

Humane Interventionsstudie zur biologischen Aktivität von anthocyanreichem Fruchtsaft

- Anschluss zu AiF 17039 N -

| | |
|-----------------------------|---|
| Koordinierung: | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn |
| Forschungsstelle I: | Technische Universität Kaiserslautern Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. Elke Richling |
| Forschungsstelle II: | Universität Wien Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie Prof. Dr. Doris Marko |
| Industriegruppe: | Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF), Bonn |
| | Projektkoordinator: Dipl.-Ing. Mario Dechent Eckes-Granini Group GmbH, Nieder-Olm |
| Laufzeit: | 2014 – 2016 |
| Zuwendungssumme: | € 326.500,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI) |

Ausgangssituation:

Bei der Pathogenese von chronischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2, Parkinson, Lebererkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen, wurde als eine der Ursachen eine erhöhte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt. Zu ROS zählen freie Radikale, wie das Hydroxyl- und Superoxid-anion-Radikal, aber auch neutrale Moleküle, wie Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Diese Moleküle sind in der Lage, direkt oder indirekt zelluläre Bestandteile, wie Lipide, DNA oder Proteine, zu schädigen und haben daher adverse Effekte für den Organismus. Durch das Abfangen von Radikalen, durch Inaktivierung redoxaktiver Übergangsmetalle oder durch Modulation der Zellantwort via redoxsensitiver Signalwege und der Bildung nachgeschalteter, antioxidativ wirksamer Enzyme können Antioxidantien ROS reduzieren.

Ein Schlüsselfaktor in der intrazellulären Abwehr von ROS ist der Transkriptionsfaktor Nrf2 (NF-E2 related factor-2). In inaktiver Form liegt Nrf2 im Zytosol als an Aktin-verankertes Keap-1 gebunden vor. Durch Einwirken von ROS oder

SH-reaktiven Verbindungen wird diese Interaktion gelöst, Nrf2 transloziert in den Nukleus und bindet dort zusammen mit small-Maf-Proteinen (sMaf) als Transkriptionsfaktor an das ARE (antioxidant responsive elements) verschiedener Gene, die beispielsweise für zentrale Enzyme des Phase-II-Metabolismus kodieren oder aber die Transkription von Nrf2 selbst initiieren. ARE-abhängige Gene kodieren beispielsweise für die Enzyme Glutathion-S-Transferase, NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase-1 (NQO-1), UDP-Glucuronyltransferase, γ -Glutamylcysteinyl-ligase sowie die Hämoxigenase-1 (HO-1).

Bekannt ist, dass zahlreiche Polyphenole aus Früchten biologische Wirkungen besitzen. Zur Substanzklasse der Polyphenole zählen auch die Anthocyane, die für die rote Färbung von Früchten, wie Trauben, Johannisbeeren, Kirschen und Heidelbeeren, verantwortlich sind. Sie zeigen antioxidative, antiinflammatorische und chemopräventive Eigenschaften und sind mit gesundheitlich positiven Aspekten assoziiert. Die antioxidative Wirksamkeit verschiedener anthocyanhaltiger Fruchtsäfte wurde bereits in einigen Humanstudien mit Probanden gezeigt.

In einem abgeschlossenen IGF-Projekt (AiF 17039 N, 2011-2013) konnte im Rahmen einer Interventionsstudie an Probanden mit gesundem Gastrointestinaltrakt und Ileostomieprobanden (mit künstlichem Darmausgang) gezeigt werden, dass es innerhalb von 8 Stunden nach Aufnahme eines Heidelbeerextraktes (HBE) zu einer Modulation des ARE/Nrf2-Signalwegs sowie zur Reduktion von DNA-Strangbrüchen im Vollblut kam. Unbeantwortet blieb die Frage, ob dieser Effekt als Langzeiteffekt (> 8 Stunden) durch kontinuierlichen Konsum anthocyanreicher Säfte anhält. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die mit einem HBE erzielten Ergebnisse auf kommerziell erhältliche anthocyanreiche Säfte übertragen werden können.

Ein Hauptziel des vorliegenden Forschungsvorhabens AiF 18068 N war es, die biologische Aktivität von anthocyanreichem Fruchtsaft an Menschen zu untersuchen. Die zentrale Frage, die im ersten Abschnitt des Projekts in vivo adressiert wurde, war, ob die biologische Aktivität von anthocyanreichem Heidelbeerextrakt (IGF-Vorhaben AiF 17039 N) auf kommerziell erhältliche Produkte, wie Fruchtsäfte, übertragbar ist und ob eine gleichbleibende oder verbesserte chemopräventive Wirkung im Organismus erreicht werden kann. Ziel war es, im Rahmen einer Kurzzeitinterventionsstudie mit Fruchtsäften die Hypothese einer Reduzierung oxidativer DNA-Schäden (Hauptzielparameter) durch Aktivierung der Nrf2/ARE-vermittelten antioxidativen Abwehr (Nebenzielparame-ter) zu verifizieren und ein geeignetes Produkt für die im Anschluss durchgeführte Langzeitintervention zu identifizieren. Folgende Produkte sollten getestet werden: roter Mischfruchtsaft (aus roter Traube, Apfel, Blaubeere, Erdbeere, Preiselbeere, Aronia und Acerola), ein Getränk mit Traubenschalenextrakt und ein Heidelbeersaft in zwei unterschiedlichen Konzentrationen mit identischen Brix-Werten und Zuckermengen.

Im zweiten Abschnitt des Projektes sollten im Rahmen einer achtwöchigen Intervention mit einem ausgewählten Fruchtsaft bisher noch nicht bekannte Langzeiteffekte (bisheriger Beobachtungszeitraum: 8 h) bezüglich chemopräventiver Eigenschaften untersucht werden.

Forschungsergebnis:

In der im ersten Projektabschnitt durchgeführten Kurzzeitinterventionsstudie konsumierten

fünf gesunde Probanden an vier verschiedenen Studientagen nach der einwöchigen Washout-Phase einmalig je 700 ml Saft (roter Mischfruchtsaft, Getränk mit Traubenschalenextrakt und ein Heidelbeersaft in zwei unterschiedlichen Konzentrationen) im nüchternen Zustand. Während der Studie wurden von allen Probanden Blutproben an drei Probeentnahmezeitpunkten (0, 2 und 8 Stunden) gesammelt und hinsichtlich der Modulation der DNA-Strangbrüche sowie der Transkriptmenge ARE/Nrf2-abhängiger Gene untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der DNA-Strangbrüche 8 Stunden nach Verzehr des roten Mischfruchtsaftes. Die anderen Getränke zeigten keine Reduzierung der DNA-Schäden im Comet-Assay. Alle Testsäfte modulierten die Transkriptmenge von Nrf2, HO-1 und NQO-1, jedoch mit unterschiedlicher Potenz sowie Persistenz der Effekte. Die Gentranskription war 2 Stunden nach Konsum des roten Mischfruchtsaftes erhöht und ging nach 8 Stunden wieder auf den Ausgangslevel zurück. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde der rote Mischfruchtsaft als Studiensaft für die Langzeitinterventionsstudie (zweiten Projektabschnitt) durch den Projektbegleitenden Ausschuss ausgewählt.

An der Langzeitinterventionsstudie nahmen 57 Probanden teil, die in zwei Gruppen unterteilt waren. Nach 7 Tagen Polyphenol-reduzierter Diät (Washout-Phase) konsumierten die Probanden am ersten Tag als Bolusgabe einmalig und an den folgenden 55 Tagen über den Tag verteilt 750 ml des anthocyanreichen Mischfruchtsaftes (Gruppe A: Saft) bzw. eines Placebogetränks (Gruppe B: Placebo). Während der Studie wurden von allen Probanden Blutproben im nüchternen Zustand (0 Stunden) nach 4, 8 und 24 Stunden sowie nach 1, 4 und 8 Wochen (56 Tage) entnommen. Die Proben wurden hinsichtlich der Modulation der Biomarker im Blut (DNA-Strangbrüche, Superoxiddismutase(SOD)-Aktivität, Katalase-Aktivität, Plasmalipide (LDL, HDL, Cholesterin, Triglyceride), oxidiertes LDL und Interferon- γ -induziertes-Protein-10 (IP10) untersucht. Außerdem wurden das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung sowie die Energie- und Nährstoffaufnahme über Ernährungsprotokolle der Probanden erfasst. Zur Überprüfung der Einhaltung der Ernährungsvorgaben während der Studie („compliance“) wurden zusätzlich die (Spot)-Urinproben von Probanden gesammelt. Zu Studienbeginn und zum Studienende wurden zudem

Faeces-Proben gesammelt und die Zusammensetzung der Darmmikrobiota charakterisiert.

Urinanalysen ergaben keine Hinweise auf eine Anthocyanaufnahme während der Washout-Phase in beiden Gruppen sowie in der Kontrollgruppe (Gruppe B) während der Interventionszeit mit dem Placebogetränk. Durch Auswertung der Ernährungsprotokolle zeigte sich, dass beide Getränke zu einer signifikanten Erhöhung der Energie- und Kohlenhydrataufnahme sowie zu einer Abnahme der Fett- und Eiweißaufnahme führten. Die mittels Bioimpedanzmessung erfasste Entwicklung des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung der Probanden zeigte eine deutliche Reduktion des Körperfettes sowie eine Erhöhung der fettfreien Masse nach Konsum des Mischfruchtsaftes über den ganzen Studienzeitraum. In beiden Gruppen zeigte sich nach 24 Stunden sowie nach 1, 4 und 8 Wochen eine signifikante Abnahme der spontanen (direkten) und der gesamten DNA-Strangbrüche. Die SOD-Aktivität wurde nach 56 Tagen signifikant durch Fruchtsaftkonsum erhöht, während die SOD-Aktivität in der Gruppe B (Placebogruppe) abnahm. In beiden Gruppen wurde die Katalase-Aktivität, die LDL-Cholesterin- und Cholesterin-Level reduziert, hingegen wurde die Inflammationsmarker IP10 nicht moduliert.

Effekte auf die Transkription Nrf2/ARE-abhängiger Gene sowie ausgewählter Polymorphismen in der Promotorregion des NRF2-Gens wurden in den Lymphozyten der Probanden analysiert. Des Weiteren wurden zu Studienbeginn und zum Studienende Faeces-Proben gesammelt und die Zusammensetzung der Darmmikrobiota charakterisiert.

Die Transkription der Gene NRF2, HO-1 und NQO-1 wurde bis zum Ende des Interventionszeitraums von 56 Tagen durch den Saftkonsum moduliert. Dabei war die Transkriptmenge von NRF2 in den Lymphozyten sowohl in der Gruppe B (Konsum des Placebogetränks) als auch in der Gruppe A (Konsum des roten Mehrfruchtsaftes) erniedrigt. Die NQO-1-mRNA-Level stiegen nach Saftkonsum (56 Tage) signifikant an, ebenso die Transkriptmengen von HO-1 an Tag 28 und Tag 56. Außerdem zeigte sich ein unterschiedliches Polymorphismen-Muster in der NRF2-Promoterregion zwischen der Placebo- und der Interventionsgruppe, was vermutlich die biologische Antwort der beiden Gruppen beeinflusste.

Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota war typisch für gesunde Individuen, mit den dominierenden Stämmen Firmicutes und Bacteroidetes und untergeordneten Stämmen einschließlich Proteobacteria, Actinobacteria und Cyanobacteria. Die humane Darmmikrobiota wird derzeit in 3 unterschiedliche Typen unterteilt, sog. Enterotypen, die durch eine Vielzahl der Gattungen Bacteroides, Ruminococcus und Prevotella gekennzeichnet sind. Daher wurde untersucht, ob die Menge dieser Gattungen zwischen den Gruppen (A, B) unterschiedlich ist und/oder durch die Intervention beeinflusst wird. Dabei zeigte sich, dass sich der Enterotypen-Status über den Zeitraum der Intervention nicht verändert hat. Hingegen wurde die Mikrobiom-Zusammensetzung sowohl über den Zeitraum der Intervention als auch in Abhängigkeit von der Kalorienaufnahme und dem Fettspiegel signifikant moduliert. Ferner wurden bei der Charakterisierung des intestinalen Mikrobioms Adlerkreutzia, welche Daidzein in Equol umwandeln können, als eine Indikatorart identifiziert, die bei Anreicherung für Personen mit Soja-Konsum ein Gesundheitsvorteil sein könnte.

Eine weitere Indikatorart waren die Spirochaetaceae für den Träger des NRF2 WT; hier trat diese Art vermehrt auf. Allerdings gibt es derzeit noch keine mechanistische Erklärung für diesen Zusammenhang. Denkbar wäre, dass Nrf2 Polymorphismen die mukosale Barrierefunktion und das Redoxgleichgewicht beeinflussen, was einen Effekt auf die Besiedlung mit Spirochaetaceae haben könnte. Es wurden ebenfalls Zusammenhänge zwischen Darmmikrobiota und Höhe der DNA-Schäden, LDL-Cholesterinspiegel, Gesamtkörperwasser und IP-10-Spiegel beobachtet.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der rote Mischfruchtsaft DNA-protective und antioxidative Wirkungen sowohl in einem kurzen Zeitraum (bis 8 Stunden) als auch nach einem kontinuierlichen Konsum über 8 Wochen (Langzeiteffekt) zeigte. Allerdings zeigte das Placebogetränk ebenfalls bei den meisten erfassten Biomarkern ähnlichen Wirkungen. Die vergleichbaren Ergebnisverläufe, die in beiden Getränkegruppen zu erfassen waren, sind wahrscheinlich auf die verhältnismäßig hohen Vitamin-C-Gehalte sowohl des Fruchtsaftes als auch des Placebogetränkes zurückzuführen, wodurch die Wirkungen der Anthocyane und weiterer Antioxidantien im Saft vermutlich maskiert wurden.

Gemäß Literatur wird sowohl den Anthocyanen als auch Vitamin C eine antioxidative und DNA-protective Wirkung zugesprochen. In der Langzeitinterventionsstudie konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmengen von Nrf2, NQO-1 und HO-1 durch den Konsum des roten Mehrfruchtsaftes moduliert wurden und dass auch die drei gemessenen NRF2-Promoter-SNPs einen Einfluss auf diese Modulation hatten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich das Darmmikrobiom durch den Konsum des Mehrfruchtsaftes veränderte und sich bestimmte Indikatorarten sowohl durch den Konsum des Saftes (Adlerkreuzia) als auch in Abhängigkeit vom Nrf2-Genotyp (Spirochaetaceae) herausgebildet haben. In der abschließenden Korrelationsanalyse nach SPEARMAN konnte zudem der Zusammenhang der einzelnen Parameter aufgezeigt werden. In einer Folgestudie könnte durch Integration einer Teilnehmergruppe, die über den Zeitraum der Intervention Wasser konsumiert, der potenzielle Einfluss von Vitamin C ausgeschlossen werden. Darüber hinaus würde eine zusätzliche Analyse von Faeces-Proben vor der Washout-Phase (Polyphenol-reduzierte Diät) die Möglichkeit eröffnen, den Basalstatus der Probanden unter Mischdiät in die Betrachtungen, mit einzubeziehen.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Fruchtsaftindustrie ist mittelständisch geprägt: Bundesweit existieren 179 Hersteller von Fruchtsäften, Fruchtnektaren und Fruchtsaftgetränken sowie 5 regionale Landesverbände mit insgesamt 179 kleineren Betrieben.

Gerade kleine und mittelständische Unternehmen (KMU) sind verstärkt auf Nischenmärkte angewiesen. Der Bereich der funktionellen Lebensmittel mit höheren Deckungsbeiträgen und innovativen Technologien mit Alleinstellungsmerkmal bietet für KMU eine besondere Chance, Nischenmärkte zu besetzen. Die Health-Claim-Verordnung zwingt allerdings die Hersteller zur Erfassung sehr aufwändiger Wirkungsnachweise, deren Erforschung insbesondere KMU nicht tragen können.

Die Ergebnisse des Vorhabens eröffnen den Unternehmen die Möglichkeit, diesbezüglich Wirkungsstudien zielführender und ökonomischer anzulegen. Die gewonnenen Erkenntnisse können in die Entwicklung von Fruchtsäften,

Smoothies, Shots, Fruchtexttrakten und Fruchtzubereitungen einfließen und zur Optimierung der Funktionalität dieser Produkte beitragen. Sie bilden für KMU eine Basis für die Entwicklung und Markteinführung von Lebensmitteln mit gesundheitspräventiven Eigenschaften.

Eine oxidative Zellschädigung ist mit der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Diabetes Typ 2, Krebs und andere chronische Erkrankungen, assoziiert. Der Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel wird aufgrund von epidemiologischen Studien als vorbeugend gegen solche Krankheiten angesehen. Über die Nahrung aufgenommene Polyphenole (z. B. Anthocyane) können freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies entweder direkt inaktivieren oder indirekt über die die Modulation der Abwehrmechanismen von Zellen entgegenwirken.

Die Ergebnisse der im Rahmen des Forschungsvorhabens durchgeführten Humanstudien zeigen, dass anthocyanreicher roter Mischfruchtsaft DNA-protective und antioxidative Wirkungen (einschließlich Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges) sowohl über einen kurzen Zeitraum als auch nach regelmäßiger Aufnahme über 8 Wochen aufweist.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2016.

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität Kaiserslautern
 Fachbereich Chemie, Fachrichtung
 Lebensmittelchemie und Toxikologie
 Erwin-Schrödinger-Str. 52, 67663
 Kaiserslautern
 Tel.: +49 631 205-4061
 Fax: +49 631 205-3085
 E-Mail: richling@chemie.uni-kl.de

Universität Wien
 Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie
 Währinger Straße 38, 1090 Wien, Österreich
 Tel.: +43 1 4277-70800
 Fax: +43 1 4277-70899
 E-Mail: doris.marko@univie.ac.at

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.