

Presseinformation

Esslingen, 18. Februar 2011

BioTeSys – 10 Jahre Analyse- und Forschungsdienstleistung für biologische Wirkungen

Teil 1: Bioverfügbarkeit und Antioxidative Kapazität

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species), auch oft nur als Sauerstoffradikale bezeichnet, ist ein Kennzeichen des Lebens und für viele Stoffwechselprozesse charakteristisch. Endogen entstehen die ROS in den Mitochondrien, als Zwischenprodukt der Zellatmung. Bei den ROS handelt es sich dabei um das Superoxid-Anionenradikal O_2^- , Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal OH [1]. Diese hoch reaktiven Stoffe können in der Umgebung ihrer Entstehung Lipide, Proteine oder Nukleinsäuren oxidieren. In der Regel werden die endogen gebildeten ROS jedoch abgefangen und unter kontinuierlichen Prozessen entsorgt. Mehr noch, unter bestimmten Bedingungen, z.B. während Entzündungsprozessen, kann der Organismus die ROS im Rahmen einer Immunantwort sogar gezielt zur Zerstörung von Bakterien einsetzen oder die Virenvermehrung mit einschränken helfen. Darüber hinaus wird diskutiert, dass ROS eine wichtige Rolle in der Regulation von Hypoxie-induzierbaren Faktoren spielen.

Um der oxidativen Schädigung durch die ROS entgegen zu wirken, steht den Zellen und Geweben wirksame Schutz- und Reparaturmechanismen zu Verfügung. Als antioxidatives Schutzsystem werden endogen enzymatische und nicht enzymatische Radikalfänger bzw. Antioxidantien bereitgestellt. Als wichtigste endogen gebildeten Antioxidantien sind dabei die Glutathionperoxidase (GPX) und die Superoxiddismutase (SOD) im Zytosol und Mitochondrien sowie die Katalase in den Peroxisomen hervorzuheben. Daneben wirken aber auch weitere Proteine antioxidativ, wie z.B. das Transferrin und Albumin, sowie allgemein SH-Gruppen tragende Proteine. Nukleinsäureschäden wirken bestimmte Reparaturmechanismen entgegen.

In normalen Zellen wird eine ausreichende Menge an antioxidativen Stoffen bereitgestellt. Treten die ROS jedoch vermehrt und unkontrolliert auf, d.h. wenn das Radikal-

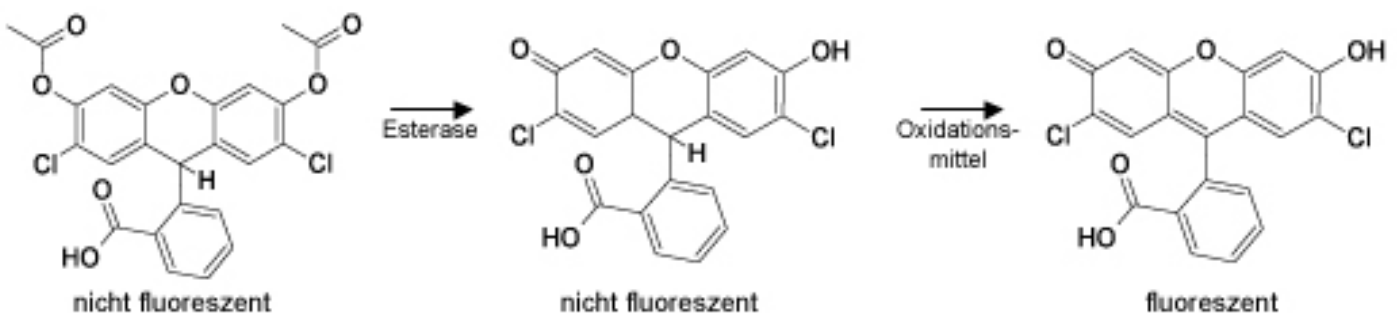
Entgiftungspotential der Zelle überfordert ist, kann dies zu eklatanten Schäden an Lipiden, Strukturproteinen und Nukleinsäuren führen. Eine solche Stoffwechsellage bezeichnet man als oxidativen Stress. Im schlimmsten Fall kann die zelluläre Homeostase zusammenbrechen und die Apoptose eingeleitet werden. Dies ist aber nicht die Regel.

Der oxidative Stress spielt unter anderem bei Alterungsprozessen und pathophysiologisch, unter anderem von Krebs, eine wichtige Rolle. Oxidativer Stress zeigt jedoch keine eindeutigen Symptome. In alternden biologischen Systemen steigt die Radikalproduktion an und die Oxidationsprodukte akkumulieren. Oxidativer Stress erhöht daneben das Risiko für zahlreiche Erkrankungen. Unter anderem beim Risiko für neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer), Artherosklerose, Störungen des Immunsystems und sogar für Krebs [2].

Das Altern kann nicht vermieden werden, es können aber von jedem Maßnahmen ergriffen werden, es zu verlangsamen. Einige Ursachen von oxidativem Stress kann man nicht beeinflussen, dazu gehört die genetische Disposition. Manche lassen sich nicht vermeiden, z. B. ionisierende Bestrahlung bei Tumorerkrankungen. Einen Einfluss hat man aber auf verhaltensbedingte Ursachen. So verhindern Antioxidantien in Hautschutzmitteln bereits die Bildung von Radikalen durch UV-Strahlung oder schädlichen Umwelteinflüssen. Dass das Rauchen mit ein Hauptverursacher zusätzlicher Radikale ist, sollte bekannt sein. Aber auch die Ernährung hat einen Einfluss auf den Grad des oxidativen Stresses.

Neben Änderungen bei Fehlernährung kann man dem Organismus exogen Antioxidantien mit der Nahrung zuführen. Diese stammen vor allem aus den sekundären Inhaltsstoffen von Pflanzen und bilden zusammen ein antioxidatives Netzwerk, wobei sie sich teilweise auch gegenseitig beeinflussen können. Dazu gehören unter anderem das Vitamin C, Vitamin E, Q10, Beta-Karotin, Lycopin, Polyphenole und Flavonoide, um nur einige zu nennen. Oft beschränken sich die Untersuchungen der antioxidativen Kapazität von Substanzen nur auf die chemische Seite (z. B. TEAC, DPPH und ABAP). Die BioTeSys bietet innerhalb ihrer Kernkompetenzen nicht nur die Möglichkeit der Analyse der antioxidativen Kapazität von Substanzen im nasschemischen Verfahren an, sondern auch in Echtzeit innerhalb lebender Zellen.

Im Rahmen der Routineanalytik werden Antioxidantien bzw. Netzwerke von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in der nasschemischen und instrumentellen Analytik der BioTeSys untersucht (vgl. Pressebox: Analytik von sekundären Inhaltsstoffen Teil 1 – 3). Dabei liegt ein Schwerpunkt in der Kompetenz der BioTeSys in ihrer Erfahrung der chemischen Analyse aus den verschiedensten Matrices, neben der Analyse aus Blut und Zellproben, auch aus Cremes und aus den unterschiedlichsten Lebensmitteln und Getränken (Pressbox: demnächst).



Um die antioxidative Kapazität von Einzelsubstanzen, deren Kombinationen bzw. Mischungen nicht nur chemisch, sondern im physiologischen Sinne umfassender zu analysieren, sollte ihre Bioverfügbarkeit gewährleistet sein. Der BioTeSys steht dabei mit dem FluoroScan-Assay (s. u.) ein validiertes und sensitives System zur Verfügung antioxidative Kapazitäten nur tatsächlich innerhalb lebender Zellen zu untersuchen.

FluoroScan-Assay

Nach der Supplementation mit verschiedenen Verdünnungen einer Prüfsubstanz werden die Zellen mit dem Farbstoff DCFH-DA behandelt. DCFH-DA gelangt über die Zellmembran in das Innere von lebenden Zellen und wird dort durch Esterasen zum nicht fluoreszierenden DCFH deacetyliert. Das DCFH kann die Zellen nun nicht mehr verlassen. Durch die periodische Zufuhr eines Stressors in Form eines Oxidationsmittels wird das DCFH zum fluoreszierenden DCF oxidiert [3].

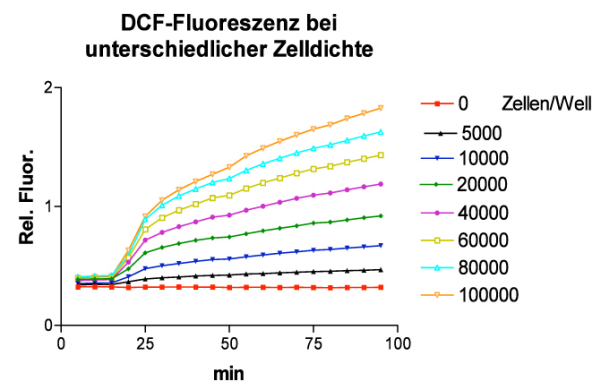


Abb. 1: DCF-Fluoreszenzemission in Bezug auf die Zelldichte

Die Signalwerte korrelieren mit der Zellzahl (Abb. 1) und damit mit der Proteinkonzentration (Abb. 2). Um Fehlinterpretationen aufgrund unterschiedlicher Zellzahlen in den Wells zu vermeiden, werden die Signale gegen die Proteinkonzentration normalisiert und in Bezug zur einer positiven Kontrollsubstanz gesetzt, die bei jeder Versuchreihe mitgeführt wird.

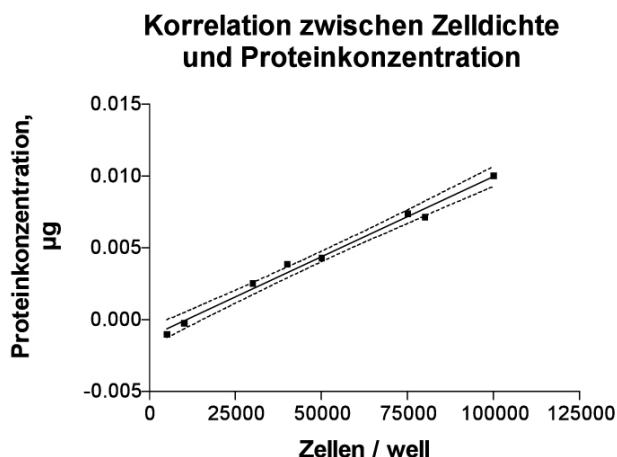


Abb. 2: Korrelation zwischen der Proteinkonzentration und der Zellzahl pro Well, $r^2=0,9896$

In der Zelle vorhandene Antioxidantien fangen die gebildeten Radikale ab und verhindern die Oxidation des Farbstoffs. Dadurch verringert sich die gemessene Fluoreszenz im Assay, je stärker die antioxidative Kapazität der Testsubstanz ist. Der messbare Effekt zeigt neben der Wirkung auf den oxidativen Stress der Zelle zugleich auch an, ob und in welchem Umfang die Testsubstanz für die Zelle verfügbar ist. Ergebnisse aus diesem zellbasierten Assay lassen sich mit nass-chemischen Verfahren kombinieren und vergleichen [4].

Der FluoroScan-Assay wurde auf multi-well-Format optimiert (96er, 384er) und eignet sich für Screening-Ansätze, aber auch zur vertieften Analyse einzelner Substanzen/Substanzkombinationen. Die BioTeSys überprüft die Qualität und Stabilität des Systems u.a. in Form von Regelkarten.

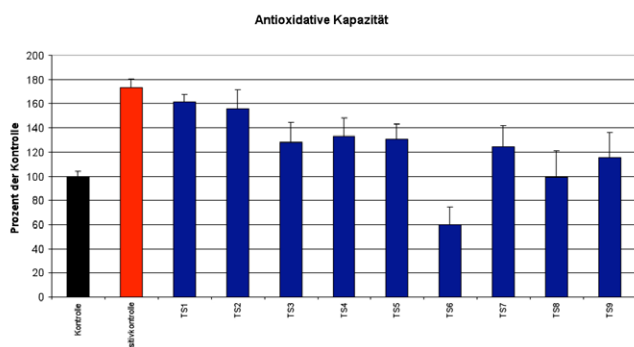


Abb. 3: Antioxidative Kapazität von neun Testsubstanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Positivreferenz

Literatur:

- [1] Schmidt R. F., et.al.: Physiologie des Menschen, Springer, 2007, S. 957 ff.
- [2] Biesalski, H. K., et al.: Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe., Georg Thieme Verlag; Stuttgart/New York 2002, S. 50 – 56, 265 – 267, 269 – 278, 312 – 348, 386 – 391, 651 – 662, 717 – 723)
- [3] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC.: Chem Res Toxicol 1992; 5: 227-231.
- [4] Büniger J et al: Int. J.Cos.Sci. 28:135 – 146, 2006

Über BioTeSys GmbH

Die BioTeSys GmbH in Esslingen (www.biotesys.de) wurde 1999 gegründet als Spin-Off des Instituts für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften der Universität Hohenheim. Heute versteht sich BioTeSys als Partner bei der Entwicklung und Umsetzung neuer Konzepte auf den Gebieten Kosmetik, Nahrungsmittel, und Consumer Health Care/OTC. Das Angebot umfasst Screening-Verfahren zur Erfassung des bioaktiven Potentials von Substanzen oder Substanzgemischen, in vitro-Testverfahren unter Verwendung von Einzelzellkulturen, Co-Kulturen und verschiedenen Organmodellen sowie klinische Studien für den Lebensmittelbereich. BioTeSys ist gemäß ISO 9001:2008 zertifiziert; die Abteilung Analytik mit den Schwerpunkten HPLC und Photometrie ist zusätzlich nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 akkreditiert. Alle verwendeten Messverfahren und Versuchsparameter sind auf physiologische Vorgaben hin entwickelt und optimiert. Die Ergebnisse und erhobenen Wirkkonzentrationen haben dadurch unmittelbare Aussagekraft für die Einschätzung biologischer Wirkungen. Als kompletter Dienstleister auf dem Gebiet der biologischen und chemischen Analyse bietet das Unternehmen ein sehr weitreichendes Service-Angebot einschließlich der Entwicklung neuer Verfahren und Produkte im Kundenauftrag.

Ihr Ansprechpartner:

Dr. Jürgen Bernhardt
 Telefon 07 11 / 31 05 71 50
 E-Mail info@biotesys.de