



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss einer Filterkaffeemischung auf ausgewählte
Parameter des oxidativen Stresses
bei gesunden Erwachsenen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Beate Moser
Matrikel-Nummer:	0308527
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner
Wien, November 2008	

Die Durchführung der Diplomarbeit erfolgte am

Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien

unter der Betreuung von
Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

und

Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien

unter der Betreuung von
Ao. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Knasmüller

DANKSAGUNG:

Ich danke allen die an dem Zustandekommen meiner Diplomarbeit mitgewirkt haben,

Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner und Ao. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Knasmüller für die Betreuung meiner Diplomarbeit.

Specials thanks to Prof. Dr. Tatjana Simic, Tanja, Anna, Maja and Maria for practical support and the nice time at the Medical University of Belgrade (Serbia)

Heike, Nina, Pezi, Christine, Franzis, Miro und Armen für die tatkräftige Unterstützung während der Studie und den vielen Tipps

Besonders danken möchte ich meinen MÄDLS: Karo, Christa, Lisa und Sigi

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich in jeglicher Hinsicht voll und ganz unterstützt haben!

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund!

ICH DANKE EUCH!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturüberblick.....	2
2.1 Ursachen und Konsequenzen von oxidativem Stress.....	2
2.2 Exogene und endogene Schutzfaktoren	3
2.3 Gesundheitliche Auswirkungen von DNA Schäden	4
2.4 Die Suche nach ROS-protectiven Substanzen in Nahrungsmitteln	7
2.5 Methoden zur Bestimmung von Oxidationsparametern	8
2.5.1 Direkter Nachweis des „Scavenging“ freier Radikale	9
2.5.2 Methoden zur Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“	9
2.5.3 Oxidation von Makromolekülen	11
2.5.3.1 Marker der Lipidperoxidation.....	11
2.5.3.2 Endpunkte der Proteinoxidation.....	13
2.5.4 Methoden zur Bestimmung oxidativer DNA Schäden	13
2.5.5 Induktion der Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme	14
2.6 Extrapolierbarkeit der Ergebnisse	16
2.7 Experimentelles Design von Humanstudien	16
2.8 Antioxidative Eigenschaften von Kaffee und seinen Inhaltsstoffen	18
2.8.1 Einleitung	18
2.8.2 Bioaktive Inhaltsstoffe von Kaffee	19
2.8.3 Antioxidative Eigenschaften von Kaffee	22
2.8.4 Antioxidative Eigenschaften von Kaffeeinhaltsstoffen	23

3	Material und Methoden.....	25
3.1	Chemikalien	25
3.2	Lösungen für die Isolierung der Lymphozyten.....	27
3.3	Lösungen und Standardreihe für die Bestimmung von Malondialdehyd	27
3.4	Lösungen für die Bestimmung der Isoprostankonzentrationen	28
3.5	Lösungen und Standardreihe für die Bestimmung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“	29
3.6	Lösungen für die Bestimmung von oxidiertem LDL.....	30
3.7	Lösungen für die Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase.....	30
3.8	Lösungen für die Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase.....	31
3.9	Durchführung der Interventionsstudie	31
3.10	Isolation der Lymphozyten	35
3.11	Messung der Konzentration von Malondialdehyd	37
3.12	Messung der Konzentration von Isoprostanen.....	38
3.13	Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“	39
3.14	Bestimmung der Konzentration von oxidiertem Low Density Lipoprotein ..	40
3.15	Messung der Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten.....	41
3.15.1	Messung der Aktivität von Glutathionperoxidase	41
3.15.2	Messung der Aktivität von Superoxiddismutase	43
3.16	Statistische Auswertung der Ergebnisse	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Ergebnisse der Malondialdehydbestimmungen	45
4.2	Ergebnisse der Messungen der Isoprostankonzentrationen	46
4.3	Ergebnisse der „Gesamten antioxidativen Kapazität“	47
4.4	Ergebnisse der Konzentrationen des oxidierten Low-Density-Lipoprotein ..	48
4.5	Ergebnisse der Messungen der Glutathionperoxidaseaktivität	49
4.6	Ergebnisse der Messungen der Superoxiddismutaseaktivität	50
5	Diskussion	51

5.1	Änderungen der Malondialdehydkonzentrationen.....	51
5.2	Änderungen der Isoprostankonzentrationen	52
5.3	Änderungen der „Gesamten antioxidativen Kapazität“	54
5.4	Änderungen der Konzentrationen von oxidiertem LDL	55
5.5	Änderungen der Aktivität der Glutathionperoxidase	56
5.6	Änderungen der Aktivität der Superoxiddismutase	58
6	Schlussbetrachtung	60
7	Zusammenfassung	62
8	Summary	63
9	Literaturverzeichnis	64
10	Appendix	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Endogene und exogene Ursache von Radikalbelastungen	2
Abbildung 2	Endogene und exogene Schutzmechanismen gegen Radikale	3
Abbildung 3	MAP – Kinase Kaskade	4
Abbildung 4	Direkte und indirekte Schädigung der Erbsubstanz durch Sauerstoffradikale	5
Abbildung 5	Teilreaktionen der Lipidperoxidationskaskade	6
Abbildung 6	Konsequenzen der Lipidperoxidation im Hinblick auf die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	7
Abbildung 7	Schematische Darstellung des radikalabhängigen und enzymatischen Bildungsweges von F ₂ -Isoprostanen	12
Abbildung 8	Katalytische Reaktion der CuZn-SOD.....	15
Abbildung 9	Reaktionsschema der GSH-Px Bestimmung.....	15
Abbildung 10	Chemische Strukturen der flüchtigen, und nicht-flüchtigen Komponenten von Kaffee	20
Abbildung 11	Schematischer Überblick über den Verlauf der Interventionsstudie und die Zeitpunkte der Probennahmen	33
Abbildung 12	Schematischer Ablauf der Probenaufarbeitung.....	34
Abbildung 13	Phasentrennung bei der Lymphozytenisolierung.....	36
Abbildung 14	Schematischer Überblick der TROLOX Reaktion.....	40
Abbildung 15	Auswirkungen von Kaffeekonsum auf die Konzentration von Malondialdehyd im Plasma.....	45
Abbildung 16	Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Konzentration der Isoprostane im Urin.....	46
Abbildung 17	Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Gesamte antioxidative Kapazität im Plasma.....	47
Abbildung 18	Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Konzentrationen von oxidiertem LDL im Plasma.....	48
Abbildung 19	Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Aktivität der Glutathion- peroxidase in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten ...	49

Abbildung 20 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Aktivität der Superoxid-dismutase in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten... 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht über ausgewählte Methoden zur Bestimmung antioxidativer Marker.....	10
Tabelle 2	Einfluss der Sortenwahl und der Produktionsprozesse auf die Konzentrationen von Kaffeeinhaltsstoffen	21
Tabelle 3	Übersicht über die Eigenschaften ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe.....	24
Tabelle 4	Angaben über Bezeichnung, Abkürzung und Herkunft der verwendeten Chemikalien.....	25
Tabelle 5	Pipettierschema der Standardreihe.....	28
Tabelle 6	Pipettierschema der Standardreihe.....	29
Tabelle 7	Pipettierschema der Standardreihe.....	30
Tabelle 8	Demographische Daten der Teilnehmer	32
Tabelle 9	Ernährungsrestriktion während der Kaffeeinterventionsstudie.....	35
Tabelle 10	Pipettierschema für Proben und Blank.....	42
Tabelle 11	Reaktionsansatz für die SOD-Bestimmung	43
Tabelle 12	Ergebnisse der Malondialdehyd Bestimmungen in humanem Plasma ...	90
Tabelle 13	Ergebnisse der Isoprostankonzentrationen im Harn	91
Tabelle 14	Ergebnisse der Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“ im Plasma.....	92
Tabelle 15	Ergebnisse der Bestimmungen von oxidiertem LDL im Plasma.....	93
Tabelle 16	Ergebnisse der spezifischen Aktivitäten der Gluthathionperoxidase in den zytosolischen Fraktionen peripherer Lymphozyten	94
Tabelle 17	Ergebnisse der Superoxiddismutaseaktivitäten in zytosolischen Fraktionen von peripheren Lymphozyten	95

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AH109A	Leberhepatomazelllinie
AO	antioxidativ
AOPP	Advanced Oxidation Protein Products
AP-1	Apoprotein-1 (Transkriptionsfaktor)
B	Blut
CAT	Katalase
CD	konjugierte Diene
CL	Chemilumineszenz Test
COX	Cyclooxygenase
C+K	Cafestol und Kahweol
CUPRAC	Copper Reducing Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Pikrylhydrazyl-Radikal
8-epi-PGF ₂	8-epi-Prostaglandin F ₂
ESCODD	European Standards Committee on Oxidative DNA Damage
ESR	Elektronenspinresonanz
FRAP	Ferric Iron Reducing Antioxidant Parameter
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Harn
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HNE	Hydroxynonenal
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Isoprostan

VIII

KG	Körpergewicht
LDL	Low-Density Lipoprotein
LOX	Lipoxygenase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MDA	Malondialdehyd
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	Nuclear Factor of Activated T- cells
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
Nrf-2	Nuclear Factor like-2
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
8-OHdG	8-Hydroxydeguanosin
ox-LDL	oxidiertes LDL
P	Probennahme
p53	Protein p53
PES _{1,2}	Prostaglandin Endoperoxid-Synthetase _{1,2}
PG	Prostaglandin
PL A ₂	Phospholipase A ₂
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Zellkulturmedium
SCGE	Einzelgelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
T	Zeitpunkt
TAC	gesamte antioxidative Kapazität
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen
t-BuOOH	Tert-butyl Hydroperoxid
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEP	1, 1, 3, 3-Tetraethoxypropan
TMB	Tetramethylbenzidin
TOSC	Total Oxidant Scavenging Capacity
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
VP	Verdünnungspuffer

1 Einleitung

Kaffee ist eines der wichtigsten Welthandelsgüter und meist konsumierten Getränke weltweit. Eine Reihe neuerer Untersuchungen weist darauf hin, dass sich Kaffee positiv auf die menschliche Gesundheit auswirkt. Da nur wenige Studien über antioxidative Effekte von Kaffee vorliegen, sollen diese in der vorliegenden Studie weiter untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob nach Konsum von papiergefiltertem Bohnenkaffee beim Menschen antioxidative Eigenschaften nachweisbar sind. Dieser Kaffee ist in Mitteleuropa und den USA die am häufigsten getrunkene Variante, und es sollte geklärt werden, ob bei durchschnittlichen Verzehrsmengen Effekte detektierbar sind.

Um eine möglichst hohe Aussagekraft zu erzielen, wurden relativ viele Probanden ($n = 40$) in die Studie inkludiert. Die Teilnehmerzahl der meisten Studien ($\geq 80\%$ der bisher mit Nahrungsmitteln durchgeführten Untersuchungen) lag unter 30 (siehe Hoelzl et al. [2]).

Im Gegensatz zu Studien, die auf der Verwendung von Fragebögen basieren, wurde eine Interventionsstudie durchgeführt um inter-individuelle Schwankungen zu reduzieren.

Da es im Fall von Kaffee nicht möglich ist eine Placebogruppe mitzuführen, wurde von den Teilnehmern im Kontrollzeitraum eine aliquote Menge an Wasser getrunken. Durch das Mitführen einer Parallelgruppe war es möglich saisonale Effekte, die eine Rolle spielen könnten [2,3], auszuschließen.

Die nachfolgenden Kapitel geben eine Übersicht über die Ursachen und Konsequenzen von zellulären Schäden die durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst werden, weiters sind die Methoden dargestellt, die derzeit eingesetzt werden um antioxidativ wirksame Nahrungsinhaltsstoffe und komplexe Nahrungsgemische (Rezepturen) zu untersuchen. Der letzte Abschnitt des Literaturüberblicks beschreibt den derzeitigen Kenntnisstand hinsichtlich der antioxidativen Eigenschaften von Kaffee und seinen Inhaltsstoffen. Diese Kapitel liefern eine Begründung für die Vorgangsweise bei der Durchführung der vorliegenden Studie, die im letzten Abschnitt des zweiten Kapitels beschrieben sind.

2 Literaturüberblick

2.1 Ursachen und Konsequenzen von oxidativem Stress

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass Störungen des Redoxstatus (oxidativer Stress) die menschliche Gesundheit maßgeblich beeinflussen [4]. Freie Sauerstoffradikale (ROS) die entweder durch exogene Belastungen (Ernährung, Tabakrauch, ionisierende Strahlung, etc.) [5] oder durch endogene Faktoren (Atmungsprozesse, Phagozytose, etc.) entstehen, führen zu zellulären Schäden [6,7]. Abbildung 1 zeigt die Hauptursachen exogener und endogener Radikalbelastungen.

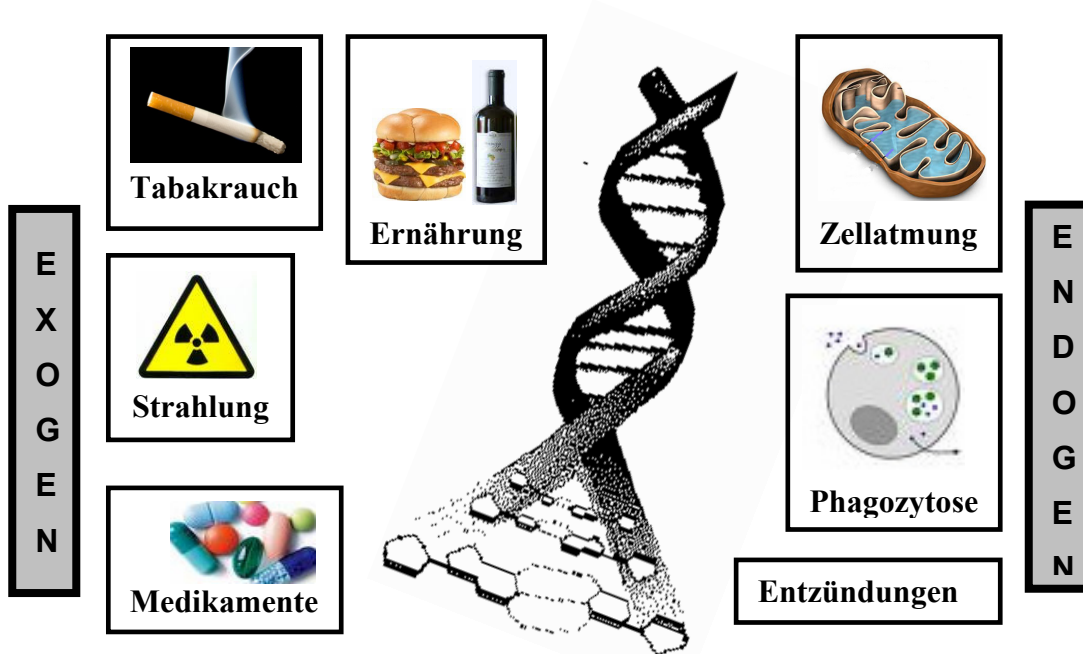


Abbildung 1 Endogene und exogene Ursache von Radikalbelastungen nach Kaliora et al. [5]

Die hohe Reaktivität von Radikalen basiert auf ihren chemisch physikalischen Eigenschaften (auf dem Vorkommen ungepaarter Elektronen in der äußeren Hülle) [8]. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Radikalspezies (beispielsweise Hyperoxidation, Hydroxylradikal, Peroxylradikal, Alkoxyradikal) die im Rahmen von Stoffwechselprozessen auch ineinander umgewandelt werden können [9,10].

ROS spielen bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle und lösen Zellschäden aus, indem sie Makromoleküle (Fettsäuren von Zellmembranen, Proteine,

DNA) oxidieren, dies führt zu Funktionsstörungen auf zellulärer Ebene die in weiterer Folge zu Krankheiten führen können [9,11,12].

2.2 Exogene und endogene Schutzfaktoren

Alle Organismen (Einzeller oder Vielzeller) besitzen effiziente Schutzmechanismen, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben, und die dazu dienen, Radikalschäden zu verhindern bzw. zu eliminieren. Es handelt sich dabei um Enzyme, die Radikale inaktivieren (typische Beispiele sind Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase), darüber hinaus werden ROS auch durch „Scavenging“ (z.B. durch Glutathion, Harnsäure und Bilirubin) inaktiviert [9,13]. Bereits ausgelöste Schäden können enzymatisch durch verschiedene DNA Reparaturenzyme behoben werden [14].

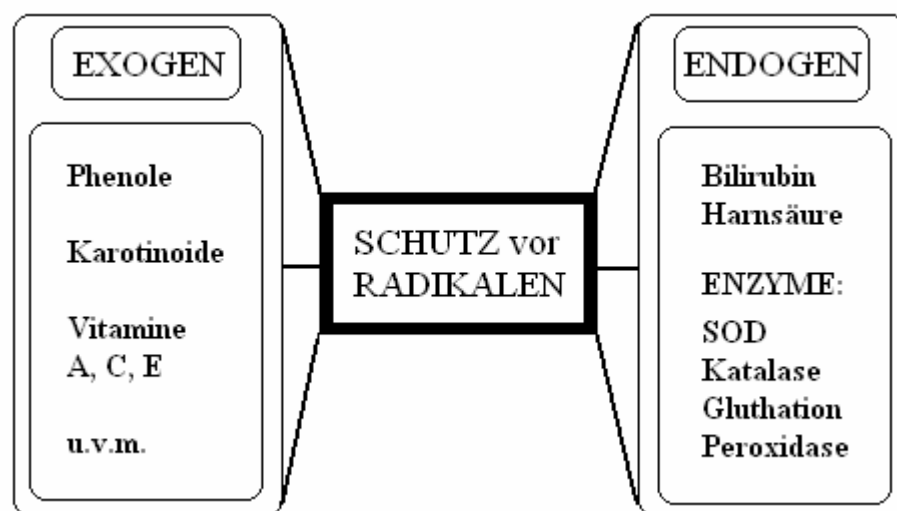


Abbildung 2 Endogene und exogene Schutzmechanismen gegen Radikale nach Kaliora et [5]

Die Folgen von oxidativem Stress auf der Ebene der Gentranskription bei Organismen sind dramatisch, beispielsweise fand man bei Hefepilzen, dass etwa ein Drittel aller Gene im Hinblick auf ihr Expressionsmuster verändert werden [15].

Zu den interessantesten Erkenntnissen der modernen Molekularbiologie zählt die Aufklärung der Mechanismen, mit der Lebewesen auf Radikalschäden reagieren. Durch Reaktionen die an der Membran stattfinden, werden Moleküle die intrazellulär Signale übertragen aktiviert, beispielsweise MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte Proteinkinasen). Diese lösen die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma aus, die die

Expression von Genen steuern [16-18]. Einige dieser Transkriptionsfaktoren und ihre zellulären Funktionen sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

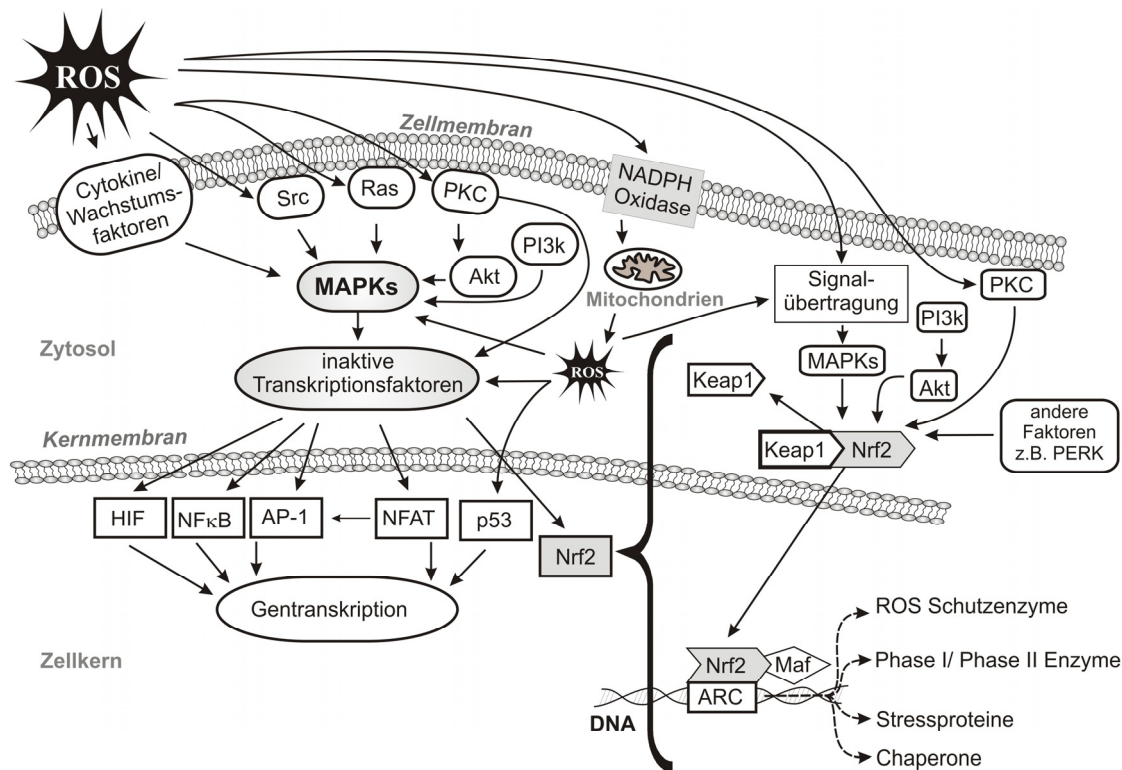


Abbildung 3 MAP – Kinase Kaskade; modifiziert nach Nersesyan et al., 2007, Use of proteomic-based approaches to investigate the consequences of oxidative DNA damage and protective effects of dietary factors [19]. **AP-1** reguliert Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose; **NF-κB** Genaktivierung im Nukleus die bei Entzündungsprozessen, Transformation und Angiogenese beteiligt sind; **p53** unterdrückt Zellproliferation und induziert Apoptose; **NFAT** und **HIF** regulieren Muskelwachstum, Differenzierung, Bildung von Cytokinen; **Nrf2** Transkriptionsfaktor, spielt eine wichtige Rolle im Redoxstatus [14,19]

2.3 Gesundheitliche Auswirkungen von DNA Schäden

Die gesundheitlichen Konsequenzen von ROS bedingten Schäden wurden in einer Reihe von Übersichtsarbeiten beschrieben [4,20].

Zahlreiche Krankheiten stehen mit Sauerstoffradikalen in kausalem Zusammenhang, beispielsweise die Auslösung von Krebs [21,22], die Beschleunigung von Alterungsprozessen [4], Herz-Kreislauferkrankungen [23-25], Arthritis, neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer [26-31] und Erbkrankheiten, um nur einige zu nennen. In diesem Zusammenhang ist auch erwähnenswert, dass zahlreiche Ent-

zündungen, Diabetes, Infertilität sowie Niereninsuffizienz durch erhöhte Radikalbelastungen charakterisiert sind [32-34].

In Abbildung 4 sind die direkten und indirekten Mechanismen dargestellt durch die Radikalbelastungen zu Schäden der Erbsubstanz führen.

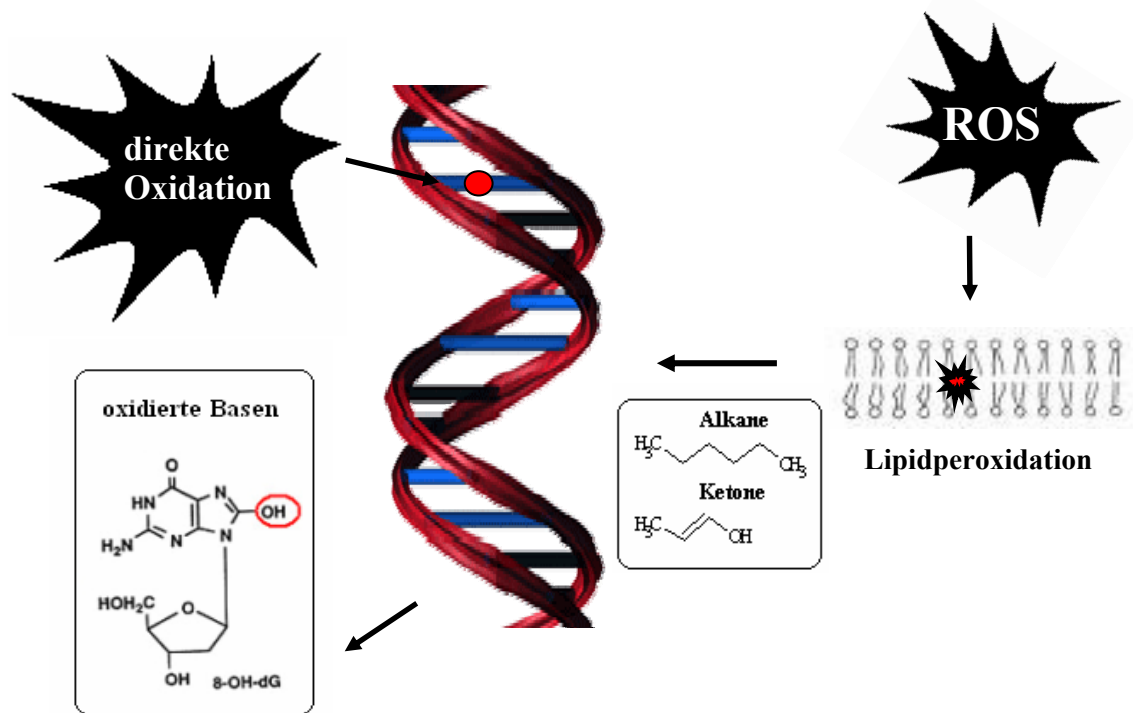


Abbildung 4 Direkte und indirekte Schädigung der Erbsubstanz durch Sauerstoffradikale

Die Mechanismen die der Auslösung dieser Krankheiten zugrunde liegen sind zumindest teilweise bekannt. Im Fall von Krebserkrankungen spielt vor allem die Auslösung von DNA Schäden eine zentrale Rolle. Diese werden entweder durch direkte Oxidation der Erbsubstanz (insbesondere von DNA Basen) verursacht; oder aber durch Reaktionsprodukte die infolge einer Kettenreaktion entstehen, die als Lipidperoxidation bezeichnet wird [9,35]. Im Rahmen mehrerer Reaktionsschritte werden Fettsäuren von Zellmembranen oxidiert. Die daraus entstehenden Reaktionsprodukte lösen eine Kaskade weiterer Reaktionen aus. Die bei der Reaktion entstehenden Substanzen (insbesondere Aldehyde und Ketone) wirken DNA schädigend und krebsauslösend [35]. Eine der Konsequenzen der DNA Schädigung ist die Auslösung persistierender Mutationen [9,22]. Sofern diese in Genen stattfinden, die mit Wachstumsregulation oder mit der Steuerung von Signalketten in Zusammenhang stehen, kann so die Bildung trans-

formierter Zellen ausgelöst werden [9]. Abbildung 5 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte der Lipidperoxidationskaskade

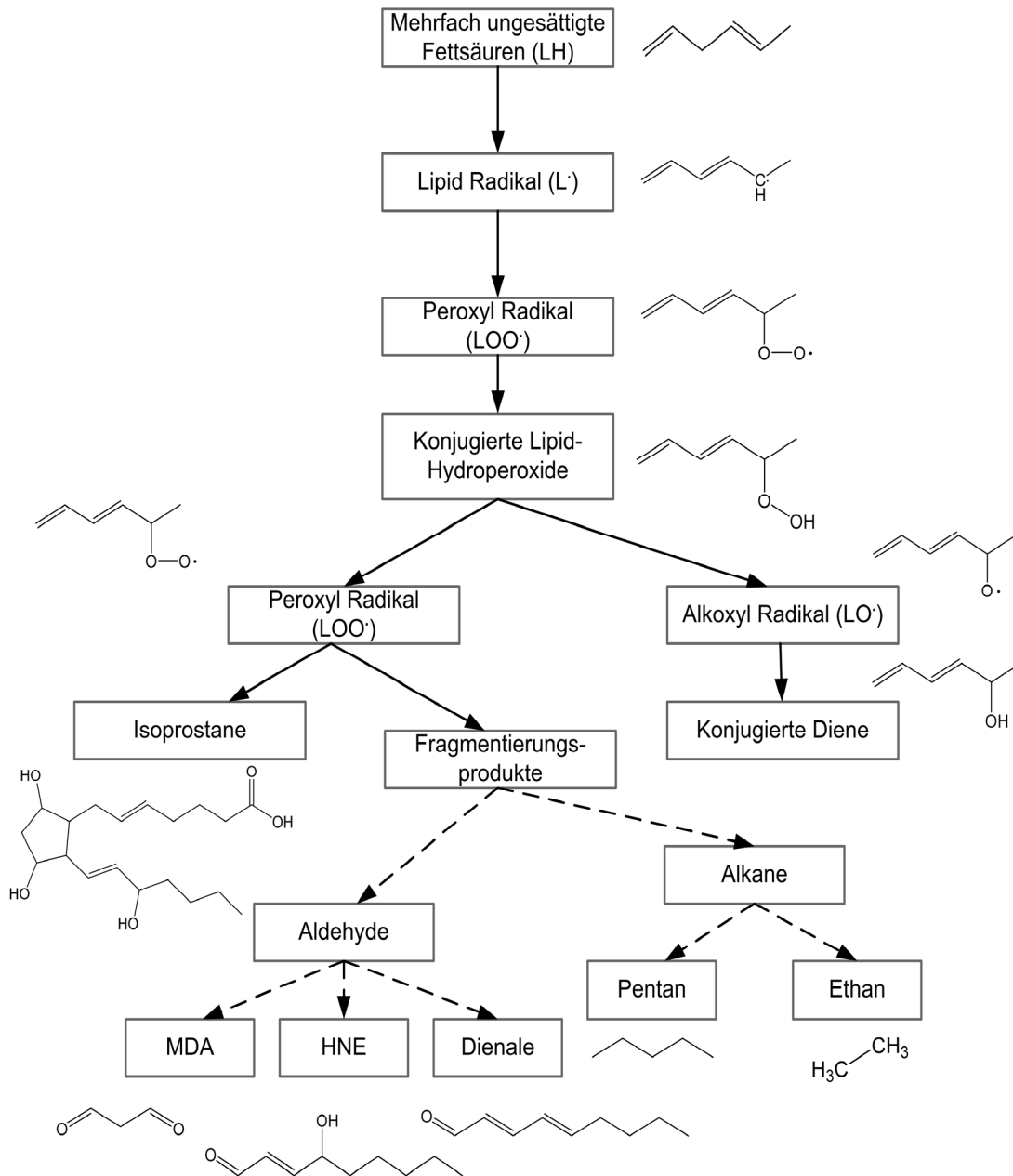


Abbildung 5 Teilreaktionen der Lipidperoxidationskaskade (nach Dotan et al. [36])

Die Mechanismen der Auslösung von Herz-Kreislauf-erkrankungen durch oxidativen Stress sind weitgehend geklärt. Durch die Oxidation von Low-Density-Lipoprotein (LDL) kommt es zu Makrophagenaktivierung, Schaumzellenbildung und zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques [37,38].

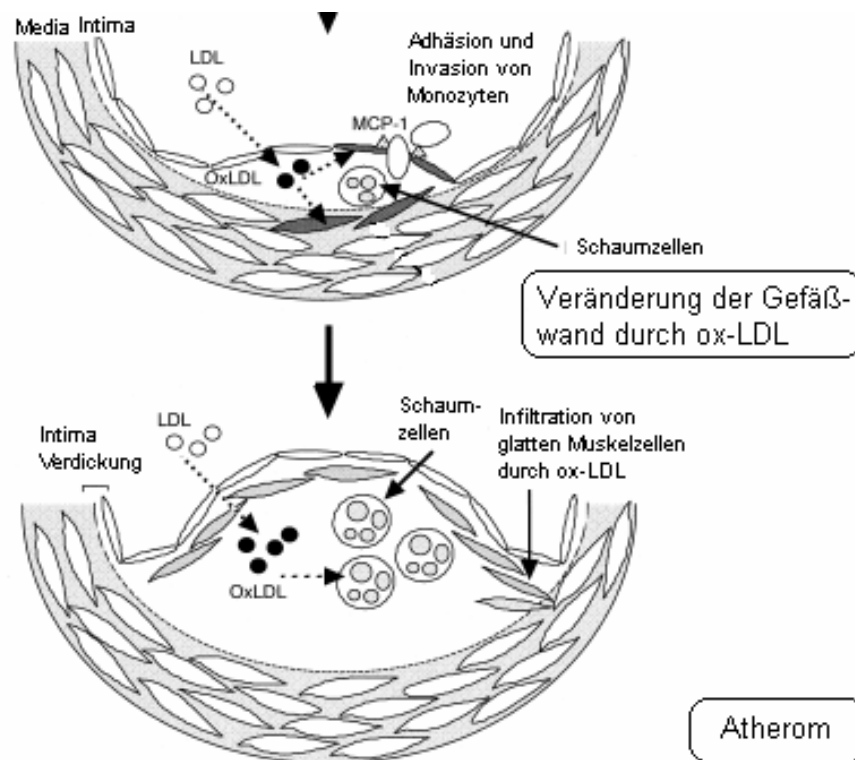


Abbildung 6 Konsequenzen der Lipidperoxidation im Hinblick auf die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (modifiziert nach Itabe et al. [37])

2.4 Die Suche nach ROS-protektiven Substanzen in Nahrungsmitteln

Um den Menschen vor den negativen Folgen der Radikalschäden zu schützen, suchte man in den letzten Jahren intensiv nach Substanzen, die Radikale inaktivieren. Die Erfolge auf diesem Gebiet führten zur Ausarbeitung von Ernährungsempfehlungen und zur Vermarktung von Nahrungsergänzungsmitteln, sowie zur Herstellung funktio-neller Lebensmittel, („Functional Foods“), die mit antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen supplementiert werden. Derzeit werden mehrere tausend pflanzliche Inhaltsstoffe als Supplemente vermarktet [39].

Die ersten antioxidativ wirksamen Verbindungen die in Nahrungsmitteln entdeckt wurden waren Vitamine (A, C, E). Es wurde beobachtet, dass diese vor Schäden ausgelöst durch radioaktive Strahlung, schützen. Es war bereits vor 50 Jahren bekannt, dass diese Schädigung insbesondere auf der Bildung von freien Radikalen beruhen, die durch intrazelluläre Zerlegung von Wassermolekülen gebildet werden [40,41].

Bereits in den 1960er und 70er Jahren wurde eine Vielzahl von Inhaltsstoffen mit antioxidativen Eigenschaften, in pflanzlichen Nahrungsmitteln identifiziert. Diverse phenolische Verbindungen sind in der Lage reaktive Sauerstoffradikale durch „Scavenging“ beziehungsweise auch durch indirekte Interaktionen (via Transkriptionsfaktoren) zu inaktivieren [13,42]. Es handelt sich bei diesen Substanzen sehr häufig um „sekundäre“ Pflanzeninhaltsstoffe, die im Primärstoffwechsel keine Rolle spielen. Pflanzen werden durch diese Inhaltsstoffe vor oxidativen Schäden die durch Krankheitserreger, Strahlung und Infektionen hervorgerufen werden, geschützt [43]. Diese Verbindungen zählen chemisch gesehen zu unterschiedlichen Gruppen, beispielsweise identifizierte man Verbindungen die aus Phenol- oder Polyphenolstrukturen bestehen, andere Gruppen bestehen aus Isoprenuntereinheiten (Terpene), Phytoöstrogenen, eine weitere wichtige Gruppe sind Farbstoffe wie Anthozyane (phenolische Grundstruktur) und Chlorophylle [44-47]. Bestimmte Carotinoide (Isoprenstruktur) haben starke antioxidative Wirkungen [48]. Die stärkste im Menschen wirksame Verbindung ist wahrscheinlich die Gallussäure [49], die sehr gut absorbiert wird. Bereits mit 0,2mg/ kg KG wurden antioxidative Effekte gefunden [50]. Die stärkste *in vitro* wirksame Verbindung ist Curcumin (Inhaltsstoff der Gelbwurzel) allerdings wird diese Verbindung nur zu einem geringen Teil über den Verdauungstrakt aufgenommen [51]. Epigallocatechingallate (EGCG) und andere Gerbstoffe sind in Grün- und Schwarzteesorten enthalten [52], ihre protektive Wirkung wurde v.a. in Tierexperimenten eindeutig nachgewiesen.

2.5 Methoden zur Bestimmung von Oxidationsparametern

In den letzten 50 Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die einerseits zur Messung von oxidativem Stress und andererseits zur Identifizierung antioxidativ wirksamer Nahrungsinhaltsstoffe eingesetzt werden können. Insgesamt kann man fünf Kategorien unterscheiden.

- Methoden die auf physikalischen Messungen beruhen,
- Chemische Methoden die mittels Redox - Reaktionen wirksame Substanzen detektieren,

- Biochemische Verfahren, mit denen die Oxidation von Makromolekülen wie Lipiden und Proteinen und ihrer Oxidationsprodukte erfasst werden,
- Methoden zum Nachweis ROS induzierter DNA Schäden und
- Verfahren zum Nachweis der Aktivierung antioxidativer Enzyme und Transkriptionsfaktoren [53]

Nachfolgend sind die ersten vier Hauptgruppen genauer beschrieben. Die relativ komplexe Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ist in den Übersichtsarbeiten von Knasmüller et al. [14] und Kong et al. [54] detailliert dargestellt.

2.5.1 Direkter Nachweis des „Scavenging“ freier Radikale

Die einzige Technik die es ermöglicht freie Radikale direkt zu erfassen und sie zu charakterisieren, ist die Elektronenspinresonanz (ESR). Dieses Verfahren detektiert allerdings ausschließlich „weniger“ reaktive Radikale, da sich die „reaktiven“ Verbindungen in zu geringer Konzentration anreichern um nachgewiesen werden zu können. Eine Lösung dieses Problems ist der Einsatz von molekularen Fallen („Traps“), beispielsweise von N-Tertbutyl-p-phenylnitron, diese Substanzen reagieren mit den „reaktiven“ Radikalen und bilden stabile Verbindungen die mit ESR erfasst werden können. Das Verfahren kann sowohl auf zellulärer Ebene als auch mit subzellulären Fraktionen durchgeführt werden [14,55,56].

2.5.2 Methoden zur Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“

Um die gesamte antioxidative Kapazität (TAC) zu messen, wurden zwei Methoden entwickelt.

Beim ersten Verfahren wird die Fähigkeit einer Substanz gemessen ein Elektron zu transferieren, um so Verbindungen wie Radikale, Carbonyle oder Metalle zu reduzieren. Die am häufigsten durchgeführten Messungen die zu dieser Kategorie zählen sind die Bestimmung des „*Ferric Iron Reducing Antioxidant Parameter*“ (FRAP), die Bestimmung des „*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*“ (TEAC), sowie der „*Diphenyl-1-Pikrylhydrazyl*“ Test (DPPH).

Zur zweiten Kategorie zählen Methoden die auf der Fähigkeit von Substanzen beruhen, Radikale durch Wasserstoffabgabe einzufangen. Hierzu zählen Methoden wie die Bestimmung der „*Oxygen Radical Absorbance Capacity*“ (ORAC) sowie die Bestimmung der „*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*“ (TRAP), die Bestimmung der „*Total Oxidant Scavenging Capacity*“ (TOSC), letztendlich zählen auch Verfahren dazu, die auf der Inhibition der Oxidation von Linolensäure und von LDL beruhen [53].

Tabelle 1 Übersicht über ausgewählte Methoden zur Bestimmung antioxidativer Marker

VERFAHREN	PRINZIP DER METHODE
Methoden die auf der Inaktivierung freier Radikale beruhen	
ORAC	Bestimmung der antioxidativen Kapazität hinsichtlich Inaktivierung von ROO [•] induzierter Oxidation. [57-59]
TRAP	Bildung von Peroxylradikalen durch 2,2'-Azobis-(2,4-amidinopropan)dihydrochlorid, die mit den Proben reagieren. Diese Reaktion führt zu einer signifikanten Veränderung der spektroskopisch ermittelten Werte von der oxidierten Probe im Vergleich zu nicht oxidierte Probe [60]
TOSC	Hemmung der radikal - abhängigen Entstehung von Ethylen aus α -Keto- γ -methiolbuttersäure durch Antioxidantien. Einsatz: Nachweis von Peroxyl-, Hydroxylradikale und Peroxynitrit [61]
CL (Chemilumineszenz Test)	Modifizierung von TRAP, nach der Radikalbildung wird CL (Oxidantien emittieren Chemilumineszenz) oder Photo-CL eingesetzt [62]
PCL	Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität hinsichtlich O ₂ [63]
LDL Oxidation	Autoxidation von Linolsäure oder LDL. Bei <i>in vitro</i> Methoden wird die Oxidation hauptsächlich durch Cu ²⁺ oder durch andere Azo-Initiatoren induziert [64-66]
Crocin bleaching assay	Antioxidantien (in Plasmaproben) schützen vor AAPH-induzierter Crocin (Carotinoid des Safrans) Bleichung [67]
Methoden zur Bestimmung des einfachen Elektronentransports	
TEAC	ABTS wird durch ROO [•] zu einem grün-blauen Radikalkation oxidiert und spektrophotometrisch bestimmt. Die Fähigkeit der Antioxidantien diese Färbung zu verzögern wird in Troloxequivalenten angegeben [68]
FRAP	Reduktion von 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazin (TPTZ) im Plasma zu einem gefärbten Abbauprodukt. Verbindungen mit einem Redox – Potential werden erfasst. [69-71]
CUPRAC (copper reducing assay)	Modifikation von FRAP, Eisen wird durch Kupfer ersetzt. Cu ²⁺ → Cu ⁺ [72]

2.5.3 Oxidation von Makromolekülen

Die wesentlichen und am häufigsten durchgeführten Methoden sind in den nachfolgenden Abschnitten kurz dargestellt.

2.5.3.1 Marker der Lipidperoxidation

Zellmembranen sind aufgrund ihrer Zusammensetzung (hoher Anteil mehrfach-ungesättigter Fettsäuren, PUFA) leicht oxidiertbar [73]. Es handelt sich bei der „Lipidperoxidation“ um eine Kettenreaktion, die zu strukturellen und funktionalen Schädigungen der Membranen und zur Bildung von instabilen Hydroperoxiden führt, diese zerfallen zu sekundären Oxidationsprodukten. Ein bedeutender Parameter der PUFA Peroxidation ist Malondialdehyd [74]. Die Bildung dieser Verbindung wird mit dem so genannten TBARS Test („*Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen*“) erfasst [53].

Die Reaktion beruht auf der Bildung eines rosa gefärbten Komplexes der aus MDA und Thiobarbitursäure (TBA) entsteht, die Konzentration des Aldehyds wird spektrophotometrisch (532nm) bestimmt. Es handelt sich dabei um eine der ältesten Methoden, die auf der Ausfällung von Protein nach Erhitzung der Proben beruht. Die unphysiologischen Bedingungen während der Aufarbeitung der Proben wurden häufig kritisiert. Es wird nicht die Menge an MDA in den Originalproben, sondern die Menge an MDA die während des Kochprozesses durch Lipidperoxidation entsteht, bestimmt [53]. Bisher wurden mehr als 16000 Studien (16% *in vitro* Messungen, 53% Tierversuche, 31% Humanstudien) publiziert in denen das Verfahren angewendet wurde [14]. Es ist bekannt, dass Antioxidantien zur Reduktion der MDA Konzentrationen im Organismus führen können [75]. Durch die Entwicklung HPLC basierter Methoden konnten die Empfindlichkeit und Aussagekraft der Methode substantiell verbessert werden [76,77].

Der erste Schritt der Oxidation mehrfach-ungesättigter Fettsäuren besteht in der Konjugation von Doppelbindungen, die zur Bildung konjugierter Diene (CD) führt [36]. Das Absorptionsmaximum von CDs liegt bei 234nm. Üblicherweise werden die Diene in Plasmaproben mit HPLC-UV detektiert [53,78]. Obwohl dieser Parameter eine geringe Aussagekraft aufweist, sind einige Experten der Meinung, dass Ergebnisse die mit zuverlässigeren Verfahren erarbeitet wurden, durch derartige Messungen unterstützt werden können [53].

Bei Isoprostanen handelt es sich um stabile Produkte die durch Oxidation von Arachidonsäure entstehen [36]. Insbesondere 8-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ gelten als zuverlässige Marker der Lipidperoxidation [79-81].

In mehreren vergleichbaren Studien wurde festgestellt, dass ELISA Methoden weniger zuverlässig sind als GC-MS (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) und LC - MS (Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) basierte Messungen [82,83].

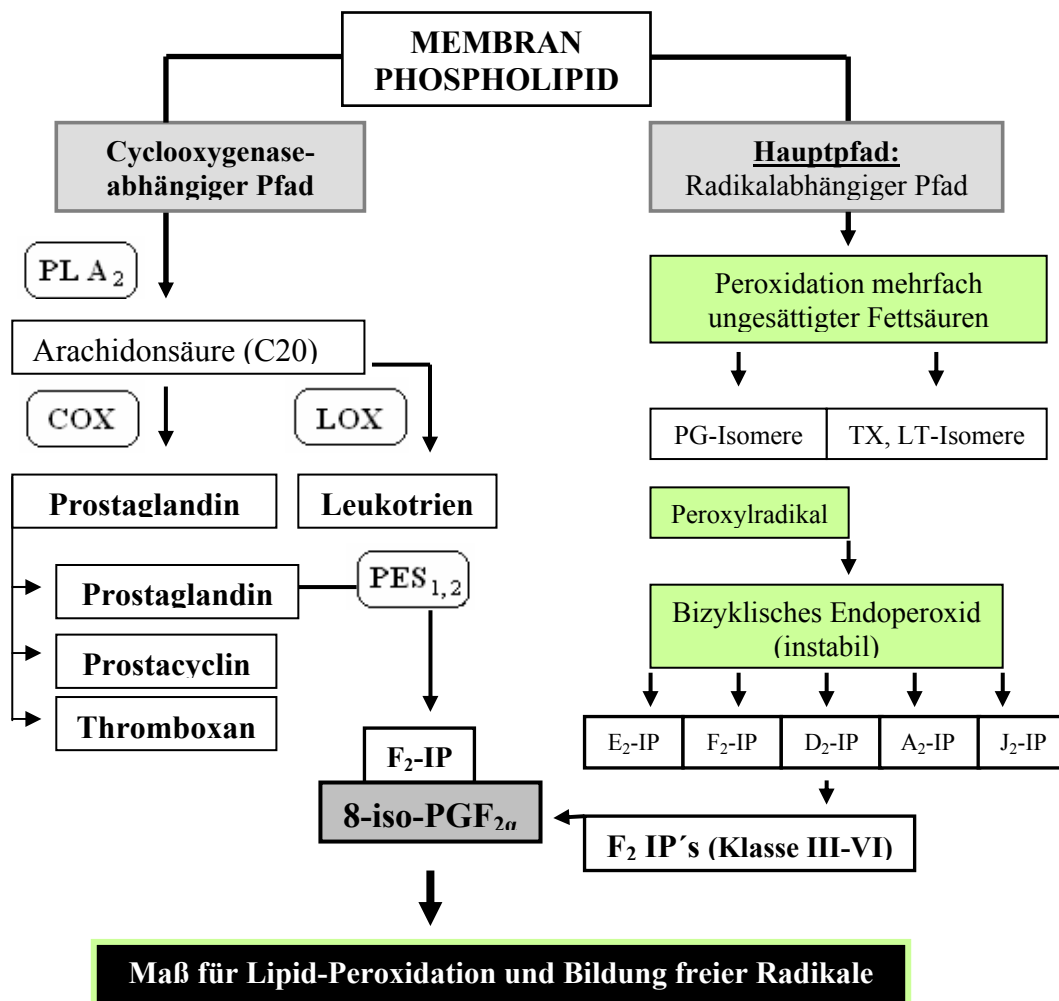


Abbildung 7 Schematische Darstellung des radikalabhängigen und enzymatischen Bildungsweges von F_2 -Isoprostanen. **COX** Cyclooxygenase, **$PES_{1,2}$** PG Endoperoxid-Synthase_{1,2}, **IP** Isoprostan, **PG** Prostaglandin, **LOX** Lipooxygenase, **$PL A_2$** Phospholipase A_2 (modifiziert nach Schröder [84])

Aldehyde sind ein weiterer wichtiger Parameter, für die Bestimmung der Oxidation von Fettsäuren. Hauptsächlich werden 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und Hexanal

aus der Oxidation von 6-fach ungesättigten Fettsäuren gebildet [85]. Die häufigsten Methoden zur Bestimmung dieser Verbindungen sind beispielsweise GC-MS, GC-Headspace und HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) [86].

2.5.3.2 Endpunkte der Proteinoxidation

Marker der Proteinoxidation werden wesentlich seltener zum Nachweis antioxidativ wirksamer Substanzen verwendet, als Lipidperoxidationsparameter. Sie werden hauptsächlich in Kombination mit Endpunkten der Lipidperoxidation eingesetzt [53]. Ein wichtiger Parameter sind proteingebundene Carbonyle [1,87,88], die colorimetrisch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazine erfasst werden können [89]. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass große Mengen an Lösungsmittel erforderlich sind.

Eine weitere Methode ist die Messung von „*Advanced Oxidation Protein Products*“ (AOPP); es handelt sich dabei vorwiegend um Albumin und Aggregate dieses Proteins, die durch oxidativen Stress geschädigt werden [90]. Diese Verbindungen gelten als wichtige Parameter von oxidativem Stress und als wichtiger Marker für die Aktivierung neutrophiler Blutkörperchen [91]. Die Messungen erfolgen im sauren Milieu unter Anwesenheit von Kaliumjodid. AOPPs werden bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und als Chloramin-T Äquivalente angegeben [53].

2.5.4 Methoden zur Bestimmung oxidativer DNA Schäden

Eine Übersicht über häufig eingesetzte Methoden findet sich in einer neueren Übersichtsarbeit von Nersesyan et al. [92]. Zum Nachweis oxidativer Schäden der Erbsubstanz, können eine Vielzahl von Indikatororganismen (beispielsweise Bakterien, Hefen, Pflanzen, Nager etc.) eingesetzt werden [93-95]. Häufig werden Bakterientests eingesetzt; von Bruce Ames [96] wurden spezielle *Salmonella thyphimurium* Stämme (TA 102, TA 104) isoliert die mit besonders hoher Empfindlichkeit auf Radikale ansprechen [53,97]. Der Endpunkt des *Salmonella*/ Mikrosomentests beruht auf der Erfassung histidin-unabhängiger Mutanten [96].

In Säugerzellen können viele verschiedene Endpunkte die zur Detektion genotoxisch wirkender Chemikalien entwickelt wurden, eingesetzt werden (Kleinkerntest, Chromosomenaberrationstests, aber auch Genmutationsverfahren) [14]. Besonders häu-

fig wird in letzter Zeit der Einzelzellgelelektrophoresetest (SCGE) eingesetzt, der auf der Erfassung der DNA-Migration im elektrischen Feld beruht. Durch Einsatz von speziellen läsionsspezifischen Enzymen (Formamidopyrimidinglykosylase, Endonuklease III) kann die Bildung oxidierten Basen erfasst werden [98,99]. Eine andere Möglichkeit oxidative Schäden zu detektieren, ist die Behandlung der Zellen mit Substanzen die Radikale freisetzen (beispielsweise Wasserstoffperoxid oder ionisierende Strahlung) [100]. Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE) werden in *in vitro* Untersuchungen, Tier- und Humanstudien angewendet [2,3,101,102]. Derzeit liegen Ergebnisse von etwa 80 Interventionsstudien vor, die mit Nahrungsmittelinhaltsstoffen durchgeführt wurden [14].

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis antioxidativer Wirkungen ist die Erfassung der oxidierten Base 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) im Harn, in Leukozyten oder in inneren Organen [103-105]. Die Quantifizierung des Oxidationsproduktes 8-Oxo-7,8-Dihydro-2-deguanosin (8-oxodG) kann mit verschiedenen chemischen Detektionsverfahren erfolgen: beispielsweise durch den Einsatz von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrikopplung [106], Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischen Detektoren (Amperometrie, Coulometrie) [107-109] oder enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest [110]. Das „European Standards Committee on Oxidative DNA Damage“ (ESCODD) stellte fest, dass zwischen den Laboratorien starke Unterschiede in den Ergebnissen vorliegen [111-113]. Eine Standardisierung der Methoden ist unbedingt erforderlich, um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen [114].

2.5.5 Induktion der Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme

In einer Reihe von Untersuchungen, die die Identifizierung antioxidativer Inhaltsstoffe von Nahrungsmitteln betrafen wurden zusätzlich Messungen der Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme durchgeführt, insbesondere von Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase.

Superoxiddismutase kommt in unterschiedlichen Isoformen vor. In Eukaryoten liegt sie im Zytosol und extrazellulär als Cu-Zn SOD und in den Mitochondrien als Mn-SOD vor. Es ist eines der wichtigsten Schutzenzyme, welches vor oxidativem Stress

schützt. Die Funktion der SOD ist die Inaktivierung (Dismutase) von Superoxid, dabei entsteht Wasserstoffperoxid. Das Enzym Katalase detoxifiziert H_2O_2 in einer weiteren Reaktion zu Wasser und Sauerstoff [9,13].

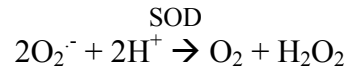


Abbildung 8 Katalytische Reaktion der CuZn-SOD

Eine Reihe von Untersuchungen weisen darauf hin, dass Nahrungsinhaltsstoffe diese Enzyme aktivieren (beispielsweise: Kaffee [115], Kohlsprossen [116] oder Gallussäure [117]. SOD spielt eine wichtige Rolle im Schutz des Organismus vor freien Radikalen. In einer Tierstudie von Akturk und Mitarbeitern wurde nach Gabe von Vitamin E und C eine Abnahme der Enzymaktivität beobachtet [118]. Andere Untersuchungen betreffen die Über-Expression von SOD; in Fruchtfliegen (*Drosophila*) konnte gezeigt werden, dass diese Tiere [119] wenn sie höhere Enzymaktivitäten besitzen, eine längere Lebenserwartung aufweisen [120].

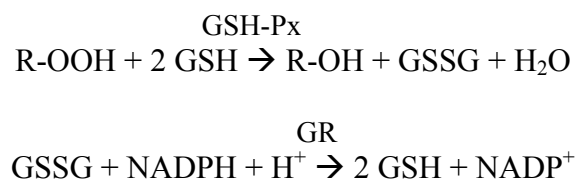


Abbildung 9 Reaktionsschema der GSH-Px Bestimmung

Einzelne Nahrungsinhaltsstoffe induzieren die Aktivität der Glutathionperoxidase, allerdings sind weniger Induktoren bekannt als bei Superoxiddismutase. Beispiele für nahrungsrelevante Faktoren sind Mandeln [121] und Gallussäure [122].

Glutathionperoxidase enthält im katalytischen Zentrum L-Selenocystein [100]. Es ist bekannt, dass Selenmangel zu einer Abnahme der Glutathionperoxidaseaktivität [10] und zu erhöhten Krebshäufigkeiten und zu verringerter Lebenserwartung führt [123].

Die Induktion antioxidativ wirksamer Enzyme wird durch Transkriptionsfaktoren geregelt, insbesondere von Nrf2. Cavin und seine Mitarbeiter fanden in Experimenten mit Ratten (Leber und primäre Hepatozyten), dass Kaffee diesen Transkriptionsfaktor induziert [124,125]. Die Autoren postulierten auf der Grundlage dieser

Ergebnisse, dass die Induktion von SOD und anderer Enzyme (beispielsweise Glutathionperoxidase, Katalase, etc.) mit der Aktivierung von Nrf2 in Zusammenhang steht. In einer Studie mit kaffeespezifischen Diterpenoiden konnte gezeigt werden, dass antioxidativ wirksame Enzyme mittels Nrf2 aktiviert werden [125].

2.6 Extrapolierbarkeit der Ergebnisse

Bei den meisten Experimenten, die durchgeführt wurden um antioxidativ wirksame Nahrungsmittelinhaltsstoffe zu erfassen, handelt es sich um *in vitro* Studien, bzw. um Untersuchungen in denen subzelluläre Zellfraktionen eingesetzt werden. Die Nachteile derartiger Ansätze sind, dass sie weder die Verstoffwechselung der Substanzen reflektieren, noch die Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt. Daher ist anzunehmen, dass zahlreiche der antioxidativ wirksamen Verbindungen, die auf diese Weise identifiziert wurden und als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet werden, im Menschen bzw. in inneren Organen keine Wirkungen besitzen. Ein typisches Beispiel ist das erwähnte Curcumin, das über den Darmtrakt kaum aufgenommen wird, dies trifft auch auf Chlorophylle und auf Anthozyane zu [126]. Um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen, ist die Durchführung von Tierexperimenten oder Humanstudien erforderlich.

2.7 Experimentelles Design von Humanstudien

In einer Reihe von Humanstudien, wurden antioxidativ wirksame Verbindungen untersucht. Das Design derartiger Studien ist sehr uneinheitlich und in einer Übersichtsarbeit von Hoelzl und Mitarbeiter [2] eingehend beschrieben. Durch entsprechende „run-in“ Phasen in denen die Nahrungsaufnahme kontrolliert erfolgt und durch „wash-out“ Perioden [101] bzw. durch ein „cross-over“ Design oder Verwendung von Placebo kann die Aussagekraft der Studien wesentlich erhöht werden [2,101].

Teilweise ist es problematisch (z.B. in Untersuchungen mit Obst und Gemüse) ein adequates Placebo einzusetzen, deshalb wird ein „cross-over“ Design angewendet. Die Teilnehmer werden in diesem Fall in zwei oder mehrere Gruppen eingeteilt (randomisiert). Die Gruppen erhalten eine Basisdiät oder das Supplement in unterschiedlicher Reihenfolge, dadurch können saisonale Unterschiede weitgehend ausgeschlossen werden. Sequenzielle und „cross-over“ Designs haben generell den Vorteil, dass die

Probanden als eigene Kontrollen eingesetzt werden und somit inter-individuelle Unterschiede reduziert werden. Wichtig bei Studien mit einem „cross-over“ Design ist die „wash-out“ Periode zwischen den Interventionsphasen [2]. Nach einer Analyse von Moller und Loft, wurden in früheren Studien mit einem inadecuaten Design, häufig Schutzeffekte gefunden. Diese Ergebnisse basieren möglicherweise auf saisonalen Unterschieden beziehungsweise auf Veränderungen des Lebensstils der einzelnen Teilnehmer während der Studie [101]. Hoelzl und Mitarbeiter bewerteten alle verfügbaren Publikationen und kamen zu dem Ergebnis, dass ein Großteil aller Interventionsstudien, nach maximal vier Wochen endeten, in diesem Zeitraum sind Veränderung des Lebensstils und saisonale Effekte unwahrscheinlich [2].

In einer Reihe von Untersuchungen wurden „run-in“ Phasen eingebaut. In denen die Teilnehmer eine kontrollierte Diät konsumierten [115,116,127,128].

Zur Verbesserung der Qualität von Interventionsstudien sind „wash-out“ Phasen sehr wichtig, obwohl die Festlegung der Dauer problematisch ist. Bub und Mitarbeiter [75] beobachteten, dass sich der „wash-out“ Effekt, nach einer polyphenolreichen Ernährung, erst nach einigen Wochen einstellt. Die Dauer der Interventionsphasen variieren sehr stark.

Werden Antioxidantien mit direkter Wirkung eingesetzt, können Effekte bereits nach einigen Stunden festgestellt werden, handelt es sich aber um Verbindungen die zuerst Enzyme induzieren treten Schutzeffekte später auf [2]. Zeitverlaufstudien wurden zur Ermittlung der optimalen Interventionsdauer durchgeführt [102,128,129].

Ein weiterer wichtiger Faktor sind die Teilnehmerzahlen. Um die ideale Anzahl für Interventionsstudien zu bestimmen, kann nach Empfehlung von Moller und Loft die „statistische Power“ berechnet werden [102].

Zusätzliche Parameter die die Qualität einer Studie beeinflussen, sind das Alter [130,131], das Geschlecht [130], das Körpergewicht [132], saisonale Schwankungen [133,134], der Lebensstil (Rauch-, Trinkverhalten und Ernährung) [135-137] und das Sportverhalten [138].

2.8 Antioxidative Eigenschaften von Kaffee und seinen Inhaltsstoffen

2.8.1 Einleitung

Kaffee (*türkisch*: kahve „anregendes Getränk“) soll seinen Ursprung in der Region Kaffa im Südwesten Äthiopiens haben. Er wird bereits im 9. Jahrhundert erwähnt und erstmals im 14. Jahrhundert durch Sklavenhändler nach Skandinavien verfrachtet. Kaffee zählt zu den wichtigsten Getränken der Menschheit, der jährliche pro Kopf Konsum in Mitteleuropa beträgt etwa 7 kg. Europaweit herrscht ein Nord-Süd Gefälle, die Finnen führen mit einem pro Kopf Konsum von etwa 11 kg die Deutschen konsumieren 6 kg die Italiener 5 kg und die Spanier 4 kg jährlich [139]. Die Gesamtproduktion des letzten Jahres (Juli 2007-Juni 2008) belief sich auf 5,7 Millionen Tonnen Kaffee [140].

Die zwei bedeutendsten Sorten sind *Coffea arabica* (Arabica) und *Coffea canephora* (Robusta), weitere Sorten sind *C. liberica* und *C. excelsa*. Den größten Prozentsatz (ca. 61%) des Weltmarktanteils nimmt die Sorte Arabica ein [141].

Man beschäftigt sich schon seit langer Zeit mit den Auswirkungen des Kaffeekonsums auf die menschliche Gesundheit. In den letzten Jahrzehnten, wurden zahlreiche biologisch-medizinische Untersuchungen durchgeführt und publiziert, die dieses Thema betreffen. Während in den älteren Arbeiten häufig negative Eigenschaften beschrieben wurden, hat sich das Bild in den letzten Jahren geändert und man tendiert dazu anzunehmen, dass der Konsum von Kaffee durchaus positive Auswirkungen auf den Gesundheitszustand hat.

Die Annahmen negativer Gesundheitseffekte basierten auf mehreren Befunden. Einerseits deuteten *in vitro* Untersuchungen darauf hin, dass Koffein DNA schädigend wirkt [142,143] und aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeiten mit DNA Basen wurde angenommen, dass Kaffee auch im Menschen die Erbsubstanz schädigt. Derartige Effekte stehen mit der Auslösung von Krebserkrankungen und mit der Beschleunigung von Alterungsprozessen in Zusammenhang. Zahlreiche Tier- und Humanstudien zeigten, dass das Alkaloid Koffein im lebenden Säugetier keine derartigen Schäden auslöst. In den 70er Jahren wurden erstmals Befunde publiziert die auf Ergebnisse von *in vitro* Studien mit Zellen basieren; diese zeigten, dass Kaffee oxidative Schäden auslöst. Allerdings treten diese Wirkungen erst bei relativ hohen Dosierungen auf, die bei Menschen nicht relevant sind. In einer früheren Studie wurde postuliert, dass Kaffeekonsum

mit dem Auftreten von Pankreaskarzinomen assoziiert wird. Diese Untersuchung wurde von Stocks und seinen Mitarbeitern in einer renommierten Fachzeitschrift [143] Anfang der 70iger Jahre publiziert. Alle Versuche, diese mangelhafte Studie zu reproduzieren, scheiterten bisher. Zusammenfassend stellte die IARC 1991 fest, dass es keine begründete Annahme gibt, die dafür spricht, dass Kaffeeconsum beim Menschen ein Krebsrisiko darstellt [144].

In den darauf folgenden Jahren häuften sich Anzeichen, dass Kaffee positive gesundheitliche Eigenschaften besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass Kaffee in niedrigen Konzentrationen unter *in vitro* Bedingungen antioxidativ wirkt [145,146], diese Befunde konnten durch Untersuchungen einzelner Inhaltsstoffe weiter untermauert werden [147-149]. Kaffeespezifische Nahrungsinhaltsstoffe (beispielsweise die Diterpenoide Cafestol und Kahweol C+K) induzieren Enzyme die kanzerogene Substanzen (insbesondere solche in der Nahrung) entgiften [150].

Letztendlich deuteten die Resultate epidemiologischer Studien darauf hin, dass Kaffee möglicherweise vor Krankheiten schützt. In diesem Zusammenhang sind inverse Assoziationen zwischen Kaffeeconsum und dem Auftreten von Leberzirrhose [151,152], sowie von Leber- und Dickdarmkrebs [153-155], aber auch der, möglicher Schutzfunktionen vor neurodegenerativen Erkrankungen [31] und Diabetes Mellitus [156-158] zu nennen. Sowohl die Auslösung von Krebserkrankungen, als auch jene von Alzheimer und Parkinson stehen kausal mit oxidativen Schäden in Zusammenhang [4], daher sind Humanstudien hinsichtlich antioxidativer Eigenschaften von Kaffee von besonderer Bedeutung.

Die nachfolgenden Kapitel geben eine Übersicht über die wichtigsten bioaktiven Inhaltsstoffe des Kaffees und den derzeitigen Stand des Wissens, im Hinblick auf seine antioxidativen Eigenschaften.

2.8.2 Bioaktive Inhaltsstoffe von Kaffee

Kaffee enthält mehrere tausend Inhaltsstoffe, die meist in eine flüchtige und in eine nicht flüchtige Komponente eingeteilt werden. Die erstere ist insbesondere für den Geruch und den Geschmack verantwortlich und enthält mehr als 1500 Einzelkomponenten (z.B.: Carbonyle, Alkohole, Säuren, Ester, Terpenoide, heterozyklische

und aromatische Verbindungen). Die nicht flüchtigen Bestandteile sind wahrscheinlich für die biologischen Eigenschaften des Kaffees von besonderer Bedeutung [144]. Abbildung 10 gibt eine grobe Übersicht über die diversen Bestandteile von Kaffee.

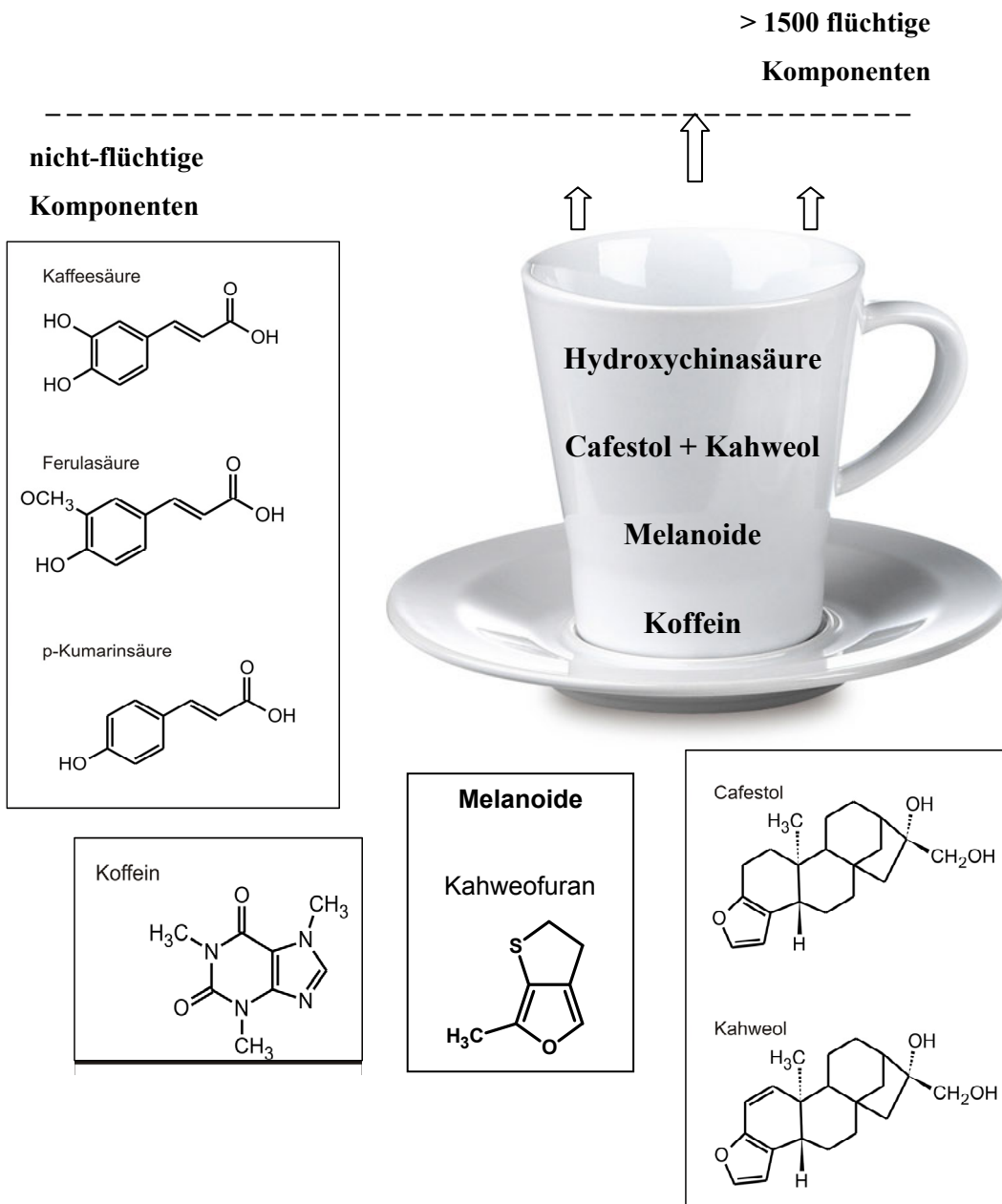


Abbildung 10 Chemische Strukturen der flüchtigen, und nicht-flüchtigen Komponenten von Kaffee

Bei der Röstung des Kaffees (Arabica) kommt es zu einer Verringerung des Chlorogensäuregehalts von 6,9% auf 0,2% (starke Röstung). Es entstehen beispielsweise Maillard Produkte, Lipide oder Glycoside [144].

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Kaffees durch das Anbaugebiet, Auswahl der Sorten, Lagerung, Röstung und durch die Zubereitungsform, substantiell verändert werden können [144,159,160]. Nachfolgend sind die wichtigsten Prozesse aufgelistet, die die Korrelation der Einzelkomponenten des Kaffees beeinflussen.

Tabelle 2 Einfluss der Sortenwahl und der Produktionsprozesse auf die Konzentrationen von Kaffeeinhaltsstoffen

Prozess	Art der Zusammensetzung
Röstung	Abnahme der Konzentrationen der Chlorogensäuren und Zunahme der Bildung von Maillard Produkten [161,162]
Dekaffeinierung	Entfernung des Koffeins von 1,2-2,2% auf 0,1% durch diverse Verfahren, keine substantiellen Veränderungen der Zusammensetzung anderer Kaffeebestandteile [140,144]
Trocknung/ Instantkaffee	Relativ geringfügige Änderung der Zusammensetzung, Möglichkeit nachfolgender Modifikation (z.B. Zusatz von Chlorogensäuren, Geschmacksstoffen) [144]
Papierfilterung	Entfernung der biologisch hochaktiven Diterpenoide Kawheol und Cafestol [163]
Sortenauswahl	
Arabica versus Robusta	Arabica weist einen geringeren Gehalt an Koffein (~ 1,3%) und Chlorogensäuren (~ 2,5%), jedoch einen höheren Gehalt an Trigonellin (~ 1,0%) im Vergleich zu Robusta auf [144]

Durch Herstellungs- und Zubereitungsformen können die Konzentrationen bioaktiver Bestandteile im Kaffee verändert werden; dies bietet die Möglichkeit der Optimierung der Gesundheitseffekte von Kaffee. Allerdings setzt dies die Kenntnis der molekularen Mechanismen und der Substanzen, die für diese Eigenschaften verantwortlich sind, voraus.

2.8.3 Antioxidative Eigenschaften von Kaffee

Über die antioxidativen Eigenschaften von Kaffee liegen zahlreiche *in vitro* Untersuchungen vor. Mit höheren Konzentrationen wurden häufig die Auslösung oxidativer Schäden beobachtet die durch Freisetzung von Wasserstoffperoxid erklärt werden [164-166]; ein Teil der DNA schädigenden Wirkungen wurden in einigen Arbeiten dem Inhaltsstoff Methylglyoxal zugeschrieben [164,167]. In Experimenten mit geringeren Kaffeekonzentrationen fand man fast immer antioxidative Eigenschaften [145,146,159,168]. Es wurde wiederholt postuliert, dass die, unter unphysiologischen Bedingungen beobachteten, negativen Effekte durch Artefakte bedingt sind (beispielsweise durch Bildung von Radikalen in Gegenwart von Metallen), die für den Menschen keine Bedeutung haben [169].

Es gibt relativ wenige Tierstudien in denen Kaffee untersucht wurde, lediglich in einer davon wurde ein Anstieg der Ausscheidung von 8-OHdG gefunden, während die Isoprostankonzentrationen nicht beeinflusst wurden [170]. In allen übrigen Untersuchungen wurden Schutzeffekte gefunden, zum Beispiel in einer jüngeren Arbeit von Ozercan und seinen Mitarbeitern [171] (Anstieg von TAC und Abnahme von MDA im Plasma durch Instantkaffee). Huber fand eine Induktion von Glutathiontransferasen [172] auch Turesky und seine Mitarbeiter berichteten über eine Induktion dieses Enzyms [173]. Es ist bekannt, dass Glutathion-S-Transferase nicht nur kanzerogene Stoffwechselprodukte von Chemikalien entgiften sondern auch reaktive Sauerstoffspezies detoxifizieren [174]. McMahon und seine Mitarbeiter [175] fanden in einer Studie mit Mäusen, dass Kaffee den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert und erklärten so die Induktion diverser ROS protektiver Enzyme, wie beispielsweise von GSTs und Superoxid-dismutase.

Giovanelli und seine Mitarbeitern [135] fanden in einer auf Fragebögen basierenden Humanstudie, eine positive Assoziation, zwischen der Bildung oxidierten Basen nach Kaffeekonsum. Es wurden in Einzelzellgelelektrophoresestests mit dem läsionsspezifischen Enzym Formamidopyrimidinglykosylase um 20% mehr Schäden detektiert. Die Aussagekraft dieser Studie ist allerdings zweifelhaft, da auch ein Anstieg oxidativer Schäden durch Tomatenkonsum gefunden wurde, während in allen anderen Untersuchungen Schutzeffekte mit Tomaten und Lycopin (Carotinoid, Inhaltsstoff Tomaten) beobachtet wurden [102,176].

Alle übrigen Humanstudien mit Kaffee deuten auf Schutzeffekte hin, etwa jene von Grubben et al. [177] in der ein Anstieg der Konzentration von Gluthation in der Dickdarmschleimhaut (um 8%) und im Plasma (um 15%) gefunden wurde. Bichler und Mitarbeiter veröffentlichten kürzlich [115] die Ergebnisse einer kleinen humanen Interventionsstudie (n = 8) in der eine Abnahme der Kometenbildung durch oxidierte Basen (sowohl Purine als auch Pyrimidine), eine Reduktion der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid und ein Anstieg der Aktivität von SOD gefunden wurde. Es wurde allerdings keine Änderung der DNA Migration unter Standardbedingungen und der GSH-Px Aktivität beobachtet. In dieser Studie wurde von den Teilnehmern Kaffee (200 ml French Press + 400 ml Filterkaffee) über 5 Tage hinweg konsumiert. Weniger vielversprechend sind die Ergebnisse von Mursu et al. [178] die nach einmaligem Kaffeekonsum von (0, 150 oder 300ml Filterkaffee), in keinem der diverseren AO Parameter (Lipidperoxidation, Enzymaktivitäten) Veränderungen festgestellt haben.

2.8.4 Antioxidative Eigenschaften von Koffeinhaltstoffen

Eine detaillierte Darstellung der antioxidativen Eigenschaften diverser Inhaltsstoffe würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, in Tabelle 3 (Seite 24) sind die Eigenschaften einiger ausgewählter Inhaltsstoffe aufgelistet.

Es ist derzeit nicht möglich Aussagen darüber zu treffen, welcher Inhaltsstoff primär für die antioxidativen Eigenschaften von Kaffee verantwortlich ist. Die in *in vitro* Modellen gefundenen Ergebnisse sind widersprüchlich, beispielsweise wurde in einigen Untersuchungen sowohl ein Anstieg antioxidativer Effekte bei längerer Röstung gefunden in anderen jedoch eine Abnahme der Effekte [168,179,180]. Relativ unklar sind auch die antioxidativen Eigenschaften der Maillard Produkte im Kaffee, da bisher vor allem Substanzen untersucht wurden, die bei Modellreaktionen gebildet werden und im Kaffee nicht enthalten sind; darüber hinaus liegen fast ausschließlich Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten vor.

In einer Pilotstudie von Ferk (Endpunkt: Bildung Enzym-veränderter pre-neoplastischer Foci in der Leber von Ratten, die durch Gamma-Bestrahlung ausgelöst wurden), kam es zu dem Ergebnis, dass sowohl metall- als auch papiergefilterter Kaffee eine ähnliche protektive Wirkung aufweisen (Abnahme der GST-P⁺ Foci bis zu 58%)

während Dekaffeinierung zu einer deutlichen Reduktion des Schutzeffektes führte (Studie am Institut für Krebsforschung, Wien, nicht veröffentlicht).

Tabelle 3 Übersicht über die Eigenschaften ausgewählter Kaffeeinhaltsstoffe

Substanzgruppe	Eigenschaften
Chlorogensäuren	<i>in vitro</i>: ausgeprägte Schutzeffekte bei niedrigen Dosierungen, bei höheren Dosierungen häufig prooxidative Effekte durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen [147,170,180,181] auch im <i>Tierversuch</i>: sind die antioxidativen Eigenschaften von Chlorogensäure eindeutig nachgewiesen (↓TBARS, ↓ 8-OHdG im Harn, ↑ SOD, ↑ CAT etc.) [182-184] Extrapolation auf die Situation beim Menschen ist jedoch sehr schwierig da bei Tierversuchen hohe Dosierungen verwendet wurden
Koffein	<i>in vitro</i>: in einzelnen Untersuchungen wurden antioxidative Effekte nachgewiesen [185-187] mit Labornagern wurden nur sehr wenige Studien durchgeführt bei denen eine ↑ GST, ↓ ROS induzierter Kleinkernbildung im Knochenmark gefunden wurde [188] Es liegen keine Daten über antioxidative Effekte beim Menschen vor
Cafestol & Kahweol	<i>in vitro</i>: wurden nur vereinzelt ROS protektive Eigenschaften gefunden, bei relevanter Dosierung traten keine Effekte auf [189,190] <i>in vivo</i>: Aktivierung von Nrf2 in Mäusen, Induktion von antioxidativen Enzymen in Experimenten mit Mäusen nachgewiesen [124,125]
Maillard Produkte	<i>in vitro</i>: protektive und prooxidative Eigenschaften mit vereinzelt Modellschubstanzen nachgewiesen [180,191-196] <i>in vivo</i>: keine eindeutigen Ergebnisse aus Tierexperimenten verfügbar
Trigonellin	<i>in vitro</i>: antiinvasive Wirkung von Trigonellin auf ROS geschädigte Hepatomazellen von Ratten AH109A [197]

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 4 Angaben über Bezeichnung, Abkürzung und Herkunft der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Firma	Verwendung
Lymphozytenisolierung			
Histopaque - 1077	Ficoll	Sigma ¹⁾	Dichte-Gradienten-zentrifugation
RPMI 1640	RPMI	Sigma ¹⁾	Zellkulturmedium
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck ²⁾	PBS
Hydrogenchlorid	HCl	Merck ²⁾	pH-Wert Einstellung
Kaliumchlorid	KCl	Sigma ¹⁾	PBS
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck ²⁾	PBS
Natriumchlorid	NaCl	Sigma ¹⁾	PBS
Natriumhydroxid	NaOH	Fluka ³⁾	PBS
Bestimmung von Malondialdehyd			
1,1,3,3-Tetraethoxypropane	(C ₂ H ₅ O) ₂ CHCH ₂ CH(OC ₂ H ₅) ₂	Sigma ¹⁾	Standardreihe
Ethanol 96 Vol% p.a.	C ₂ H ₆ O	Riedel de Haen ³⁾	Lösungsmittel
ortho – Phosphorsäure (Dichte 1,71 g/ml; 85%)	H ₃ OP ₄	Riedel de Haen ³⁾	saures Milieu
2-Thiobarbituric acid	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S	Sigma ¹⁾	Komplexbildner
Methanol lichrosolv für Flüssigkeits-chromatographie	CH ₃ OH	Merck ²⁾	Laufmittel, Neutralisationsgemisch
Ätznatron	Na ₂ CO ₃	Riedel de Haen ³⁾	Neutralisationsgemisch
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Riedel de Haen ³⁾	Laufmittel
Kaliumhydroxidplättchen	KOH	Riedel de Haen ³⁾	1M KOH -
Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität (TRAP)			
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromam-2-Carbonsäure	Trolox	Fluka ³⁾	Stocklösung der Standardreihe

Tabelle 4 Fortsetzung

Chemikalien	Abkürzung	Firma	Verwendung
2,2'-Azinobis(3-ethylbenz-thialozin-6-sulfonsäure)	ABTS	Sigma ¹⁾	Auslösung von Radikalbildung
30% Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Riedel de Haen ³⁾	startet Reaktion
Myoglobin	Mb	Sigma ¹⁾	Oxidationsmediator
Natriumchlorid	NaCl	Fluka ³⁾	PBS
Kaliumchlorid	KCl	Riedel de Haen ³⁾	PBS
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Fluka ³⁾	PBS
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Riedel de Haen ³⁾	PBS
Bestimmung - Oxidiertes LDL			
Mercodia Testkit oxidized LDL ELISA ⁷⁾			
Bestimmung der Aktivität von Superoxiddismutase			
Randox Testkit ⁴⁾			
Bestimmung der Aktivität von Glutathionperoxidase			
Glutathionreduktase	GR (NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma ¹⁾	Enzym
L-Glutathion (reduzierte Form)	GSH C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	Serva ⁵⁾	Substrat
Nicotinamadenindinukleotidphosphat ≥ 95% (HPLC)	NADPH C ₂₁ H ₃₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ · 4C ₆ H ₁₃ N	Sigma ¹⁾	Energielieferant
tetr.- Butylhydroperoxid 80%	t-BuOOH C ₄ H ₁₀ O ₂	Fluka ³⁾	Induziert Reaktion
Tris(hydroxymethyl)amino methan	Tris NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	Fluka ³⁾	Tris-Puffer
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Na ₂ EDTA C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	Sigma ¹⁾	Tris-Puffer
Bestimmung der Konzentration von 8-epi-PGF2α			
BIOXYTECH® Urinary 8-epi-Prostaglandin F2α ⁶⁾			

¹⁾ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; ²⁾ Merck, Darmstadt, Deutschland; ³⁾ Fluka und Riedel-de-Haen Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland; ⁴⁾ Randox Laboratories Ltd., Ardmore, UK; ⁵⁾ Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D; ⁶⁾ OxisResearch, Foster City, Foster City, USA; ⁷⁾ Mercodia AB, Uppsala, Schweden;

3.2 Lösungen für die Isolierung der Lymphozyten

Sämtliche Lösungen wurden wenn nicht anders angegeben bei + 4°C gelagert.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Lösung)

8,0g NaCl, 1,15g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2g KCl und 0,2g KH₂PO₄, wurden in 1,0L Aqua bidest gelöst. Nachfolgend wurde mit 1,0N NaOH ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.3 Lösungen und Standardreihe für die Bestimmung von Malondialdehyd

Phosphorsäure 0,44mol/ L

In einen Messkolben wurden 3,0ml o-Phosphorsäure pipettiert und mit Aqua bidest. auf 100,0ml aufgefüllt.

Thiobarbitursäurelösung (TBA)

0,6g TBA wurden in 100,0ml Aqua bidest. unter Wärmeeinwirkung (50-100°C, 30min) gelöst.

1,0 N Natronlauge

4,0g Ätznatron wurden in 100,0ml Aqua bidest. gelöst.

Methanol/ NaOH

20,0ml NaOH wurden mit 45,0ml Methanol chromasolv versetzt.

Laufmittel

Phosphatpuffer: 6,8g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in 800,0ml Aqua bidest. gelöst; der pH Wert wurde mit 1,0M KOH auf 6,8 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 1,0L aufgefüllt.

Der *Phosphatpuffer* und das *Methanol* wurden im Verhältnis 60:40 gemischt, mit Faltenfilter abfiltriert und 3-5min in ein Ultraschallbad gestellt.

Ethanol – Wassergemisch (Lösungsmittel für die Standardreihe)

Ethanol und Wasser wurden im Verhältnis 40:60 gemischt.

Standardreihe

Stocklösung 1:

50µl (oder 46,0mg) TEP (97%; Dichte 0,92g/ml) wurden in einen Messkolben pipettiert und mit Lösungsmittel (Ethanol:Wasser; 40:60) gemischt; nachfolgend wurde die Lösung für 3min in ein Ultraschallbad gestellt um das TEP zu lösen, anschließend wurde mit Lösungsmittel (auf 50,0ml) aufgefüllt.

Stocklösung 2:

Von Stocklösung 1 wurden 100,0µl in einen Messkolben pipettiert und mit Lösungsmittel auf 50,0ml aufgefüllt.

Tabelle 5 Pipettierschema der Standardreihe

Standard	Verdünnung	Konzentration
Standard 1	Aqua bidest.	0,00 µM
Standard 2	1,0 ml Standard 3 + 1,0 ml Aqua dest.	0,195 µM
Standard 3	1,0 ml Standard 2 + 20,0 ml Aqua dest.	0,39 µM
Standard 4	1,0 ml Standard 2 + 9,0 ml Aqua dest.	0,81 µM
Standard 5	1,0 ml Standard 2 + 5,0 ml Aqua dest.	1,35 µM
Standard 6	1,0 ml Standard 2 + 3,0 ml Aqua dest.	2,03 µM
Standard 7	1,0 ml Standard 2 + 1,0 ml Aqua dest.	4,06 µM
Standard 8	1,0 ml Standard 2	8,12 µM

3.4 Lösungen für die Bestimmung der Isoprostankonzentrationen

Die Isoprostankonzentrationen wurden mit einem kommerziell erhältlichen „ELISA Kit“ (BIOXYECH[®] Urinary 8-epi-Prostaglandin F_{2α} ELISA, OxisResearch[®], Foster City, USA) bestimmt. Die Reagenzien waren gebrauchsfertig.

Tabelle 6 Pipettierschema der Standardreihe

Standard	Verdünnung	Konzentration
Standard 0	Verdünnungspuffer (VP)	0,00ng/ml
Standard 1	500µl S2 + 500µl VP	0,05ng/ml
Standard 2	100µl S3 + 900µl VP	0,10ng/ml
Standard 3	100µl S4 + 400µl VP	1,00ng/ml
Standard 4	200µl S5 + 200µl VP	5,00ng/ml
Standard 5	100µl S6 + 400µl VP	10,00ng/ml
Standard 6	200µl S7 + 200µl VP	50,00ng/ml
Standard 7	50µl Stockstandardlösung + 450µl VP	100,00ng/ml

3.5 Lösungen und Standardreihe für die Bestimmung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“

Phosphatbuffer (PBS)

Es wurden 8,2g NaCl, 0,2g KCl, 1,2g Na₂HPO₄ und 0,2g KH₂PO₄ in 1,0L Aqua bidest. gelöst. Mit 1,0N HCl wurde ein pH Wert von 7,4 eingestellt.

Wasserstoffperoxid

Aus einer 30%igen Wasserstoffperoxid Lösung wurden 515µl entnommen und in 10,0ml PBS gelöst (Lösung A: 500mM). Zur Herstellung der Arbeitslösung (450µM) wurden der Lösung A 45µl entnommen und mit 50,0ml PBS verdünnt.

2,2'-Azinobis(3-ethylbenz-thialozin-6-sulfonsäure):

27,43g 2,2'-Azinobis(3-ethylbenz-thialozin-6-sulfonsäure) wurden in 10,0ml PBS gelöst.

Trolox (c: 2,5mM)

156,41g Trolox wurden in 250,0ml PBS gelöst.

Tabelle 7 Pipettierschema der Standardreihe

Standard	Verdünnung	Konzentration
Standard 1	400µl PBS + 100µl Trolox (2,5mM)	0,5mM
Standard 2	300µl PBS + 200µl Trolox (2,5mM)	1,0mM
Standard 3	200µl PBS + 300µl Trolox (2,5mM)	1,5mM
Standard 4	400µl PBS + 100µl Trolox (2,5mM)	2,0mM
Standard 5	Trolox (2,5mM)	2,5mM

Die Lösungen wurden unmittelbar vor der Durchführung der Experimente zubereitet.

3.6 Lösungen für die Bestimmung von oxidiertem LDL

Die LDL Messungen wurden mit einem kommerziell erhältlichen „ELISA Kit“ (oxidized LDL ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

3.7 Lösungen für die Bestimmung der Aktivität der Glutathionperoxidase

Alle Lösungen ausgenommen dem Puffer wurden vor jedem Versuchstag frisch zubereitet.

Tris(hydroxymethyl)aminomethanpuffer mit EDTA

3,029g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und 0,186g Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na_2EDTA) wurden in 1,0L Aqua bidest. gelöst. Nachfolgend wurde mit 1,0M HCl ein pH Wert von 7,6 eingestellt.

Glutathionreduktase - Lösung

Es wurden 55µl Glutathionreduktase (GR = 168U/mg Protein) mit 445µl 50,0mM Tris-HCl-Puffer versetzt.

L-Glutathion Lösung

Es wurden 461,0mg GSH (MW=307,3 g/mol) in 1,0ml Aqua bidest. gelöst.

Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Lösung

Es wurden 140,0mg NADPH (MW= 833,4g/mol) in 2,0ml 10,0mM Tris-HCl-Puffer versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1,0M HCl auf 7,0 eingestellt.

tetr.- Butylhydroperoxid Lösung

Es wurden 10µl t-BuOOH (MW=90.1g/ mol; 70% Lösung) in 2,4ml Aqua bidest. gelöst.

3.8 Lösungen für die Bestimmung der Aktivität der Superoxid-dismutase

Die Messungen erfolgten mit einem kommerziell erhältlichen Testkit (Ransod, Randox Laboratories Ltd.; Ardmore; UK). Die diversen Lösungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers zubereitet.

3.9 Durchführung der Interventionsstudie

Insgesamt nahmen 40 Probanden an der Interventionsstudie teil. Einschlusskriterien für die Teilnahme waren der Altersbereich (20-55 Jahre), normales Körpergewicht (BMI zwischen 20-25), Rauchverhalten (Nichtraucher), der Gesundheitszustand (keine Krankheiten und keine Einnahme von Medikamenten).

Um interindividuelle Schwankungen zu reduzieren, wurden die Probanden ersucht, sich vor und während der Studie an ein standardisiertes Ernährungsprotokoll zu halten (Details siehe Tabelle 9). Die Teilnehmer wurden aufgefordert, während der Studie: keine Vitamintabletten, Nahrungsergänzungsmittel, Aspirin einzunehmen und keinen exzessiven Sport zu betreiben, der zu erhöhtem oxidativen Status führen kann [198,199].

Tabelle 8 Demographische Daten der Teilnehmer

Parameter	Charakteristika ²
Geschlecht	15 ♂ ³ 25 ♀ ⁴
Alter	27,35 ± 7,97
Größe	1,73 ± 0,10
Gewicht	66,98 ± 12,97
BMI	22,35 ± 2,96
Blutdruck ¹	120,85±14,27 : 73,23±9,18 125,15 ± 15,92 : 77,70 ± 8,37 123,25 ±14,61 : 77,68 ± 8,06
Puls ¹	73,23 ± 9,18 75,25 ± 13,88 72,50 ± 13,07
Harnvolumen ¹	1634,00 ± 710,50 1820,00 ± 729,00 2104,00 ± 1880,00

¹ Die Werte beziehen sich auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Blutabnahmen, 1. Wert T0, 2. Wert T1, 3. Wert T2 ² die angegebenen Zahlen von Einzelmessungen und alle Standardabweichungen (Teilnehmer n = 40), ³ männliche Teilnehmer, ⁴ weibliche Teilnehmer

Für die Kaffeeintervention wurde die Filterkaffeemischung „Tchibo Beste Bohne“ (Eduscho Kaffee GmbH, Wien, Österreich) verwendet. Für jeden Teilnehmer wurden täglich 40g der Filterkaffeemischung portioniert und bereitgestellt. Der Kaffee wurde mit 800ml Wasser und handelsüblichen Melitta Kaffeefiltern zubereitet.

Die Abbildung 11 gibt einen Überblick über die Zeitpunkte der Probennahmen. Drei Wochen vor Beginn der Studie reduzierten die Probanden ihren Kaffeekonsum auf eine Tasse (200ml) pro Tag. Nach drei Wochen begann eine „run-in“ Phase (9 Tage), während der kein Kaffeekonsum erfolgte, zusätzlich wurde mit der Ernährungsrestriktion begonnen. Nach neun Tagen erfolgte die erste Blut- und Harnnahme (T0). Anschließend begann die erste Interventionsphase unter Beibehaltung der Restriktion (jeweils 20 Probanden konsumierten Kaffee und 20 konsumierten Wasser). Die zweite Blut- und Harnsammlung (T1) erfolgte nach Abschluss der ersten Interventionsphase. Danach folgte eine „wash-out“ Phase von fünf Wochen mit Einschränkung des Kaffeekonsums auf 200 ml pro Tag. Dann begann die zweite Phase der Intervention mit Ernährungsrestriktion (Probanden die während der ersten Interventionsphase Kaffee kon-

sumiert hatten, tranken in der zweiten eine idente Menge Wasser und *vice versa*). Die dritte Blutabnahme (T2) erfolgte nach Abschluss der Intervention.

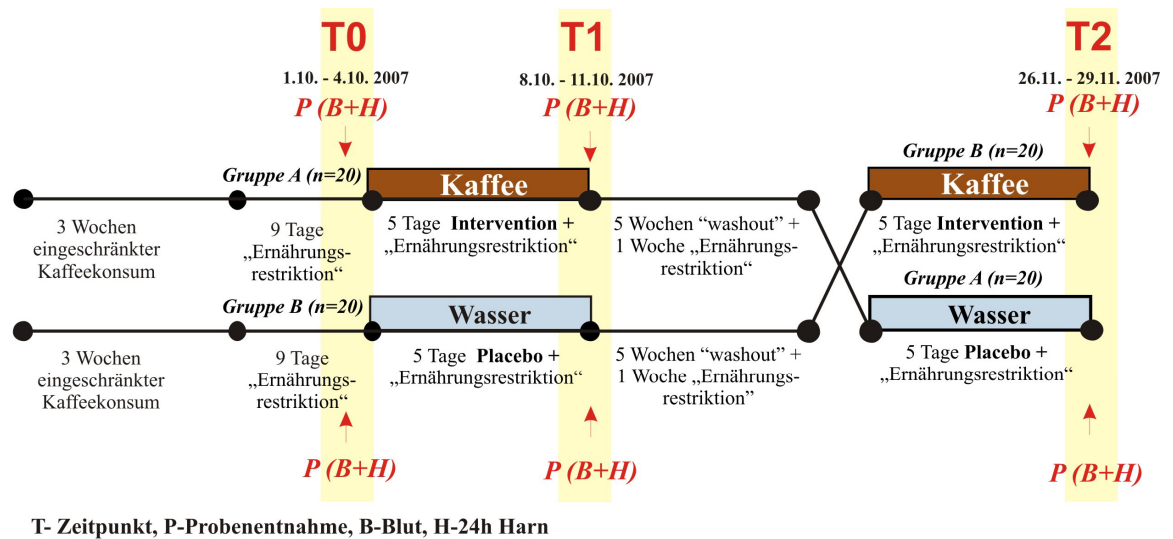


Abbildung 11 Schematischer Überblick über den Verlauf der Interventionsstudie und die Zeitpunkte der Probennahmen

Für die Bestimmung der diversen Endpunkte wurden Plasma, Lymphozyten und Harn aliquotiert (siehe Abbildung 12). Das Gesamtvolumen des 24h-Harns wurde notiert und aliquotiert. Nach Zentrifugation der Heparinröhrchen (Lithium-Heparintubes; Becton Dickinson; Plymouth; UK) wurde Plasma im Überstand abpipettiert. Die Lymphozytenisolierung erfolgt durch Dichte-Gradientenzentrifugation mit Histopaque, die isolierten Lymphozyten wurden in PBS resuspendiert und in Eppendorfröhrchen (1,5ml Reaktionsgefäße; AL Labortechnik; Amstetten; Österreich) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Probenaufarbeitung

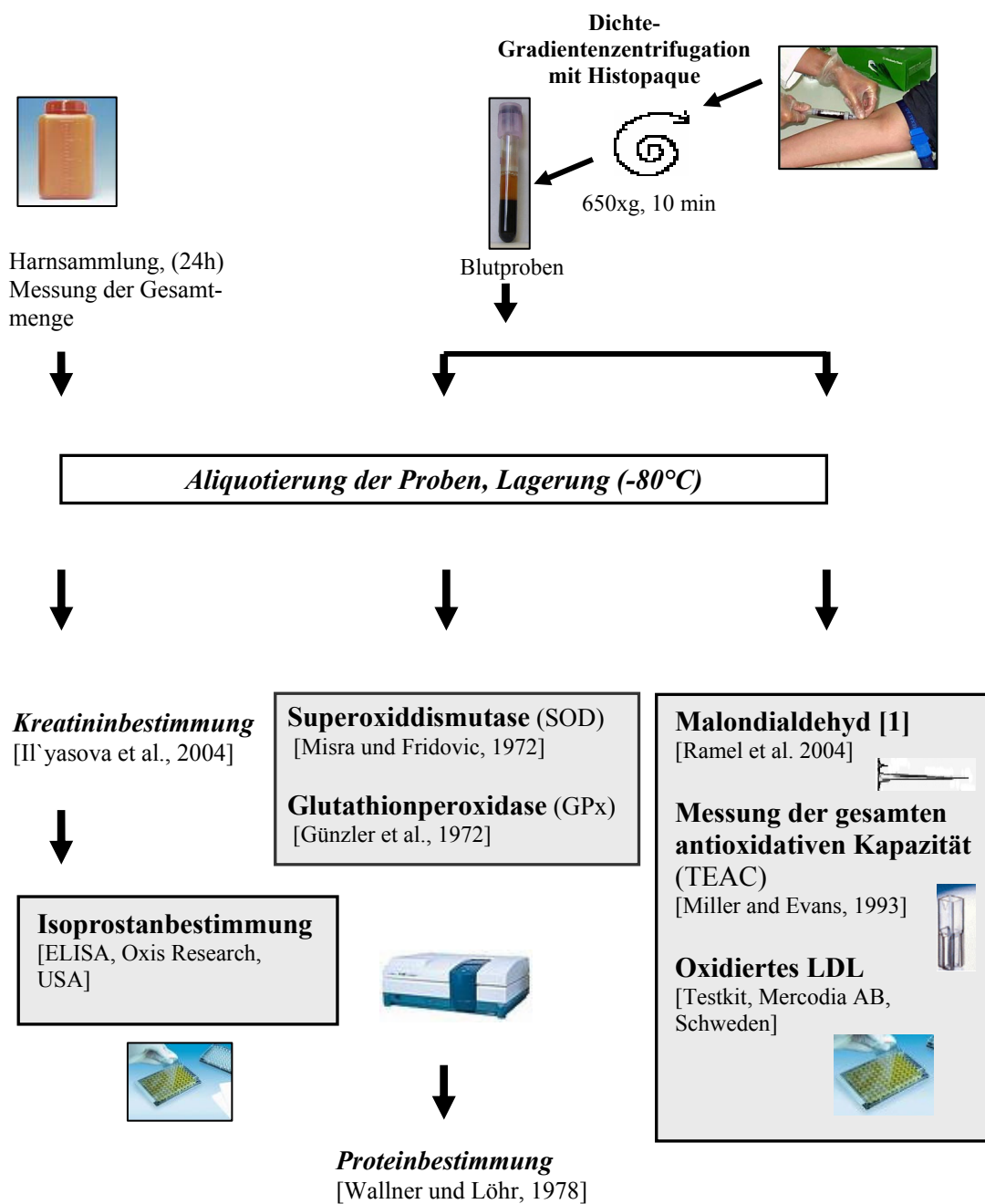


Abbildung 12 Schematischer Ablauf der Probenaufarbeitung

Tabelle 9 Ernährungsrestriktion während der Kaffeeinterventionsstudie

Gruppen	Einschränkung (Restriktion)	Alternativen
Getränke	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> 1 Tasse/ Tag Kaffee, Schwarztee, Rotbuschtee <u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> 200ml Fruchtsaft/Tag z.B.: Zitronen-, Grapefruit-, Johannisbeer-, Apfelsäfte Coca-Cola, Energiedrinks <u>Alkohol</u> 250 ml Wein /Woche (erlaubt) 250 ml Bier/Woche (kein Alkohol am Abend vor der Blutabnahme)	Kräuterlimonade, Mineralwasser, Milch, Tee (Kräutertee, Tees ohne Vitaminzusätze)
Getreideprodukte	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> Vollkornbrot (1 Scheibe/Tag), Müsli (höchstens 100g/Tag)	Schwarzbrot, Weißbrot, Nudeln, Nockerl, Eier
Gemüse	<u>Erlaubt mit Einschränkung:</u> bis zu 100g/ Tag Kohlrabi, Rotkraut, Kohl, Karfiol, Rettich, Kohlsprossen, Paprika, Karotten, Tomaten, Mais	Zucchini, Kartoffeln, Bohnen, Linsen, Erbsen, Salat, Gurken, Pilze
Obst	<u>Bis zu 100g/ Tag</u> Zitronen, Nektarinen, Clementinen, Grapefruit Kiwi, Mango, Papaya, Sanddornbeere, Erdbeeren, Hagebutten Weintrauben Marillen, Orangen	Äpfel, Birnen, Bananen, Wassermelonen, Pfirsiche
Sonstiges	keine Vitamintabletten, Aspirin keine Lebensmittel mit Vitaminzusätzen (z.B Frühstücksflocken, Müsli,..)	

3.10 Isolation der Lymphozyten

Pro Teilnehmer und Zeitpunkt wurden 60ml Blut in 6 Heparinröhrchen (Lithium-Heparintubes; Becton Dickinson; Plymouth; UK) entnommen. Die Blutproben wurden zentrifugiert (Sigma Tischkühlzentrifuge 4 K 15, Osterode; Deutschland; 650 x

g, 10 min, 18°C), das Plasma abpipettiert, in 1,5ml Eppendorfröhrchen aliquotiert und bei -80°C für die Messungen der biochemischen Parametern gelagert.

Die festen Blutbestandteile wurden für die Lymphozytenisolierung verwendet. Der Inhalt der Heparinröhrchen wurde auf je zwei Falconröhrchen (50ml; Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) die mit 12,0ml RPMI (Zellkulturmedium) gefüllt waren aufgeteilt. Nachfolgend wurden die Röhrchen geschwenkt, der Inhalt der beiden Falconröhrchen wurde auf je zwei Accuspins (AccuspinTM, Sigma Diagnostics, St. Louis, U-SA), gefüllt mit 15ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich; Steinheim; Deutschland) aufgeteilt und zentrifugiert (800 x g, 15 min, 18°C, Bremsung 0). Durch die Zentrifugation kommt es zu einer sequenziellen Phasentrennung: RPMI, Plasma, mononukleäre Blutzellen (z.B. Lymphozyten -weißer Ring-), Histopaque, Erythrozyten (siehe Abbildung 13).

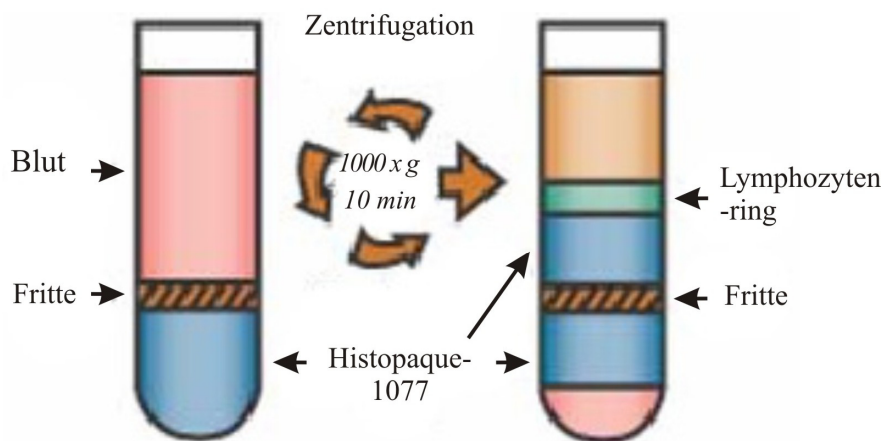


Abbildung 13 Phasentrennung bei der Lymphozytenisolierung (modifiziert nach www.sigma-aldrich.com AccuspinTM Systems)

Der Lymphozytenring wurde mit einer Pipette abgesaugt und in Falconröhrchen (15,0ml; Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) die 3,0ml RPMI enthielten überführt und zentrifugiert (300 x g, 10min, 18°C). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und erneut in 1,0ml RPMI resuspendiert. Die Lymphozytenfraktion eines Probanden wurde nachfolgend in einem Falconröhrchen das mit RPMI gefüllt wurde (Gesamtvolumen: 8,0ml) gesammelt und zentrifugiert (300 x g, 10min, 18°C). Abschließend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 6,0ml PBS gelöst.

Für die Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer (0,1mm Tiefe, 9 Großquadrate zu je 1mm^2 , geeicht), wurden die Zellsuspensionen im Verhältnis 1:1 mit der Färbelösung (Trypanblau) gemischt. Nachfolgend wurden $10\mu\text{l}$ in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und in einem Lichtmikroskop (Nikon TMS; 0,3 A; Japan) das Verhältnis zwischen lebenden (gelb, ungefärbt) und toten Zellen (blau, gefärbt) erfasst [200].

Die Lymphozyten wurden nach ermittelter Zellzahl in definierte Aliquote aufgetrennt.

3.11 Messung der Konzentration von Malondialdehyd

Malondialdehyd wurde entsprechend dem Protokoll von Ramel et al. [78] fluorimetrisch bei 532 nm gemessen. Malondialdehyd ist ein Produkt der Lipidperoxidation, welches mit Thiobarbitursäure einen Komplex bildet, der fluorimetrisch nachweisbar ist. Diese Substanzen werden als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet.

Zu den Reaktionsansätzen wurden in Pyrexgläser $700\mu\text{l}$ Phosphorsäure, $500\mu\text{l}$ Aqua bidest, $50\mu\text{l}$ Probe/ Standard, $250\mu\text{l}$ TBA zugesetzt. Die Zugabe von TBA ist Voraussetzung für die Bildung des Farbkomplexes. Zur Messung der MDA Konzentration wurde eine RP-18 (reversed phase) Trennsäule (Merck LichroCART 125-4 Lichrospher 100 RP-18 ($5\mu\text{m}$); VMR -Merck; Darmstadt; Deutschland) verwendet.

Der Reaktionsansatz (Proben, Standardreihe) wurde nach Zugabe von TBA eine Stunde im Wasserbad gekocht. Nachfolgend wurden die Proben 10min auf Eis gekühlt, und mit Methanol/ NaOH Gemisch neutralisiert; die pH Wert Kontrolle erfolgte mit Indikatorpapier (grün, pH 7,0). In einer Plastikeprouvette wurden $100\mu\text{l}$ Methanol/ NaOH mit $100\mu\text{l}$ des Proben/ Standardgemisches versetzt und geschüttelt. Die Proben- gemische wurden 2min bei 3000U/ min zentrifugiert. Anschließend wurden $20\mu\text{l}$ der Proben mittels Hamilton Spritze in ein HPLC-Fluoreszenz Spektrometer (Model L-7100 Pump, Fluoreszenz Spektrophotometer F-1050 Detektor, Integrator D-7500; Merck Hitachi; VMR Merck; Darmstadt; Deutschland) injiziert und die Peaks gemessen.

An jedem Versuchstag wurden 7 Standards als Qualitätskontrolle gemessen. MDA wurde für die Standardreihe aus Tetraethoxypropan gebildet, der MDA-TBA Komplex wurde fluorimetrisch bestimmt.

Die vom Integrator (D-7500; Merck Hitachi; VMR – Merck; Darmstadt; Deutschland) aufgezeichneten Peakflächen wurden mit Hilfe von Standardgeraden statistisch ausgewertet. Die Konzentrationen des MDA im Plasma werden in $\mu\text{M MDA/L}$ angegeben.

3.12 Messung der Konzentration von Isoprostanen

Die Konzentrationen von 8-epi-PGF_{2 α} wurden mit einem Enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (Bioxytech® Urinary 8-Epi-Prostaglandin_{2 α} , Oxis Research, Foster City, USA) bestimmt. 8-epi-PGF_{2 α} ist ein Metabolit von Prostaglandin und dient als Marker für oxidativen Stress [80,201].

Diese Verbindung wurde im 24h-Harn der Probanden (jeweils gesammelt am letzten Tag vor den Blutabnahmen) bestimmt.

Um die optimalen Verdünnungen der Urinproben herstellen zu können wurden zuerst die Kreatininkonzentrationen nach den Methoden von Il'yasova und Kroll et al. [202,203] bestimmt. Die ersten 10 Proben wurden mit vier verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) analysiert und die Konzentrationen des 8-epi-PGF_{2 α} berechnet. Diese Werte sollten in dem Rangebereich zwischen 40-60% der Absorption liegen (Empfehlung des Herstellers), welche den linearsten Teil der Standardkurve darstellt.

Zur Probenvorbereitung wurden die Urinproben bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Minuten zentrifugiert und mit Puffer verdünnt. Der Versuch wurde wie im folgenden Abschnitt beschrieben durchgeführt:

1.Schritt: 100 μl Standard bzw. Probe oder Verdünnungspuffer.

2.Schritt: 100 μl verdünntes HRP-Konjugat wurde in jede Vertiefung ausgenommen die des Blank hier wurden 100 μl des Verdünnungspuffers pipettiert.

3.Schritt: Inkubation der Platte (2 Stunden).

4.Schritt: Der Inhalt der Vertiefungen wurde entleert und 3x mit 300 μl Waschpuffer gewaschen.

5.Schritt: Nach Zugabe von 200µl TMB-Substrat erfolgte Inkubation für 20-40 Minuten. Während der Inkubation entstand eine Blaufärbung.

6.Schritt: Um die Reaktion zu stoppen wurde 50µl Stop-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Proben wurden im Doppelansatz bestimmt.

Die Absorption wurden mit einem Microplate Reader 5060-006 (LKB; Rom; Italien) bei 450nm gemessen.

Die Resultate wurden auf die Kreatininkonzentrationen der Proben bezogen und in *ng Isoprostan/ mg Kreatinin* angegeben.

3.13 Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“

Die *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity* (TEAC) wurde gemäß dem Protokoll von Miller und Rice Evans [68] ermittelt. Die Trolox-Äquivalente (mM Trolox Äquivalent) werden zur Ermittlung der gesamten antioxidativen Kapazität in Proben (Humanplasma) eingesetzt. Das Messprinzip beruht darauf, dass *in vitro* ein oxidatives Milieu erzeugt wird und durch ein zugesetztes Antioxidans die Oxidationsreaktion verlangsamt wird. Das Radikal 2,2'-Azinobis-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfon-säure) wird durch Peroxylradikal oxidiert; es entsteht ein grüner Radikalkomplex. Abbildung 14 zeigt das Reaktionsschema. Die Fähigkeit von Antioxidantien diese Formation zu verlangsamen wird in Troloxäquivalenten angegeben.

Vor Beginn der Messungen wurden 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthialozin-6-sulfonsäure) und Phosphatpuffer im Wasserbad auf 30°C erhitzt. Die Zusammensetzung der Probenansätze ist nachfolgend angegeben:

Blank: 410µl PBS, 400µl ABTS, 20µl Myoglobin und 170µl H₂O₂

Standards: 410µl PBS, 400µl ABTS, 10µl Standard, 20µl Myoglobin und 170µl H₂O₂

Proben: 400µl PBS, 400µl ABTS, 20µl Probe (Plasma der Probanden vor und nach der Intervention), 20µl Myoglobin und 170µl H₂O₂

Nach Zugabe von H₂O₂ wurde der Ansatz 3 Minuten in einem Wasserbad (30°C) temperiert, anschließend in eine Halbmikroküvette (Disposable Cuevettes, semi micro, 2,5ml, PS, visible range; Sterilin; Barloworld Scientific Ltd. Stone; Staffordshire; U.K.) überführt und die Bestimmung der Absorption mit einem Spektrometer (UV/VIS Spectrometer Lambda2; Perkin Elmer; λ 734nm) nach 6 Minuten durchgeführt.

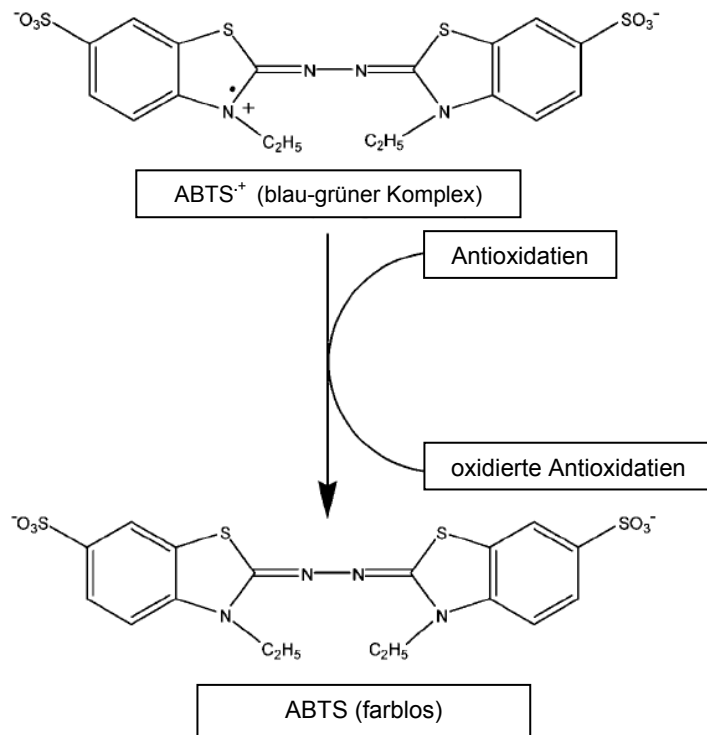


Abbildung 14 Schematischer Überblick der TROLOX Reaktion (modifiziert nach Fischer et al. [204])

Eine Eichgerade wurde nach den Messungen von Blank und Verdünnungsreihe im Vergleich zum Standard gesetzt (in %). Der höchste Standard entspricht 100% ($c=2,5\text{mM}$ Trolox). Anschließend wurden die Plasmaproben der Probanden gemessen und die Konzentrationen der Trolox Äquivalente *in mM TEAC* mit der Eichgeraden ermittelt.

3.14 Bestimmung der Konzentration von oxidiertem Low Density Lipoprotein

Die Konzentrationen von oxidiertem LDL wurden mit einem enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (oxidized-LDL ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Schweden) bestimmt [205]. Die Messung erfolgte mit einem Fluorstar Optima Mikroplate reader (BMG labtechnologies, Deutschland). Zur Bestimmung der Konzentration

rationen des oxidierten LDL wurden Plasmaproben der Studienteilnehmer die bei -80°C gelagert worden waren, verwendet.

In die Vertiefungen der ELISA-Platten wurden jeweils 25 μl Standardlösungen, Kontrollen oder verdünntes Plasma (1:6561) und 100 μl Probenpuffer pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden (Schüttler, $18-25^{\circ}\text{C}$) wurde die Platte sechs Mal mit jeweils 350 μl Puffer gewaschen. Nachfolgend wurden 100 μl der Enzymkonjugatlösung pro Vertiefung zugesetzt und die Ansätze für eine weitere Stunde (Schüttler, $18-25^{\circ}\text{C}$) inkubiert. Nach sechs weiteren Waschschritten, erfolgte pro Messansatz die Zugabe von 200 μl Substrat Tetramethylbenzidin (TMB). Nach 15-minütiger Inkubation wurden 50 μl „Stop-Lösung“ in jede Vertiefung der Platte pipettiert, und nach gründlichem Durchmischen (15 Sekunden), die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 450 nm nach 30 Minuten gemessen.

Die Konzentrationen von oxidiertem LDL wurden in *oxdiertes LDL U/L* angegeben und mit Hilfe der Kalibratorkurve berechnet.

3.15 Messung der Aktivität antioxidativ wirksamer Enzyme in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten

Die Aktivitätsbestimmungen der Enzyme wurden entsprechend den Protokollen von Günzler et al. [206] und Misra und Fridovic [207] durchgeführt und photometrisch (UV/Visible Spectrometer, Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, England) bestimmt.

Von jedem Teilnehmer wurden zwei Lymphozytenfraktionen – 80°C in Eppendorfröhrchen (2ml Reaktionsgefäße, AL Labortechnik; Amstetten; Österreich) tiefgefroren. Die Messungen erfolgten in der zytosolischen Fraktion der peripheren Lymphozyten. Zur Herstellung der Zytosole wurden die Zellen drei Mal aufgetaut, geschüttelt und tiefgefroren. Alle Proben wurden in Doppelansätzen gemessen.

3.15.1 Messung der Aktivität von Glutathionperoxidase

Die Bestimmungen der Aktivität der Glutathionperoxidase erfolgte entsprechend dem Protokoll von Günzler et al. [206]. Die Messung beruht auf der spektro-

photometrischen Bestimmung der Abnahme der NADPH Konzentrationen. Glutathionperoxidase katalysiert die Oxidation von L-Glutathion (GSH) unter Anwesenheit eines Peroxides (tetr.-Butylhydroperoxid) zu oxidiertem Glutathion (GSSG). Bei Anwesenheit von NADPH wird GSSG mittels Glutathionreduktase reduziert und oxidiertes NADPH⁺ gebildet.

Die abnehmende Exktinktion von NADPH pro Minute wurde spektrophotometrisch gemessen (λ 340 nm) und ist proportional zur Aktivität der Glutathionperoxidase.

Tabelle 10 Pipettierschema für Proben und Blank¹

Reagenzien	Reagenzien-Blank	Proben-Blank	Blank vom Reagenzien Blank	Proben-volumen
Tris-HCl-Buffer 50 mM	920	890	940	870
GR	20	20	20	20
GSH	20	20	20	20
NADPH	20	20	20	20
t-BuOOH	0	0	0	20
Sample	0	50	0	50

¹ Die Mengenangaben in μ l

Nach Zugabe von t-BuOOH wurde nach kurzem Schütteln mit einem Durchfluss-Spektrometer (λ 340nm, T 25°C) der Ansatz bestimmt. Die Messungen wurden 30 Sekunden nach Ansatz des Reaktionsgemisches gestartet und liefen über einen Zeitraum von weiteren 180 Sekunden (d.h. Gesamtzeit 210 Sekunden).

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen wurden auf die ermittelten Proteinkonzentrationen (nach der Bradford Methode) [208] bezogen. Die GSH-Px Aktivität, wurde als Verbrauch von NADPH in nmol pro Minute berechnet und in *GSH-Px U/ mg Protein* angegeben.

3.15.2 Messung der Aktivität von Superoxiddismutase

Die Aktivität der Superoxiddismutase wurde nach dem Protokoll von Misra und Fridovic [207] bestimmt.

Das Prinzip der Messungen beruht auf der Freisetzung von Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$) aus Xanthin und Xanthinoxidase. Die Radikale reagieren mit 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid und bilden einen roten Formazan-Farbstoffkomplex. CuZn-SOD bewirkt eine Inhibition der Bildung dieses roten Formazan-Farbstoffes. Das Ausmaß der Inhibition wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 505nm und einer Temperatur von 37°C gemessen.

Für die Bestimmung der Aktivität der CuZn-SOD wurde ein Enzymkit der Firma RANSOD (Randox Laboratories Ltd.; Ardmore; UK) verwendet. Die Standardkurve wurde mit einer SOD-Stammlösung entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 11 Reaktionsansatz für die SOD-Bestimmung¹

Reagenzien	Sample	Blank	Standards
Gemischtes Substrat	850	850	850
Proben	25	0	0
Standard	0	0	25
Probenpuffer	0	25	0
Xanthinoxidase	125	125	125

¹ Alle Mengenangaben in μ l

Nach Zugabe der Xanthinoxidase wurde der Probenansatz geschüttelt und die photometrischen Bestimmungen mit einem Durchfluss-Spektrometer (UV/Visible Spectrometer, Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge, England) durchgeführt. Nach einer Inkubation von 30 Sekunden wurden die Messungen gestartet und liefen über einen Zeitraum von 180 Sekunden.

Die Enzymaktivität in den zytosolischen Fraktionen der Lymphozyten wurde als %Inhibition der Bildung des roten Farbstoffkomplexes berechnet $[100 - (\Delta A_{\text{Probe}} \cdot$ *

$100/\Delta A_{\text{Blank}}]$. Anschließend wurden die Konzentrationen des Enzyms mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Die Ergebnisse wurden in *SOD U/ mg Protein* angegeben.

Der Korrelationskoeffizient aller Endpunkte lag zwischen 0,99 und 0,999.

3.16 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Daten der Studie wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Abhängig von der Normalverteilung der Daten, wurde entweder der gepaarte t-Test (für normalverteilte Daten), oder der Wilcoxon Test (für nicht normalverteilte Daten) verwendet. Die Teilnehmer wurden in eine Placebo-, und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Unterschiede innerhalb der Gruppen (z.B. Placebo/ Intervention und geschlechtsspezifische Unterschiede) wurden mittels unabhängigem t-Test evaluiert.

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS 15.0 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Das Signifikanzniveau war 95% und wurde mit $p < 0,05$ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Malondialdehydbestimmungen

Die Resultate der MDA Messungen sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Vor Beginn der Intervention lagen die Werte bei 3,0 μM MDA/ L; nach der Interventionsphase wurden keine signifikanten Veränderungen detektiert. Auch nach der „wash-out“ Phase veränderten sich die Wert im Vergleich zum Ausgangswert nicht. Bei den Frauen waren die Werte generell höher als bei den Männern (z.B. 19% vor der Intervention und 18% nach der Intervention); diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant.

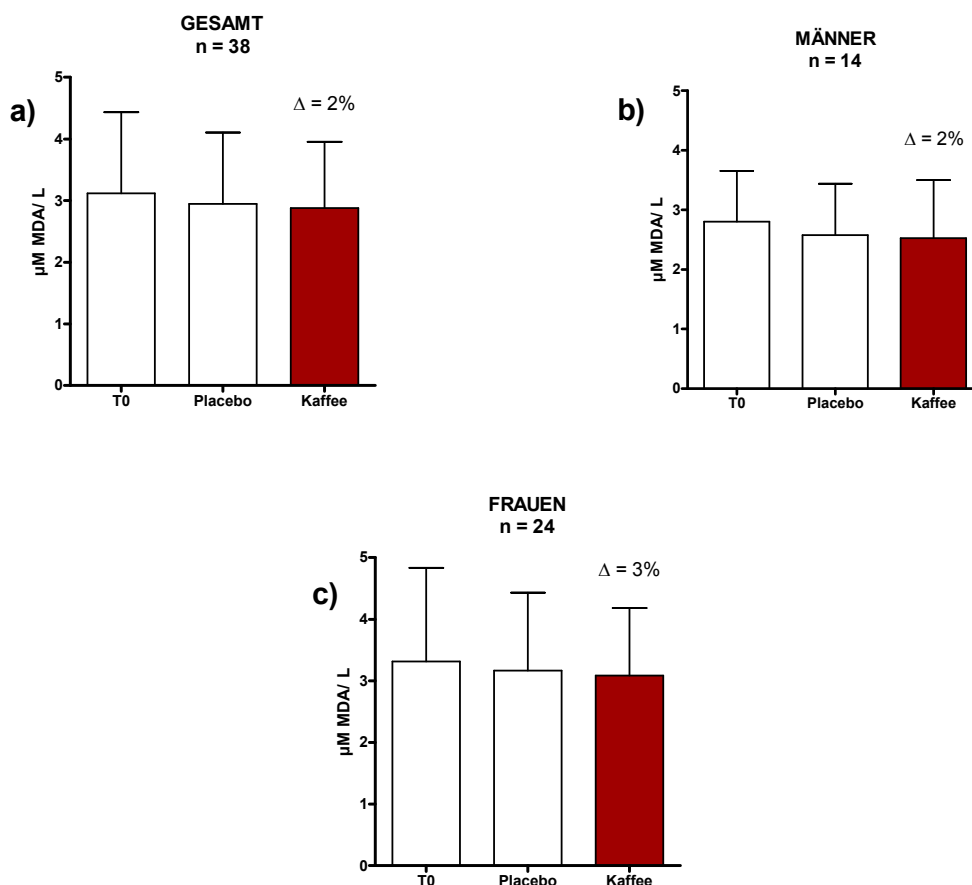


Abbildung 15 Auswirkungen von Kaffeekonsum auf die Konzentration von Malondialdehyd im Plasma. a) Gesamtkollektiv (n = 38), b) Männer (n = 14) und c) Frauen (n = 24). Die Teilnehmer der Studie (n = 40) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. MDA wurde im Plasma fluorimetrisch (532 nm) gemessen. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse aller Probanden. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

4.2 Ergebnisse der Messungen der Isoprostankonzentrationen

Die Ergebnisse der Isoprostanmessungen im Harn sind in der Abbildung 16 graphisch dargestellt. Nach Kaffeekonsum war ein signifikanter Anstieg der Isoprostankonzentrationen im Harn detektierbar ($p = 0,047$). Diese Unterschiede waren im Gesamtkollektiv signifikant nachweisbar, bei den Männern war der Anstieg (66%) aufgrund der geringen Fallzahl und der großen Streuung, als auch bei den Frauen (33%) nicht signifikant.

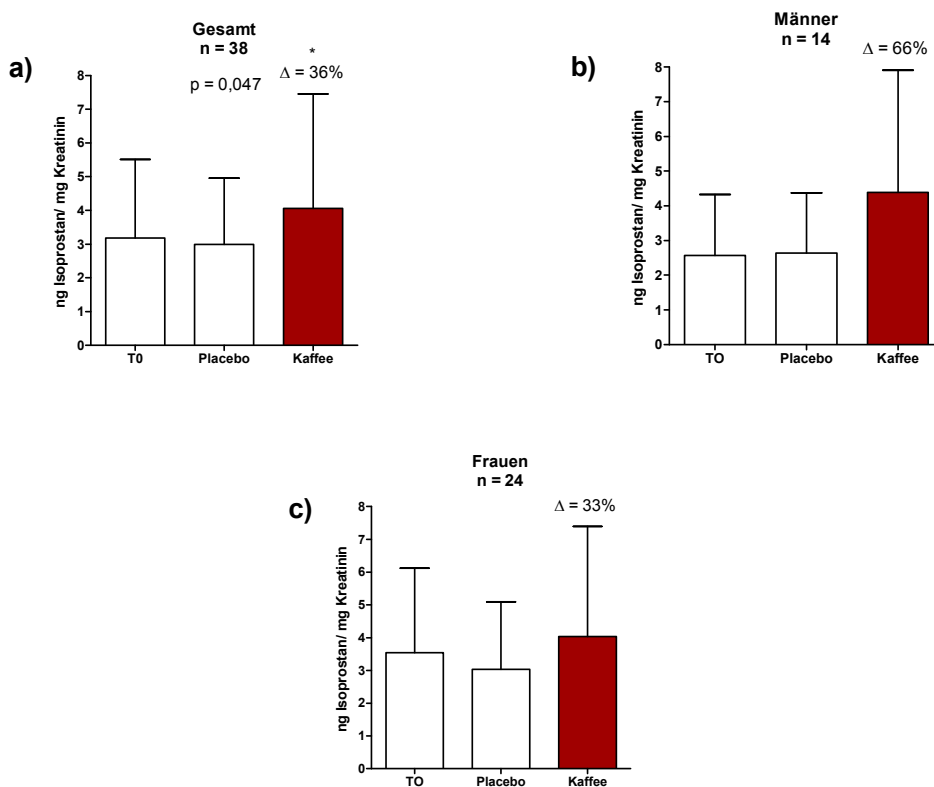


Abbildung 16 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Konzentration der Isoprostane im Urin. a) Gesamtkollektiv ($n = 38$), b) Männer ($n = 14$) und c) Frauen ($n = 24$). Die Teilnehmer der Studie ($n = 40$) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. Die Isoprostankonzentrationen wurden mit einem kompetitiven Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (340 nm) bestimmt. Pro Proband wurden drei parallele Messungen durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kreatininkonzentrationen bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

4.3 Ergebnisse der „Gesamten antioxidativen Kapazität“

Ähnlich wie bei der Malondialdehydbestimmung wurde auch bei den TEAC Messungen kein signifikanter Einfluss des Kaffeekonsums detektiert. Interessant ist, dass die Schwankungen im Gesamtkollektiv und auch in den einzelnen Geschlechtern relativ gering waren (im Durchschnitt 1,5%). Die Streuung bei den MDA Messungen war deutlich höher. Zwischen den Geschlechtern war kein Unterschied feststellbar.

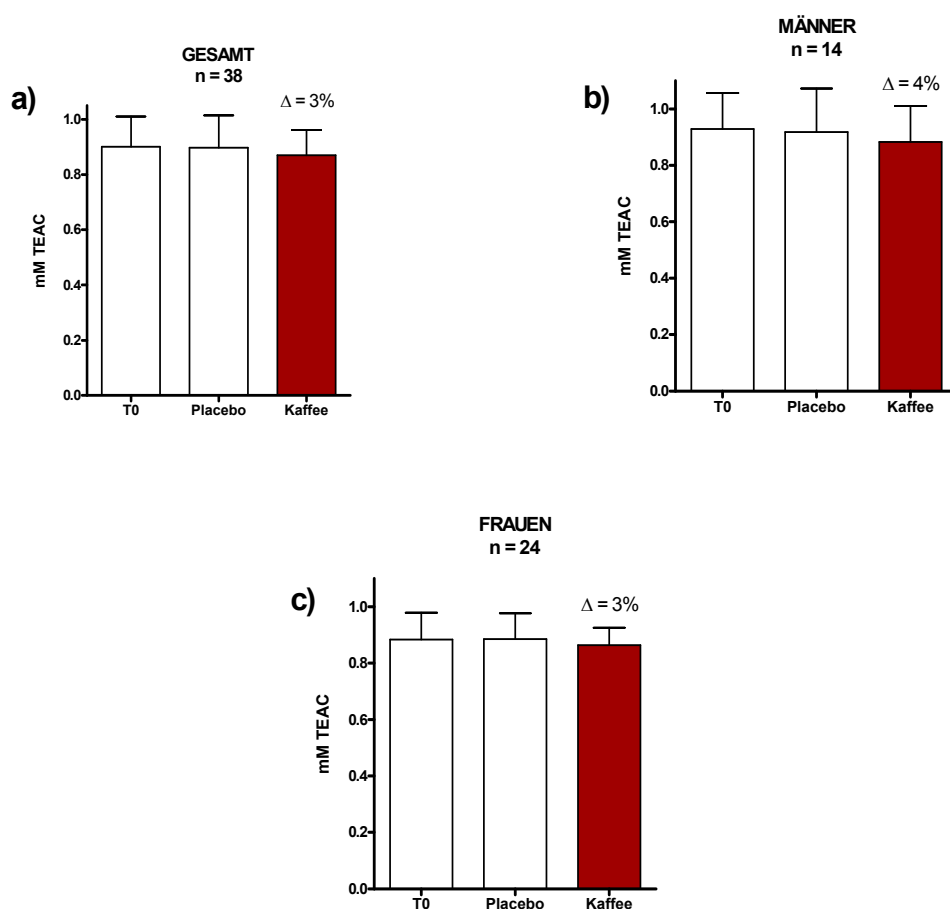


Abbildung 17 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Gesamte antioxidative Kapazität im Plasma. a) Gesamtkollektiv (n = 38), b) Männer (n = 14) und c) Frauen (n = 24). Die Teilnehmer der Studie (n = 40) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. Die gesamte antioxidative Kapazität wurde spektrometrisch (Details siehe Seite 39) bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messergebnisse aller Probanden. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

4.4 Ergebnisse der Konzentrationen des oxidierten Low-Density-Lipoprotein

Die ox-LDL Werte sind in der Abbildung 18 graphisch dargestellt. Es waren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektierbar; Kaffeekonsum verursachte keine signifikanten Änderungen. Interessant ist, dass die Schwankungen innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen relativ hoch waren. (beispielsweise bei den Männern 13% vom Mittelwert).

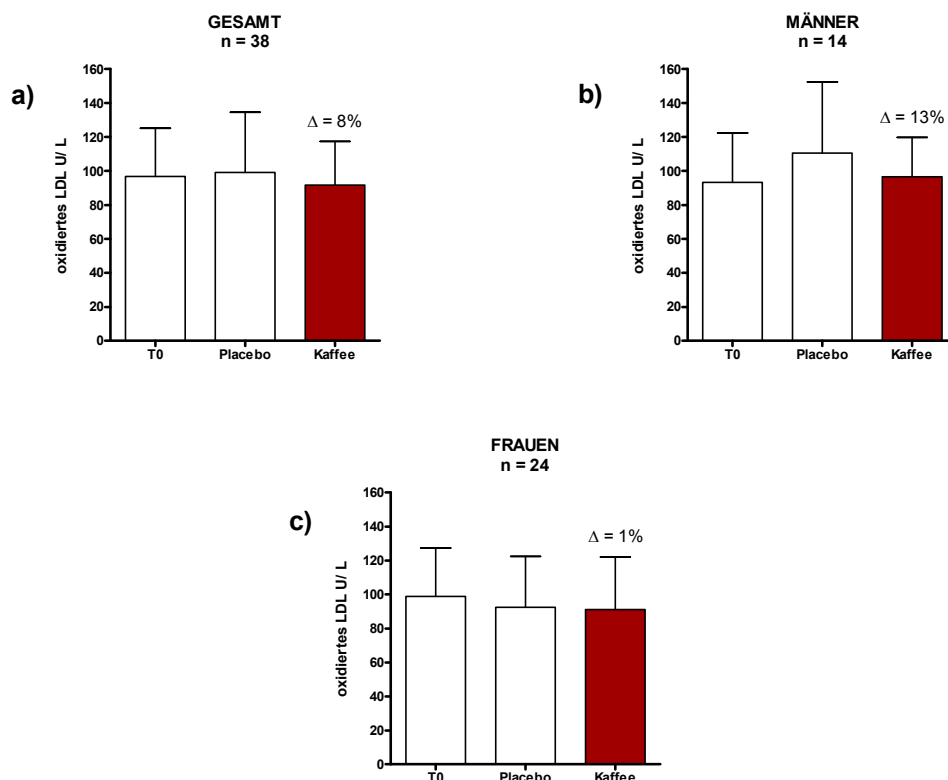


Abbildung 18 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Konzentrationen von oxidiertem LDL im Plasma. a) Gesamtkollektiv (n = 38), b) Männer (n = 14) und c) Frauen (n = 24). Die Teilnehmer der Studie (n = 40) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. Das oxidierte LDL wurde mittels einem Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (450 nm) bestimmt. Pro Teilnehmer wurden drei parallele Messungen durchgeführt. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. * statistische Signifikanz (p < 0,05).

4.5 Ergebnisse der Messungen der Glutathionperoxidaseaktivität

Die Ergebnisse der Bestimmung der GSH-Px Aktivitäten sind in der Abbildung 19 graphisch dargestellt. Es waren keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern detektierbar; Kaffeekonsum verursachte keine signifikanten Änderungen. Interessant ist, dass ähnlich wie bei den MDA Bestimmungen, die Werte der Frauen geringfügig höher lagen, als bei den Männern (z.B.: 1,5% vor der Intervention und 14% nach der Intervention); diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant.

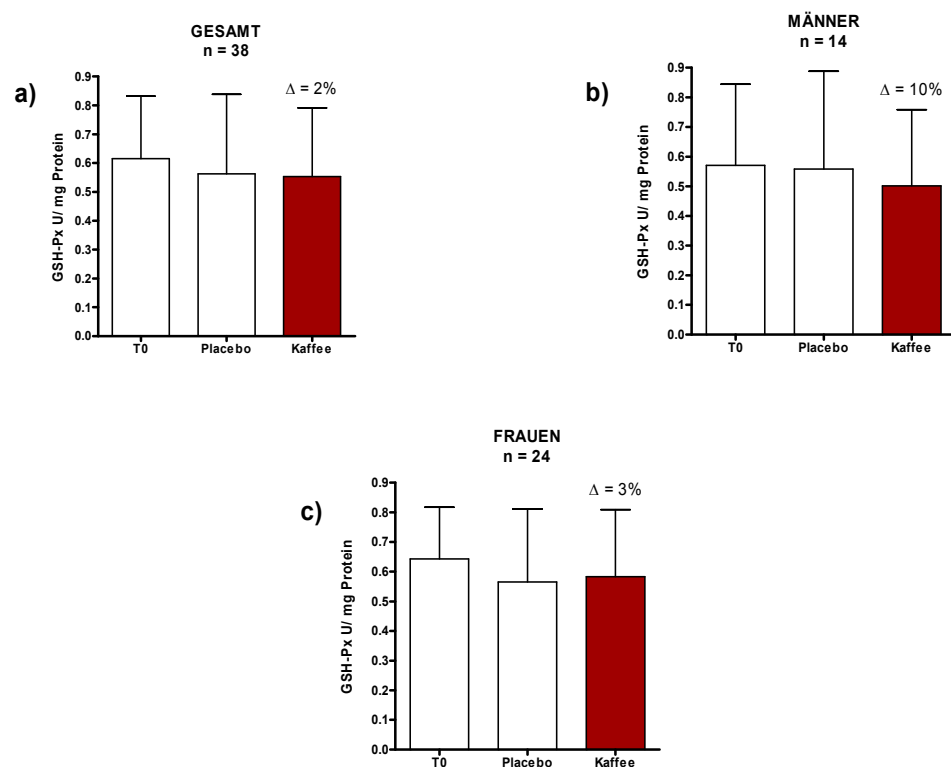


Abbildung 19 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Aktivität der Glutathionperoxidase in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten. a) Gesamtkollektiv (n = 38), b) Männer (n = 14) und c) Frauen (n = 24). Die Teilnehmer der Studie (n = 40) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. Die GSH-Px Aktivitäten wurden spektrophotometrisch (340 nm) bestimmt. Pro Proband wurden zwei parallele Messungen durchgeführt. Die Werte wurden auf die Proteinkonzentrationen bezogen die nach Bradford ermittelt wurden. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

4.6 Ergebnisse der Messungen der Superoxiddismutaseaktivität

Die Ergebnisse der SOD Aktivität sind in der Abbildung 20 graphisch dargestellt. Es waren keine Unterschiede zwischen dem Gesamtkollektiv und den Geschlechtern detektierbar; Kaffeekonsum verursachte keine signifikanten Änderungen. Interessant ist, dass die Werte der Frauen nach Kaffeekonsum geringfügig erhöht waren (8% nach der Intervention); diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

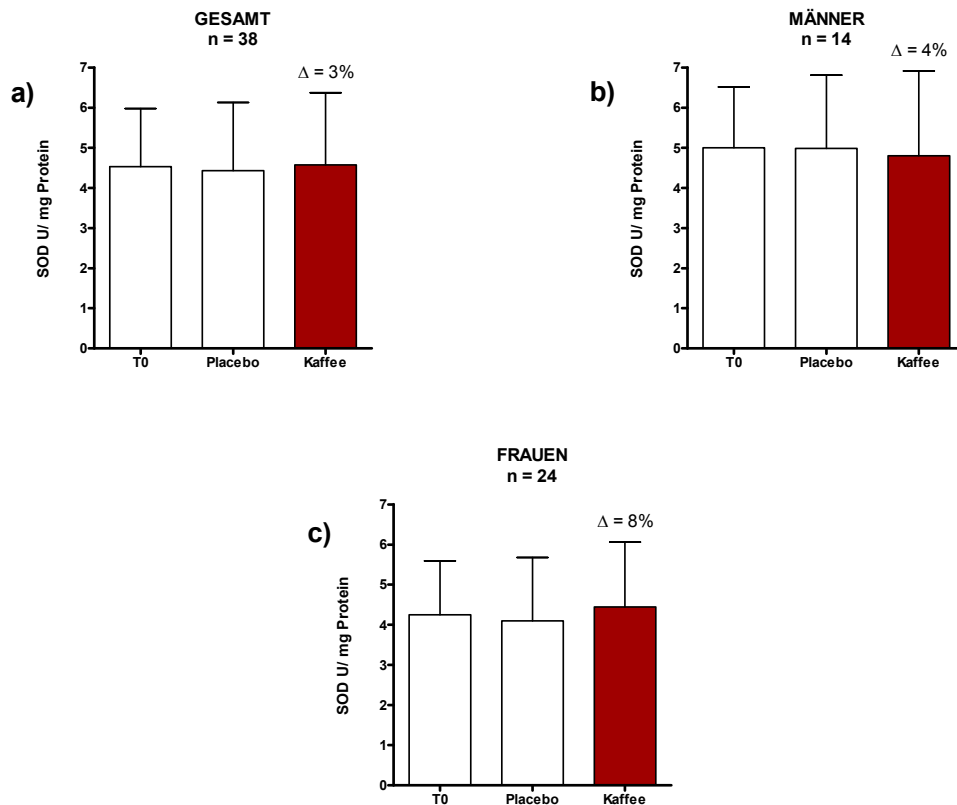


Abbildung 20 Auswirkung von Kaffeekonsum auf die Aktivität der Superoxiddismutase in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten. Gesamtkollektiv (n = 38), b) Männer (n = 14) und c) Frauen (n = 24). Die Teilnehmer der Studie (n = 40) konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg 800 ml Filterkaffee. Vor und nach der Intervention wurde Blut abgenommen. Die SOD Aktivitäten wurden spektrophotometrisch (505 nm) bestimmt. Pro Proband wurden zwei parallele Messungen durchgeführt. Die Werte wurden auf die Proteinkonzentrationen bezogen, die nach Bradford ermittelt wurden. Die Balken zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen. * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

5 Diskussion

Der Diskussionsteil ist in mehrere Abschnitte gegliedert. Die Basiswerte der diversen Parameter, die in der vorliegenden Studie gemessen wurden, wurden mit den Werten anderer Untersuchungen verglichen, weiters werden die Ergebnisse früherer Tier- und Humanstudien mit Kaffee diskutiert in denen idente oder ähnliche Endpunkte bestimmt wurden. Letztendlich wurden die Ergebnisse von Interventionsstudien in die Diskussion miteinbezogen, die mit anderen Nahrungsfaktoren (z.B. mit Obst und Gemüse) durchgeführt wurden.

5.1 Änderungen der Malondialdehydkonzentrationen

Die Messung der **Thiobarbituräsure-reaktiven Substanzen (TBARS)** ist einer der „klassischen“ Endpunkte bei der Untersuchung von Antioxidantien. Das Verfahren wurde 1987 von Wong und Mitarbeitern [77] das erste Mal in einer Humanstudie eingesetzt. Basierend auf einer computergestützten Literaturrecherche wurden über 3500 Arbeiten erfasst, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden [14]. Allerdings ist dieses Verfahren zunehmend ins Kreuzverhör der Kritik geraten, da die Aufarbeitung der Proben unter unphysiologischen Bedingungen erfolgt (Erhitzen über einen längeren Zeitraum), sodass es zu Oxidationsprozessen kommen kann. Es wurde von mehreren Autoren betont, dass HPLC Messungen zu zuverlässigeren Ergebnissen führen, als fluorimetrische Bestimmungen [53]. Trotz der „Unsicherheiten“ dieses Verfahrens, wurden mit vielen etablierten Antioxidantien eindeutige Schutzeffekte detektiert. Die Methode wird sowohl bei *in vitro* Experimenten eingesetzt, als auch in Tier- und Humanstudien.

Die Basiswerte, die in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurden ($2,97 \pm 0,18 \mu\text{M MDA/L}$) stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein [209-211]. Ergebnisse des Einflusses von Kaffee auf die MDA Bildung liegen in einer Reihe von Studien vor. Je nach experimentellen Bedingungen (z.B. hohe oder niedrige Kaffeekonzentrationen) wurde bei *in vitro* Experimenten entweder ein Anstieg oder eine Abnahme der TBARS gefunden.

Simic und Mitarbeiter fanden einen Anstieg der MDA Konzentrationen in einer *in vitro* Studie mit Kaffeesäure und einer Reihe anderer Phenole [196], Fujioka und Shi-

bamoto [145] detektieren einen Anstieg der TBARS durch 5-Caffeoylchinasäure und Stadler und Mitarbeiter [169] fanden, dass Kaffeesäure, pyrollisierte Kaffeesäure und Pyrocatechol einen Anstieg der MDA Bildung bei *in vitro* Experimenten verursachen. Im Gegensatz dazu fand Stadler in derselben Studie sowohl mit regulärem als auch mit dekaffinierten Kaffee eine deutliche Abnahme der MDA Bildung, ähnliche Effekte wurden auch mit Instantkaffee gefunden [169]. In anderen *in vitro* Experimenten mit Lebermikrosomen von Ratten wurden ebenfalls Schutzeffekte gefunden, interessanterweise war Robusta Kaffee effektiver als Arabica. Die Dauer der Röstung hatte einen Einfluss auf die protektive Wirkung (längerfristiges Erhitzen bewirkte eine Abnahme der Lipidperoxidation) [159].

Aus Tier-, und Humanstudien liegen nur wenige Resultate vor, Ozercan und Mitarbeiter [171] fanden in einer Fütterungsstudie (0,14-0,35g Instantkaffeepulver/ über acht Tage hinweg) eine signifikante Reduktion der Bildung der Lipidperoxidationsprodukte in Plasma und Leber von Ratten. In einer Humanstudie von Yukawa [212] wurde die MDA Konzentration im Serum bestimmt. Die Teilnehmer konsumierten über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg 150ml Instantkaffee (8g/ Tasse; 24g/ Tag). Nach der Intervention wurde eine signifikante Abnahme (17% der MDA Konzentrationen) beobachtet.

5.2 Änderungen der Isoprostankonzentrationen

In der vorliegenden Untersuchung wurde nach Kaffeekonsum ein deutlicher Anstieg der F₂-Isoprostane gefunden, die Ergebnisse (3,47±0,70 ng Isoprostan/ mg Kreatinin) stimmen mit den Werten aus der Literatur überein [213,214]. Im Gesamtkollektiv betrug der Anstieg (36% zum Placebowert) interessanterweise war der Effekt bei Männern deutlicher (66%) als bei Frauen (33%). Die Unterschiede der Ergebnisse unserer Intervention zwischen Männern und Frauen waren nicht signifikant.

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in einer Studie von Bayir et al. [215] geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet wurden, F₂-Isoprostankonzentrationen waren bei Männern nach einer traumatischen Kopfverletzung 2-fach höher als bei Frauen. Die Autoren fassten zusammen, dass die geschlechtsspezifischen Effekte in klinischen Studien mit Antioxidantien berücksichtigt werden sollen. In einer

weiteren Untersuchug von Mori und Mitarbeitern [216] wurde der Effekt von Fischkonsum und körperliche Aktivität auf die Isoprostankonzentrationen im Harn bei nicht-insulinabhängigen diabeteskranken Probanden untersucht. Es wurde eine Reduktion der Isoprostankonzentrationen (20%) festgestellt der geschlechtsunabhängig war. In einem weiteren Experiment von Ward und Mitarbeitern wurde bei männlichen Teilnehmern mit Bluthochdruck, nach Intervention mit blutdrucksenkenden Mitteln eine Reduktion der Isoprostankonzentrationen im Harn festgestellt, bei hypertensiven Frauen wurden hingegen keine Veränderungen beobachtet. Die Autoren erklären diesen Effekt durch den unterschiedlichen Lebensstil von Männern und Frauen (z.B. Alkoholkonsum) [217].

In einer weiteren Humanstudie von Mursu und Mitarbeitern [178] wurden die Effekte von Filterkaffee auf die Isoprostankonzentrationen untersucht. Die Teilnehmer (n = 43, ausschließlich Männer) konsumierten über einen Zeitraum von 3 Wochen täglich 0, 450 oder 900ml Filterkaffee (papiergefiltert), in dieser Studie wurden keine signifikanten Veränderungen der F₂-Isoprostankonzentrationen festgestellt. Auch bei einer Fütterungsstudie (Basisdiät mit 0,62% Kaffee - 6,2g/ kg Futter oder 1,36% Kaffee - 13,6g/ kg Futter) mit Ratten (n = 48) wurde keine Erhöhung der Isoprostankonzentrationen im Serum festgestellt [218].

Es ist uns nicht bekannt, dass in anderen Untersuchungen mit Nahrungsfaktoren beim Menschen beziehungsweise bei Tieren Schutzeffekte gefunden wurden, es ist jedoch bekannt, dass es bei bestimmten Erkrankungen zu einem Anstieg der Isoprostankonzentrationen kommt. Erhöhte Isoprostanwerte wurden beispielsweise bei akuter Cholestase (Gallenstauung) [219,220], Diabetes [221], allergischem Asthma [222], Alzheimer [223] und Atherosklerose [81] gefunden (siehe Comporti et al. [224]).

Da Isoprostanmessungen als zuverlässige Marker von Lipidperoxidationsprozessen gelten [14] wurden eine Reihe von Untersuchungen mit anderen Nahrungsmitteln durchgeführt. Für die Messungen wurden entweder Plasma- oder Harnproben eingesetzt. Beispiele für Studien in denen eine deutliche Reduktion der Isoprostankonzentrationen gefunden wurden, sind die Interventionsstudien von Thompson et al. [214] in der eine starke Reduktion der 8-EPG Werte (35%) nach Obst-, und Gemüseverzehr beobachtet wurden. Auch bei Interventionen mit Gemüsesuppen reich an Vitamin C (78mg/ Portion) wurden deutliche Effekte gemessen [225]. Im Gegensatz dazu wurden in anderen Humanstudien keine Effekte detektiert, beispielsweise nach Konsum

von Tomatensaft [226], nach Verzehr von Blaubeeren [227] oder nach Konsum von Kuh- und Sojamilchprodukten [228].

5.3 Änderungen der „Gesamten antioxidativen Kapazität“

Die Messung der gesamten antioxidativen Kapazität mittels $\text{ABTS}^{\cdot+}$ Radikal wird zunehmend zur Detektion von antioxidativ wirksamen Nahrungsmittel-inhaltsstoffen eingesetzt. Bisher wurden etwa 220 Studien publiziert in denen dieses Verfahren (TEAC) angewendet wurde [14]. Die Methode wurde ursprünglich von Miller und seinen Mitarbeitern entwickelt [68], in den letzten Jahren wurde das Verfahren modifiziert [229,230]. Nach der Bildung des $\text{ABTS}^{\cdot+}$ Radikals wurde das Probenmaterial zugesetzt. Für die Radikalbildung werden Substanzen wie Manganiodid, ABAP oder Kaliumpersulfat eingesetzt [68,229,231].

Die Basiswerte, die in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurden ($0,88 \pm 0,01$ mM TEAC) stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein [68]. Es ist bekannt, dass phenolische Verbindungen und Vitamin C sehr gut mit dem $\text{ABTS}^{\cdot+}$ Radikal reagieren. Lipophile Substanzen reagieren allerdings nur schwach, ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass eine zu hohe Konzentration an Hämoglobin in den Plasmaproben die Ergebnisse verfälschen kann [14].

Mehrere *in vitro* Messungen in der die antioxidative Kapazität von Kaffee untersucht wurden zeigten, dass der Beitrag des Kaffees zur Aufnahme antioxidativ wirksamer Phenole höher ist, als jener der dem Obst- und Gemüseverzehr zuzuschreiben ist [127,232]. Eine Reihe von *in vitro* Experimenten belegen die antioxidative Wirkung des Kaffees [146,233] und weiters konnte gezeigt werden, dass durch Dekaffeinierung die antioxidativen Eigenschaften etwa um ~25-30% abnehmen [234]. Durch Röstung entstehen Maillard Produkte, die ebenfalls Schutzeffekte gegenüber Radikalen aufweisen [235], sodass es bei diesem Prozess zu einem Anstieg der gesamten antioxidativen Kapazität kommt [159].

Aus Tier-, und Humanstudien liegen nur wenige Ergebnisse mit Kaffee vor. Ozeran und seine Mitarbeiter [171] berichteten über einen Anstieg der gesamten antioxidativen Kapazität, nach Fütterung von Instantkaffee in Tetrachlorkohlenstoff behandelten Ratten. CCl_4 löst in den Tieren Lipidperoxidation und Leberzirrhose aus. In einer

kleinen Humanstudie von Garsetti [236] ernährten sich die Teilnehmer ($n = 14$) ohne Vorgaben, sie protokollierten jedoch die konsumierten Nahrungsmittel. Der Fäzes wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden hinweg gesammelt. Es wurde eine deutliche Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität in den Fäzesproben und der Nahrungsaufnahme (Kaffee) beobachtet.

Es ist erwähnenswert, dass auch in zahlreichen anderen Studien mit Nahrungsmitteln, Änderungen der TAC Werte beobachtet wurden (die meisten Messungen wurden im Plasma durchgeführt). Beispiele für erfolgreiche Interventionen (Anstieg der antioxidativen Kapazität, TEAC) sind die Studie von Erba und Mitarbeiter mit Catechinen [237]. In einer Interventionsstudie von Wilms und Mitarbeitern konsumierten die Teilnehmer täglich ein Gemisch aus 1000 ml Blaubeer- und Apfelsaft (97mg Quercetin, 16mg Ascorbinsäure) pro Teilnehmer und Tag, die gesamte antioxidative Kapazität war nach einer 4-wöchigen Interventionsphase signifikant erhöht (11% zum Ausgangswert) [238].

5.4 Änderungen der Konzentrationen von oxidiertem LDL

In der vorliegenden Arbeit wurde im Gesamtkollektiv, eine marginale Reduktion des oxidierten LDL gefunden (Reduktion 5,3%), dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant, die erhaltenen Werte ($96,79 \pm 2,41$ U ox-LDL/ L) stimmen mit den Basiswerten des Herstellers (25-115 U ox-LDL/ L, laut Handbuch Mercodia [239]) überein. Die Ergebnisse anderer Humanstudien sind widersprüchlich, allerdings wurden auch unterschiedliche Kaffeesorten eingesetzt. In einer kleinen Studie ($n = 10$) von Natella et al. [240] wurde nach kurzfristigem Konsum von Filterkaffee (200ml Kaffee, Blutabnahme: 30 und 60 min nach Konsum) eine signifikante Verzögerung der LDL Oxidation im Plasma festgestellt. Im Gegensatz dazu fanden Mursu und Mitarbeiter [178] in einer größeren Humanstudie ($n = 35$) sowohl nach Konsum einer Einzeldosis von 150 und 300ml Filterkaffee, als auch nach kontinuierlichem Konsum ($n = 43$; 450 und 900ml Filterkaffee) über mehrere Wochen hinweg, keine Veränderung der LDL Oxidation. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten wurden in einer japanischen Studie von Yukawa et al. [212], die Messungen mit humanem Serum LDL durchgeführt. Diese Untersuchung wurde mit Instantkaffee durchgeführt (7-tägiger Konsum von

450ml Instantkaffee - 24g Instantkaffee/ Tag), es wurde eine Verzögerung (8%, $p < 0,01$) der LDL Oxidation gefunden.

In diversen *in vitro* Experimenten wurde wiederholt eine Abnahme der LDL Oxidation beziehungsweise eine Zunahme der „lag time“ mit verschiedenen Kaffeesorten beobachtet, beispielsweise mit Löskaffee [241], aber auch mit türkischem Kaffee und Instantkaffee [242]. Gómez-Ruiz und Mitarbeiter [243] verglichen in einer aktuellen Arbeit die Effekte von grünen und gerösteten Bohnen, wobei bei Kaffee ohne Röstung keine Schutzeffekte auftraten. Die Autoren schließen darauf, dass vor allem Maillard Reaktionsprodukte antioxidative Wirkung besitzen. Diese Annahme wird durch die Befunde von Dittrich et al. [244] erhärtet, die mit künstlich hergestellten Reaktionsprodukten eine Verzögerung der „lag time“ der LDL Oxidation fanden.

Allerdings könnte auch Koffein zumindest teilweise für die Schutzeffekte verantwortlich sein, Lee und Mitarbeiter fanden mit Koffein und dessen Primärmetaboliten keine Reduktion der LDL Oxidation, mit sekundären Stoffwechselprodukten (1-Methylxanthin und 1-Methylharnsäure) die im Blut entstehen, wurde ein deutlicher Schutzeffekt gefunden [245].

Auch Hydroxyzimtsäuren (Kaffeesäure) reduzieren unter *in vitro* Bedingungen die Oxidation von LDL [147,240,246].

Allerdings ist unklar ob die Befunde auf den Menschen extrapoliert werden können, da die diversen Inhaltsstoffe nach Absorption im Darmtrakt rasch abgebaut werden (beispielsweise wurde mit Koffein im Tierversuch nachgewiesen, dass die gesamte aufgenommene Menge rasch im Gastrointestinaltrakt absorbiert wird [247], die Verteilung erfolgt innerhalb kürzester Zeit (5 min) in alle Körperflüssigkeiten und Gewebe [248]. Es kommt zu keiner Anreicherung von Koffein und seinen Metaboliten in den Geweben unabhängig von der Dosierung [247].

5.5 Änderungen der Aktivität der Glutathionperoxidase

Die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) war nach der Intervention nicht signifikant erhöht, die gemessenen Basiswerte ($0,56 \pm 0,01$ U GSH-Px/ mg Protein) stimmen mit früheren Ergebnissen [249] und Hoelzl et al. (Manuskript, in Vorbereitung) überein.

Auch in anderen Studien mit Kaffee wurde keine Induktion der GPx Aktivität beobachtet, weder in jener von Bichler und Mitarbeitern [115], in der von den Teilnehmern ein Gemisch aus Metall- und Filterkaffee konsumiert wurde (400ml Filterkaffee und 200ml French Press), noch in einer wesentlich größeren Interventionsstudie (n = 36) mit Instantkaffee (800ml Kaffee über 5 Tage hinweg) [Hoelzl et al., Studie am Institut für Krebsforschung, Wien, nicht publiziert]. Auch Mursu und Mitarbeiter fanden in einer Interventionsstudie (n = 43), in der die Teilnehmer über einen Zeitraum von 3 Wochen täglich 450 oder 900ml Filterkaffee konsumierten [178], keine Veränderung der Enzymaktivitäten. Im Gegensatz dazu wurde in einer Tierstudie mit Hamstern ein deutlicher Anstieg der Aktivität von GSH-Px (16,5%) gefunden. Über einen Zeitraum von 14 Wochen, erhielten die Tiere 8% eines „schwarzen“ Kaffeeextraktes mittels Gavage und wurden mit DMBA (induziert Mundhöhlenkarzinom) behandelt, die Messungen der GPx – Aktivität wurde mit den Mundhöhlenzellen durchgeführt [250].

Mit kaffeespezifischen Melanoiden die aus stark geröstetem Kaffee gewonnen wurden, fanden Goya und Mitarbeiter in einer humanen Leberhepatomzelllinie (HepG2) nach Inkubation der Zellen mit einem Kaffeeextrakt nach 2 und 20 Stunden einen Anstieg der Aktivität von GPx [193].

Auch mit Chlorogensäure wurde ein deutlicher Induktionseffekt in Labornagern gefunden. Tsuchiya und Mitarbeiter fütterten Labornagern *ad libitum* eine Basisdiät (mit 0,02% Paraquat +/- 0,2% Chlorogensäure im Futter über 10 Tage hinweg) und fanden einen deutlichen Anstieg der Aktivität in Erythrozyten und Leberzellen von Ratten [184].

In weiteren Humanstudien wurden deutliche Induktionseffekte mit anderen Nahrungsinhaltsstoffen beobachtet beispielsweise in peripheren Lymphozyten, mit Gallussäure (0,2mg/ kg KG pro Teilnehmer und Tag, über 3 Tage hinweg) [50]; diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, da Gallussäure auch im Kaffee enthalten ist [251]. Auch nach erhöhtem Verzehr von Früchten und Gemüse (600g pro Tag) wurde eine deutliche Erhöhung der GPx Aktivität in Erythrozyten (nicht aber in Leukozyten) gefunden [252].

5.6 Änderungen der Aktivität der Superoxiddismutase

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Induktion der SOD nach Kaffeekonsum beobachtet. Die Ergebnisse unserer Studie ($4,51 \pm 0,15$ U SOD/ mg Protein) liegen in dem Bereich die in anderen Untersuchungen gefunden wurden [253-255]. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Hoelzl und Mitarbeitern überein, die eine ähnliche Interventionsstudie mit Instantkaffee durchführten, auch in dieser Studie wurden keine Effekte gefunden. Im Gegensatz dazu berichteten Bichler und Mitarbeiter [115] über einen deutlichen Anstieg der SOD (38%) nach 5-tägiger Kaffeeintervention. Die Teilnehmer konsumierten täglich eine Mischung aus 400 ml Filterkaffee und 200 ml metallgefiltertem Kaffee („French Press“). In einer *in vitro* Studie von Itagaki et al. [256] wurde nach Behandlung von humanen Intestinalzellen ein Anstieg der SOD Aktivität beobachtet.

Die Ergebnisse die mit Kaffeesäuren erhalten wurden sind widersprüchlich. Jung und Mitarbeiter [257] berichten über einen deutlichen Anstieg der SOD Aktivität in der Leber und Erythrozyten von Mäusen denen Kaffeesäure im Futter verabreicht wurde (0,02%). Im Gegensatz dazu wurden bei Sprague-Dawley Ratten (0, 0,2% und 0,8% Kaffeesäure ins Futter gemischt), eine Abnahme der Enzymaktivitäten gefunden [258]. Von Tsuchiya und Mitarbeitern wurden in einer Tierstudie mit Ratten keine Veränderungen der Enzymaktivitäten beobachtet. Den Ratten wurde Paraquat gefüttert, nach der Supplementierung mit Chlorogensäuren wurde in der Interventionsgruppe keine Änderung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt [184].

Möglicherweise sind die Unterschiede der Ergebnisse der Humanstudien durch die unterschiedliche Zubereitung des Kaffees zu erklären. In der vorliegenden Studie konsumierten die Teilnehmer 800 ml Filterkaffee der faktisch keine Diterpenoide enthält, während in den Untersuchungen von Bichler und Mitarbeitern [115] ein Teil der Kaffeemenge metallgefiltert wurde, sodass von den Probanden Diterpenoide Cafestol und Kahweol aufgenommen wurden. In aktuellen Arbeiten von Cavin [124] und Higgins [125] wurde gezeigt, dass die kaffeespezifischen Diterpenoide (C + K) per se die Expression von Genen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 auslösen. Die Transkription von SOD wird durch diesen Faktor aktiviert (persönliche Mitteilung H.K. Na, Universität Seoul).

Es ist bekannt, dass diverse andere Nahrungsfaktoren SOD induzieren; typische Beispiele sind Kohlsprossen, Mandeln, Sumach sowie Gallussäure (siehe Hoelzl et al. 2008 [2]). Allerdings ist festzustellen, dass die Aktivierung dieses Enzyms nicht notwendigerweise mit Schutzeffekten in Zusammenhang gebracht werden kann. Es ist bekannt, dass SOD auch durch oxidative Belastungen bzw. entzündliche Prozesse hochreguliert werden kann, sodass erhöhte Aktivitäten auch als Hinweis für Radikalbelastungen interpretiert werden können [259,260].

6 Schlussbetrachtung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass der Konsum von papiergefiltertem Bohnenkaffee die meisten der untersuchten Endpunkte für oxidativen Stress nicht signifikant veränderte. Obwohl Kaffee per se eine sehr hohe antioxidative Kapazität aufweist, und auch aufgrund der relativ hohen Aufnahmemengen beim Menschen ist die Zufuhr von Antioxidantien durch Kaffeekonsum höher, als durch den Verzehr von Obst und Gemüse [127,232]; jedoch zeigten unsere Untersuchungen das Filterkaffee keine Auswirkungen auf den AO Status beim Menschen hat; dies belegen die Ergebnisse der TEAC Messungen sehr deutlich.

Wie in Kapitel 2.8.2 erwähnt werden durch Papierfilterung die biologisch hochwirksamen Diterpenoide C+K weitgehend entfernt [174]; dies könnte die Tatsache erklären, dass keine Induktion der antioxidativen Enzyme (Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase) in der vorliegenden Studie gefunden wurden. Es ist bekannt, dass C+K, offensichtlich über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2, diese und andere Enzyme hochregulieren [125].

Die Tatsache, dass die MDA Konzentrationen im Plasma durch die Intervention nicht verändert wurden, obwohl parallel dazu ein Anstieg der Isoprostankonzentrationen gemessen wurde, ist zunächst ein scheinbarer Widerspruch, da beide Parameter, als Marker für die Oxidation von Membranlipiden angesehen werden. Allerdings kann die Bildung von F₂-Isoprostanen auch enzymatisch (Cyclooxygenase-Weg) zur Oxidation der Arachidonsäure führen [261,262]. Dieser Prozess führt nur zur Bildung von Isoprostanen, nicht aber zur Bildung von Malondialdehyd, dies könnte die von uns beobachteten Effekte erklären. Die Frage ist insofern von Interesse da COX-2 Induktion mit dem Gesundheitszustand beim Menschen in Zusammenhang steht, beispielsweise kommt es bei Entzündungsprozessen zu einem Anstieg dieses Enzyms. Durch bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe wie Gingerol (Inhaltsstoff des Ingwers) werden die COX-2 Aktivitäten inhibiert [263].

Interessant ist, dass die Ergebnisse der vorliegenden Humanstudie in deutlichem Widerspruch zu den Resultaten stehen, die unter *in vitro* Bedingungen bzw. in Tierexperimenten gefunden wurden. Wie erwähnt wurden in derartigen Experimenten recht häufig eine Erhöhung der TAC Werte, sowie ein Einfluss auf MDA Konzentrationen

und auf die Aktivitäten antioxidativer Enzyme beobachtet [115,171,264]. Diese Vergleiche zeigen, dass die Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen bzw. Tierexperimenten in denen oft hohe Dosierungen eingesetzt werden nur bedingt auf den Menschen übertragen werden können, und dass klare Aussagen nur durch Befunde von kontrollierten Humanstudien möglich sind.

7 Zusammenfassung

Kaffee ist eines der am häufigsten konsumierten Getränke der Menschheit, eine Reihe von Untersuchungen deutet darauf hin, dass Kaffee den Gesundheitszustand des Menschen beeinflusst. In den letzten Jahren wurden Studien veröffentlicht, die auf Veränderungen des Oxidationszustandes beim Menschen durch Kaffeekonsum hindeuten. Es wurden sowohl negative, als auch positive Veränderungen beschrieben (z.B. Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, als auch Inaktivierung derselben durch Maillard Produkte oder Chlorogensäuren). Über antioxidative Effekte beim Menschen liegen nur wenige Studien vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Filterkaffee in einer großen kontrollierten Interventionsstudie ($n = 40$) untersucht. Um Störgrößen weitgehend zu reduzieren wurde ein „cross-over“ Design gewählt. Die Teilnehmer konsumierten über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg täglich 800 ml papiergefilterten Bohnenkaffee.

Es wurden diverse Parameter des oxidativen Stoffwechsels bestimmt, nämlich die Isoprostankonzentrationen im Harn, die Enzymaktivitäten (Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase) in der zytosolischen Fraktion peripherer Lymphozyten, weiters wurde im Plasma die Menge an oxidiertem Low Density Lipoprotein (ox-LDL) sowie die Malondialdehydkonzentration bestimmt. Darüber hinaus wurde die „gesamte antioxidative Kapazität“ (TEAC) spektrophotometrisch gemessen.

Nur bei einem Parameter (F_2 -Isoprostanen) wurde nach der Kaffeeintervention eine signifikante Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert gefunden. Nach dem Kaffeekonsum waren die Harnkonzentrationen (bezogen auf Kreatinin) im Gesamtkollektiv deutlich erhöht (36%; $p = 0,047$).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch gefilterten Kaffee die Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme nicht erhöht werden. Auch die ox-LDL und TEAC Werte wurden nicht verändert. Die Erhöhung der Isoprostane ist ein Hinweis auf eine gesteigerte Lipidperoxidation.

8 Summary

Coffee is one of the most frequently consumed beverages worldwide and a number of investigations indicate, that coffee influences the health condition of humans. In recent years a number of studies have been published which indicate that coffee consumption causes changes of the redox state in humans. Negative as well as positive changes were shown (e.g. release of free radical species, but also inactivation of reactive species by maillard products and chlorogenic acids). Only few studies have been published which concern antioxidant effects in humans.

The aim of the present study was the investigation on the impact of filter papered coffee in a large controlled human intervention trial ($n = 40$). To avoid bias a “cross-over” design was used. The participants consumed 800 ml of paper filtered bean coffee daily over a period of five days. A number of different parameters of the oxidative status were determined, namely the concentrations of isoprostanes in urine, the activities of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in the cytosolic fraction of peripheral lymphocytes. Furthermore the oxidised low-density-lipoprotein and the concentrations of malondialdehyde were determined in plasma. The total antioxidant capacity (TEAC) was measured spectrophotometrically. Only one of the parameters (F_2 -isoprostanes) was altered after intervention with coffee and a significant increase was found at the end of the trial. The concentrations of isoprostanes in urine (related to creatinin concentrations) were significantly increased in all participants (+36%, $p = 0,047$).

In conclusion, coffee was not found to influence the activities of antioxidant enzymes, also ox-LDL and TEAC were not affected. The induction of isoprostanes can be taken as one indication, that coffee consumption induces lipid peroxidation.

9 Literaturverzeichnis

1. Alamdari, D.H., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., Konstas, A.G., Karapiperidou, A. and Koliakos, G. (2005) High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radic Biol Med*, **39**, 1362-7.
2. Hoelzl, C., Knasmüller, S., Misik, M., Collins, A., Dusinska, M. and Nersesyan, A. (2008, in press) Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends. *Mutat Res*.
3. Moller, P. and Loft, S. (2004) Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat Res*, **551**, 79-89.
4. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7915-22.
5. Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V. and Schmidt, H. (2006) Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, **187**, 1-17.
6. Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, **49**, 481-93.
7. Thomas, M.J. (2000) The role of free radicals and antioxidants *Nutrition*, **16**, 716-8.
8. Gilbert, D.L. (2000) Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci*, **899**, 1-14.
9. Younes, M. (1994) Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies. In Marquardt, H. and Schaefer, S.G. (eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, pp. 94-105.
10. Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-9.
11. Choe, E. and Min, D.B. (2006) Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **46**, 1-22.
12. Karihtala, P. and Soini, Y. (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*, **115**, 81-103.
13. Finaud, J., Lac, G. and Filaire, E. (2006) Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, **36**, 327-58.

14. Knasmuller, S., Nersesyan, A., Misik, M., Gerner, C., Mikulits, W., Ehrlich, V., Hoelzl, C., Szakmary, A. and Wagner, K.H. (2008) Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *Br J Nutr*, **99 E Suppl 1**, ES3-52.
15. Kim, K.S., Chang, Y.J., Chung, Y.J., Park, C.U. and Seo, H.Y. (2007) Enhanced expression of high-affinity iron transporters via H-ferritin production in yeast. *J Biochem Mol Biol*, **40**, 82-7.
16. Allen, R.G. and Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, **28**, 463-99.
17. Dalton, T.P., Shertzer, H.G. and Puga, A. (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 67-101.
18. Owuor, E.D. and Kong, A.N. (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, **64**, 765-70.
19. Nersesyan, A., Misik, M., Hoelzl, C., Ehrlich, V., Mikulits, W., Wagner, K.H., Knasmueller, S. and Gerner, C. (2007) Use of proteomic-based approaches to investigate the consequences of oxidative DNA damage and protective effects of dietary factors. In Durackova, Z. and Knasmueller, S. (eds.), *The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy*. Slovak Academic Press, Bratislava, pp. 297-322.
20. Harris, G.K. and Shi, X. (2003) Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat Res*, **533**, 183-200.
21. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. and Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, **266**, 37-56.
22. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **160**, 1-40.
23. Elahi, M.M. and Matata, B.M. (2006) Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch Biochem Biophys*, **450**, 78-88.
24. Kukreja, R.C. and Hess, M.L. (1992) The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res*, **26**, 641-55.

25. Lefer, D.J. and Granger, D.N. (2000) Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*, **109**, 315-23.
26. Barranco Quintana, J.L., Allam, M.F., Serrano Del Castillo, A. and Fernandez-Crehuet Navajas, R. (2007) Alzheimer's disease and coffee: a quantitative review. *Neurol Res*, **29**, 91-5.
27. Calabrese, V., Bates, T.E. and Stella, A.M. (2000) NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res*, **25**, 1315-41.
28. Calabrese, V., Guagliano, E., Sapienza, M., Mancuso, C., Butterfield, D.A. and Stella, A.M. (2006) Redox regulation of cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Ital J Biochem*, **55**, 263-82.
29. Chung, K.K., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2005) S-nitrosylation in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Methods Enzymol*, **396**, 139-50.
30. Floyd, R.A. (1999) Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, **222**, 236-45.
31. Hernan, M.A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F. and Gestal-Otero, J.J. (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **52**, 276-84.
32. Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, A.J., Jr., Alvarez, J.G. and Sikka, S.C. (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*, **86**, 878-85.
33. Astley, S., Langrish-Smith, A., Southon, S. and Sampson, M. (1999) Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma LDL in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **22**, 1626-31.
34. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44-84.
35. Vaca, C.E., Wilhelm, J. and Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res*, **195**, 137-49.
36. Dotan, Y., Lichtenberg, D. and Pinchuk, I. (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, **43**, 200-27.

37. Itabe, H. (2003) Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull*, **26**, 1-9.
38. Witztum, J.L. and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, **88**, 1785-92.
39. Remacle, C., Reusens, B. and Eds. (2004) *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Woolhead Publishing Limited, Washington, DC.
40. Gebhart, E. (1974) Antimutagens. Data and problems. *Humangenetik*, **24**, 1-32.
41. Knasmueller, S., Majer, B.J. and Buchmann, C. (2004) Identifying antimutagenic constituents of food. In Remacle, C. and Reusens, B. (eds.), *Functional foods, ageing and degenerative disease*. Woolhead Publishing Limited, Washington, DC, pp. 581-614.
42. Wattenberg, L.W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*, **45**, 1-8.
43. Ames, B.N., Profet, M. and Gold, L.S. (1990) Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7777-81.
44. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2007) Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, pp. 341-394.
45. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (2007) Antioxidant defences: endogenous and diet derived. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, pp. 79-186.
46. Manach, C. and Donovan, J.L. (2004) Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, **38**, 771-85.
47. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, **20**, 933-56.
48. Semba, R.D., Lauretani, F. and Ferrucci, L. (2007) Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Arch Biochem Biophys*, **458**, 141-5.
49. Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M.G. and Chekir-Ghedira, L. (2007) Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling. *Chem Biol Interact*, **165**, 1-13.

50. Nersesyan, A., Hoelzl, C., Ferk, F., Misik, M. and Knasmüller, S. (in press) Use of single cell gel electrophoresis assays in dietary intervention trials. In A. Dhanwan and Anderson, D. (eds.), *The Comet Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry, UK, Cambridge, UK.
51. Somporn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S. and Morales, N.P. (2007) Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull*, **30**, 74-8.
52. Luximon-Ramma, A., Neergheen, V.S., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T. and Aruoma, O.I. (2006) Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: a potential contributor to their antioxidant functions. *Biofactors*, **27**, 79-91.
53. Wagner, K.-H., Misik, M., Nersesyan, A. and Knasmueller, S. (2009, in press) Methods to determine total antioxidant capacity and oxidative damage. In Knasmueller, S., DeMarini, D.M., Johnson, I.T. and Gernaeuser, C. (eds.), *Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors*. Wiley-VCH.
54. Kong, A.N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R. and Mandlekar, S. (2001) Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev*, **33**, 255-71.
55. Karoui, H., Clément, J.-L., Rockenbauer, A., Siri, D. and Tordo, P. (2004) Synthesis and structure of 5,5-diethoxycarbonyl-1-pyrroline N-oxide (DECPO). Application to superoxide radical trapping. *Tetrahedron Letters*, **45**, 149-152.
56. Khan, N., Wilmot, C.M., Rosen, G.M., Demidenko, E., Sun, J., Joseph, J., O'Hara, J., Kalyanaraman, B. and Swartz, H.M. (2003) Spin traps: *in vitro* toxicity and stability of radical adducts. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1473-81.
57. Cao, G., Alessio, H.M. and Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*, **14**, 303-311.
58. Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. and Ferro-Luzzi, A. (1995) A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med*, **18**, 29-36.
59. Glazer, A.N. (1990) Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol*, **186**, 161-168.

60. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U. and Locke, S. (1985) Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, **187**, 33-37.
61. Winston, G.W., Regoli, F., Dugas Jr., A.J., Fong, J.H. and Blanchard, K.A. (1998) A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radic Biol Med*, **24**, 480-493.
62. Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. and Maxwell, S.R.J. (1992) Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, **266**, 265-277.
63. Popov, I., Völker, H. and Lewin, G. (2001) Photochemiluminescent detection of antiradical activity. V. Application in combination with the hydrogen peroxide-initiated chemiluminescence of blood plasma proteins to evaluate antioxidant homeostasis in humans. *Redox Report*, **6**, 43-48.
64. Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O. and Koller, E. (1987) Autoxidation of human low density lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res*, **28**, 495-509.
65. Quehenberger, O., Jürgens, G., Zadavec, S. and Esterbauer, H. (1988) Oxidation of human low density lipoprotein initiated by copper (II) chloride. *Basic Life Sci*, **49**, 387-390.
66. Rice-Evans, C., Leake, D., Bruckdorfer, R. and Diplock, A.T. (1996) Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: Whys, wherefores and pitfalls. *Free Radic Res*, **25**, 285-311.
67. Bors, W., Michel, C. and Saran, M. (1984) Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochim Biophys Acta*, **796**, 312-319.
68. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, **84**, 407-12.

69. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Anal Biochem*, **239**, 70-76.
70. Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T. (1999) Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*, **47**, 633-636.
71. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*, **48**, 3396-3402.
72. Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M. and Karademir, S.E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, **52**, 7970-81.
73. Spiteller, G. (2006) Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med*, **41**, 362-387.
74. Young, I.S. and McEneny, J. (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, **29**, 358-62.
75. Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Muller, H., Pool-Zobel, B.L. and Rechkemmer, G. (2003) Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J Nutr Biochem*, **14**, 90-8.
76. Meagher, E.A. and Fitzgerald, G.A. (2000) Indices of lipid peroxidation *in vivo*: Strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1745-1750.
77. Wong, S.H.Y., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach Jr., C.N. and Sunderman Jr., F.W. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*, **33**, 214-220.
78. Ramel, A., Wagner, K.-H. and Elmadfa, I. (2004) Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr*, **43**, 2-6.
79. Milne, G.L., Musiek, E.S. and Morrow, J.D. (2005) F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals.*, **10 Suppl 1**, S10-23.

80. Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F. and Roberts II, L.J. (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9383-9387.
81. Roberts, L.J. and Morrow, J.D. (1999) Isoprostanes as markers of lipid peroxidation in atherosclerosis. *Molecular and cellular basis of inflammation*, 141-163.
82. Schwedhelm, E. and Boger, R.H. (2003) Application of gas chromatography-mass spectrometry for analysis of isoprostanes: their role in cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*, **41**, 1552-61.
83. Yan, W., Byrd, G.D. and Ogden, M.W. (2007) Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *J Lipid Res*, **48**, 1607-17.
84. Schroeder, C. (2007) Untersuchung zu Inhaltsstoffen des Atemkondensates beim Kalb. *Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereiches Veterinärmedizin*. Freie Universität Berlin, Berlin, pp. 113.
85. Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **11**, 81-128.
86. Holley, A.E., Walker, M.K., Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993) Measurement of n-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. *Free Radic Biol Med*, **15**, 281-289.
87. Levine, R.L., Wehr, N., Williams, J.A., Stadtman, E.R. and Shacter, E. (2000) Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol*, **99**, 15-24.
88. Winterbourn, C.C. and Buss, I.H. (1999) Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods Enzymol*, **300**, 106-11.
89. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **186**, 464-478.
90. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P. and Descamps-Latscha, B. (1996) Ad-

vanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, **49**, 1304-13.

91. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa, T.N., Capeill re-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.-M., Jungers, P., Dr  ke, T. and Descamps-Latscha, B. (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*, **161**, 2524-2532.
92. Nersesyan, A., Misik, M. and Knasmueller, S. (in press) Methods used for the detection of antimutagens: an overview. In Knasmueller, S., DeMarini, D.M., Johnson, I.T. and Gerhaeuser, C. (eds.), *Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors*. Wiley-VCH.
93. Fahrig, R. (1993) *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wiss. Buchges., Darmstadt.
94. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (1984) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier Science Publisher Amsterdam.
95. Venitt, S.P., J.M. (1984) *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*. IRL-Press, Oxford.
96. Ames, B.N. (1972) A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. In Sutton, H.E. and Harris, M.I. (eds.), *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants*. Academic Press, New York, pp. 57-66.
97. Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E.A. and Ames, B.N. (1982) A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7445-9.
98. Collins, A., Dusinska, M., Gedik, C.M. and Stetina, R. (1995) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*, **104**, 465-9.
99. Collins, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, **14**, 1733-5.
100. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Avon, England.
101. Moller, P. and Loft, S. (2002) Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*, **76**, 303-10.

102. Moller, P. and Loft, S. (2006) Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med*, **41**, 388-415.
103. Hays, A.M., Srinivasan, D., Witten, M.L., Carter, D.E. and Lantz, R.C. (2006) Arsenic and cigarette smoke synergistically increase DNA oxidation in the lung. *Toxicol Pathol*, **34**, 396-404.
104. Hofer, T., Seo, A.Y., Prudencio, M. and Leeuwenburgh, C. (2006) A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration. *Biol Chem*, **387**, 103-11.
105. Kim, S.Y., Suzuki, N., Laxmi, Y.R., Umemoto, A., Matsuda, T. and Shibutani, S. (2006) Antiestrogens and the formation of DNA damage in rats: a comparison. *Chem Res Toxicol*, **19**, 852-8.
106. Dizdaroglu, M. (1990) Gas chromatography-mass spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Methods Enzymol*, **193**, 842-57.
107. Kasai, H. (2003) A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system. *J Radiat Res (Tokyo)*, **44**, 185-9.
108. Loft, S., Deng, X.S., Tuo, J., Wellejus, A., Sorensen, M. and Poulsen, H.E. (1998) Experimental study of oxidative DNA damage. *Free Radic Res*, **29**, 525-39.
109. Shigenaga, M.K., Aboujaoude, E.N., Chen, Q. and Ames, B.N. (1994) Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol*, **234**, 16-33.
110. Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C. and Wu, J.T. (2003) Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta*, **334**, 87-94.
111. Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys*, **423**, 57-65.

112. OECD (2002) Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis*, **23**, 2129-33.
113. OECD (2003) Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1089-99.
114. Gedik, C.M. and Collins, A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *Faseb J*, **19**, 82-4.
115. Bichler, J., Cavin, C., Simic, T., Chakraborty, A., Ferk, F., Hoelzl, C., Schulte-Hermann, R., Kundi, M., Haidinger, G., Angelis, K. and Knasmüller, S. (2007) Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem Toxicol*, **45**, 1428-36.
116. Hoelzl, C., Glatt, H., Meinel, W., Sontag, G., Haidinger, G., Kundi, M., Simic, T., Chakraborty, A., Bichler, J., Ferk, F., Angelis, K., Nersesyan, A. and Knasmüller, S. (2008) Consumption of Brussels sprouts protects peripheral human lymphocytes against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and oxidative DNA-damage: results of a controlled human intervention trial. *Mol Nutr Food Res*, **52**, 330-41.
117. Ferk, F., Chakraborty, A., Simic, T., Kundi, M. and Knasmüller, S. (2006) Antioxidant and free radical scavenging activities of sumac (*Rhus coriaria*) and identification of gallic acid as its active principle. In Schulte-Herman, R. (ed.), *12th Scientific Symposium of the Austrian Pharmacological Society (APHAR). Joint Meeting with the Austrian Society for Toxicology (ASTOX)*, Vienna, Austria, pp. 11.
118. Akturk, O., Demirin, H., Sutcu, R., Yilmaz, N., Koylu, H. and Altuntas, I. (2006) The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat heart and ameliorating role of vitamin E and vitamin C. *Cell Biol Toxicol*, **22**, 455-61.

119. Sun, J. and Tower, J. (1999) FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol*, **19**, 216-28.
120. Hoelzl, C., Bichler, J., Ferk, F., Simic, T., Nersesyan, A., Elbling, L., Ehrlich, V., Chakraborty, A. and Knasmüller, S. (2005) Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. *J Physiol Pharmacol*, **56 Suppl 2**, 49-64.
121. Li, N., Jia, X., Chen, C.Y., Blumberg, J.B., Song, Y., Zhang, W., Zhang, X., Ma, G. and Chen, J. (2007) Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid peroxidation in male smokers. *J Nutr*, **137**, 2717-22.
122. Ferk, F., Chakraborty, A., Simic, T., Kundi, M. and Knasmüller, S. (2007) DNA-protective and anticarcinogenic effects of gallic acid., *The 9th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis*, Jeju Island, South Korea.
123. Chu, F.F., Esworthy, R.S. and Doroshov, J.H. (2004) Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1481-95.
124. Cavin, C., Marin-Kuan, M., Langouet, S., Bezencon, C., Guignard, G., Verguet, C., Piguet, D., Holzhauser, D., Cornaz, R. and Schilter, B. (2008) Induction of Nrf2-mediated cellular defenses and alteration of phase I activities as mechanisms of chemoprotective effects of coffee in the liver. *Food Chem Toxicol*, **46**, 1239-48.
125. Higgins, L.G., Cavin, C., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. (2008) Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol*, **226**, 328-37.
126. Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D. and Lee, M.J. (2008) Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res*, **52 Suppl 1**, S139-51.
127. Briviba, K., Bub, A., Moseneder, J., Schwerdtle, T., Hartwig, A., Kulling, S. and Watzl, B. (2008) No differences in DNA damage and antioxidant capacity bet-

- ween intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr Cancer*, **60**, 164-70.
128. Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.P., Kulling, S., Rufer, C., Johannes, C. and Janzowski, C. (2006) An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J*, **1**, 388-97.
 129. Collins, B.H., Horska, A., Hotten, P.M., Riddoch, C. and Collins, A.R. (2001) Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer*, **39**, 148-53.
 130. Angerer, J., Ewers, U. and Wilhelm, M. (2007) Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*, **210**, 201-28.
 131. Moller, P. (2006) Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res*, **612**, 84-104.
 132. Berwick, M. and Vineis, P. (2005) Measuring DNA repair capacity: small steps. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 84-5.
 133. Moller, P., Knudsen, L.E., Loft, S. and Wallin, H. (2000) The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 1005-15.
 134. Verschaeve, L., Koppen, G., Gorp, U.V., Schoeters, G., Jacobs, G. and Zwijsen, C. (2007) Seasonal variations in spontaneous levels of DNA damage; implication in the risk assessment of environmental chemicals. *J Appl Toxicol*, **27**, 612-20.
 135. Giovannelli, L., Saieva, C., Masala, G., Testa, G., Salvini, S., Pitozzi, V., Riboli, E., Dolaro, P. and Palli, D. (2002) Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis*, **23**, 1483-9.
 136. Frenzilli, G., Betti, C., Davini, T., Desideri, M., Fornai, E., Giannessi, L., Maggiorini, F., Paoletti, P. and Barale, R. (1997) Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res*, **375**, 117-23.
 137. Zeljezic, D., Vrdoljak, A.L., Radic, B., Fuchs, N., Berend, S., Orescanin, V. and Kopjar, N. (2007) Comparative evaluation of acetylcholinesterase status and ge-

- nome damage in blood cells of industrial workers exposed to carbofuran. *Food Chem Toxicol*, **45**, 2488-98.
138. Mastaloudis, A., Yu, T.W., O'Donnell, R.P., Frei, B., Dashwood, R.H. and Tra-ber, M.G. (2004) Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*, **36**, 966-75.
 139. <http://www.kaffeeverband.de> and Zugriff: 08.09.2008.
 140. <http://www.ico.org> and Zugriff: 21.09.2008.
 141. <http://www.kaffeeverband.de> and Zugriff: 28.10.2008.
 142. MacMahon, B., Yen, S., Trichopoulos, D., Warren, K. and Nardi, G. (1981) Coffee and cancer of the pancreas. *N Engl J Med*, **304**, 630-3.
 143. Stocks, P. (1970) Cancer mortality in relation to national consumption of cigarettes, solid fuel, tea and coffee. *Br J Cancer*, **24**, 215-25.
 144. IARC, W.H.O. (1991) Coffee. In International Agency for Research on Cancer, W.H.O. (ed.), *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Coffee, tea, mate, methylxanthines and Methylglyoxal* IARC, Lyon, vol. 51, pp. 41-259.
 145. Fujioka, K. and Shibamoto, T. (2006) Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, **54**, 6054-8.
 146. Lopez-Galilea, I., De Pena, M.P. and Cid, C. (2007) Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. *J Agric Food Chem*, **55**, 6110-7.
 147. Gomez-Ruiz, J.A., Leake, D.S. and Ames, J.M. (2007) In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem*, **55**, 6962-9.
 148. Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M. and Scaccini, C. (1995) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med*, **19**, 541-52.
 149. Nardini, M., Pisu, P., Gentili, V., Natella, F., Di Felice, M., Piccolella, E. and Scaccini, C. (1998) Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med*, **25**, 1098-105.

150. Cavin, C., Holzhaeuser, D., Scharf, G., Constable, A., Huber, W.W. and Schilter, B. (2002) Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem Toxicol*, **40**, 1155-63.
151. Corrao, G., Zambon, A., Bagnardi, V., D'Amicis, A. and Klatsky, A. (2001) Coffee, caffeine, and the risk of liver cirrhosis. *Ann Epidemiol*, **11**, 458-65.
152. Gallus, S., Tavani, A., Negri, E. and La Vecchia, C. (2002) Does coffee protect against liver cirrhosis. *Ann Epidemiol*, **12**, 202-205.
153. Giovannucci, E. (1998) Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am J Epidemiol*, **147**, 1043-52.
154. Gelatti, U., Covolo, L., Franceschini, M., Pirali, F., Tagger, A., Ribero, M.L., Trevisi, P., Martelli, C., Nardi, G. and Donato, F. (2005) Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol*, **42**, 528-34.
155. Inoue, M., Yoshimi, I., Sobue, T. and Tsugane, S. (2005) Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 293-300.
156. Rosengren, A., Dotevall, A., Wilhelmsen, L., Thelle, D. and Johansson, S. (2004) Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: a prospective 18-year follow-up study. *J Intern Med*, **255**, 89-95.
157. Salazar-Martinez, E., Willett, W.C., Ascherio, A., Manson, J.E., Leitzmann, M.F., Stampfer, M.J. and Hu, F.B. (2004) Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, **140**, 1-8.
158. van Dam, R.M. and Feskens, E.J. (2002) Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, **360**, 1477-8.
159. Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F. and Gazzani, G. (2000) In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem*, **48**, 1449-54.
160. Maritsch, F. and Uhl, A. (1989) Kaffee und Tee. In Scheerer, S. and Vogt, I. (eds.), *Drogen und Drogenpolitik*. Campus Verlag, Frankfurt, New York.
161. Bekedam, E.K., Loots, M.J., Schols, H.A., Van Boekel, M.A. and Smit, G. (2008) Roasting effects on formation mechanisms of coffee brew melanoidins. *J Agric Food Chem*, **56**, 7138-45.

162. Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L.C. and Martin, P.R. (2005) Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J Agric Food Chem*, **53**, 1505-13.
163. Gross, G., Jaccaud, E. and Huggett, A.C. (1997) Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *Food Chem Toxicol*, **35**, 547-54.
164. Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M. and Sugimura, T. (1985) Characteristics of major mutagenicity of instant coffee. *Mutat Res*, **142**, 145-8.
165. Nagao, M., Fujita, Y., Wakabayashi, K., Nukaya, H., Kosuge, T. and Sugimura, T. (1986) Mutagens in coffee and other beverages. *Environ Health Perspect*, **67**, 89-91.
166. Rinkus, S.J. and Taylor, R.T. (1990) Analysis of hydrogen peroxide in freshly prepared coffees. *Food Chem Toxicol*, **28**, 323-31.
167. Hasegawa, R., Ogiso, T., Imaida, K., Shirai, T. and Ito, N. (1995) Analysis of the Potential Carcinogenicity of Coffee and its Related Compounds in a Medium-term Liver Bioassay of Rats. *J Food Chem Toxicol*, **33**, 15-20.
168. Daglia, M., Racchi, M., Papetti, A., Lanni, C., Govoni, S. and Gazzani, G. (2004) In vitro and ex vivo antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem*, **52**, 1700-4.
169. Stadler, R.H., Turesky, R.J., Muller, O., Markovic, J. and Leong-Morgenthaler, P.M. (1994) The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. *Mutat Res*, **308**, 177-90.
170. Sakamoto, W., Isomura, H., Fujie, K., Nishihira, J., Ozaki, M. and Yukawa, S. (2003) Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats. *Toxicology*, **183**, 255-63.
171. Ozercan, I.H., Dagli, A.F., Ustundag, B., Ozercan, M.R., Bahcecioglu, I.H., Celik, H., Yalniz, M., Poyrazoglu, O.K. and Ataseven, H. (2006) Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄)? *Hepatol Res*, **35**, 163-168.
172. Huber, W.W., Scharf, G., Nagel, G., Prustomersky, S., Schulte-Hermann, R. and Kaina, B. (2003) Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Ca-

- festol increase the activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver--comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutat Res*, **522**, 57-68.
173. Turesky, R.J., Richoz, J., Constable, A., Curtis, K.D., Dingley, K.H. and Turteltaub, K.W. (2003) The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats. *Chem Biol Interact*, **145**, 251-65.
 174. Huber, W.W. and Parzefall, W. (2005) Modification of N-acetyltransferases and glutathione S-transferases by coffee components: possible relevance for cancer risk. *Methods Enzymol*, **401**, 307-41.
 175. McMahon, M., Itoh, K. and Yamamoto, M. (2001) The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes *Cancer Research*, **61**, 3299-3307.
 176. Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Muller, H., Wollowski, I. and Rechkemmer, G. (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, **18**, 1847-50.
 177. Grubben, M.J., Van Den Braak, C.C., Broekhuizen, R., De Jong, R., Van Rijt, L., De Ruijter, E., Peters, W.H., Katan, M.B. and Nagengast, F.M. (2000) The effect of unfiltered coffee on potential biomarkers for colonic cancer risk in healthy volunteers: a randomized trial. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**, 1181-90.
 178. Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Alfthan, G., Virtanen, J.K., Rissanen, T.H., Happonen, P., Nyyssonen, K., Kaikkonen, J., Salonen, R. and Salonen, J.T. (2005) The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: a clinical trial. *Free Radic Biol Med*, **38**, 527-34.
 179. Daglia, M., Cuzzoni, M.T. and Dacarro, C. (1994) Antiradical Activity of Coffee. *J Agric Food Chem*, **42**, 2270-72.
 180. Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A. and Morales, F.J. (2005) Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J Agric Food Chem*, **53**, 7832-6.

181. Chlopčikova, S., Psotova, J., Míketova, P., Soušek, J., Lichnovský, V. and Šímanek, V. (2004) Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytother Res*, **18**, 408-13.
182. Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S. and Mori, H. (2000) Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. *Food Chem Toxicol*, **38**, 467-71.
183. Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I. and Arichi, S. (1985) Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **33**, 2028-34.
184. Tsuchiya, T., Suzuki, O. and Igarashi, K. (1996) Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 765-8.
185. Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U. and Hadi, S.M. (2003) Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*, **9**, BR325-30.
186. Devasagayam, T.P., Kamat, J.P., Mohan, H. and Kesavan, P.C. (1996) Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, **1282**, 63-70.
187. Devasagayam, T.P. and Kesavan, P.C. (1996) Radioprotective and antioxidant action of caffeine: mechanistic considerations. *Indian J Exp Biol*, **34**, 291-7.
188. Farooqi, Z. and Kesavan, P.C. (1992) Radioprotection by caffeine pre- and post-treatment in the bone marrow chromosomes of mice given whole-body gamma-irradiation. *Mutat Res*, **269**, 225-30.
189. Cavin, C., Mace, K., Offord, E.A. and Schilter, B. (2001) Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. *Food Chem Toxicol*, **39**, 549-56.

190. Lee, K.J., Choi, J.H. and Jeong, H.G. (2007) Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol*, **45**, 2118-25.
191. Bhat, S.H., Azmi, A.S. and Hadi, S.M. (2007) Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties. *Toxicol Appl Pharmacol*, **218**, 249-55.
192. Borrelli, R.C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M. and Fogliano, V. (2002) Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J Agric Food Chem*, **50**, 6527-33.
193. Goya, L., Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J.A., Bravo, L. and Morales, F.J. (2007) Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol Nutr Food Res*, **51**, 536-45.
194. Morales, F.J. and Babbel, M.B. (2002) Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in a hydrophilic media. *J Agric Food Chem*, **50**, 2788-92.
195. Morales, F.J. and Babbel, M.B. (2002) Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. *J Agric Food Chem*, **50**, 4657-61.
196. Simic, A., Manojlovic, D., Segan, D. and Todorovic, M. (2007) Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, **12**, 2327-40.
197. Hirakawa, N., Okauchi, R., Miura, Y. and Yagasaki, K. (2005) Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**, 653-8.
198. Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grunert-Fuchs, M. and Speit, G. (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis*, **9**, 269-72.
199. Palazzetti, S., Richard, M.J., Favier, A. and Margaritis, I. (2003) Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Canadian Journal of Applied Physiology-Revue Canadienne De Physiologie Appliquee*, **28**, 588-604.
200. Lindl, T. and Bauer, J. (1994) *Zell- und Gewebekultur*, Stuttgart, Jena, New York.

201. Roberts, L.J. and Morrow, J.D. (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*, **28**, 505-13.
202. Il'yasova, D., Morrow, J.D., Ivanova, A. and Wagenknecht, L.E. (2004) Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane. *Ann Epidemiol*, **14**, 793-7.
203. Kroll, M.H., Chesler, R., Hagengruber, C., Blank, D.W., Kestner, J. and Rawe, M. (1986) Automated determination of urinary creatinine without sample dilution: theory and practice. *Clin Chem*, **32**, 446-52.
204. Fischer, M.A., Gransier, T.J., Beckers, L.M., Beckers, O., Bast, A. and Haenen, G.R. (2005) Determination of the antioxidant capacity in blood. *Clin Chem Lab Med*, **43**, 735-740.
205. Holvoet, P., Donck, J., Landeloos, M., Brouwers, E., Luijckens, K., Arnout, J., Lesaffre, E., Vanrenterghem, Y. and Collen, D. (1996) Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost*, **76**, 663-9.
206. Gunzler, W.A., Kremers, H. and Flohe, L. (1974) An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem*, **12**, 444-8.
207. Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **247**, 3170-5.
208. Löhr, G.W. and Waller, H.D. (1978) Glucose-6-phosphatase Dehydrogenase, In: "Methods of Enzymatic Analysis", Bergmeyer H.U. (ed.), 2nd English ed., Verlag Chemie Weinheim and Academic Press Inc., New York and London, 4 vols, pp 636.
209. Fabian, E. and Elmadfa, I. (2007) The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and anti-oxidant parameters in plasma of young healthy women. *Int J Vitam Nutr Res*, **77**, 79-88.
210. Gokirmak, M., Yildirim, Z., Canan Hasanoglu, H., Koksall, N. and Mehmet, N. (2003) The role of oxidative stress in bronchoconstriction due to occupational sulfur dioxide exposure. *Clin Chim Acta*, **331**, 119-26.

211. Lutoslawska, G., Tkaczyk, J., Panczenko-Kresowska, B., Hubner-Wozniak, E., Skierska, E. and Gajewski, A.K. (2003) Plasma TBARS, blood GSH concentrations, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in regularly menstruating women with ovulatory and anovulatory menstrual cycles. *Clin Chim Acta*, **331**, 159-63.
212. Yukawa, G.S., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X.M., Iwahashi, H. and Sakamoto, W. (2004) Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry (Mosc)*, **69**, 70-4.
213. Atteritano, M., Pernice, F., Mazzaferro, S., Mantuano, S., Frisina, A., D'Anna, R., Cannata, M.L., Bitto, A., Squadrito, F., Frisina, N. and Buemi, M. (2008) Effects of phytoestrogen genistein on cytogenetic biomarkers in postmenopausal women: 1 year randomized, placebo-controlled study. *Eur J Pharmacol*, **589**, 22-6.
214. Thompson, H.J., Heimendinger, J., Haegele, A., Sedlacek, S.M., Gillette, C., O'Neill, C., Wolfe, P. and Conry, C. (1999) Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, **20**, 2261-6.
215. Bayir, H., Marion, D.W., Puccio, A.M., Wisniewski, S.R., Janesko, K.L., Clark, R.S. and Kochanek, P.M. (2004) Marked gender effect on lipid peroxidation after severe traumatic brain injury in adult patients. *J Neurotrauma*, **21**, 1-8.
216. Mori, T.A., Dunstan, D.W., Burke, V., Croft, K.D., Rivera, J.H., Beilin, L.J. and Puddey, I.B. (1999) Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, **48**, 1402-8.
217. Ward, N.C., Hodgson, J.M., Puddey, I.B., Mori, T.A., Beilin, L.J. and Croft, K.D. (2004) Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radic Biol Med*, **36**, 226-32.
218. Sakamoto, W., Isomura, H., Fujie, K., Takahashi, K., Nakao, K. and Izumi, H. (2005) Relationship of coffee consumption with risk factors of atherosclerosis in rats. *Ann Nutr Metab*, **49**, 149-54.

219. Holt, S., Marley, R., Fernando, B., Harry, D., Anand, R., Goodier, D. and Moore, K. (1999) Acute cholestasis-induced renal failure: effects of antioxidants and ligands for the thromboxane A2 receptor. *Kidney Int*, **55**, 271-7.
220. Leo, M.A., Aleynik, S.I., Siegel, J.H., Kasmin, F.E., Aleynik, M.K. and Lieber, C.S. (1997) F2-isoprostane and 4-hydroxynonenal excretion in human bile of patients with biliary tract and pancreatic disorders. *Am J Gastroenterol*, **92**, 2069-72.
221. Gopaul, N.K., Anggard, E.E., Mallet, A.I., Betteridge, D.J., Wolff, S.P. and Nourooz-Zadeh, J. (1995) Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, **368**, 225-9.
222. Dworski, R., Murray, J.J., Roberts, L.J., 2nd, Oates, J.A., Morrow, J.D., Fisher, L. and Sheller, J.R. (1999) Allergen-induced synthesis of F(2)-isoprostanes in atopic asthmatics. Evidence for oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*, **160**, 1947-51.
223. Pratico, D., V, M.Y.L., Trojanowski, J.Q., Rokach, J. and Fitzgerald, G.A. (1998) Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J*, **12**, 1777-83.
224. Comporti, M., Signorini, C., Arezzini, B., Vecchio, D., Monaco, B. and Gardi, C. (2008) F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **44**, 247-56.
225. Sanchez-Moreno, C., Cano, M.P., de Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Grana-do, F. and Martin, A. (2006) Mediterranean vegetable soup consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes, prostaglandin E2 and monocyte chemotactic protein-1 in healthy humans. *J Nutr Biochem*, **17**, 183-9.
226. Riso, P., Visioli, F., Grande, S., Guarnieri, S., Gardana, C., Simonetti, P. and Porrini, M. (2006) Effect of a tomato-based drink on markers of inflammation, immunomodulation, and oxidative stress. *J Agric Food Chem*, **54**, 2563-6.
227. McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Morrow, J.D., Khardouni, D., Shooter, L., Monk, J., Gross, S. and Brown, V. (2005) Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers. *Free Radic Res*, **39**, 1241-8.

228. Ryan-Borchers, T.A., Park, J.S., Chew, B.P., McGuire, M.K., Fournier, L.R. and Beerman, K.A. (2006) Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **83**, 1118-25.
229. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, **26**, 1231-1237.
230. Van Den Berg, R., Haenen, G., Van Den Berg, H. and Bast, A. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, **66**, 511-517.
231. Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M. and Rice-Evans, C.A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, **384**, 240-2.
232. Moller, P., Vogel, U., Pedersen, A., Dragsted, L.O., Sandstrom, B. and Loft, S. (2003) No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 1016-22.
233. Stadler, R.H. (2001) The use of chemical markers and model studies to assess the in vitro pro- and antioxidative properties of methylxanthine-rich beverages. *Food Reviews International*, **17**, 385-418.
234. Shi, X., Dalal, N.S. and Jain, A.C. (1991) Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol*, **29**, 1-6.
235. Tubaro, F., Micossi, E. and Ursini, F. (1996) The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **73**, 173-9.
236. Garsetti, M., Pellegrini, N., Baggio, C. and Brighenti, F. (2000) Antioxidant activity in human faeces. *Br J Nutr*, **84**, 705-10.
237. Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P.L. and Testolin, G. (2005) Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem*, **16**, 144-9.
238. Wilms, L.C., Hollman, P.C., Boots, A.W. and Kleinjans, J.C. (2005) Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA

- damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res*, **582**, 155-62.
239. http://www.diagenics.co.uk/documents_mercodia-10114301.pdf and Zugriff: 30.10.2008.
 240. Natella, F., Nardini, M., Belelli, F. and Scaccini, C. (2007) Coffee drinking induces incorporation of phenolic acids into LDL and increases the resistance of LDL to ex vivo oxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, **86**, 604-9.
 241. Richelle, M., Tavazzi, I. and Offord, E. (2001) Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem*, **49**, 3438-42.
 242. Gunduc, N. and El, S.N. (2003) Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common turkish food and drinks in in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J Food Sci*, **68**, 2591-5.
 243. Gomez-Ruiz, J.A. and Ames, J.M. (2008) Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *Eur Food Res Technol*, **227**, 1017-24.
 244. Dittrich, R., El-Massry, F., Kunz, K., Rinaldi, F., Peich, C.C., Beckmann, M.W. and Pischetsrieder, M. (2003) Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *J Agric Food Chem*, **51**, 3900-4.
 245. Lee, C. (2000) Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta*, **295**, 141-54.
 246. Yamanaka, N., Oda, O. and Nagao, S. (1997) Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett*, **405**, 186-90.
 247. Bonati, M., Latini, R., Tognoni, G., Young, J.F. and Garattini, S. (1984) Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab Rev*, **15**, 1355-83.
 248. Burg, A.W. and Werner, E. (1972) Tissue distribution of caffeine and its metabolites in the mouse. *Biochem Pharmacol*, **21**, 923-36.
 249. Wani, A.A., Rangrez, A.Y., Kumar, H., Bapat, S.A., Suresh, C.G., Barnabas, S., Patole, M.S. and Shouche, Y.S. (2008) Analysis of reactive oxygen species and

antioxidant defenses in complex I deficient patients revealed a specific increase in superoxide dismutase activity. *Free Radic Res*, **42**, 415-27.

250. Saroja, M., Balasenthil, S., Ramachandran, C.R. and Nagini, S. (2001) Coffee enhances the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinomas. *Oral Oncol*, **37**, 172-6.
251. Monteiro, M., Farah, A., Perrone, D., Trugo, L.C. and Donangelo, C. (2007) Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr*, **137**, 2196-201.
252. Dragsted, L.O., Krath, B., Ravn-Haren, G., Vogel, U.B., Vinggaard, A.M., Bo Jensen, P., Loft, S., Rasmussen, S.E., Sandstrom, T.B. and Pedersen, A. (2006) Biological effects of fruit and vegetables. *Proc Nutr Soc*, **65**, 61-7.
253. Srinivasan, M., Rajendra Prasad, N. and Menon, V.P. (2006) Protective effect of curcumin on gamma-radiation induced DNA damage and lipid peroxidation in cultured human lymphocytes. *Mutat Res*, **611**, 96-103.
254. Bartkowiak, A., Lipecka, K. and Daniszewska, K. (1990) Effect of superoxide dismutase on the number of chromosome aberrations in lymphocytes after irradiation of human blood preparations. *Med Pr*, **41**, 225-9.
255. Checkoway, H., Costa, L.G., Woods, J.S., Castoldi, A.F., Lund, B.O. and Swanson, P.D. (1992) Peripheral blood cell activities of monoamine oxidase B and superoxide dismutase in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, **4**, 283-90.
256. Itagaki, S.K., Kobayashi, T., Kitagawa, Y., Iwata, S., Suwa, Y., Nukaya, H. and Tsuji, K. (1992) Cytotoxicity of coffee in human intestinal-cells invitro and its inhibition by peroxidase *Toxicology and in vitro*, **6**, 417-421.
257. Jung, U.J., Lee, M.K., Park, Y.B., Jeon, S.M. and Choi, M.S. (2006) Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **318**, 476-83.
258. Nardini, M., Natella, F., Gentili, V., Di Felice, M. and Scaccini, C. (1997) Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. *Arch Biochem Biophys*, **342**, 157-60.

259. Soini, Y., Kaarteenaho-Wiik, R., Paakko, P. and Kinnula, V. (2003) Expression of antioxidant enzymes in bronchial metaplastic and dysplastic epithelium. *Lung Cancer*, **39**, 15-22.
260. Wenzel, U., Herzog, A., Kuntz, S. and Daniel, H. (2004) Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics*, **4**, 2160-74.
261. Montuschi, P., Barnes, P.J. and Roberts, L.J., 2nd (2004) Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*, **18**, 1791-800.
262. Schulte-Hermann, R., Marian, B., Bursch, W. and Grasl-Kraupp, B. (2004) Tumorpromotion. In Marquardt, H. and Schaefer, S.G. (eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, vol. 2. Auflage, pp. 195-242.
263. Na, H.-K., Kundu, J.K. and Surh, Y.-J. (2009, in press) Antioxidant, Antiinflammatory and Anticarcinogenic Effects of Ginger and Its Ingredients. In Knasmueller, S., DeMarini, D.M., Johnson, I.T. and Gerhaeuser, C. (eds.), *Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors*. Wiley VCH.
264. Steinkellner, H., Hoelzl, C., Uhl, M., Cavin, C., Haidinger, G., Gsur, A., Schmid, R., Kundi, M., Bichler, J. and Knasmuller, S. (2005) Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: results of controlled human intervention trials. *Mutat Res*, **591**, 264-75.

10 Appendix

Tabelle 12 Ergebnisse der Malondialdehyd Bestimmungen in humanem Plasma¹

ID	Werte T0	Werte T1	Werte T2
01	2,85	1,42	2,52
02	3,29	2,00	1,08
03	1,86	3,29	1,14
04	3,57	3,84	2,68
05	2,53	3,22	3,27
06	3,83	3,41	6,28
07	3,18	3,15	5,66
08	2,85	4,01	3,50
09	2,48	1,33	2,98
10	2,07	2,03	1,90
11	2,58	2,14	1,73
12	4,26	4,02	3,69
13	0,70	3,90	2,07
14	5,93	1,40	3,35
15	2,79	3,07	2,28
16	3,11	3,52	3,31
17	3,72	2,07	2,42
18	6,08	3,07	4,35
19	0,86	1,47	3,11
20	2,34	4,74	2,81
21	2,26	1,81	1,99
22	2,86	2,83	1,71
23	3,33	3,25	2,88
24	k.P. ²	3,14	3,75
25	1,68	1,34	1,72
26	1,09	2,81	1,20
27	2,56	1,12	2,53
28	2,97	2,50	2,65
29	2,96	2,43	3,00
30	2,84	2,73	3,59
31	4,79	4,00	3,51
32	4,67	3,40	3,39
33	4,58	2,28	4,55
34	1,88	1,49	2,06
35	4,96	2,33	4,47
36	4,60	3,47	4,74
37	3,18	3,52	4,60
38	1,70	1,96	2,50
39	5,12	5,03	3,35
40	3,28	2,19	1,98

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 37) beschrieben ermittelt und geben die MDA Konzentrationen in $\mu\text{M}/\text{L}$ an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probenahme (siehe Abbildung 11, Seite 33). ² k.P. bedeutet dass kein Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 13 Ergebnisse der Isoprostankonzentrationen im Harn

ID	Werte T0	Werte T1	Werte T2
01	6,02	1,72	1,42
02	1,69	2,23	16,03
03	1,45	1,82	3,47
04	2,49	3,60	1,11
05	2,24	4,37	2,64
06	2,99	2,37	2,00
07	2,19	4,57	5,65
08	4,44	4,74	3,76
09	4,11	2,11	4,09
10	1,97	0,96	3,23
11	5,44	5,87	7,24
12	11,37	2,20	6,54
13	2,28	2,83	3,38
14	2,65	5,57	1,55
15	2,22	2,50	2,45
16	2,81	2,21	1,22
17	3,56	2,79	3,06
18	2,96	2,42	2,71
19	2,86	2,31	12,06
20	3,36	3,33	3,87
21	1,12	3,12	1,55
22	4,18	3,05	3,40
23	3,52	3,29	2,67
24	6,08	2,06	5,10
25	1,07	1,27	1,10
26	2,49	2,08	2,92
27	3,93	3,74	7,00
28	1,05	2,43	1,57
29	0,21	4,68	4,51
30	1,54	3,45	2,40
31	1,68	2,31	1,27
32	4,59	5,02	4,20
33	2,08	3,36	3,61
34	2,18	3,25	3,37
35	3,38	2,51	2,32
36	3,23	2,88	2,40
37	10,65	10,92	14,65
38	0,22	0,34	0,21
39	2,16	0,50	1,58
40	1,04	2,47	1,34

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 38) beschrieben ermittelt und geben die Konzentrationen von Isoprostanen in ng/ mg Kreatinin an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probennahme (siehe Abbildung 11, Seite 33).

Tabelle 14 Ergebnisse der Messung der „Gesamten antioxidativen Kapazität“ im Plasma

ID	Werte T0¹	Werte T1²	Werte T2³
01	0,70	0,74	0,73
02	1,05	0,83	0,78
03	0,76	0,75	0,60
04	0,88	0,97	0,81
05	0,90	0,95	0,95
06	0,98	0,92	0,91
07	0,90	0,90	0,91
08	0,91	0,91	0,94
09	0,87	0,79	0,82
10	0,78	0,86	0,76
11	0,97	0,95	0,84
12	0,84	0,92	0,89
13	1,06	1,11	0,86
14	0,97	0,89	0,95
15	0,83	0,74	0,79
16	0,97	0,95	0,97
17	1,04	0,95	1,02
18	0,91	0,81	0,92
19	0,77	0,78	0,75
20	0,90	0,91	0,84
21	0,94	0,92	0,87
22	0,77	0,83	0,80
23	0,95	0,97	0,89
24	k.P. ²	1,00	0,86
25	0,72	0,72	0,80
26	0,93	1,09	1,01
27	0,94	0,84	0,91
28	0,88	0,75	0,88
29	1,13	1,07	0,94
30	1,06	0,80	1,11
31	1,11	1,10	1,25
32	1,01	1,00	0,91
33	0,84	0,91	0,84
34	0,92	0,98	0,83
35	0,95	0,88	0,85
36	0,89	0,91	0,91
37	0,95	0,84	0,90
38	0,75	0,82	0,83
39	0,73	0,72	0,88
40	0,80	0,85	0,85

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 39) beschrieben ermittelt und geben die Gesamte antioxidative Kapazität in mM TEAC an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probennahme (siehe Abb.11, Seite 33). ² k.P. bedeutet, dass kein Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 15 Ergebnisse der Bestimmungen von oxidiertem LDL im Plasma

ID	Werte T0	Werte T1	Werte T2
01	101,6	218,8	110,4
02	20,7	99,6	104,6
03	81,2	82,0	85,97
04	114,7	99,9	86,0
05	119,2	124,7	126,4
06	132,8	153,6	147,7
07	116,0	115,8	118,2
08	91,0	73,9	58,5
09	64,6	79,9	75,4
10	46,6	51,9	44,6
11	76,7	89,5	93,9
12	109,3	139,3	113,6
13	89,8	71,2	64,4
14	101,1	159,6	100,1
15	79,8	79,7	66,8
16	111,3	104,3	131,2
17	115,7	109,8	113,5
18	146,7	150,4	148,9
19	70,4	68,9	66,3
20	125,7	90,6	88,7
21	75,7	72,3	62,96
22	88,6	96,0	85,3
23	41,6	42,3	54,0
24	k.P. ²	104,2	72,5
25	58,0	82,3	65,2
26	131,0	117,0	126,3
27	101,9	90,1	94,1
28	86,8	82,0	74,2
29	122,0	116,3	109,1
30	110,0	117,9	133,3
31	112,3	117,8	166,1
32	127,8	101,2	111,9
33	103,2	70,0	78,5
34	100,7	77,3	71,1
35	136,6	106,5	96,6
36	74,1	69,6	76,1
37	128,7	113,1	106,5
38	101,5	77,2	56,1
39	82,5	65,8	72,8
40	86,4	60,2	71,8

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 40) beschrieben ermittelt und geben die Konzentrationen von ox-LDL in U/ L an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probennahme (siehe Abb.11, Seite 33). ² k.P. bedeutet, dass kein Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 16 Ergebnisse der spezifischen Aktivitäten der Gluthathionperoxidase in den zytosolischen Fraktionen peripherer Lymphozyten

ID	Werte T0	Werte T1	Werte T2
01	0,426	0,447	0,342
02	0,304	0,338	0,339
03	0,366	0,316	0,287
04	0,643	0,574	0,441
05	0,534	0,560	0,262
06	0,394	0,459	0,602
07	0,683	0,429	0,448
08	0,780	0,364	0,436
09	0,987	0,558	0,481
10	0,599	0,434	0,499
11	1,141	1,242	1,063
12	0,591	0,560	0,853
13	0,516	0,382	0,427
14	0,590	0,497	0,373
15	0,509	0,443	0,562
16	0,602	0,496	0,469
17	0,464	0,569	0,321
18	0,768	0,953	1,102
19	0,694	0,573	0,942
20	0,687	0,241	0,490
21	0,193	0,440	1,441
22	0,960	0,236	0,528
23	0,689	0,167	0,206
24	k.P. ²	0,439	0,539
25	0,835	0,524	0,460
26	0,460	0,426	0,190
27	0,375	0,379	0,434
28	0,456	0,328	0,409
29	0,570	0,476	0,536
30	0,358	0,445	0,375
31	0,406	0,366	0,501
32	0,343	0,391	0,469
33	0,876	0,966	0,832
34	0,333	0,315	0,568
35	0,623	1,180	0,915
36	0,768	0,758	0,704
37	0,690	0,700	0,601
38	0,810	0,704	0,552
39	0,851	0,947	0,822
40	0,818	0,777	0,801

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 41) beschrieben ermittelt und geben die Aktivitäten von GSH-Px in U/ mg Protein an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probenahme (siehe Abb.11, Seite 33). ² k.P. bedeutet, dass kein Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 17 Ergebnisse der Superoxiddismutaseaktivitäten in zytosolischen Fraktionen von peripheren Lymphozyten

ID	Werte T0	Werte T1	Werte T2
01	5,18	5,50	5,48
02	4,81	3,24	6,73
03	4,44	4,96	4,63
04	6,22	7,10	8,05
05	6,20	8,66	8,12
06	4,93	7,96	7,36
07	5,27	8,27	8,85
08	7,00	7,24	8,18
09	7,95	6,36	4,78
10	4,13	3,90	4,30
11	4,68	3,74	4,54
12	4,77	4,97	5,81
13	6,16	5,54	5,83
14	8,54	4,63	4,62
15	6,03	5,44	4,01
16	3,95	3,44	4,27
17	5,17	5,89	3,71
18	4,28	3,74	4,69
19	3,62	3,71	4,44
20	4,22	5,84	3,21
21	3,02	2,45	3,30
22	4,54	2,56	3,21
23	3,31	3,27	3,41
24	k.P. ²	3,01	2,52
25	4,62	4,33	6,13
26	6,08	3,72	2,52
27	3,34	3,86	4,39
28	3,91	3,19	4,59
29	3,02	2,83	3,35
30	4,46	3,56	4,24
31	3,59	3,55	4,73
32	3,46	2,71	3,96
33	3,91	2,36	2,87
34	3,27	3,42	2,96
35	2,36	3,76	5,30
36	2,48	2,17	2,69
37	3,39	4,77	5,63
38	4,07	3,09	2,80
39	3,04	2,58	2,39
40	3,43	2,44	2,94

¹ Die Werte wurden wie im Material und Methodenteil (Seite 43) beschrieben ermittelt und geben die Aktivitäten von SOD in U/ mg Protein an. T0, T1 und T2 beschreiben die jeweiligen Zeitpunkte der Probenahme (siehe Abb.11, Seite 33). ² k.P. bedeutet, dass kein Probenmaterial vorhanden war.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Beate Viktoria Moser

Geburtsdatum: 10.06.1984

Geburtsort: Melk

Familienstand: ledig

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

1998-2002	Stiftsgymnasium Melk ORG mit BGW, Melk
09/2002 - 05/2003	Studium der medizinischen und pharmazeutischen Biotechnologie an der Fachhochschule IMC Krems
ab 10/2003	Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien Schwerpunkt: Lebensmittelproduktion und -technologie
ab 09/2007	Diplomarbeit am Department für Ernährungswissenschaften, Fakultät für Lebenswissenschaften und am Institut für Krebsforschung, Univ. Klinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität Wien, Arbeitsgruppe Umwelttoxikologie und Prävention.

Berufliche Praxis

08/2006	Mitarbeit im Golfrestaurant Maria Taferl in der Lebensmittelverarbeitung und -ausgabe
09/2006	Praktikum im Zentrallabor des Landesklinikum Mostviertel Melk
ab 06/2007	wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Krebsforschung in der Arbeitsgruppe Umwelttoxikologie und Prävention (experimentelle Arbeit, Literaturrecherche, verfassen wissenschaftlicher Arbeiten)
02-03/2008	Auslandsaufenthalt an der Medizinischen Universität in Belgrad (Institut für Biochemie, Leitung: Prof. Dr. Tatjana Simic)
04-10/2008	Im Rahmen der wissenschaftlichen Mitarbeit am Institut für Krebsforschung: Durchführung und Koordinierung einer humanen Interventionsstudie (Einfluss von ausgewählten Nahrungsmitteln auf den antioxidativen Status beim Menschen)