bei 13.500U/min suspendiert. Diese Extrakt-Stammlösungen wurden anschließend mit Komplettmedium 2-; 3,5-; 5-; 13-; 25-; und 50-fach weiter verdünnt und als Testmedien in Dreifachbestimmung eingesetzt. Nach 24h-Inkubation erfolgte die Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Umsetzung wie in Abschnitt 3.6.7.1 beschrieben.

3.6.9.2 Durchflusscytometrische Analysen

Für die Annexin-V-Untersuchungen wurden zunächst $0,3 \times 10^6$ vitale Zellen pro Vertiefung in 24-well-Multischalen in 500µl Komplettmedium ausgesät. Drei Tage nach der Aussaat bei 100% Konfluenz erfolgte die Zugabe der frisch angesetzten Faeces-Extrakt-Stammlösungen mit einer Endkonzentration von 10% (v/v) in Komplettmedium (500µl/well; Herstellung siehe Abschnitt 3.6.9.1). Bei jedem Versuchsansatz wurde zusätzlich eine Negativ-Kontrolle (Komplettmedium ohne weitere Zusätze) und eine Positiv-Kontrolle (je 1,0µM Staurosporin (ST) und Brefeldin A (BFA) zur Apoptoseinduktion) mitgeführt. Um mögliche Effekte durch das Antioxidans BHT ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine BHT-Kontrolle eingesetzt. Nach 2- und 5h-Inkubation wurden die Testmedienüberstände vom Zellrasen abgenommen und in 15ml-Polypropylenröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 500µl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und diese Waschlösungen zu den jeweiligen Testmedienüberständen gegeben. Die Ablösung der Zellen vom Schalenboden erfolgte durch Behandlung der Zellen mit je 250µl Trypsin/EDTA bei 37°C. Der Trypsinierungsprozess wurde mikroskopisch genau beobachtet und sofort nach eingetretener Wirkung (nach 0,5-4min) durch Zugabe von je 1ml Komplettmedium abgestoppt. Nach vorsichtiger Suspendierung der Zellen und Überführung in die entsprechenden Röhrchen zu den Medienüberständen und Waschlösungen erfolgte eine Zentrifugation bei 200xg und RT für 5min. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellpellets in je 1ml frischem Komplettmedium resuspendiert und aus Aliquots der verschiedenen Zellsuspensionen Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblaumethode (siehe Abschnitt 3.6.5) bestimmt.

Annexin-V-Methode

Bereits in frühen Apoptosestadien findet eine Translokation von Phosphatidylserin-Resten, die sich bei intakten Zellen auf der cytoplasmatischen Innenseite der asymmetrisch aufgebauten Membran befinden, auf die extrazelluläre Seite statt [van Engeland *et al.* 1998].

Das Protein Annexin-V bindet spezifisch an Phosphatidylserin und kann daher nach Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) zur Anfärbung und durchflusscytometrischen Analyse apoptotischer Zellen eingesetzt werden. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V binden kann, wurde in dieser Arbeit gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Dieser DNA-Farbstoff kann die intakte Zellmembran nicht passieren.

Versuchsdurchführung

Je $0,25 \times 10^6$ Zellen (Vorbereitung siehe 3.6.9.2 Seite 56) wurden in Polystyrolröhrchen überführt, 5min bei 220xg und RT zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit je 1ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ erfolgte die Färbung der Zellpellets mit je 25 μl Annexin-V-Markierungslösung für 10min im Dunkeln bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit je 400 μl Inkubationspuffer versetzt und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis gestellt (höchstens 30min).

Messung am Durchflusscytometer

Zur Erfassung ihrer optischen Eigenschaften werden in einem Durchflusscytometer Zellen mittels laminarem Hüllstrom transportiert, vereinzelt und an einem fokussierten Laserstrahl - erzeugt von einem Argonionenlaser (Anregung bei 488nm) - vorbeigeführt. In Abhängigkeit von Zelltyp, Zellzustand und der bei der Probenvorbereitung eingesetzten Farbstoffe streuen die Zellen einen Teil des Laserlichtes und emittieren Fluoreszenzlicht. Mit Hilfe des Durchflusscytometers FACSCalibur™ können folgende Parameter simultan gemessen werden:

- relative Zellgröße über Vorwärtsstreulicht (FSC, Lichtstreuung $<2^\circ$)
- relative Zellgranularität über Seitwärtsstreulicht (SSC, Messung im 90° Winkel zum einfallenden Licht)
- spezifische Fluoreszenz und entsprechende relative Fluoreszenzintensität in vier verschiedenen Spektralbereichen: Grünfluoreszenz (FL1: 530nm Bandpassfilter (BP) z.B. FITC), Orange-Fluoreszenz (FL2: 585nm BP z.B. PE und PI), Rotfluoreszenz (FL3: 670nm Langpassfilter z.B. PI), Rotfluoreszenz (FL4: 661nm BP, z.B. APC)

Zur Einstellung der Fluoreszenzkompensation sowie zur Justierung der Instrumenteneinstellung und Überprüfung der Geräteempfindlichkeit dienten regelmäßige Messungen mit fluoreszenzmarkierten Kontrollbeads (CaliBRITE™ Beads). Die Speicherung der Geräteeinstellungen und der gemessenen Daten sowie deren statistische Analyse erfolgte über die CELLQuest™ Software (Version 3.1 f).

3.6.10 Alternatives Faeceswasser-Modell

Eine wichtige physiologische Funktion des Dickdarms ist die Rückresorption von Wasser aus dem Lumen. Daher können im Stuhl möglicherweise Substanzen mit geringer Löslichkeit ausfallen, die in oberen Colonabschnitten luminal gelöst vorliegen und dadurch Wirkungen auf das Colonepithel ausüben könnten. Diese Überlegungen sollten anhand eines alternativen Faeceswasser-Modells überprüft werden. Dazu wurden $5(\pm 0,02)$ g jeder homogenisierten Stuhlprobe in 50ml Polypropylenröhrchen eingewogen mit je 25ml DMEM ohne Zusätze 60s bei 13.500 U/min mit dem Ultra Turrax gemischt. Nach dem Überführen der homogenen Proben in UZ-Röhrchen erfolgten die nächsten Arbeitsschritte wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben. Das so gewonnene Faeceswasser, in nachfolgenden Abschnitten stets als FW-Medium (FW-M) bezeichnet, wurde steril-filtrierte und unfiltriert für Cytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen in Konzentrationen von 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 2% und 1% (v/v) in Kompletmedium eingesetzt. Die Aussaat für diese Zellkulturversuche erfolgte wie in Abschnitt 3.6.7.1 und 3.6.7.2 dargestellt.

3.7 Statistische Auswertung der Daten

Statistische Auswertungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel Version 7.0, Sigma Plot Version 4.01 und SigmaStat® 3.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) durchgeführt. Aus den Ergebnissen der dosisabhängigen Cytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen wurden nicht lineare Regressionskurven (Abbildungen siehe Abschnitt 4.5.2 und 4.5.3) errechnet. Um den Vergleich der Wirkung von verschiedenen Faeces-Präparationen auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Interventionsphasen (siehe Abschnitt 3.6.1) zu vereinfachen, wurden aus den Regressionskurven EC_{25} -Werte¹⁶ und IC_{50} -Werte¹⁷ ermittelt und für die nachfolgenden statistischen Analysen eingesetzt.

¹⁶ Der EC_{25} -Wert (EC: effective concentration) gibt die Konzentration der eingesetzten Faeces-Präparation (z.B. in % FW) an, welche eine Reduktion der Zellvitalität um 25% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur Folge hat.

Zur Überprüfung bzw. zum Ausschluss möglicher Behandlungs-, Perioden- und Nachwirkungseffekte, bedingt durch das Crossover-Studiendesign, wurde zunächst folgendes statistisches Verfahren für jeden in dieser Arbeit untersuchten Parameter angewandt:

Testverfahren der Crossover-Analyse

- Test auf Behandlungs-Unterschiede zwischen Karottensaft- und Tomatensaft-Konsum: gepaarter t-Test nach Student zwischen Studienperiode I und II; Periode I: Differenz der Messdaten aus Depletion 1 (vor der Intervention) und nach Intervention 1 (bzw. am Ende der Interventionsphase); Periode II: Depletion 2 – Intervention 2
- Test auf Periodeneffekte: ungepaarter t-Test zum Vergleich der Daten-Unterschiede zwischen den Perioden von Gruppe A (Periode I - Periode II) gegen Gruppe B (Periode II – Periode I)
- Test auf Nachwirkungseffekte (= Behandlung x Perioden-Wechselwirkungseffekte): ungepaarter t-Test mit Vergleich der Messdaten von Periode I + Periode II von Gruppe A gegen Gruppe B

Waren die Daten im Kolmogorov-Smirnov-Test (Lilliefors-Korrektur) nicht normalverteilt bzw. homogen (Levenetest), dienten die entsprechenden parameterfreien Verfahren Mann-Whitney Rangsummen-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test zur statistischen Auswertung.

Waren keine Perioden- und Nachwirkungseffekte zu beobachten (Signifikanz-Level $P < 0,1$), wurden die Messdaten der Probandengruppen A und B zusammengefasst. Effekte durch die Karottensaft- und Tomatensaft-Intervention wurden in diesem Fall ungeachtet der Saft-Konsum-Sequenz (K/T und T/K) durch Vergleich der Messdaten aus den jeweiligen Depletions- und nachfolgenden Interventionsphasen durch gepaarte t-Tests (bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test) statistisch geprüft (Bsp.: Daten von Gruppe A / D1 gegen I1 und von Gruppe B / D2 gegen I2 hinsichtlich Effekte durch Karottensaft-Konsum). Das Signifikanzniveau wurde auf $P \leq 0,05$ festgelegt. Zeigten sich Perioden- oder Nachwirkungseffekte, wurden nur die Messdaten aus Studienperiode I für weitere statistische Auswertungen verwendet.

¹⁷ Der IC_{50} -Wert (IC: inhibition concentration) zeigt, bei welcher Konzentration der eingesetzten Faeces-Präparation eine 50%ige Wachstumshemmung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle beobachtet werden kann.

Zur Erfassung von Zusammenhängen bzw. Abhängigkeiten wurden Korrelationen zwischen den gemessenen Parametern durchgeführt (Pearson-Produktmoment-Korrelation bei normalverteilten Daten, Rangkorrelation nach Spearman bei Verdacht auf Nichtnormal-Verteilung der Variablen, Signifikanzniveau ebenfalls bei $P \leq 0,05$). Die visuellen Darstellungen lieferten keinen Anlass dazu, die Annahme einer linearen Beziehung zwischen den korrelierten Parametern zu verwerfen. Signifikante bzw. tendenzielle Korrelationen sind im Tabellenanhang in Tab. 7.7 dargestellt.

Um die Bedeutung von einzelnen beobachteten Einflussfaktoren (Prädiktorvariablen) wie z.B. Faeces-MDA- und Faeces-Wassergehalt, FW-DCA- und FW-Proponat-Konzentration sowie FW- β -Glucosidase-Aktivität auf die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von Faeceswasser abschätzen zu können, wurden abschließend mit dem Programm SigmaStat[®] 3.0 multiple lineare Regressionsanalysen in einem vorwärts schrittweisen Verfahren durchgeführt. Im ersten Schritt einer solchen Analyse wird eine einfache Regression mit derjenigen Variablen (z.B. Faeces-MDA-Gehalt) durchgeführt, die die höchste positive oder negative Korrelation mit der abhängigen Variablen (z.B. antiproliferative FW-Wirkung/IC₅₀-Wert) zeigt. In den nachfolgenden Schritten werden im Programm ausschließlich statistisch wichtige (signifikante) Variablen mit den höchsten partiellen Korrelationen selektiert. Interkorrelationen von Prädiktorvariablen (Multikollinearität) können dabei mit Hilfe der Toleranz bzw. deren Kehrwert (Variance Inflation Factor) überprüft und Variablen gegebenenfalls aus dem Regressionsmodell entfernt werden. Die Voraussetzungen für die Anwendung der multiplen Regression wie Konstanz der Variabilität wurden mittels SigmaStat[®] 3.0 überprüft und waren erfüllt.

Aufgrund der begrenzten Stuhl-, bzw. Faeceswasser- und Faeces-Extrakt-Mengen konnten nicht alle in der Arbeit bestimmten Parameter bei jeder Probanden-Probe erfasst werden. Daher sind die in den nachfolgenden Abschnitten dargestellten Messergebnisse stets mit der Anzahl (n) der für die statistische Auswertung verfügbaren Messdaten angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Probandendaten

Im Rahmen der Rekrutierung wurden zunächst einige anthropometrische Daten der Probanden erfasst. In Tab. 4.1 sind die Daten jener Probanden aufgeführt, deren Stuhlproben in dieser Arbeit untersucht wurden. Der statistische Vergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Probanden-Gruppen A (Reihenfolge der Saft-Interventionen: Karotten-/Tomatensaft (K/T)) und B (T/K) der Crossover-Studie hinsichtlich ihrer anthropometrischen Daten (Studiendesign siehe Abschnitt 3.6.1).

Tab. 4.1: Anthropometrische Daten (MW \pm SD) der zwölf Probanden, die ihre Stuhlproben am Ende jeder Studienphase sammelten.

Parameter	Gruppe A (K/T)	Gruppe B (T/K)
Alter [Jahre]	26 \pm 5	28 \pm 4
Gewicht [kg]	78 \pm 8	75 \pm 4
Größe [m]	1,80 \pm 0,06	1,86 \pm 0,09
BMI [kg/m ²]	24,0 \pm 2,5	21,9 \pm 2,2
Körperfett-Anteil [%] ¹	15,5 \pm 5,8	15,8 \pm 6,4
Grundumsatz [kcal/Tag] ²	1858 \pm 223	1862 \pm 249

¹ erfasst mittels bioelektrischer Impedanzanalyse unter Standardbedingungen

² bestimmt über indirekte Kalorimetrie mit Vmax 229 (Sensomatics, Höchberg) unter Standardbedingungen

4.2 Daten aus der Ernährungserhebung

Durch die kontrollierte Diät konnte eine einheitliche Nahrungsaufnahme zwei Tage vor und während der Stuhlsammelperioden gewährleistet werden (siehe Tab. 4.2). Eine einfache Varianzanalyse der Daten mit wiederholten Messungen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den fünf Studieneinheiten hinsichtlich der nachfolgend gezeigten Parameter.

Tab. 4.2: Vergleich der Nährstoffaufnahme der zwölf Probanden (MW±SD, während der kontrollierten Diät) zwischen den fünf Studieneinheiten ohne Berücksichtigung der Nährstoffzufuhr aus Karotten- und Tomatensaft.

Parameter	Zeit (Wochen)				
	2	4	6	8	10
Energie [kcal/Tag]	2742±286	2672±276	2799±247	2882±407	2791±498
KH [Energie%]	51±2	51±2	51±2	50±2	49±2
Fett [Energie%]	34±2	34±2	34±2	35±3	35±2
Protein [Energie%]	15±1	15±1	15±1	15±1	15±1
Ballaststoffe ¹ [g/Tag]	36±4	35±4	36±5	37±4	34±6
Ethanol [g/Tag]	3,3±5,9	2,1±5,1	1,3±3,6	0,3±0,02	0,7±1,5
β-Carotin [mg/Tag]	1,2±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,3±0,2	1,3±0,2

¹ Nach Angaben des Herstellers Schoenenberger enthielt der verwendete Karottensaft 1,0g Ballaststoffe/100ml und der Tomatensaft 0,8g/100ml. Damit wurden während der jeweiligen Saft-Interventionsphasen täglich zusätzlich 3g Ballaststoffe aus Karottensaft und 2,4g aus Tomatensaft aufgenommen.

4.3 Studiendesign - Crossover

Bei den anthropometrischen und Ernährungserhebungs-Daten sowie allen in dieser Arbeit untersuchten Parametern aus Depletionsphase 1 (D1) bestanden im ungepaarten t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen Probandengruppe A und B vor Beginn der Saft-Interventionen (Daten nicht gezeigt). Bei der Bestimmung der Carotinoid-Gehalte im Stuhl und anderen in der Arbeit untersuchten Parametern wie Cytotoxizität und Proliferation sowie den Substanzeanalysen in verschiedenen Faeces-Präparationen wurden auch Proben aus der Depletionsphase D3 untersucht. Nachdem die Messdaten der ersten und letzten Depletionsphase bei diesen Parametern jedoch keine signifikanten Unterschiede zeigten, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf eine Darstellung von D3 weitestgehend verzichtet bzw. bei späteren Experimenten von der Untersuchung der Proben aus D3 abgesehen. Auch bei den in Tab. 7.7 dargestellten Korrelationsanalysen sind daher die Daten der letzten Depletionsphase nicht berücksichtigt.

4.4 Faeces-Untersuchungen

4.4.1 Stuhlgewicht, Stuhl-Wassergehalt

Das Gewicht der Faeces-Proben wurde durch den Konsum von Karotten- bzw. Tomatensaft nicht signifikant beeinflusst:

Tab. 4.3: Faeces-Parameter in Abhängigkeit der Studienphasen (MW±SD).

*signifikanter Unterschied im Vergleich zur Depletionsphase direkt vor der entsprechenden Saft-Intervention mit $P \leq 0,05$.

Parameter	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
Stuhlgewicht [g]/48h (n=12)	499±169	430±168	443±230	512±245
Wassergehalt [%] ¹ (n=6)	78±6	74±4*	73±5	78±4

¹ n=6: die Messdaten aus Studienperiode II wurden beim Parameter Stuhl-Wassergehalt nicht in die weitere statistische Auswertung miteinbezogen, da bei der Crossover-Analyse Nachwirkungseffekte ($P=0,04$) auftraten.

Der Wassergehalt im Stuhl ging nach Karottensaft-Konsum (I1) signifikant um ca. 4% zurück. Nach Tomatensaft-Konsum (I1) zeigte sich eine tendenzielle, aber nicht signifikante ($P=0,07$) Erhöhung im Wassergehalt der Stuhlproben im Vergleich zur vorausgegangenen Auswaschphase.

4.4.2 Carotinoid-Gehalte in Faeces und Faeceswasser

Die Messung des Carotinoid-Gehaltes in Faeces- und FW-Proben ermöglichte die Erfassung physiologischer, durch eine carotinoidreiche Ernährung erreichbare, Carotinoid-Konzentrationen im Dickdarm. Karottensaft-Konsum (330ml/Tag) über zwei Wochen erhöhte bei allen Probanden signifikant den β - und α -Carotin-Gehalt im Stuhl (siehe Abb. 4.1). Auch die Faeces-Lycopin-Menge war nach 14-tägigem Tomatensaft-Konsum (330ml/Tag) signifikant erhöht. Nach der sich anschließenden Depletionsphase gingen die Faeces-Gehalte der Hauptcarotinoide wieder auf die ursprünglichen Werte (vor der jeweiligen Saft-Intervention) zurück.

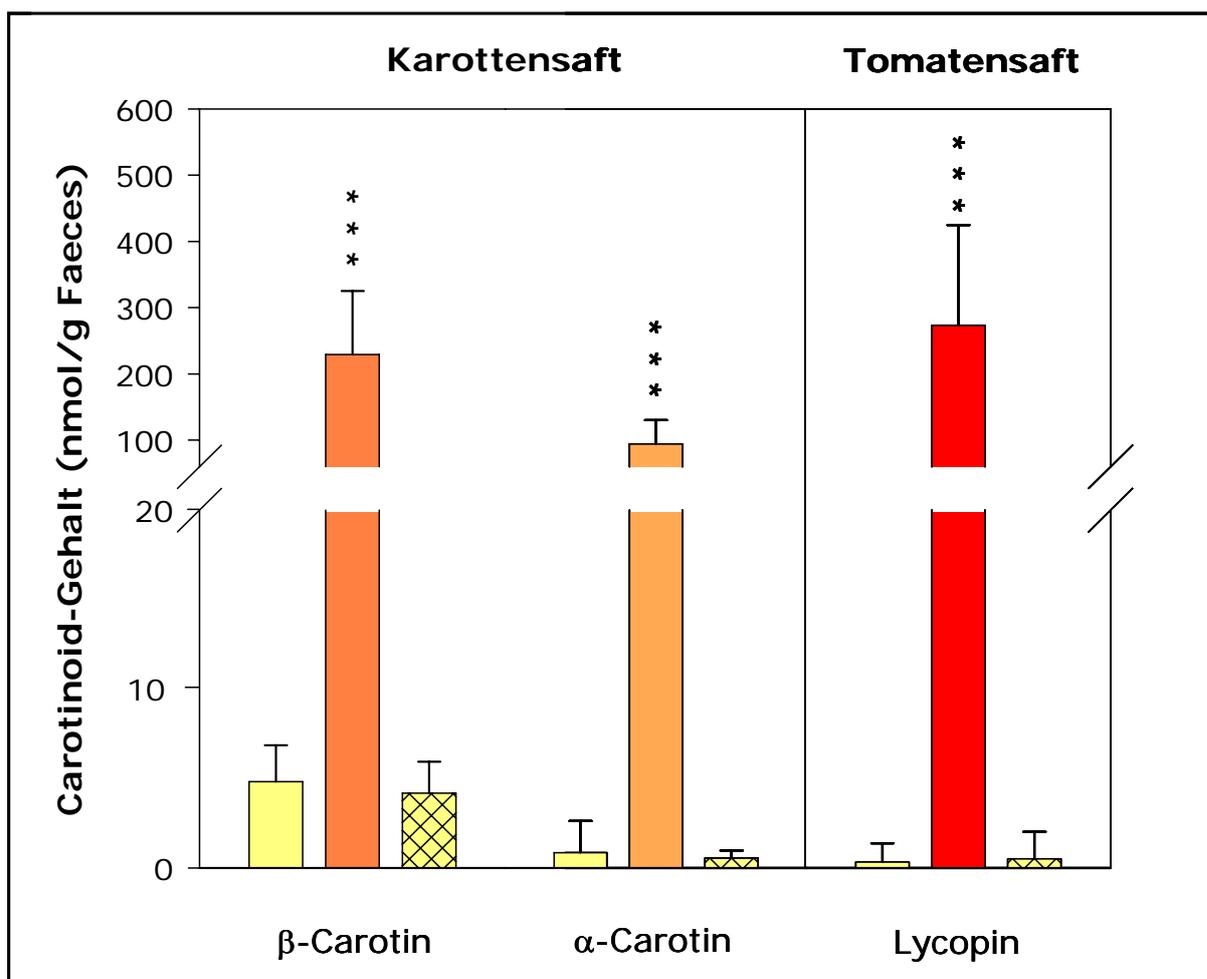


Abb. 4.1: Faeces-Carotinoid-Gehalte nach 14-tägiger Depletion und Gemüsesaft-Intervention (MW±SD, n=12). Dargestellt sind die Hauptcarotinoide aus Karotten- bzw. Tomatensaft einschließlich ihrer Isomere. *** $P < 0,001$. ■ Depletion vor der Saft-Intervention, ■ Depletion nach der Saft-Intervention (Messwerte, einschließlich der Gehalte der übrigen erfassten Carotinoide, siehe Tabellenanhang Tab. 7.1).

Zusätzlich wurde die Carotinoid-Analyse exemplarisch auch bei einigen, in Zellkulturversuchen eingesetzten, unfiltrierten FW-Proben durchgeführt. Sie sollte Aufschluss darüber geben, in welchem Konzentrationsbereich Carotinoide in der wässrigen Phase des Stuhls vorliegen können. Die Durchführung der Carotinoid-Extraktion und -Analyse erfolgte aus je 500µl FW-Probe wie die HPLC-Analytik der Faeces-Carotinoide (Methode siehe Abschnitt 3.6.3.2). Entsprechend der Faeces-Carotinoide waren auch die Carotinoid-Konzentrationen in unfiltriertem Faeceswasser nach Saft-Konsum erhöht. Die Konzentration von β-Carotin stieg z.B. von $0,24 \pm 0,19 \mu\text{M}$ (Depletionsphase) auf $49,2 \pm 16,6 \mu\text{M}$ nach Karottensaft-Konsum an.

Im Vergleich zur vorausgegangenen Auswaschphase ($0,7 \pm 1,5$) enthielt Faeceswasser nach Tomatensaft-Konsum Lycopin in einer Konzentration von $83,1 \pm 50,2 \mu\text{M}$ (jeweils $n=4$). In steril-filtrierte FW-Proben ($0,22 \mu\text{m}$ Filter) lagen die Carotinoid-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

4.4.3 Stabilität von Carotinoiden in Faeces und Faeceswasser (Langzeittest)

Zur Erfassung der Stabilität von Faeces-Carotinoiden über einen Zeitraum von acht Monaten wurden aus zwei repräsentativen, zuvor homogenisierten, aliquotierten und bei -80°C (im Dunkeln) gelagerten Stuhlproben - jeweils mit und ohne BHT-Zusatz - mindestens alle acht Wochen eine Carotinoid-Extraktion und -Analyse wie in Abschnitt 3.6.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Langzeitlagerung von Faeces bei -80°C zeigte keinen Einfluss auf die Stabilität der Carotinoide:

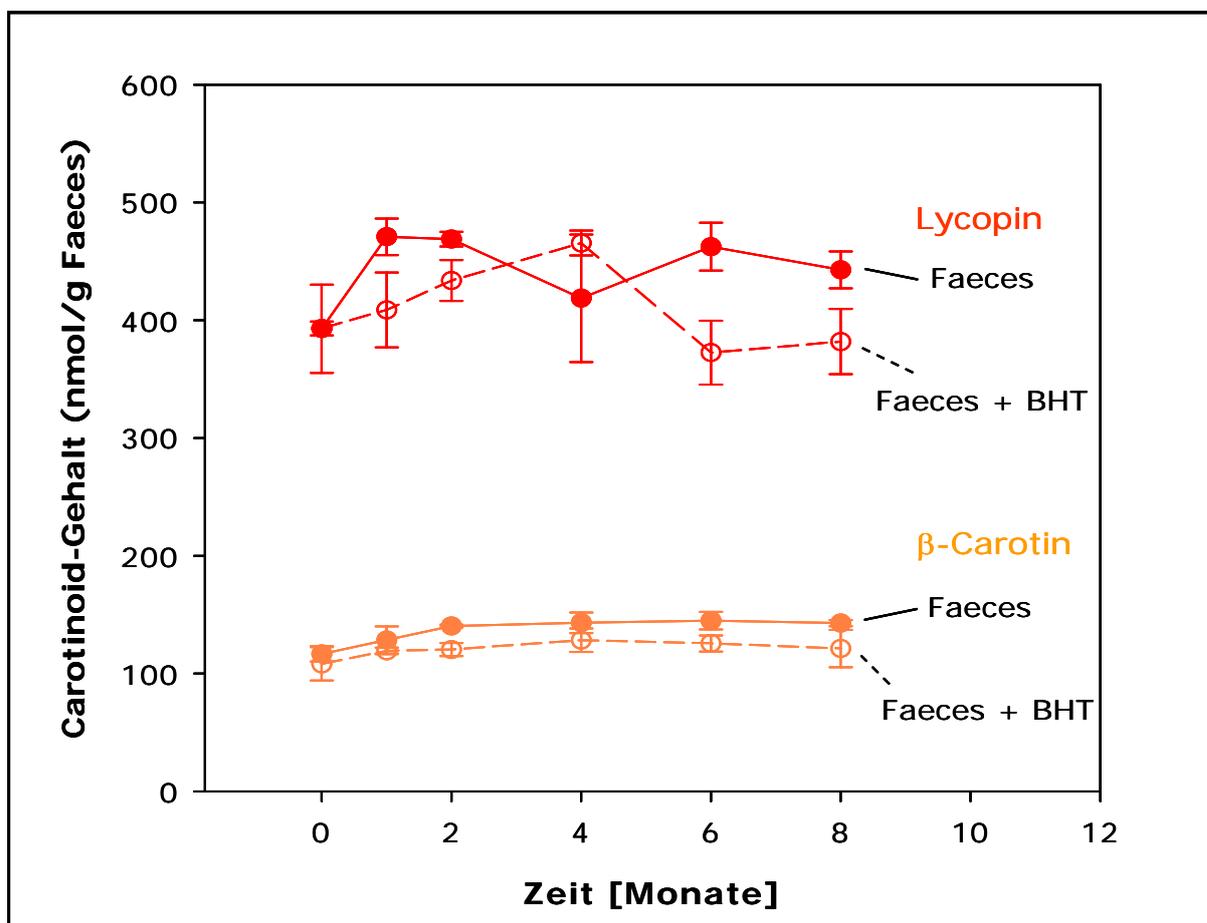


Abb. 4.2: Stabilität von Faeces-Carotinoiden am Beispiel von β -Carotin und Lycopin, einschließlich ihrer Isomere ($\text{MW} \pm \text{SD}$, $n=3$). Die repräsentativen Faeces-Proben stammen von zwei verschiedenen Probanden aus der Stuhlsammelperiode von Interventionsphase II (Probe 1 nach Karottensaft-Konsum (β -Carotin), Probe 2 nach Tomatensaft-Konsum (Lycopin), Messwerte siehe Tab. 7.3).

Der Zusatz des Antioxidans BHT hatte keinen statistisch signifikanten Effekt (einfache Varianzanalyse) auf den Carotinoid-Gehalt im Stuhl.

Die untersuchten FW-Proben zeigten bei gleichen Lagerbedingungen über acht Monate ebenfalls keine Abnahme hinsichtlich der Carotinoid-Konzentrationen (Messdaten siehe Tabellenanhang Tab. 7.1).

4.4.4 Faeces-MDA-Gehalt

Malondialdehyd wird häufig als Marker für die Lipidperoxidation eingesetzt. Weder Karotten- noch Tomatensaft-Konsum hatte einen signifikanten Einfluss auf den MDA-Gehalt im Stuhl:

Tab. 4.4: Faeces-MDA-Gehalt in Abhängigkeit der Saft-Interventionen (MW±SD). Die Daten wurden von PD Dr. med. (SU) Briviba (BFEL, Karlsruhe) für diese Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Faeces-MDA-Gehalt [nmol/g Stuhl]			
vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
11,9±1,9	12,4±2,5	11,3±2,5	12,5±3,2
n=6	n=5	n=5	n=6

Mit steigendem Wassergehalt im Stuhl schien der Faeces-MDA-Gehalt abzunehmen; es zeigte sich eine geringe tendenzielle Korrelation zwischen diesen beiden Parametern von $r=-0,35$ ($P=0,11$; siehe Tab. 7.7). Jedoch auch unter Berücksichtigung des Faeces-Wassergehaltes beeinflussten Tomaten- und Karottensaft-Konsum den Faeces-MDA-Gehalt nicht [Briviba *et al.* 2004].

4.5 Faeceswasser-Experimente

Die Behandlung von HT-29 Zellen mit steril-filtrierte Faeceswasser (FW) in Zellkulturexperimenten sollte Effekte von nicht bzw. nur teilweise resorbierbaren, insbesondere wasserlöslichen Substanzen erfassen, die in Gemüsesaft vorkommen bzw. *in vivo* z.B. durch die intestinale Mikroflora gebildet werden. Versuche mit unfiltrierten FW-Proben sollten Aufschluss über mögliche Effekte von Carotinoiden in Anwesenheit anderer luminaler Substanzen auf das Colonepithel geben.

4.5.1 Faeceswasser-pH-Wert

Durch die Karottensaft-Intervention wurde eine signifikante Erniedrigung des FW-pH-Wertes von $0,38 \pm 0,12$ von unfiltrierten FW-Proben im Vergleich zur jeweiligen vorausgegangenen Depletionsphase festgestellt. Tomatensaft-Konsum zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss:

Tab. 4.5: pH-Wert von unfiltriertem Faeceswasser in Abhängigkeit der Studienphasen (n=12). * = signifikanter Unterschied zur entsprechenden Depletionsphase direkt vor der Saft-Intervention mit $P \leq 0,05$.

Karottensaft		Tomatensaft	
vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
6,73±0,45	6,34±0,42*	6,76±0,47	6,67±0,41

4.5.2 Cytotoxizität

Nach 24h-Behandlung mit Faeceswasser war eine deutliche dosisabhängige Abnahme der Vitalität von HT-29 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Komplettmedium ohne weitere Zusätze) zu beobachten. Während die intraindividuellen Schwankungen hinsichtlich der cytotoxischen Wirkung von FW-Proben im Allgemeinen relativ gering waren, unterschied sich die generelle FW-Cytotoxizität verschiedener Probanden deutlich. Abb. 4.3 stellt repräsentativ am Beispiel der steril-filtrierte FW-Proben von zwei Probanden (gewonnen aus den Stuhlproben der verschiedenen Studienphasen) die Dosis-Wirkungsbeziehung dar.

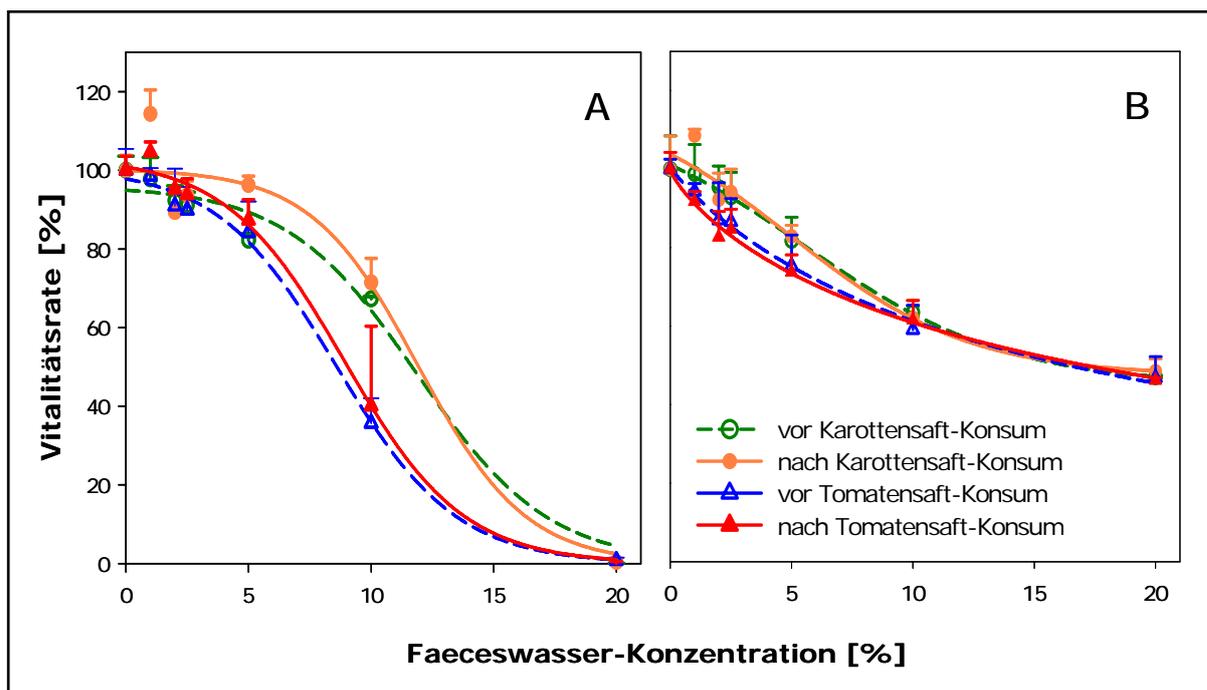


Abb. 4.3: Cytotoxischer, dosisabhängiger Effekt der FW-Proben von zwei repräsentativen Probanden in Abhängigkeit der Studienphasen. Die Daten sind in Form der Vitalitätsraten aus einem Experiment in Dreifachbestimmung (MW+SD) relativ zur unbehandelten Kontrolle (ausschließlich Komplettmedium, 100% Vitalität) dargestellt. Die zugehörigen nicht linearen Regressionskurven wurden aus allen Datenpunkten einer Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt und zur Berechnung von EC_{25} -Werten eingesetzt (siehe Abschnitt 3.7).

Während konfluente HT-29 Zellen nach der Behandlung mit FW-Proben von einigen Probanden vollständig zugrunde gingen (siehe Beispiel A, Abb. 4.3), nahm ihre Vitalität nach Inkubation mit weniger toxischen FW-Proben anderer Probanden (Beispiel B) auch bei einer FW-Konzentration von 20% (v/v in Komplettmedium) um maximal 50% ab. Um den Einfluss der Saft-Interventionen auf die FW-Cytotoxizität zu untersuchen, wurden daher für die statistische Auswertung EC_{25} -Werte herangezogen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 4.6: Cytotoxische Wirkung von steril-filtrierten FW-Proben auf HT-29 Zellen nach 24h-Inkubation in Abhängigkeit der Saft-Interventionen (MW±SD, * $P \leq 0,05$). Es sind ausschließlich die Messdaten aus Studienperiode I dargestellt, da in der Crossover-Analyse Periodeneffekte auftraten ($P=0,02$).

EC₂₅-Werte ¹ ([%], MW±SD)			
Karottensaft		Tomatensaft	
vor Saft-Konsum (D1)	nach Saft-Konsum (K11)	vor Saft-Konsum (D1)	nach Saft-Konsum (T11)
6,8±2,7	7,7±1,5	4,8±1,7	5,9±1,1*
n=6	n=5	n=6	n=6

¹ EC₂₅-Werte: Effektive FW-Konzentrationen (Verdünnung dargestellt als prozentualer Anteil von Faeceswasser in Kompletmedium) bei Reduktion der Vitalität um 25% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die Karottensaft-Intervention zeigte keine signifikante Veränderung hinsichtlich der FW-Cytotoxizität. Tomatensaft-Konsum führte dagegen zu einer signifikanten mittleren Zunahme des EC₂₅-Wertes von 1,0% im Vergleich zur vorausgegangenen Depletionsphase D1, gleichbedeutend mit einer Abnahme der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser. Dieser Effekt ist aber vernachlässigbar, da er innerhalb der Schwankungsbreite der individuellen EC₂₅-Werte liegt (bedingt durch die intra-individuellen Schwankungen der Vitalitätswerte im Testsystem, siehe Abb. 4.3).

Zur Erfassung von Carotinoid-Wirkungen in Kombination mit anderen luminalen Komponenten wurden von fünf Probanden exemplarisch auch unfiltrierte FW-Proben auf ihre cytotoxische Wirkung hin untersucht. Im Vergleich zu den steril-filtrierten Proben waren die unfiltrierten Proben toxischer (mittlerer EC₂₅-Wert und SD aller Proben 4,6±2,3%); Karotten- bzw. Tomatensaft-Konsum zeigte aber keinen signifikanten Einfluss auf die FW-Cytotoxizität (Messwerte siehe Tabellenanhang, Tab. 7.4).

4.5.3 Proliferation

Proliferationsmessungen wurden ebenfalls mit steril-filtrierten und unfiltrierten FW-Proben durchgeführt. Faeceswasser zeigte im Verlauf der Proliferationsmessungen eine starke dosisabhängige, antiproliferative Wirkung auf HT-29 Zellen, die am deutlichsten nach 5-Tage-Inkubation zu beobachten war. Diese Inkubationszeit diente daher zur Berechnung der IC₅₀-Werte (prozentuale FW-Konzentrationen bei 50% Wachstumshemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%)).

Im Gegensatz zu den Cytotoxizitätsmessungen waren anhand des Verlaufs der Dosis-Wirkungsbeziehung keine deutlichen Unterschiede in der proliferationshemmenden Wirkung von FW-Proben verschiedener Probanden erkennbar.

Abb. 4.4 zeigt die dosisabhängigen, antiproliferativen Effekte der FW-Proben eines repräsentativen Probanden in Abhängigkeit der Saft-Interventionen:

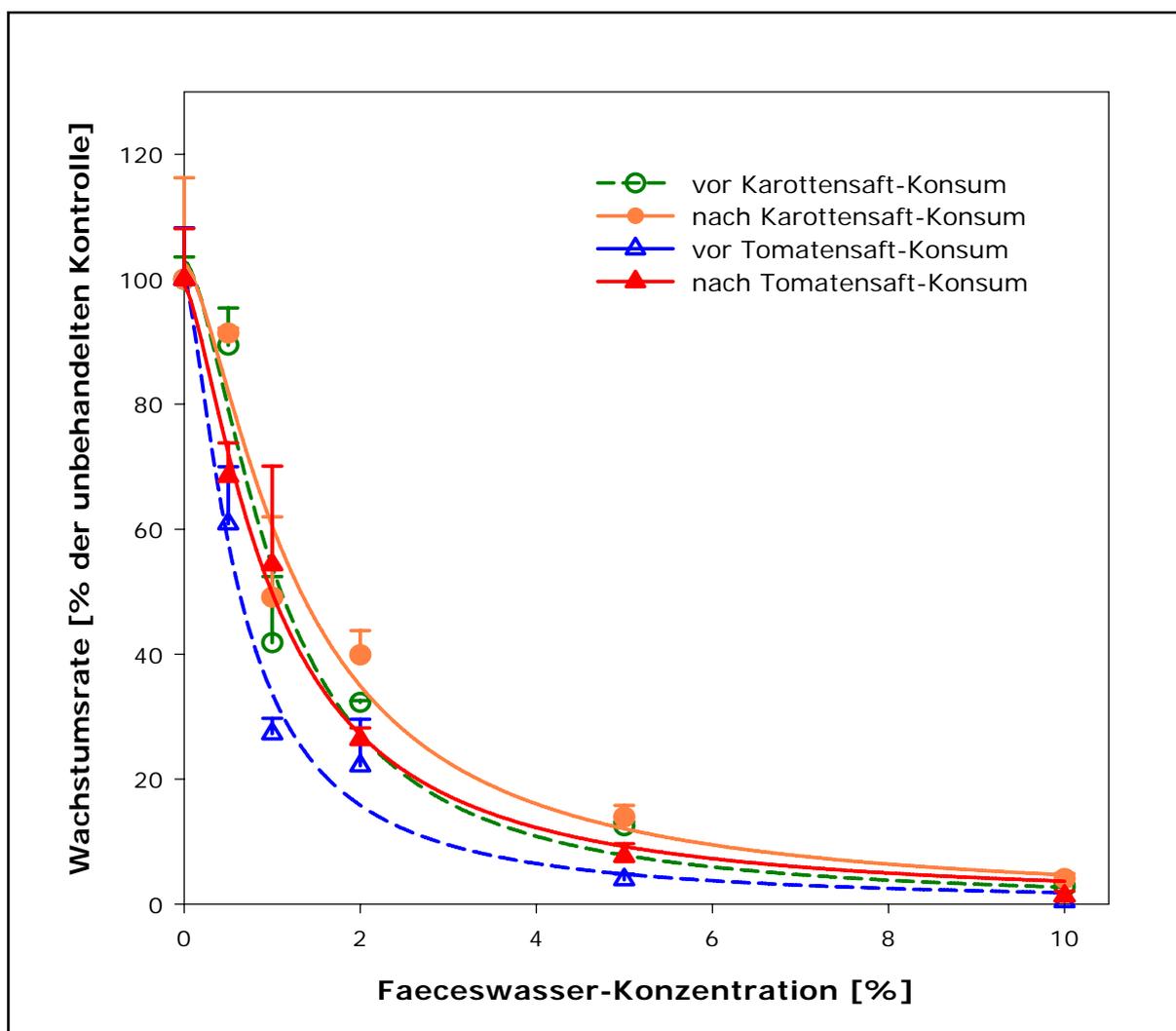


Abb. 4.4: Antiproliferative Wirkungen von FW-Proben eines repräsentativen Probanden auf HT-29 Zellen nach einer Inkubation von fünf Tagen (entsprechende cytotoxische FW-Wirkungen siehe Abb. 4.3B). Die Daten stellen die Wachstumsraten aus einem Experiment in Dreifachbestimmung (MW+SD) in Relation zur unbehandelten Kontrolle dar. Die abgebildeten nicht linearen Regressionskurven wurden aus allen Datenpunkten einer Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt und dienen zur Berechnung der IC_{50} -Werte.

Das Wachstum von HT-29 Zellen war nach Behandlung mit Faeceswasser stark gehemmt. Karotten- bzw. Tomatensaft-Konsum zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser im Vergleich zu den vorausgegangenen Depletionsphasen:

Tab. 4.7: Einfluss der Saft-Interventionen auf die antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte FW-Proben auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Saft-Interventionen (n=7).

IC₅₀-Werte ([%], MW±SD) nach 5-Tage-Inkubation mit FW			
Karottensaft		Tomatensaft	
vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
0,8±0,2	0,9±0,3	1,1±0,5	1,0±0,6

Auch bei unfiltrierten carotinoidhaltigen FW-Proben konnte kein signifikanter Effekt von Karotten- oder Tomatensaft-Konsum auf die proliferationshemmende FW-Wirkung beobachtet werden (Messwerte siehe Tab. 7.4).

4.5.4 Konzentrationen von Gallensäuren in steril-filtrierte Faeceswasser

Aufgrund der möglichen Bedeutung von Fett in der Colonicarcinogenese wird zunehmend auch die Wirkung von lipidlöslichen Substanzen aus dem intestinalen Lumen wie Gallensäuren untersucht. Von einem Teil der Gallensäuren (GS), insbesondere von LCA, ist eine cytotoxische Wirkung auf HT-29 Zellen bekannt [Latta *et al.* 1993]. In dieser Arbeit sollten daher FW-Proben auf ihre GS-Konzentrationen und ihr GS-Profil hin untersucht werden.

Karotten- und Tomatensaft-Konsum zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der erfassten Gallensäuren und das GS-Muster.

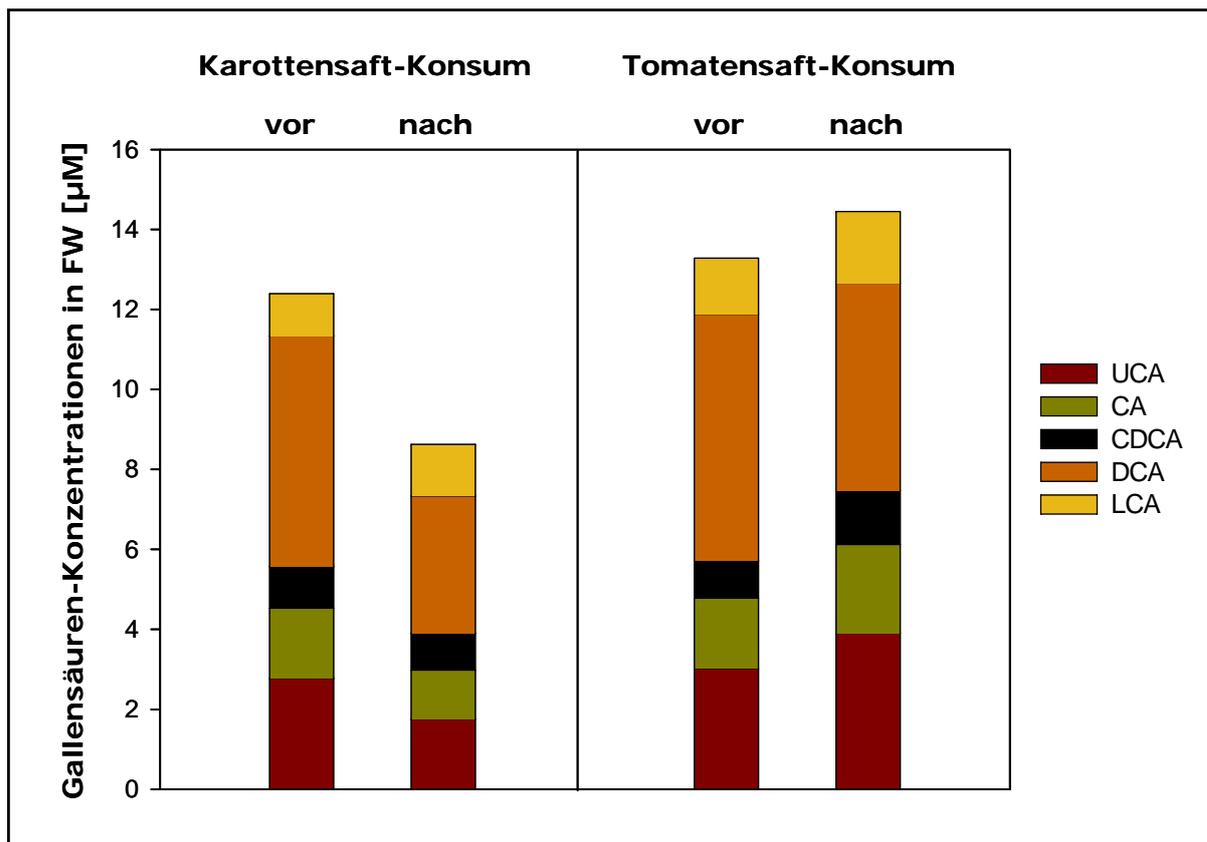


Abb. 4.5: Konzentrationen von Gallensäuren (Mittelwerte) in steril-filtrierte FW-Proben von acht Probanden in Abhängigkeit der Studienphasen. Messdaten \pm SD siehe Tab. 7.5.

Auch die Gesamt-Konzentration an Gallensäuren in steril-filtriertem Faeceswasser wurde durch die Saft-Interventionen nicht signifikant verändert (zugehörige Messdaten siehe Tab. 7.5).

Eine Korrelation zwischen der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser und der Konzentration der einzelnen Gallensäuren bzw. der Gesamt-GS-Konzentration - ungeachtet der Studienphasen - konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Mit steigendem Anteil der primären Gallensäuren (CA und CDCA) nahm jedoch die cytotoxische Wirkung (EC_{25} -Wert) von steril-filtriertem Faeceswasser ab ($r=0,61$; siehe Tab. 7.7). Die antiproliferative Wirkung von Faeceswasser wurde signifikant nur durch die FW-DCA-Konzentration beeinflusst. In diesem Fall war eine erhöhte DCA-Konzentration mit einer Abnahme der proliferationshemmenden Wirkung von Faeceswasser verbunden ($r=0,39$).

4.5.5 Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) in steril-filtrierte Faeceswasser

Weder Karottensaft- noch Tomatensaft-Konsum zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Butyrat sowie die Gesamt-Konzentration der drei untersuchten Fettsäuren in Faeceswasser:

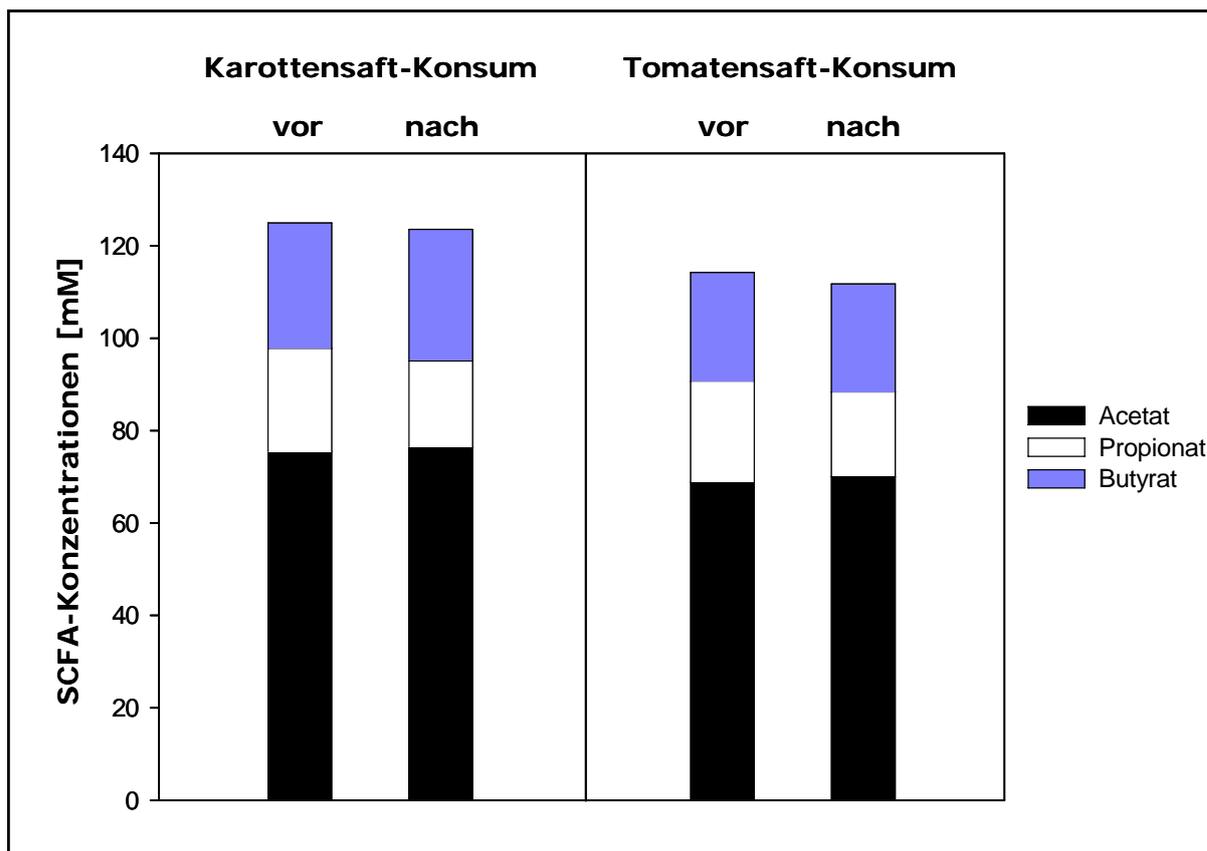


Abb. 4.6: Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren (Mittelwerte) in den steril-filtrierten FW-Proben von acht Probanden in Abhängigkeit der Studienphasen. Messdaten (MW±SD) finden sich in Tab. 7.6.

Die FW-Propionat-Konzentration war nach Tomatensaft-Konsum signifikant um durchschnittlich 3,6mM erniedrigt ($P=0,01$). Diese Konzentrationsabnahme ist jedoch vernachlässigbar, da sie im Bereich der intraindividuellen Schwankungsbreite der Propionat-Konzentrationen in den Auswaschphasen (D1-D3, Daten nicht gezeigt) liegt.

Die FW-Konzentrationen von Acetat und Butyrat waren signifikant negativ mit dem pH-Wert korreliert, wie die nächste Abbildung zeigt.

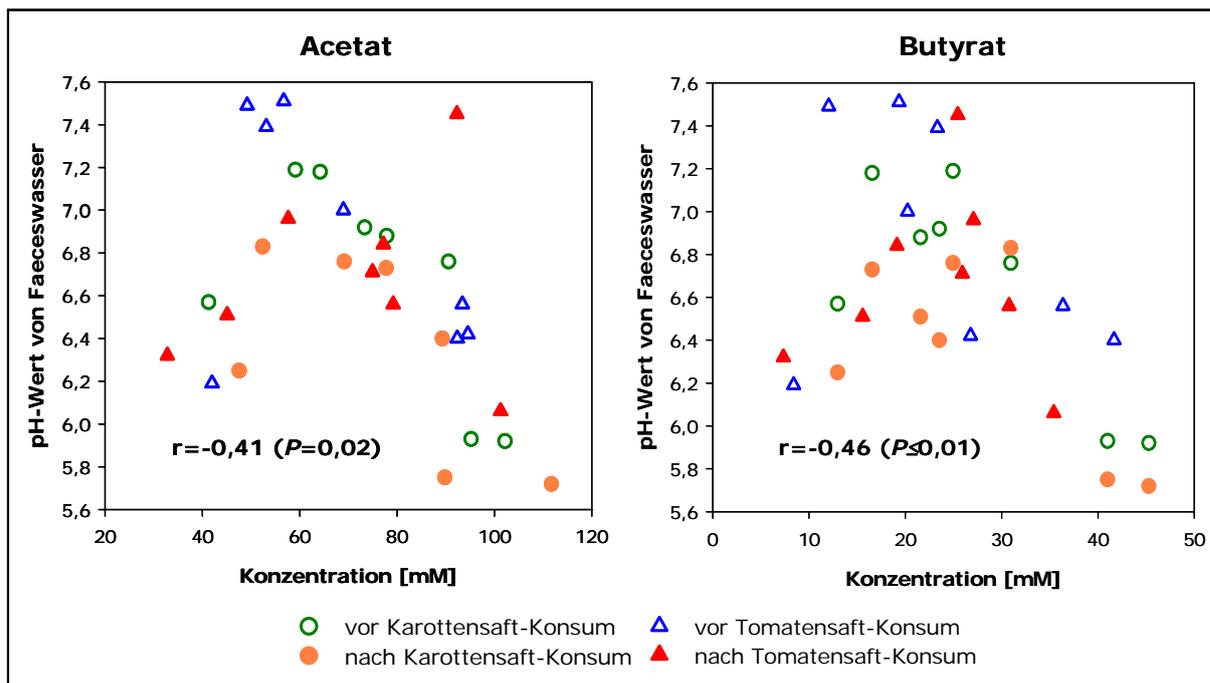


Abb. 4.7: Korrelationen zwischen Faeceswasser-pH und den Konzentrationen der beiden kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Butyrat. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte von acht Probanden. Die abgebildeten Korrelationskoeffizienten (r) beziehen sich auf alle Datenpunkte im jeweiligen Diagramm.

Eine erhöhte Acetat-, Propionat- und Butyrat-Konzentration war mit einer gesteigerten cytotoxischen Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser verbunden (Korrelationskoeffizienten siehe Tab. 7.7). Dagegen zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der Cytotoxizität von steril-filtriertem Faeceswasser und den Konzentrationen der drei untersuchten kurzkettigen Fettsäuren.

Eine erhöhte Propionat-Konzentration war signifikant mit einer verminderten antiproliferativen Wirkung von steril-filtriertem und unfiltriertem Faeceswasser verbunden. Dagegen schienen Acetat und Butyrat tendenziell die antiproliferative Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser zu erhöhen. Diese Effekte waren aber nicht signifikant (siehe Tab. 7.7).

4.5.6 β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität in un-filtriertem Faeceswasser

Karotten- und Tomatensaft-Konsum zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der bakteriellen Enzyme in den FW-Proben von sechs Probanden:

Tab. 4.8: Aktivität bakterieller Enzyme in Faeceswasser, bestimmt in Form des Substratumsatzes. Die Messdaten (MW \pm SD) sind in Abhängigkeit der Saft-Interventionen zusammengefasst dargestellt.

Enzym	Substratumsatz [mg Substrat/h*ml FW]			
	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
β -Glucosidase	1,0 \pm 0,8	1,2 \pm 0,6	1,0 \pm 0,4	1,3 \pm 0,7
β -Glucuronidase	0,5 \pm 0,6	0,5 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3

Es zeigte sich jedoch eine signifikante hohe Korrelation ($r=-0,62$) zwischen der β -Glucosidase-Aktivität und der antiproliferativen Wirkung (IC_{50}) von steril-filtriertem Faeceswasser.

4.5.7 Einflussfaktoren auf die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von steril-filtriertem Faeceswasser

Zusammenhänge zwischen der cytotoxischen und antiproliferativen Wirkung von steril-filtriertem Faeceswasser und den nachfolgend gemessenen Parametern, unabhängig von den Studienphasen, wurden zunächst über Korrelationen - wie in den vorherigen Abschnitten angegeben - zwischen je zwei Variablen untersucht. Zur Ermittlung der wichtigsten Einflussfaktoren und deren Wirkungszusammenhang dienten multiple lineare Regressionanalysen im schrittweisen Verfahren (Methode siehe 3.7). Die dadurch errechnete beste Kombination von erfassten Parametern zur Vorhersage der cytotoxischen bzw. proliferationshemmenden FW-Wirkung zeigt die nachfolgende Abbildung.

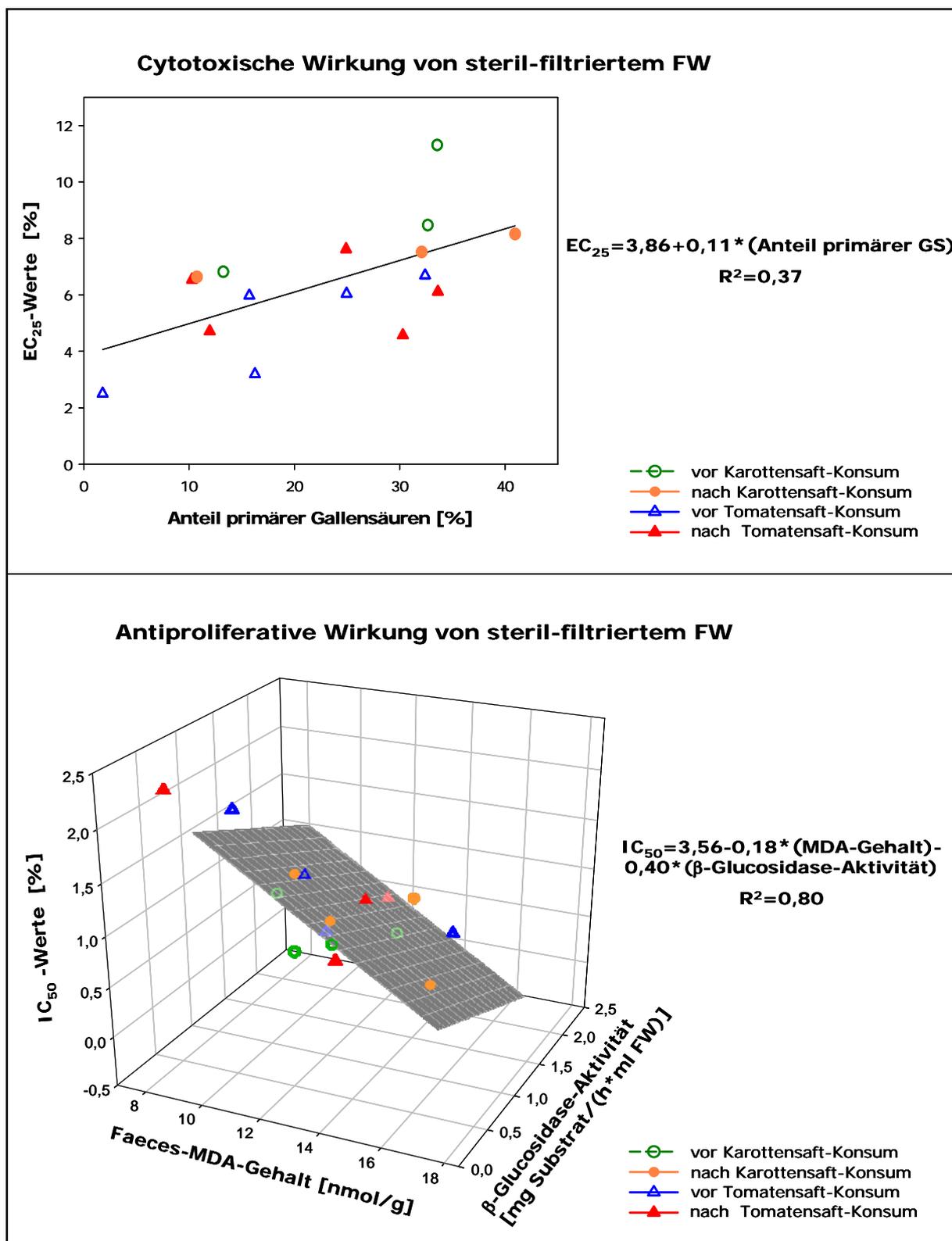


Abb. 4.8: Regressionsmodelle zur Bedeutung von Einflussfaktoren auf die cytotoxische (Daten aus Periode I, oberes Bild) und antiproliferative (unteres Bild) Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser. Dargestellt sind die einzelnen Messwerte von jeweils vier Probanden in Abhängigkeit der Studienphasen. Genauere Angaben zu den Regressionsmodellen siehe Tab. 7.8.

Die Regressionsanalyse zeigte, dass ein Teil der Varianz (37%) in der cytotoxischen Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser durch den Anteil primärer FW-Gallensäuren erklärt werden kann. Bei der proliferationshemmenden Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser kann 80% der Variation durch ein Regressionsmodell mit den Variablen Faeces-MDA-Gehalt und FW- β -Glucosidase-Aktivität erklärt werden.

4.6 Faeces-Lipidextrakte

Da lipidlösliche Komponenten aus dem Stuhl zum Teil in die wässrige Phase des Cololumen gelangen können, sollte ihr cytotoxisches Potenzial auf Colonicarcinomzellen untersucht werden. Die Extraktion von Faeces-Lipiden (beschrieben in Abschnitt 3.6.8) ermöglichte außerdem die Anreicherung von Lipiden, einschließlich der Carotinoide, die durch Saft-Konsum in den Darm gelangten.

4.6.1 Cytotoxische Wirkung von Faeces-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen

Als Maßeinheit für die cytotoxische Wirkung der Lipidextrakte wurden auch hier die EC_{25} -Werte herangezogen. Karotten- und Tomatensaft-Konsum erhöhten signifikant die Cytotoxizität der Lipidextrakte, gleichbedeutend mit einer Erniedrigung der EC_{25} -Werte:

Tab. 4.9: Cytotoxizität von Faeces-Lipidextrakten nach 24h-Inkubation in Abhängigkeit der Saft-Interventionen. * = signifikanter Unterschied zur vorausgegangenen Depletionsphase mit $P \leq 0,05$.

EC_{25}-Werte¹ ([%], MW\pmSD)			
Karottensaft		Tomatensaft	
vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
33,5 \pm 24,9	11,5 \pm 6,3*	29,8 \pm 26,1	10,7 \pm 7,0*
n=12	n=11	n=10 ²	n=12

¹ EC_{25} -Werte: Effektive Konzentrationen der Faeces-Lipidextrakte, angegeben als prozentualer Anteil der zunächst hergestellten Stammlösungen in Kompletmedium (siehe Abschnitt 3.6.8) bei einer Reduktion der Vitalität um 25% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

² Bei zwei Proben konnte kein EC_{25} -Wert bestimmt werden, da die Proben bei keiner der eingesetzten Verdünnungen toxisch waren.

Eine Korrelation zwischen den Faeces-Gehalten von α - und β -Carotin nach Karotensaft-Konsum und dem Ausmaß der cytotoxischen Effekte der Faeces-Lipidextrakte wurde nicht beobachtet. Auch ein Zusammenhang zwischen der Lipidextrakt-Cytotoxizität und dem Faeces-Lycopin-Gehalt nach Tomatensaft-Konsum konnte nicht festgestellt werden.

4.6.2 Durchflusscytometrische Analysen zur Wirkung von Faeces-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen

Zur Mechanismen-Aufklärung der zuvor beobachteten cytotoxischen Wirkung von Faeces-Lipidextrakten wurden die Apoptose- und Nekroseraten von HT-29 Zellen nach Lipidextrakt-Behandlung bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte entsprechend der Zelldichte aus dem Cytotoxizitätstest. Anhand mikroskopischer Beobachtungen stellte sich heraus, dass bereits nach sehr kurzer Zeit - in Abhängigkeit der eingesetzten Proben - die cytotoxische Wirkung der Extrakte eintrat und die HT-29 Zellen daraufhin außergewöhnlich schnell zugrunde gingen. Deshalb wurden kurze Inkubationszeiten von 2 und 5h gewählt. Die nächste Abbildung zeigt die zur Datenerhebung und -analyse verwendeten graphischen Darstellungen am Beispiel von unbehandelten Zellen, Zellen nach Apoptoseinduktion und mit Lipidextrakt-behandelten Zellen jeweils nach 2h-Inkubation.

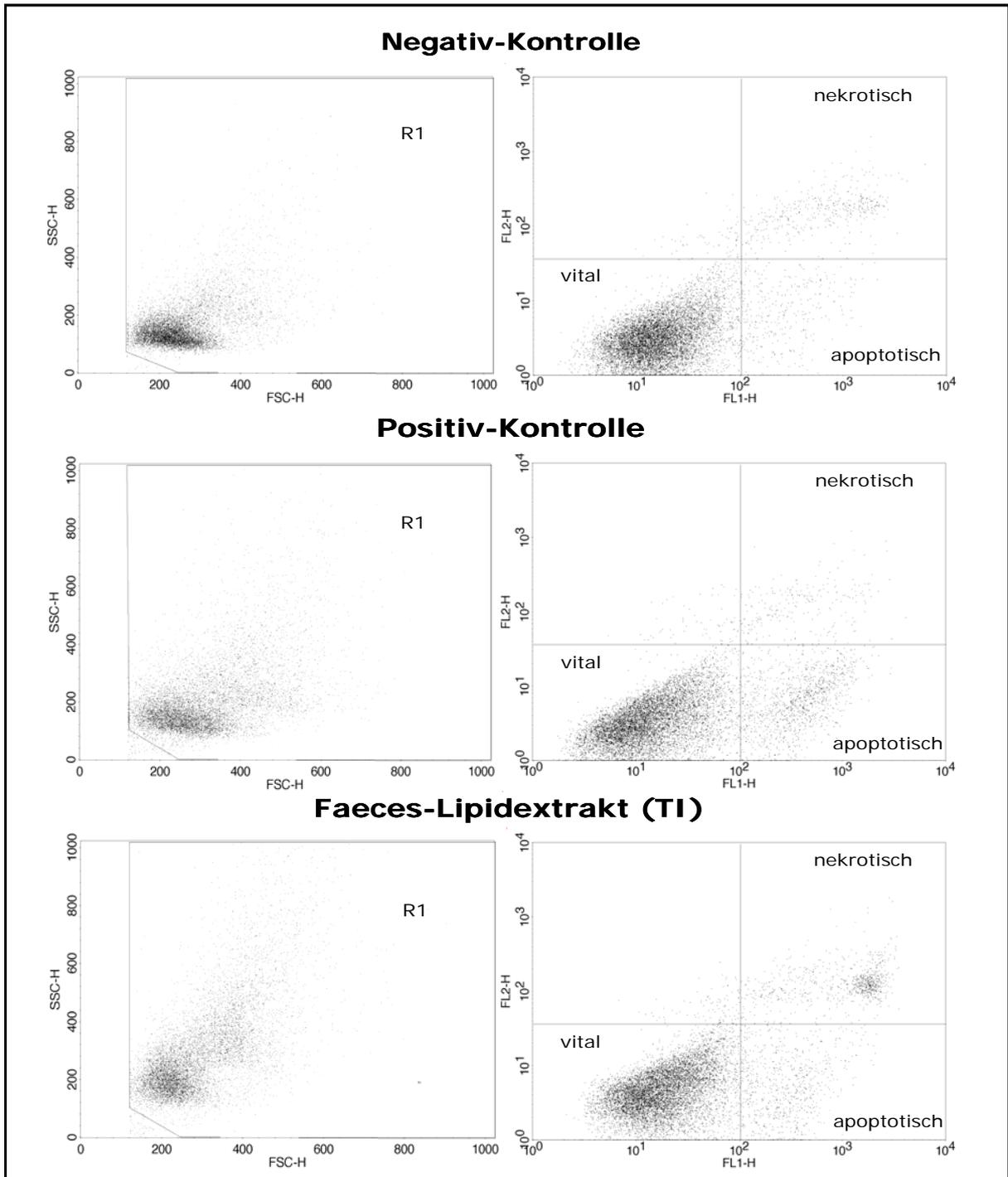


Abb. 4.9: Dot-Plots der durchflusscytometrischen Analyse von HT-29 Zellen nach 2h-Inkubation mit Komplettmedium (Negativ-Kontrolle), nach Induktion mit je 1,0 μM Staurosporin und Brefeldin A (Positiv-Kontrolle) und nach Behandlung mit dem Lipidextrakt einer Faeces-Probe der Tomatensaft-Intervention. Die Eingrenzung der für die statistische Auswertung relevanten Zellpopulation, d.h. der Ausschluss von Apoptosese Körperchen und Zelldebris wurde in den FSC/SSC-Dot-Plots (linke Bildhälfte) mit Hilfe eines Analysenfensters (Region R1) vorgenommen. In den FL1/FL2-Dot-Plots (rechte Bildhälfte, Gesamtpopulation aus R1) konnten vitale (FITC⁻/PI⁻), apoptotische (FITC⁺/PI⁻) und nekrotische Zellen (FITC⁺/PI⁺) durch Einsatz eines Quadrantenmarkers voneinander abgegrenzt und quantitativ erfasst werden.

Die 2- und 5h-Behandlung von HT-29 Zellen mit Faeces-Lipidextrakten aus den Depletions- und Interventionsphasen verursachte im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Nekroserate (Messwerte siehe Tab. 7.10). Faeces-Lipidextrakte aus der Tomatensaft-Intervention führten jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der Negativ- bzw. BHT-Kontrolle ($P \leq 0,05$; Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zur jeweiligen vorausgegangenen Depletionsphase erhöhte sich nach 2h-Inkubation die Apoptoserate durch Tomatensaft-Konsum signifikant um den Faktor 1,7; nach 5h-Inkubation verdoppelte sie sich (siehe Abb. 4.10). Karottensaft-Konsum hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose- und Nekroserate von HT-29 Zellen.

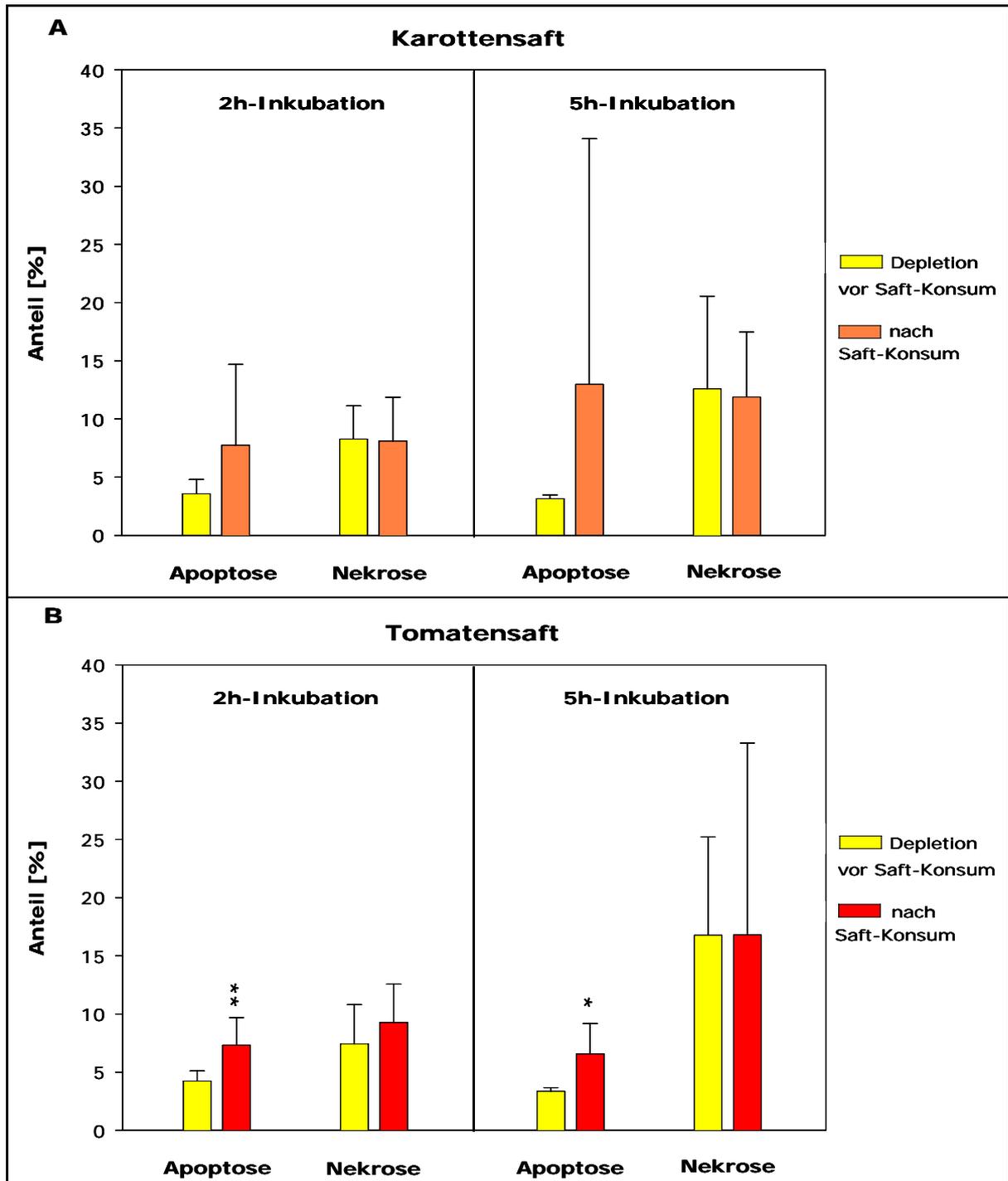


Abb. 4.10A/B: Apoptose- und Nekroserate [%] von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation mit Faeces-Lipidextrakten aus den Depletions- und nachfolgenden Saft-Interventionsphasen (MW±SD, n=6). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; zugehörige Messwerte siehe Tab. 7.10. Die 5h-Behandlung von HT-29 Zellen mit einem Faeces-Lipidextrakt aus der Karottensaft-Intervention führte zu einer Apoptoserate von 55,9% und bedingt die hohe SD in Abb. A. Die Nekroserate nach 5h-Inkubation mit Faeces-Lipidextrakten der Tomatensaft-Intervention unterlag hohen interindividuellen Schwankungen (siehe SD Abb.B), möglicherweise bedingt durch die unterschiedlich schnell eintretende Wirkung der Lipidextrakte und daraus resultierende zeitliche Unterschiede im Auftreten von Sekundärnekrose.

4.7 Alternatives Faeceswasser-Modell

Zwischen der cytotoxischen und antiproliferativen Wirkung der FW-Proben aus der direkten FW-Gewinnung (siehe Abschnitt 3.6.4) und der Wirkung der FW-M-Proben des alternativen FW-Modells (siehe 3.6.10) bestand ein deutlicher Zusammenhang:

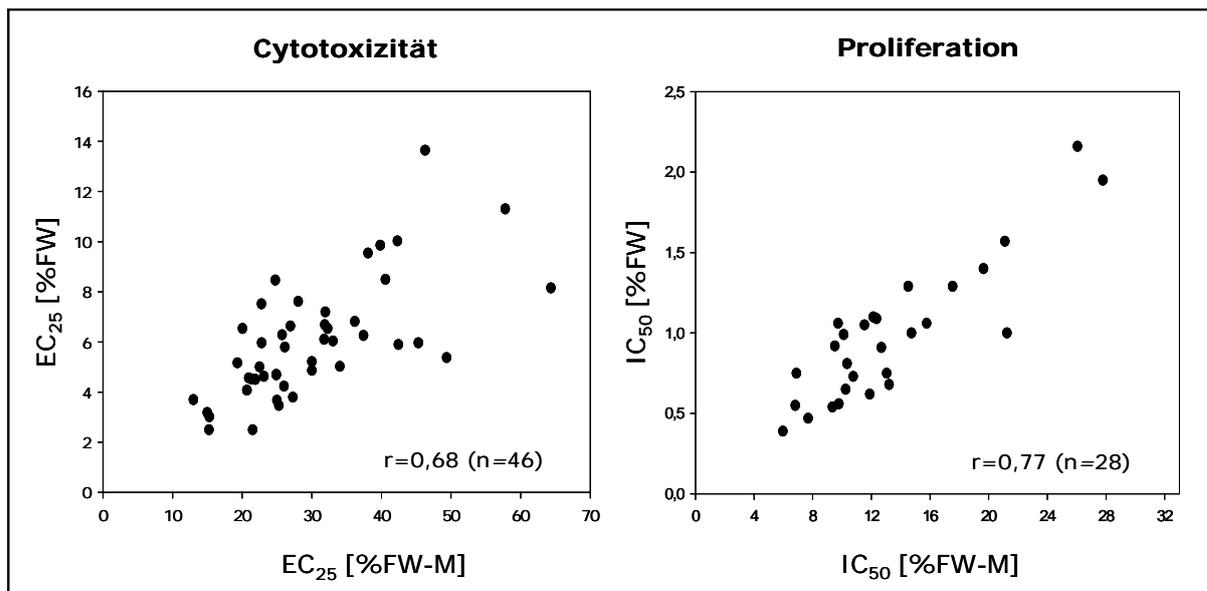


Abb. 4.11: Signifikante Korrelationen zwischen den EC₂₅- und IC₅₀-Werten von Faeceswasser und Faeceswasser-Medium ($P < 0,001$).

Wie bei Faeceswasser beeinflussten weder Karotten- noch Tomatensaft-Konsum signifikant die proliferationshemmende Wirkung von FW-Medium. Die Karottensaft-Intervention zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf die Cytotoxizität von FW-Medium.

Tab. 4.10: Cytotoxische und antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte FW-M-Proben auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Saft-Interventionen, dargestellt in Form der mittleren EC_{25} - bzw. IC_{50} -Werte [%FW-M in Kompletmedium] \pm SD. * $P \leq 0,05$ im Vergleich zur vorausgegangenen Depletionsphase.

FW-M-Parameter	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
Cytotoxizität (EC_{25} -Werte, n=12)	31,2 \pm 12,7	30,4 \pm 13,4	31,6 \pm 10,4	25,1 \pm 5,6*
Proliferationshemmung (IC_{50} -Werte, n=7)	5,7 \pm 2,5	6,1 \pm 1,6	7,4 \pm 3,5	7,4 \pm 3,3

Die Tomatensaft-Intervention führte dagegen zu einer signifikanten Erhöhung der cytotoxischen Wirkung von FW-Medium mit einer mittleren Abnahme der EC_{25} -Werte um 9,0%. Dieser Effekt ist jedoch zu vernachlässigen, da er innerhalb der Schwankungsbreite der individuellen EC_{25} -Werte liegt (bedingt durch die intraindividuellen Schwankungen der Vitalitätswerte im Testsystem).

5 DISKUSSION

Ernährungsfaktoren können die Entstehung eines Tumors, wie in Abschnitt 2.1.2ff beschrieben, maßgeblich beeinflussen. Toxische bzw. potenziell carcinogene Substanzen können im Colon aktiviert oder gebildet werden. Sie können das Colon auch direkt über den Chymus oder über den enterohepatischen Kreislauf nach Resorption im Magen und Dünndarm und Metabolisierung durch Leberenzyme erreichen. In Abhängigkeit der Stuhltransitzeit können Substanzen im Colon verbleiben und über mehrere Stunden auf die Epithelzellen einwirken. Da die Stuhltransitzeit relativ lang sein kann, sind diese Zellen einer besonderen Expositionssituation ausgesetzt. Eine nicht invasive Möglichkeit zur Beurteilung von protektiven und Risikofaktoren der Colonicarcinogenese stellt die Sammlung und Analyse von Faeces dar.

5.1 Faeces-Analysen

5.1.1 Allgemeine Faeces-Parameter

Stuhl besteht nach der intestinalen Darmassage trotz intensiver Wasserrückresorption im Dickdarm zum Großteil aus Wasser, wobei der Stuhl-Wassergehalt sowohl inter- als auch intraindividuell beträchtlich variieren kann. Die Faeces-Trockensubstanz kann bis zu 55% aus Bakterien bestehen [Stephen und Cummings 1980]. Die individuelle Zusammensetzung des Stuhls wird durch die aufgenommene Nahrung, die Verdauungskapazität, die Mikroflora und die intestinale Transitzeit bestimmt. Ein hohes Stuhlgewicht wird mit einem niedrigeren colorectalen Krebsrisiko assoziiert [Cummings *et al.* 1992], vermutlich aufgrund eines Verdünnungseffektes, der den Kontakt zwischen der Colonmucosa und carcinogenen Substanzen vermindert. Aufgrund der täglichen Variation der Defäkation (Stuhlentleerung) wurde für diese Arbeit zur Verringerung der intraindividuellen Variabilität von den Probanden am Ende jeder Interventionsphase 48h-Stuhl gesammelt. Die Unterschiede im Wassergehalt der Stuhlproben verschiedener Probanden waren bei der kontrollierten einheitlichen Diät während der Stuhlsammelperioden relativ gering. Dies stellt einen Hinweis auf eine physiologisch intakte Wasserrückresorption im Dickdarm der untersuchten Probanden dar. Im Mittel lag der Stuhl-Wassergehalt bei $74\pm 6\%$, er ging nach Karottensaft-Konsum leicht um 4% zurück. Dagegen wurde das Stuhlgewicht nicht signifikant durch die Saft-Interventionen beeinflusst und unterlag im Vergleich zum Stuhl-Wassergehalt - trotz gleicher kontrollierter Diät - erheblich größeren Schwankungen ($471\pm 202\text{g}$), sowohl inter- als auch intra-individuell (Daten nicht gezeigt).

Zwischen den Parametern Stuhlgewicht und -Wassergehalt bestand eine signifikante mittlere Korrelation von 0,41. Veränderungen im Stuhlgewicht könnten durch Unterschiede in der Flüssigkeitszufuhr, die im Rahmen der Interventionsstudie nicht erfasst wurde, bedingt sein. Aber auch Änderungen in der Bakterienmasse könnten für Schwankungen im Stuhlgewicht verantwortlich sein bzw. auch die beobachtete Änderung im Stuhl-Wassergehalt nach Karottensaft-Konsum erklären.

5.1.2 Carotinoid-Gehalte in Faeces und Faeceswasser

Die Carotinoide aus Karotten- und Tomatensaft schienen für die Probanden gut verfügbar zu sein, was sich in einem deutlichen Anstieg der Carotinoid-Plasmakonzentrationen zeigte. So stieg z.B. nach der ersten Saft-Intervention bei ansonsten carotinoidarmer Ernährung der mittlere Plasmaspiegel von α - bzw. β -Carotin durch Karottensaft-Konsum im Vergleich zur vorausgegangenen Depletionsphase (0,06 bzw. 0,27 $\mu\text{mol/l}$) signifikant auf 0,61 bzw. 1,18 $\mu\text{mol/l}$ an. Der mittlere Plasma-Lycopinspiegel erhöhte sich signifikant von 0,21 $\mu\text{mol/l}$ nach der ersten Depletionsphase auf 0,52 $\mu\text{mol/l}$ nach der ersten Tomatensaft-Intervention [Watzl *et al.* 2003]. Zur Erfassung physiologisch erreichbarer Carotinoid-Konzentrationen im Dickdarm nach Karotten- und Tomatensaft-Konsum wurden die Carotinoid-Gehalte in Faeces bzw. in einigen unfiltrierten FW-Proben bestimmt. Dabei zeigte die HPLC-Analyse, dass Karotten- bzw. Tomatensaft-Konsum zu physiologisch hohen Konzentrationen der Carotinoide α -, β -Carotin und Lycopin im Stuhl führen kann. Diese Carotinoide sind möglicherweise für Colonepithelzellen verfügbar, da sie auch in den analysierten FW-Proben nach entsprechendem Saft-Konsum hohe Konzentrationen von bis zu 67 μM β -Carotin und bis zu 147 μM Lycopin erreichten. Dabei zeigte sich sowohl für β -Carotin als auch für Lycopin eine deutliche Korrelation zwischen der FW-Konzentration und dem Faeces-Gehalt dieser Carotinoide ($r_{\beta\text{-Carotin}}=0,95$ und $r_{\text{Lycopin}}=0,93$; siehe Tab. 7.7). In Faeceswasser scheinen die Carotinoide an größere Partikel (Durchmesser 0,65–5,0 μm) gebunden zu sein, da z.B. β -Carotin und Lycopin während der schrittweisen Filtration (beschrieben in Abschnitt 3.6.4) in Filtern mit einer Porengröße von 0,65 μm zurückgehalten wurden.

Hohe Schwankungen im Carotinoid-Faecesgehalt von Proben verschiedener Probanden beruhen möglicherweise auf interindividuellen Unterschieden in der Resorption von Carotinoiden. Es zeigte sich eine tendenzielle Korrelation von 0,54 ($P=0,07$) zwischen dem Faeces- β -Carotin- und -Lycopin-Gehalt nach entsprechendem Saft-Konsum. Das Verhältnis von β -Carotin zu α -Carotin in den Stuhlproben aus der Karottensaft-Intervention lag durchschnittlich bei 2,4($\pm 0,4$):1 und entsprach damit weitestgehend dem Verhältnis der beiden Carotinoide von 2,3($\pm 0,02$):1 im für die Interventionen eingesetzten Karottensaft.

Während in Pflanzen Carotinoide vor allem als all-*trans*-Isomere vorliegen, können in verarbeiteten Lebensmitteln und in menschlichen Geweben verschiedene *cis*-Isomere von β -Carotin und Lycopin nachgewiesen werden. Eine *trans-cis*-Isomerisierung von Carotinoiden wird beispielsweise durch Säuren, Hitzebehandlung, reaktive Sauerstoffspezies und Lichtexposition gefördert [Rodriguez-Amaya 1999]. In dem hier verwendeten Karottensaft¹⁸ lag der prozentuale Anteil von all-*trans*- β -Carotin durchschnittlich bei 87%; bei Tomatensaft¹⁸ betrug der all-*trans*-Lycopin-Anteil 82%. In den Plasma-Proben aus der Karottensaft-Intervention wurde im Vergleich zu den Saft- bzw. Faeces-Proben keine signifikante Veränderung des all-*trans*- β -Carotin-Anteils beobachtet (Daten siehe Tab. 7.2). Dagegen zeigten die Plasma-Proben der Tomatensaft-Intervention im Vergleich zu Saft- und Faeces-Proben eine deutliche Verschiebung zugunsten der Lycopin-*cis*-Isomere (Daten siehe Tab. 7.2) und entsprachen mit einem *cis*-Isomeren-Anteil von $63 \pm 12\%$ den Angaben aus der Literatur [Clinton *et al.* 1996, Stahl *et al.* 1992].

Während die Probanden unter carotinoidarmer Ernährung durch Karotten- und Tomatensaft-Konsum mit Lycopin (aus Tomatensaft) und α - bzw. β -Carotin (aus Karottensaft) versorgt waren, konnte der Konsum dieser beiden Säfte die Aufnahme anderer Carotinoide wie Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin aus Obst und Gemüse nicht ersetzen. Die β -Cryptoxanthin-Konzentration im Plasma nahm nach der ersten Saft-Intervention sogar weiter ab [Watzl *et al.* 2003]. Nach Karottensaft-Konsum lag der β -Cryptoxanthin-Gehalt im Stuhl unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Tab. 7.1), der Faeces-Zeaxanthin-Gehalt nahm während der Tomatensaft-Intervention ebenfalls aufgrund der niedrigen Zufuhr dieses Carotinoids signifikant ab.

5.1.3 Stabilität von Faeces- und Faeceswasser-Carotinoiden

Durch Lagerung der Faeces-Proben bei -80°C waren die Faeces-Carotinoide β -Carotin und Lycopin über den gesamten erfassten Zeitraum stabil; auch das all-*trans/cis*-Isomerenverhältnis veränderte sich bei beiden Carotinoiden nicht (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte der Zusatz des Antioxidans BHT keine Auswirkungen auf die Stabilität der Carotinoide. Die FW-Carotinoid-Konzentration nahm während der 8-monatigen Lagerung bei -80°C ebenfalls nicht ab. *In vitro* sind Carotinoide in wässrigem Medium in Abhängigkeit des eingesetzten Trägers nur über einen begrenzten Zeitraum stabil [Williams *et al.* 2000]. In Vorversuchen wurde bei 37°C keine Veränderung in der Konzentration von β -Carotin und Lycopin in Faeceswasser, selbst über einen langen Zeitraum von

¹⁸ Erhitzung der Säfte auf 105°C ca. 30-45s lang (Angaben des Herstellers Schoenenberger, Magstadt).

fünf Tagen, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die antioxidative Kapazität von Faeces bzw. Faeceswasser scheint somit relativ hoch zu sein.

5.1.4 Faeces-Malondialdehyd (MDA)-Gehalt

Protektive Wirkungen von Carotinoiden werden häufig mit ihren antioxidativen Eigenschaften in Verbindung gebracht (siehe 2.4.4ff). In multilamellaren Liposomen zeigte Lycopin *in vitro* die stärkste antioxidative Wirkung, gefolgt von α -Carotin, β -Cryptoxanthin, β -Carotin/Zeaxanthin und Lutein. Carotinoid-Gemische zeigten synergistische Effekte. Lycopin und Lutein stellten das effizienteste Carotinoid-Gemisch gegen induzierte Lipidperoxidation dar [Stahl *et al.* 1998]. Über antioxidative Wirkungen von Carotinoiden *in vivo*, insbesondere im Gastrointestinaltrakt, ist jedoch nur wenig bekannt. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie Kupfer- und Eisenionen könnten eine Rolle in der Colonicarcinogenese spielen, da sie die Lipidperoxidation induzieren und zu schweren DNA-Schäden führen können [Briviba *et al.* 2004]. Menschliche Colonadenocarcinomzellen (Caco-2) zeigten außerdem eine niedrigere Superoxiddismutase- und Catalase-Aktivität als normale Colonepithelzellen [Grisham *et al.* 1990]. MDA-Konzentrationen waren in Dickdarmtumorgewebe im Vergleich zu makroskopisch normalem Gewebe ebenfalls erhöht [Otamiri und Sjodahl 1989].

Malondialdehyd stellt ein Endprodukt der Lipidperoxidation dar und wird daher als Marker für die Lipidperoxidation bzw. für die Bildung von den oben aufgeführten reaktiven Verbindungen *in vivo* eingesetzt [Briviba *et al.* 2004]. Malondialdehyd kann promutagene exocyclische DNA-Addukte in menschlichen Zellen bilden und damit zur Krebsentwicklung beitragen [Bartsch *et al.* 1999].

Eine carotinoidarme Ernährung führte bei Frauen zu einem Anstieg im Plasma-MDA-Spiegel, der durch Supplementierung mit einem Carotinoid-Gemisch aufgehoben werden konnte [Dixon *et al.* 1998]. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss von Karotten- und Tomatensaft-Konsum auf den MDA-Gehalt im Stuhl. Auch der Plasma-MDA-Spiegel konnte durch die beiden Säfte nicht verändert werden [Briviba *et al.* 2004].

Neben der Lipidperoxidation finden auch andere Oxidationsprozesse im menschlichen Organismus statt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Karotten- und Tomatensaft-Konsum auf andere Oxidationsprozesse als die Lipidperoxidation Einfluss nehmen kann [Briviba *et al.* 2004].

5.2 Faeceswasser-Untersuchungen

Faeceswasser wird als die Faeces-Fraktion mit direktem Kontakt zum Colon-epithel angesehen, da freie reaktive und lösliche Komponenten vermutlich effektiver auf Epithelzellen einwirken können als Substanzen, die an Nahrungsreste oder die Bakterienmasse gebunden sind [Haza *et al.* 2000].

5.2.1 Cytotoxische Wirkung von Faeceswasser

Es wird vermutet, dass die cytotoxische Wirkung luminaler Komponenten zum Verlust von Epithelzellen im Dickdarm und infolgedessen zu einer kompensatorisch gesteigerten Zellproliferation führt, die mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von Colonkrebs in Verbindung gebracht wird [Gill und Rowland 2002].

Zur Untersuchung von Faeceswasser im Zellkultursystem werden die Proben üblicherweise durch Filter mit 0,45µm oft auch mit 0,2µm Porengröße vorfiltriert [De Kok *et al.* 1999, Haza *et al.* 2000, Jenner *et al.* 2005, Rafter *et al.* 1987, van Munster *et al.* 1993]. In Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur [Glinghammar *et al.* 1999] wiesen die in dieser Arbeit untersuchten FW-Proben dosisabhängig deutliche cytotoxische Effekte bei konfluenten HT-29 Zellen auf. Dabei zeigten sich merkliche Unterschiede zwischen steril-filtrierte und unfiltrierten FW-Proben hinsichtlich ihrer Wirkung. Unfiltrierte Proben waren im Vergleich zu den steril-filtrierte Proben stärker cytotoxisch. Möglicherweise ist im Faeceswasser ein Teil der toxisch wirksamen Substanzen in Partikeln gebunden, die über die Filtration durch 0,22µm-Filter entfernt wurden. Eine Korrelation zwischen den EC₂₅-Werten von filtrierte und unfiltrierten FW-Proben konnte nicht beobachtet werden. Unabhängig von der Filtration wurden jedoch die cytotoxischen Eigenschaften von Faeceswasser durch Karottensaft- bzw. Tomatensaft-Konsum nicht bzw. kaum beeinflusst. Ob die FW-Carotinoide, die in Partikeln mit einem Durchmesser von 0,65-5,0µm vorlagen, durch Colonocyten aufgenommen werden konnten, ist unklar. Aus Emulsionen (Durchmesser 0,3-1,0µm) können HT-29 Zellen Carotinoide aufnehmen [Ax *et al.* 2001].

Unterschiede in der Wirkung der FW-Proben auf HT-29 Zellen können nicht auf Verdünnungseffekte zurückgeführt werden, da keine signifikanten Korrelationen zwischen der cytotoxischen Wirkung von steril- bzw. unfiltrierten Proben und dem Faeces-Wassergehalt beobachtet werden konnten. Der Einfluss der Saft-Interventionen war darüber hinaus unabhängig von der FW-Cytotoxizität, d.h. zwischen stark toxischen und weniger toxischen FW-Proben der verschiedenen

Probanden bestand hinsichtlich der Saftwirkung kein Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Konfluente HT-29 Zellen zeigten in einer zuvor durchgeführten Studie eine geringe, signifikant erniedrigte Vitalitätsrate um 11% nach 24h-Behandlung mit 30 μ M β -Carotin, vorgelöst in Tetrahydrofuran [Briviba *et al.* 2001]. In der hier untersuchten Interventionsstudie stieg nach Karottensaft-Konsum (27,1mg β -Carotin pro 330ml) die β -Carotin-Konzentration in unfiltriertem Faeceswasser auf deutlich höhere Werte von bis zu 67 μ M an, was auch für eine potenzielle cytotoxische Wirkung von β -Carotin im Lumen spricht. Die meisten FW-Proben aus den Depletionsphasen mit nicht cytotoxisch wirksamen β -Carotin-Konzentrationen von $\leq 0,2\mu$ M zeigten jedoch eine um mindestens 20-fach höhere cytotoxische Wirkung als 30 μ M β -Carotin (siehe Briviba *et al.* 2001). Darüber hinaus konnte nach Karottensaft-Konsum kein Anstieg in der cytotoxischen Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser beobachtet werden. Isoliertes Lycopin zeigte auf konfluente HT-29 Zellen keine höhere Cytotoxizität als β -Carotin (unveröffentlichte Daten von PD Dr. med. (SU) Briviba). Nach Tomatensaft-Konsum zeigte sich auch keine Erhöhung der cytotoxischen Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser. Dies war unter anderem vermutlich dadurch bedingt, dass nach der erforderlichen Verdünnung von Faeceswasser die Carotinoide nur in geringer Konzentration vorlagen. Somit scheinen andere luminale Komponenten eine stärkere Toxizität als die Carotinoide aufzuweisen und für die hohen cytotoxischen Effekte von Faeceswasser auf HT-29 Zellen verantwortlich zu sein.

Faeceswasser kann in HT-29 Zellen Apoptose induzieren [Haza *et al.* 2000]. Anhand von FW-Proben eines Probanden wurde auch in dieser Arbeit in einem Vorversuch der der cytotoxischen Wirkung zugrunde liegende Zelltodmechanismus untersucht. Nach 17h-Inkubation mit FW-Proben in einer Konzentration von 5% in Kompletmedium zeigten HT-29 Zellen eine erhöhte Apoptoserate von durchschnittlich 40% (ermittelt mittels Annexin-Methode siehe 3.6.9.2, Daten nicht gezeigt). Da weder Karotten- noch Tomatensaft-Konsum einen merklichen Einfluss auf die FW-Cytotoxizität hatten, wurde diese Untersuchung nicht weiter verfolgt.

Trotz identischer Diät zwei Tage vor und während der Stuhlsammelperiode in den jeweiligen Studienphasen (siehe 3.6.1) wurden starke Unterschiede in der cytotoxischen Wirkung von FW-Proben verschiedener Probanden beobachtet. Im Vergleich dazu waren die intraindividuellen Schwankungen bezüglich der FW-Cytotoxizität von Proben der einzelnen Probanden deutlich geringer (Daten nicht gezeigt). Große interindividuelle Abweichungen in der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser beruhen vermutlich auf Unterschieden in der Mikroflora und deren Stoffwechselprodukten.

Aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs der Dosis-Wirkungsbeziehung einzelner FW-Proben (siehe Abb. 4.3) scheint es besonders wichtig zu sein, die cytotoxische Wirkung von mehreren FW-Verdünnungen zu messen, um Einflüsse einer Ernährungsmodifikation auf die FW-Cytotoxizität erfassen zu können.

In vivo sind die intrazellulären Konzentrationen von luminalen Komponenten in den Epithelzellen aufgrund der schützenden Mucusschicht und der Exkretion oder Exocytose von Substanzen wie Gallensäuren in die enterohepatische Zirkulation vermutlich niedriger als im Lumen. Um z.B. die in der Zellkultur beobachteten Effekte von DCA auf Colonocyten *in vivo* reproduzieren zu können, muss im Tiermodell das Colon mit 10-100-fach höheren Konzentrationen perfundiert werden [Glinghammar *et al.* 1999]. Daher müssen bei Kultivierung von Zellen in normalen Zellkulturplatten FW-Proben für *In-vitro*-Untersuchungen entsprechend verdünnt werden. Dennoch stellt die Messung der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser *in vitro* eine relativ häufig angewendete, nicht invasive Methode zur Erfassung des colorectalen Krebsrisikos beim Menschen dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit, z.B. im Hinblick auf den Einfluss der Filtration auf die cytotoxische FW-Wirkung, machen jedoch deutlich, dass weitere Untersuchungen zur Validierung der FW-Cytotoxizität als Biomarker nötig sind.

5.2.2 Antiproliferative Wirkung von Faeceswasser

Veränderungen in der proliferativen Aktivität des Colonepithels spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Colonkrebs (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Wirkung von Substanzen auf Colonicarcinomzellen *in vitro* liefert daher erste Hinweise auf ihre mögliche Bedeutung *in vivo*. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsmessungen starben die Zellen durch fünftägige Behandlung mit 10% Faeceswasser ((v/v) in Komplettmedium), unabhängig von der FW-Probe vollständig ab. Die proliferationshemmende FW-Wirkung war bereits nach 24h-Behandlung sichtbar und nahm mit zunehmender Inkubationszeit deutlich zu. Der vergleichsweise lange Versuchszeitraum wurde aufgrund der Verdopplungszeit von 40-60h bei HT-29 Zellen gewählt. In einer früheren Studie von Briviba *et al.* wurde nach fünftägiger Behandlung bei gleicher Zelldichte ein starker proliferationshemmender Effekt von isoliertem β -Carotin (IC_{50} bei 11-16 μ M) auf HT-29 Zellen beobachtet [Briviba *et al.* 2001]. Lycopin hemmte bei Brust-, Lungen- und Endometriumkrebszellen *in vitro* die Zellproliferation mit IC_{50} -Werten von 1-2 μ M und zeigte damit eine noch stärkere antiproliferative Wirkung als β -Carotin [Levy *et al.* 1995]. Daher wurde in dieser Arbeit ein Einfluss der Saft-Interventionen auf das Wachstum von mit Faeceswasser behandelten HT-29 Zellen erwartet. Die antiproliferativen Effekte von unfiltrierten FW-Proben wurden jedoch weder durch Karotten- noch durch Tomatensaft-Konsum signifikant modifiziert. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die allgemein hohe antiproliferative Wirkung von

FW-Proben aus allen Studienphasen, auch denen ohne Konsum der carotinoidhaltigen Säfte bzw. von steril-filtrierte FW-Proben sein. Für eine Wachstumshemmung von 50% mussten die FW-Proben um etwa 1:100 verdünnt werden, auch wenn sie keine Carotinoide enthielten (siehe Tab. 4.7 und Tab. 7.4). Unter Umständen konnten daher mögliche, aber relativ geringe Carotinoid-Effekte in dem in dieser Arbeit verwendeten Testsystem nicht detektiert werden. Andere lumina- le Substanzen scheinen auch hier einen größeren Einfluss auf HT-29 hinsichtlich der Zellproliferation zu haben.

Mit steigendem Faeces-MDA-Gehalt nahm die antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser deutlich signifikant zu ($r=-0,63$). Verdünnungseffekte könnten bei den Proliferationsmessungen ebenfalls eine Rolle zu spielen; es zeigte sich eine tendenzielle mäßige Korrelation von 0,40 ($P=0,16$) zwischen dem Faeces-Wassergehalt und dem IC_{50} -Wert der steril-filtrierte FW-Proben. Bei den unfiltrierten Proben zeigten sich dagegen keine Korrelationen zwischen der antiproliferativen FW-Wirkung und dem Faeces-Wasser- bzw. MDA-Gehalt. Auf die Bedeutung der einzelnen Einflussfaktoren auf die antiproliferative Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser wird in Abschnitt 5.2.7 nochmals eingegangen.

Bei Betrachtung der steril-filtrierte FW-Proben, unabhängig von der jeweiligen Studienphase, konnten die beobachteten antiproliferativen Wirkungen von Faeceswasser nicht ausschließlich durch cytotoxische Wirkungen bedingt sein, da die proliferationshemmenden und cytotoxischen Effekte nicht korrelierten. Möglicherweise sind verschiedene lumina- le Komponenten und Mechanismen für die erfassten cytotoxischen und antiproliferativen Effekte von Faeceswasser verantwortlich.

Die Langzeitexposition von proliferierenden HT-29 Zellen mit Faeceswasser führte zu einer deutlichen Wachstumshemmung. Unter welchen Umständen *in vivo* bzw. *in vitro* eine proliferationsstimulierende Wirkung infolge Kompensation cytotoxischer Effekte auftreten kann, sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden. Zur Validierung der Proliferationsmessung als nicht invasiver Colonicarcinogenese-relevanter Faecesmarker wären Studien sinnvoll, die den Einfluss von Faeceswasser auf das Wachstum von Colonicarcinomzellen unter verschiedenen Zellkulturbedingungen und parallel die Colonicellproliferation bei humanen Biopsieproben untersuchen.

5.2.3 Gallensäuren in Faeceswasser

Es wird häufig angenommen, dass Gallensäuren durch Störung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose in den Colonocyten zur malignen Transformation beitragen [Glinghammar und Rafter 1999]. Bei HT-29 Zellen zeigten LCA, CDCA und DCA cytotoxische bzw. proliferationshemmende Effekte, allerdings erst ab Konzentrationen von 350 μ M (2h-Kurzzeitexposition) bzw. 50 μ M (5d-Langzeitexposition) [Latta *et al.* 1993]. In einer Humanstudie konnte die beobachtete FW-Cytotoxizität durch den FW-pH-Wert und die FW-Konzentrationen von DCA-, CA-, und UDCA erklärt werden [De Kok *et al.* 1999]. Auch in einer Studie von van Munster *et al.* war die FW-Toxizität korreliert mit der FW-DCA-Konzentration, dennoch zeigten einige FW-Proben mit niedriger DCA-Konzentration merkbare Cytotoxizität [van Munster *et al.* 1993]. Latta *et al.* ermittelten nach Langzeitexposition von proliferierenden HT-29 Zellen mit Gallensäuren über fünf Tage IC₅₀-Werte von 77 μ M für LCA, 112 μ M für CDCA und 168 μ M für DCA [Latta *et al.* 1993]. Unter der Berücksichtigung, dass in den in dieser Arbeit untersuchten steril-filtrierte FW-Proben die maximale Gesamt-GS-Konzentration nur 33,6 μ M bzw. die höchste DCA-Konzentration 21,1 μ M betrug und die Proben für den Einsatz im Zellkultursystem mindestens zweifach verdünnt wurden, ist eine direkte cytotoxische bzw. proliferationshemmende Wirkung der Gallensäuren in dem hier verwendeten Testsystem eher unwahrscheinlich. Korrelationen zwischen einzelnen Gallensäuren bzw. der Gesamt-GS-Konzentration und der cytotoxischen Wirkung von Faeceswasser wurden überdies nicht beobachtet. Verschiedene Gallensäuren könnten sich jedoch in ihrer Wirkung verstärken. Veränderungen im hydrophoben-hydrophilen Gleichgewicht von Gallensäuren in Faeceswasser können ebenfalls starke Effekte auf die intestinale cytotoxische Aktivität haben [Lapre *et al.* 1992]. Ebenso können synergistische Wirkungen von Gallensäuren mit anderen luminalen Substanzen nicht ausgeschlossen werden. Die Kombination aus niedrigen DCA-Konzentrationen (12,5-25 μ M) mit Butyrat und Propionat (4mM) führte z.B. bei HT-29 Zellen zu additiven Effekten bezüglich Apoptoseinduktion nach 24h-Inkubation [Marchetti *et al.* 1997].

Bei den steril-filtrierte FW-Proben zeigte sich als einziger Zusammenhang zwischen Gallensäuren und der cytotoxischen Wirkung eine mittlere positive Korrelation von 0,61 zwischen dem prozentualen Anteil der primären Gallensäuren und dem EC₂₅-Wert. Mit steigendem Anteil dieser Gallensäuren nahm demzufolge die cytotoxische FW-Wirkung ab. Möglicherweise beeinflussten die in dieser Arbeit untersuchten Gallensäuren die cytotoxische FW-Wirkung nicht direkt. Der prozentuale Anteil primärer Gallensäuren könnte vielmehr auch einen indirekten Marker für die Aktivität bestimmter Mikroorganismen der Darmflora, die andere cytotoxische Substanzen produzieren bzw. freisetzen, darstellen.

Karotten- und Tomatensaft-Konsum zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der erfassten Gallensäuren, die Gesamt-GS-Konzentration oder das GS-Muster. Auch das LCA/DCA-Verhältnis, das nach Owen *et al.* einen besseren Risikomarker für colorectalen Krebs darstellen könnte als die faecale DCA-, LCA- oder Gesamt-GS-Konzentration [Owen *et al.* 1987], wurde durch die Karotten- und Tomatensaft-Interventionen in Faeceswasser nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich jedoch eine tendenzielle ca. 1,5-fache Zunahme der primären Gallensäuren durch die Tomatensaft-Intervention ($P=0,10$; Daten nicht gezeigt). Auf die Bedeutung von Gallensäuren für die cytotoxische Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser in Kombination mit anderen Einflussfaktoren wird in Abschnitt 5.2.7 nochmals eingegangen.

Mit der antiproliferativen Wirkung von steril-filtrierte FW schien in dieser Arbeit lediglich die Konzentration der DCA, der häufigsten Gallensäure in Faeceswasser (bzw. im Colon), zusammenzuhängen. Zwischen diesen beiden Parametern lag eine signifikante moderate Korrelation von 0,39 vor; d.h. mit steigender DCA-Konzentration nahm die wachstumshemmende Wirkung von Faeceswasser ab. Besonders hydrophobe Gallensäuren wie DCA könnten die Struktur von Zellmembranen und damit den Stofftransport verändern und zur Aktivierung von Membranrezeptoren führen [Powell *et al.* 2001]. Die Bedeutung der FW-DCA-Konzentration für die proliferationshemmende Wirkung von Faeceswasser in Kombination mit weiteren Einflussfaktoren wird in Abschnitt 5.2.7 nochmals diskutiert.

Das GS-Muster von den in dieser Arbeit untersuchten FW-Proben stimmte weitestgehend mit den Daten aus der Literatur überein [De Kok *et al.* 1999]. Allerdings war der prozentuale Anteil an den primären Gallensäuren CA und CDCA mit durchschnittlich 23% ($\pm 12\%$) erhöht. Ursache dafür könnte ein erniedrigter luminaler pH-Wert sein (siehe 5.2.4), der eine Hemmung der bakteriellen 7α -Dehydroxylase und damit eine begrenzte Umwandlung von primären in sekundäre Gallensäuren zur Folge haben kann [AGA 2000].

In der Literatur zeigen die Konzentrationen verschiedener Gallensäuren in Faeceswasser starke Schwankungen. So wurden bei gesunden Probanden z.B. FW-DCA-Konzentrationen von 46-210 μ M [De Kok *et al.* 1999, Geltner-Allinger *et al.* 1989] und nach fettreicher Diät bis zu 400 μ M gemessen [Rafter *et al.* 1987]. In dieser Arbeit zeigten die steril-filtrierte FW-Proben vergleichsweise niedrige GS-Konzentrationen. Möglicherweise lagen die Gallensäuren überwiegend an die Faecesmatrix, z.B. an unlösliche Ballaststoffe oder an größere FW-Partikel, die durch Sterilfiltration entfernt werden, gebunden vor. Steril-filtrierte FW-Proben wiesen auch in einer anderen Studie niedrigere DCA-Konzentrationen (5-100 μ M) auf [van Munster *et al.* 1993]. Ballaststoffe können durch Bindung von Gallensäuren deren Löslichkeit in Faeceswasser reduzieren und die GS-Konzentration durch Verdünnungseffekte erniedrigen [Alberts *et al.* 2003].

Eine durch hohe Ballaststoffaufnahme bedingte pH-Wert-Erniedrigung im Lumen kann ebenfalls über Verminderung der Löslichkeit zur Reduktion der GS-Konzentration in Faeceswasser beitragen [De Kok und van Maanen 2000]. Mit einer täglichen Aufnahme von durchschnittlich 36g durch die kontrollierte Diät am Ende der Studienphasen (siehe Tab. 4.2) war die Ballaststoffzufuhr in der in dieser Arbeit untersuchten Interventionsstudie vergleichsweise hoch. Die Ballaststoffzufuhr in Deutschland liegt bei durchschnittlich 24g/Tag [Hermann-Kunz und Thamm 1999]. Eine fettreiche Ernährung erhöht deutlich die GS-Sekretion und den GS-Fluss. Die tägliche Fettaufnahme lag bei den untersuchten Probanden mit durchschnittlich 34 Energieprozent über den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE: 25-30%), jedoch unter der mittleren Fettzufuhr in Deutschland (40%, Hermann-Kunz und Thamm 1999). Eine niedrigere Fettaufnahme könnte ebenfalls für verminderte FW-GS-Konzentrationen verantwortlich sein. Um die relativ niedrigen GS-Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten FW-Proben erklären zu können, sollten in weiteren Untersuchungen parallel die Konzentrationen der verschiedenen Gallensäuren von steril-filtrierte und un-filtrierte FW-Proben analysiert werden.

Neben methodischen Unterschieden bezüglich Stuhlsammlung, FW-Gewinnung bzw. -Filtration, chemischer Analyse und diätetischer Intervention können sich auch Probandenunterschiede hinsichtlich Alter, Ernährungsgewohnheiten, Stuhltransitzeit, Leberfunktion, Medikamenteneinnahme und Erkrankungen, z.B. Gallensteine und frühere Darmerkrankungen, sowie durchgeführte Operationen wie Cholecystektomien auf Faeces- bzw. FW-GS-Konzentrationen und -Profil auswirken [De Kok *et al.* 1999]. Dass häufig nicht alle diese Faktoren kontrolliert werden können, macht die Interpretation von Studienergebnissen schwierig. Obwohl die sekundären Gallensäuren DCA und LCA häufig mit der colorectalen Carcinogenese in Verbindung gebracht werden (siehe 2.3.3), konnten nicht alle Studien einen Zusammenhang zwischen diesen Gallensäuren in Faeceswasser und dem Krebsrisiko bestätigen [De Kok *et al.* 1999, Geltner-Allinger *et al.* 1991].

Bei weitgehender Konstanthaltung der Fett-, Protein- und Ballaststoffaufnahme, mit Ausnahme der erhöhten täglichen Ballaststoffzufuhr durch die Karottensaft- bzw. Tomatensaft-Intervention, zeigte sich in dieser Arbeit keine signifikante Modifikation der Konzentrationen einzelner Gallensäuren oder der Gesamt-GS-Konzentration durch Karotten- oder Tomatensaft-Konsum.

Die Rolle der Fett- und Ballaststoffaufnahme bei der colorectalen Carcinogenese wird nach wie vor kontrovers diskutiert (siehe 2.1.2 ff). Auch für Gallensäuren liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. FW-Gallensäuren als Colonicarcinogenese-relevante Expositionsmarker bleiben somit umstritten.

5.2.4 Faeceswasser-pH-Wert

Ein niedriger Faeces-pH wurde mit einer verminderten Colonkrebsinzidenz in verschiedenen Populationen in Verbindung gebracht [Walker *et al.* 1986, Wollowski *et al.* 2001]. Mechanismen wie eine durch die pH-Wert-Erniedrigung bedingte reduzierte Löslichkeit von freien Gallensäuren und Fettsäuren, die Hemmung der bakteriellen 7 α -Dehydroxylase bei einem pH unter 6,0 bis 6,5 und die Hemmung des bakteriellen Abbaus von Faeces-Komponenten zu potenziellen Carcinogenen und Veränderungen in der Zusammensetzung der Colonflora werden dieser Beobachtung zugrunde gelegt [AGA 2000].

Die pH-Werte von Faeces- und zugehörigen FW-Proben zeigen eine starke Korrelation [Govers *et al.* 1996]. Die in dieser Arbeit gemessenen FW-pH-Werte von durchschnittlich 6,63 liegen im unteren Bereich der FW- bzw. Faeces-pH-Daten aus der Literatur [De Kok *et al.* 1999, Geltner-Allinger *et al.* 1989, Govers *et al.* 1996, Nagengast *et al.* 1993, Walker *et al.* 1986]. Während in einer Studie von De Kok *et al.* die Cytotoxizität von FW-Proben negativ mit deren pH-Werten korreliert war [De Kok *et al.* 1999], konnte in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen dem pH-Wert und der Cytotoxizität von steril-filtrierte**m** bzw. un-filtrierte**m** Faeceswasser sowie der antiproliferativen Wirkung der beiden FW-Präparationen (EC₂₅- und IC₅₀-Werte) festgestellt werden. Allein die Protonenkonzentration der in dieser Studie untersuchten FW-Proben kann auch nicht für deren unterschiedliche cytotoxische und antiproliferative Wirkungen verantwortlich sein, da in allen Versuchen der pH-Wert aufgrund der Pufferfunktion des Zellkulturmediums stets in einem für HT-29 Zellen tolerierbaren Bereich lag.

Nach Tomatensaft-Konsum war der FW-pH-Wert tendenziell ($P=0,16$), aber nicht signifikant erniedrigt. Dagegen führte die Karottensaft-Intervention zu einer deutlichen signifikanten Abnahme des pH-Wertes um durchschnittlich 0,38. Eine Ursache für eine pH-Wert-Erniedrigung kann eine erhöhte Aktivität der Mikroflora sein, die Substanzen wie kurzkettige Fettsäuren durch Abbau von Ballaststoffen produziert und sezerniert (siehe nächster Abschnitt). Auch in dieser Arbeit konnten SCFA den pH-Wert von Faeceswasser, wie in Abschnitt 4.5.5 dargestellt, beeinflussen. Durch Karotten- bzw. Tomatensaft-Konsum erhöhte sich während der kontrollierten Diät die Ballaststoffaufnahme um durchschnittlich 7,9 bzw. 8,6%. Möglicherweise geht die unterschiedliche Auswirkung der beiden Saft-Interventionen auf den FW-pH auf Abweichungen in der Ballaststoff-Zusammensetzung bzw. auf Matrixunterschiede zwischen Karotten- und Tomatensaft zurück, die die Fermentierung in verschiedenen Colonabschnitten bedingen können. Seitens des Herstellers liegen nur Daten zum Gesamt-Ballaststoff-Gehalt der Säfte vor, jedoch keine weiteren Analysendaten über deren Ballaststoff-Zusammensetzung oder weitere Saftbestandteile, die den luminalen pH-Wert beeinflussen könnten.

Das lumenale pH-Gleichgewicht ist dynamisch und hängt von zahlreichen Faktoren ab, z.B. von der Konzentration an kurzkettigen und weiteren organischen Fettsäuren, Bicarbonat, Phosphat, Ammoniak sowie von anorganischen basischen Kationen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} [Newmark und Lupton 1990], so dass die genauen Ursachen für die FW-pH-Wert-Erniedrigung im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden konnten (siehe auch nächster Abschnitt).

Studien haben gezeigt, dass eine Ernährungsmodifikation von einer Woche ausreicht, um Veränderungen im Faeces-pH, in der FW-GS-Konzentration, FW-Cytotoxizität und der Mucosaproliferation detektieren zu können [Govers *et al.* 1996, Rafter *et al.* 1987, Stadler *et al.* 1988a]. Möglicherweise konnte bereits ein 14-tägiger Karottensaft-Konsum bei der vorliegenden Studie die biochemische Aktivität bzw. auch die Zusammensetzung der Mikroflora der Probanden modifizieren.

5.2.5 Kurzkettige Fettsäuren in Faeceswasser

Für die Neutralisierung von Basen sowie die Ansäuerung des Cololumens und der Faeces sind hauptsächlich SCFA, insbesondere Acetat, Propionat und Butyrat verantwortlich [Newmark und Lupton 1990]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der FW-Acetat- bzw. Butyrat-Konzentration und dem FW-pH-Wert. Die multiple Regressionsanalyse (Methode siehe 3.7) ergab für die FW-Butyrat-Konzentration den bedeutendsten Einfluss auf den FW-pH ($\text{FW-pH} = 7,208 - 0,0218 \cdot \text{FW-Butyrat}$; $R^2 = 0,21$). Die hier erfassten SCFA Acetat, Butyrat und Propionat konnten jedoch nicht allein für die Verminderung des FW-pH nach Karottensaft-Konsum verantwortlich sein, da ihre Konzentrationen in Faeceswasser nicht signifikant durch Karottensaft-Konsum verändert wurden. Auch die Tomatensaft-Intervention beeinflusste die Konzentration der SCFA nicht merklich. Aufgrund der schnellen Resorption von SCFA im Colon können die in FW-Proben erfassten SCFA-Konzentrationen nicht die genauen lumenalen SCFA-Konzentrationen widerspiegeln. Die Verwendung von Faeces- bzw. FW-Daten zur Interpretation von Veränderungen hinsichtlich der Fermentation im Colon sind daher begrenzt [Cummings *et al.* 1987]. Über ihre osmotische Wirksamkeit trugen die SCFA möglicherweise jedoch zu einer verstärkten Wasserrückresorption im distalen Colon und damit zur Verminderung des beobachteten Faeces-Wassergehaltes nach Karottensaft-Konsum bei. Um herauszufinden, welche Substanzen in Faeceswasser an der pH-Wert-Verminderung durch Karottensaft-Konsum beteiligt sind, wären nachfolgende Analysen zur Bestimmung weiterer organischer Säuren bzw. Anionen wie Lactat interessant. Lactat stellt ein Zwischenprodukt der KH-Fermentation zu SCFA dar, dessen Faeces-Konzentration bei gesunden Probanden normalerweise unter 5mM liegt [Duncan *et al.* 2004]. Dennoch sollte überprüft werden, ob bei vergleichsweise hoher Ballast-

stoffaufnahme Karottensaft-Konsum zu einer erhöhten FW-Lactat-Konzentration führen kann. Ob beim bakteriellen Abbau von Karottensaft-Inhaltsstoffen distal vermehrt auch andere organische Säuren wie Succinat und phenolische Säuren entstehen und den FW-pH-Wert vermindern konnten, sollte ebenfalls untersucht werden.

Im menschlichen Colon wurde ein durchschnittliches molares Verhältnis von Acetat:Propionat:Butyrat von 57:22:21 im rechten und 57:21:22 im linken Colon detektiert [Cummings *et al.* 1987]. In Abhängigkeit der Natur, Menge und Fermentierbarkeit von Ballaststoffen die das Colon erreichen, kann das Verhältnis dieser SCFA variieren. Bei den hier untersuchten FW-Proben lag das molare Verhältnis von Acetat:Propionat:Butyrat durchschnittlich bei 62:18:21 und stimmte damit annähernd mit den oben beschriebenen Daten von Cummings *et al.* überein.

Kurzkettigen Fettsäuren wird eine bedeutende Rolle bei der Colonomöostase zugeschrieben. In einer Studie von Dolara *et al.* waren höhere Faeces-SCFA-Spiegel bei Patienten mit 6-24 Monate zuvor entfernten Colonpolypen mit einer niedrigeren Proliferationsrate der Colonmucosa verbunden [Dolara *et al.* 2002]. Das normale Colongewebe toleriert Butyrat-Konzentrationen von 10-60mM [Scheppach *et al.* 1995]. Dagegen zeigten SCFA *in vitro* - vermutlich durch eine höhere Anfälligkeit isolierter Zellen im Vergleich zu Gewebe-assoziierten Zellen in ihrer natürlichen Umgebung – cytotoxische Wirkung auf HT-29 Zellen. Butyrat stellte mit einer cytotoxischen Wirkung ab 5mM dabei die wirksamste SCFA dar, während Acetat die schwächste Wirkung auf konfluente HT-29 Zellen ausübte [Lang 2001]. In dieser Arbeit zeigten Korrelationen der FW-SCFA-Konzentrationen mit den EC₂₅-Werten von unfiltriertem Faeceswasser, dass SCFA für die cytotoxische FW-Wirkung im Zellkultursystem mitverantwortlich sein könnten (siehe Tab. 7.7). Dieser Zusammenhang konnte allerdings bei steril-filtrierte FW-Proben nicht bestätigt werden. Möglicherweise stellen die erfassten SCFA nur indirekte Marker für andere Substanzen aus Bakterien dar, die mit den SCFA-Konzentrationen korrelieren, aber durch die Sterilfiltration entfernt wurden.

Auch proliferationshemmende Wirkungen durch SCFA wurden an HT-29 Zellen beobachtet. So hemmte eine dreitägige Behandlung mit Na-Butyrat bei HT-29 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase dosisabhängig das Zellwachstum mit einer IC₅₀-Konzentration von 1,6mM [Coradini *et al.* 2000]. Diese Wachstumshemmung wurde mit einem Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase und mit Veränderungen in Zellzyklus-assoziierten Proteinen wie Cyclin D1 und p53 in Verbindung gebracht. Bei den steril-filtrierte FW-Proben zeigte sich nur noch die Korrelation zur Propionat-Konzentration, deren Bedeutung als Einflussfaktor auf die proliferationshemmende FW-Wirkung in Abschnitt 5.2.7 erläutert wird.

5.2.6 Bakterielle Enzymaktivitäten in Faeceswasser

Tumoren treten im Dickdarm wesentlich häufiger auf als im Dünndarm. Neben Unterschieden in der Gewebekomposition (siehe 2.2.2) könnte auch die Colonflora eine wichtige Rolle in der Colonicarcinogenese spielen. Ein Mechanismus, durch den intestinale Bakterien in diesen Prozess involviert sein könnten, stellt die Produktion carcinogener Metabolite aus nicht-toxischen Vorläufersubstanzen dar. Einige reduktive und hydrolytische Enzyme wie Azoreduktase und Nitroreduktase, β -Glucosidase und β -Glucuronidase, die für die Bildung carcinogener Substanzen bekannt sind, werden von Colonbakterien produziert [McBain und Macfarlane 1998]. Die bakterielle Enzymaktivität kann durch Substratinduktion oder durch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Colonflora modifiziert werden. Die als gesundheitsfördernd geltenden Bifidobakterien und Lactobazillen weisen z.B. geringere Aktivitäten der Xenobiotika-metabolisierenden Enzyme im Vergleich zu in hohen Zahlen als eher schädlich betrachteten Bacteroides, Clostridien und Enterobacteriaceae auf. β -Glucuronidase kommt z.B. vor allem in Enterobakterien und Clostridien vor [Wollowski *et al.* 2001].

In einer Humanstudie von Johansson *et al.* wurden nach Umstellung von einer gemischten auf eine lacto-vegetabile Kost, die mit einem verminderten Colonkrebsrisiko assoziiert wird, verminderte Aktivitäten von β -Glucosidase, β -Glucuronidase und Sulfatase in Faeces-Proben beobachtet [Johansson *et al.* 1990]. Im Fall der β -Glucosidase und β -Glucuronidase konnten die verminderten Aktivitäten unter Berücksichtigung des erhöhten Stuhlgewichtes auf Verdünnungseffekte zurückgeführt werden. In dieser Arbeit korrelierte die FW-Aktivität der β -Glucosidase und β -Glucuronidase weder mit dem Stuhlgewicht, noch mit dem Faeces-Wassergehalt, so dass Verdünnungseffekte die Aktivität der beiden Enzyme nicht maßgeblich zu beeinflussen schienen. Auch Karotten- und Tomatensaft-Konsum zeigten keinen Einfluss auf die Aktivität von β -Glucosidase und β -Glucuronidase in Faeceswasser. Inwieweit die Aktivität anderer bakterieller Enzyme wie Nitratreduktase durch Karotten- oder Tomatensaft-Konsum beeinträchtigt wird, sollte in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

Die cytotoxische Wirkung von steril- und unfiltriertem Faeceswasser wurde nicht von der β -Glucosidase- sowie der β -Glucuronidase-Aktivität beeinflusst; es konnten keine signifikanten Korrelationen beobachtet werden. Die β -Glucuronidase-Aktivität zeigte auch keinen signifikanten Einfluss auf die antiproliferative Wirkung der beiden FW-Präparationen. Durch eine gesteigerte β -Glucosidase-Aktivität nahm jedoch die antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem Faeceswasser signifikant zu ($r=-0,62$). Auf diese Beobachtung wird in Abschnitt 5.2.7 nochmals eingegangen.

Häufig wird die Aktivität bakterieller Enzyme nach Zentrifugation aus mit Puffer verdünnten und zur Freisetzung Zell-assoziiertes bzw. intrazellulärer Enzyme mit Ultraschall- oder Triton-behandelten Faeces-Proben aus dem Überstand bestimmt. In Vorversuchen wurden jedoch keine Unterschiede in der β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität von unfiltriertem Faeceswasser und dem Überstand von mit Puffer verdünnten Ultraschall-behandelten Faeces-Proben beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des Materialmangels wurde in dieser Arbeit daher die Aktivität der beiden Enzyme aus bereits zuvor gewonnenen unfiltrierten und bei -80°C gelagerten FW-Proben bestimmt. Die Aktivität der beiden Enzyme, gemessen in Form des Substratumsatzes, lag im Bereich der Ergebnisse zu den faecalen Enzymaktivitäten aus früheren Studien [Bartram *et al.* 1996, Hylla *et al.* 1998]. Dies lässt vermuten, dass die beiden Enzyme überwiegend extrazellulär vorlagen, möglicherweise begünstigt durch Zelllyse beim Aufarbeiten der Proben.

Trotz zahlreicher Untersuchungen über bakterielle Enzyme gibt es bisher keinen direkten, eindeutigen Zusammenhang zwischen deren metabolischer Aktivität und der Entwicklung von sporadischem colorectalem Krebs [Huycke und Gaskins 2004]. Bakterielle Enzymaktivitäten und entsprechende Faeces-Metabolite können daher eher zur Beurteilung der Effekte einer Ernährung auf die Modulation der Exposition des Colons mit potenziellen Carcinogenen herangezogen werden, als dass sie das Krebsrisiko widerspiegeln [Rafter *et al.* 2004].

Durch die bakterielle β -Glucosidase können carcinogen wirkende Aglycone wie Azoxymethan und Cycasin freigesetzt werden, die in glycosidischer Form inaktiv sind [Steer *et al.* 2000]. Die β -Glucosidase könnte jedoch auch gesundheitsfördernde Effekte haben, z.B. wenn durch dieses Enzym vermehrt Flavonoide, die in der Nahrung häufig glycosidisch verknüpft vorliegen, freigesetzt werden [Wollowski *et al.* 2001]. Ein Anstieg in der β -Glucosidase-Aktivität kann auch auf einem präbiotischen Effekt z.B. durch Oligosaccharide beruhen, da Milchsäurebakterien im Vergleich zu anderen Darmflorabakterien eine hohe β -Glucosidase-Aktivität haben [Hughes und Rowland 2001]. Bei höherer β -Glucosidase-Aktivität kann eine erhöhte Hydrolyse mehr Energie für Mikroorganismen und möglicherweise Freisetzung von Mikronährstoffen aus der Nahrungsmittelmatrix bedeuten [van den Heuvel *et al.* 2005]. Daher wird die funktionelle Bedeutung der β -Glucosidase noch diskutiert.

Die Ernährung könnte auch für Enzym-assoziierte detoxifizierende Effekte im Colon eine wichtige Rolle spielen. Obwohl das Colonepithel zum Teil durch seine Mucusschicht geschützt ist, sind die Zellen relativ anfällig gegenüber exogenen Toxinen. Im Vergleich zur Leber exprimieren sie nur relativ geringe Mengen an Phase-II-Enzymen wie die Glutathion-S-Transferasen (GST), die viele genotoxische Carcinogene inaktivieren [Berlau *et al.* 2004]. Im Colon der Ratte wurde nach Aufnahme resistenter Stärke, die die Aktivität und Zusammensetzung der

Mikroflora modifizieren kann, eine Induktion der Glutathion-S-Transferase π beobachtet [Treptow-van Lishaut *et al.* 1999]. Butyrat, ein Hauptfermentationsprodukt der Mikroflora, konnte in HT-29 ebenfalls Glutathion-S-Transferasen induzieren [Pool-Zobel *et al.* 2005]. Untersuchungen zum Einfluss von Faeceswasser auf die GST-Aktivität im Zellkultursystem wären daher ebenfalls interessant.

5.2.7 Einflussfaktoren auf die cytotoxische und wachstumshemmende Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser

Hinsichtlich der cytotoxischen Wirkung von steril-filtrierte FW zeigte nur der prozentuale Anteil an primären Gallensäuren bedeutenden Einfluss. Eine Verschiebung des GS-Musters zugunsten der primären Gallensäuren CA und CDCA mit gleichzeitiger Abnahme des Anteils an den sekundären Gallensäuren DCA und LCA führte zu einer Verminderung der cytotoxischen FW-Wirkung, gleichbedeutend mit einer Erhöhung des EC_{25} -Wertes. Der FW-pH-Wert wurde im linearen Regressionsverfahren dagegen als nicht signifikanter Einflussfaktor ausgeschlossen. Eine pH-Wert-Erniedrigung führt jedoch zu einer verminderten Löslichkeit von freien Gallensäuren und Fettsäuren sowie unter pH 6-6,5 zur Hemmung der bakteriellen 7α -Dehydroxylase [AGA 2000] und beeinflusst somit vermutlich indirekt die cytotoxische FW-Wirkung. Möglicherweise stellt der prozentuale Anteil der primären Gallensäuren auch einen indirekten Einflussfaktor auf die cytotoxische FW-Wirkung dar (Begründung siehe 5.2.3). Da nur 37% der Varianz des EC_{25} -Wertes durch den Anteil primärer Gallensäuren in Faeceswasser erklärt werden können, spielen andere, in dieser Arbeit nicht erfasste Faktoren, vielleicht eine wichtigere Rolle für die FW-Cytotoxizität. So könnte die individuelle Mikroflora weitere cytotoxische Substanzen produzieren bzw. freisetzen. Bei der proteolytischen Fermentierung können neben verzweigt-kettigen SCFA wie Isobutyryl, Methylbutyryl (C_4), Isovalerat (C_5) und Caproat, die mit ca. 10-20mol/100mol SCFA_{gesamt} [Williams *et al.* 2001] im Colon in wesentlich geringeren Mengen als die erfassten SCFA vorkommen, auch potenziell toxische Metabolite wie Ammoniak bzw. Ammonium-Ionen, Amine, Phenole (z.B. p-Cresol), Indole, N-Nitroso-Verbindungen und Sulfide entstehen.

Für die wachstumshemmende Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser stellen wahrscheinlich vor allem der Faeces-MDA-Gehalt (bzw. andere Produkte der Lipidperoxidation wie Lipidhydroperoxide oder 4-Hydroxy-2-nonenal) und die bakterielle β -Glucosidase-Aktivität wichtige Einflussfaktoren dar, da ihre lineare Kombination 80% der Variation des IC_{50} -Wertes erklären konnte. Mit steigendem Faeces-MDA-Gehalt und steigender β -Glucosidase-Aktivität zeigte sich bei den untersuchten FW-Proben eine Abnahme des IC_{50} -Wertes bzw. eine Erhöhung der

proliferationshemmenden FW-Wirkung. Auch die FW-DCA-Konzentration und die FW-Propionat-Konzentration schienen mit der antiproliferativen FW-Wirkung korreliert zu sein; sie wurden als interkorrelierte Variablen (siehe Tab. 7.7) bei der Regressionsanalyse im schrittweisen Verfahren jedoch ausgeschlossen.

Die β -Glucosidase-Aktivität könnte einen indirekten Einflussfaktor darstellen, der auf Substanzen wie Flavonoide zurückgeht, die in der Nahrung häufig glycosyliert vorliegen und nur begrenzt resorbiert werden können. Durch bakterielle Glucosidasen können sie im Dickdarm freigesetzt und nachfolgend durch die Mikroflora z.B. zu phenolischen Säuren metabolisiert werden [Rechner *et al.* 2004]. Flavonoide bzw. phenolische Säuren konnten auch in Faeceswasser nachgewiesen werden [Jenner *et al.* 2005]. Während den Flavonoiden aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften eine positive Rolle in der menschlichen Ernährung und Prävention von Krankheiten zugeschrieben wird, können diese Verbindungen *in vitro* in Gegenwart von Cu^{2+} oder Fe^{2+} auch prooxidativ wirken. Dabei scheint sich die prooxidative Aktivität in Abhängigkeit der Zahl an Hydroxylgruppen zu erhöhen, während Methylierung und Glycosylierung der Hydroxylgruppen die prooxidative Aktivität von Flavonoiden vermindert [Heim *et al.* 2002]. Luteolin, ein Flavonoid, das unter anderem auch in Karotten vorkommt, konnte *in vitro* bei Ratten-Hepatoma-Zellen (H4IIE) Apoptose induzieren. Darüber hinaus zeigte sich durch Luteolin ein konzentrationsabhängiger Anstieg von Malondialdehyd im Zellkulturmedium [Michels *et al.* 2005]. Phenolische Säuren wie Gallussäure konnten *in vitro* in HT-29 Zellen Apoptose induzieren, vermutlich durch prooxidative Effekte, die durch gleichzeitige Inkubation mit Ascorbinsäure unterdrückt werden konnten (unveröffentlichte Daten). Ob Flavonoide bzw. phenolische Säuren auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Zellkultursystem an der antiproliferativen FW-Wirkung durch prooxidative Wirkung maßgeblich beteiligt waren, könnten nachfolgende Untersuchungen klären. Außerdem sollten weitere Untersuchungen zu anderen Komponenten wie biogenen Aminen oder bakteriellen Toxinen und deren Einfluss auf die cytotoxische und antiproliferative FW-Wirkung durchgeführt werden.

5.3 Einsatz von Faeces-Lipidextrakten in der Zellkultur

Aufgrund der möglichen Rolle von diätetischem Fett in der Colonicarcinogenese wurden in dieser Arbeit neben Faeceswasser auch Lipidextrakte aus den Stuhlproben der Probanden gewonnen. Die Verwendung von Faeces-Extrakten ermöglichte im Vergleich zu Faeceswasser eine Aufkonzentrierung von Carotinoiden bzw. anderen lipidlöslichen Substanzen für den Einsatz im verwendeten Zellkulturmodell. Die errechneten Carotinoid-Konzentrationen der unverdünnt eingesetzten Lipidextrakt-Stammlösungen (Herstellung siehe 3.6.9.1) lagen für β -Carotin bei $76 \pm 32 \mu\text{M}$ nach Karottensaft-Konsum und für Lycopin bei $91 \pm 51 \mu\text{M}$ nach Tomatensaft-Konsum. Zur Suspendierung der Faeces-Extrakte in Zellkulturmedium war der Einsatz eines Ultra Turrax erforderlich. Diese Suspendierung führte vermutlich zur Bildung von kleineren carotinoidhaltigen Partikeln, die im Gegensatz zu den im Faeceswasser vorliegenden Carotinoid-Partikeln einen Filter von $0,22 \mu\text{m}$ Porengröße passieren konnten (HPLC-Analyse, Daten nicht gezeigt). Möglicherweise waren die Faeces-Carotinoide damit auch besser für HT-29 Zellen verfügbar. Um Lipidperoxidation weitestgehend zu vermeiden, war den für die Extrakterstellung verwendeten Faeces-Proben BHT ($0,022 \text{mg BHT/ml PBS}$, siehe 3.6.3.2) zugesetzt. Beim Einsatz der Lipidextrakte im Zellkultursystem betrug die maximale BHT-Konzentration nur noch $7,3 \cdot 10^{-4} \%$ (w/v; $7,3 \mu\text{g/l}$), das in dieser Konzentration in drei voneinander unabhängigen Versuchen keine cytotoxische Wirkung auf HT-29 Zellen hatte (Daten nicht gezeigt).

5.3.1 Wirkung von Faeces-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen

Karotten- und Tomatensaft-Konsum erhöhten deutlich die Cytotoxizität von Faeces-Lipidextrakten; der EC_{25} -Wert wurde durchschnittlich um 39 bzw. 34% erniedrigt. Ein signifikanter Rückgang der Vitalität von HT-29 Zellen um 25% zeigte sich bei β -Carotin- bzw. Lycopin-Konzentrationen von $1-19 \mu\text{M}$ bzw. $1-31 \mu\text{M}$ im Zellkulturmedium. Damit war die cytotoxische Wirkung von z.B. β -Carotin in Kombination mit anderen Faeces-Lipiden stärker als die von isoliertem β -Carotin (siehe Briviba *et al.* 2001). Die Cytotoxizität der Lipidextrakte aus den Saft-Interventionsphasen (EC_{25}) korrelierte jedoch nicht mit den durch HPLC-Analyse bestimmten Faeces-Carotinoid-Gehalten. Möglicherweise wurde die Löslichkeit bzw. Verfügbarkeit der Faeces-Carotinoide im wässrigen Medium durch andere Faeces-Lipide wie Gallen- und Fettsäuren und damit ihre Wirkung im Zellkultursystem beeinträchtigt. Karotten- und Tomatensaft-Extrakte mit β -Carotin- bzw.

Lycopin-Gehalten wie in den untersuchten Faeces-Lipidextrakten zeigten keine cytotoxische Wirkung auf HT-29 Zellen (Daten nicht gezeigt).

In hohen Konzentrationen könnten Carotinoide auch die Eigenschaften von biologischen Membranen verändern und ihre Permeabilität für Toxine, molekularen Sauerstoff oder Radikale beeinflussen [El Agamey *et al.* 2004]. Ob andere lipophile Substanzen aus Karotten- und Tomatensaft an der cytotoxischen Wirkung der Faeces-Lipidextrakte beteiligt sind oder ob Karotten- und Tomatensaft-Konsum die Erhöhung der Lipidextrakt-Cytotoxizität über eine Veränderung in der luminalen Zusammensetzung lipophiler toxischer Komponenten bewirken konnten, sollten nachfolgende Analysen klären.

Korrelationen zwischen der cytotoxischen Wirkung von Lipidextrakten und der cytotoxischen bzw. antiproliferativen Wirkung von Faeceswasser (sowohl steril- als auch unfiltriert) waren - unabhängig von den Studienphasen - nicht zu beobachten. Interessant wäre, inwieweit sich die Lipid-Konzentration und -Zusammensetzung in der wässrigen von der festen Phase des Stuhls unterscheiden und welche Auswirkungen sie auf die Cytotoxizität von Faeceswasser haben.

5.3.2 Durchflusscytometrische Analysen

Im Darmepithel ist die Apoptose zur Regulation der Zellzahl wichtig; daher ist die Charakterisierung von luminalen Komponenten, die diesen Prozess beeinflussen, von besonderem Interesse. Die Hemmung der Apoptose scheint eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von colorectalen Carcinomen zu spielen. Auch die in dieser Arbeit verwendeten HT-29 Zellen haben eine verminderte Fähigkeit, in Apoptose zu gehen [Morin *et al.* 1996, Shao *et al.* 1997]. Zum besseren Verständnis der beobachteten cytotoxischen Effekte von Faeces-Lipidextrakten aus der Karotten- und Tomatensaft-Intervention wurde daher auch deren Einfluss auf die Apoptoserate von HT-29 Zellen untersucht. Lipidextrakte von Faeces-Proben aus der Tomatensaft-Intervention führten zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate von konfluenten HT-29 Zellen im Vergleich zur vorausgegangenen Depletionsphase. Die cytotoxische Wirkung der Lipidextrakte nach Tomatensaft-Konsum beruht daher vermutlich auf Apoptoseinduktion. Nach Karottensaft-Konsum führte die 5h-Behandlung von HT-29 Zellen mit Faeces-Lipidextrakten zu einer tendenziellen ($P=0,16$), aber nicht signifikanten Erhöhung der Apoptoserate. Offensichtlich differierte die optimale Inkubationszeit bei Lipidextrakt-Proben der Karottensaft-Intervention von verschiedenen Probanden stärker als bei den Proben aus der Tomatensaft-Intervention. Daher wären weitere Experimente mit längeren Inkubationszeiten zur eindeutigen Mechanismenaufklärung der Effekte von Karottensaft-Konsum notwendig. Darüber hinaus sollte untersucht werden, durch welche Signale die beobachtete Apoptose induziert wird.

Insbesondere die Faeces-Lipidextrakte aus der Tomatensaft-Intervention induzierten Apoptose nach einer vergleichsweise kurzen Inkubationszeit von 2h. Möglicherweise haben luminale Komponenten zu Veränderungen in der Membranstruktur geführt und dadurch Apoptose induziert. Verfälschungen der mittels Annexin-Methode ermittelten Messergebnisse durch Wirkung von Lipidextrakt-Komponenten an der Membran können ausgeschlossen werden, da häufig parallel Bestimmungen zur Caspase-3-Aktivierung durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Die durch diese beiden Methoden gemessenen Apoptoseraten von HT-29 Zellen zeigten eine signifikante hohe Korrelation von 0,84 ($P < 0,001$; $n = 22$).

Aufgrund der Anfälligkeit von Carotinoiden gegenüber Oxidation, vor allem bei hohem Sauerstoffpartialdruck (siehe 2.4.4.1ff), sind ihre *in vitro* beobachteten biologischen Aktivitäten häufig schwer zu interpretieren. In welchem Ausmaß beim Menschen prooxidative Wirkungen von Carotinoiden *in vivo* vorkommen, ist unklar. Obwohl in dieser Arbeit keine Unterschiede im Faeces-MDA-Gehalt nach Karotten- und Tomatensaft-Konsum beobachtet wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Carotinoide aus den Faeces-Lipidextrakten im Zellkulturmedium prooxidativ wirkten. Um dies überprüfen zu können, müssten weitere analytische Untersuchungen mit dem Nachweis von Oxidationsprodukten durchgeführt werden. Offen bleibt darüber hinaus, inwieweit lipophile Substanzen aus Faeces *in vivo* Wirkungen auf Colonepithelzellen entfalten können. Weder Karotten- noch Tomatensaft-Konsum veränderten signifikant die cytotoxische Wirkung von unfiltriertem Faeceswasser. Daher schien der *In-vitro*-Einfluss der Saft-Carotinoide auf die Zusammensetzung cytotoxisch wirkender löslicher bzw. freier Komponenten bei den Probanden unter definierter Diät eher gering zu sein.

Die Induktion von Apoptose wird häufig mit protektiven Effekten assoziiert, wie im Fall der Wirkung von kurzkettigen Fettsäuren. Wenn Apoptoseinduktion jedoch zur Selektion von apoptoseresistenten Subpopulationen führt - so vermutet im Fall von Gallensäuren [Hague *et al.* 1995, Payne *et al.* 1995] - könnte dies zur Tumorpromotion führen. Um besser auf die physiologische Bedeutung der höheren, vermutlich durch Apoptoseinduktion bedingten cytotoxischen Wirkung von Lipidextrakten nach Tomaten- und eventuell auch nach Karottensaft-Konsum schließen zu können, sollte zunächst geklärt werden, ob diese Wirkungen auch bei nichttransformierten Colonepithelzellen eintreten. Die Gewinnung adulter normaler Epithelzellen der Colonmucosa durch Colonbiopsien ist für den Probenumfang von Humaninterventionsstudien jedoch zu aufwändig. Normale nicht transformierte Colonocyten können auch nicht permanent subkultiviert werden und sind daher nur in Kurzzeitversuchen einsetzbar. Für die Zellkulturversuche wurde eine permanente Colonadenocarcinom-Zelllinie ausgewählt. Bei Behandlung mit β -Carotin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unter Standardbedingungen undifferenzierten HT-29 Zellen (siehe 3.5) und

HT-29 Clon 19A, einem permanent differenzierten Zellclon, der durch Behandlung von HT-29 Zellen mit Butyrat gewonnen wurde [Augeron und Laboisie 1984] (Daten nicht gezeigt). Da HT-29 Zellen im Vorfeld dieser Arbeit bei Versuchswiederholungen hinsichtlich Reproduzierbarkeit die besten Ergebnisse zeigten und nicht ausreichend Humanmaterial aus der Interventionsstudie für die Untersuchung mehrerer Zelllinien zur Verfügung stand, wurden alle Zellkulturexperimente mit HT-29 Zellen durchgeführt.

Studien, in denen die Wirkung von Faeceswasser bzw. FW-Lipidextrakten auf HT-29 Zellen und foetale normale Colonmucosazellen (FHC-Zellen, fetal human colon cells) untersucht wurde, zeigten keine ausschließlich für Colonkrebszellen spezifischen Effekte [Glinghammar *et al.* 1999, Haza *et al.* 2000]. FHC-Zellen schienen auf apoptotische Effekte luminaler Komponenten jedoch weniger sensitiv zu reagieren als HT-29 [Haza *et al.* 2000]. Schwartz *et al.* beobachteten eine höhere Sensitivität von malignen Epidermiszellen gegenüber β -Carotin im Vergleich zu normalen Keratinocyten [Schwartz *et al.* 1992]. Um schädliche cytotoxische Effekte einer Karotten- bzw. Tomatensaft-Intervention auf normale Colon-epithelzellen ausschließen zu können, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So wären Studien an Colonbiopsie-Material von Patienten mit erhöhtem colorectalen Krebsrisiko (z.B. FAP- oder HNPCC-Patienten), die vor der Biopsie über einen längeren Zeitraum Karotten- oder Tomatensaft konsumieren, interessant.

5.4 Alternatives Faeceswasser-Modell

Am Beispiel der cytotoxischen und antiproliferativen Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser sollte untersucht werden, inwieweit die Faeces-Aufarbeitung zur Gewinnung von Faeceswasser Einfluss auf die cytotoxische und antiproliferative FW-Wirkung nimmt. Dazu wurden neben der direkten FW-Gewinnung durch Ultrazentrifugation Faeces-Proben vor der Zentrifugation mit Medium homogenisiert (FW-M-Proben). Die guten Korrelationen zwischen den verschiedenen FW-Modellen Faeceswasser und FW-Medium lassen vermuten, dass die Art der FW-Präparation keine Rolle spielt. Durch Zugabe von Flüssigkeit scheinen keine weiteren cytotoxisch oder antiproliferativ wirksamen Faeces-Komponenten in Lösung zu gehen. Da FW-M-Proben aufgrund ihrer niedrigeren Viskosität beim Filtrieren und Herstellen von Verdünnungen einfacher in der Handhabung waren, sind sie für den Einsatz in der Zellkultur den FW-Proben aus der direkten FW-Gewinnung vorzuziehen.

5.5 Probanden und Studiendesign der Humaninterventionsstudie

Die in dieser Arbeit untersuchten Faeces-Proben stammen aus einem für die Humaninterventionsstudie ausgewählten jungen, gesunden Probandenkollektiv (Studiendesign und –durchführung Dr. med. A. Bub, BFEL, Karlsruhe, 2000). Während in Deutschland gegenwärtig über 65% der Männer Übergewicht (BMI ≥ 25 , Ernährungsbericht der DGE e.V., Bonn 2004) haben, lag der BMI der hier untersuchten Probanden mit wenigen Ausnahmen im Normalbereich, ebenso wie der Körperfettanteil. Durch die kontrollierte Diät zwei Tage vor und während der Stuhlsammel-Perioden war die Energieaufnahme sowie die Nahrungszusammensetzung hinsichtlich KH-, Fett- und Proteinzufuhr in dieser Zeit relativ einheitlich (siehe Tab. 4.1). Möglicherweise war in der in dieser Arbeit vorgestellten Humaninterventionsstudie die Variabilität der Probanden bzw. die Variabilität in der Nährstoffzufuhr zu gering, um Effekte von Karotten- und Tomatensaft-Konsum auf Colonicarcinogenese-relevante FW-Marker beobachten zu können. Daher wäre interessant zu untersuchen, ob bei einem Risikokollektiv von Probanden, z.B. mit Übergewicht, oder einer risikoreichen Ernährung, z.B. mit einem hohen Verzehr an rotem Fleisch und einer niedrigen Ballaststoffaufnahme, durch Karotten- und Tomatensaft-Konsum Veränderungen in den hier erfassten Colonicarcinogenese-relevanten Faecesmarkern beobachtet werden können.

Die Humaninterventionsstudie wurde im Crossover-Design durchgeführt, wobei jeder Proband sowohl Karotten- als auch Tomatensaft konsumierte. Damit stellen alle Probanden ihre eigene Kontrolle für beide Saft-Interventionen dar. Um die in einer Studie im Crossover-Design möglicherweise auftretenden Nachwirkungseffekte zu vermeiden, gingen der jeweiligen Saft-Interventionsphase Depletionsphasen mit carotinoidarmer Ernährung über einen Zeitraum von zwei Wochen voraus. Diese Auswaschphasen waren zwar hinsichtlich der Carotinoid-Gehalte im Stuhl ausreichend, bei anderen Parametern wie der cytotoxischen Wirkung von steril-filtrierte Faeceswasser und dem Faeces-Wassergehalt traten jedoch auch Perioden- bzw. Nachwirkungseffekte auf. Darüber hinaus waren die durch Saft-Konsum gesteigerten Plasma-Carotinoid-Konzentrationen durch eine zeitverzögerte Modulation von Immunfunktionen wie Lymphozytenproliferation und IL-2 Sekretion mit den deutlichsten Veränderungen in den nachfolgenden Depletionsphasen begleitet [Watzl *et al.* 2003]. Nachfolgestudien zu Wirkungen von Karotten- und Tomatensaft-Konsum sollten daher mit verlängerten Auswaschphasen bzw. nicht im Crossover-Design durchgeführt werden. Außerdem sollte in weiteren Studien die Flüssigkeitszufuhr kontrolliert werden, um Einflüsse auf Stuhlgewicht und Faeces-Wassergehalt erfassen zu können. Sinnvoll wäre auch, während der gesamten Studiendauer eine Ernährungserhebung durchzu-

führen oder die Diät (bzw. verschiedene Diäten) permanent zu kontrollieren, um eine kontinuierlichere Ernährungsweise zu erreichen.

Zwischen den Probanden der Humaninterventionsstudie wurden hinsichtlich der FW-Wirkungen starke individuelle Unterschiede beobachtet, die möglicherweise auf Unterschiede in der Mikroflora zurückzuführen sind. Daher wären nachfolgende Untersuchungen zum Einfluss einer carotinoidreichen Ernährung auf die Mikroflora interessant.

5.6 Schlussbetrachtung und Ausblick

Humaninterventionsstudien zur Untersuchung von isolierten Carotinoiden bzw. anderen Pflanzeninhaltsstoffen lassen vermuten, dass für die Krebsprävention das Ernährungsmuster wichtiger ist als die Aufnahme einzelner als protektiv betrachteter Nährstoffe (siehe 2.4.5). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein breites Spektrum an Colonicarcinogenese-relevanten Faecesmarkern etabliert und eingesetzt werden. Dabei zeigten sich jedoch nur wenige Auswirkungen einer carotinoidreichen Ernährung (hier in Form von Karotten- und Tomatensaft-Konsum) auf die eingesetzten Faeces- bzw. FW-Marker. Die bedeutendste Veränderung schien die Erniedrigung des FW-pH-Wertes durch Karottensaft-Konsum zu sein. Sie könnte auf einer Modifizierung der biochemischen Aktivität der Mikroflora beruhen. Da die FW-Konzentrationen der SCFA Acetat, Propionat und Butyrat durch die Karottensaft-Intervention unbeeinflusst blieben, sollte nachfolgend überprüft werden, welche weiteren Substanzen in Faeceswasser den pH-Wert entscheidend beeinflussen bzw. für die pH-Wert-Erniedrigung durch Karottensaft-Konsum verantwortlich sein könnten. Darüber hinaus sollten umfassende FW-Analysen durchgeführt werden, um die für die cytotoxischen und antiproliferativen FW-Wirkungen hauptsächlich verantwortlichen Substanzen identifizieren zu können. Da die Darmflora maßgeblich am Abbau von luminalen Komponenten beteiligt ist, könnten Faeces-Inkubationen mit Karotten- bzw. Tomaten-Inhaltsstoffen bzw. -Extrakten wichtige Informationen zu potenziell auf das Colonepithel wirksamen Metaboliten liefern. Welche *In-vivo*-Bedeutung die beobachtete Erhöhung der Lipidextrakt-Cytotoxizität - vermutlich infolge Apoptoseinduktion - durch Karotten- und Tomatensaft-Konsum hat, kann aufgrund der hier vorliegenden Daten nicht ausreichend beurteilt werden. Dieser Effekt sollte jedoch ebenfalls in weiteren Studien näher untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten wichtige Informationen zu kritischen Schritten bei der Etablierung von nicht invasiven Biomarkern der Colonicarcinogenese und damit auch zur Bewertung von deren Aussagekraft. Untersuchungen aus dieser Arbeit haben gezeigt, dass bei der FW-Gewinnung die Filtration entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von Faeceswasser im Zellkultursystem hat.

Da durch Filtration hohe Mengen an Untersuchungsmaterial verloren gehen, sollte in zukünftigen Studien ausschließlich unfiltriertes Faeceswasser bzw. Faeceswasser-Medium als wertvolle Alternative für Zellkulturversuche verwendet werden. Um Kontaminationen im Zellkultursystem weitestgehend zu vermeiden, sollte ein verstärkter Einsatz von Antibiotika und Fungiziden erfolgen. Für den Einsatz in der Zellkultur muss Faeceswasser aufgrund der starken cytotoxischen bzw. antiproliferativen *In-vitro*-Wirkung verdünnt werden, wodurch möglicherweise Effekte mancher luminalen Komponenten nicht detektiert werden können. Die Verwendung eines anderen Zellkulturmodells, z.B. Transwells, die Zellen den Transport von Substanzen von der apikalen zur basolateralen Seite ermöglichen, könnte zusätzliche Informationen über potenzielle Effekte von luminalen Komponenten *in vivo* liefern.

In dieser Arbeit blieben bei jungen, gesunden Probanden bei ausgewogener Energie- und Makronährstoffzufuhr zahlreiche Faeces- bzw. FW-Marker durch Karotten- und Tomatensaft-Konsum unbeeinflusst. Fehlende Wirkungen auf die cytotoxischen und antiproliferativen Eigenschaften von Faeceswasser, Lipidperoxidation in Faeces, die FW-GS- und -SCFA-Konzentrationen sowie die bakterielle β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität weisen darauf hin, dass entsprechende physiologische Prozesse unter den beschriebenen Ausgangsbedingungen durch eine carotinoidreiche Ernährung nicht beeinflusst werden und andere anticarcinogene Mechanismen von größerer Bedeutung sind. Dies lässt jedoch nicht den Schluss zu, dass eine Ernährung, reich an carotinoidhaltigem Obst und Gemüse keine protektiven Effekte auf die colorectale Carcinogenese hat, insbesondere dann nicht, wenn durch den Verzehr von carotinoidhaltigem Obst und Gemüse die Aufnahme anderer Nahrungsmittel bzw. Substanzen, die mit einem erhöhten colorectalen Krebsrisiko in Verbindung gebracht werden, vermindert wird. Ob der Verzehr carotinoidreicher Lebensmittel wie Karotten- und Tomatensaft der schädigenden Wirkung von anderen als risikoerhöhend geltenden Lebensmitteln entgegenwirken könnte, ist unklar und sollte in weiteren Humaninterventionsstudien untersucht werden. Wie sich ein hoher Verzehr von Lebensmitteln, die vermehrt andere Carotinoide, z.B. Xanthophylle wie Lutein und Zeaxanthin enthalten, auf das colorectale Krebsrisiko auswirkt, sollte ebenfalls Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

AGA (2000). American Gastroenterological Association medical position statement: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 118: 1233-1234

Al Delaimy WK, Van Kappel AL, Ferrari P, Slimani N, Steghens JP, Bingham S, Johansson I, Wallstrom P, Overvad K, Tjonneland A, Key TJ, Welch AA, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Boeing H, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Guibout C, Navarro C, Quiros JR, Palli D, Celentano E, Trichopoulou A, Benetou V, Kaaks R, Riboli E (2004). Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr.* 7: 713-722

Albanes D, Malila N, Taylor PR, Huttunen JK, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Barrett MJ, Pietinen P, Hartman TJ, Sipponen P, Lewin K, Teerenhovi L, Hietaanen P, Tangrea JA, Virtanen M, Heinonen OP (2000). Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on colorectal cancer: results from a controlled trial (Finland). *Cancer Causes Control* 11: 197-205

Alberts DS, Einspahr JG, Earnest DL, Krutzsch MF, Lin P, Hess LM, Heddens DK, Roe DJ, Martinez ME, Salen G, Batta AK (2003). Fecal bile acid concentrations in a subpopulation of the wheat bran fiber colon polyp trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 197-200

Alberts DS, Martinez ME, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, Earnest DL, Sampliner RE (2000). Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network. *N.Engl.J.Med.* 342: 1156-1162

Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahu T, Levy J, Sharoni Y (1999). Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr.Cancer* 33: 105-112

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2004). *Krebs in Deutschland*, 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe ed. Saarbrücken

ATBC (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* 330: 1029-1035

Augeron C, Labois CL (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 44: 3961-3969

Ax K, Schubert H, Briviba K, Rechkemmer G, Tevini M (2001). Oil-in-water emulsions as carriers of bioavailable carotenoids. *Proceedings International Congress for Particle Technology* 4-B-153: 1-6

Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, Sedgewick M, Riss G, Wyss A, Cardinault N, Duszka C, Goralczyk R, Grolier P (2002). Feedback regulation of beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J.Nutr.* 132: 3616-3622

- Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER (1999). Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* 340: 101-107
- Baron JA, Cole BF, Mott L, Haile R, Grau M, Church TR, Beck GJ, Greenberg ER (2003). Neoplastic and antineoplastic effects of beta-carotene on colorectal adenoma recurrence: results of a randomized trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 95: 717-722
- Bartram HP, Gostner A, Kelber E, Dusel G, Weimer A, Scheppach W, Kasper H (1996). Effects of fish oil on fecal bacterial enzymes and steroid excretion in healthy volunteers: implications for colon cancer prevention. *Nutr.Cancer* 25: 71-78
- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20: 2209-2218
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauser BA, Hamilton SR, Jones RJ (1995). Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 1811-1816
- Berlau J, Gleis M, Pool-Zobel BL (2004). Colon cancer risk factors from nutrition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 737-743
- Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Dinning P, Jabi R, Sampliner RE, McCuskey MK, Panda M, Roe DJ, L'Heureux L, Payne C (1999). A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Res.* 59: 2353-2357
- Bertram JS (1999). Carotenoids and gene regulation. *Nutr.Rev.* 57: 182-191
- Bertram JS, Pung A, Churley M, Kappock TJ, Wilkins LR, Cooney RV (1991). Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 12: 671-678
- Bhuvaneshwari V, Velmurugan B, Balasenthil S, Ramachandran CR, Nagini S (2001). Chemopreventive efficacy of lycopene on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Fitoterapia* 72: 865-874
- Biasco G, Paganelli GM, Miglioli M, Brillanti S, Di Febo G, Gizzi G, Ponz dL, Campieri M, Barbara L (1990). Rectal cell proliferation and colon cancer risk in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 50: 1156-1159
- Biesalski HK, Obermueller-Jevic UC (2001). UV light, beta-carotene and human skin-beneficial and potentially harmful effects. *Arch.Biochem.Biophys.* 389: 1-6
- Biesalski H, Köhrle J, Schühman K (2002). Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe - Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. *Georg Thieme Verlag Stuttgart* S.41-48

- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361: 1496-1501
- Bingham SA, Hughes R, Cross AJ (2002). Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J.Nutr.* 132: 3522S-3525S
- Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK (1996). Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis* 17: 515-523
- Bonithon-Kopp C, Kronborg O, Giacosa A, Rath U, Faivre J (2000). Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. European Cancer Prevention Organisation Study Group. *Lancet* 356: 1300-1306
- Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J (2000). Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett.* 154: 201-210
- Briviba K, Schnabele K, Rechkemmer G, Bub A (2004). Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J.Nutr.* 134: 1081-1083
- Briviba K, Schnabele K, Schwertle E, Blockhaus M, Rechkemmer G (2001). beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. *Biological Chemistry* 382: 1663-1668
- Bub A, Watzl B, Abrahamse L, Delincee H, Adam S, Wever J, Muller H, Rechkemmer G (2000). Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. *J.Nutr.* 130: 2200-2206
- Burkitt DP (1971). Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 28: 3-13
- Castenmiller JJ, West CE (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu.Rev.Nutr.* 18: 19-38
- Caygill CP, Charlett A, Hill MJ (1996). Fat, fish, fish oil and cancer. *Br.J.Cancer* 74: 159-164
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human-colon carcinoma-cells - a survey of 20 cell-lines. *Cancer Research* 48: 1936-1942
- Chen J, Stampfer MJ, Hough HL, Garcia-Closas M, Willett WC, Hennekens CH, Kelsey KT, Hunter DJ (1998). A prospective study of N-acetyltransferase genotype, red meat intake, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 3307-3311

- Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Kim DH, Malila N, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Sellers TA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ (2004). Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann. Intern. Med.* 140: 603-613
- Chopra M, O'Neill ME, Keogh N, Wortley G, Southon S, Thurnham DI (2000). Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. *Clin. Chem.* 46: 1818-1829
- Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, Bostwick DG, Williams AW, Moore BJ, Erdman JW, Jr. (1996). Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5: 823-833
- Cohen BI, Raicht RF, Deschner EE, Takahashi M, Sarwal AN, Fazzini E (1980). Effect of cholic acid feeding on N-methyl-N-nitrosourea-induced colon tumors and cell kinetics in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 573-578
- Collins AR, Olmedilla B, Southon S, Granado F, Duthie SJ (1998). Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19: 2159-2162
- Coradini D, Pellizzaro C, Marimpietri D, Abolafio G, Daidone MG (2000). Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *Cell Prolif.* 33: 139-146
- Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* 63: 2358-2360
- Cross AJ, Sinha R (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ. Mol. Mutagen.* 44: 44-55
- Cummings JH, Bingham SA, Heaton KW, Eastwood MA (1992). Fecal weight, colon cancer risk, and dietary intake of nonstarch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology* 103: 1783-1789
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221-1227
- De Kok TM, Van Faassen A, Glinghammar B, Pachen DM, Rafter JJ, Baeten CG, Engels LGJB, Kleinjans JC (1999). Bile acid concentrations, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 2218-2225
- De Kok TM, van Maanen JM (2000). Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat. Res.* 463: 53-101
- De Vries JW (2003). On defining dietary fibre. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 37-43
- Delgado-Vargas F, Paredes-López O (2003), Carotenoids, *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press LLC New York, p 113-166

- Dixon ZR, Shie FS, Warden BA, Burri BJ, Neidlinger TR (1998). The effect of a low carotenoid diet on malondialdehyde-thiobarbituric acid (MDA-TBA) concentrations in women: a placebo-controlled double-blind study. *J.Am.Coll.Nutr.* 17: 54-58
- Dolara P, Caderni G, Salvadori M, Morozzi G, Fabiani R, Cresci A, Orpianesi C, Trallori G, Russo A, Palli D (2002). Fecal levels of short-chain fatty acids and bile acids as determinants of colonic mucosal cell proliferation in humans. *Nutr.Cancer* 42: 186-190
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl.Environ.Microbiol.* 70: 5810-5817
- El Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch.Biochem.Biophys.* 430: 37-48
- Elmadfa I, Majchrzak D (1998). Carotenoids and vitamin A in fish. *Z.Ernahrungswiss.* 37: 207-210
- Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 13: 340-345
- Flood DM, Weiss NS, Cook LS, Emerson JC, Schwartz SM, Potter JD (2000). Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 11: 403-411
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat.Rev.Cancer* 1: 55-67
- Franceschi S, Bidoli E, La Vecchia C, Talamini R, D'Avanzo B, Negri E (1994). Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int.J.Cancer* 59: 181-184
- Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C, Favero A, Talamini R, Negri E (1998). Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum, and breast. *Epidemiology* 9: 338-341
- Friedenreich CM (2001). Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10: 287-301
- Frommel TO, Mobarhan S, Doria M, Halline AG, Luk GD, Bowen PE, Candel A, Liao Y (1995). Effect of beta-carotene supplementation on indices of colonic cell proliferation. *J.Natl.Cancer Inst.* 87: 1781-1787
- Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N.Engl.J.Med.* 340: 169-176
- Fuhrman B, Elis A, Aviram M (1997). Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 233: 658-662

Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int.J.Cancer* 52: 286-289

Garewal H, Bernstein H, Bernstein C, Sampliner R, Payne C (1996). Reduced bile acid-induced apoptosis in "normal" colorectal mucosa: a potential biological marker for cancer risk. *Cancer Res.* 56: 1480-1483

Gartner C, Stahl W, Sies H (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am.J.Clin.Nutr.* 66: 116-122

Geltner-Allinger U, Brismar B, Reinholt FP, Andersson G, Rafter JJ (1991). Soluble fecal acidic lipids and colorectal epithelial cell proliferation in normal subjects and in patients with colon cancer. *Scand.J.Gastroenterol.* 26: 1069-1074

Geltner-Allinger UG, Johansson GK, Gustafsson JA, Rafter JJ (1989). Shift from a mixed to a lactovegetarian diet: influence on acidic lipids in fecal water-a potential risk factor for colon cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 50: 992-996

Gill CI, Rowland IR (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *Br.J.Nutr.* 88 Suppl 1: S73-S87

Gill RK, Saksena S, Alrefai WA, Sarwar Z, Goldstein JL, Carroll RE, Ramaswamy K, Dudeja PK (2005). Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J.Physiol Cell Physiol* 289: C846-C852

Giovannucci E (2001). Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J.Nutr.* 131: 3109S-3120S

Giovannucci E (2002). A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp.Biol.Med. (Maywood.)* 227: 852-859

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC (1995a). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann.Intern.Med.* 122: 327-334

Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE (1995b). Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N.Engl.J.Med.* 333: 609-614

Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC (1995c). Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J.Natl.Cancer Inst.* 87: 265-273

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC (1994a). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann.Intern.Med.* 121: 241-246

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC (1994b). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res.* 54: 2390-2397

- Glinghammar B, Holmberg K, Rafter J (1999). Effects of colonic luminal components on AP-1-dependent gene transcription in cultured human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 20: 969-976
- Glinghammar B, Rafter J (1999). Carcinogenesis in the colon: interaction between luminal factors and genetic factors. *Eur.J.Cancer Prev.* 8 Suppl 1: S87-S94
- Glinghammar B, Rafter J (2001). Colonic luminal contents induce cyclooxygenase 2 transcription in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* 120: 401-410
- Glinghammar B, Venturi M, Rowland IR, Rafter JJ (1997). Shift from a dairy product-rich to a dairy product-free diet: influence on cytotoxicity and genotoxicity of fecal water-potential risk factors for colon cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 66: 1277-1282
- Goldin BR, Gorbach SL (1976). The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 57: 371-375
- Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexton M, Gorbach SL (1980). Effect of diet and Lactobacillus acidophilus supplements on human fecal bacterial enzymes. *J.Natl.Cancer Inst.* 64: 255-261
- Gollnick HPM, Hopfenmuller W, Hemmes C, Chun SC, Schmid C, Sundermeier K, Biesalski HK (1996). Systemic beta carotene plus topical UV-sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: Results of the Berlin-Eilath study. *European Journal of Dermatology* 6: 200-205
- Govers MJ, Termont DS, Lapre JA, Kleibeuker JH, Vonk RJ, Van der MR (1996). Calcium in milk products precipitates intestinal fatty acids and secondary bile acids and thus inhibits colonic cytotoxicity in humans. *Cancer Res.* 56: 3270-3275
- Grady WM, Markowitz SD (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 3: 101-128
- Grasten SM, Juntunen KS, Poutanen KS, Gylling HK, Miettinen TA, Mykkanen HM (2000). Rye bread improves bowel function and decreases the concentrations of some compounds that are putative colon cancer risk markers in middle-aged women and men. *J.Nutr.* 130: 2215-2221
- Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman DH, Jr., Beck GJ, Bond JH, Colacchio TA, Collier JA, Frankl HD, Haile RW (1994). A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.* 331: 141-147
- Grisham MB, MacDermott RP, Deitch EA (1990). Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* 14: 669-680
- Grodzicky T, Elkon KB (2002). Apoptosis: a case where too much or too little can lead to autoimmunity. *Mt.Sinai J.Med.* 69: 208-219
- Gross MD, Bishop TD, Belcher JD, Jacobs DR, Jr. (1997). Induction of HL-60 cell differentiation by carotenoids. *Nutr.Cancer* 27: 169-173
- Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr.Probl.Cancer* 21: 233-300

- Guarner F, Malagelada JR (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519
- Guldutuna S, You T, Kurts W, Leuschner U (1993). High-performance liquid-chromatographic determination of free and conjugated bile-acids in serum, liver biopsies, bile, gastric-juice and feces by fluorescence labeling. *Clinica Chimica Acta* 214: 195-207
- Hague A, Diaz GD, Hicks DJ, Krajewski S, Reed JC, Paraskeva C (1997). Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int.J.Cancer* 72: 898-905
- Hague A, Elder D, Hicks D (1995). Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int J Cancer* 72: 898-905
- Haza AI, Glinghammar B, Grandien A, Rafter J (2000). Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr.Cancer* 36: 79-89
- Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 54: 3288-3293
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J.Nutr.Biochem.* 13: 572-584
- Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W (2003). Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J.Nutr.* 133: 98-101
- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R (1996). Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N.Engl.J.Med.* 334: 1145-1149
- Hermann-Kunz E, Thamm M (1999). Dietary recommendations and prevailing food and nutrient intakes in Germany. *Br.J.Nutr.* 81 Suppl 2: S61-S69
- Hininger IA, Meyer-Wenger A, Moser U, Wright A, Southon S, Thurnham D, Chopra M, van den BH, Olmedilla B, Favier AE, Roussel AM (2001). No significant effects of lutein, lycopene or beta-carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL oxidizability in healthy adult subjects. *J.Am.Coll.Nutr.* 20: 232-238
- Hofmann AF (1999). Bile Acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol Sci.* 14: 24-29
- Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D (2002). Dietary carotenoids, serum beta-carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *Am.J.Epidemiol.* 156: 536-547

- Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelleto R, Cornee J, Duffy S, Gallagher RP, Iscovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB, Peters RK, Potter JD, Riboli E, Slattery ML, Trichopoulos D, Tuyns A, Tzonou A, Watson LF, Whittemore AS, Shu Z (1997). The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control* 8: 215-228
- Hsi LC, Angerman-Stewart J, Eling TE (1999). Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis* 20: 2045-2049
- Huang CS, O'Brien MJ, Yang S, Farraye FA (2004). Hyperplastic polyps, serrated adenomas, and the serrated polyp neoplasia pathway. *Am J.Gastroenterol.* 99: 2242-2255
- Hughes DA (1999). Effects of carotenoids on human immune function. *Proc.Nutr.Soc.* 58: 713-718
- Hughes DA, Wright AJ, Finglas PM, Peerless AC, Bailey AL, Astley SB, Pinder AC, Southon S (1997). The effect of beta-carotene supplementation on the immune function of blood monocytes from healthy male nonsmokers. *J.Lab Clin.Med.* 129: 309-317
- Hughes R, Rowland IR (2001). Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* 22: 43-47
- Huycke MM, Gaskins HR (2004). Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 229: 586-597
- Hylla S, Gostner A, Dusel G, Anger H, Bartram HP, Christl SU, Kasper H, Scheppach W (1998). Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 136-142
- Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF (1999). Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur.J.Cancer* 35: 335-351
- Imray CH, Radley S, Davis A, Barker G, Hendrickse CW, Donovan IA, Lawson AM, Baker PR, Neoptolemos JP (1992). Faecal unconjugated bile acids in patients with colorectal cancer or polyps. *Gut* 33: 1239-1245
- IOM (2000). Food and Nutrition Board Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *Washington, DC: Natl.Acad.Press* p 486
- Jenner AM, Rafter J, Halliwell B (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic.Biol.Med.* 38: 763-772
- Johansson GK, Ottova L, Gustafsson JA (1990). Shift from a mixed diet to a lactovegetarian diet: influence on some cancer-associated intestinal bacterial enzyme activities. *Nutr.Cancer* 14: 239-246
- Johnson EJ, Qin J, Krinsky NI, Russell RM (1997). Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J.Nutr.* 127: 1833-1837

Johnson IT (2002). Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1171-1178

Karas M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, Koifmann A, Giat Y, Levy J, Sharoni Y (2000). Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr. Cancer* 36: 101-111

Khachik F, Spangler CJ, Smith JC, Jr., Canfield LM, Steck A, Pfander H (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.* 69: 1873-1881

Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, von Lintig J (2001). Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276: 14110-14116

Kim DH, Jin YH (2001). Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch. Pharm. Res.* 24: 564-567

Kim HS, Bowen P, Chen L, Duncan C, Ghosh L, Sharifi R, Christov K (2003). Effects of tomato sauce consumption on apoptotic cell death in prostate benign hyperplasia and carcinoma. *Nutr. Cancer* 47: 40-47

Kishida T, Taguchi F, Feng L, Tatsuguchi A, Sato J, Fujimori S, Tachikawa H, Tamagawa Y, Yoshida Y, Kobayashi M (1997). Analysis of bile acids in colon residual liquid or fecal material in patients with colorectal neoplasia and control subjects. *J. Gastroenterol.* 32: 306-311

Klipstein-Grobusch K, Launer LJ, Geleijnse JM, Boeing H, Hofman A, Witteman JC (2000). Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Atherosclerosis* 148: 49-56

Kobayashi H, Tan EM, Fleming SE (2003). Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21WAF1/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status. *Nutr. Cancer* 46: 202-211

Kohlmeier L, Hastings SB (1995). Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1370S-1376S

Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal AF, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ (1997). Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am. J. Epidemiol.* 146: 618-626

Krinsky NI (1991). Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 238S-246S

Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 171-201

Kucuk O, Sarkar FH, Djuric Z, Sakr W, Pollak MN, Khachik F, Banerjee M, Bertram JS, Wood DP, Jr. (2002). Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 227: 881-885

- Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP (2002). Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br.J.Cancer* 86: 1262-1269
- Lang H (2001). Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf humane Kolonkarzinomzelllinien bezüglich Proliferation, Zytotoxizität und Apoptoserate. *Diplomarbeit Universität Hohenheim, durchgeführt am Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe*
- Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF (1994). Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 3: 675-682
- Lapre JA, De Vries HT, Koeman JH, Van der Meer R (1993a). The antiproliferative effect of dietary calcium on colonic epithelium is mediated by luminal surfactants and dependent on the type of dietary fat. *Cancer Res.* 53: 784-789
- Lapre JA, De Vries HT, Van der Meer R (1993b). Cytotoxicity of fecal water is dependent on the type of dietary fat and is reduced by supplemental calcium phosphate in rats. *J.Nutr.* 123: 578-585
- Lapre JA, Termont DS, Groen AK, Van der Meer R (1992). Lytic effects of mixed micelles of fatty acids and bile acids. *Am.J.Physiol* 263: G333-G337
- Lapre JA, Van der Meer R (1992). Diet-induced increase of colonic bile acids stimulates lytic activity of fecal water and proliferation of colonic cells. *Carcinogenesis* 13: 41-44
- Latta RK, Fiander H, Ross NW, Simpson C, Schneider H (1993). Toxicity of bile acids to colon cancer cell lines. *Cancer Lett.* 70: 167-173
- Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV (1997). Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics* 7: 11-19
- Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH (1999). Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women's Health Study. *J.Natl.Cancer Inst.* 91: 2102-2106
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br.J.Surg.* 89: 845-860
- Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y (1995). Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr.Cancer* 24: 257-266
- Liu C, Lian F, Smith DE, Russell RM, Wang XD (2003a). Lycopene supplementation inhibits lung squamous metaplasia and induces apoptosis via up-regulating insulin-like growth factor-binding protein 3 in cigarette smoke-exposed ferrets. *Cancer Res.* 63: 3138-3144
- Liu C, Russell RM, Wang XD (2003b). Exposing ferrets to cigarette smoke and a pharmacological dose of beta-carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J.Nutr.* 133: 173-179

- Liu C, Wang XD, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell RM (2000). Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. *Carcinogenesis* 21: 2245-2253
- Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN (1996). Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum.Pathol.* 27: 102-110
- Lynch HT, Lynch JF (1998). Genetics of colonic cancer. *Digestion* 59: 481-492
- Macdonald IA, Bokkenheuser VD, Winter J, McLernon AM, Mosbach EH (1983). Degradation of steroids in the human gut. *J.Lipid Res.* 24: 675-700
- Mai V, Morris JG (2004). Colonic bacterial flora: Changing understandings in the molecular age. *Journal of Nutrition* 134: 459-464
- Marchetti MC, Migliorati G, Moraca R, Riccardi C, Nicoletti I, Fabiani R, Mastrandrea V, Morozzi G (1997). Possible mechanisms involved in apoptosis of colon tumor cell lines induced by deoxycholic acid, short-chain fatty acids, and their mixtures. *Nutr.Cancer* 28: 74-80
- Martinez JD, Stratagoules ED, LaRue JM, Powell AA, Gause PR, Craven MT, Payne CM, Powell MB, Gerner EW, Earnest DL (1998). Different bile acids exhibit distinct biological effects: the tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation. *Nutr.Cancer* 31: 111-118
- Mastromarino A, Reddy BS, Wynder EL (1976). Metabolic epidemiology of colon cancer: enzymic activity of fecal flora. *Am.J.Clin.Nutr.* 29: 1455-1460
- Mathews-Roth MM (1993). Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 691: 127-138
- McBain AJ, Macfarlane GT (1998). Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J.Med.Microbiol.* 47: 407-416
- Meier PJ, Stieger B (2002). Bile salt transporters. *Annu.Rev.Physiol* 64: 635-661
- Meydani SN, Wu D, Santos MS, Hayek MG (1995). Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am.J.Clin.Nutr.* 62: 1462S-1476S
- Michaud DS, Feskanich D, Rimm EB, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Giovannucci E (2000). Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am.J.Clin.Nutr.* 72: 990-997
- Michels G, Watjen W, Niering P, Steffan B, Thi QH, Chovolou Y, Kampkotter A, Bast A, Proksch P, Kahl R (2005). Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology* 206: 337-348
- Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V (2004). Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J.Biol.Chem.* 279: 13293-13296

Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 7950-7954

Mortensen PB, Clausen MR (1996). Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 216: 132-148

Mucci LA, Tamimi R, Laggiou P, Trichopoulou A, Benetou V, Spanos E, Trichopoulos D (2001). Are dietary influences on the risk of prostate cancer mediated through the insulin-like growth factor system? *BJU.Int.* 87: 814-820

Muhlhofer A, Bühler-Ritter B, Frank J, Zoller WG, Merkle P, Bosse A, Heinrich F, Biesalski HK (2003). Carotenoids are decreased in biopsies from colorectal adenomas. *Clin.Nutr.* 22: 65-70

Muller H, Bub A, Watzl B, Rechkemmer G (1999). Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich foods. *Eur.J.Nutr.* 38: 35-44

Nagengast FM, Grubben MJ, van Munster IP (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur.J.Cancer* 31A: 1067-1070

Nagengast FM, van den BG, Ploemen JP, Leenen R, Zock PL, Katan MB, Hectors MP, de Haan AF, van Tongeren JH (1993). The effect of a natural high-fibre diet on faecal and biliary bile acids, faecal pH and whole-gut transit time in man. A controlled study. *Eur.J.Clin.Nutr.* 47: 631-639

Nahum A, Hirsch K, Danilenko M, Watts CK, Prall OW, Levy J, Sharoni Y (2001). Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene* 20: 3428-3436

Nakamura J, Kubota Y, Miyaoka M, Saitoh T, Mizuno F, Benno Y (2002). Comparison of four microbial enzymes in Clostridia and Bacteroides isolated from human feces. *Microbiol.Immunol.* 46: 487-490

Narisawa T, Fukaura Y, Hasebe M, Ito M, Aizawa R, Murakoshi M, Uemura S, Khachik F, Nishino H (1996). Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett.* 107: 137-142

Narisawa T, Fukaura Y, Terada K, Sekiguchi H (1998). Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon tumorigenesis by ursodeoxycholic acid in F344 rats. *Jpn.J.Cancer Res.* 89: 1009-1013

Newmark HL, Lupton JR (1990). Determinants and consequences of colonic luminal pH: implications for colon cancer. *Nutr.Cancer* 14: 161-173

Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int.J.Cancer* 98: 241-256

Obermueller-Jevic UC, Francz PI, Frank J, Flaccus A, Biesalski HK (1999). Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 460: 212-216

- Ollilainen V, Heinonen M, Linkola E, Varo P, Koivistoinen P (1989). Carotenoids and retinoids in Finnish foods: dairy products and eggs. *J.Dairy Sci.* 72: 2257-2265
- Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martinez E, Berg H, Corridan B, Roussel AM, Chopra M, Thurnham DI (2001). Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br.J.Nutr.* 85: 227-238
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N.Engl.J.Med.* 334: 1150-1155
- Onogi N, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Fukutomi Y, Moriwaki H, Muto Y, Kojima S (1998). Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr.Cancer* 32: 20-24
- Osganian SK, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Manson JE, Willett WC (2003). Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *Am.J.Clin.Nutr.* 77: 1390-1399
- Otamiri T, Sjobahl R (1989). Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer* 64: 422-425
- Owen RW, Dodo M, Thompson MH, Hill MJ (1987). Fecal steroids and colorectal cancer. *Nutr.Cancer* 9: 73-80
- Palozza P, Maggiano N, Calviello G, Lanza P, Piccioni E, Ranelletti FO, Bartoli GM (1998). Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis* 19: 373-376
- Paolini M, Cantelli-Forti G, Perocco P, Pedulli GF, Abdel-Rahman SZ, Legator MS (1999). Co-carcinogenic effect of beta-carotene. *Nature* 398: 760-761
- Payne CM, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H (1995). Role of apoptosis in biology and pathology: resistance to apoptosis in colon carcinogenesis. *Ultrastruct.Pathol.* 19: 221-248
- Payne CM, Crowley C, Washo-Stultz D, Briehl M, Bernstein H, Bernstein C, Beard S, Holubec H, Warneke J (1998). The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis. *Cell Death.Differ.* 5: 623-636
- Pelz R, Schmidt-Faber B, Hesecker H (1998). Carotenoid intake in the German National Food Consumption Survey. *Z.Ernahrungswiss.* 37: 319-327
- Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, Bresalier R, Weissfeld JL, Flood A, Schatzkin A, Hayes RB (2003). Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 361: 1491-1495
- Pinto M, Appay MD, Simonassmann P, Chevalier G, Dracopoli N, Fogh J, Zweibaum A (1982). Enterocytic differentiation of cultured human-colon cancer-cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biology of the Cell* 44: 193-196

- Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolf S (2005). Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 26: 1064-1076
- Porrini M, Riso P (2000). Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J.Nutr.* 130: 189-192
- Potten CS, Wilson JW, Booth C (1997). Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15: 82-93
- Potter JD (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *J.Natl.Cancer Inst.* 91: 916-932
- Powell AA, LaRue JM, Batta AK, Martinez JD (2001). Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *Biochem.J.* 356: 481-486
- Qiao D, Chen W, Stratagoules ED, Martinez JD (2000). Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J.Biol.Chem.* 275: 15090-15098
- Que FG, Gores GJ (1996). Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 110: 1238-1243
- Rafter J, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tuijtelars S, van Loo J (2004). PASSCLAIM--diet-related cancer. *Eur.J.Nutr.* 43 Suppl 2: I147-I184
- Rafter JJ, Child P, Anderson AM, Alder R, Eng V, Bruce WR (1987). Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *Am.J.Clin.Nutr.* 45: 559-563
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srari SK, Moore KP, Rice-Evans CA (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic.Biol.Med.* 36: 212-225
- Reddy BS (1992). Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids* 27: 807-813
- Reddy BS, Engle A, Simi B, Goldman M (1992). Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* 102: 1475-1482
- Reddy BS, Mangat S, Weisburger JH, Wynder EL (1977). Effect of high-risk diets for colon carcinogenesis on intestinal mucosal and bacterial beta-glucuronidase activity in F344 rats. *Cancer Res.* 37: 3533-3536
- Reddy BS, Watanabe K (1979). Effect of cholesterol metabolites and promoting effect of lithocholic acid in colon carcinogenesis in germ-free and conventional F344 rats. *Cancer Res.* 39: 1521-1524
- Reinacher-Schick A, Schmiegel W (2002). Pathogenesis of colorectal carcinoma. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 91: 1589-1593

- Renehan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, Potten CS (2002). Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis.* 4: 76-89
- Reuter G (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2: 43-53
- Riboli E, Norat T (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 559S-569S
- Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C (1999). A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis* 20: 2311-2316
- Rock CL, Kusluski RA, Galvez MM, Ethier SP (1995). Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr. Cancer* 23: 319-333
- Rock CL, Loalvo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ (1998). Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J. Nutr.* 128: 913-916
- Rock CL, Swendseid ME (1992). Plasma beta-carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *Am J. Clin. Nutr.* 55: 96-99
- Rodriguez-Amaya DB (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49: 38S-47S
- Romano M, Claria J (2003). Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J.* 17: 1986-1995
- Rousset M (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68: 1035-1040
- Sandhu MS, Dunger DB, Giovannucci EL (2002). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 972-980
- Santos MS, Meydani SN, Leka L, Wu D, Fotouhi N, Meydani M, Hennekens CH, Gaziano JM (1996). Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 772-777
- Sato R, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Hoffman SC, Norkus EP, Comstock GW (2002). Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 11: 451-457
- Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, Shike M, Weissfeld J, Burt R, Cooper MR, Kikendall JW, Cahill J (2000). Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342: 1149-1155
- Scheppach W, Bartram HP, Richter F (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 31A: 1077-1080

- Schwartz JL, Tanaka J, Khandekar V, Herman TS, Teicher BA (1992). Beta-carotene and/or vitamin E as modulators of alkylating agents in SCC-25 human squamous carcinoma cells. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 29: 207-213
- Segain JP, Raingeard dIB, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47: 397-403
- Segal I (1998). Rarity of colorectal adenomas in the African black population. *Eur.J.Cancer Prev.* 7: 387-391
- Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA (1998). Alcohol and cancer. *Recent Dev.Alcohol* 14: 67-95
- Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der MR (1999). Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res.* 59: 5704-5709
- Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der MR (2000). Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis* 21: 1909-1915
- Sesso HD, Liu S, Gaziano JM, Buring JE (2003). Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *J.Nutr.* 133: 2336-2341
- Shao RG, Shimizu T, Pommier Y (1997). 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp.Cell Res.* 234: 388-397
- Sharoni Y, Danilenko M, Dubi N, Ben Dor A, Levy J (2004). Carotenoids and transcription. *Arch.Biochem.Biophys.* 430: 89-96
- Sies H, Stahl W (1997). Carotenoids and intercellular communication via gap junctions. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 67: 364-367
- Sies H, Stahl W (2004). Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu.Rev.Nutr.* 24: 173-200
- Singh B, Halestrap AP, Paraskeva C (1997). Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 18: 1265-1270
- Stadler J, Stern HS, Yeung KS, McGuire V, Furrer R, Marcon N, Bruce WR (1988a). Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids. *Gut* 29: 1326-1331
- Stadler J, Yeung KS, Furrer R, Marcon N, Himal HS, Bruce WR (1988b). Proliferative activity of rectal mucosa and soluble fecal bile acids in patients with normal colons and in patients with colonic polyps or cancer. *Cancer Lett.* 38: 315-320
- Stahl W, Ale-Agha N, Polidori MC (2002). Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol.Chem.* 383: 553-558

- Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H (2000a). Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 71: 795-798
- Stahl W, Junghans A, de Boer B, Driomina ES, Briviba K, Sies H (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.* 427: 305-308
- Stahl W, Schwarz W, Sies H (1993). Human serum concentrations of all-trans beta- and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J.Nutr.* 123: 847-851
- Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H (1992). Cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch.Biochem.Biophys.* 294: 173-177
- Stahl W, von Laar J, Martin HD, Emmerich T, Sies H (2000b). Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch.Biochem.Biophys.* 373: 271-274
- Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR (2000). Perspectives in the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 13: 229-254
- Steinmetz KA, Potter JD (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 427-442
- Stephen AM, Cummings JH (1980). The microbial contribution to human faecal mass. *J.Med.Microbiol.* 13: 45-56
- Stivala LA, Savio M, Quarta S, Scotti C, Cazzalini O, Rossi L, Scovassi IA, Pizzala R, Melli R, Bianchi L, Vannini V, Prosperi E (2000). The antiproliferative effect of beta-carotene requires p21waf1/cip1 in normal human fibroblasts. *Eur.J.Biochem.* 267: 2290-2296
- Sun Z, Wang X, Wallen R, Deng X, Du X, Hallberg E, Andersson R (1998). The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand.J.Gastroenterol.* 33: 415-422
- Tejpar S, Van Cutsem E (2002). Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 16: 171-185
- Terpstra OT, van Blankenstein M, Dees J, Eilers GA (1987). Abnormal pattern of cell proliferation in the entire colonic mucosa of patients with colon adenoma or cancer. *Gastroenterology* 92: 704-708
- Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462
- Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek SM, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Conry C (1999). Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266
- Tong X, Yin L, Giardina C (2004). Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 317: 463-471

- Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G, Rowland I, Dolara P, Pool-Zobel BL (1999). The carbohydrate crystalline and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats. *Eur.J.Nutr.* 38: 76-83
- van den Heuvel EG, Wils D, Pasman WJ, Saniez MH, Kardinaal AF (2005). Dietary supplementation of different doses of NUTRIOSE((R))FB, a fermentable dextrin, alters the activity of faecal enzymes in healthy men. *Eur.J.Nutr.* [Epub ahead of print]
- Van der Meer R, Lapre JA, Govers MJ, Kleibeuker JH (1997). Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 114: 75-83
- Van der Meer R, Termont DS, De Vries HT (1991). Differential effects of calcium ions and calcium phosphate on cytotoxicity of bile acids. *Am.J.Physiol* 260: G142-G147
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31: 1-9
- van het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J.Nutr.* 130: 503-506
- van Munster IP, Tangerman A, de Haan AF, Nagengast FM (1993). A new method for the determination of the cytotoxicity of bile acids and aqueous phase of stool: the effect of calcium. *Eur.J.Clin.Invest* 23: 773-777
- van Poppel G, Goldbohm RA (1995). Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *Am.J.Clin.Nutr.* 62: 1393S-1402S
- Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, Rafter JJ, Rowland IR (1997). Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 18: 2353-2359
- Visioli F, Riso P, Grande S, Galli C, Porrini M (2003). Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur.J.Nutr.* 42: 201-206
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9: 138-141
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.* 10: 789-799
- Wachtershauser A, Stein J (2000). Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur.J.Nutr.* 39: 164-171
- Walker AR, Walker BF, Walker AJ (1986). Faecal pH, dietary fibre intake, and proneness to colon cancer in four South African populations. *Br.J.Cancer* 53: 489-495
- Wang XD, Russell RM (1999). Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr.Rev.* 57: 263-272
- Watson AJ (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* 53: 1701-1709

Watzl B, Bub A (2001). Carotinoide - Basiswissen aktualisiert. *Ernährungsumschau* 48: 71-74

Watzl B, Bub A, Blockhaus M, Herbert BM, Luhrmann PM, Neuhauser-Berthold M, Rechkemmer G (2000). Prolonged tomato juice consumption has no effect on cell-mediated immunity of well-nourished elderly men and women. *J.Nutr.* 130: 1719-1723

Watzl B, Bub A, Brandstetter BR, Rechkemmer G (1999). Modulation of human T-lymphocyte functions by the consumption of carotenoid-rich vegetables. *Br.J.Nutr.* 82: 383-389

Watzl B, Bub A, Briviba K, Rechkemmer G (2003). Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men. *Ann.Nutr.Metab* 47: 255-261

WCRF (1997). Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. *World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, Washington*

Welfare MR, Cooper J, Bassendine MF, Daly AK (1997). Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis* 18: 1351-1354

Weststrate JA, Meijer GW (1998). Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur.J.Clin.Nutr.* 52: 334-343

Weststrate JA, van het Hof KH (1995). Sucrose polyester and plasma carotenoid concentrations in healthy subjects. *Am J.Clin.Nutr.* 62: 591-597

WHO (2003). World Cancer Report. *World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Press Lyon*

Willett WC (1995). Diet, nutrition, and avoidable cancer. *Environ.Health Perspect.* 103 Suppl 8: 165-170

Williams AW, Boileau TW, Clinton SK, Erdman JW, Jr. (2000). Beta-carotene stability and uptake by prostate cancer cells are dependent on delivery vehicle. *Nutr.Cancer* 36: 185-190

Williams BA, Verstegen MW, Tamminga S (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews* 14: 207-227

Wilson RG, Smith AN, Bird CC (1990). Immunohistochemical detection of abnormal cell proliferation in colonic mucosa of subjects with polyps. *J.Clin.Pathol.* 43: 744-747

Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 73: 451S-455S

Wu JT, Archer SY, Hinnebusch B, Meng S, Hodin RA (2001). Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280: G482-G490

- Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA, Giovannucci EL (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J.Natl.Cancer Inst.* 94: 437-446
- Yeum KJ, Russell RM (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu.Rev.Nutr.* 22: 483-504
- You CS, Parker RS, Goodman KJ, Swanson JE, Corso TN (1996). Evidence of cis-trans isomerization of 9-cis-beta-carotene during absorption in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 64: 177-183
- Young AJ, Lowe GM (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch.Biochem.Biophys.* 385: 20-27
- Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X (1999). Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J.Natl.Cancer Inst.* 91: 151-156
- Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ (1998). Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J.Biol.Chem.* 273: 2424-2428
- Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS (1992). Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res.* 52: 5707-5712
- Zhu D, Keohavong P, Finkelstein SD, Swalsky P, Bakker A, Weissfeld J, Srivastava S, Whiteside TL (1997). K-ras gene mutations in normal colorectal tissues from K-ras mutation-positive colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 57: 2485-2492

7 TABELLENANHANG

Tab. 7.1: Carotinoid-Gehalte im Stuhl (MW±SD) in Abhängigkeit der Studienphasen. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$: signifikanter Unterschied zur Depletionsphase (D) direkt vor der jeweiligen Saft-Intervention.

	Faeces-Carotinoid-Gehalte [nmol/g Faeces]		
Carotinoid	Karottensaft-Konsum		
	D vor KI	Intervention (KI)	D nach KI
β -Carotin	4,8±2,0	229,2±96,1***	4,2±1,8
α -Carotin	0,9±1,8	94,3±36,0***	0,5±0,4
Lycopin	0,5±1,5	0,4±0,9	5,3±16,4 ¹
Lutein	5,2±2,8	8,5±5,1	5,7±2,8
β -Cryptoxanthin	0,3±0,2	u.N. ²	0,4±0,4
Zeaxanthin	0,8±0,4	0,5±0,8	0,6±0,8
	Tomatensaft-Konsum		
	D vor TI	Intervention (TI)	D nach TI
β -Carotin	5,8±4,6	1,4±3,2*	4,6±2,0
α -Carotin	0,6±0,7	1,8±2,7	0,3±0,7
Lycopin	4,6±15,0	273,4±151,2	0,5±1,5
Lutein	8,2±7,3	4,8±5,1	5,6±2,7
β -Cryptoxanthin	0,4±0,5	0,1±0,3	0,2±0,2
Zeaxanthin	0,8±0,5	0,2±0,5**	0,8±0,3

¹ Hohe SD durch den hohen Lycopin-Gehalt einer Stuhlprobe (aus Gruppe A (K/T); 52,0 nmol Lycopin/g Faeces) bedingt.

² u.N.=unterhalb der Nachweisgrenze, signifikant erniedrigte β -Cryptoxanthin-Gehalte im Stuhl nach Karottensaft-Konsum verglichen mit Depletionsphasen vor und nach der Karottensaft-Intervention ($P \leq 0,023$; Tukey-Test nach einfacher Varianzanalyse mit wiederholten Messungen).

Tab. 7.2: Prozentualer Anteil der all-*trans*-Isomere von β -Carotin und Lycopin in Faeces- und Plasma-Proben der entsprechenden Saft-Interventionen sowie in Karotten- und Tomatensaft (MW \pm SD (n)). Die Plasma-Daten wurden von PD Dr. med. (SU) Briviba (BFEL, Karlsruhe) für diese Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Statistischer Vergleich der Plasma- und Faeces-Daten: *** $P\leq 0,001$.

Carotinoid	all- <i>trans</i> -Isomerenanteil [%]		
	Faeces	Plasma	Saft
β -Carotin (KI)	89 \pm 3 (12)	93 \pm 7 (12)	87 \pm 1 (3)
Lycopin (TI)	82 \pm 17 (12)	37 \pm 12*** (12)	82 \pm 0,3 (3)

Tab. 7.3: Stabilität von β -Carotin und Lycopin in Faeces- und FW-Proben von zwei Probanden über einen Zeitraum von acht Monaten (MW \pm SD, n=3).

Zeit [Monate]	β -Carotin-Gehalt		
	Faeces [nmol/g Stuhl]	Faeces+BHT [nmol/g Stuhl]	FW [μ M]
0	116,7 \pm 6,5	108,2 \pm 14,2	22,6 \pm 0,6
1	128,5 \pm 11,5	119,2 \pm 2,8	23,8 \pm 1,4
2	140,3 \pm 1,2	120,4 \pm 5,6	23,9 \pm 2,0
4	143,1 \pm 8,7	128,3 \pm 10,0	25,5 \pm 2,0
6	144,9 \pm 7,4	125,5 \pm 6,9	26,6 \pm 2,9
8	142,8 \pm 2,6	121,2 \pm 16,0	24,5 \pm 0,4
Zeit [Monate]	Lycopin-Gehalt		
	Faeces [nmol/g Stuhl]	Faeces+BHT [nmol/g Stuhl]	FW [μ M]
0	392,7 \pm 37,5	393,0 \pm 6,0	89,5 \pm 8,2
1	470,8 \pm 15,5	408,8 \pm 31,8	91,0 \pm 5,5
2	468,8 \pm 6,3	433,7 \pm 17,3	100,1 \pm 22,3
4	418,6 \pm 54,2	465,5 \pm 10,6	111,4 \pm 5,0
6	462,4 \pm 20,3	372,5 \pm 27,1	106,1 \pm 8,3
8	442,7 \pm 15,7	381,8 \pm 27,7	93,4 \pm 4,3

Tab. 7.4: Cytotoxische und proliferationshemmende Wirkung von unfiltrierten FW-Proben auf HT-29 Zellen in Abhängigkeit der Saft-Interventionen, dargestellt in %Faeceswasser in Komplettmedium (MW±SD).

FW-Parameter	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
EC ₂₅ -Werte (Cytotoxizität, n=5)	3,6±1,4	6,0±4,3	4,4±2,2	4,6±1,6
IC ₅₀ -Werte (Proliferationshemmung, n=3)	0,9±0,1	0,8±0,4	0,9±0,6	0,8±0,3

Tab. 7.5: Konzentrationen von verschiedenen Gallensäuren [µM] in steril-filtriertem Faeceswasser (MW±SD, n=8).

Gallensäure	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
UCA	2,7±2,1	1,8±0,6	3,0±2,4	3,9±3,6
CA	1,8±1,0	1,2±0,7	1,8±1,4	2,2±1,9
CDCA	1,0±0,5	0,9±0,6	0,9±0,7	1,3±1,0
DCA	5,8±6,5	3,4±2,3	6,2±4,4	5,2±3,3
LCA	1,1±0,7	1,3±0,9	1,4±0,7	1,8±1,2
Gallensäuren _{gesamt}	12,4±8,9	8,6±3,3	13,3±7,0	14,5±8,7

Tab. 7.6: Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren [μM] in steril-filtriertem Faeceswasser ($\text{MW}\pm\text{SD}$). * = signifikanter Unterschied zur Depletionsphase (D) direkt vor der jeweiligen Saft-Intervention mit $P\leq 0,05$.

Fettsäure	Karottensaft		Tomatensaft	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (KI)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (TI)
Acetat	75,5 \pm 20,4	76,8 \pm 22,6	68,8 \pm 21,8	70,1 \pm 23,3
Propionat	22,4 \pm 10,3	18,6 \pm 6,7	21,9 \pm 9,1	18,3 \pm 8,5*
Butyrat	27,1 \pm 11,3	28,5 \pm 11,8	23,5 \pm 11,3	23,3 \pm 8,9
SCFA _{gesamt}	124,9 \pm 34,5	123,9 \pm 36,5	114,2 \pm 35,0	111,7 \pm 31,1
Anzahl der Messdaten (n)	n=8	n=7	n=8	n=8

Tab. 7.7: Signifikante bzw. tendenzielle Korrelationen zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Parametern. Dargestellt sind die errechneten Korrelationskoeffizienten (r) mit zugehörigen P-Werten und Anzahl der Messdaten (n). * $P\leq 0,05$; ** $P\leq 0,01$; *** $P\leq 0,001$.

Parameter 1	Parameter 2	r	n
Stuhlgewicht	Faeces-Wassergehalt	0,41**	48
FW- β -Carotin-Konzentration	Faeces- β -Carotin-Gehalt	0,95***	8
FW-Lycopin-Konzentration	Faeces-Lycopin-Gehalt	0,93***	8
Faeces- β -Carotin-Gehalt	Faeces-Lycopin-Gehalt	0,54 ($P=0,07$)	12
Faeces-MDA-Gehalt	Faeces-Wassergehalt	-0,35 ($P=0,11$)	23 ¹
Cytotoxischer Effekt von steril-filtriertem FW (EC_{25})	Anteil primärer GS in FW	0,61**	16 ¹
Antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem FW (IC_{50})	Faeces-MDA-Gehalt	-0,63***	28
Antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem FW (IC_{50})	FW-DCA-Konzentration	0,39*	28

¹ Messdaten aus Studienperiode II wurden in die Korrelationsanalyse nicht miteinbezogen, da bei der Crossover-Analyse bei einem der Parameter Perioden- oder Nachwirkungseffekte auftraten.

Fortsetzung von Tab. 7.7

Parameter 1	Parameter 2	r	n
Antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem FW (IC ₅₀)	Faeces-Wassergehalt	0,40 (P=0,16)	14 ¹
FW-pH	FW-Acetat-Konzentration	-0,41*	31
FW-pH	FW-Butyrat-Konzentration	-0,46*	31
FW-pH	FW-SCFA _{ges} -Konzentration	-0,36*	31
FW-Acetat-Konzentration	Cytotoxischer Effekt von unfiltriertem FW (EC ₂₅)	-0,53*	19
FW-Acetat-Konzentration	Antiproliferative Wirkung von unfiltriertem FW (IC ₅₀)	-0,55 (P=0,06)	12
FW-Propionat-Konzentration	Cytotoxischer Effekt von unfiltriertem FW (EC ₂₅)	-0,46*	19
FW-Propionat-Konzentration	Antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem FW (IC ₅₀)	0,50*	24
FW-Propionat-Konzentration	Antiproliferative Wirkung von unfiltriertem FW (IC ₅₀)	0,58*	12
FW-Butyrat-Konzentration	Cytotoxischer Effekt von unfiltriertem FW (EC ₂₅)	-0,45*	19
FW-Butyrat-Konzentration	Antiproliferative Wirkung von unfiltriertem FW (IC ₅₀)	-0,50 (P=0,10)	12
FW-SCFA _{ges} -Konzentration	Cytotoxischer Effekt von unfiltriertem FW (EC ₂₅)	-0,59**	19
FW-SCFA _{ges} -Konzentration	Antiproliferative Wirkung von unfiltriertem FW (IC ₅₀)	-0,50 (P=0,09)	12
FW-β-Glucosidase-Aktivität	Antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem FW (IC ₅₀)	-0,62**	16

¹ Messdaten aus Studienperiode II wurden in die Korrelationsanalyse nicht miteinbezogen, da bei der Crossover-Analyse bei einem der Parameter Perioden- oder Nachwirkungseffekte auftraten.

Fortsetzung von Tab. 7.7

Interkorrelierte Variablen			
Parameter 1	Parameter 2	r	n
FW-Acetat-Konzentration	FW-Butyrat-Konzentration	0,87***	31
Faeces-MDA-Gehalt	FW-DCA-Konzentration	-0,48**	27
FW- β -Glucosidase-Aktivität	FW-Propionat-Konzentration	-0,52*	19
FW-DCA-Konzentration	FW-Propionat-Konzentration	0,35 ($P=0,07$)	27

Tab. 7.8: Einflussfaktoren auf die cytotoxische und antiproliferative Wirkung von steril-filtriertem Faeceswasser. Ergebnisse der vorwärts schrittweise multiplen Regressionsanalyse.

Abhängige Variable	Prädiktorvariablen ²	Koeffizienten		SE ¹	P
		nichtstandardisiert	standardisiert		
Cytotoxische FW-Wirkung (EC ₂₅) n=16 ³	Anteil primärer GS in FW [%]	0,112	0,607	0,04	0,01
Antiproliferative FW-Wirkung (IC ₅₀) n=16	Faeces-MDA-Gehalt [nmol/g]	-0,18	-0,68	0,03	<0,001
	FW- β -Glucosidase-Aktivität [mg Substrat/h*ml FW]	-0,40	-0,46	0,11	0,003

¹ SE: Standardfehler

² Unabhängige, automatisch in das Regressionsmodell aufgenommene Variablen.

³ Für die Regressionsanalyse der cytotoxischen Wirkung von steril-filtriertem Faeceswasser wurden aufgrund der in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Periodeneffekte nur die Daten der ersten Studienperiode herangezogen.

Tab. 7.9: Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroseraten von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation mit Kontrollmedien (MW±SD, n=6). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$ im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

Kontrollmedium	Parameter	Anteil [%] nach 2h-Inkubation	Anteil [%] nach 5h-Inkubation
Negativ-Kontrolle	Vitalität	89,2±3,6	87,9±2,6
	Apoptose	3,9±1,1	3,1±0,8
	Nekrose	5,6±3,1	7,1±3,3
Positiv-Kontrolle (je 1,0µM ST/BFA)	Vitalität	86,9±2,5	82,7±4,2*
	Apoptose	8,7±2,9**	12,1±2,4***
	Nekrose	3,4±1,2	4,9±2,3
BHT-Kontrolle (100µM)	Vitalität	88,4±1,3	86,3±7,7
	Apoptose	4,7±0,8	3,0±0,8
	Nekrose	5,44±0,9	9,5±6,7

Tab. 7.10: Einfluss von Faeces-Lipidextrakten (LPE) auf Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroserate von HT-29 Zellen nach 2- und 5h-Inkubation (MW±SD, n=6) in Abhängigkeit der Studienphasen. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ im Vergleich zur Depletionsphase (D) vor der entsprechenden Saft-Intervention.

Saft Parameter	Anteil [%] nach 2h-Inkubation mit LPE		Anteil [%] nach 5h-Inkubation mit LPE	
	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (I)	vor Saft-Konsum (D)	nach Saft-Konsum (I)
Karottensaft				
Vitalität	84,4±3,3	81,3±4,7	82,4±9,1	74,0±18,6
Apoptose	3,6±1,2	7,7±7,0	3,2±0,3	13,0±21,1
Nekrose	8,3±2,9	8,1±3,8	12,6±8,0	11,9±5,6
Tomatensaft				
Vitalität	84,6±5,3	80,2±4,4	77,4±8,7	74,7±14,4
Apoptose	4,2±0,9	7,3±2,4**	3,4±0,3	6,6±2,6*
Nekrose	7,4±3,4	9,3±3,3	13,8±8,5	16,8±16,5

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Kerstin Janine Schnäbele
Geburtsdatum	17.05.1973
Geburtsort	Karlsruhe
Familienstand	nicht verheiratet

Schulbildung

1980 – 1984	Grund- und Hauptschule Esslingen-Sulzgries
1984 – 1993	Schelztorgymnasium Esslingen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

Oktober 1993 – Juli 2000	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Hohenheim Vertiefungsfach: Spezielle Biochemie - Vitamine
August 1999 – Juli 2000	Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie, Thema: Wirkung von β -Carotin auf Proliferation und Apoptose von humanen Colonicarcinomzelllinien Betreuung: PD Dr. med. (SU) K. Briviba
August 2000 – Mai 2003	Experimenteller Teil der Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Karlsruhe, Institut für Ernährungsphysiologie Thema: Einfluss von Karotten- und Tomatensaft-Konsum auf Colonicarcinogenese-relevante Faecesmarker beim Menschen Betreuung: PD Dr. med. (SU) K. Briviba

Berufstätigkeit

- April 1999 – Mai 2003 Freie Mitarbeit im Ernährungszentrum
Mittlerer Oberrhein am Amt für Landwirtschaft
Bruchsal, Dienststelle Karlsruhe Augustenberg
Bereiche: Verbraucherinformation, Fachvorträge,
Multiplikatorenveranstaltungen
- August 2000 – Mai 2003 Wissenschaftliche Angestellte an der
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und
Lebensmittel Karlsruhe,
Institut für Ernährungsphysiologie
Tätigkeitsschwerpunkt: siehe Berufsausbildung
- Juni 2003 - heute Wissenschaftliche Assistentin an der Technischen
Universität München, Wissenschaftszentrum
Weihenstephan, Lehrstuhl für Biofunktionalität
der Lebensmittel
Hauptaufgaben: Mitwirkung beim Aufbau des neu
eingerrichteten Lehrstuhls, Forschungstätigkeit mit
Schwerpunkt Charakterisierung von physiologischen
und biochemischen Wirkungen von Lebensmitteln
und deren Inhaltsstoffen, Lehrtätigkeit

Publikationen

- Schnabele K, Schwertle E, Briviba K, Rechkemmer G (2001). Antiproliferative und apoptoseinduzierende Wirkung von β -Carotin auf humane Colonicarcinomzelllinien. Posterpräsentation, *Wissenschaftlicher Kongress der DGE*, Giessen
- Briviba K, Schnabele K, Schwertle E, Blockhaus M, Rechkemmer G (2001). β -Carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells *in vitro* by induction of apoptosis. *Biological Chemistry* 382: 1663-1668
- Briviba K, Schnabele K, Rechkemmer G, Bub A (2004). Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *Journal of Nutrition* 130: 2200-2206

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die deutsche Krebshilfe (Fördernummer 70-2165) finanziert und am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Rechkemmer für die Bereitstellung des Themas und das Vertrauen in meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Biesalski für die Übernahme der Betreuung an der Universität Hohenheim.

Ganz besonders Herrn PD Dr. Briviba für die umfassende wissenschaftliche Betreuung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, das große Interesse an meiner Arbeit und seine Geduld bei der Fertigstellung des Manuskripts.

Claudia und Serap für die exzellente praktische Unterstützung im Labor.

Silvia für die wertvollen Korrekturvorschläge für das Manuskript und die ausgezeichnete alte und neue Zusammenarbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Ernährungsphysiologie für die stetige Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Frau Becker vom Institut für Physiologie der tierärztlichen Hochschule Hannover für die gaschromatographische Analyse der kurzkettigen Fettsäuren.

Herrn Korn und Wolfgang für die Tipps zur statistischen Auswertung der Daten.

Herrn Krause für die Lösung von Computerproblemen.

Anja und Sheila für die Endkorrektur des Manuskripts.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biofunktionalität der Lebensmittel der Technischen Universität München für ihre Unterstützung, Zeit zur Fertigstellung des Manuskripts freizuschaffen.

Allen Freunden, die schon immer mal eine Frau Doktor in ihrer Mitte haben wollten und geduldig darauf warteten.

Meiner Familie für ihre tolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ganz besonders meinem Freund Alex für die große Liebe, den Glauben an mich und den unermüdlichen Rückhalt.