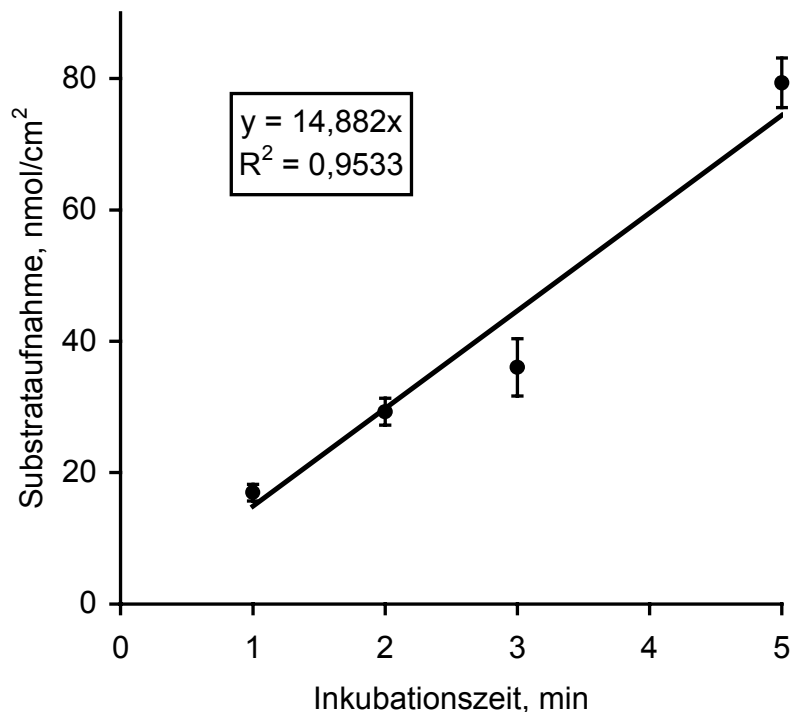


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mucosal-uptake-Technik

#### 4.1.1 Initialer Zeitverlauf der MDG-Aufnahme

Zunächst wurde der Zeitverlauf der mukosalen MDG-Aufnahme im mittleren Jejunum untersucht. Die Messung der initialen Substrataufnahme ist u. a. eine wichtige Voraussetzung für die Charakterisierung eines Transportsystems (Substratspezifität und Affinität, Transport-Kinetik). Die mukosale MDG-Aufnahme wurde bei einer Konzentration von 0,5 mmol/l im Versuchsmedium untersucht. Bei Inkubationszeiten von 1, 2, 3 und 5 Minuten ergaben sich konstante Transportraten (Substrataufnahme/min) (Abbildung 4). Für die weiteren Untersuchungen der mukosalen Aufnahme von MDG unter verschiedenen Bedingungen wurde eine Inkubationszeit von 3 min gewählt.

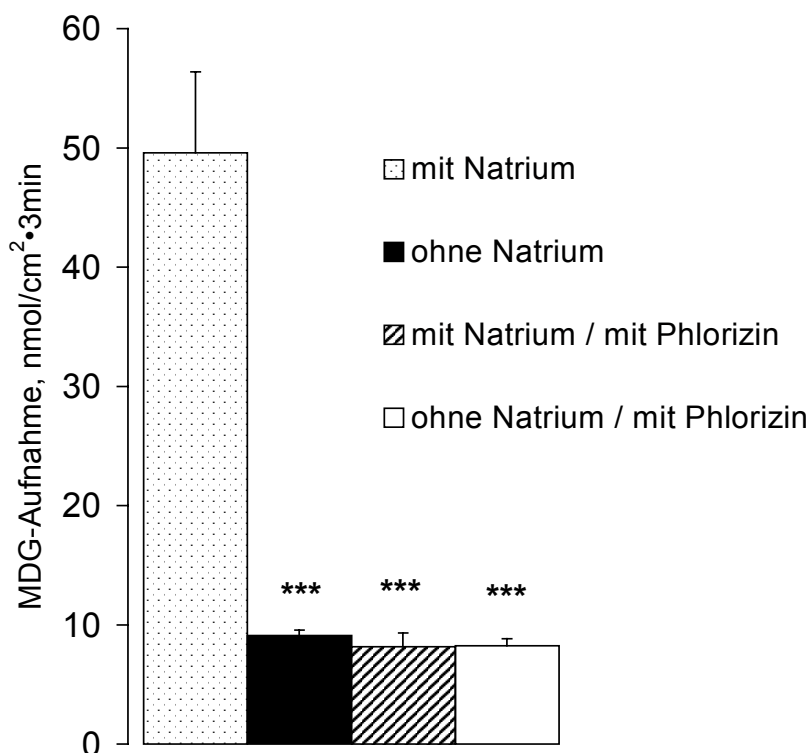


**Abbildung 4:**

**Initialer Zeitverlauf der mukosalen MDG-Aufnahme im Jejunum**  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 6

#### 4.1.2 Einfluss von Natrium und Phlorizin auf die MDG-Aufnahme

Zur weiteren Überprüfung der Eignung der Mukosapräparate wurde zunächst die durch den transmukosalen elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten energetisierte Aufnahme von MDG geprüft. Hierzu wurde die mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l) in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  mit den entsprechenden Aufnahmen unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen sowie bei Anwesenheit von Phlorizin (100  $\mu\text{mol/l}$ ), einem bekannten SGLT1-Hemmstoff, gemessen. Sowohl das Fehlen von  $\text{Na}^+$  im Inkubationsmedium als auch die Inhibition des SGLT1 durch Phlorizin bewirkte eine hochsignifikante Reduktion der  $\text{Na}^+$ -abhängigen MDG-Aufnahme (Abbildung 5). Die Befunde belegen die Aktivität des SGLT1 unter den gewählten Versuchsbedingungen.



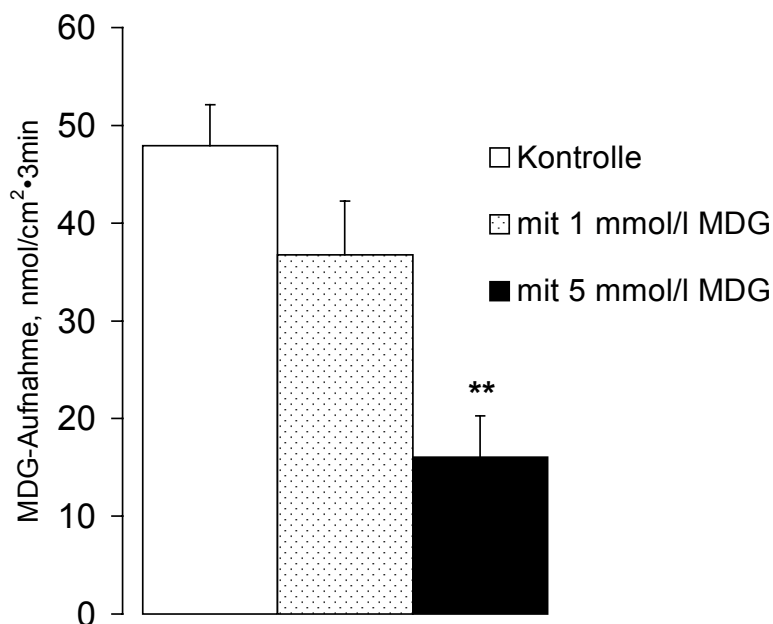
**Abbildung 5:**

**Einfluss von  $\text{Na}^+$  und Phlorizin (0,1 mmol/l) auf die mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)**

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 6, \*\*\* signifikante Hemmung ( $p < 0,001$ ) der MDG-Aufnahme

#### 4.1.3 Einfluss von unmarkiertem MDG auf die natriumabhängige MDG-Aufnahme

In weiteren Versuchen zur Überprüfung des sekundär aktiven Transports von MDG wurde gezeigt, dass die MDG-Aufnahme (0,5 mmol/l) durch Zugabe von 1,0 bzw. 5,0 mmol/l nicht radioaktiv markiertem MDG gehemmt wird (Abbildung 6). Der Befund lässt sich durch eine kompetitive Hemmung der Aufnahme des radioaktiv markierten Substrates durch nicht markiertes Substrat erklären und ist typisch für Carrier-vermittelte Transportmechanismen. Diese Versuche bestätigen somit die Eignung des Versuchansatzes für Untersuchungen zur Hemmung der initialen Substrataufnahme.



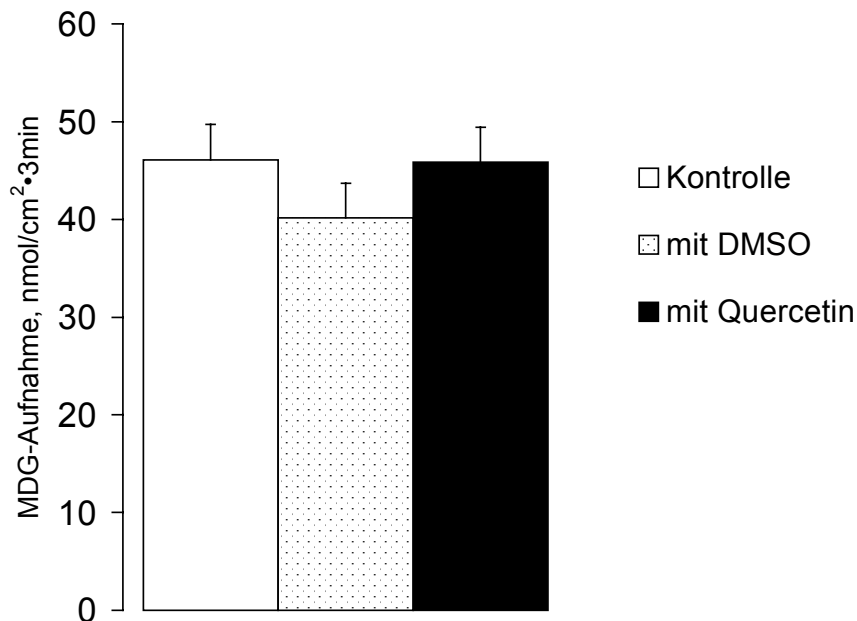
**Abbildung 6:**

**Einfluss von unmarkiertem MDG (1,0 mmol/l bzw. 5 mmol/l) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)**

Mittelwerte ± SEM, n = 6, \*\* signifikante Hemmung (p < 0,01) der MDG-Aufnahme durch unmarkiertes MDG

#### 4.1.4 Einfluss von Quercetin auf die natriumabhängige MDG-Aufnahme

Im Folgenden wurde der Einfluss des Flavonol-Aglykons Quercetin auf die mukosale MDG-Aufnahme untersucht. Da für diese Substanz und für alle weiteren eingesetzten Flavonoide DMSO als Lösungsvermittler in einer Konzentration von 0,5 % eingesetzt wurde, wurde parallel dessen Wirkung auf die Akkumulation von MDG im Jejunum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Quercetin in einer Konzentration von 0,25 mmol/l im Inkubationsmedium die Na<sup>+</sup>-abhängige MDG-Aufnahme in die Mukosa des Rattenjejunums nicht beeinflusst. Auch DMSO hatte keinen Effekt auf die mukosale Akkumulation von MDG (Abbildung 7).

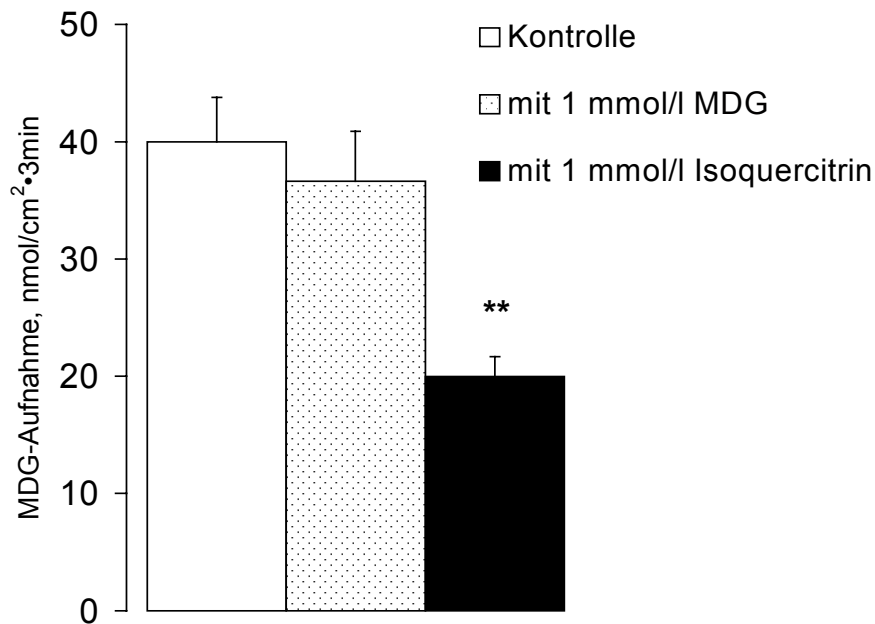


**Abbildung 7:** Einfluss von DMSO (0,5 %) und von Quercetin (0,25 mmol/l) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)  
Mittelwerte ± SEM, n = 6

#### 4.1.5 Einfluss der Quercetin-Glukoside Isoquercitrin und Spiraeosid auf die natriumabhängige MDG-Aufnahme

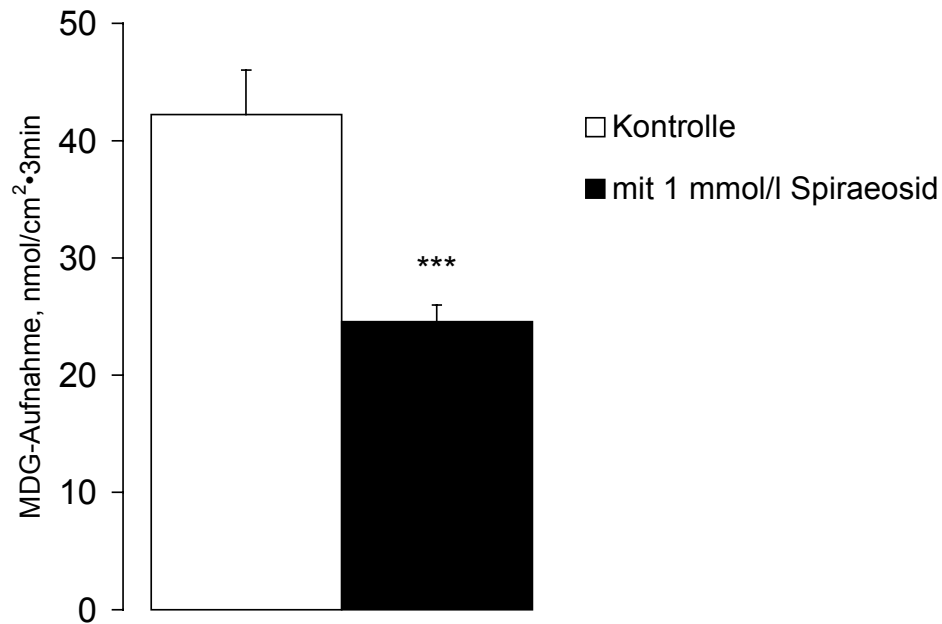
Die im Folgenden beschriebenen Versuche sollten klären, ob das Vorhandensein eines Glukosylrestes am Aglykon Quercetin einen Einfluss auf die MDG-Aufnahme in die Rattendarmmukosa hat. Hierzu wurde im ersten Versuch Isoquercitrin

(Quercetin-3-Glukosid) dem Inkubationsmedium in einer Konzentration von 1,0 mmol/l zugegeben. Isoquercitrin hemmte die mukosale natriumabhängige MDG-Aufnahme im Jejunum der Ratte signifikant. Im Unterschied dazu trat bei parallelen Ansätzen mit Zugabe von 1,0 mmol/l nicht markiertem MDG noch keine signifikante Hemmung der MDG-Aufnahme ein (Abbildung 8, s. a. Abbildung 6).



**Abbildung 8:** Einfluss von MDG (1,0 mmol/l) und Isoquercitrin (1,0 mmol/l) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)  
Mittelwerte ± SEM, n = 12, \*\* signifikante Hemmung (p < 0,01)

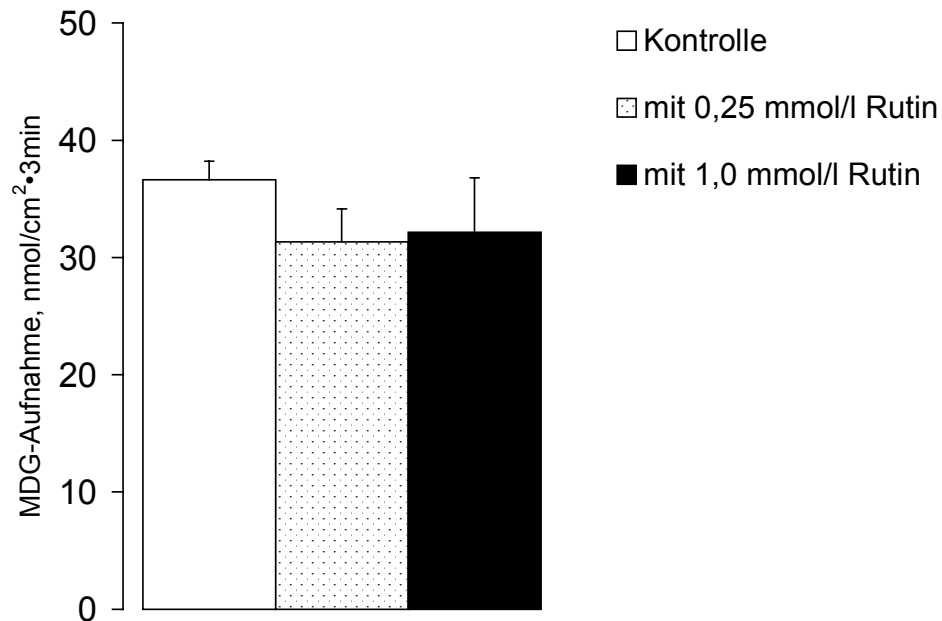
Um den Einfluss der Position des freien Glukoserestes am Aglykon auf die mukosale MDG-Aufnahme zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz Spiraeosid (Quercetin-4'-Glukosid), welches sich lediglich durch die Position des Glukosylrestes am Quercetin von Isoquercitrin unterscheidet, dem Versuchsmedium zugegeben. Spiraeosid hemmte ebenfalls die Aufnahme von MDG in die Mukosa des Rattenjejunums signifikant (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Einfluss von Spiraeosid (1,0 mmol/l) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)  
Mittelwerte ± SEM, n = 9, \*\*\* signifikante Hemmung (p < 0,001)

#### 4.1.6 Einfluss des Glykosids Rutin auf die natriumabhängige MDG-Aufnahme

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde geprüft, ob die Art des Zuckerrestes einen Einfluss auf die mukosale MDG-Aufnahme hat. Hierzu wurde dem Versuchsmedium Rutin (Quercetin-3-rhamnoglukosid) in einer Konzentration von 0,25 bzw. 1,0 mmol/l zugegeben. Rutin weist im Gegensatz zu den Quercetin-Glukosiden Isoquercitrin und Spiraeosid keinen endständigen Glukosylrest auf. Weder bei einer Konzentration von 0,25 noch von 1,0 mmol/l Rutin im Inkubationsmedium trat eine signifikante Hemmung der MDG-Aufnahme auf (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Einfluss von Rutin (0,25 bzw. 1,0 mmol/l) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)  
Mittelwerte ± SEM, n = 12

#### 4.1.7 Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Isoquercitrin auf die natriumabhängige MDG-Aufnahme

Für Isoquercitrin wurde zudem die Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts (Dosis-Wirkungs-Beziehung) auf die Na<sup>+</sup>-abhängige MDG-Aufnahme (0,5 mmol/l) untersucht. Hierbei wurde dem Versuchsmedium Isoquercitrin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Eine signifikante Hemmung der MDG-Aufnahme trat bereits bei einer Konzentration von 0,125 mmol/l Isoquercitrin auf (Abbildung 11). Trägt man die Hemmung in % der Aufnahme von MDG in Anwesenheit von Isoquercitrin gegen die InhibitorKonzentration auf (Inset Abbildung 11), so lässt sich anhand einer Michaelis-Menten-Gleichung die InhibitorKonzentration berechnen, die zur halbmaximalen Hemmung führt (IC<sub>50</sub>-Wert). Der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei einer Isoquercitrin-Konzentration von ca. 0,1 mmol/l.

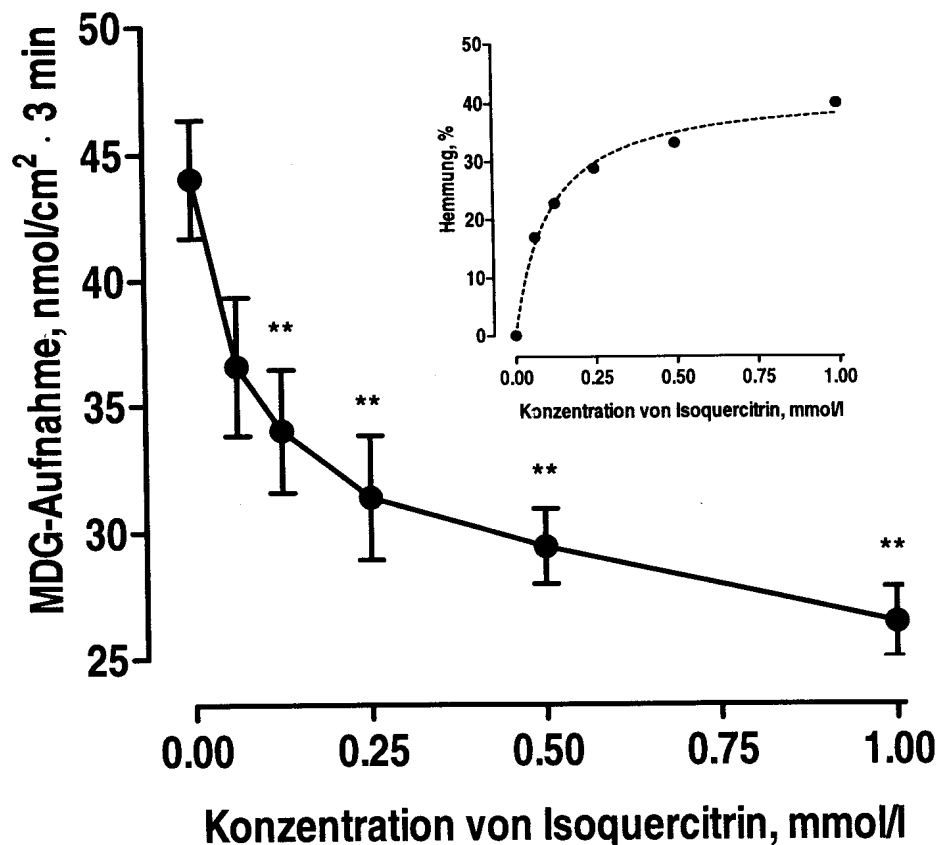


Abbildung 11:

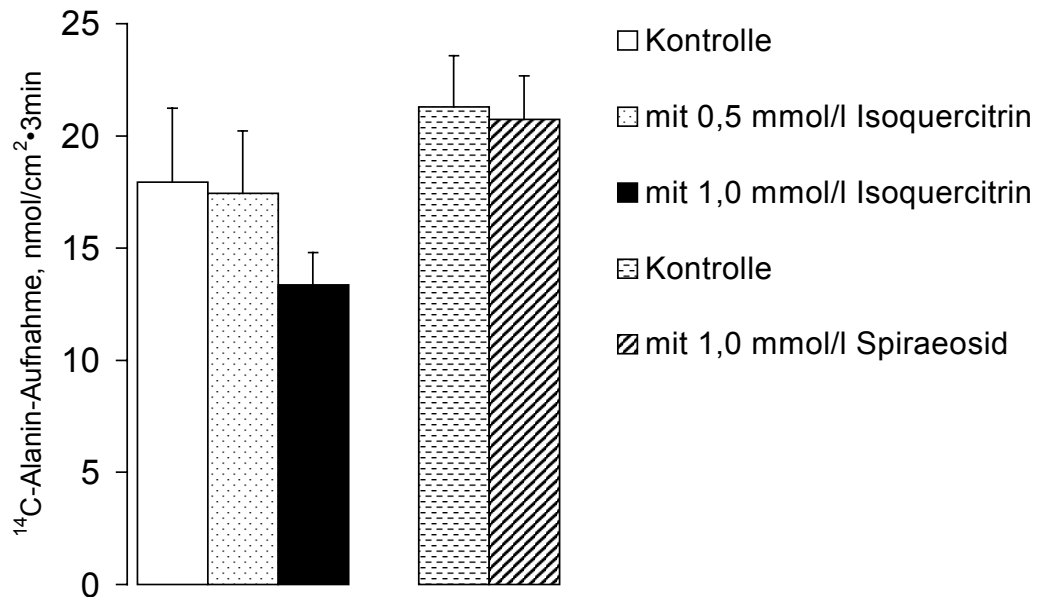
Konzentrationsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Isoquercitrin auf die Na<sup>+</sup>-abhängige mukosale Aufnahme von MDG (0,5 mmol/l)

Mittelwerte ± SEM, n = 15, \*\* signifikante Hemmung (p < 0,01) der MDG-Aufnahme

#### 4.1.8 Einfluss von Isoquercitrin und Spiraeosid auf die Aufnahme von <sup>14</sup>C-Alanin im Jejunum

Um einen unspezifischen Effekt von Isoquercitrin auf Na<sup>+</sup>-abhängige Transportsysteme in der Bürstensaummembran auszuschließen, wurde geprüft, ob Isoquercitrin und Spiraeosid auch einen Einfluss auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem L-Alanin (0,74 kBq/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) aufweisen. Weder Isoquercitrin noch Spiraeosid in einer Konzentration von 0,5 bzw. 1,0 mmol/l hemmten die L-Alanin-Aufnahme (Abbildung 12), wohingegen die Zugabe von 1,0 mmol/l Isoquercitrin zu einer statistisch nicht signifikanten Abnahme der mukosalen Aufnahme von L-Alanin um 25,5 ± 8,1 % führte.





**Abbildung 12:** Einfluss von Isoquercitrin (0,5 und 1,0 mmol/l) und Spiraeosid (1,0 mmol/l) auf die mukosale Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Alanin (0,5 mmol/l)  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 6 - 9

#### 4.1.9 Einfluss von Isoquercitrin und Spiraeosid auf die Kinetik der $\text{Na}^+$ -abhängigen MDG-Aufnahme

Zur Absicherung der Hinweise auf eine Interaktion von Isoquercitrin und Spiraeosid mit dem natriumabhängigen Glukose-Carrier wurden Untersuchungen zur Kinetik der MDG-Aufnahme durchgeführt. Dazu wurden die initialen natriumabhängigen MDG-Aufnahmen in die Mukosazellen bei Konzentrationen zwischen 0,25 und 10 mmol/l MDG in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Isoquercitrin und Spiraeosid (jeweils 1,0 mmol/l) gemessen. Die MDG-Aufnahme in die Mukosazellen zeigte in beiden Versuchsansätzen unter Kontrollbedingungen einen saturablen Verlauf, d. h. mit zunehmender MDG-Konzentration ergab sich eine Abflachung der Kurve. Dieser Kurvenverlauf lässt sich durch eine Michaelis-Menten Gleichung mit einer saturablen Carrier-vermittelten Komponente (Sättigungskinetik) beschreiben:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

- $V_0$  = Transportrate  
 $V_{\max}$  = maximale Transportrate  
 $K_m$  = Affinitätskonstante  
 $[S]$  = Substratkonzentration

In Gegenwart von Isoquercitrin bzw. Spiraeosid ließ sich die initiale MDG-Aufnahme in einem Konzentrationsbereich von 0,25 mmol/l bis 5 mmol/l MDG im Inkubationsmedium deutlich hemmen. Dieser Hemmeffekt konnte bei einer Konzentration von 10 mmol/l MDG nicht mehr beobachtet werden. Die Berechnung der apparenten kinetischen Parameter der MDG-Aufnahme anhand der Michaelis-Menten-Gleichung mit einer saturablen Komponente (GraphPad Prism, V 2.02., GraphPad software, San Diego, CA, USA) ergab in Gegenwart beider Quercetin-Glukoside eine ähnlich ausgeprägte Erhöhung des apparenten  $K_m$ -Wertes um das ca. 3-fache, während die  $V_{\max}$ -Werte nur ca. 1,5-fach erhöht waren (Abbildung 13).

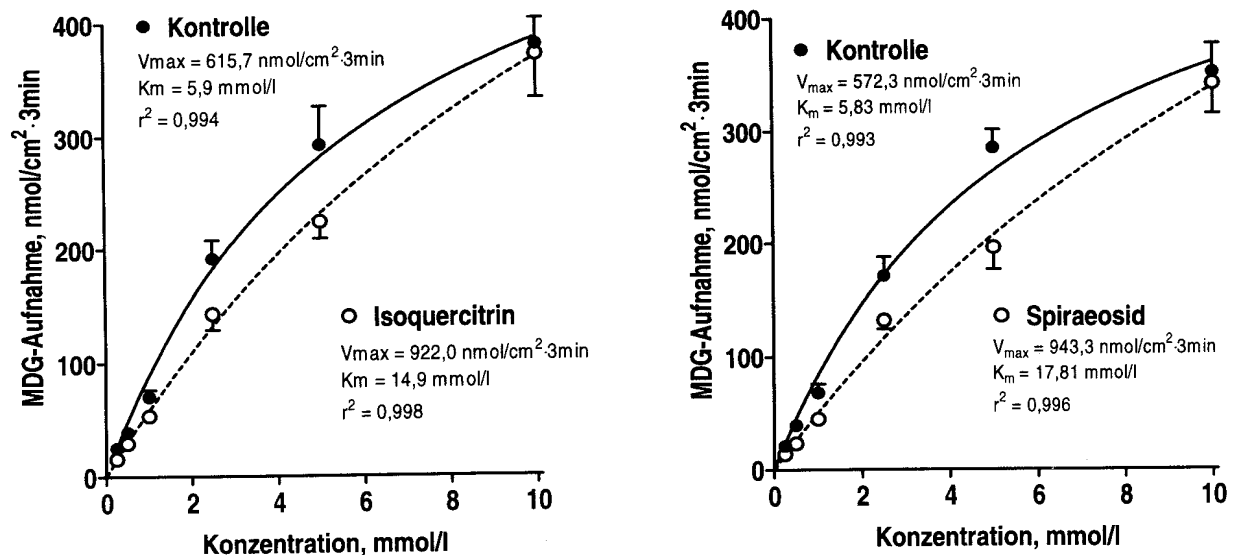


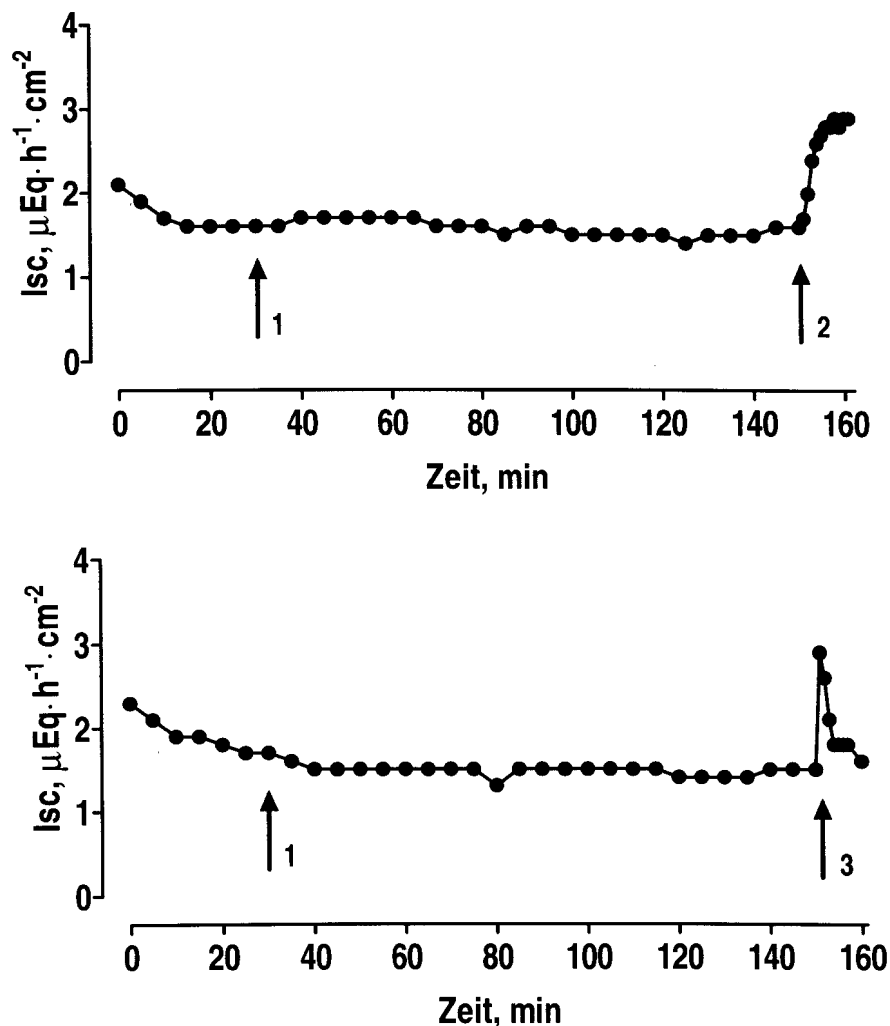
Abbildung 13:

Einfluss von Isoquercitrin und Spiraeosid (jeweils 1,0 mmol/l) auf die Kinetik der  $\text{Na}^+$ -abhängigen Aufnahme von MDG (Konzentration: 0,25-10 mmol/l)  
 Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8 - 9

## 4.2 Ussing-Kammer

### 4.2.1 Elektrophysiologische Parameter

Bei Zugabe von Isoquercitrin oder Rutin in das mukosale oder serosale Kompartiment der Ussing-Kammer in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  blieben die elektrophysiologischen Parameter  $I_{sc}$ , PD und Gt am Jejunum und Colon unverändert. In den folgenden Abbildungen ist anhand eines repräsentativen Experiments der Verlauf des Kurzschlussstromes ( $I_{sc}$ ) über eine Versuchsdauer von 160 min am mittleren Jejunum und proximalen Colon in der Ussing-Kammer dargestellt (Abbildung 14).



**Abbildung 14**

**Einfluss von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ , mukosal) und Glukose (20 mmol/l mukosal) bzw. Carbachol (100  $\mu\text{mol/l}$  serosal) auf den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) am mittleren Jejunum (obere Abbildung) und proximalen Colon (untere Abbildung) der Ratte**

- 1: Zugabe von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) mukosal
- 2: Zugabe von Glukose (20 mmol/l) mukosal
- 3: Zugabe von Carbachol (100  $\mu\text{mol/l}$ ) serosal

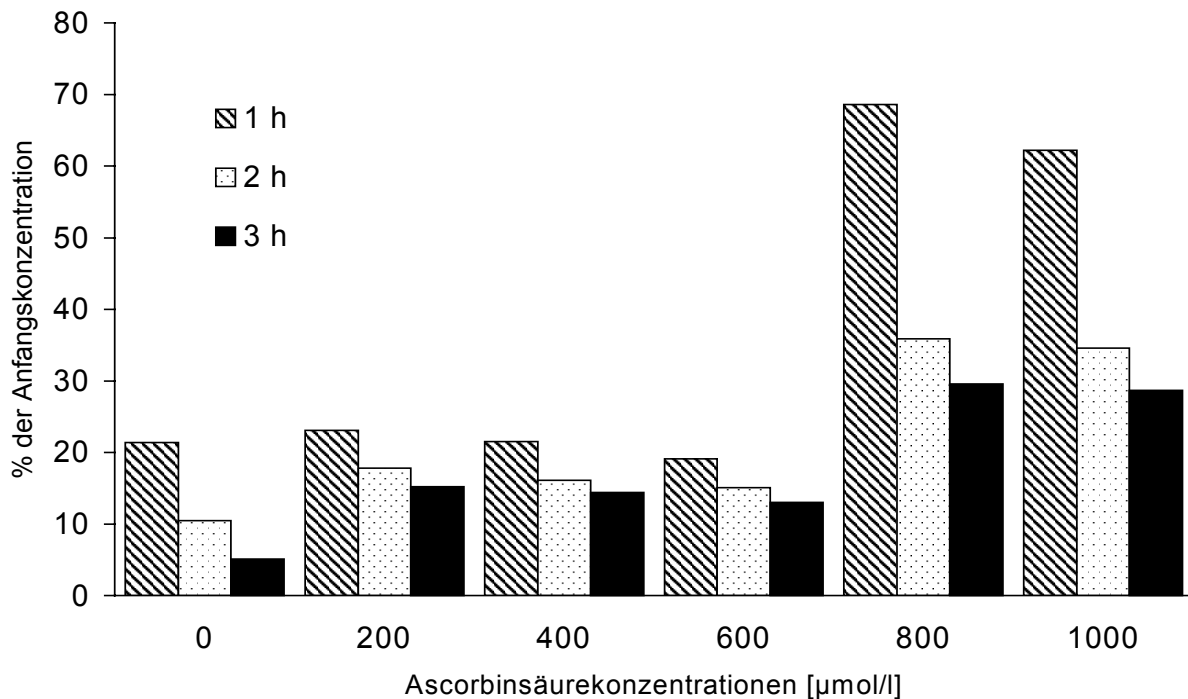
Nach Zugabe von Isoquercitrin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  in das mukosale Kompartiment nach einer Äquilibrierungs-Zeit von 30 min blieb der Isc am Jejunum- und Colon-Präparat unverändert. Die Zugabe von 20 mmol/l Glukose mukosal am mittleren Jejunum bzw. 100  $\mu\text{mol/l}$  Carbachol serosal am proximalen Colon gegen Ende der Versuchszeit bewirkten einen deutlichen Anstieg des Isc und belegt die Vitalität des Gewebes bis zum Ende der Versuchsperiode. Die Gewebeleitfähigkeit bewegte sich während der gesamten Versuchsperiode zwischen 20 und 30  $\text{mS}\cdot\text{cm}^2$  am Jejunum bzw. 15 und 25  $\text{mS}\cdot\text{cm}^2$  am Colon.

## **4.2.2 Stabilitätsversuche**

Einleitend zu den Ussing-Kammer-Versuchen wurde in einer Reihe von Vorversuchen die Stabilität von Quercetin, Isoquercitrin, Spiraeosid und Rutin unter den gewählten Versuchsbedingungen überprüft. Dazu wurden die Ussing-Kammern ohne ein Darmgewebepräparat mit Krebs-Phosphat-Puffer und der entsprechenden Testsubstanz beschickt und zu definierten Zeiten Proben für die HPLC-Analyse entnommen.

### **4.2.2.1 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Stabilität von Quercetin in KPP in der Ussing-Kammer**

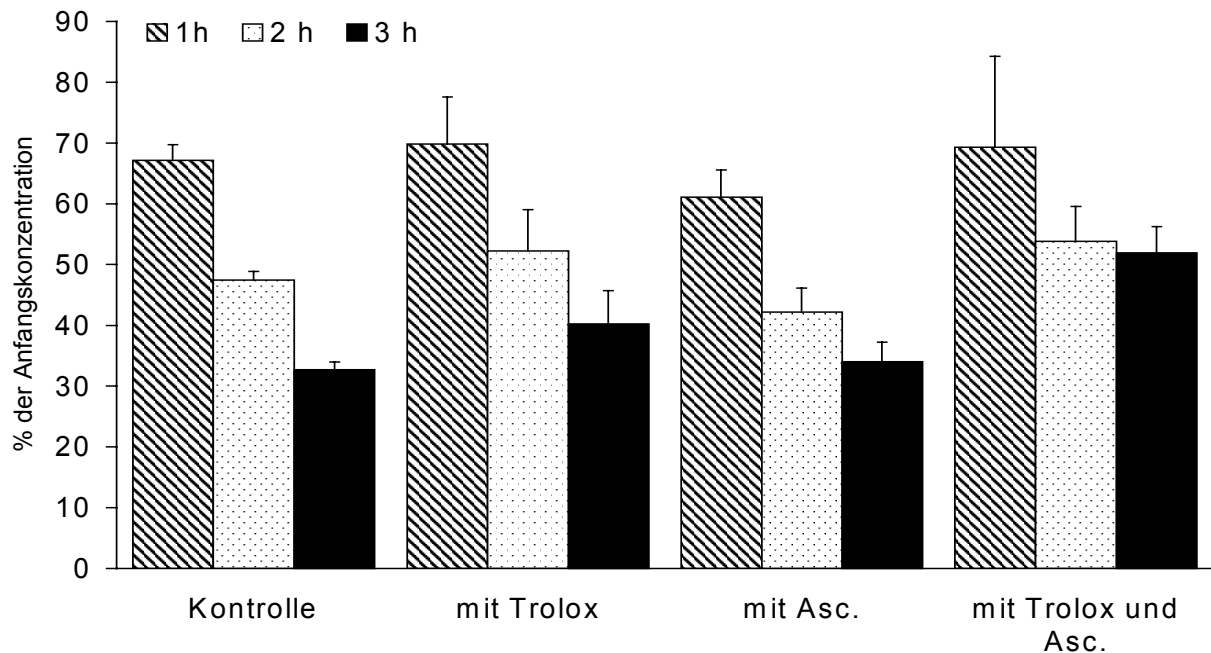
Zunächst wurde in einem Einzelversuch die Stabilität des Aglykons Quercetin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) in Krebs-Phosphat-Puffer in der Ussing-Kammer bei 37 °C, pH 6,8 und permanenter Sauerstoffbegasung über einen Zeitraum von 3 h überprüft. Nach Ablauf dieser Zeit konnte weniger als 10 % der Anfangskonzentration von Quercetin wiedergefunden werden. Um einer möglichen oxidativen Veränderung des Quercetin-Moleküls entgegen zu wirken, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Ascorbinsäure zugegeben. Durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure im Medium konnte zwar eine Erhöhung der verbleibenden Konzentration an Quercetin nach Ablauf von 3 h in der Ussing-Kammer erreicht werden, eine deutliche Abnahme der Quercetin-Konzentration wurde dadurch aber nicht verhindert (Abbildung 15). Vergleichbare Untersuchungen ohne Sauerstoffbegasung führten zu ähnlichen Resultaten, so dass die Instabilität von Quercetin weitgehend unabhängig von der Begasung zu sein scheint.



**Abbildung 15:** Einfluss von Ascorbinsäure auf die Stabilität von Quercetin (100 µmol/l) in der Ussing-Kammer in KPP bei permanenter Sauerstoffbegasung  
n = 1

#### 4.2.2.2 Einfluss von Trolox und Ascorbinsäure auf die Stabilität von Quercetin in KPP in der Ussing-Kammer

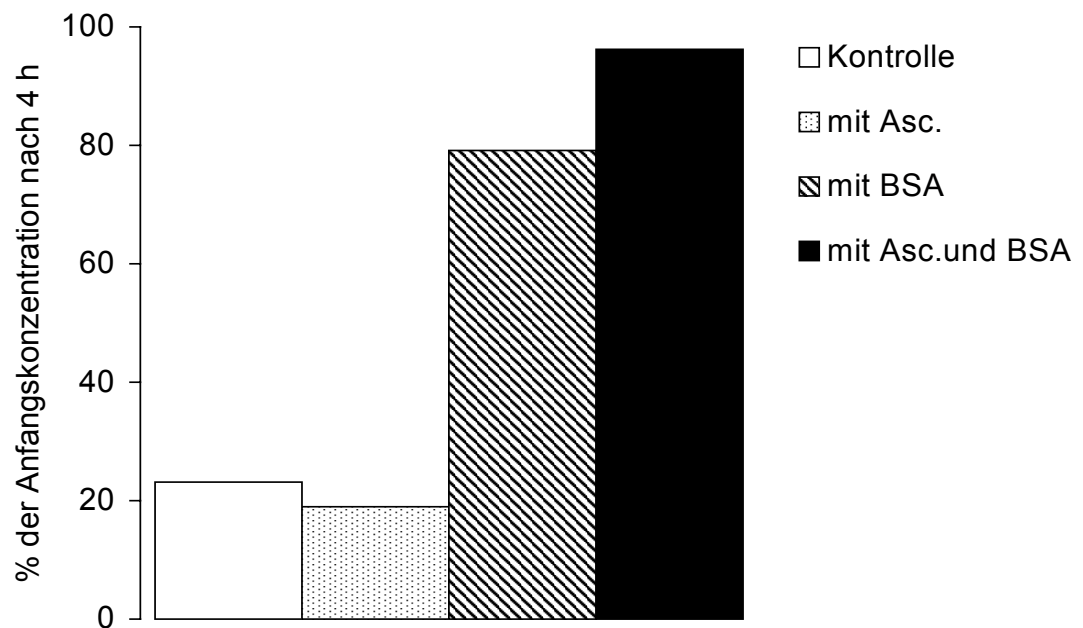
Der Zusatz von Trolox (6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure), einem wasserlöslichen Vitamin E-Analog, in einer Konzentration von 500 µmol/l im KPP erbrachte keine Stabilisierung von Quercetin (100 µmol/l) in der Ussing-Kammer. Nach 3 h waren, ähnlich wie unter Kontrollbedingungen bzw. nach Zusatz von 500 µmol/l Ascorbinsäure, nur noch ca. 30 - 40 % der initialen Quercetin-Konzentration nachweisbar. Auch die gleichzeitige Zugabe von Trolox und Ascorbinsäure (jeweils 500 µmol/l) führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Stabilität von Quercetin (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Einfluss von Trolox und Ascorbinsäure (jeweils 500  $\mu\text{mol/l}$ ) auf die Stabilität von Quercetin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) in KPP in der Ussing-Kammer bei permanenter Sauerstoffbegasung  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 3

#### 4.2.2.3 Einfluss von Ascorbinsäure und BSA auf die Stabilität von Quercetin

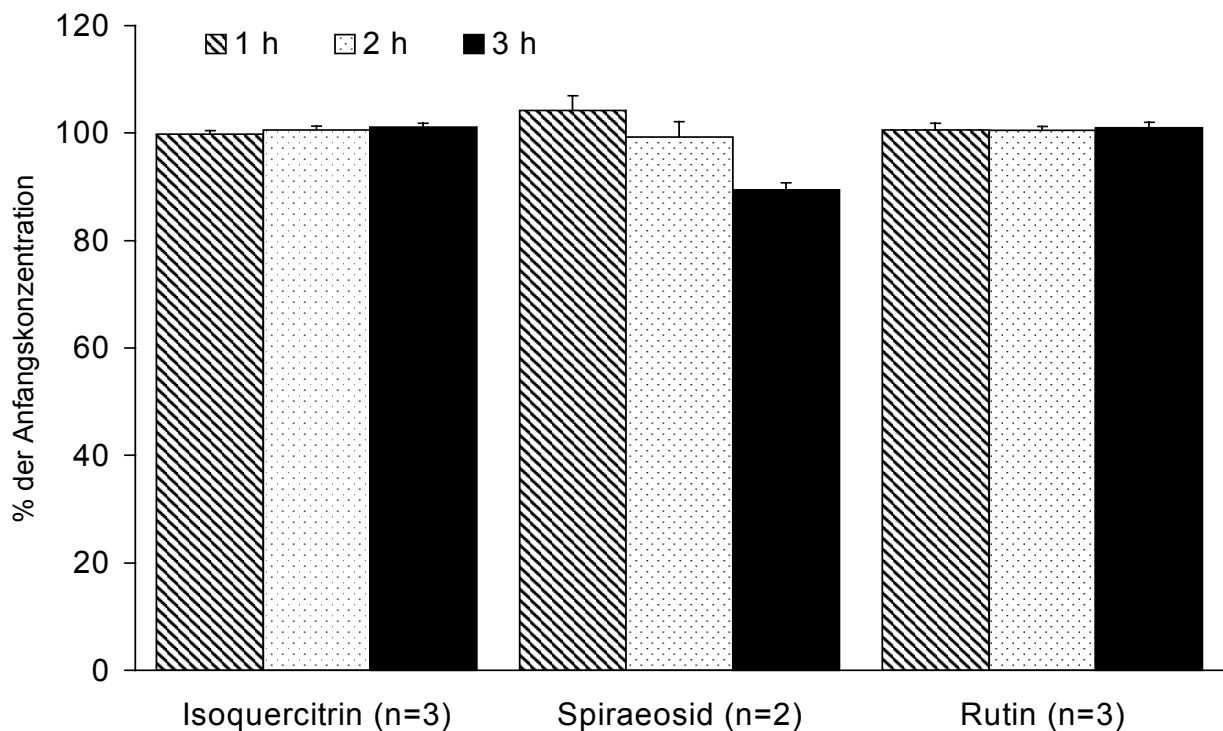
In weiteren Vorversuchen wurde den Versuchsmedien bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 2 % und/oder Ascorbinsäure (500  $\text{mmol/l}$ ) zugegeben. Im Unterschied zu Ascorbinsäure führte der Zusatz von BSA zu einer wesentlichen Steigerung der Quercetin-Wiederfindung (Abbildung 17). Dieser „stabilisierende“ Effekt von Albumin beruht wahrscheinlich auf einer intensiven Bindung von Quercetin (Boulton et al. 1998). Allerdings konnte in den Versuchen BSA nicht eingesetzt werden, da es bei Begasung zu einer starken Schaumbildung in der Ussing-Kammer führte.



**Abbildung 17:** Einfluss von Ascorbinsäure (Asc., 500 µmol/l) und bovinem Serumalbumin (BSA, 2%) auf die Stabilität von Quercetin (100 µmol/l) in KPP ohne Sauerstoffbegasung  
n = 1

#### 4.2.2.4 Stabilität der Quercetin-Glykoside in der Ussing-Kammer

Im Unterschied zum Aglykon Quercetin erwiesen sich die Quercetin-Glukoside Isoquercitrin und Spiraeosid sowie das Quercetin-Rhamnoglykosid Rutin über einen Zeitraum von 3 h als stabil (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Stabilität von Isoquercitrin, Spiraeosid und Rutin (jeweils 100  $\mu\text{mol/l}$ ) in KPP in der Ussing-Kammer bei permanenter Sauerstoffbegasung  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 2 - 3

### 4.2.3 Absorptionsversuche

Im weiteren Verlauf wurde die Absorption von Isoquercitrin und Rutin am mittleren Jejunum und proximalen Colon untersucht. Aufgrund der gezeigten Instabilität in KPP blieb Quercetin als Testsubstanz bei den Absorptionsversuchen unberücksichtigt. Des Weiteren wurde aus Kostengründen auf den Einsatz von Spiraeosid verzichtet. Die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchung mit der „Mucosal-uptake-Technik“ sowie die Resultate anderer Arbeitsgruppen (Olthof et al. 2000, Hollman et al. 1999) zeigten, dass sich dieses Quercetin-Glukosid grundsätzlich wie Isoquercitrin verhält.



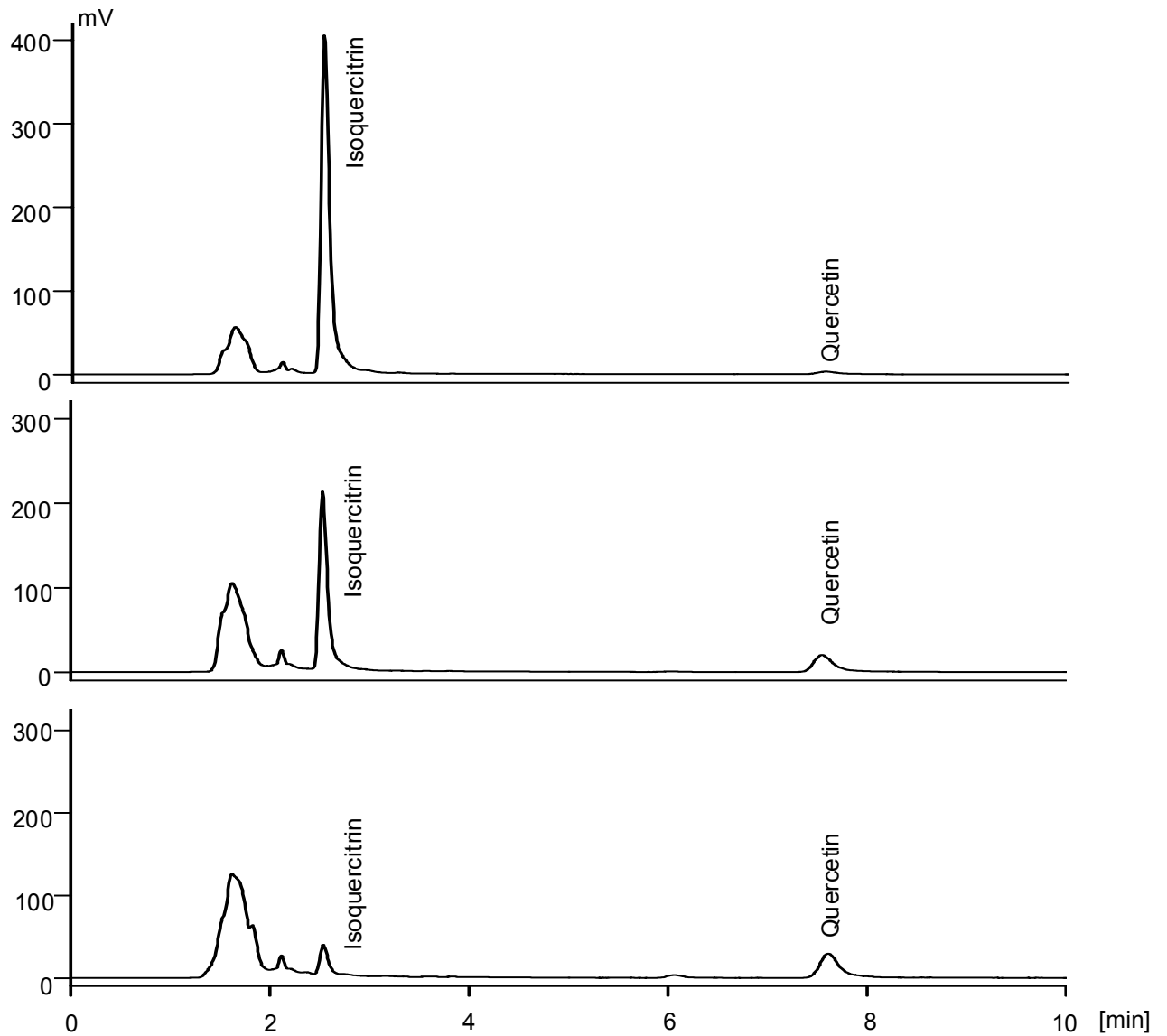
#### **4.2.3.1 Einfluss von Glukose auf die Absorption von Isoquercitrin im mittleren Jejunum**

In der ersten Versuchsreihe zur Untersuchung der Absorption von Isoquercitrin am mittleren Jejunum der Ratte wurde dem mukosalen glukosefreien Medium Isoquercitrin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  zugegeben. Mit fortschreitender Versuchsdauer sank die Konzentration von Isoquercitrin im mukosalen Medium kontinuierlich, begleitet von einem Anstieg der Quercetin-Konzentration. Nach 1 h waren nur noch 43,2 % der bei Versuchsbeginn eingesetzten Isoquercitrin-Konzentration nachweisbar. Nach 2 h reduzierte sich die Konzentration auf 14,4 % (Abbildung 20). In Abbildung 19 sind exemplarisch die HPLC-Chromatogramme mukosaler Ussing-Kammer Proben (Kontrollbedingung), die unmittelbar nach Zugabe von Isoquercitrin sowie 1 h und 2 h später entnommen wurden, dargestellt.

Der Austausch von Mannit durch Glukose im mukosalen Medium (10 mmol/l) führte zu einer signifikant höheren Endkonzentration von Isoquercitrin nach 2 stündiger Inkubation. In Gegenwart von Glukose war die verbliebene Isoquercitrin-Konzentration mehr als doppelt so hoch wie unter Glukose-freien Bedingungen (Abbildung 20).

Die gemessenen Quercetin-Konzentrationen im mukosalen Kompartiment lagen nach 2 h unter glukosefreien Bedingungen bei  $67,4 \pm 3,4 \mu\text{mol/l}$  und im glukosehaltigen Medium bei  $46,04 \pm 6,5 \mu\text{mol/l}$ . Allerdings lässt sich anhand der nach 2 h im Medium gefundenen Quercetin-Konzentration aufgrund der nachgewiesenen Instabilität dieser Verbindung keine gesicherte Aussage über den genauen Umfang der während des Versuchs freigesetzten Quercetin-Menge machen.

In dieser Versuchsreihe konnte unter keinen der untersuchten Bedingungen Isoquercitrin oder Quercetin im serosalen Kompartiment nachgewiesen werden. Somit scheint kein Transfer von intakten Quercetin-Glukosiden bzw. von Quercetin stattgefunden zu haben.

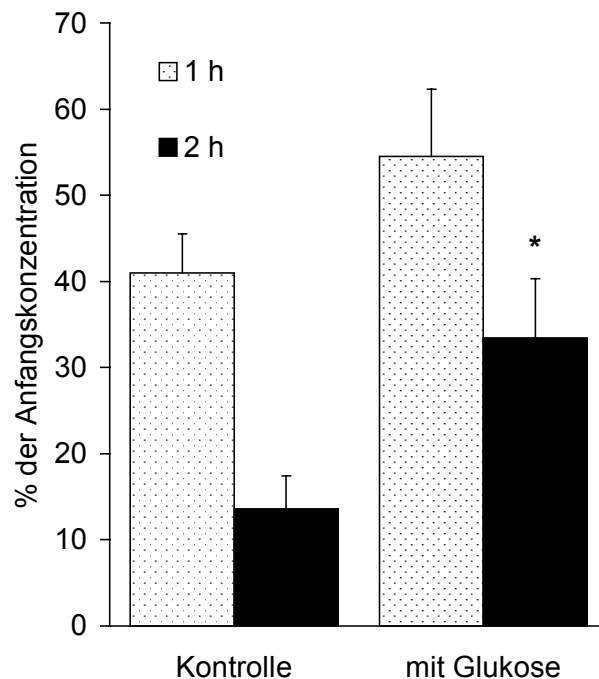


**Abbildung 19:** HPLC-Chromatogramme mukosaler Ussing-Kammer Proben (Kontrollbedingung, mittleres Jejunum) nach Zugabe von Isoquercitrin ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) in das mukosale Kompartiment.

Oben: Probe unmittelbar nach Zugabe von Isoquercitrin

Mitte: Probe nach 1 h

Unten: Probe nach 2 h

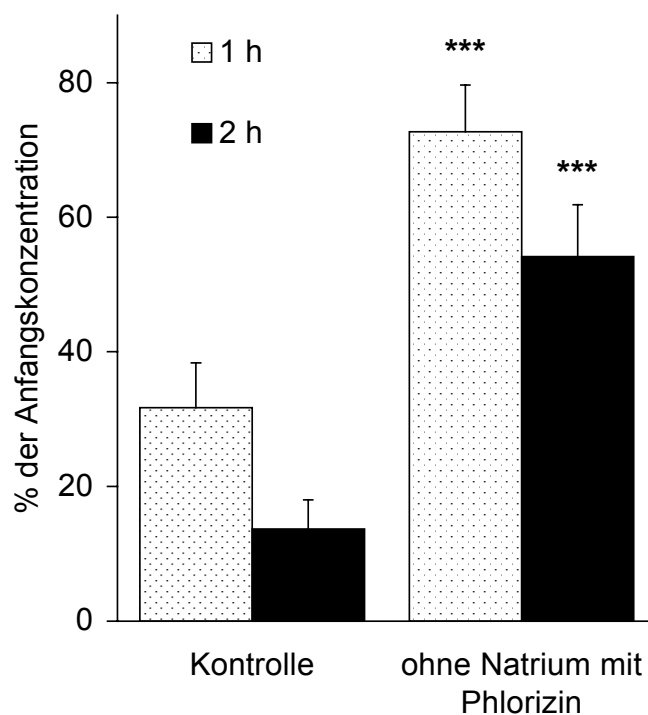


**Abbildung 20:** Einfluss von Glukose (10 mmol/l) auf den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer (mittleres Jejunum)  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8 - 9, KPP mit Mannit (Kontrolle) bzw. Glukose (je 10 mmol/l), \* signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Isoquercitrin-Konzentration in Gegenwart von Glukose im mukosalen Medium

#### 4.2.3.2 Einfluss von Natrium und Phlorizin auf die Absorption von Isoquercitrin im mittleren Jejunum

Um eine mögliche Beteiligung des  $\text{Na}^+$ -abhängigen-Glukose-Carriers an der Reduzierung der Konzentration von Isoquercitrin im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer nachzuweisen, wurde der Konzentrationsverlauf unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen bei gleichzeitigem Zusatz von Phlorizin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) im mukosalen Kompartiment bestimmt. Unter diesen Bedingungen, bei denen von einer weitgehenden Reduktion der Aktivität des SGLT1 ausgegangen werden kann, zeigte sich eine signifikante Reduzierung der mukosalen Konzentrationsabnahme von Isoquercitrin im Vergleich zu den Versuchen mit  $\text{Na}^+$ -haltigen Medium ohne Phlorizin-Zusatz (Abbildung 21). Die nach 2 h auf der mukosalen Seite gemessene Isoquercitrin-Konzentration lag bei ca. 54 % der Anfangskonzentration und somit

etwa vier mal höher als der Wert, der nach 2 h unter Kontroll-Bedingungen gefunden wurde. Auch in dieser Versuchsreihe konnte parallel zu dem Absinken der Isoquercitrin-Konzentration ein Anstieg der Quercetin-Konzentration auf der mukosalen Kammer-Seite über den Versuchszeitraum nachgewiesen werden. In sämtlichen Versuchsreihen wurde weder Quercetin noch Isoquercitrin im serosalen Kompartiment gefunden.

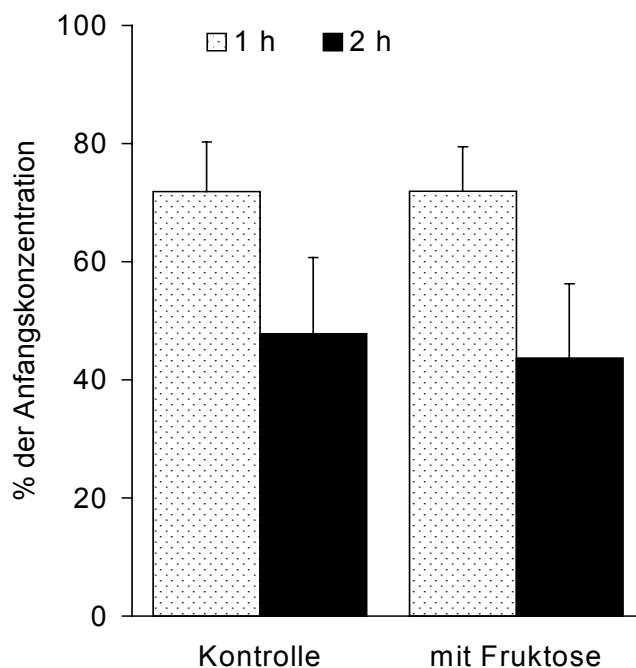


**Abbildung 21:** Einfluss von Natrium und Phlorizin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) auf den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer (mittleres Jejunum)  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, KPP (Kontrolle) bzw. KPP ohne  $\text{Na}^+$ , jeweils mit Mannit (10  $\text{mmol/l}$ ),  $n = 6 - 7$ , \*\*\* signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Isoquercitrin-Konzentration in Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  und gleichzeitiger Gegenwart von Phlorizin im mukosalen Medium

#### 4.2.3.3 Einfluss von Fruktose auf die Absorption von Isoquercitrin am mittleren Jejunum

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob der in der Bürstensaummembran lokalisierte,  $\text{Na}^+$ -unabhängige Fruktose-Carrier (GLUT5)

eine Rolle beim Transport von Isoquercitrin in das Dünndarmepithel spielen könnte. Um eine kompetitive Hemmung des Carriers zu erreichen, wurde dem mukosalen Medium statt Mannit Fruktose in einer Konzentration von 10 mmol/l zugegeben. Zudem wurde mukosal  $\text{Na}^+$ -freier KPP verwendet, um eine weitgehende Inaktivität des SGLT1 zu erreichen. Die Anwesenheit von Fruktose bewirkte keine Reduzierung der Isoquercitrin-Abnahme im mukosalen Kompartiment 1 bzw. 2 h nach Zugabe des Glukosids. In beiden Fällen verblieben nach 2 h etwa 47 bzw. 43 % der Isoquercitrin-Anfangskonzentration im mukosalen Kompartiment (Abbildung 22). Ferner lässt sich anhand dieser Ergebnisse im Vergleich mit den in Abbildung 20 bzw. Abbildung 21 dargestellten Ergebnis unter Kontrollbedingung (in Gegenwart von  $\text{Na}^+$ ) ein klarer Einfluss von Natrium auf das Verschwinden von Isoquercitrin aus dem mukosalen Medium erkennen.



**Abbildung 22:**

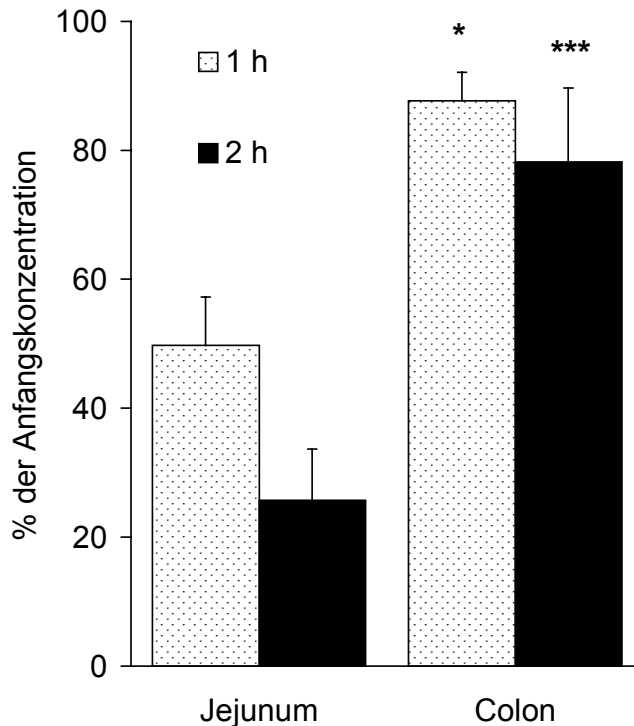
**Einfluss von Fruktose (10 mmol/l) auf den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer (mittleres Jejunum).**

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 6, KPP mit Mannit bzw. Fruktose (je 10 mmol/l) ohne  $\text{Na}^+$

Auch unter diesen Versuchsbedingungen konnte in der Kontroll- und der Versuchsgruppe zu beiden Messzeitpunkten mit dem Absinken der Isoquercitrin-Konzentration eine Erhöhung der Quercetin-Konzentration im mukosalen Kompartiment detektiert werden. Ein Transport von Isoquercitrin und Quercitrin durch das Jejunum-Präparat auf die serosale Kammerseite fand nicht statt.

#### **4.2.3.4 Absorption von Isoquercitrin am proximalen Colon**

Nach Zugabe von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) in das mukosale Kompartiment der Ussing-Kammer konnte gezeigt werden, dass am proximalen Colon zum Zeitpunkt 1 h und 2 h nach Zugabe jeweils eine signifikant höhere Konzentration von Isoquercitrin im Medium vorhanden war, als im entsprechenden mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammern, die mit Jejunum-Präparaten bestückt waren (Abbildung 23). Gleichzeitig wurde 2 h nach Zugabe von Isoquercitrin bei Verwendung des proximalen Colons deutlich weniger Quercetin auf der mukosalen Seite detektiert als am mittleren Jejunum. Die Quercetin-Konzentration im mukosalen Kompartiment der mit Colon präparierten Kammern war im Vergleich mit Jejunum weniger als halb so groß ( $8,2 \pm 4,0$  bzw.  $22,2 \pm 3,4$   $\mu\text{mol/l}$ ). Auch unter diesen Versuchsbedingungen konnten weder Isoquercitrin noch Quercitrin auf der serosalen Darmseite nachgewiesen werden.



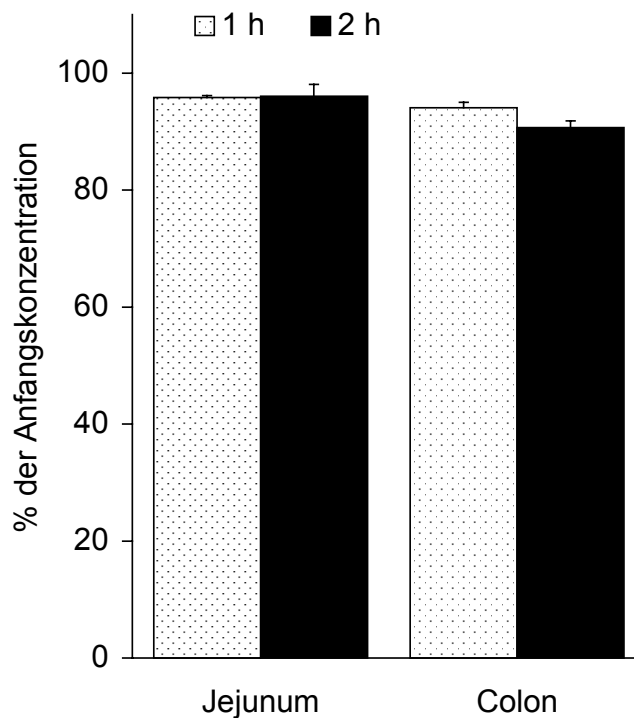
**Abbildung 23:**

**Einfluss der Darmsegmente auf den Konzentrations-Zeit-Verlauf von Isoquercitrin (100  $\mu\text{mol/l}$ ) im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer (mittleres Jejunum und proximales Colon)**

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4 - 6, KPP mit Mannit, \*, \*\*\* signifikant ( $p < 0,05$  bzw. 0,001) höhere Isoquercitrin-Konzentration im mukosalen Medium des Colons im Vergleich zu der des Jejunums

#### 4.2.3.5 Zugabe von Isoquercitrin in das serosalen Kompartiment

Bei der Zugabe von Isoquercitrin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  in das serosale Kompartiment der Ussing-Kammer sank die Isoquercitrin-Konzentration über einen Zeitraum von 2 h sowohl bei Verwendung von mittlerem Jejunum als auch proximalem Colon um weniger als 6 % (Abbildung 24). Gleichzeitig wurden nach 2 h in beiden Fällen nur sehr geringe Konzentrationen ( $2,18 \pm 0,18$  bzw.  $1,64 \pm 0,9$   $\mu\text{mol/l}$ ) Quercetin auf der serosalen Darmseite gefunden. Weder Isoquercitrin noch Quercetin waren über den Versuchszeitraum von 2 h im mukosalen Kompartiment nachweisbar.

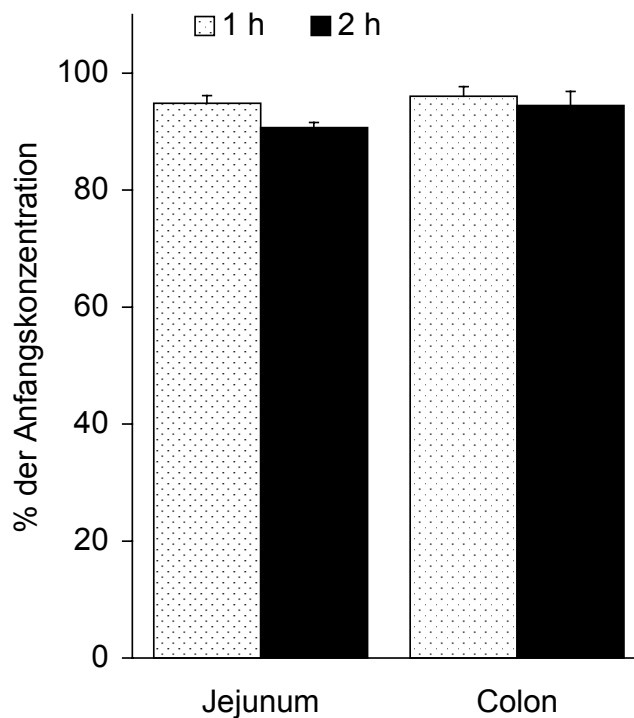


**Abbildung 24:** Konzentrations-Zeit-Verlauf von Isoquercitrin (100 µmol/l) im serosalen Kompartiment (mittleres Jejunum und proximales Colon) nach serosaler Zugabe  
Mittelwerte ± SEM, n = 3 - 6

#### 4.2.3.6 Absorption von Rutin am mittleren Jejunum und proximalen Colon

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Absorption des Quercetin-Rhamnoglukosids Rutin am mittleren Jejunum und proximalen Colon untersucht. Dazu wurde jeweils dem mukosalen Medium der Ussing-Kammer Rutin in einer Konzentration von 100 µmol/l zugegeben. Sowohl bei den Kammern mit mittlerem Jejunum als auch bei denjenigen mit proximalen Colon waren nach 1 h bzw. 2 h noch über 90 % der Rutin-Anfangskonzentration im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer vorhanden (Abbildung 25). Quercetin konnte in beiden Fällen weder mukosal noch serosal nachgewiesen werden. Ein Transport von Rutin vom mukosalen in das serosale Kompartiment wurde am Jejunum wie am Colon nicht beobachtet.



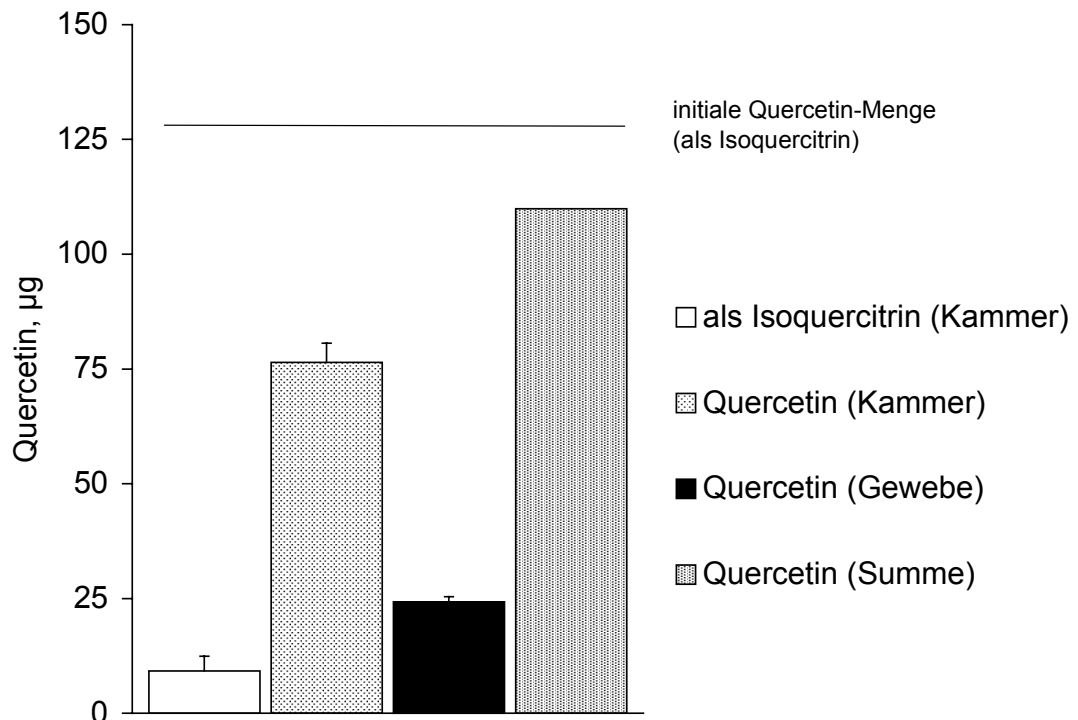


**Abbildung 25:** Konzentrations-Zeit-Verlauf von Rutin (100 µmol/l) im mukosalen Kompartiment (mittleres Jejunum und proximales Colon)  
Mittelwerte ± SEM, n = 4

Des Weiteren wurde in einem Einzelversuch Rutin in einer Konzentration von 100 µmol/l im serosalen Kompartiment der Ussing-Kammer eingesetzt, die mit Jejunum bzw. Colon präpariert waren. In beiden Fällen lag die Konzentrationsabnahme von Rutin im serosalen Kompartiment 1 bzw. 2 h nach Rutin-Zugabe unter 5%. Quercetin wurde im serosalen und mukosalen Kompartiment nicht gefunden. Rutin war im mukosalen Kompartiment nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht abgebildet).

#### 4.2.3.7 Bilanzierung der Quercetinmenge nach Einsatz von Isoquercitrin

Zum Nachweis der Absorption bzw. Adsorption von Isoquercitrin wurden insgesamt 6 Jejunum-Gewebepräparate, die aus Ussing-Kammer-Versuchen mit mukosaler Zugabe von Isoquercitrin ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) stammten, einer Gewebeextraktion unterzogen. In sämtlichen Gewebeproben wurde Quercetin ( $24,3 \pm 1,1 \mu\text{g}$ ) gefunden, Isoquercitrin war in keiner Probe nachweisbar. Im mukosalen Medium wurden nach einer Versuchsdauer von 2 h  $76,4 \pm 4,2 \mu\text{g}$  Quercetin und  $9,2 \pm 3,2 \mu\text{g}$  Quercetin aus Isoquercitrin nachgewiesen. Da bei einer eingesetzten Isoquercitrin-Konzentration von  $100 \mu\text{mol/l}$  durch die Hydrolyse der  $\beta$ -glykosidischen Bindung des Isoquercitrin-Moleküls maximal  $128,1 \mu\text{g}$  Quercetin entstehen können, ergibt sich unter Berücksichtigung des im Kammer-Medium  $\beta$ -glykosidisch als Isoquercitrin gebundenen Quercetins eine Wiederfindung von ca. 86 % (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Wiederfindung von Quercetin nach mukosaler Zugabe von Isoquercitrin ( $100 \mu\text{mol/l}$ , mittleres Jejunum)  
Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 6

Dies scheint im Hinblick auf die unter 4.2.2 gezeigte Instabilität von Quercetin zunächst erstaunlich. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die Stabilitätsversuche ohne Gewebe durchgeführt wurden. So mit ist denkbar, dass aufgrund der Anwesenheit von Protein (Gewebe, sezerniertes Protein) eine Stabilisierung von Quercetin vorlag, wie sie auch in Anwesenheit von BSA gefunden wurde (siehe 4.2.2.3). An dieser Stelle muß jedoch nochmals kritisch darauf hingewiesen werden, dass offensichtlich auch von Versuch zu Versuch erhebliche Schwankungen bezüglich der im mukosalen Medium gemessenen Quercetin-Konzentration vorlagen (siehe 4.2.3.1 und 4.2.3.4) und somit nur eine vorsichtige Interpretation der Daten möglich ist.

#### **4.2.3.8 Glukuronidase-Behandlung**

Da in verschiedenen Untersuchungen (Ader et al. 2000, Crespy et al. 1999, Spencer et al. 1999) gezeigt wurde, dass Flavonoid-Glykoside nach  $\beta$ -glykosidischer Spaltung bereits in der Darmmukosa glukuronidiert und sulfatiert und anschliessend sowohl nach mukosal als auch nach serosal sezerniert werden, wurde in der vorliegenden Studie auch geprüft, ob im mukosalen bzw. serosalen Medium von mit mittlerem Jejunum bestückten Ussing-Kammern ( $n = 4$ ,  $100 \mu\text{mol/l}$  Isoquercitrin mukosal) nach 2-stündiger Versuchsdauer Quercetin-Glukuronide bzw. -Sulfate vorlagen. Dazu wurden die entnommenen Proben einer Behandlung mit  $\beta$ -Glukuronidase unterzogen. Da kein Anstieg der Quercetin-Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme der Konzentration unidentifizierbarer Substanzen festzustellen war, ist davon auszugehen, dass von der Darmmukosa unter diesen Versuchsbedingungen keine Quercetin-Glukuronide sezerniert wurden.