

5 Diskussion

Flavonoide werden in allen höheren Pflanzen als sog. sekundäre Metabolite synthetisiert und erfüllen hier eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Bis heute wurden mehr als 4000 verschiedenen Flavonoide identifiziert, wobei es sich überwiegend um Glykoside handelt. In zahlreichen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Flavonoide als Antioxidantien und Modulatoren zahlreicher Enzyme wirken und möglicherweise an der Prävention von Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und anderen im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehenden Erkrankungen im Säugerorganismus beteiligt sein könnten. Über den Umfang und den Mechanismus von mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoiden liegen aber bisher unzureichende Daten vor. Dies gilt auch für die Frage, ob Flavonoide als Aglykon oder, wie sie vornehmlich in Pflanzen vorkommen, als Glykosid absorbiert werden. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass der in der intestinalen Bürstensaummembran lokalisierte Na⁺-abhängige Glukosecarrier (SGLT1) an der Absorption bestimmter Quercetin-Glukoside beteiligt sein könnte (Mizuma et al. 1994, Hollman et al. 1995, Noteborn et al. 1997, Gee et al. 1998, Walgren et al. 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Quercetin-Glukosiden zu untersuchen. Dazu wurden mit Hilfe der „mucosal-uptake“-Technik und der Ussing-Kammer überprüft, ob das Aglykon Quercetin und die Quercetin-Glukoside Isoquercitrin und Spiraeosid sowie das Diglykosid Rutin mit dem SGLT1 interagieren bzw. Isoquercitrin und Rutin über diesen Carrier in die Mukosazelle transportiert werden.

Dazu wurde im ersten Teil dieser Studie mit Hilfe der „mucosal-uptake“-Technik die initiale, Na⁺-abhängige Aufnahme des Glukose-Analogs MDG in die Mukosazelle bei An- bzw. Abwesenheit der Versuchssubstanzen gemessen. MDG wird wie D-Glukose über den SGLT1 in die Dünndarmzelle transportiert. Eine Metabolisierung im Enterozyten findet aber nicht statt (Aoshima et al. 1997). Dieser indirekte Ansatz lässt Rückschlüsse auf eine Interaktion der Testsubstanzen mit dem Glukose-Carrier zu.

Die Funktionsfähigkeit des SGLT1 unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde durch folgende Befunde belegt:

Die mukosale Aufnahme von MDG zeigte eine deutliche Na^+ -Abhängigkeit und wurde durch den etablierten SGLT1-Hemmstoff Phlorizin nahezu vollständig gehemmt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von MDG kompetitiv durch die Anwesenheit von nicht markierten MDG im Inkubationsmedium signifikant reduziert wurde (Selbsthemmung).

Da sowohl Isoquercitrin (Quercetin-3-Glukosid) als auch Spiraeosid (Quercetin-4'-Glukosid) die Carrier-vermittelte Na^+ -abhängige MDG-Aufnahme in die Mukosazelle signifikant hemmten, während Quercetin (Aglykon) und Rutin (Quercetin-3-Rhamnosid) keinen Effekt zeigten, kann auf eine Interaktion der untersuchten Quercetin-Glukoside mit dem intestinalen SGLT1 geschlossen werden. Dabei scheint die Position des Glukoserestes (3 vs. 4') am Quercetin-Molekül keinen Einfluss auf Interaktion mit dem Carrier zu haben. Da die mukosale L-Alanin-Aufnahme durch die Anwesenheit der Quercetin-Glukoside weitgehend unbeeinflusst blieb, lässt sich ein spezifischer Effekt der Quercetin-Glukoside auf den SGLT1 postulieren. Die Tatsache, dass bereits bei einer Isoquercitrin-Konzentration von 0,125 mmol/l im Versuchsmedium eine signifikante Hemmung der MDG-Aufnahme gezeigt werden konnte, während dieser Effekt bei Gegenwart von MDG in einer Konzentration von 1 mmol/l im Versuchsmedium (Selbsthemmungs-Effekt) noch nicht zu beobachten war, lässt den Schluss zu, dass Quercetin-Glukoside eine deutlich höhere Affinität zum SGLT1 haben als MDG.

Das Aglykon Quercetin wurde wegen seiner begrenzten Löslichkeit im wässrigen Medium in einer Konzentration von 0,25 mmol/l im Versuchsmedium eingesetzt. Da aber bereits bei einer Isoquercitrin-Konzentration von 0,125 mmol/l eine signifikante Hemmung der mukosalen MDG-Aufnahme beobachtet wurde, ist die fehlende Hemmwirkung von Quercetin wahrscheinlich auf eine fehlende oder zumindest deutlich geringere Interaktion des Aglykons mit dem SGLT1 zurück zu führen.

Untersuchungen zum Einfluss von Quercetin-Glukosiden auf die Kinetik der mukosalen MDG-Aufnahme ergaben Hinweise auf die Art der Interaktion am Glukosecarrier: Die Zunahme des apparenten K_m -Wertes durch Isoquercitrin bzw. Spiraeosid von 5,9 auf 14,9 bzw. von 5,8 auf 17,8 bei vergleichsweise geringfügiger Veränderung des V_{\max} -Wertes (1,5-fach) sprechen für eine überwiegend kompetitive Hemmung des SGLT1 durch diese Glukoside.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit der Ussing-Kammer lassen ebenfalls auf eine Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Flavonoid-Glukosiden im Dünndarm schließen: So konnte bei Versuchen am mittleren Jejunum gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von Glukose im mukosalen Medium das Verschwinden von Isoquercitrin über einen Zeitraum von 2 h signifikant reduziert wurde. Dies lässt sich durch eine Hemmung der Isoquercitrin-Aufnahme durch die Bürstensaummembran in Gegenwart von Glukose erklären. Für eine Aufnahme von Isoquercitrin in die Dünndarmmukosa spricht auch, dass unter Na^+ -freien Bedingungen bzw. mit Na^+ -freiem Medium und Zusatz von Phlorizin eine signifikante Erhöhung der verbleibenden Isoquercitrin-Konzentration nach einer bzw. zwei Stunden Versuchsdauer festgestellt wurden.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lieferten ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Flavonoid-Glukosiden. So zeigten Kimmich und Randles (1978) bei Versuchen an isolierten Dünndarmmukosazellen unter anderem eine Interaktion von Apiginin-7-Glukosid mit dem Na^+ -abhängigen Glukose-Transportsystem. Versuchsergebnisse von Mizuma et al. (1994) und Gee et al. (1998) sowie Bioverfügbarkeitsstudien von Hollman et al. (1995) wurden dahingehend interpretiert, dass ein Transport von Flavonoid-Glukosiden über den SGLT1 prinzipiell möglich sein könnte. Im Gegensatz zu den eher spekulativen Äußerungen bezüglich einer Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Flavonoid-Glukosiden konnten Walgren et al. (2000) erstmals direkt den Transport von Quercetin-4'-Glukosid über diesen Carrier mittels HPLC und Fluoreszenzmikroskopie an mit SGLT1 transfizierten Ovar-Zellen des chinesischen Hamsters sowie mit Caco-2-Zellen nachweisen.

In der vorliegenden Studie wurde bei Ussing-Kammer-Versuchen am proximalen Colon im mukosalen Kompartiment signifikant höhere Isoquercitrin-Konzentrationen zum Zeitpunkt 1 h und 2 h gemessen, als am mittleren Jejunum. Dieser deutliche Unterschied zu den Befunden am Dünndarm ist durch das Fehlen des SGLT1 in der luminalen Membran von Colonozyten zu erklären.

Die Isoquercitrin-Konzentration am mittleren Jejunum und proximalen Colon entsprach nach Zugabe in das serosale Kompartiment der Ussing-Kammer über einen Zeitraum von 2 h nahezu der Anfangskonzentration. Folglich scheint die festgestellte Konzentrationsabnahme von Isoquercitrin am mittleren Jejunum im mukosalen Kompartiment der Kammern auf spezifische, in der

Bürstensaummembran des Jejunums lokalisierte Mechanismen zurückzuführen zu sein. Da der SGLT1 ausschließlich in der Bürstensaummembran des Jejunums lokalisiert ist (Wright et al. 1994), die Versuchsergebnisse der „mukosal-uptake“-Technik eine deutliche Interaktion von Quercetin-Glukosiden mit dem SGLT1 zeigten und mit Hilfe der Ussing-Kammer-Versuche eine Korrelation zwischen der Aktivität des Glukose-Carriers und dem Verschwinden von Isoquercitrin im mukosalen Kompartiment jejunaler Präparate dargestellt werden konnte, ist eine Beteiligung des SGLT1 am Transport von Isoquercitrin durch die intestinale Bürstensaummembran sehr wahrscheinlich.

Da trotz kompetitiver Hemmung des SGLT1 durch Glukose und dessen Inaktivierung durch Abwesenheit von Natrium und Zugabe von Phlorizin im mukosalen Medium eine Abnahme der Isoquercitrin-Konzentration um ca. 60 bzw. 40 % beobachtet wurde, kann zudem auf die Beteiligung anderer Mechanismen am Verschwinden von Isoquercitrin geschlossen werden. Dabei scheint ein spontaner Zerfall des Glukosids nicht beteiligt zu sein, wie die Stabilitätsversuche gezeigt haben. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle des Na⁺-unabhängigen Fruktose-Carriers (GLUT5) bei der Absorption von Isoquercitrin untersucht. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass GLUT5 unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht am Verschwinden von Isoquercitrin beteiligt war, da in Gegenwart von Fruktose im mukosalen Versuchsmedium die Konzentration von Isoquercitrin unbeeinflusst blieb.

Nach Untersuchungen von Day et al. (1998 und 2000) könnte eine präabsorptive Spaltung der β -glykosidischen Bindung am Isoquercitrin-Molekül durch eine intestinale, membrangebundene β -Glykosidase (Laktase-Phlorizin-Hydrolase) eine Erklärung für die von der Aktivität des SGLT1 unabhängigen Abnahme der Isoquercitrin-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg der Quercetin-Konzentration im mukosalen Medium sein. Von dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass dieses Enzym eine Vielzahl von Flavonol- und Isoflavon-Glykosiden spaltet, unter anderem Isoquercitrin, nicht aber Rutin. Nach der Hydrolyse des Glukosids kann das Aglykon Quercetin aufgrund seiner Molekülgröße und seines lipophileren Charakters über Diffusion teilweise in die Enterozyten aufgenommen werden. Eine rasche Diffusion eines Flavonoid-Aglykons, des Flavons, wurde in einer Studie von Kuo et al. (1998) gezeigt. Die Autoren fanden einen temperaturabhängigen und Na⁺-unabhängigen muko-serosalen bzw. sero-mukosalen Flux von Flavon an Caco-2-Zellen.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung des Befundes, dass im Gewebe kein intaktes Isoquercitrin, wohl aber Quercetin nachgewiesen wurde, könnte die intrazelluläre Spaltung von über den SGLT1 in die Enterozyten transportiertem Isoquercitrin durch cytosolische β -Glukosidasen sein. In der Tat konnten Day et al. (1998) und Ioku et al. (1998) die Hydrolyse einiger Quercetin-Glukoside durch eine β -Glukosidase im Dünndarm des Menschen bzw. der Ratte zeigen. Sowohl das im Dünndarm des Menschen als auch der Ratte vorkommende Enzym hydrolysiert Quercetin-4'-Glukosid. Für die Glukosidase aus dem Rattendarm wurde auch eine, wenn auch deutlich geringere, Aktivität gegenüber Quercetin-3-Glukosid gezeigt (Ioku et al. 1998). Gee et al. (2000) konnten ebenfalls bei Transport-Versuchen am Jejunum der Ratte intaktes Quercetin-Glukosid weder im Darmgewebe noch im serosalen Kompartiment nachweisen und stellten bei der Passage durch das Darmepithel eine rasche Deglykosilierung des eingesetzten Quercetin-3-Glukosids fest.

Rutin wurde am mittleren Jejunum und proximalen Colon praktisch nicht absorbiert bzw. metabolisiert. Da mit Hilfe der „mukosal-uptake“-Technik eine Interaktion von Rutin mit dem SGLT1 nicht nachgewiesen werden konnte und eine Absorption von Rutin aus dem mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer nicht stattgefunden hat, verfügt offensichtlich die Darmschleimhaut des Jejunums bzw. Colons über keine Absorptionsmechanismen für das intakte Glykosid. Diese Versuchsergebnisse stimmen grundsätzlich mit den Schlussfolgerungen von Mannach et al. (1997) überein, die eine Absorption von intaktem Rutin aus dem Dünndarm ausschlossen. Während der Absorptionsversuche konnte zu keinem Zeitpunkt weder intaktes Isoquercitrin bzw. Rutin noch deren Hydrolyse-Produkt Quercetin oder dessen Glukuronate/Sulfate im Akzeptor-Kompartiment der Ussing-Kammer gefunden werden. Somit fand in diesen Untersuchungen kein Transport durch die Darmwand statt. Dies steht allerdings nicht im Widerspruch zur postulierten, teilweise über der SGLT1 vermittelten Aufnahme von Isoquercitrin in das Epithel, sondern zeigt nur, dass weder Isoquercitrin noch Quercetin aus dem subepithelialen Kompartiment durch die darunterliegenden Muskelschichten diffundiert sind. *In vivo* erfolgt ein permanenter Abtransport von Substanzen aus dem subepithelialen Kompartiment durch die intensive Versorgung mit Blutgefäßen. Somit stehen die von uns erhaltenen *in vitro*-Befunde keinesfalls im Widerspruch mit der *in vivo* gezeigten

Absorption von Quercetin (Ueno et al. 1983, Hollman et al. 1995, Manach et al. 1997, Ader et al. 2000, Izumi et al. 2000).

Während der Versuche konnten selbst im mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer keine Glukuronsäure- bzw. Schwefelsäure-Konjugate der Versuchssubstanzen detektiert werden. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass in den Mukosa-Zellen des Dünndarmes Konjugations-Reaktionen stattfinden, bei denen glukuronidierte und sulfatierte Flavonoid-Konjugate entstehen (Crespy et al. 1999, Spencer et al. 1999, Ader et al. 2000). Zumindest für Rutin ist das Fehlen von Quercetin-Konjugaten durchaus nachvollziehbar und weitgehend übereinstimmend mit Ergebnissen von Crespy et al. (1999). Die Arbeitsgruppe konnte bei Perfusionsversuchen am Rattendarm zeigen, dass Rutin von der Darmwand weder nennenswert absorbiert, noch metabolisiert wurde. Hingegen bleibt die Frage, warum zumindest im mukosalen Kompartiment bzw. in der Mukosa keine Quercetin-Konjugate gefunden wurden, unbeantwortet. Denkbar ist, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die energetische Versorgung der Mukosazellen für eine Synthese und Sekretion dieser Konjugate nicht ausreichend war, oder dass ein rascher Abbau solcher Konjugate unter den vorherrschenden Bedingungen stattgefunden hat.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchung unterstützen grundsätzlich die Hypothese einer höheren Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Gabe von Quercetin-Glukosiden im Vergleich mit Quercetin und Rutin aufgrund einer möglichen Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Quercetin-Glukosiden. (Hollman et al. 1995 und 1997). Auch weitere Ergebnisse aus Untersuchungen zum Thema Bioverfügbarkeit, bei denen in humanen Plasmaproben intakte Flavonoid-Glykoside nach deren oraler Applikation gefunden wurden (Pagana und Rice Evans 1997, Aziz et al. 1998) sind möglicherweise durch den Transport dieser Substanzen über den Glukose-Carrier erklärbar. Aufgrund der eigenen Befunde und der Daten aus der Literatur scheint für die Absorption von Quercetin und dessen Glykosiden folgende Absorptions-Hypothese denkbar:

- Die Aufnahme von freien Quercetin (Aglykon) erfolgt wahrscheinlich über Diffusion, d. h. ohne Beteiligung spezifischer Transportmechanismen. Für die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten vom Darmlumen ins Epithel ist

u. a. eine bereits in der Darmmukosa stattfindende Konjugation sowie möglicherweise der Übertritt von freien Quercetin in den subepithelialen Raum bzw. ins Blut beteiligt. Allerdings muss angemerkt werden, dass nur bei sehr hohen oral verabreichten Gaben nicht konjugiertes Quercetin im Plasma in äußerst geringen Konzentrationen nachweisbar ist.

- Quercetin-Glukoside wie Isoquercitrin und Spiraeosid können intakt über den SGLT1 in die Mukosazelle transportiert werden. Innerhalb der Enterozyten unterliegen sie einer Hydrolyse durch eine cytosolische β -Glukosidase-Aktivität. Das Aglykon unterliegt dem gleichen Schicksal wie oben geschildert.
- Flavonoid-Glukoside können aber auch durch eine membranständige β -Glykosidase (LPH) bzw. durch mikrobielle Glykosidasen hydrolysiert werden. Das freie lipophilere Aglykon ist in der Lage, durch die Bürstensaummembran zu diffundieren.
- Rutin und weitere Flavonoid-Glykoside, die keinen freien Glukoserest aufweisen und kein Substrat für die membrangebundene β -Glykosidase darstellen, werden im Dünndarm nicht absorbiert. Im Colon findet nach einer Metabolisierung durch die physiologische Mikroflora die Absorption der Metabolite statt.

Zusammengefasst lassen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse auf eine Beteiligung des in der Bürstensaummembran lokalisierten Na^+ -abhängigen Glukose-Carriers an der Absorption von Isoquercitrin und Spiraeosid und somit vermutlich auch von anderen Quercetin-Glukoside schließen. Da eine Interaktion von Quercetin und Rutin am SGLT1 nicht nachgewiesen werden konnte, scheint generell ein freier Glukosyl-Rest am Quercetin-Molekül Voraussetzung für den Transport über diesen Carrier zu sein, wobei dessen Position am Aglykon unbedeutend ist.