

3 ERGEBNISSE

Die Bestimmungsmethoden für die Enzymaktivität und die Zellproliferation wurden auf SK-N-SH-Zellen (humane Tumorzellen aus Neuroblastomgewebe) übertragen, auf deren Oberflächen NEP- und ACE-Enzyme lokalisiert sind. Durch die Arbeit an Zellen war es möglich, Langzeiteffekte der Naturstoffe zu untersuchen. Ermittelt und verglichen wurden die Veränderung der Enzymaktivitäten auf den Zelloberflächen sowie die Proliferationsentwicklung nach 96stündiger Inkubation unter Zusatz der untersuchten Substanzen. Die Enzymaktivität wurde in pmol/min/µg DNA berechnet. Die mittlere spezifische NEP-Aktivität betrug 2.8 ± 0.2 pmol/min/µg DNA (n=66 mit vier parallelen Proben), die mittlere spezifische ACE-Aktivität betrug 0.7 ± 0.06 pmol/min/µg DNA (n=39 mit vier parallelen Proben). Eine DNA-Menge von 1.0 µg entspricht ca. 100000 Zellen. Ein weiterer Mittelwert für die Enzymaktivität von allen Kontrollen wurde für die beiden Enzyme (NEP und ACE) in fmol/min/Zelle umgerechnet. Die NEP-Aktivität betrug 0.028 ± 0.002 fmol/min/Zelle, für die ACE-Aktivität 0.007 ± 0.0006 pmol/min/Zelle.

3.1 Einfluss von Grüntee-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

3.1.1 Einfluss des Grüntee-Extrakts

Für die Klärung des Einflusses des Grüntee-Extraktes (Nr.85.942-3000220) auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurden Langzeitversuche in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µg/ml bis 100.0 µg/ml durchgeführt (Tab. 1). Der Grüntee-Extrakt erhöhte in einer Konzentration von 25.0 µg/ml die NEP-Aktivität um 20 %. Bei 50.0 µg/ml konnte er die NEP-Aktivität sogar um 150 % erhöhen.

In der maximalen Konzentration wurde eine NEP-Aktivitätssteigerung von über 2000 % beobachtet. Die Induktion der NEP-Aktivität war von einer Hemmung der Zellproliferation begleitet.

Tabelle 1: Einfluss des Grüntee-Extrakts auf NEP-Aktivität und Zellproliferation

Extraktkonzentration in $\mu\text{g/ml}$	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
1.0	100 ± 7	100 ± 8
10.0	117 ± 7	91 ± 9
25.0	$122 \pm 5^*$	$87 \pm 12^{**}$
50.0	$250 \pm 4^*$	$45 \pm 5^{**}$
100.0	$2100 \pm 8^*$	$6 \pm 10^{**}$

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 6)).

3.1.2 Untersuchung von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin

In diesem Abschnitt wurden die Wirkungen der Inhaltsstoffe des Grüntee-Extraktes, Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation geprüft. Der Einfluss von diesen Substanzen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde im Rahmen von Langzeitversuchen im Konzentrationsbereich von $1.0 \mu\text{M}$ bis 1.0mM durchgeführt (Abb. 13).

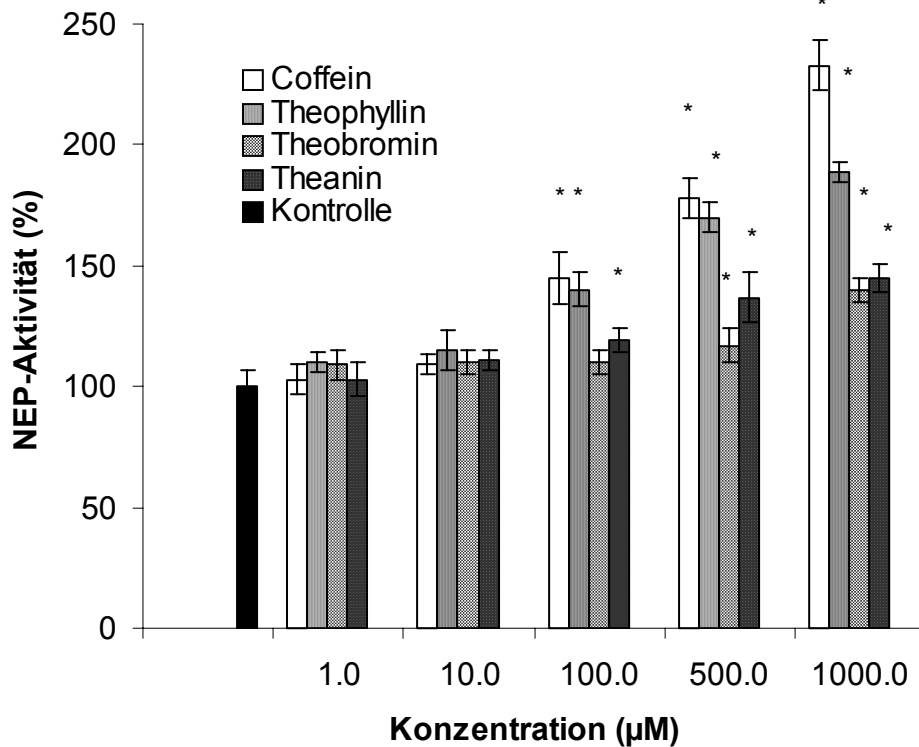


Abbildung 13: Untersuchung der Wirkungen von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP- Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle)

Coffein erhöhte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 130 % und hemmte die Zellproliferation um 55 %. Theophyllin konnte die NEP-Aktivität in der höchsten Konzentration um 90 % steigern bei einer gleichzeitigen Hemmung der Zellproliferation um 44 %. Theobromin ließ die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 40 % ansteigen und hemmte die Zellproliferation um 20 %. Theanin konnte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 45 % erhöhen (Abb. 13) und die Zellproliferation um 18 % hemmen (Tab. 2).

Tabelle 2: Der Einfluss von Coffein, Theophyllin, Theobromin und Theanin auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Coffein	1.0	103 \pm 6	97 \pm 9
	10.0	109 \pm 4	95 \pm 10
	100.0	145 \pm 11*	83 \pm 9
	500.0	178 \pm 8*	64 \pm 11**
	1000.0	233 \pm 10*	45 \pm 10**
Theophyllin	1.0	110 \pm 4	93 \pm 8
	10.0	115 \pm 8	88 \pm 9
	100.0	140 \pm 7*	88 \pm 9
	500.0	170 \pm 6*	66 \pm 11**
	1000.0	189 \pm 4*	56 \pm 10**
Theobromin	1.0	109 \pm 6	99 \pm 4
	10.0	110 \pm 5	99 \pm 6
	100.0	110 \pm 5	99 \pm 5
	500.0	117 \pm 7*	90 \pm 9
	1000.0	140 \pm 5*	75 \pm 8**
Theanin	1.0	103 \pm 7	99 \pm 4
	10.0	111 \pm 4	96 \pm 4
	100.0	119 \pm 5*	91 \pm 4
	500.0	137 \pm 10*	83 \pm 11**
	1000.0	145 \pm 6*	82 \pm 5**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 8)).

3.1.3 Untersuchung von Polyphenolen: (-) Epicatechin, (-)Epigallocatechin und Epigallocatechingallat

Zuerst wurden die Effekte des jeweiligen Polyphenols einzeln auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation in den Konzentrationen von 1.0 μM und 10.0 μM untersucht (Tab. 3 und 4). Der Einfluss von diesen Substanzen wurde im Rahmen von Langzeitversuchen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation untersucht.

Epicatechin (EC) erhöhte die NEP-Aktivität in 10.0 μM Konzentration um 20 % und hemmte die Zellproliferation um 12 %. Epigallocatechin (EGC) konnte die Aktivität der NEP um 29 % steigern mit gleichzeitiger Hemmung der Zellproliferation um 16 %. Das Epigallocatechingallat (EGCG) hatte keinen Einfluss auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation.

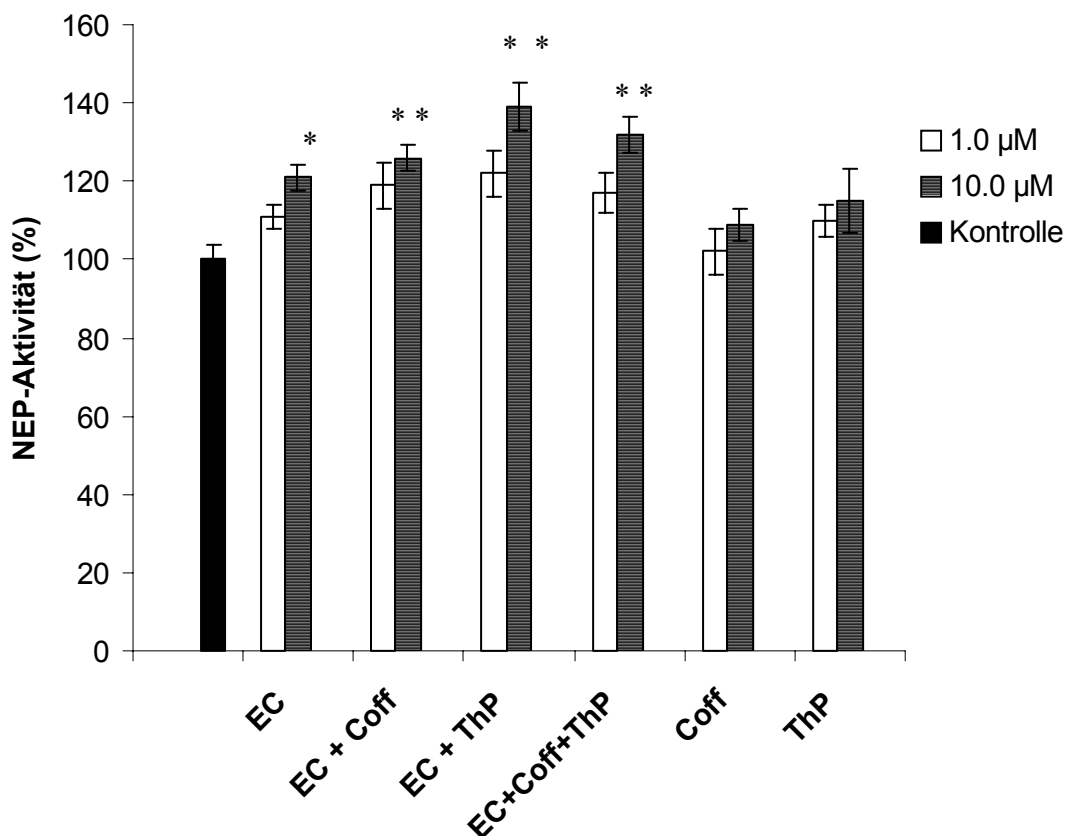


Abbildung 14: Einfluss von Epicatechin (EC), Coffein (Coff) und Theophyllin (ThP) sowie deren Kombinationen auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, $n=3$ mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

Die Einflüsse von EC, EGC und EGCG auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurden weiterhin in Kombination mit Coffein und/oder Theophyllin und/oder Theobromin untersucht. EC in Kombination mit Coffein steigerte die NEP-Aktivität um 25 % und erhöhte die Zellproliferation bis 95 %, anstatt 88 % mit EC allein. EC mit Theophyllin hob die Enzymaktivität um 39 % ohne signifikante Hemmung der Zellproliferation an. Während EC mit Coffein und Theophyllin zusammen die Enzymaktivität um 30 % erhöhten (Abb. 14), wurde auf die Zellproliferation kein Einfluss registriert (Tab. 3).

Tabelle 3: Einfluss von Epicatechin (EC) und seinen Kombinationen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EC	1.0	111 \pm 3	95 \pm 7
	10.0	121 \pm 3*	88 \pm 6**
EC + Coff	1.0	119 \pm 6*	95 \pm 5
	10.0	125 \pm 3*	95 \pm 5
EC + ThP	1.0	121 \pm 6*	94 \pm 4
	10.0	139 \pm 6*	94 \pm 4
EC + ThB	1.0	109 \pm 6*	98 \pm 3
	10.0	120 \pm 5*	98 \pm 4
EC + Coff + ThP	1.0	117 \pm 5*	98 \pm 1
	10.0	132 \pm 5*	94 \pm 2

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 5); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 6).

Die Kombination von EGC mit Coffein und/oder Theophyllin steigerte die Enzymaktivität um 50 % (Abb. 15) wobei bei der Zellproliferation keine Hemmung festgestellt wurde (Tab. 4).

Die Kombination von EGCG mit Coffein und/oder Theophyllin hatte weder Auswirkungen auf die NEP-Aktivität noch auf die Zellproliferation (Tab. 4). Die Kombination von EC, EGC und EGCG mit Theobromin hatte auf die NEP-Aktivität

keinen Effekt mehr, führte jedoch zum Anstieg der Zellproliferation im Gegensatz zur Hemmung der Zellproliferation mit EC und EGC als Einzelsubstanzen (Tab. 3 und 4).

Tabelle 4: Einfluss von Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechingallat (EGCG) und ihren Kombinationen auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EGC	1.0	116 \pm 4*	89 \pm 9
	10.0	129 \pm 2*	84 \pm 9**
EGC + Coff	1.0	119 \pm 9*	97 \pm 3
	10.0	150 \pm 7*	95 \pm 3
EGC + ThP	1.0	140 \pm 7*	94 \pm 4
	10.0	148 \pm 4*	95 \pm 3
EGC + ThB	1.0	114 \pm 5*	100 \pm 3
	10.0	125 \pm 3*	99 \pm 3
EGC + Coff + ThP	1.0	115 \pm 2*	99 \pm 2
	10.0	125 \pm 2*	96 \pm 4
EGCG	1.0	108 \pm 10	99 \pm 7
	10.0	112 \pm 6	99 \pm 5
EGCG + Coff	1.0	113 \pm 8	100 \pm 7
	10.0	113 \pm 9	103 \pm 6
EGCG + ThP	1.0	110 \pm 6	100 \pm 4
	10.0	119 \pm 9	97 \pm 6
EGCG + ThB	1.0	104 \pm 5	104 \pm 5
	10.0	105 \pm 8	100 \pm 6
EGCG + Coff + ThP	1.0	114 \pm 3	97 \pm 6
	10.0	117 \pm 5	97 \pm 5

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 5); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 6).

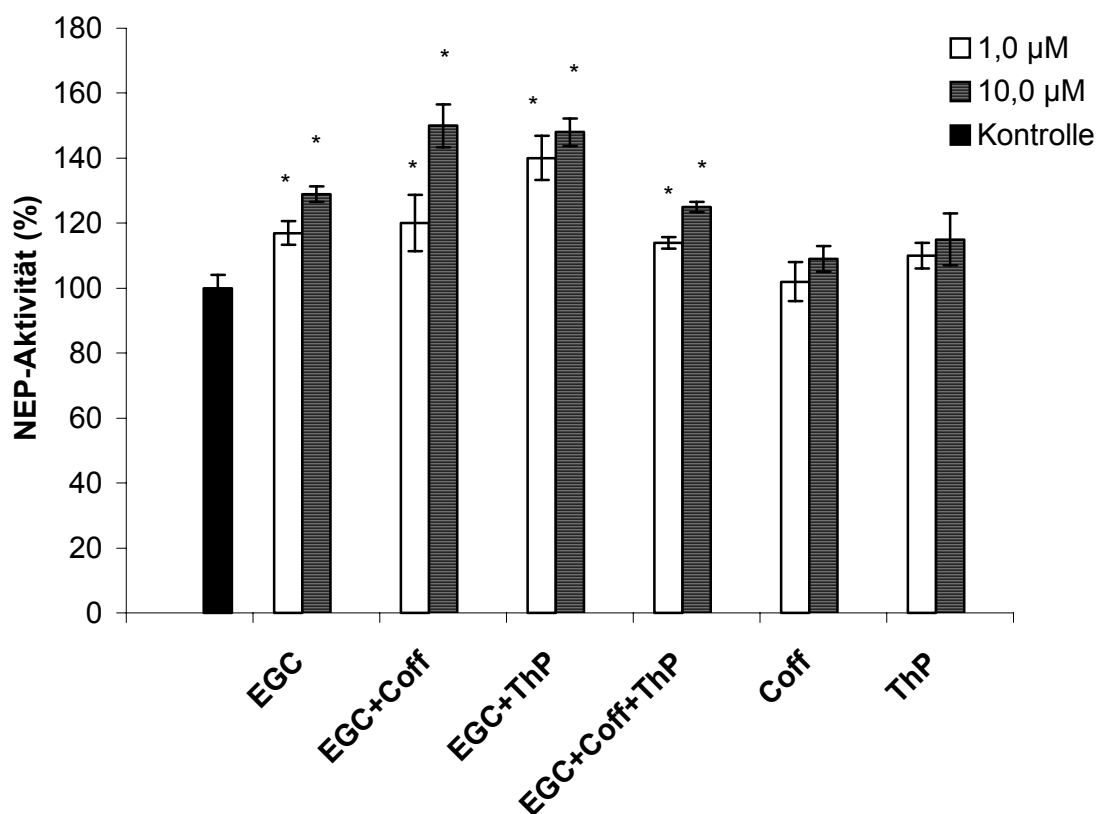


Abbildung 15: Einfluss von Epigallocatechin (EGC), Coffein (Coff) und Theophyllin (ThP) sowie deren Kombinationen auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.2 Einfluss von Ginkgo-biloba-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

3.2.1 Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts

Der Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde im Rahmen von Langzeitversuchen ermittelt. Der Ginkgo-biloba-Extrakt (EGb 761[®]) wurde in unterschiedlichen Lösungsmitteln (Wasser, Ethanol 50 %, DMSO 50 %) aufgenommen.

Die wässrige Lösung des Extrakts induzierte signifikant ab einer Konzentration von 50 µg/ml die NEP-Aktivität. In der maximalen Konzentration des Extraktes wurde die NEP-Aktivität um 80 % erhöht. Die ethanolische Lösung des Extrakts steigerte die Enzymaktivität in der Konzentration von 100.0 µg/ml um 82 %. Durch den DMSO-

Lösung des Extrakts stieg die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 20 % (Tab. 5).

Tabelle 5: Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Extrakt- konzentration in µg/ml	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle			Zellproliferation in % zur Kontrolle		
	Wasser 100 %	Ethanol 50 %	DMSO 50 %	Wasser 100 %	Ethanol 50 %	DMSO 50 %
1.0	103±9	100±14	100±6	101±7	100±7	100±5
5.0	100±8	99±14	100±6	103±5	103±4	100±6
10.0	108±19	106±12	98±4	103±4	100±6	105±7
25.0	118±17	130±12*	98±3	96±8	83±10**	101±6
50.0	138±19*	173±16*	108±9	82±10**	63±12**	92±9
75.0	140±16*	175±14*	118±6	80±13**	61±12**	86±8
100.0	180±19*	182±8*	128±7*	73±11**	53±5**	78±7**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 8)); Ethanol und DMSO wurden in der Konzentration von 0.5 % auf die Kontrolle gegeben.

3.2.2 Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon

Da der Ginkgo-biloba-Extrakt das Enzym induzierte, wurden zunächst die Substanzen, die im Extrakt vorhanden sind, einzeln hinsichtlich ihrer Wirkung auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation untersucht. Hierdurch konnten Hinweise auf die verantwortlichen Inhaltstoffgruppen gewonnen werden. Es wurden die Einflüsse des Bilobalids, der Ginkgolide A und B sowie des Amentoflavons auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation im Rahmen von Langzeitversuchen im Konzentrationsbereich von 1.0 µM bis 50.0 µM geprüft. Bilobalid, Ginkgolid A und B hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation.

Amentoflavon hemmte in der maximalen Konzentration sowohl die NEP-Aktivität als auch die Zellproliferation (Tab. 6).

Tabelle 6: Einfluss von Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Amentoflavon auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Bilobalid	1.0	97 \pm 10	104 \pm 6
	10.0	103 \pm 9	105 \pm 7
	20.0	102 \pm 10	107 \pm 8
	50.0	107 \pm 9	102 \pm 7
Ginkgolid A	1.0	101 \pm 7	102 \pm 14
	10.0	105 \pm 9	99 \pm 13
	20.0	108 \pm 12	98 \pm 9
	50.0	113 \pm 10	99 \pm 4
Ginkgolid B	1.0	108 \pm 9	97 \pm 7
	10.0	109 \pm 13	95 \pm 10
	20.0	108 \pm 14	99 \pm 11
	50.0	112 \pm 11	91 \pm 6
Amentoflavon	1.0	104 \pm 6	100 \pm 12
	10.0	98 \pm 4	107 \pm 8
	20.0	98 \pm 12	105 \pm 7
	50.0	85 \pm 9*	73 \pm 7**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant schwächere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 9); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 9)).

3.2.3 Einfluss von Bilobalids und der Ginkgolide A und B in Kombination

Zunächst wurden die Substanzen als Kombination bei den Konzentrationen 10.0 μM und 20.0 μM im Rahmen von Langzeitversuchen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Die Kombination von Bilobalid, Ginkgolid A und B hemmte die NEP-Aktivität und die Zellproliferation in den getesteten Konzentrationen (Tab. 7).

Tabelle 7: Einfluss der Kombination von Bilobalid, Ginkgolid A und B auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
10.0	$62 \pm 7^*$	$56 \pm 14^{**}$
20.0	$67 \pm 7^*$	$52 \pm 8^{**}$

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant schwächere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 10); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 11)).

3.3 Einfluss von Flavonoiden auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente mit Apigenin und Luteolin zusammengefasst. Der Einfluss von Apigenin und Luteolin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation wurde in den Konzentrationsbereichen von $1.0 \mu\text{M}$ bis $50.0 \mu\text{M}$ im Rahmen von Kurz- und Langzeitversuchen erfasst.

In den Kurzzeitversuchen hemmte Apigenin die NEP-Aktivität bei der Konzentration $10.0 \mu\text{M}$ um 20 % und in der maximalen Konzentration um 32 %. Luteolin konnte die NEP-Aktivität in der maximalen Konzentration um 47 % hemmen (Tab. 8).

In den Langzeitversuchen konnten Apigenin und Luteolin bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die NEP-Aktivität um 150 % erhöhen (Abb. 16) und die Zellproliferation um 70 % hemmen (Tab. 9).

Tabelle 8: Einfluss von Apigenin und Luteolin (Kurzzeit) auf die NEP-Aktivität

	Konzentration	NEP-Aktivität
	in μM	in % zur Kontrolle
Apigenin	10.0	80 \pm 9*
	20.0	73 \pm 12*
	30.0	69 \pm 9*
	50.0	68 \pm 10*
Luteolin	10.0	80 \pm 7*
	20.0	77 \pm 8*
	30.0	67 \pm 9*
	50.0	53 \pm 8*

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 1 Stunde (Kurzzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 10)).

Tabelle 9: Einfluss von Apigenin und Luteolin (Langzeitversuche) auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation.

	Konzentration	NEP-Aktivität	Zellproliferation
	in μM	in % zur Kontrolle	in % zur Kontrolle
Apigenin	1.0	104 \pm 11	92 \pm 10
	5.0	106 \pm 7	86 \pm 5
	10.0	254 \pm 17*	31 \pm 13**
	20.0	507 \pm 18*	15 \pm 11**
	30.0	638 \pm 13*	12 \pm 13**
	50.0	816 \pm 9*	10 \pm 7**
Luteolin	1.0	105 \pm 8	97 \pm 11
	5.0	107 \pm 7	85 \pm 6
	10.0	250 \pm 13*	23 \pm 22**
	20.0	580 \pm 7*	9 \pm 12**
	30.0	623 \pm 16*	8 \pm 10**
	50.0	1452 \pm 17*	5 \pm 9**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 72–96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 11); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 12)).

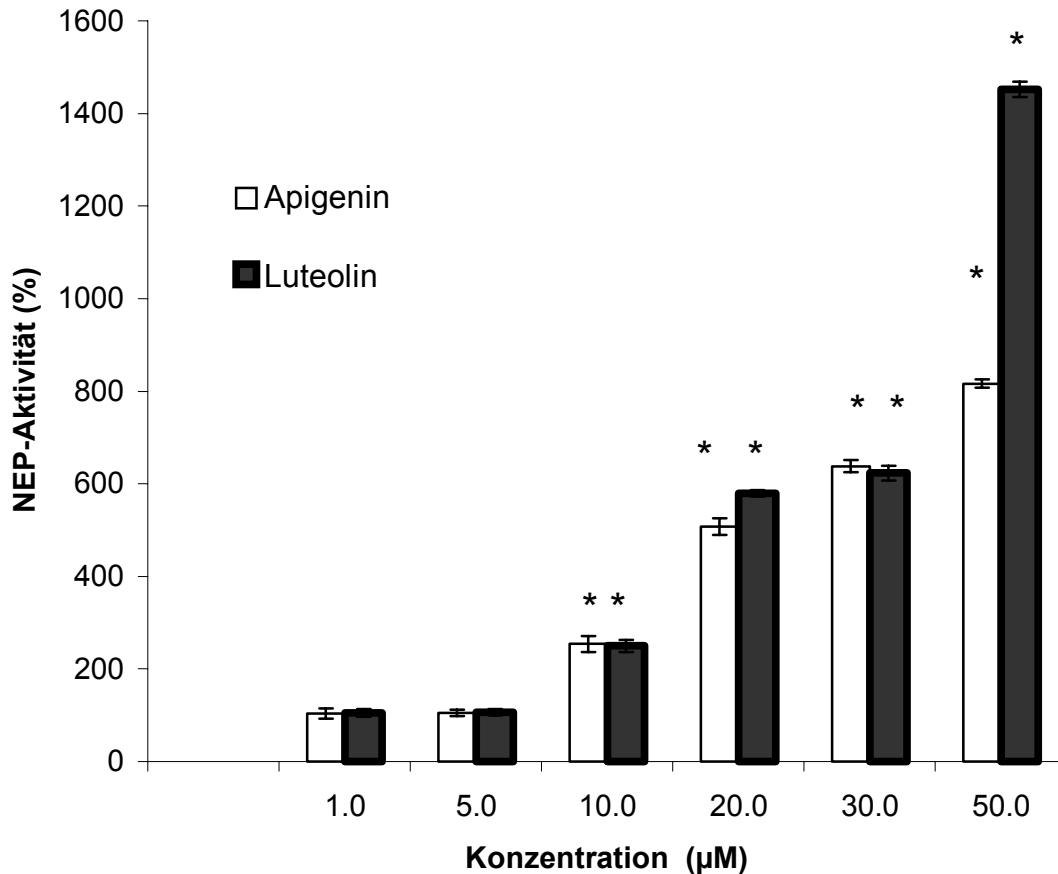


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses von Apigenin und Luteolin auf die NEP-Aktivität
 Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 5.2.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche);
 Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; *
 signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 11).

3.4 Untersuchung von weiteren Naturstoffen

In diesem Kapitel wurden die Einflüsse der folgenden Substanzen im Rahmen von Langzeitversuchen dargestellt: Vinpocetin, Curcumin, Nikotin, Deoxyepiganin und Triiodotyronin (T3). Die Auswahl der Substanzen erfolgte aufgrund ihrer positiven Wirkungen bei Demenz und AD (Imamoto et al. 1984; Ono et al. 2004; Belluardo et al. 2004; Tarasiuk et al. 1989; Latasa et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Substanzen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht.

Vinpocetin wurde im Konzentrationsbereich von 1.0 µM bis 50.0 µM untersucht. In der maximalen Konzentration induzierte Vinpocetin die NEP-Aktivität um 62 % und hemmte die Zellproliferation um 72 % (Tab. 10). Curcumin wurde im Konzentrationsbereich von 0.5 µM bis 5.0 µM untersucht. In der maximalen Konzentration konnte Curcumin die NEP-Aktivität um 190 % erhöhen und die Zellproliferation um 73 % hemmen (Tab. 10). Triiodotyronin wurde bei

Konzentrationen von 0.01 μM bis 10.0 μM untersucht. Triiodotyronin hatte weder Einfluss auf die NEP-Aktivität noch auf die Zellproliferation (Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin (T3) auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Vinpocetin	Kontrolle	100 \pm 9	100 \pm 7
	1.0	100 \pm 5	100 \pm 4
	10.0	119 \pm 4*	80 \pm 8**
	20.0	128 \pm 10*	52 \pm 9**
	30.0	137 \pm 10*	39 \pm 12**
	50.0	162 \pm 5*	28 \pm 6**
Curcumin	Kontrolle	100 \pm 10	100 \pm 7
	0.5	101 \pm 8	95 \pm 5
	1.0	107 \pm 16	85 \pm 8
	2.5	143 \pm 11*	60 \pm 13**
	5.0	290 \pm 10*	27 \pm 15**
Triiodotyronin	Kontrolle	100 \pm 8	100 \pm 6
	0.01	99 \pm 8	100 \pm 6
	0.1	102 \pm 7	101 \pm 4
	1.0	98 \pm 9	101 \pm 6
	5.0	93 \pm 10	102 \pm 5
	10.0	90 \pm 9	102 \pm 4

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

Nikotin und Deoxyepiganin wurden in Konzentrationen von 1.0 μM bis 1.0 mM untersucht. Deoxyepiganin erhöhte in der maximalen Konzentration die NEP-Aktivität um 44 % mit gleichzeitiger Hemmung der Zellproliferation um 34 %. Nikotin hatte keinen Einfluss, weder auf die NEP-Aktivität, noch auf die Zellproliferation (Tab. 11).

Tabelle 11: Einfluss von Deoxypeganin und Nikotin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

	Konzentration in μM	NEP-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Deoxypeganin	1.0	105 \pm 10	98 \pm 5
	10.0	120 \pm 12	85 \pm 11
	100.0	126 \pm 8*	80 \pm 9**
	500.0	132 \pm 5*	68 \pm 12**
	1000.0	144 \pm 11*	66 \pm 49**
Nikotin	1.0	100 \pm 5	100 \pm 4
	10.0	99 \pm 7	100 \pm 6
	100.0	100 \pm 5	101 \pm 7
	500.0	105 \pm 7	99 \pm 9

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle(100 \pm 10)).

3.5 Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen der untersuchten Extrakte und Reinsubstanzen

3.5.1 Blockade der Synthese von DNA durch Arabinosylcytosin

Die ersten Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen wurden an SK-N-SH-Zellen mit Blockade der DNA-Synthese durchgeführt. Arabinosylcytosin wirkt als ein selektiver Blocker der DNA-Synthese (Kufe and Major 1982). Verschiedene Konzentrationen (5.0-100.0 ng/ml) von Arabinosylcytosin wurden über einen Zeitraum von 96 Stunden ins Zellsystem appliziert und die Auswirkungen auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht.

Am Verlauf der Kurve der Wachstumshemmung wurde deutlich, dass kein plötzlicher Zelltod stattfand, sondern eine Hemmung des Zellwachstums vorlag, welche von der Konzentration abhängig war. Arabinosylcytosin induzierte allein die NEP-Aktivität in Zusammenhang mit einer starken Hemmung der Zellproliferation. Bei einer Konzentration von 60.0 ng/ml wurde die Aktivität der NEP um 264 % erhöht und die Zellproliferation um 72 % gehemmt (Abb. 17). Dies wies auf eine Erhöhung der Zelldifferenzierung hin.

Mit Hilfe der Hämatoxylinfärbung konnte die vermutete Zelldifferenzierung durch 60.0 ng/ml Arabinosylcytosin bestätigt werden, die verstärkte Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Ausläufer (Abb. 18).

Alle weiteren Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus fanden bei einer Konzentration von 60.0 ng/ml statt.

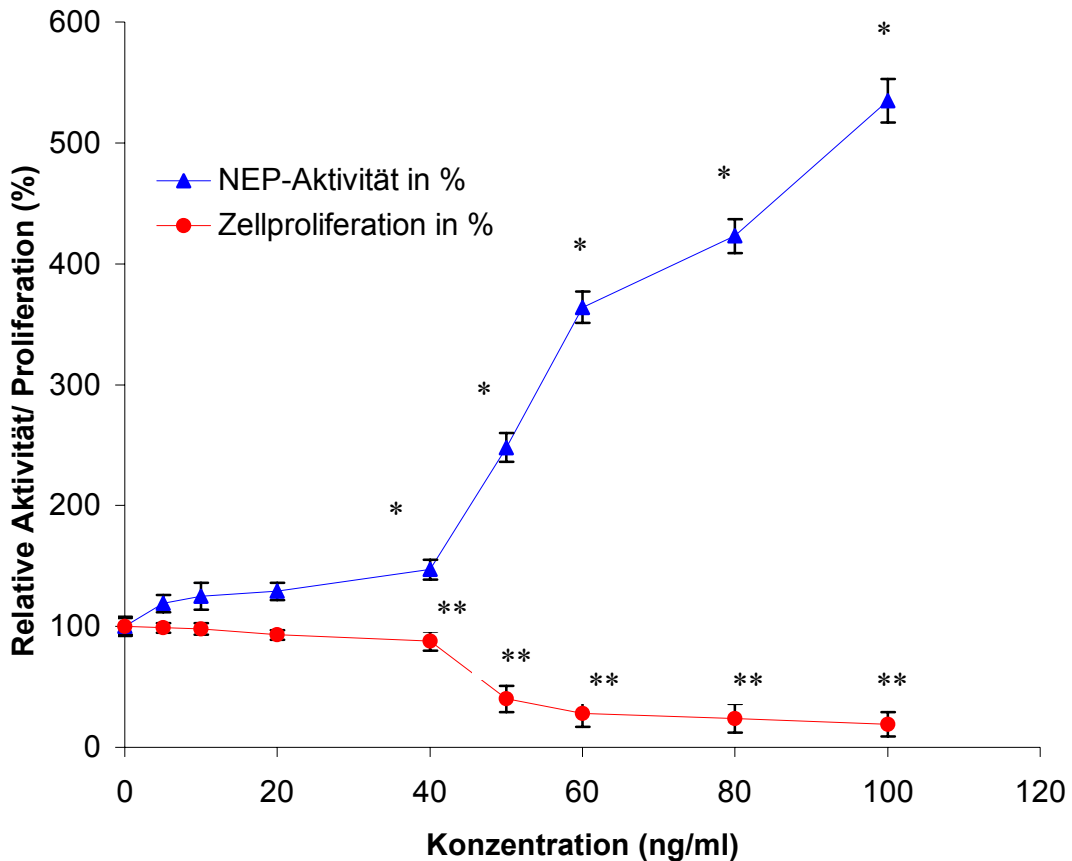
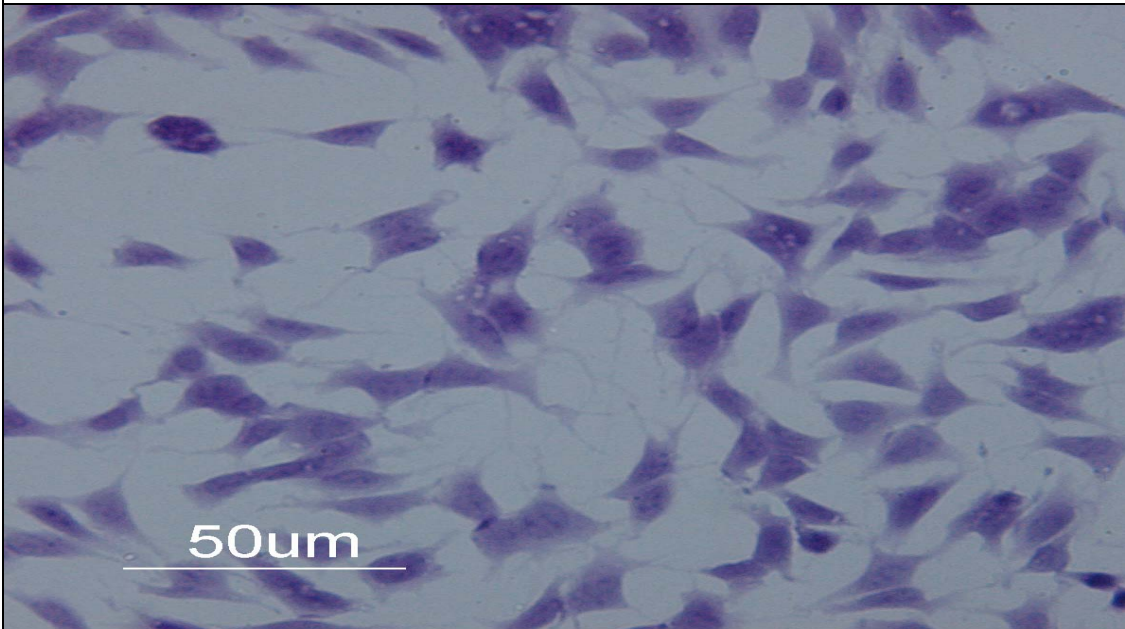


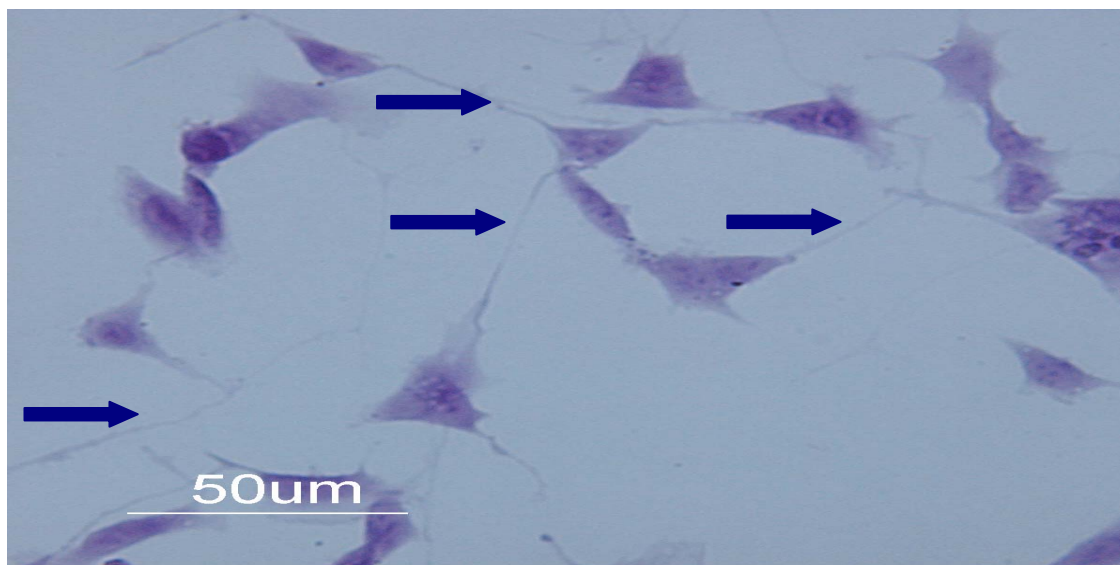
Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses von Arabinosylcytosin auf die NEP-Aktivität und die Zellproliferation

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 10 ; ** signifikant stärkere Proliferationshemmung im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 11).

Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Abbildung von SK-N-SH-Monolayern mit und ohne Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)



a) Monolayer einer intakten SK-N-SH-Zelllinie
(Proliferationszeit: 72h, Hämatoxylinfärbung)




b) SK-N-SH-Zellen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)
(Proliferationszeit: 72h, Hämatoxylinfärbung)

Hämatoxylinfärbung: siehe Abschnitt 2.9

Abbildung 18: Einfluss von Arabinosylcytosin auf die Proliferation der SK-N-SH-Zelllinie

a) SK-N-SH-Zellen ohne Arabinosylcytosin

b) SK-N-SH-Zellen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml)

 Neuriten-ähnliche Ausläufer → Kennzeichen für differenzierte Nervenzellen

3.5.2 Einfluss von ausgewählten untersuchter Substanzen in Kombination mit Arabinosylcytosin

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die NEP-Aktivität nach der Blockade der DNA-Synthese untersuchten. Diese Substanzen konnten konzentrationsabhängig die NEP-Aktivität erhöhen und die Zellproliferation hemmen (siehe Tab. 2; 3; 4; 9 und 10). Aus diesem Grund wurden sie für diese Versuche ausgewählt. Es sollte herausgefunden werden, ob die Erhöhung der Enzym-Aktivität durch diese Substanzen von der Zelldifferenzierung abhängig war. Für diese Untersuchungen wurde Arabinosylcytosin, als Blocker der DNA-Synthese, in einer Konzentration von 60.0 ng/ml verwendet. Im Rahmen von Langzeitversuchen wurden die untersuchten Substanzen zusammen mit Arabinosylcytosin (60.0 ng/ml) auf die SK-N-SH-Zellen gegeben. Coffein, Theophyllin und Theanin wurden in der Konzentration von 50 µM untersucht, während Apigenin, Luteolin und die Kombination von EC, EGC, EGCG und Coffein in der Konzentration von 10 µM untersucht wurden. Vinpocetin wurde in der Konzentration von 10 µM und 20 µM untersucht und Curcumin wurde in in der Konzentration von 2.5 µM und 5 µM getestet. Nach der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin hatten Coffein, Theophyllin und Theanin keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der NEP. Die Kombination von EC, EGC, EGCG und Coffein erhöhte die NEP-Aktivität um 20 %.

Curcumin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der NEP. Apigenin und Luteolin konnten die NEP-Aktivität zusätzlich um 35 % bzw. 38 % erhöhen (Tab. 12).

Vinpocetin hemmte bei 10.0 µM die NEP-Aktivität um 30 % und erhöhte die Zellproliferation um 59 %. In der Konzentration von 20 µM konnte Vinpocetin die NEP-Aktivität um 55 % hemmen und die Zellproliferation um 90 % im Vergleich zur Kontrolle erhöhen. Im Vergleich zur Zellproliferation ohne Arabinosylcytosin könnte diese Erhöhung damit erklärt werden, dass Vinpocetin den totalen Effekt von Arabinosylcytosin auf die Zellproliferation nicht aufhebt (Tab. 12).

Tabelle 12: Einfluss von Coffein (Coff), Theophyllin (ThP), EC in Kombination mit EGC, EGCG und Coffein (Coff), Theanin (ThN), Curcumin (Cur), Apigenin (Api), Luteolin (Lut) und Vinpocetin (Vin) nach der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin (ARC) (60.0 ng/ml) auf die Aktivität der NEP

	Konzentration	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Ohne ARC	00.00	100 ± 10	100 ± 11
ARS	60.0 ng/ml	364 ± 13*	28 ± 11
Coff	50.0 µM	377 ± 12	27 ± 12
ThP	50.0 µM	366 ± 11	27 ± 13
EC+EGC+EGCG+Coff	10.0 µM	384 ± 8*	25 ± 6
ThN	50.0 µM	368 ± 10	25 ± 11
Cur	2.5 µM	370 ± 10	25 ± 5
	5.0 µM	377 ± 5	28 ± 9
Api	10.0 µM	499 ± 12*	34 ± 13
Lut	10.0 µM	500 ± 6*	25 ± 9
Vin	10.0 µM	334 ± 10*	34 ± 10**
	20.0 µM	309 ± 7*	45 ± 9**

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (60 ng/ml Arabinosylcytosin)); ** signifikant stärkere Erhöhung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (60 ng/ml Arabinosylcytosin)).

3.5.3 Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram

Trotz der Blockade der DNA-Synthese durch Arabinosylcytosin wurde die NEP-Aktivität durch einige der untersuchten Substanzen erhöht. Das könnte dadurch erklärt werden, dass andere Wirkungsmechanismen neben der Zelldifferenzierung für die Induktion der NEP-Aktivität verantwortlich sind. Es wurde vermutet, dass die Erhöhung der NEP-Aktivität von der Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), das die NEP Gen-Expression über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erhöht, abhängig ist. Deshalb wurde der Einfluss anderer Substanzen, welche den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen können, geprüft. Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram wurden in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µM bis 10.0 µM untersucht. Die drei Substanzen erhöhten die Aktivität der NEP

ohne die Zellproliferation zu hemmen (Abb. 19). Die NEP-Aktivität konnte durch Rolipram (10.0 μ M) um 50 %, durch Forskolin um 35 % und durch Dibutyryl-cAMP um 26 % erhöht werden (Tab. 13).

Tabelle 13: Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die NEP-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	NEP-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Rolipram		
Kontrolle	100 \pm 8	100 \pm 8
1.0	115 \pm 6*	100 \pm 8
5.0	122 \pm 5*	102 \pm 6
10.0	150 \pm 9*	101 \pm 7
Forskolin		
Kontrolle	100 \pm 11	100 \pm 8
1.0	110 \pm 6	106 \pm 6
5.0	118 \pm 4*	100 \pm 5
10.0	132 \pm 10*	106 \pm 10
20.0	135 \pm 8*	90 \pm 8
Dibutyryl-cAMP		
Kontrolle	100 \pm 6	100 \pm 5
0.5	110 \pm 5	99 \pm 5
1.0	113 \pm 7	97 \pm 3
2.5	117 \pm 6*	95 \pm 6
5.0	124 \pm 6*	95 \pm 6
10.0	126 \pm 5*	94 \pm 8

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; keine signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

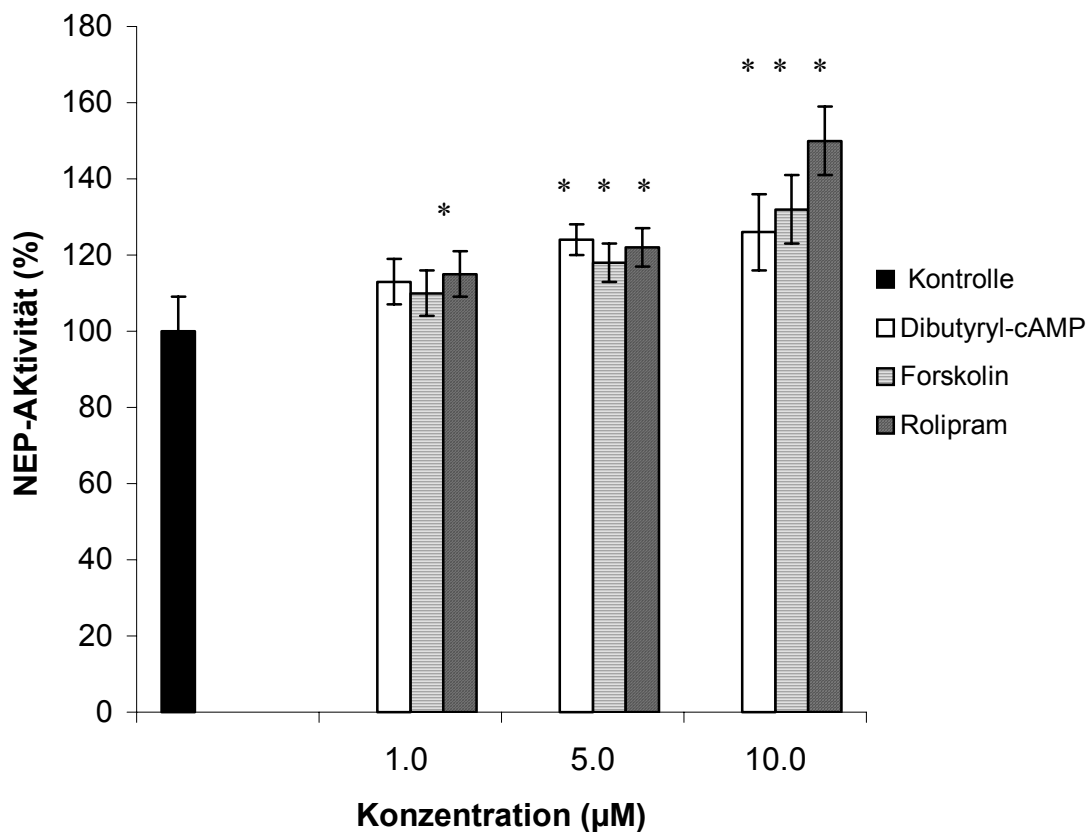


Abbildung 19: Untersuchung des Einflusses von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die NEP-Aktivität

Methode: NEP-Assay (siehe Abschnitt 2.5.1.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.6 Einfluss ausgewählter Substanzen auf die ACE-Aktivität

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst, die den Einfluss von ausgewählten Substanzen, welche die NEP-Aktivität erhöhten, auf die ACE-Aktivität untersuchten. Diese Untersuchungen waren notwendig um herauszufinden, ob diese Substanzen spezifisch nur die NEP-Aktivität beeinflussten.

3.6.1 Einfluss von Coffein und Theophyllin

Der Effekt von Coffein und Theophyllin wurde in den Konzentrationsbereichen von 1.0 µM bis 1000.0 µM untersucht (Tab. 14). Coffein konnte die ACE-Aktivität nur in der maximalen Konzentration um 30 % erhöhen und die Zellproliferation um 28 % hemmen. Mit Theophyllin konnten keine signifikanten Effekte auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation registriert werden.

Tabelle 14: Einfluss von Coffein und Theophyllin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in μM	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
Coffein		
1.0	98 \pm 12	98 \pm 10
10.0	103 \pm 13	92 \pm 11
100.0	112 \pm 10	85 \pm 13
500.0	119 \pm 8*	80 \pm 10**
1000.0	130 \pm 9*	72 \pm 12**
Theophyllin		
1.0	108 \pm 13	96 \pm 8
10.0	110 \pm 13	97 \pm 6
100.0	110 \pm 9	97 \pm 7
500.0	124 \pm 6*	76 \pm 5**
1000.0	136 \pm 6*	64 \pm 9**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 10); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7)).

3.6.2 Einfluss von EC und EGC in Kombination

EC in Kombination mit Coffein hatte keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation. Während EC mit Theophyllin die Enzymaktivität um 14 % an hob und die Zellproliferation um 8 % hemmte, hatte EC mit Coffein und Theophyllin zusammen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation (Tab. 15).

EGC in Kombination mit Coffein und/oder Theophyllin konnte weder die ACE-Aktivität noch die Zellproliferation beeinflussen (Tab. 15).

Tabelle 15: Einfluss von Epicatechin (EC) und Epigallocatechin (EGC) in Kombination mit Coffein (Coff) und/oder Theophyllin (ThP) auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in μM	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
EC + Coff	1.0	106 \pm 7	100 \pm 6
	10.0	110 \pm 6	95 \pm 8
EC + ThP	1.0	110 \pm 4	95 \pm 9
	10.0	114 \pm 9*	92 \pm 8
EC + Coff + ThP	1.0	110 \pm 9	94 \pm 10
	10.0	111 \pm 8	95 \pm 11
EGC + Coff	1.0	99 \pm 10	100 \pm 8
	10.0	103 \pm 11	97 \pm 11
EGC + ThP	1.0	100 \pm 10	99 \pm 11
	10.0	103 \pm 11	94 \pm 9
EGC + Coff + ThP	1	98 \pm 6	100 \pm 10
	10	102 \pm 6	97 \pm 7

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0,05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; keine signifikante Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.3 Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts

Ginkgo-biloba-Extrakt wurde in Ethanol (50 %) gelöst und im Konzentrationsbereich von 1.0 $\mu\text{g/ml}$ bis 100.0 $\mu\text{g/ml}$ hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die ACE-Aktivität und die Zellproliferation untersucht. Ab einer Konzentration von 50.0 $\mu\text{g/ml}$ wurde ein Induktionseffekt auf die Enzymaktivität und eine Hemmungswirkung auf die Zellproliferation registriert. In der maximalen Konzentration konnte Ginkgo-biloba-Extrakt die Enzymaktivität um 38 % erhöhen und die Zellproliferation um 36 % hemmen (Tab. 16).

Tabelle 16: Einfluss des Ginkgo-biloba-Extrakts auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration in µg/ml	ACE-Aktivität in % zur Kontrolle	Zellproliferation in % zur Kontrolle
1.0	100 ± 11	100 ± 7
5.0	99 ± 10	103 ± 4
10.0	107 ± 10	96 ± 8
25.0	112 ± 11*	86 ± 11**
50.0	121 ± 8*	76 ± 10**
75.0	131 ± 5*	65 ± 4**
100.0	138 ± 10*	64 ± 11**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 12); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 9)).

3.6.4 Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram

Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram wurden in der Konzentration von 10.0 µM auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Hier konnte kein Einfluss auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation festgestellt werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Einfluss von Dibutyryl-cAMP, Forskolin und Rolipram auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

	Konzentration in µM	ACE-Aktivität in %	Zellproliferation in %
Dibutyryl-cAMP	Kontrolle	100 ± 7	100 ± 7
	10.0	105 ± 10	101 ± 10
Forskolin	Kontrolle	100 ± 4	100 ± 3
	10.0	100 ± 6	104 ± 6
Rolipram	Kontrolle	100 ± 4	100 ± 3
	10.0	106 ± 8	98 ± 4

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n=3 mit vier parallelen Proben; p < 0.05; keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.5 Einfluss von Apigenin und Luteolin

Apigenin und Luteolin wurden in den Konzentrationen von 10.0 μM und 20.0 μM auf die Enzymaktivität und auf die Zellproliferation untersucht. Die Enzymaktivität konnte durch Apigenin in der Konzentration von 10.0 μM um 130 % gesteigert werden. Luteolin erhöhte die Enzymaktivität um 230 % (Abb. 20).

Die Zellproliferation wurde durch 10.0 μM Apigenin um 54 % und durch 10.0 μM Luteolin um 67 % gehemmt (Tab. 18). In der Konzentration von 20.0 μM konnten Apigenin und Luteolin die Enzymaktivität um über 700 % erhöhen und die Zellproliferation über 80 % hemmen (Tab. 18).

Tabelle 18: Einfluss von Apigenin und Luteolin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration		ACE-Aktivität	Zellproliferation
in μM		in % zur Kontrolle	in % zur Kontrolle
Apigenin	10.0	230 \pm 16*	46 \pm 14**
	20.0	800 \pm 14*	13 \pm 4**
Luteolin	10.0	330 \pm 13*	33 \pm 11**
	20.0	850 \pm 11*	12 \pm 5**

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 13); ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle (100 \pm 7)).

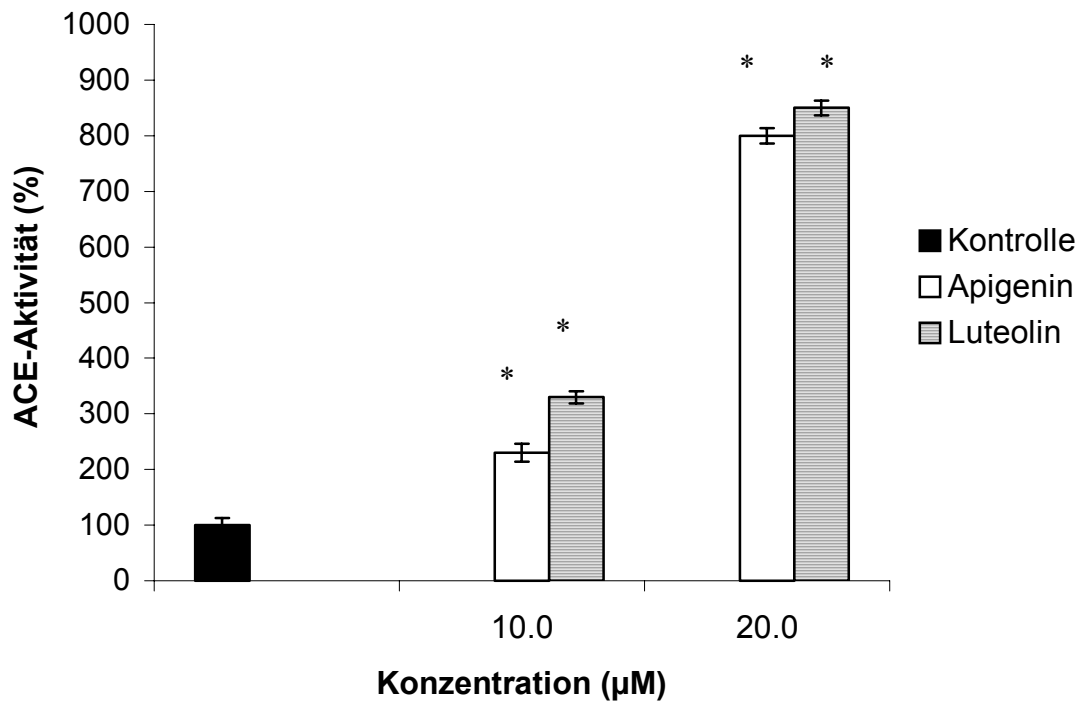


Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses von Apigenin und Luteolin auf die ACE-Aktivität
 Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche);
 Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; *
 signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle).

3.6.6 Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin

Der Effekt von Vinpocetin auf die ACE-Aktivität und die Zellproliferation wurde in den Konzentrationen von 10.0 µM und 20.0 µM untersucht. Vinpocetin konnte die Enzymaktivität in der Konzentration von 10.0 µM um 30 % und in der Konzentration von 20.0 µM um 78 % erhöhen. Bei 20.0 µM Vinpocetin wurde eine Hemmung der Zellproliferation von über 40 % registriert. Curcumin wurde in den Konzentrationen von 2.5 µM und 5.0 µM auf die Enzymaktivität und die Zellproliferation untersucht. Durch 5.0 µM Curcumin konnte die Enzymaktivität um 147 % erhöht und die Zellproliferation um 65 % gehemmt werden (Tab. 19). Der Einfluss von Triiodotyronin auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation in den Konzentrationsbereichen von 0.1 µM bis 10.0 µM wurde untersucht. In der maximalen Konzentration hemmte Triiodotyronin die Enzymaktivität um 10 %, bei einer Erhöhung der Zellproliferation um 12 % (Tab. 19).

Tabelle 19: Einfluss von Vinpocetin, Curcumin und Triiodotyronin (T3) auf die ACE-Aktivität und auf die Zellproliferation

Konzentration	ACE-Aktivität	Zellproliferation
in μM	in %	in %
Vinpocetin Kontrolle	100 \pm 16	100 \pm 10
10.0	130 \pm 15*	81 \pm 13**
20.0	178 \pm 20*	54 \pm 10**
Curcumin Kontrolle	100 \pm 14	100 \pm 7
2.5	134 \pm 20*	76 \pm 15**
5.0	247 \pm 7*	35 \pm 11**
Triiodotyronin Kontrolle	100 \pm 6	100 \pm 3
0.1	99 \pm 5	105 \pm 5
1.0	97 \pm 6	101 \pm 8
5.0	92 \pm 9	110 \pm 6
10.0	90 \pm 10	112 \pm 6

Methode: ACE-Assay (siehe Abschnitt 2.5.2.2), DNA-Assay (siehe Abschnitt 2.6.3); Inkubationszeit: 96 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=3 mit vier parallelen Proben; $p < 0.05$; * signifikant stärkere Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle; ** signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle).

3.7 Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die Menge von endogen gebildetem β -Amyloid-Peptid 1-42 ($\text{A}\beta$ 1-42)

Amyloid-Peptid 1-42 ($\text{A}\beta$ 1-42) wird durch verschiedene Enzyme in vivo abgebaut. NEP spielt eine große Rolle beim Abbau von β -Amyloid in vivo (Iwata et al. 2001). Die wichtige Rolle von NEP wurde durch die Infusion des Metalloprotease-Inhibitors Thiorphan in den Hippocampus von Ratten gezeigt. Diese Infusion zeigte einen eingeschränkten $\text{A}\beta$ -Abbau durch Hemmung von NEP (Iwata et al. 2000).

Die Bestimmung des $\text{A}\beta$ 1-42 wurde auf SK-N-SH-Zellen, die $\text{A}\beta$ produzieren können (Haugabook et al. 2001), übertragen (siehe Abschnitt 2.7). Die Menge von $\text{A}\beta$ 1-42 in pg/ml wurde für das erste Experiment nach der Kalibriergerade der Abbildung 23 und für das zweite Experiment nach der Kalibriergerade der Abbildung 24 berechnet.

3.7.1 Erste Experimentserie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin, Rolipram und Phosphoramidon auf die Menge des A β 1-42 untersuchten. Diese Substanzen wurden zu 1.0 ml Medium (1 % FBS) in 6-Well Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 72 Stunden kultiviert. Dann wurde das Medium zur Bestimmung der endogenen A β 1-42 gesammelt (Kap. 2.7.2.1).

Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Apigenin, Luteolin, Rolipram und Phosphoramidon in der Konzentration von 10.0 μ M untersucht wurden. In der Konzentration von 5.0 μ M wurde Curcumin untersucht. Apigenin, Luteolin Curcumin und Rolipram hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Menge von A β 1-42. Grüntee-Extrakt konnte die Menge von endogenen produzierten und ins Medium sezernierten A β 1-42 um 162 % erhöhen. Phosphoramidon, ein NEP-Inhibitor, in der Konzentration von 10 μ M konnte die Menge von A β 1-42 um 31 % erhöhen (Tab. 20).

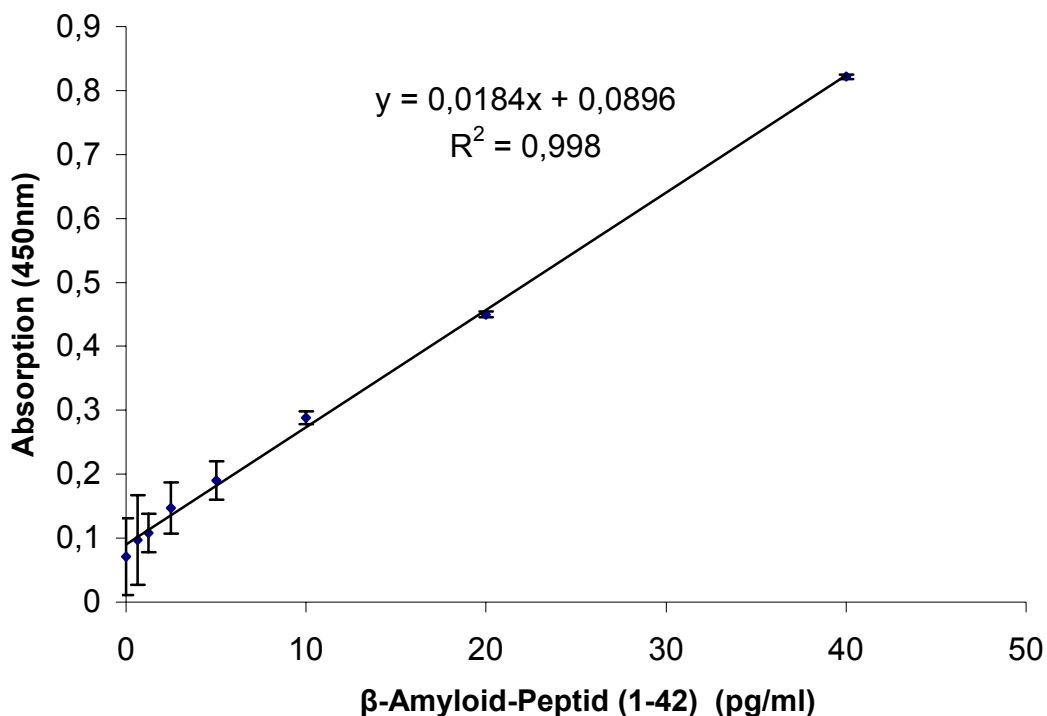


Abbildung 21: Kalibriergerade für β -Amyloid-Peptid-Assay von Kit (Nr. 1). Jeweils 100 μ l jeder β -Amyloid-Peptide-Verdünnung wurde mit 100 μ l Antikörperlösung, 100 μ l Chromogen und 100 μ l Stopplösung bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Tabelle 20: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die Menge von A β 1-42

Substanzen	A β 1-42 in pg/ml	A β 1-42 per μ g DNA	A β 1-42 per μ g DNA in %
Kontrolle	26.2 \pm 1.3	0.45 \pm 0.0225	100 \pm 5
Grüntee-Extrakt (50.0 μ g/ml)	70.0 \pm 4.9*	1.18 \pm 0.082*	262 \pm 7*
Apigenin (10.0 μ M)	22.1 \pm 1.32	0.44 \pm 0.026	98 \pm 6
Luteolin (10.0 μ M)	23.2 \pm 2.01	0.46 \pm 0.041	102 \pm 9
Curcumin (5.0 μ M)	20.0 \pm 0.6	0.43 \pm 0.012	96 \pm 3
Rolipram (10.0 μ M)	15.3 \pm 1.22	0.42 \pm 0.034	94 \pm 8
Phosphoramidon (10.0 μ M)	56.0 \pm 3.36*	0.59 \pm 0.035*	131 \pm 6*

Methode: Bestimmung von A β 1-42 mit ELISA-Kit (siehe Abschnitt 2.7.3); Inkubationszeit: 72 Stunden (Langzeitversuche); Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 21; 1.0 μ g DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.7.2 Zweite Experimentserie

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente wiedergegeben, die mit dem zweiten Kit (siehe Abschnitt 2.7.2.2) durchgeführt wurden. Hierbei wurde der Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin auf die Menge des endogen gebildeten A β 1-42 untersucht. Phosphoramidon wurde zu 1.0 ml Medium (1 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren, und für weitere 3 Tage kultiviert. Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin wurden zu 2.0 ml Medium (10 % FBS) in 6-Well-Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 48 Stunden kultiviert. Das Medium wurde auf 1.0 ml (1 % FBS) Medium gewechselt und die Zellen wurden im Brutschrank für weitere 24 Stunden kultiviert.

Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Apigenin und Luteolin in der Konzentration von 10.0 μ M untersucht wurden. In der Konzentration von 5.0 μ M wurde Curcumin untersucht. Apigenin, Luteolin und Curcumin konnten signifikant die Menge von endogenen produzierten und im Medium sekretierten A β 1-42 hemmen. Grüntee-Extrakt konnte die Menge von A β 1-42 um 34 % erhöhen (Tab. 21).

Kalibriergerade für Beta-Amyloid-Peptid (1-42)-Assay

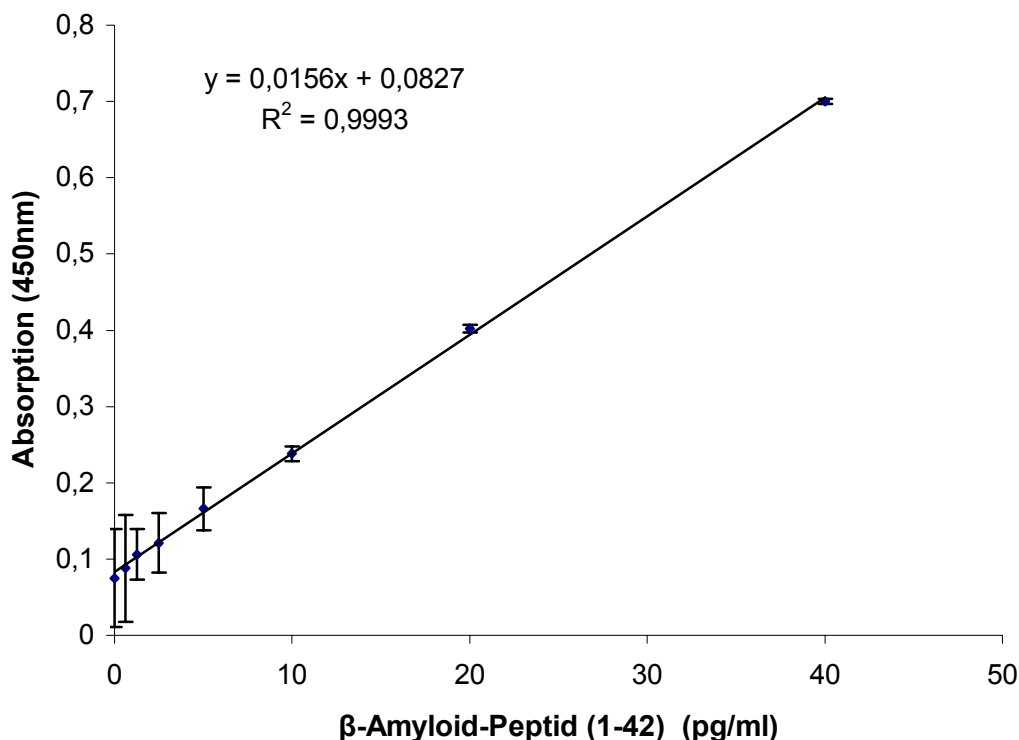


Abbildung 22: Kalibriergerade für β -Amyloid-Peptid ($A\beta$ 1-42)-Assay von Kit (Nr. 2). Jeweils 100 μ l jeder einzelnen β -Amyloid-Peptid-Verdünnung wurde mit 100 μ l Antikörperlösung, 100 μ l Chromogen und 100 μ l Stopplösung bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Tabelle 21: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin und Curcumin auf die Menge von $A\beta$ 1-42

Substanzen	$A\beta$ 1-42 in pg/ml	$A\beta$ 1-42 per μ g DNA	$A\beta$ 1-42 per μ g DNA in %
Kontrolle	37.5 \pm 2.25	0.50 \pm 0.03	100 \pm 6
Grüntee-Extrakt (50.0 μ g/ml)	42.8 \pm 1.28*	0.67 \pm 0.02*	134 \pm 3*
Apigenin (10.0 μ M)	28.0 \pm 0.56*	0.43 \pm 0.009*	86 \pm 3*
Luteolin (10.0 μ M)	25.8 \pm 1.03*	0.44 \pm 0.017*	88 \pm 4*
Curcumin (5.0 μ M)	34.0 \pm 1.02*	0.45 \pm 0.018*	90 \pm 4*

Methode: Bestimmung von $A\beta$ 1-42 mit ELISA-Kit (Abschnitt 2.7.3); Inkubationszeit: 24 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 22; 1.0 μ g DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n=8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

3.8 Einfluss von ausgewählten Testsubstanzen auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Das cAMP kann als second Messenger verschiedene Enzyme durch Induktion der Phosphorylierung oder der Dephosphorylierung von den Enzymen aktivieren oder inhibieren. Um nachzuweisen, dass die Induktion der NEP-Aktivität mit einer Erhöhung von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) verbunden war, wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration nach der Inkubation von SK-N-SH-Zellen mit den ausgewählten Substanzen bestimmt (siehe Abschnitt 2.8). Die cAMP-Konzentration wurde in pmol/ml nach der Kalibrierkurve von Abbildung 23 berechnet und wiederum in pmol/min/ μ g DNA (1.0 μ g DNA entspricht ca. 100000 Zellen) kalkuliert.

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Effekt von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die intrazelluläre cAMP Konzentration untersuchten. Diese Substanzen wurden zu 2.0 ml Medium (10 % FBS) in 6-Well Platten gegeben, in welche SK-N-SH-Zellen ausgesät worden waren. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ und 95 % Luft enthielt, für 72 Stunden kultiviert. Grüntee-Extrakt wurde in der Konzentration von 50.0 μ g/ml getestet, während Curcumin in der Konzentration von 5.0 μ M untersucht wurde. In der Konzentration von 10.0 μ M wurden Apigenin, Luteolin und Rolipram untersucht. Rolipram als positive Kontrolle konnte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 154 % erhöhen. Durch Grüntee-Extrakt konnte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 100 % erhöht werden. Apigenin und Luteolin hatten den stärksten signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Apigenin erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 539 %, Luteolin um 556 %. Curcumin erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 130 % (Tab. 22 und Abb. 24).

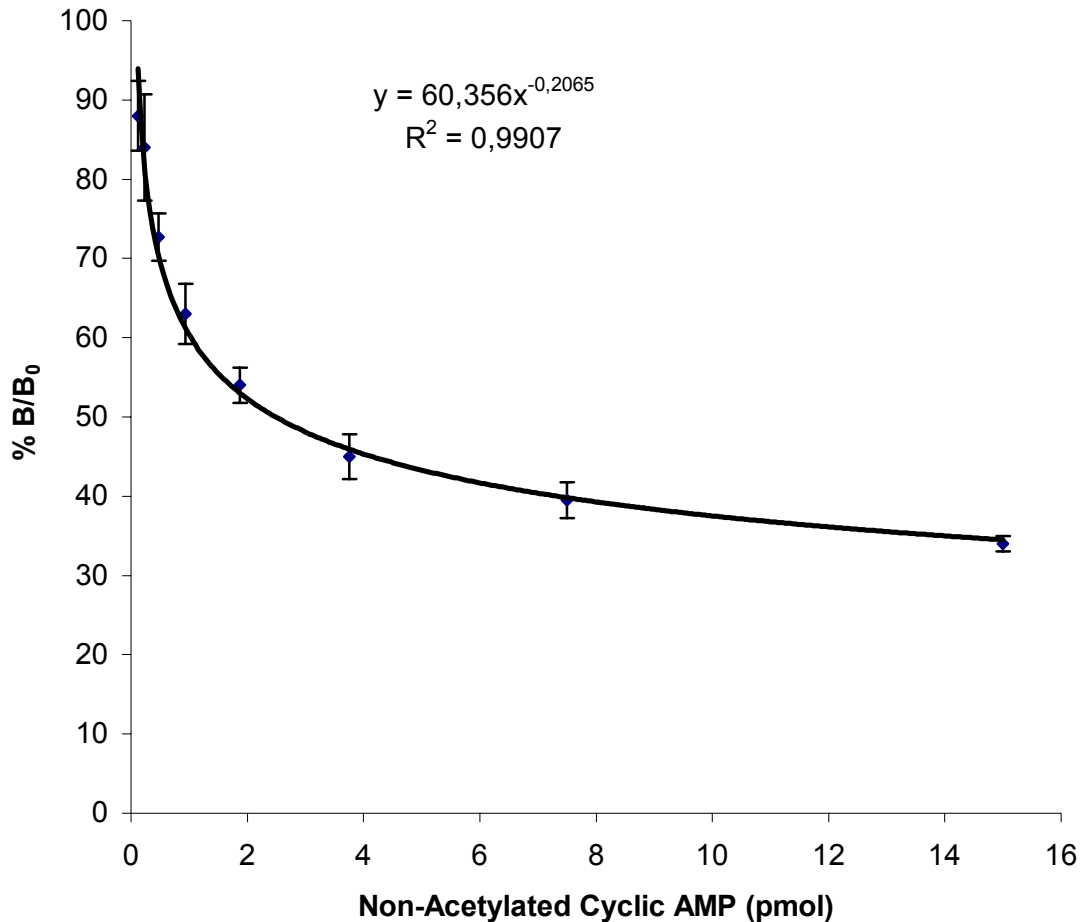


Abbildung 23: Kalibrierkurve für intrazelluläres cAMP-Assay. Jeweils 50 µl jeder cAMP-Verdünnung wurde mit 50 µl cAMP AChE Tracer, 50 µl cAMP-Antiserum und 200 µl Ellman's Reagent bei einer Wellenlänge von 405 nm bis 450 nm gemessen.

Tabelle 22: Einfluss von Grüntee-Extrakt, Apigenin, Luteolin, Curcumin und Rolipram auf die Konzentration des intrazellulären cAMP

Substanzen	cAMP in pmol/ml	cAMP in pmol/µg DNA	cAMP in pmol/µg DNA in %
Kontrolle	264 ± 13.2	1.22 ± 0.056	100 ± 5
Rolipram (10.0 µM)	1040 ± 52*	3.1 ± 0.14*	254 ± 5*
Apigenin (10.0 µM)	660 ± 39.6*	7.8 ± 0.21*	639 ± 6*
Luteolin (10.0 µM)	620 ± 37.2*	8.0 ± 0.18*	656 ± 6*
Curcumin (10.0 µM)	200 ± 8.0*	2.8 ± 0.044*	230 ± 4*
Grüntee-Extrakt (50.0 µg/ml)	440 ± 22.0*	2.45 ± 0.08*	200 ± 5*

Methode: Bestimmung von cAMP mit EIA-Kit (Abschnitt 2.8); Inkubationszeit: 72 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH; Kalibriergerade: Abb. 23; 1.0 µg DNA entspricht 100000 Zellen (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert ± SD, n = 8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle).

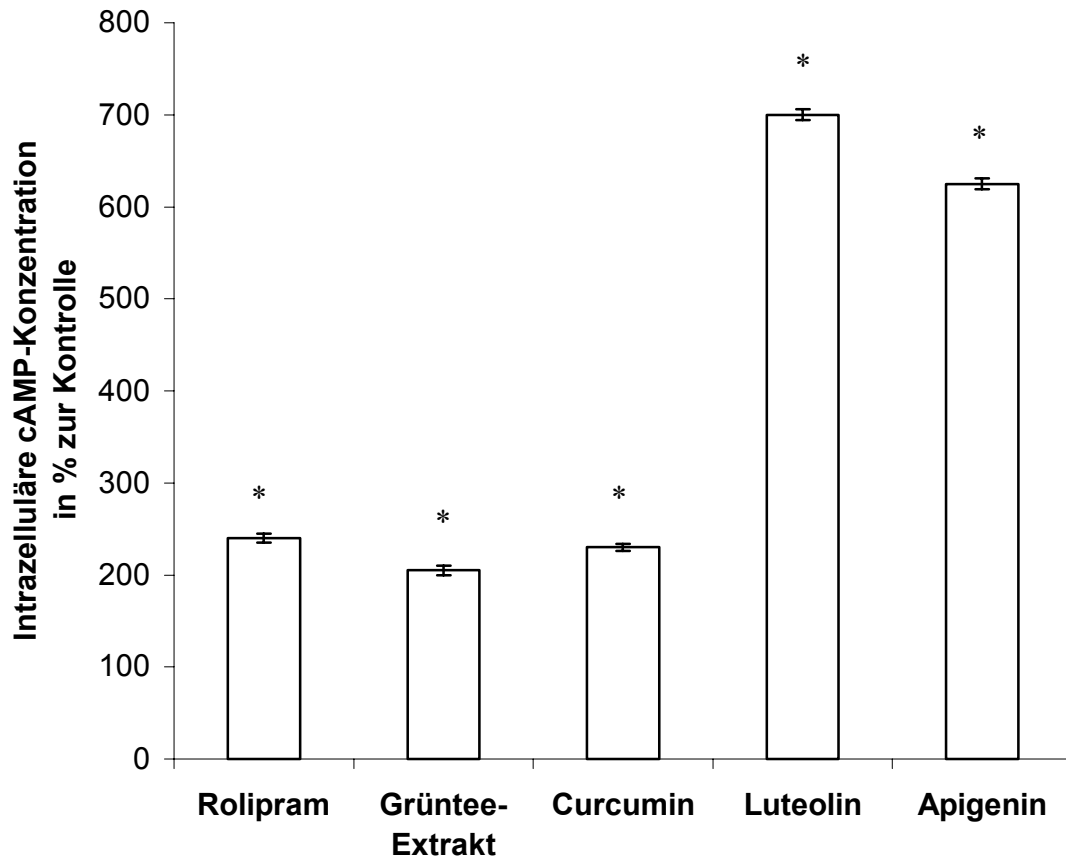


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses von Rolipram (10.0 μM), Grüntee-Extrakt (50.0 $\mu\text{g/ml}$), Curcumin (5.0 μM), Apigenin (10.0 μM) und Luteolin (10.0 μM) auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Methode: Bestimmung von cAMP mit EIA-Kit (Abschnitt 2.8); Inkubationszeit: 72 Stunden; Zelllinie: SK-N-SH (U-Test nach Wilcoxon; Mittelwert \pm SD, n = 8; p < 0.05; * signifikant stärkere Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle 100 ± 5).