



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Safran auf Zellvitalität und DNA-Stabilität von HepG2-Zellen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin: Felizitas Moll

Matrikel-Nummer: 0403004

Studienrichtung /Studienzweig Ernährungswissenschaften
(lt. Studienblatt):

Betreuer: A.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Wien, im Jänner 2010

Danksagungen

Mein Dank gilt..

Herrn a.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die großartige Betreuung meiner Diplomarbeit. Dafür, dass er mich mit größtmöglichem Engagement beraten, geleitet, verbessert und gefördert hat und mir immer wieder den richtigen Weg wies. Dafür, dass er versucht hat, ein guter Ansprechpartner zu sein und auch in stressigen Zeiten immer ein paar Minuten für uns fand.

Frau Dr. Susanne Till für die Ermöglichung unseres Ausflugs nach Klingenbach, ihre botanische Expertise und ihr großes laufendes Interesse an uns und unserer Arbeit.

Herrn Johannes Pinteritz für seine Begeisterung für unser Projekt, seine Gastfreundlichkeit bei unserem Besuch, sowie die großzügige Bereitstellung aller Rohstoffe für unsere Versuche.

Frau Dr. Karin Koschutnig für eine tolle Einschulung und ständige Betreuung in allen Labor-, Diplomarbeits-, Studiums- und Lebensfragen.

Dem gesamten Spange-E-Team für fachliche, moralische und kulinarische Unterstützung.

Meinem Projektpartner Michael Bilek, mit dem die neun Monate im Labor wie im Flug vergangen sind, sowie Katharina Helmich, Günther Seiringer, Andreia Gonzalez Doñate und Hedwig Huber für die wunderbare Zeit im Labor und außerhalb.

Meiner Familie für den Glauben an meine Fähigkeiten, sowie die Anteilnahme und Begeisterung für praktisch alles, was ich tue. Ihre Unterstützung legt den Grundstein für all meine Möglichkeiten und Wege.

Sebastian Novak für seine beruhigende Anwesenheit, gelegentliches Korrekturlesen, das Lösen der ein oder anderen Computerpanne, sowie sein Grundvertrauen in mich und uns.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
2	SAFRAN.....	2
2.1	BOTANIK/TAXONOMIE	2
2.2	ANBAU & VERARBEITUNG	5
2.2.1	<i>Anbau</i>	5
2.2.2	<i>Ernte</i>	6
2.2.3	<i>Trocknung</i>	6
2.2.4	<i>Produktion, Vermarktung und Kosten</i>	8
2.3	HERKUNFT & VERWENDUNG.....	9
2.3.1	<i>Herkunft</i>	9
2.3.2	<i>Verwendung</i>	10
2.3.3	<i>Lagerung</i>	10
2.4	GESCHICHTE.....	11
2.4.1	<i>Bedeutung in der Geschichte</i>	11
2.4.2	<i>Medizinische Verwendung in Mittelalter und Antike</i>	13
2.5	SAFRANANBAU IN ÖSTERREICH.....	15
2.6	CHEMISCHE INHALTSSTOFFE	16
2.6.1	<i>Farbstoffe</i>	16
2.6.2	<i>Aromastoffe</i>	18
2.6.3	<i>Weitere Inhaltsstoffe</i>	19
2.6.4	<i>Inhaltsstoffe der Tepalen</i>	19
2.6.5	<i>Bestimmungsmethoden</i>	20
2.7	WIRKUNG & NEUERE MEDIZINISCHE ERKENNTNISSE	22
2.7.1	<i>Toxische Wirkung</i>	22
2.7.2	<i>Antioxidative Wirkung</i>	24
2.7.3	<i>Antikanzerogene Wirkung</i>	26
2.7.4	<i>Antithrombotische Wirkung</i>	30
2.7.5	<i>Neurologische Wirkung</i>	32

2.7.6	<i>Sonstige Wirkungen</i>	34
2.7.6.1	Wirkung auf das Immunsystem.....	34
2.7.6.2	Wirkung als Aphrodisiakum	35
2.8	AKTUELLER STAND DER WISSENSCHAFT	36
2.8.1	<i>Safran und Zelltests</i>	36
2.8.2	<i>Safran und Comet Assay</i>	37
2.8.3	<i>Comet Assay und HepG2-Zellen</i>	37

3 MATERIAL UND METHODEN.....39

3.1	CHEMIKALIEN UND MEDIEN	39
3.2	GERÄTE UND TECHNISCHE AUSSTATTUNG	39
3.3	HERSTELLUNG VON LÖSUNGEN UND REAGENZIEN FÜR ZELLTESTS	40
3.4	PROBEN	42
3.4.1	<i>Herkunft der Proben</i>	42
3.4.2	<i>Konservierung</i>	43
3.4.3	<i>Vortests</i>	43
3.4.4	<i>Testen des Lösungsmittels</i>	43
3.4.5	<i>Testen der Extrakte</i>	44
3.4.6	<i>Probenaufbereitung</i>	44
3.5	HEPG2-ZELLEN.....	45
3.5.1	<i>Charakterisierung der Zellen</i>	45
3.5.2	<i>Zellkultivierung</i>	46
3.5.3	<i>Passage</i>	46
3.6	TESTS	49
3.6.1	<i>Vorbehandlung der Zellen</i>	49
3.6.2	<i>Trypanblau-Test</i>	49
3.6.2.1	Ablauf des Trypanblau-Test.....	50
3.6.3	<i>SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)-, „Comet“-Assay</i>	50
3.6.3.1	Prinzip des Comet Assay.....	51
3.6.3.2	Lösungen und Reagenzien für den Comet Assay.....	53
3.6.3.3	Ablauf des Comet Assay	54
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	55

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	56
4.1	TRYPANBLAU-TEST	57
4.1.1	<i>Trypanblau-Test der Narbenäste.....</i>	<i>57</i>
4.1.2	<i>Trypanblau-Test der Tepalen</i>	<i>59</i>
4.1.3	<i>Diskussion</i>	<i>59</i>
4.2	SCGE (SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS)-„COMET“-ASSAY	63
4.2.1	<i>Comet Assay der Narbenäste</i>	<i>63</i>
4.2.2	<i>Comet Assay der Tepalen</i>	<i>65</i>
4.2.3	<i>Diskussion</i>	<i>65</i>
5	SCHLUSSBETRACHTUNG	67
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7	SUMMARY	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	71

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Onthogenese der Crocus sativus Pflanze und ihrer Blüte [Negbi, 1999] ...</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: Strukturformel von Crocetin ('R, R' = H) und Crocin ('R, R' = X)</i> <i>[Li et al., 1999]</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 3: Chemische und enzymatische Konversion von Picrocrocin zu HTCC und Safranal [Lonzano et al., 1999]</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 4: Phasen der chemischen Kanzerogenese</i> <i>[http://www.scielo.br/img/revistas/aabc/v79n4/a04fig02.gif, Zugriff: 12.11.2009]</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 5: Probenaufbereitung in Zentrifugenröhrchen (15ml)</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 6: Wochenzyklus der Zellkultivierung [Koschutnig, 2009]</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 7: Kulturfläschchen zur Zellkultivierung, mit Medium und Zellrasen</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 8: Arbeiten im Laminar Flow</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 9: Ablauf des SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)- "Comet"-Assay</i> <i>[Koschutnig, 2009]</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 10: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes</i>	<i>56</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Chemikalien und Medien</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 2: Geräte und technische Ausstattung</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 3: Probeneinwaage in mg</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 4: Schema des Arbeitsablaufes</i>	<i>48</i>

1 Einleitung und Fragestellung

Safran, ein Gewürz aus den Blüten des Safrankrokus (*Crocus sativus L.*), gilt als das teuerste Gewürz der Erde. Bereits in der Antike und im Mittelalter als Gewürz, Farbstoff und Heilmittel geschätzt, wird Safran heute hauptsächlich zum Würzen von Speisen verwendet, und vor allem im Mittelmeerraum und in arabischen Ländern kultiviert. Doch auch in Österreich erfreut sich der in Vergessenheit geratene Safrankrokus seit einigen Jahren wieder großer Beliebtheit, beispielsweise im Burgenland als „Pannonischer Safran“.

Wie viele aromatische und stark gefärbte Pflanzenteile, enthalten die Narbenäste der Safranpflanze sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Carotinoide, Flavonoide und Terpene, die für die meisten der sensorischen Eigenschaften und medizinischen Wirkungen verantwortlich sind. In experimentellen Studien, *in vitro* und *in vivo*, wurden bis dato die antioxidativen, antikanzerogenen, antiinflammatorischen und neurologischen Wirkungen von Safran getestet und interessante Forschungsergebnisse erzielt. Nicht außer Acht zu lassen bleibt jedoch die akut toxische Wirkung der Narbenäste in hohen Dosen (20g/d), sowie ihre teratogene und abortive Wirkung, die einen hochdosierten Einsatz von Safran als Phytotherapeutikum mit Vorsicht betrachten lassen.

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, das toxische Potential von Safran (Trypanblau-Test für die Zytotoxizität, Comet Assay für die Genotoxizität) in HepG2-Zellen zu testen. Dabei lag besonderes Augenmerk auf der Dosis, die einen normalen Haushaltsgebrauch widerspiegelt.

Neben den Narbenästen, dem eigentlichen Safrangewürz, wurden auch die Tepalen, die Blütenblätter des Safrankrokus, untersucht, da diese in der Literatur meist wenig betrachtet werden, und erst wenige Studienergebnisse über ihre Wirkung existieren. Zu diesem Zweck wurden Narbenäste und Tepalen des „Pannonischen Safrans“ in haushaltsüblichen Mengen auf ihre Zytotoxizität und Genotoxizität gegenüber HepG2-Zellen getestet.

Die Diplomarbeit wurde in Partnerarbeit mit meinem Kollegen Michael Bilek durchgeführt, der sich in seinem Teil der Arbeit mit der Schutzwirkung von Safran auf H₂O₂-induzierte Zell- und DNA-Schädigung befasste.

2 Safran

2.1 Botanik und Taxonomie

Safran (lat. *Crocus sativus* L.) ist eine mehrjährige Crocusart aus der Familie der Schwertliliengewächse (Iridaceae). Sie treibt, anders als die meisten ihrer verwandten Crocusarten, erst im Herbst aus und überdauert den Rest des Jahres als Knolle im Boden [Katzner und Fansa, 2007].

Im gängigen Sprachgebrauch bezeichnet man sowohl die Pflanze selbst, als auch das aus ihr hervorgehende Gewürz, die getrockneten Narbenäste, als „Safran“ [Teuscher, 2002].

Der Aufbau der Safranpflanze lässt sich in den Grundzügen von unten nach oben folgendermaßen beschreiben:

- 1) Knolle mit sprossbürtigen Wurzeln
- 2) Niederblätter (Blattscheiden)
- 3) Laubblätter
- 4) Blüte: Perigon, Griffel und Narbenäste, Staubblätter



1) Die Knolle

Das Speicherorgan der Safran-Pflanze, die Knolle, wird mit einigen feinen, homorhizen, unverzweigten Wurzeln fest im Boden verankert.

Obwohl des Öfteren als „Zwiebelgewächs“ bezeichnet, handelt es sich beim Safran eigentlich um eine Knollenpflanze. Dies erkennt man bei näherem Hinsehen an der

Beschaffenheit des Speicherorgans der Pflanze: der Sprossknolle [Teuscher, 2002; Till, 2004].

Während bei einer Zwiebel die Sprossachse gestaucht ist, und die angrenzenden, fleischigen Blätter die Speicherfunktion für Nährstoffe übernehmen, ist bei der Knolle die Sprossachse selbst verdickt und dient der Speicherung von Nährstoffen für die Pflanze. Die fasrigen, braunen Blätter, die die Knolle umgeben, sind vertrocknete Niederblätter, die keine Speicherfunktion mehr aufweisen.



2) Die Blätter

Auf der anderen Seite der Knolle ragen breite, weiße, übereinander wachsende Niederblätter hervor. Die Niederblätter bilden Blattscheiden, die die Laubblätter bündeln, und den Bereich der Pflanze markiert, an dem sie dem Boden entwächst.

Die dunkelgrünen, grasähnlichen Laubblätter (6-9) bilden eine Blattrosette, die direkt, ohne verbindenden Blattstiel, jedoch von den Niederblättern umgeben, aus der Sprossknolle entspringt.

3) Die Blüte

Aus der Mitte der Laubblätter entwächst die Blüte mit einer Blütenröhre, die schließlich in ein Perigon von 6 fliederfarbenen Tepalen mündet.

In dieser Blütenröhre befindet sich der ca. 10 cm lange hellgelbe Griffel, der sich aus



dem Fruchtknoten erhebt, und sich im Bereich der Tepalen, am oberen Ende der Blüte, in drei 2,5 bis 3,5 cm lange, kräftig rote Narbenäste verzweigt.

Die Narbenäste stellen den Teil des Safrans dar, der schließlich als Gewürz Verwendung findet. Sie sind nach oben hin offen und verdickt, mit Papillen besetzt und am

Ende leicht ausgefranst [Teuscher, 2002].

Trotz der unübersehbaren Ähnlichkeit zu unseren heimischen Frühlingskrokusarten, gibt es einige bedeutende Unterschiede:

- Anders als gewöhnliche Krokusse blüht der Safran im Herbst, nicht im Frühling. Die Blütezeit ist von Ende September bis Anfang November [Teuscher, 2002].
- Safran ist triploid und damit steril. Die Pflanze kann nur auf vegetativem Weg, das heißt durch Auspflanzung von Tochterknollen, vermehrt werden [Negbi, 1999]. Dabei werden die jeweils besten Knollen zur Kultivierung ausgewählt.
- Safran wächst vor allem in warmen, trockenen Gegenden, und wird deshalb bevorzugt im Mittelmeerraum, sowie im Nahen Osten angebaut.

2.2 Anbau & Verarbeitung

2.2.1 Anbau

Safran schätzt ein gemäßigtes, sommerwarmes Klima mit einem warmen, niederschlagsarmen Herbst, einem kühlen bis kalten Winter, sowie lockere, sandhaltige Böden in sonnigen Lagen, da die Knollen in nassen Böden leicht faulen [Katzner und Fansa, 2007; Teuscher, 2002]. Der Crocus ist sehr gut an das Klima angepasst, wächst von Herbst bis Frühling und überdauert den heißen Sommer als Knolle im Boden.

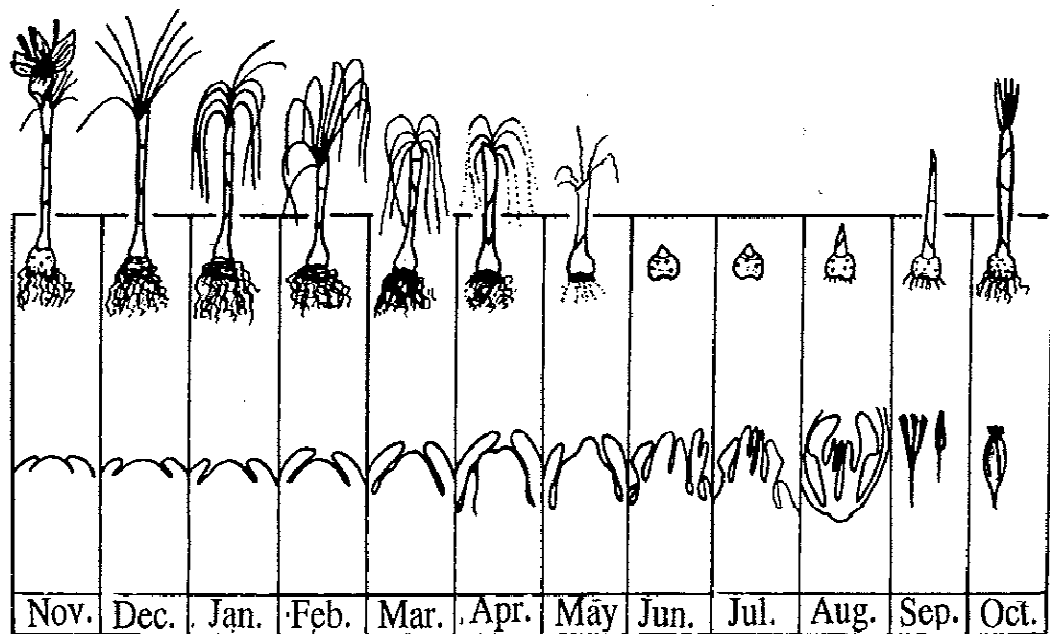


Abbildung 1: Ontogenese der *Crocus sativus* Pflanze und ihrer Blüte [Negbi, 1999]

Aus den Knollen treiben im Oktober/November, nach den ersten Herbstregentagen, rasch hintereinander Blätter und Blüten aus. Über den Winter wachsen neue Wurzeln, sowie Tochterknollen, die später von der Mutterpflanze getrennt und neu ausgesetzt werden [Negbi, 1999]. Die Knollen können mehrere Jahre im Boden verbleiben, spätestens alle 5 bis 7 Jahre werden sie durch neue ersetzt, um zu verhindern, dass sie zu weit in den Boden eindringen [Teuscher, 2002]. In regenreichen Regionen werden sie im Sommer ausgegraben und im Frühherbst wieder eingegraben [Katzner und Fansa, 2007].

Nähere Details zum Anbau werden in der Diplomarbeit meines Kollegen Michael Bilek („Schutzwirkung von Safran gegen H₂O₂-induzierte Zellschädigung in HepG2-Zellen“) erläutert.

2.2.2 Ernte

Safran wird in reiner Handarbeit geerntet und verarbeitet. Eine mechanische Ernte scheint bisher unmöglich, da sich eine Verletzung der Laubblätter dabei nicht vermeiden ließe. Werden die Laubblätter verletzt oder gar entfernt, treibt die Pflanze keine Tochterknollen mehr aus und ist damit in ihrer Fortpflanzung gestört [Negbi, 1999].

Die Blüten sollten so früh wie möglich, solange sie noch geschlossen sind, geerntet werden, da dies das Aroma des Gewürzes entscheidend beeinflusst. Safran aus bereits geöffneten Blüten trocknet schnell ein und wird spröde.

Gleich nach dem Erntevorgang (bzw. parallel dazu) werden die roten Narbenäste von der restlichen Blüte getrennt und gesammelt. Dabei ist es vor allem wichtig, den hellgelben Griffel, der mit den Narbenästen verbunden ist, weitgehend zu entfernen, da Bestandteile des Griffels im fertigen Gewürz die Qualität des Gewürzes verringern.

2.2.3 Trocknung

Die ausgelösten Narbenäste werden dann bis auf einen Wassergehalt von 5-20% [Negbi, 1999] getrocknet. Laut ISO-Norm 3632 sollten fertige Narbenäste nicht mehr als 12% Feuchtigkeit aufweisen [Carmona et al., 2006].

Der Trocknungsprozess ist einerseits wichtig, um vorzeitigem Verderb und Schimmelbildung entgegenzuwirken, andererseits entstehen durch die Röstung und anschließende Lagerung erst die charakteristischen Aromastoffe und die mürbe Konsistenz des Safrans.

Je nach Herstellungsort und Produzent sind unterschiedliche Trocknungsmethoden im Einsatz: traditionellerweise werden die frischen Narbenäste auf feinmaschigen Sieben über heißer Kohle geröstet. Oft wird der Safran auch direkt in der Sonne getrocknet. Dies kann jedoch große Verluste der Farb- und Aromawirkung zur Folge haben, da viele Safran-Inhaltsstoffe bei direkter Lichteinwirkung oxidieren [Negbi, 1999].

Inzwischen werden oft modernere Methoden, wie das Trocknen auf feinen Seidennetzen in 30-35°C gewärmten Räumen (10-12h), bevorzugt. Die Wahl der richtigen Temperatur und Trocknungsdauer führt zu einer optimalen Ausprägung der feinen Geschmackskomponenten des Safrans. Zu große Hitze zerstört das Aroma, zu lange Trocknung führt zum Verlust der gewünschten Konsistenz und Farbe.

Wurde der Safran gut getrocknet, sollte er zwar trocken sein, aber noch genug Elastizität besitzen, um nicht zwischen den Fingern zu zerbröseln [Carmona et al., 2006].

In der Literatur sind unterschiedliche Trocknungstemperaturen und Methoden angegeben:

In einer spanischen Studie von Carmona et al. (2006) wurde die traditionelle Trocknungsmethode in La Mancha (Spanien) mit der Heißluft-Trocknung (70°, 90° und 110°C) und der Trocknung bei Raumtemperatur (21°C) verglichen. Bei der traditionellen spanischen Kohle-Trocknung wurden Temperaturen zwischen 54° und 83°C, und Trocknungszeiten zwischen 28 und 55 Minuten erreicht. Diese Trocknungsart erzielte die beste Farb- und Aromawirkung, wobei die intensivste Farbe durch hohe Temperaturen und eine damit verbundene geringere Trocknungsdauer entstand.

Frühere Daten zeigten die beste Trocknungswirkung bei 35 – 45°C, da in diesem Temperaturbereich die Trocknungsdauer noch relativ gering ist (im Vergleich zur Zimmertemperatur), große Mengen an Picrocrocin zu Safranal umgesetzt werden, und die Carotinoide noch keiner thermischen Zersetzung unterliegen [Raina et al., 1996].

Laut Gregory et al. (2005) wird jedoch durch eine kurze Trocknung bei relativ hohen Temperaturen (20 Minuten bei 80 - 92°C; anschließend eine etwas längere Trocknungsphase bei 43°C) die höchste durch GC und HPLC-UV messbare Menge an Safranal gebildet. Die hohen Safranal-Werte entstehen wahrscheinlich durch thermische Konversion aus Picrocrocin (im Gegensatz zur enzymatischen Umwandlung über HTCC), die genau in diesem Temperaturbereich (80-92°C) ihren Höhepunkt erreicht. Eine zu große Luftbewegung scheint den Safranalgehalt zu verringern. Auch Crocin-Pigmente scheinen bei höheren Temperaturen besser als bei mittleren Temperaturen um

die 50°C bewahrt zu werden, da die Einwirkzeit kürzer, und die thermale Degradation deshalb geringer ist [Gregory et al., 2005].

Die Diskrepanz der Studienergebnisse lässt sich möglicherweise durch unterschiedliche Trocknungszeiten (die teilweise nicht genauer erläutert wurden) bzw. durch Unterschiede in der Empfindlichkeit der Analysemethoden begründen.

Fest steht, dass sich weder zu hohe ($>90^{\circ}\text{C}$), noch zu geringe ($<30^{\circ}\text{C}$) Temperaturen positiv auf das Trocknungsergebnis auswirken, und dass die Ausprägung der Aroma- und Farbstoffe gleichermaßen von Trocknungstemperatur und Trocknungsdauer abhängt.

Kanakakis et al. (2004) stellten ferner fest, dass sich auch die Gefriertrocknung als Trocknungsmethode für Safran eignet, wobei sich die Safranalkonkonzentration über eine jahrelange Lagerung kaum verändert. HTCC konnte in den gefriergetrockneten Proben nicht nachgewiesen werden.

2.2.4 Produktion, Vermarktung und Kosten

Nach der Röstung wird der Safran entweder in Form ganzer Narbenäste oder als Pulver verpackt und in den Handel gebracht.

Für 1 kg Safrangewürz benötigt man ca. 150.000 Blüten. Dies entspricht der Tagesleistung von ungefähr zehn Pflückern auf rund 2000m² Anbaufläche. Daraus ergibt sich der stolze Preis von 3€/g [Katzner und Fansa, 2007].

In den 90er-Jahren wurden weltweit jährlich 50 Tonnen Safran produziert, wobei der Hauptexporteur, und möglicherweise auch Hauptproduzent, zu dieser Zeit Spanien war. Namhafte Anbaugelände lagen aber auch im Iran, in Italien, Griechenland und Indien. Die Hauptimporteure waren 1988 die USA, Saudi-Arabien und die Vereinigten Arabischen Emiraten. In letzter Zeit verlagert sich der Safranbau allerdings aus wirtschaftlichen Gründen immer stärker vom Mittelmeergebiet in den Nahen Osten [Negbi, 1999].

Je nach Anteil der Griffelreste (siehe 2.2.2) werden verschiedene Handelsformen für Safran unterschieden [Teuscher, 2002]:

Elegierter Safran (= *Crocus electus*): enthält keine oder kaum Griffelreste

Natureller Safran (= *Crocus naturalis*): darf bis zu 10% gelbe Griffelreste enthalten

Spanischer Safran wird zudem durch die ISO Ü39-1 nach Herkunftsgebieten und Reinheit unterteilt [Teuscher, 2002]:

Coupé: nur 5% Blütenreste, beste Qualität

Mancha: bis zu 7% Blütenreste

Rio: 13-15% Blütenreste

Sierra: 17-20% Blütenreste

Nicht umsonst trägt Safran den Beinamen „teuerstes Gewürz der Erde“. 1991 war ein Kilo des Gewürzes auf dem Weltmarkt um ungefähr 1000\$, im Einzelhandel um bis zu 5000\$ zu haben [Negbi, 1999]. Im Supermarkt bekommt man für den Gewürz-Standardpreis von 1,49 € momentan ungefähr 0,4g Safran.

Zur Orientierung: Für ein 4-Personen-Gericht benötigt man in der Regel 10 Safranfäden, die insgesamt ca. 15mg ausmachen.

2.3 Herkunft & Verwendung

2.3.1 Herkunft

Safran, wie wir ihn heute kennen, trifft man in Kultur vor allem in Griechenland, Spanien, Italien, Marokko und Iran, nicht jedoch als wild wachsende Form an. Der griechisch-stämmige diploide *Crocus cartwrightianus* gilt als ursprüngliche Wildform, aus der der Kultursafran entstanden ist [Teuscher, 2002]. Diese Annahme konnte vor einiger Zeit durch cytologische, morphologische und physiologische Studien, sowie DNA-Analysen der beiden Pflanzen untermauert werden [Negbi, 1999].

Andere Hinweise sprechen dafür, dass der Ursprung des Safrans im westlichen Himalaya-Gebiet oder in der heutigen Türkei, an der Grenze zum Iran, liegt [Scheck, 1997].

Die Namensgebung des Safrans gibt beiden Theorien recht: so stammt das Wort „crocus“ aus dem Griechischen und bedeutet „Faden“, „Safran“ ist ein arabisches Wort („za’fran“) und bedeutet so viel wie „gelb“ bzw. „mit Gelb färben“ [Scheck, 1997].

Fest steht, dass Safran bereits im alten Rom und Griechenland als Heilmittel und edles Gewürz bekannt war, und im Mittelalter über Handelswege nach Europa kam [Schnell, 2007].

2.3.2 Verwendung

Heutzutage wird Safran in verschiedenen europäischen und nahöstlichen Küchen nach wie vor als exotisches Gewürz geschätzt (wenn seine Bedeutung auch nicht mehr annähernd so groß ist wie vor einigen Jahrhunderten) und stellt einen wichtigen Bestandteil vieler bekannter Gerichte dar. Es findet zum Beispiel Verwendung in der spanischen *Paella*, der französischen *Bouillabaisse*, im italienischen *Risotto Milanese*, iranischen Reisgerichten (*Polows*) und indischen *Biriyanis*. In Mittel- und Nordeuropa wird der Safran vor allem zur Vollendung von Fischgerichten und Süßspeisen wie Osterbrot und Safrankuchen verwendet [Katzner und Fansa, 2007].

Auch in der Likörindustrie gilt Safran noch immer als beliebtes Färbemittel und wird in Schwedenkräutermischungen und Kräuterbittern als Aromastoff eingesetzt [Wichtl, 2002].

Da die meisten Farb- und Geschmacksstoffe von Safran wasserlöslich sind, werden die Safranfäden vor Zugabe zum Gericht meist einige Minuten in wenig warmem Wasser, Milch, Brühe oder Wein eingeweicht. Die gelb gefärbte Flüssigkeit wird dann, gemeinsam mit den schwimmenden Safranfäden, dem Gericht, gegen Ende der Garzeit, zugegeben. Safranpulver kann direkt verwendet werden, da es sich ohnehin gut verteilt. Aufgrund der hohen Verfälschungsgefahr ist es jedoch sinnvoll, Safran in ganzer und nicht in gemahlener Form zu erwerben. So lässt sich die Originalität leichter feststellen.

2.3.3 Lagerung

Zu viel Safran auf Vorrat zu kaufen lohnt sich nicht, da das Safranaroma auch unter korrekter Lagerung nach ungefähr einem Jahr deutlich abnimmt.

Safran ist hygroskopisch und lichtempfindlich. Um Farbe und Aroma so lange wie möglich zu erhalten, sollte das Gewürz vor Feuchtigkeit und Licht geschützt (in dicht verschlossenen Porzellan-, dunklen Glas- oder Metallbehältern), trocken und kühl gelagert werden [Teuscher, 2002]. Sonst können die lichtempfindlichen Farbstoffe, wie z.B. Carotinoide, leicht oxidieren und die flüchtigen Aromastoffe verloren gehen.

2.4 Geschichte

2.4.1 Bedeutung in der Geschichte

Safran wurde im Laufe der Geschichte bereits des Öfteren in bedeutenden historischen Schriften erwähnt, unter anderem in der Bibel und in Schriften des antiken Griechenlands und Roms, beispielsweise in der Odyssee von Homer als Metapher für gelbrote Farbe [Katzner und Fansa, 2007].

Auch die alten Griechen, wie Plinius (23-79 n. Chr.) oder Dioskurides, erwähnten Safran in ihren naturkundlichen Schriften und Enzyklopädien („Medicina plinii“), was darauf schließen lässt, dass Safran bereits im Altertum für seine gesundheitsbeeinflussende Wirkung bekannt war und geschätzt wurde. Ursprünglich geht das Wissen über Safran, nicht zuletzt aufgrund seiner Herkunft, auf arabische Quellen zurück. Diese wurden in die Antike und schließlich auf das Mittelalter und die Neuzeit übertragen [Schnell, 2007].

In der Antike war Safran vor allem als Parfüm und Färbemittel beliebt, aber auch in fast jedem komponierten Gericht vorhanden. Die gelbe Farbe des Safrans symbolisierte Reichtum und Macht, und wurde deshalb gerne von Königen und feinen Damen getragen. Babylonische Herrscher und Perserkönige trugen safrangelbe Schuhe, Herkules wurde als Kind laut Sage in safrangelbe Windeln gewickelt und modebewusste Damen wie Helena kleideten sich bevorzugt in safrangelbe Gewänder. Die Römer verwendeten Safran gerne als Badeessenz, in Salben, Balsam und Parfums, und gingen damit alles andere als sparsam um [Göock, 1981].

Mit dem Ende der Antike wurde der Safranbau in Europa fast gänzlich abgeschafft und erst durch die Mauren, die die Iberische Halbinsel ab dem 8. Jahrhundert besiedelten, wieder neu eingeführt. Von dort breitete er sich im Laufe der Jahrhunderte auf ganz Europa aus und wurde durch eifrigen Handel im Mittelalter immer begehrter. Auch der Anbau wurde im Laufe der Jahrhunderte auf fruchtbare Gebiete in ganz Zentral- und Nordeuropa ausgebreitet [Katzner und Fansa, 2007].

Safran wurde mit Begeisterung in der mittelalterlichen Küche, in medizinischen Tränken und Tinkturen, und wegen seiner starken Farbe und des betörenden Geruchs auch als Parfüm und Färbemittel für Lebensmittel und Kleidung verwendet.

Der hohe Preis und die wenig entwickelten Untersuchungsmethoden lockten seit jeher zur **Verfälschung** des Safrans. So wurden die Safranfasern durch eigene Blütenteile (Griffel, Staubfäden), Narben anderer Crocusarten [Teuscher, 2002], fremde Pflanzenteile (z.B. von Saflor, Ringelblume, Tagetes), aber auch durch gefärbte Fleischfasern ersetzt. Das Safranpulver wurde durch Kurkuma- oder Paprikapulver, Sandelholz [Wichtl, 2002], Sand, Kreide oder Mineralsalze [Teuscher, 2002] gestreckt. So konnte man mit geringen Mengen echter Ware auskommen und das Gewicht deutlich erhöhen. In manchen Fällen hatte die Ware, die als Safran ausgegeben wurde, nicht mehr das Geringste mit Safran zu tun.

Da sich der mitteleuropäische Safranhandel im Mittelalter auf Nürnberg konzentrierte, gab es dort auch die ersten Versuche, Safranfälschungen zu unterbinden. Neben grausamen Strafen, die jeden erwarteten, der es wagte, gefälschten Safran nach Nürnberg zu schmuggeln oder dort zu verkaufen, wurde in Nürnberg die erste so genannte „Safranschau“, eine städtische Schauanstalt zur Prüfung des Safrans, entwickelt. Dort musste jeder Safranimporteur seine Ware prüfen lassen. Gefälschte Ware wurde sofort vernichtet und der Fälscher schwer bestraft. Die Ware kam meist aus den Hauptanbaugebieten und Handelszentren in Italien, Spanien und Frankreich nach Nürnberg und wurde von dort ins restliche Europa vertrieben.

Ab dem 15. Jahrhundert gab es auch in Deutschland und Österreich eine namhafte Safranproduktion. In der Schweiz sind Safrankulturen bereits ab dem 13. Jahrhundert

bekannt, dort wurden sogar eigene Safranzünfte errichtet, um einen korrekten Anbau und Vertrieb zu gewährleisten und Fälschungen zu unterbinden [Gööck, 1981].

Im **18./19. Jahrhundert** wurde der Safranbau vielerorts wieder eingestellt [Katzner und Fansa, 2007], und auch der Safranhandel verlor seine große Bedeutung. Die möglichen Gründe dafür sind vielfältig. Sicher spielte die wachsende Industrialisierung (künstliche Farbstoffe sind billiger!) und die sinkende Rentabilität eine Rolle. Safran kam mehr und mehr aus der Mode und brachte deshalb nicht mehr den erwünschten Gewinn.

2.4.2 Medizinische Verwendung in Mittelalter und Antike

Safran wurde praktisch in der gesamten mittelalterlichen Heilkunde als Medikament benutzt. Die medizinische Verwendung erstreckt sich über ein unglaublich breites Spektrum an verschiedensten Leiden wie Atemnot, Hustenreiz, Fieber, Zahnschmerzen, Rachenschmerzen, Dysenterie, Schlaflosigkeit, Magen-Darm-Beschwerden, Erkrankungen der Leber und Milz, Herzleiden, Erbrechen von Blut, „Blut in den Augen“, u.v.m. - wobei in den seltensten Fällen ein konkreter Wirkmechanismus beschrieben wird [Schnell, 2007].

Auch die alten Griechen berichten über die Wirkung von Safran gegen diverse Entzündungen, Magengeschwüre, Brust- und Nierenleiden, Störungen der Sexualität, sowie Trunkenheit. Dioskurides weist auch auf die tödliche Wirkung des Safrans, sowie auf seine harntreibenden, adstringierenden und abortiven Eigenschaften hin [Schnell, 2007].

Oft wurden Pflanzen aus althergebrachter Tradition (mit sogenanntem „Erfahrungswissen“) als Heilkräuter verwendet. Vielen dieser angeblichen Wirkungen liegt auch die mittelalterliche Humoralpathologie, oder Vielsäftelehre, zu Grunde. Da Safran als „warme“ Substanz galt, wurde sie für sämtliche Leiden angewendet, die durch zu große Kälte oder Feuchtigkeit entstehen sollten: Herzschwäche, Erkrankungen der Leber oder Milz, Magenbeschwerden und ähnliches [Schnell, 2007].

Einige Anwendungen von Safran als Heilmittel lassen sich auch durch die im Mittelalter stark verbreitete „Singularitätsmagie“ und „Similemagie“ erklären. So

wurden einzelnen, seltenen, wertvollen Gegenständen (zu denen der Safran ohne Zweifel gezählt werden konnte) besondere magische Kräfte zugeschrieben. „Similemagie“ bezeichnet die Heilung durch die magische Kraft des Ähnlichen, durch ähnliche Formen oder Farben. So liegt auf der Hand, warum Safran mit seiner auffällig scharlachroten Färbung als Wunderheilmittel gegen Blutungen aller Art gesehen wurde [Schnell, 2007].

Die antike und frühmittelalterliche Begeisterung des Safrans als Heilmittel nahm im späteren Mittelalter immer mehr ab [Schnell, 2007]. Manche der Wirkungen, die Safran damals zugeschrieben wurden, können jedoch heute, durch moderne medizinische Forschung, tatsächlich nachgewiesen werden [Mohajeri et al., 2007; Premkumar et al., 2006; Jessie und Krishnakantha, 2005; Abe und Saito, 2000].

2.5 Safranbau in Österreich

Durch das große Ansehen und die vielseitige Verwendung von Safran breitete sich nicht nur der Handel im Mittelalter in Europa aus, auch der Anbau der Safranknollen wurde aufgrund der kürzeren Transportwege und der Kostenersparnis gerne gepflegt.

In Österreich wurde Safran ab dem 15. Jahrhundert, vorwiegend in niederösterreichischen Weinbaugebieten wie der Wachau und im Süden Wiens, angebaut. Der so genannte *Crocus austriacus* war trotz des kühleren Klimas von besonderer Qualität und genoss einen sehr guten Ruf in ganz Europa. Im Jahre 1807 exportierte Niederösterreich fast 4000kg Safran, wobei die Stadt Krems als Hauptstadt des Safranhandels fungierte [Till, 2004].

Trotz der einstigen Popularität des *Crocus austriacus* wurde auch der österreichische Safranbau im späten 19. Jahrhundert, wahrscheinlich aufgrund der sinkenden Nachfrage, eingestellt und vergessen.

Erst seit wenigen Jahren wird diese alte Tradition des Safranbaus von innovativen österreichischen Bauern wieder aufgegriffen und weiterkultiviert.

Eine dieser neuen Safransorten, der „Pannonische Safran“, wird seit 2006 in Klingenbach im Burgenland, in einer warmen, sonnigen Gegend, auf 1,5 Hektar Land angebaut. Da es sich um ein qualitativ hochwertiges Produkt handelt, werden die Narbenäste nach der Ernte insgesamt drei Mal von Hand selektiert (um Griffelreste zu entfernen), und bei 45-50°C konstanter Temperatur einige Stunden lang getrocknet. So kann sich das Aroma des Safrans optimal entfalten und die feine Honignote, die bei industriellen Röstprozessen oft verloren geht, behalten.

Nach Ernte und Trocknung wird Pannonischer Safran ausschließlich in Form ganzer Fäden, in aromatischeren Aludosen, verkauft. Neben dem direkten Verkauf des Gewürzes werden auch innovative Produkte wie Safrannudeln, Safranhonig oder Safranpralinen auf den Markt gebracht.

Ziel des österreichischen Safranbaus ist es, das in Vergessenheit geratene Gewürz wieder aufleben zu lassen und qualitätsbewusste Konsumenten für den heimischen Safran zu begeistern.

2.6 Chemische Inhaltsstoffe

Safran enthält ein Gemisch aus intensiven Farb- und Geruchsstoffen, die sich hauptsächlich aus den Familien der Carotinoide, Flavonoide und Terpene herleiten.

Einige dieser Stoffe werden bereits vor der Ernte gebildet, andere entstehen erst im Laufe der Verarbeitung und Reifung. Menge und Verhältnis der Hauptinhaltsstoffe sind je nach Sorte unterschiedlich, und hängen stark mit der Art der Trocknung, Extraktion, und Lagerung zusammen [Caballero-Ortega et al., 2007].

2.6.1 Farbstoffe

Bei der Ernte tragen die Safranfäden eine satte, glänzend rote Farbe, die im Zuge des Trocknungsprozesses matter wird. Safranextrakte und Speisen, die mit Safran gewürzt wurden, zeigen je nach Konzentration eine gelbe bis orange Färbung.

Die gelbe Farbe des Safrans wird durch die Ester des **Crocetins**, eines Carotinoids mit kurzer Kohlenstoffkette (20 C-Atome) und zwei Carboxylgruppen an den Enden, hervorgerufen. Diese sogenannten **Crocine** sind wasserlösliche Mono- und Diester des wasserunlöslichen Crocetins mit unterschiedlichen Kohlenhydraten: β -D-Glucose, β -D-Gentiobiose oder β -D-Neapolitanose.

Die Wasserlöslichkeit der Crocine kommt durch den Zuckeranteil zustande [Wichtl, 2002].

Die gelbe Farbe entsteht durch die konjugierten Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette und die damit verbundene Lichtabsorption.

Die Hauptkomponente der gelben Safranfarbe ist das **α -Crocin**, das etwas kürzer ist als das verwandte Carotinoid β -Carotin, und an beiden Enden der Kohlenstoffkette ein Gentiobiose-Molekül trägt.

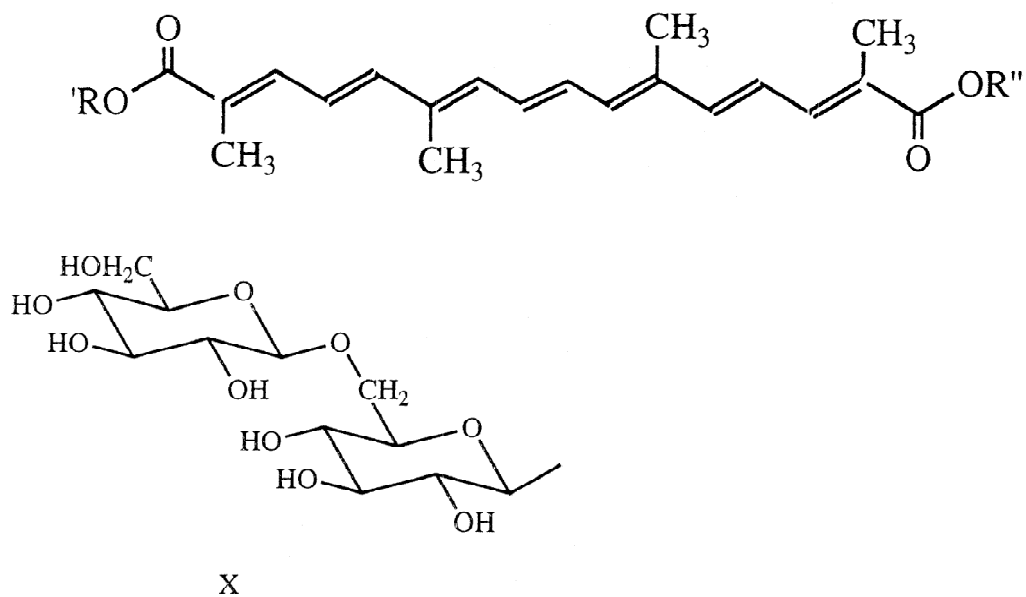


Abbildung 2: Strukturformel von Crocetin ('R, R''= H) und Crocin ('R, R''= X) [Li et al., 1999]

Zusätzlich lassen sich in Safranextrakten auch Spuren von freiem Crocetin (α -Crocetin), Methylcrocetin (β -Crocetin) und trans-Dimethylcrocetin (γ -Crocetin) finden [Teuscher, 2002]. Crocine werden vor oder während der intestinalen Absorption wahrscheinlich zu Crocetin hydrolysiert. Crocetin wird zumindest teilweise zu Mono- und Diglucuroniden metabolisiert [Asai et al., 2005].

Auch andere, wasserlösliche und wasserunlösliche, Carotinoide wie **β - und γ -Carotin**, **Lycopin** und **Zeaxanthin** sind in geringeren Konzentrationen im Safrangewürz enthalten [Teuscher, 2002].

Aufgrund der C=C-Doppelbindung sind alle Carotinoide, wie Crocine, vor allem bei Licht und Hitze, leicht oxidierbar. Durch die Oxidation wird die aktive Verbindung zerstört und die damit verbundene Farbwirkung verringert. Andererseits bedeutet dies, dass andere Moleküle oder Körperzellen durch die Anwesenheit von Crocinen vor Oxidation geschützt werden können. Das ist eine der Eigenschaften der Carotinoide, die ihre antioxidative Wirkung bedingt (siehe 2.7.2).

2.6.2 Aromastoffe

Der Geruch von Safran lässt sich als intensiv, durchdringend und leicht medizinisch/iodoform beschreiben [Katzner und Fansa, 2007]. In hohen Dosen kann er sogar etwas betörend und unangenehm riechen, im Geschmack ist er würzig, leicht bitter, und etwas scharf [Teuscher, 2002].

Die charakteristische Aroma- und Geschmackskomponente des Safran ist das **Safranal** (= 2,6,6-Trimethyl-1,3-Cyclohexadien-1-Carboxaldehyd) - ein ätherisches Öl, das im Laufe der Trocknung durch Glykosidspaltung und Oxidation aus dem Ausgangsstoff Picrocrocin entsteht.

Picrocrocin, ein bitter schmeckendes Monoterpenglycosid, das seinerseits möglicherweise aus dem Carotinoid Zeaxanthin entsteht [Gregory et al., 2005], ist hauptsächlich im ungetrockneten Safran zu finden, und bewirkt einen bitteren Beigeschmack [Wichtl, 2002].

Die Glykosidspaltung kann entweder durch saure Hydrolyse, oder durch das Enzym β -Glucosidase katalysiert werden. Dabei entsteht nach Abspaltung der Glucose **HTCC** (4-Hydroxy-3,6,6-Trimethyl-1-Zyklohexen-1-Carboxaldehyd), das durch Wasserabspaltung (bei Hitzeeinwirkung) zu Safranal metabolisiert wird. [Kanakakis et al., 2004]

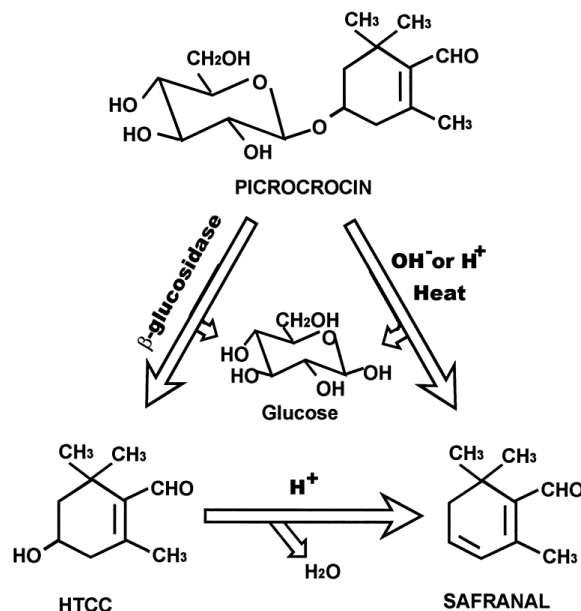


Abbildung 3: Chemische und enzymatische Konversion von Picrocrocin zu HTCC und Safranal [Lonzano et al., 1999]

Sowohl Safranal als auch HTCC sind typische Aromakomponenten von Safran, wobei Safranal mit ca. 47% der flüchtigen Stoffe [Teuscher, 2002] den Großteil des Aromas bewirkt.

Weitere Geruchskomponenten des Safrans sind beispielsweise Isophoron (3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-on), 3,5,5-Trimethyl-3-cyclohexen-1-on (Isophoron-Isomer), 2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1,4-dion oder 2,6,6-Trimethyl-1,4-cyclohexadien-1-carboxaldehyd (Safranal-Isomer) [Tarantilis et al., 1997], sowie die Monterpene α - und β -Pinen, und 1,8-Cineol [Wichtl, 2002].

2.6.3 Weitere Inhaltsstoffe

Neben Farb- und Aromastoffen enthalten Safran-Narbenäste noch 7-10% fettes Öl [Teuscher, 2002], Vitamin B2 (0,01% des Trockengewichts), Heteropolysaccharide (5,2% Pentosane, 6% Pektine) und ca. 13% Stärke [Wichtl, 2002].

2.6.4 Inhaltsstoffe der Tepalen

In den weitgehend unerforschten **Safranblüten** (Tepalen) finden sich weitere farbgebende Stoffe wie die **Flavonoide** Kämpferol-7-O-sophorosid und Kämpferol-3-O-glucosid [Kubo et al., 1999], die leicht zu Kämpferol hydrolysiert werden können. Neben ihrer Farbwirkung zeigen diese Flavonoide auch bedeutende Fähigkeiten als Antioxidantien und Tyrosinase-Inhibitoren [Kubo et al., 1999].

Vor einigen Jahren konnten erstmals **Monoterpene** der Art Crocusatin, sowie die 4-Dihydroxybuttersäure, aus dem methanolischen Extrakt der Safran-Tepalen isoliert werden. Auch die Crocusatine zeigten signifikante Anti-Tyrosinase-Aktivität, und bewiesen sich als wichtige Radikalfänger im DPPH-Radikal-Modell [Li et al., 2004].

Tyrosinase, auch bekannt als Polyphenoloxidase (PPO), ist das Schlüsselenzym für die Melaninsynthese und bei der enzymatischen Bräunung von Obst und Gemüse. Deshalb werden Tyrosinase-Inhibitoren immer wichtiger in der lebensmitteltechnologischen, wie auch in der medizinischen und kosmetischen Industrie [Kubo et al., 1999].

Hosseinzadeh und Younesi (2002) fanden nicht genauer klassifizierte **Flavonoide**, **Tannine** und **Anthocyane** in ihren Tepalen-Extrakten, und stellten fest, dass diese in

ethanolischer Lösung anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen. Der LD50-Wert der Tepalen war um einiges geringer als der der Narbenäste, weshalb die Tepalen als „schwach toxisch“ eingestuft wurden. Die Narbenäste wurden als „ziemlich toxisch“ klassifiziert.

Termetzi und Kokkalou (2008) stellten schließlich mittels LC-DAD-MS fest, dass die Hauptbestandteile der Tepalen Kaempferol, Quercetin, Naringenin und einige Flavanon- und Flavanol-Derivate sind.

Zusammengefasst wurden aus den Tepalen der Safranblüte bisher verschiedene Flavonoide, Tannine, Anthocyane und Monoterpene isoliert. Dies scheinen die Hauptbestandteile, sowie die Farb- und Geruchgebenden Komponenten der Tepalen zu sein. Sie stehen im Zusammenhang mit der antioxidativen, tyrosinase-hemmenden und anti-inflammatorischen Wirkung der Tepalen, und bewirken eine wesentlich geringere Toxizität als die Inhaltsstoffe der Narbenäste.

2.6.5 Bestimmungsmethoden

Die Inhaltsstoffe und deren Gehalt können durch Bestimmung des Färbevermögens, mit Hilfe der HPLC (Crocetinester, Picrocrocin, Safranal, Flavonoide) oder GC (Safranal) bestimmt werden. Die unterschiedliche chemische Beschaffenheit der Hauptinhaltsstoffe von Safran stellen eine gewisse Problematik für ihre synchrone Analyse dar: die Flüchtigkeit von Safranal, verschiedene Polaritäten der Inhaltsstoffe, und die rasche Zersetzung von Picrocrocin gleich nach der Extraktion. Diese unterschiedlichen Eigenschaften machen differenzierte Analysesysteme wie thermale Desorptions-GC, HPLC mit weiter Polaritäts-Spannweite und superkritische CO₂-Extraktion zur Analyse von Safran nötig [Gregory et al., 2005].

Unter UV-Licht zeigt Safran keine Fluoreszenz. Da viele der Pflanzen, die für Verfälschungen herangezogen werden (Kurkuma, Ringelblume, Saflor) jedoch sehr stark fluoreszieren, wird diese Methode oft zur Prüfung auf Verunreinigungen genutzt [Teuscher, 2002].

Die Hauptbestandteile der Safran-Narbenäste waren laut einer Studie von Caballero-Ortega et al. (2007) in 11 verschiedenen unabhängigen Proben gleich: Picrocrocin, HTCC, Safranal, 3-Gentiobiosyl-Kaempferol, trans-Crocetin 4, trans-Crocetin 3, trans-

Crocetin 2', cis-Crocetin 4, trans-Crocetin 2, cis-Crocetin 2. Lediglich die Anteile der Inhaltsstoffe variierten teilweise stark, zum Beispiel aufgrund des unterschiedlichen Trocknungszustandes und den damit verbundenen Safranal-Gehalten. Die qualitative Analyse wurde mit einer C18-Umkehrphasen-HPLC und anschließender MRFAB-MS durchgeführt, für die quantitative Analyse der Aromakomponenten Safranal und HTCC waren zusätzliche Methoden wie GC, Dampfdestillation, Ultraschall-Extraktion und Vakuum Headspace nötig.

Mit SPME-GC-MS konnten in einer Studie von D'Auria et al. (2004) noch genauere Unterscheidungen zwischen den Aromakomponenten getroffen, und neue Aroma gebende Moleküle in Safranproben entdeckt werden. Durch die hohe Sensibilität der Methode wurden in dieser Studie unterschiedliche Aromakomponenten in verschiedenen Safranproben entdeckt.

Es scheinen also sowohl die Behandlungsmethode, als auch die natürliche Zusammensetzung der Aromakomponenten, auf das Safranaroma Einfluss zu nehmen.

2.7 Wirkung & Neuere Medizinische Erkenntnisse

Von den im Mittelalter und der Antike postulierten Wirkungen des Safrans sind in heutiger Zeit nur noch wenige wissenschaftlich belegt und in medizinischen Studien nachweisbar.

Aufgrund seiner Bitter- und Aromastoffe entfaltet Safran, wie die meisten Gewürze, eine verdauungsfördernde und appetitanregende Wirkung [Teuscher, 2002].

In der Volksmedizin wird Safran noch heute als Arzneidroge bei Nervosität, Krämpfen und Asthma verwendet, in der chinesischen Medizin als Mittel gegen Husten, Dysmenorrhoe, bei Hämatomen, Depressionen, Krämpfen und Nervosität eingesetzt. Hier ist eine Tagesdosis von 0,5 bis 1,5g Safran die Regel [Teuscher, 2002].

2.7.1 Toxische Wirkung

Allgemeine Toxizität:

Von der pharmakologischen Bedeutsamkeit des Safran zeugt unter anderem seine Toxizität: In hohen Dosen entfaltet Safran eine stark toxische Wirkung, die das zentrale Nervensystem angreift, sowie Leber und Niere schädigt [Chang et al., 1964].

5-10g Safran haben schwere Vergiftungszustände zur Folge, gekennzeichnet durch Schwindel, Benommenheit, Blut in Harn und Stuhl und rauschartige Zustände. Auch geringere Dosen können bereits zu Unruhe, unregelmäßigem Puls und Schlafstörungen führen [Till, 2004]. Safran führt zu einer verstärkten Durchblutung der Organe, was im Fall des Uterus zu Blutungen und einer abortiven Wirkung führen kann [Kommission E, 1987].

Die tödliche Dosis für den Menschen liegt nach heutigen Erkenntnissen bei 20g, die Abortivrate bei 10g Safrangewürz [Kommission E, 1987].

Um die Gefahr einer medizinischen Intervention mit Safran auszuschließen, testeten Mohajeri et al. (2007) die Toxizität von Safran an Wistar-Ratten. Nach täglicher Verabreichung von 0.35-1.05g/kg (= 10-30% der LD50) ethanolischem Safran-Extrakt über zwei Wochen wurden verschiedene Leber-, Nieren- und Blutparameter der Ratten getestet. Neben einem dosisabhängigen Gewichtsverlust konnte eine Verringerung des

Hb, HCT und der Anzahl an roten Blutkörperchen, sowie eine Erhöhung der Anzahl an weißen Blutkörperchen festgestellt werden. Die Ratten zeigten erhöhte Harnstoff-, Harnsäure- und Kreatininwerte, sowie eine Erhöhung der Markerenzyme ALT und AST. Leber- und Nierenbiopsien zeigten deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie. Die Studienergebnisse bestätigen die toxische Wirkung von Safran in hohen Dosen ($LD_{50} = 3,5\text{g/kg}$) und beschreiben eine Schädigung der Niere und Leber, sowie einiger Blutzellen.

Hosseinzadeh und Younesi (2002) beschrieben, dass die LD_{50} im Tierversuch mit Mäusen für Wasserextrakte der Narbenäste bei $1,6\text{g/kg}$, für ethanolische Extrakte der Narbenäste bei $3,38\text{g/kg}$ lag. Dies entspricht einer Toxizitäts-Klassifikation von „relativ toxisch“ [Loomis, 1968]. Die Tepalen erwiesen sich als wesentlich weniger toxisch und wurden folglich als „schwach toxisch“ klassifiziert.

Mutagenität:

Da Mutationen einen wichtigen ersten Schritt in der Kanzerogenese darstellen, ist es sinnvoll, pharmakologisch wirksame Substanzen auf ihre mögliche Mutagenität zu testen.

Im AMES-Test mit dem TA98-Salmonellenstamm zeigte sich Safran nicht mutagen, sowie nicht signifikant antimutagen bei BP(Benzo(a)-Pyren)-induzierter Mutagenität. Es wurde jedoch ein dosisabhängiger co-mutagener Effekt (d.h. die Mutagenität einer mutagenen Substanz wurde durch Safran erhöht) bei 2-AA(2-Aminoanthracen)-induzierter Mutagenität beobachtet, der höchstwahrscheinlich auf Safranal zurückzuführen ist [Abdullaev et al., 2003].

Teratogenität:

Trotz der in früheren Zeiten bekannten und genützen Wirkung von Safran als Abortivum oder Wehen induzierendes Mittel, sind heute kaum aktuelle Studien zu diesem Thema auffindbar.

Eine Studie von Martin et al. (2002) stellte sich die Frage, ob Crocetin teratogene Wirkung entfaltet, und testete dies an *Xenopus*(=Frosch)-Embryos, da morphologische Veränderungen in Froschembryos bereits erfolgreich als Prognosemodell für biologische Risiken bei Säugetieren herangezogen wurden. Die getesteten

Konzentrationen rangierten zwischen 10 und 200µM Crocetin, wobei die Froschembryos ab 100µM Crocetin signifikant in ihrer Entwicklung beeinträchtigt wurden. Lässt sich der Rückschluss auf Säugetiere tatsächlich ziehen, würde dies bedeuten, dass Crocetin auch beim Menschen teratogene Effekte entfalten kann.

Bei einer Tagesdosis von bis zu 1,5g wurden beim Menschen bisher keine negativen Wirkungen beobachtet [Teuscher, 2002]. Eine normale Dosierung zum Würzen von Speisen (3-4 Fäden pro Person) führt daher auch bei täglichem Konsum zu keiner akuten oder chronischen Intoxikation.

2.7.2 Antioxidative Wirkung

Antioxidantien sind Stoffe, die die Fähigkeit besitzen, reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) zu inaktivieren [Knasmüller et al., 2008], und damit die oxidative Schädigung anderer Moleküle und Zellen zu verhindern. Oxidative Zellschädigung steht im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs und Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen, sowie mit dem generellen Alterungsprozess unserer Zellen [Gutteridge and Halliwell, 1994], somit ist es wünschenswert, eine starke oxidative Belastung des Körpers („Oxidativen Stress“) zu vermeiden.

Zu den antioxidativ wirksamen Stoffen zählen neben körpereigenen Enzymen (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) und Vitaminen (C und E) auch die in der Natur vorkommenden sekundären Pflanzenstoffe wie z.B. Carotinoide, Flavonoide [Wiseman, 1996], Anthocyane, und Polyphenole [Kasper, 2004].

Da Safran hohe Konzentrationen an Carotinoiden (Crocine, Carotine), sowie kleinere Mengen an Flavonoiden und Terpenen aufweist, lässt sich vermuten, dass er antioxidative Wirksamkeit besitzt.

Zum Beweis wurden wissenschaftliche Studien durchgeführt, die diese Annahme bestätigen:

Pellegrini et al. (2006) verglichen die Total Antioxidant Capacity (TAC) verschiedener italienischer Lebensmittel und Gewürze, und stellten fest, dass Safran unter den Gewürzen die mit Abstand höchsten antioxidativen Werte in allen Testvariablen (FRAP, TRAP, TEAC) erzielte.

Assimopoulou et al. (2005) testeten die *radical scavenging activity* (RSA, Radikalfängeraktivität) von Safran in Methanol, sowie die RSA der Hauptbestandteile Crocin und Safranal. Dabei wurden die Testsubstanzen (methanolischer Extrakt von Safran-Narbenästen, Crocin, Safranal), sowie die Negativkontrolle (Methanol) mit einer dunkelvioletten gefärbten DPPH-Radikal-Lösung versetzt und die Lichtabsorption bei 517nm, sowie die Konzentration des DPPH-Radikals photometrisch gemessen.

Zeigte die Testsubstanz RSA (antioxidative Wirkung), wurde das DPPH-Radikal verbraucht, und die Lichtabsorption veränderte sich. So konnte eine Kalibrationskurve erstellt werden, aus der sich die RSA der Testsubstanzen ablesen ließ. Als Positivkontrolle wurde die Kaffeesäure, ein starker DPPH-Radikal-Scavenger, herangezogen.

Das Safranextrakt zeigte bei einer Konzentration von 2000 ppm eine RSA von über 40% der RSA der Kaffeesäure, Crocin bei 500 ppm 48%, und Safranal bei 500 ppm 34%. In allen untersuchten Proben war die RSA dosisabhängig signifikant. Es zeigte sich, dass sowohl der methanolische Safran-Extrakt, als auch die isolierten Inhaltsstoffe des Safran, deutliche antioxidative Wirkung entfalteten.

In einer Studie von Masutani et al. (2009) konnte außerdem festgestellt werden, dass aromatische, ungesättigte Aldehyde wie Safranal das Thioredoxin-Gen (einen wichtigen Redox-Regulator im menschlichen Körper) induzieren, und so das antioxidative responsive element (ARE) aktivieren können.

Papandreou et al. (2006) untersuchten die antioxidative Wirkung von Safran und seinen Einfluss auf A β -Aggregation und Fibrillogenese im Zusammenhang mit Alzheimer. Das Methanol-Wasser-Extrakt der Narbenäste (50:50) zeigte im Ferrin-Reduktionstest (FRAP), sowie im Trolox-Äquivalenztest (TEAC) eine signifikante antioxidative Wirkung. Die Tatsache, dass trans-Crocin-4, der Digentobiosylester von Crocetin, die Fibrillogenese schon bei geringeren Konzentrationen verhinderte als Dimethylcrocetin, spricht dafür, dass die Präsenz des Kohlenhydrats Gentiobiose die Wirkung des Carotinoids verstärkt.

Der Effekt von Safran auf die Lipidperoxidation, ausgelöst durch genotoxisch wirksame Substanzen, wurde 2003 von Premkumar et al. in einem Tierversuch getestet. Dabei erhielten Albinomäuse 3 verschiedene Dosen Safranextrakt (20, 40, 80mg/kg KG) an

fünf aufeinander folgenden Tagen. Nach dem fünften Tag wurden die Mäuse mit genotoxischen Substanzen (Cisplatin, Cyclophosphamid, Mitomycin-C, Urethan) belastet. Safran-behandelte Mäuse zeigten eine signifikant geringere Lipidperoxidation, sowie einen Anstieg der enzymatischen (SOD, CAT, GST, GPx) und nicht-enzymatischer Antioxidantien (reduziertes Glutathion) der Leber. Der protektive Effekt zeigte jedoch keine Dosisabhängigkeit. Die Wirkung von 40mg/kg des Extraktes konnte durch höhere Dosen nicht mehr gesteigert werden. Durch die Gabe von Safran konnte die negative Einwirkung der Genotoxine zwar verringert, jedoch nicht aufgehoben werden. Keine der Safran-Interventionsgruppen konnte die Werte der Kontrollgruppe (keine Genotoxine) erreichen.

Oroudi et al. (2009) stellten in den Vordergrund, dass es nicht unbedeutend ist, mit welcher Methode man die antioxidative Kapazität einer Substanz misst, und dass es sich empfiehlt, mehrere Methoden gleichzeitig zu testen (siehe auch Frankel et al., 2000). So zeigte sich in ihrer Studie, dass Safranextrakte eine starke intrazelluläre antioxidative Wirkung entfalten, die gut durch Tests mit humanen Monozyten, durch herkömmliche Methoden zur Evaluierung phenolischer Antioxidantien (ABTS, ORAC, DPPH) jedoch nicht richtig ermittelt werden kann.

2.7.3 Antikanzerogene Wirkung

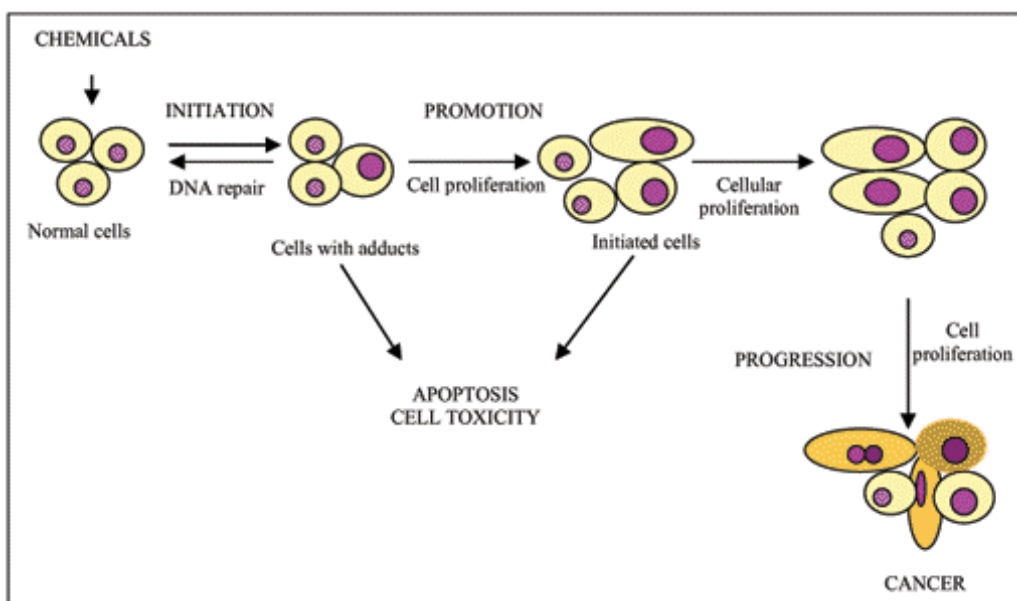


Abbildung 4: Phasen der chemischen Kanzerogenese [Internetquelle, 12.11.2009]

Die Kanzerogenese besteht aus drei Phasen: Initiation, Promotion und Progression.

Bei der Initiation wird die DNA einer gutartigen Zelle durch äußere Einflüsse physikalischer (UV-Strahlung), chemischer (Acrylamid, Nitrosamine) oder viraler (HPV) Art stark verändert. Diese Veränderung kann meist durch DNA-Reperaturmechanismen korrigiert werden, manchmal führt sie jedoch dazu, dass die Zelle entartet.

Entartete (sog. initiierte) Zellen werden durch verschiedene Kontrollmechanismen am Wachstum gehindert (z.B. über interzelluläre Verbindungen mit Nachbarzellen) bzw. durch induzierte Apoptose unschädlich gemacht. Die Zellen werden so lange am Wachstum gehindert, bis eine Promotorsubstanz sie zur Tumorbildung stimuliert.

Im letzten Schritt, der Progression, wird die prämaligne Zelle zur invasiv wachsenden Tumorzelle, die nicht mehr differenziert ist, schnell wächst, und keine Ähnlichkeit mehr mit der Ausgangszelle hat [Kasper, 2004].

Verschiedene Nahrungs- und Umweltfaktoren haben nachgewiesenermaßen großen Einfluss auf die Tumorentstehung. Sie können als Karzinogene, Co- oder Präkarzinogene die Initiation fördern, oder Zellen schützen, Schadstoffe absorbieren und die Immunabwehr stärken und damit die Bildung von Tumoren hemmen [Elmadfa und Leitzmann, 2004].

Zu den bekanntesten krebserregenden Substanzen in der menschlichen Ernährung zählen unter anderem Mykotoxine, Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), Pyrolyseprodukte und Nitrosamine [Kasper, 2004]. Als Initiatoren der Krebsentstehung kommen neben chemischen Kanzerogenen auch freie Radikale in Frage.

Antioxidantien haben die Fähigkeit, freie Radikale zu neutralisieren, oder durch DNA-Methylierung zu verhindern, dass DNA-Addukte gebildet werden [Biesalski, 2007]. Carotinoide können zudem möglicherweise Zellverbände stabilisieren, indem sie über Gap Junctions (intrazelluläre Verbindungen) die Promotion initiiert Zellen verhindern [Kasper, 2004].

Einige Safran-Inhaltsstoffe haben bereits *in vitro* antioxidative Wirkung gezeigt (Kap. 2.7.2).

In aktuellen wissenschaftlichen Studien wurde zusätzlich zur antioxidativen Wirkung die direkte Einwirkung von Safran-Inhaltsstoffen auf Krebszellen untersucht:

Bereits 1996 stellte die Forschergruppe Escribano et al. fest, dass Crocin, Safranal und Picrocrocin aus Safran das Wachstum menschlicher Krebszellen hemmen können. Die dazu verwendeten HeLa-Zellen zeigten bei 2.3mg/ml Safran-Extrakt 50% Zytotoxizität. Das Zellwachstum wurde mit allen drei Testsubstanzen (Crocin, Safranal und Picrocrocin) dosisabhängig signifikant gehemmt. Bei Crocetin konnte keine Verringerung der Zellproliferation festgestellt werden. Als möglicher Wirkmechanismus wird in dieser Studie eine induzierte Apoptose genannt, da die crocinbelasteten Zellen unter dem Mikroskop morphologische Veränderungen aufwiesen, die auf induzierte Apoptose deuten (Sternenform, Schrumpfen, Vakuolenartige Bereiche im Zytoplasma).

Abdullaev et al. (2003) bestätigten die cytotoxische Wirkung von Safran auf Tumorzellen in einem Versuch mit normalen (CCD-18Lu) und malignen (HeLa, A-204 und HepG2) Zellen. Er stellte fest, dass die dosisabhängige Wachstumshemmung der malignen Zellen von den Carotinoiden im Safran ausgeht. Crocetin zeigte bereits in früheren Studien dieses Autors hemmende Effekte auf DNA-, RNA- und Proteinsynthese in menschlichen Tumorzellen [Abdullaev, 1994], Safranextrakt hemmte die zelluläre Nukleinsäuresynthese, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proteinsynthese in Tumorzellen [Abdullaev und Frenkel, 1992].

Auch Tavakkol-Afshari et al. (2008) vermuteten den apoptotischen Zelltod hinter der hemmenden Wirkung von Safran auf das Zellwachstum von Tumorzellen. In dieser Studie wurden maligne (HeLa und HepG2) sowie nicht maligne (L929) Zellen untersucht, und festgestellt, dass die Zellviabilität (MTT-Test) der malignen Zellen von Safran-Extrakten dosis- und zeitabhängig signifikant verringert wurde. Die nicht-malignen Zellen wurden nur geringfügig in ihrem Wachstum gehemmt. Von den toten malignen Zellen waren ungefähr 20-30% apoptotisch.

Auch in vivo wurde die antikanzerogene Wirkung von Safran bereits erfolgreich belegt. In einem Mausmodell untersuchten Premkumar et al. 2006 die Wirkung von Safran auf die genotoxische Wirkung dreier bekannter Anti-Tumor Wirkstoffe (Cisplatin, Pyclophosphamid, Mitomycin). Mittels Comet Assay wurde die Genotoxizität der drei Testsubstanzen ermittelt, wobei die DNA-Schäden durch tail length, tail moment und % DNA in Tail charakterisiert wurden. Den Mäusen wurden an fünf hintereinanderfolgenden Tagen drei verschiedene Dosen Safran verabreicht (20, 40 und 80mg/kg), anschließend wurden sie mit den Genotoxinen belastet und ihre Knochenmarkszellen im Comet Assay auf DNA-Schäden untersucht. Bei den mit Safran vorbehandelten Mäusen konnte eine signifikant geringere Genotoxizität der Knochenmarkszellen (im Vergleich zur Positivkontrolle) festgestellt werden, wobei sich die Konzentration von 40mg/kg als wirksamste Konzentration erwies.

Hosseinzadeh et al. (2008) beobachteten ebenfalls im Comet-Assay den gleichen Effekt von Safran-Extrakt und Crocin auf induzierte DNA-Schädigungen an verschiedenen Mausorganen (Leber, Niere, Lunge, Milz). Safran und Crocin selbst zeigten kein genotoxisches Potential.

Diese Studien zeigen deutlich, dass Safran auch in vivo die genotoxische Wirkung anderer Substanzen verringern kann, und seine mögliche antikanzerogene Wirkung nicht nur durch antioxidative Effekte zustande kommt.

Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen Schädigung des Genoms und Krebsentstehung [Hoeijmakers et al., 2001] können Stoffe mit anti-genotoxischem Potential auch in die Krebsentstehung eingreifen und in chemopräventiven Therapien genutzt werden.

Zum molekularen **Wirkungsmechanismus** der antikanzerogenen Wirkung von Carotinoiden gibt es derzeit drei gängige Theorien:

- 1) Ihre Funktion als Antioxidantien und Quencher freier Radikale
- 2) Ihre Interaktion mit biologischen Molekülen wie der DNA [Ashrafi et al., 2005]
- 3) Förderung der Gap-Junctions-Kommunikation zwischen Zellen [Kasper, 2004]

Ashrafi et al. (2005) untersuchten die Interaktion der Carotinoide mit dem Histon H1 und halten eine Hemmung der DNA-Expression (durch eine Änderung des H1-DNA-Komplexes) als Wirkungsmechanismus für wahrscheinlich, während Hoyshar et al. (2008) feststellten, dass Picrocrocin und Safranal mit unterschiedlicher Affinität an ct-DNA und Oligonukleotide binden.

Kanakakis et al. (2007) benützten ein Kalbs-Thymus-Modell, um die Interaktion von Safranal, Crocetin und Dimethylcrocetin mit DNA zu illustrieren. Verschiedene spektroskopische Methoden wie FTIR und UV-vis wurden angewendet, um DNA-Bindungsstellen, Bindungskonstanten und Stabilität der Bindungen zwischen DNA und den Carotinoiden, sowie Safranal, zu ermitteln. Safranal zeigte keine DNA-Bindungsaktivität, schien jedoch die DNA-Helix zu destabilisieren. Crocetin und Dimethylcrocetin bildeten DNA-Addukte, darunter sowohl externe Bindungen als auch Interkalationen. Obwohl die Bindungsaffinität der DNA-Addukte gering war, konnte eine bedeutende Strukturveränderung der DNA durch die Einwirkung der Carotinoide und Safranal festgestellt werden. Crocetin und Dimethylcrocetin können also Biomoleküle wie die DNA durch Bindung schützen und ihre oxidativen Schäden so reduzieren.

2.7.4 Antithrombotische Wirkung

Die in früherer Zeit angenommene positive Wirkung von Safran auf das Herz-Kreislaufsystem ist nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen nicht unbegründet. ROS (siehe Kapitel 2.7.2) haben die Fähigkeit, zirkulierende LDL-Partikel zu oxidieren, die sich in Arterienwänden absetzen und atherosklerotische Plaques bilden können [Knasmüller et al., 2008]. Antioxidativ wirksame Stoffe wie Carotinoide können die Oxidation der LDL-Partikel verringern und so möglicherweise in die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingreifen.

Da Safran laut einigen aktuellen Studien auch Blutgerinnungsparameter in vitro positiv beeinflusst [Jessie und Krishnakantha, 2005], besteht die Möglichkeit, dass er auf mehreren Ebenen antithrombotische Wirkung entfaltet.

Jessie und Krishnakantha stellten sich 2005 die Frage, ob Safran tatsächlich auf Blutgerinnung und Lipidperoxidation beim Menschen Einfluss nehmen kann.

Sie gewannen plättchenreiches Plasma (PRP) und Plättchen-Membranen aus dem Blut gesunder Probanden und versetzten diese mit einer Vielzahl verschiedener Agonisten, die Blutgerinnung induzierten, sowie mit Safran-Extrakt. Anschließend wurde die Gerinnung bzw. Gerinnungshemmung 5 Minuten lang beobachtet und aufgezeichnet. Der gerinnungshemmende Effekt des Safran-Extraktes war dosis- und zeitabhängig signifikant.

Weiters wurde festgestellt, dass die Lipidperoxidation in den Plättchen-Membranen, die durch das Eisen-Ascorbinsäuresystem hervorgerufen wurde, vom Safran-Extrakt signifikant gehemmt wurde.

Zusätzlich wurde die Entstehung von Malondialdehyd (MDA), einem Endprodukt des Arachidonsäuremetabolismus, in den Plättchen gemessen. MDA wirkt nicht nur als Marker der Lipidperoxidation, sondern erhöht gemeinsam mit TXA₂ die Empfindlichkeit der Blutplättchen gegenüber den Antagonisten, was zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Koronare Herzkrankheiten führt. Dies zeigt, dass Safran auf mehreren Ebenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen entgegenwirken kann.

Einen Schritt weiter gingen Yang et al. in ihrer Studie 2008. Sie untersuchten den Einfluss von Crocetin auf die Blutgerinnung und stellten fest, dass Ca²⁺ Ionen bei der Hemmung der Blutgerinnung durch Crocetin eine maßgebliche Rolle spielen.

Crocetin zeigte zwar eine dosisabhängige Hemmung der durch ADP, Kollagen und AA induzierten Blutgerinnung, veränderte jedoch nicht die Bindung der Plättchen an Kollagen, oder das cAMP-Level. Der Wirkungsmechanismus von Crocetin lag offenbar in der Hemmung der Ca²⁺-Mobilisierung in aktivierten Blutplättchen, und der damit verbundenen Freisetzung der Granuloma, die schließlich die Thrombusbildung bewirken.

Weitere Studien stellten fest, dass Crocetin auch die Ca²⁺-Kanäle in den glatten Muskelzellen der Blutgefäße beeinflussen [Zhou et al., 2007], und die Anhaftung von Leukozyten an die Endothelzellen der Blutgefäße verhindern kann [Xiang et al., 2006].

Diese Erkenntnisse, gemeinsam mit der Tatsache, dass Crocetin ein wichtiger Fänger freier Radikale ist, sprechen dafür, dass dieser Stoff eine antithrombotische und antiatherogene Wirkung entfaltet.

2.7.5 Neurologische Wirkung

Auch im Bereich der neurologischen Forschung spielte Safran in den letzten Jahren eine bedeutende Rolle. Verschiedene Forscherteams konnten nachweisen, dass Safran Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson nehmen kann, und somit interessante Perspektiven für die Nervenheilkunde eröffnet.

Abe und Saito stellten 2000 in ihrem Review fest, dass Safranextrakt in einer Studie positive Effekte auf das Lernverhalten von Mäusen ausübte, die zuvor durch Ethanol in ihrer kognitiven Funktion beeinträchtigt wurden. Safran verhinderte in einigen Studien die Ethanol-bedingte Verringerung der hippocampalen Langzeit-Potenzierung, die mit Lernvermögen und Erinnerungsfähigkeit im Zusammenhang steht. Dieser Effekt wird vor allem Crocin zugeschrieben, das seine größte Wirkung bei direkter Injektion ins Gehirn entfaltete. In diesem Zusammenhang könnte Safran eine wichtige Substanz gegen Ethanol-induzierte neurodegenerative Erkrankungen, die mit Gedächtnisverlust einhergehen, darstellen.

Ahmad et al. (2005) untersuchten den neuroprotektiven Effekt von Crocetin auf Ratten mit Parkinson. Sie kamen zu dem Schluss, dass Crocetin aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften gut gegen die Zerstörung von Neuronen, die die Grundlage neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson darstellt, wirkt.

Saleem et al. (2006) beschäftigten sich mit dem Einfluss von Safran-Extrakt auf zerebrale Ischämie (Blutleere) und deren Folgen im Rattenmodell. Induzierte zerebrale Ischämie bewirkte eine signifikante Reduktion von GSH und GSH-abhängigen Enzymen, Na^+/K^+ -ATPase, SOD und CAT, sowie eine signifikante Erhöhung von Malondialdehyd, Glutamat und Aspartat. Zudem waren einige neuronal gesteuerte Verhaltensweisen stark beeinträchtigt (Spontane Bewegung, Koordination, Zugreif-Stärke). Durch die Verabreichung von 100mg/kg Safran 7 Tage vor der induzierten Ischämie konnten viele der neurologischen Beeinträchtigungen abgeschwächt werden. Histopathologische Befunde der Gehirne zeigten außerdem eine geringere Zerstörung der Neuronen nach erfolgter Ischämie und Reperfusion in den Safran-Gruppen. Da die Zerstörung der Neuronen mit oxidativem Stress im Zusammenhang steht, wird die antioxidative Wirkung von Safran als Wirkmechanismus diskutiert.

Die Forschungsgruppe Hosseinzadeh et al. hat einen Schwerpunkt auf die Erforschung von Safran in Bezug auf neurologische Erkrankungen und Funktionen bei Ratten gelegt. Dabei wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass Safranal antikonvulsive Effekte zeigt (2005), Anfälle reduziert (2007), und die extrazellulären Konzentrationen an den Neurotransmittern Glutamat und Aspartat im Ratten-Hippocampus verringert (2008). 2009 ermittelten sie außerdem den Angst lösenden (anxiolytischen), hypnotischen und motorisch-koordinativen Effekt von Safran-Wasserextrakt, sowie von Safranal und Crocin, auf Mäuse. Der Safran-Extrakt bewirkte eine dosisabhängige Einschränkung der Bewegungsaktivität, und beeinflusste die Bewegungskoordination der Mäuse maßgeblich. Im Hypnosetest zeigte eine geringe Dosis von 0,56g/kg KG Safranextrakt eine eindeutige, Schlaf verlängernde, sowie Angst lösende Wirkung. Safranal wirkte in höheren Dosen Angst lösend, sowie dosisabhängig hypnotisch und verringerte teilweise die Bewegungsaktivität. Bei Crocin konnte keine derartige Wirkung festgestellt werden.

Akhondazeh et al. stellten fest, dass sich Safranextrakt (in Kapseln) zur Behandlung milder bis moderater Depression eignet (2005). Die vierzig Probanden, alle mit einem Hamilton Depressions-Score von mindestens 18, erhielten in dieser 6-wöchigen, doppelblinden, Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie entweder eine Kapsel mit 30mg pulverisiertem Safran (Gruppe 1) oder eine Placebo-Kapsel (Gruppe 2) pro Tag. Die Safran-Gruppe zeigte ein signifikant besseres Ergebnis auf der Hamilton-Depressions-Skala als die Placebo-Gruppe, Nebenwirkungen wie Angstzustände und verstärkter Appetit waren jedoch leicht (nicht signifikant) erhöht in der Safran-Gruppe. In einer früheren Studie dieser Forschungsgruppe zeigten die Safrankapseln (30mg/d) keine signifikanten Unterschiede zum antidepressiven Wirkstoff Imipramin (100mg/d) in einem 6-wöchigen Studienverlauf (2004). In der Safrangruppe wurden wesentlich weniger Nebenwirkungen beobachtet.

Auch die Tepalen zeigten in einer weiteren Studie antidepressive Wirkung. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tepalen-Kapseln (2x tägl. 15mg) und dem Wirkstoff Fluoxetin (2x tägl. 10mg) im Laufe einer 8-wöchigen Studie (Akhondazeh et al., 2007).

Diese Studien zeigen deutlich das antidepressive Potential, das von Safran-Narbenästen und Tepalen ausgeht. Ein möglicher Wirkmechanismus wird jedoch nicht beschrieben.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sowohl Safran-Extrakt, als auch die Safran-Komponenten Safranal und Crocin, verschiedene Wirkungen auf das Nervensystem ausüben, darunter antidepressive, krampflösende und entspannende bis hypnotische Effekte. Manche Wirkungen können durch ihre antioxidativen Fähigkeiten erklärt werden, bei anderen ist der Wirkmechanismus noch nicht bekannt.

2.7.6 Sonstige Wirkungen

2.7.6.1 Wirkung auf das Immunsystem

Neben seinen antioxidativen, antikanzerogenen und neurologischen Wirkungen wird auch immer wieder, in der Naturheilkunde wie in der wissenschaftlichen Forschung, über die Wirkung von Safran auf das Immunsystem diskutiert.

Hosseinzadeh und Younesi (2002) stellten fest, dass sowohl Narbenäste, als auch Tepalen der Safranpflanze anti-inflammatorische Wirkungen zeigten. Entzündungen wurden durch Xylen bzw. Formalin induziert, und das Ausmaß der Ödembildung als Entzündungsmarker an den Testobjekten (Ratten) evaluiert. Die Narbenäste zeigten Wirkung gegen akute Entzündungsvorgänge in höheren, sowie gegen chronische Entzündungen in allen Konzentrationen. Die Tepalen entfalteten ihre anti-inflammatorische Wirkung nur im ethanolischen Extrakt gegen chronische Entzündungen.

In einer Studie von Yang et al. (2006) wurde die Wirkung von Crocetin auf die Entzündungsfaktoren TNF- α , IL-1 β und iNOS (induzierbare Stickoxidsynthase) bei hämorrhagischem Schock getestet. Die dazu verwendeten Versuchstiere (Ratten) wurden einem induzierten hämorrhagischen Schock unterzogen, in Folge dessen verschiedene Entzündungsparameter in den Körpern der Tiere anstiegen. Anschließend wurden die Tiere „wiederbelebt“. Der Interventionsgruppe wurde 2mg/kg Crocetin verabreicht, der Kontrollgruppe nichts. Aus der Leberanalyse der Tiere wurde

ersichtlich, dass die mRNA-Expression für TNF- α , IL-1 β und iNOS in den Lebern der Tiere der Interventionsgruppe wesentlich geringer als in der Kontrollgruppe war.

Auch in TNF- α -induziertem Zelltod bei PC-12-Zellen konnte Crocin den Zelltod durch Hemmung der TNF- α -induzierten DNA-Fragmentierung verhindern [Soeda et al., 2001].

Daraus lässt sich schließen, dass Crocetin die mRNA-Expression der getesteten Entzündungsfaktoren verringert, und so eine Behandlungsmöglichkeit für hämorrhagischen Schock darstellt. Diese Ergebnisse lassen jedoch auch weitere Schlüsse über den Einfluss von Crocetin und Safranextrakt auf unser Immunsystem ziehen.

2.7.6.2 *Wirkung als Aphrodisiakum*

Bereits in der Antike wurde Safran gerne als potenzsteigerndes und lustförderndes Mittel verkauft, und sollte, als Trunk oder im Parfum, seine stimulierende Wirkung entfalten.

Der Frage, ob diese Wirkung tatsächlich wissenschaftlich nachweisbar ist, gingen Hosseinzadeh et al. 2007 in einem Tierversuch mit männlichen Ratten nach. Die Ratten erhielten unterschiedliche Dosen an Safran-Wasserextrakt, Crocin, Safranal, sowie Sildenafil als Positivkontrolle. Anschließend wurde ihr Sexualverhalten nach mehreren Gesichtspunkten (Paarungshäufigkeit, Erektionshäufigkeit, Ejakulations-Latenzzeit, u.ä.) untersucht und ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass Safran-Extrakt und Crocin in hohen Dosen sämtliche Häufigkeits-Parameter steigerten, und in jeder Dosis sämtliche Latenz-Parameter verringerten. Safranal zeigte keine derartige Wirkung. Es erzielte, im Gegenteil dazu, in höheren Dosen einen beruhigenden Effekt.

Eine mögliche Erklärung für den aphrodisierenden Effekt von Crocin wäre die Hemmung der intrazellulären Ca²⁺-Ausschüttung durch Crocin und die damit verbundene Entspannung des Corpus Cavernosum, die zur Erektion führen kann.

2.8 Aktueller Stand der Wissenschaft

2.8.1 Safran und Zelltests

In Zelltests werden maligne und/oder nicht maligne Zelllinien von verschiedenen menschlichen Geweben (HepG2-Zellen aus der Leber, Caco-2-Zellen aus dem Darm, HeLa-Zellen aus Zervixepithel) auf unterschiedliche Parameter wie Zellvitalität oder DNA-Schädigung in den Zellen untersucht.

Die Eigenschaften von Safran wurden erst in wenigen Studien auf Zellebene untersucht: Escribano et al. (1996) testeten den Einfluss von Safran auf HeLa-Zellen und stellte fest, dass Safranextrakt, Crocin, Safranal und Picrocrocin das Zellwachstum dieses Zelltyps dosisabhängig hemmten. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Die LD50 (50% des normalen Zellwachstums) lag bei 2,3mg/ml ethanolischem Safranextrakt, 3mM Crocin, 0,8mM Safranal und 3mM Picrocrocin. Aufgrund des Aussehens der Zellen wurde eine induzierte Apoptose als Wirkmechanismus angenommen.

2003 wurden von Abdullaev et al. die antigenotoxischen und zytotoxischen Eigenschaften von Safran mittels AMES-Test und in vitro colony formation assay an vier verschiedenen menschlichen Zellsystemen getestet, einer nicht-mutagenen (CCD-18Lu) und drei mutagen Zelllinien (HeLa, A-204, HepG2). Im colony formation assay hemmte Safran das Wachstum der malignen Zellen, nicht jedoch das der normalen Zelllinie. Geringe Unterschiede konnten auch unter den malignen Zellen beobachtet werden. So wurden die A-204-Zellen etwas stärker gehemmt als die HepG2-Zellen, was für eine höhere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Testsubstanz spricht.

Tavakkol-Afshari et al. (2008) untersuchten ebenfalls den Einfluss von Safran auf HepG2- und HeLa-Zellen mittels MTT-Test und stellten, wenig überraschend, ebenfalls fest, dass ethanolischer Safranextrakt die Fähigkeit besitzt, die Zellviabilität dieser Zellen zeit- und konzentrationsabhängig zu hemmen. Die nicht malignen L929-Zellen wurden nicht signifikant gehemmt. Zusätzlich wurden jedoch die apoptotischen Zellen durch PI-Markierung der DNA-Fragmente bestimmt, sowie die Entstehung von ROS durch Messung des gebildeten H₂O₂ aus DCF-DA ermittelt und flowzytometrisch analysiert. Dies sollte näheren Aufschluss über den Mechanismus der Zelltoxizität von Safran geben. Da 20% der HepG2 und nahezu 30% der HeLa-Zellen Marker für

Apoptose zeigten, wird eine zumindest teilweise apoptotisch vermittelte Zytotoxizität vermutet. Der Safranextrakt erzeugte jedoch keine ROS, womit ein prooxidativer Effekt, wie er bei anderen Carotinoiden beobachtet wurde [Young and Lowe, 2001], als möglicher Wirkmechanismus ausscheidet.

2.8.2 Safran und Comet Assay

Bis dato gibt es keine Studie, die den Einfluss von Safran auf HepG2-Zellen mittels Comet Assay untersucht, und nur wenige, die sich mit Safran und Comet Assay in anderen Bereichen beschäftigen.

Eine dieser wenigen Studien, eine Untersuchung von Hosseinzadeh et al. (2008), evaluierte die Schutzwirkung von Extrakten der Safran-Narbenäste und Crocin auf Methyl-Methansulfonat(MMS)-induzierte DNA-Schädigung in mehreren Mäuseorganen. Im Gegensatz zu den Zelltests wurden die Testsubstanzen hier den Versuchstieren intraperitoneal verabreicht, die Tiere nach einigen Stunden getötet und einzelne Zellen ihrer Organe im Comet Assay untersucht. In der MMS-behandelten Mäusegruppe war die DNA-Schädigung erwartungsgemäß am höchsten, bei den Kontrollgruppen gab es keine Unterschiede zwischen Safranextrakt-, Crocin- und NaCl-behandelten Mäusen. Die MMS-induzierte DNA-Schädigung konnte sowohl durch Safran-Extrakt, als auch durch reines Crocin signifikant verringert werden. Dieses Ergebnis spricht auch für eine in vivo protektive Wirkung von Safran und Crocin auf die DNA.

2.8.3 Comet Assay und HepG2-Zellen

Der Comet-Assay dient der Detektion von DNA-Schäden in verschiedenen Arten von Zellen. Dabei können menschliche Blutzellen, Körperzellen von Versuchstieren, oder menschliche Zelllinien, wie HepG2-Zellen, verwendet werden [Anderson und Plewa, 1998].

In einer Studie von Uhl et al. (2000) wurde der Einsatz von HepG2-Zellen im Comet-Assay evaluiert. Als Testsubstanzen wurden 12 bekannte Genotoxine (u.a. Aflatoxin B1, Benzo(a)pyren) eingesetzt, die erst durch enzymatische Aktivierung genotoxisch und kanzerogen wirken, und manche dadurch in vitro ohne metabolische Aktivierung

nicht mutagen, im Tierversuch jedoch krebserregend wirken. Einige HepG2-Zellen enthalten Enzyme (Phase I + II), die eine metabolische Aktivierung der Testsubstanzen bewirken und damit weniger falsch-negative Ergebnisse erzielen als andere Zelllinien. Zehn der 12 Testsubstanzen verursachten signifikant sichtbare DNA-Schäden an den HepG2-Zellen, was für eine gute Verlässlichkeit des HepG2/Comet-Systems zur Detektion genotoxischer und DNA-reaktiver Karzinogene spricht. Die Empfindlichkeit des Testsystems ist ähnlich hoch wie bei vergleichbaren Tests (MN oder SCE) mit diesen Zellen, die Durchführbarkeit jedoch um einiges schneller.

Auch in dieser Studie wurde eine 24h-Inkubationszeit der Testsubstanzen gewählt, was sich für praktisch alle getesteten Genotoxine als sinnvoll erwies.

Aherne und O'Brien (1999) untersuchten mittels Comet Assay die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide Myricetin, Quercetin und Rutin gegen H_2O_2 -induzierte DNA-Schädigung an Caco-2 und HepG2-Zellen. Die 30-minütige Inkubation mit 50mM H_2O_2 bewirkte eine starke DNA-Schädigung, die durch Präinkubation mit den Flavonoiden vor H_2O_2 -Exposition signifikant verringert werden konnte.

Dies zeigt, dass sich der Comet-Assay auch zur Evaluation von DNA-Reperaturmechanismen eignet, und für sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide eingesetzt werden kann. H_2O_2 erwies sich als Mittel der Wahl um oxidative DNA-Schädigung in den Zellen zu induzieren.

Um im Comet Assay Genotoxizität von Zytotoxizität unterscheiden zu können, ist es wichtig, zuerst einen Zytotoxizitätstest wie den Trypanblautest durchzuführen. Der Comet Assay misst einerseits die DNA-Schäden, die durch Einwirkung einer genotoxischen Substanz entstehen, andererseits auch die DNA-Degradation, die durch Nekrose oder Apoptose entsteht. So kann es durch eine stark zytotoxische Wirkung der Testsubstanz zu falsch positiven Resultaten kommen. Um dies zu vermeiden sollten die Zellzahlen im Zytotoxizitätstest nicht weniger als 70% der Negativkontrolle betragen [Henderson et al., 1998].

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Medien

Substanz	Hersteller	Produktnummer
Amino Acids non essential	PAA Laboratories	M11-003
Dimethylsulfoxid	Sigma	D5879
Dulbecco's phosphate buffered saline	PAA Laboratories	H15002
Ethanol	Riedel-de-Haën	32221
Ethidium bromide aqueous solution	Sigma	E1510
Foetal Bovine Serum „GOLD“	PAA Laboratories	A15-151
Hydrogen peroxide, 30%	Riedel-de-Haën	31642
Low melting Agarose	Invitrogen	15517014
Minimal essential medium (MEM) with Earle's Salts and L-Glutamine	PAA Laboratories	E15-825
Normal melting Agarose	Invitrogen	15510019
Sodium chloride	Sigma	S5886
Sodium hydroxide	Sigma	S5881
Sodium pyruvate	Sigma	P2256
Tris	Sigma	T1503
Triton X-100	Serva	T8787
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories	L11-659
Trypan blue solution	Sigma	T8154

Tabelle 1: Chemikalien und Medien

3.2 Geräte und technische Ausstattung

Gegenstand	Hersteller	Produktnummer
6-well Platten	Dr. F. Bertoni	3810-006
Deckgläser (24x50mm)	Dr. F. Bertoni	990
Einmalkanülen: Terumo Neolus Nr. 18, 26Gx23, 0,45x23mm	Apotheke	Lot 0606023
Einmalspritzen, 10ml	Dr. F. Bertoni	309110

Einmalspritzen, 5ml	Dr. F. Bertoni	309050
Elektrophoresekammer, horizontal	VWR	730-1796
Handschuhe	VWR	112-2220
Neubauer Zählkammer, 0.1mm	Brand	
Nitrilhandschuhe	VWR	112-2220
Objektträger gefrostet	VWR	6311304
Spritzenfilter (45µm)	Dr. F. Bertoni	2053-025
Zellkulturflaschen, 25cm²	Dr. F. Bertoni	3103-025
Zentrifugenröhrchen, 15ml	Dr. F. Bertoni	15PPR
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Dr. F. Bertoni	36050NPG
Mikroskop	Axioskop, Zeiss; Wilovert, Hund Wetzlar	
Inkubator	Heraeus Instruments Function Line Typ BB16	
Wasserbad	GFL Müller und Scherr	
Analytische Waage	LC 4801P Sartorius	
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 20, Zeiss	
Komet 5.5, image analysis system	Kineting Imaging	
Zentrifuge	Techno Spin, Sorvall Instruments (Du Pont)	
Vortex	Heidolph REAX 2000	
Magnetplatte	Heidolph MR 3001 K	

Tabelle 2: Geräte und technische Ausstattung

3.3 Herstellung von Lösungen und Reagenzien für Zelltests

Komplementiertes Medium (500ml):

445ml Minimal Essential Medium Eagle (MEM)

50ml Fetal Bovine Serum (FBS)

5ml non essential Amino Acids

1ml Sodumpyruvat (500mM)

Unkomplementiertes Medium (500ml):

495ml Minimal Essential Medium Eagle (MEM)

5ml non essential Amino Acids

1ml Sodumpyruvat (500mM)

NaCl-Lösung (0,9%):

0,9g NaCl

100ml Aqua bidest.

Sodiumpyruvat (500mM):

1,1g Sodiumpyruvat

20ml NaCl-Lösung (0,9%)

Lösungsmittel für Safranextrakte:

80ml Ethanol

20ml Aqua bidest.

Positivkontrolle:

0,02% H₂O₂ in MEM (Inkubationszeit: 2 Stunden)

3.4 Proben

Als Proben wurden sowohl die Narbenäste, das eigentliche Safran-Gewürz, als auch die Tepalen des österreichischen Safran (*Crocus sativus austriacus*), in verschiedenen Konzentrationen, untersucht. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 80:20-Ethanol:Wasser verwendet.

3.4.1 Herkunft der Proben

Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Johannes Pinterits, Safran-Landwirt aus Klingenbach im Burgenland, zur Verfügung gestellt. Sie wurden am Vormittag des 9. Oktober 2008 in Klingenbach geerntet, und noch am selben Tag in Narbenäste, Staubblätter und Tepalen getrennt und konserviert.

Die Blüten wurden von Hand ausgelesen und in ihre Einzelteile getrennt. Als erstes wurden die Narbenäste aus der Blüte gelöst, wobei darauf geachtet wurde, den Griffel weitgehend zu entfernen. Anschließend wurden die übrig bleibenden Tepalen von ihren Staubblättern getrennt und die drei Gruppen von Blütenteilen in getrennten Gefäßen gesammelt.



3.4.2 Konservierung

Die Proben wurden wenige Stunden nach der Ernte vakuumisiert bzw. in Plastikdosen bei -80°C tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Proben wurden einen Monat später gefriergetrocknet und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C im Tiefkühler gelagert.

3.4.3 Vortests

Um festzustellen, welche Konzentration und Zusammensetzung des Lösungsmittels am besten zur Extraktion der Safranproben geeignet war, und gleichzeitig die Zellvitalität nicht beeinflusste, wurden im Vorfeld einige Voruntersuchungen durchgeführt.

3.4.4 Testen des Lösungsmittels

Da Safran aufgrund seiner teils hydrophilen, teils lipophilen Inhaltsstoffe in der Literatur meist mit Gemischen aus Wasser und organischem Lösungsmittel extrahiert wurde, und sich diese Vorgehensweise bewährt hat, wurde dieser Weg gewählt.

Sowohl reines, steriles Wasser und reines Ethanol, als auch Gemische aus Wasser und Ethanol in verschiedenen Verhältnissen (20:80, 50:50 und 80:20) wurden als Extraktionsmittel getestet. Da die 80:20-Mischung die besten Ergebnisse lieferte und in der Literatur am beliebtesten ist [Hosseinzadeh und Ghenaati, 2006; Lechtenberg et al., 2008], wurde diese Mischung schlussendlich für den Hauptversuch eingesetzt.

Da Ethanol für menschliche Zellen eine toxische Substanz darstellt, galt es die optimale Konzentration an Ethanol bzw. 80:20-Gemisch in Medium zu finden, um die Versuchszellen nicht durch Lösungsmittel zu schädigen.

Vorangegangene Versuche an unserem Institut ergaben bereits, dass die Zellen eine Ethanolkonzentration von bis zu 0,4% Ethanol in Medium akzeptieren [Koschutnig, 2009]. Aus diesem Grund wurde das 80:20-Gemisch in Konzentrationen von 0,3%, 0,4% und 0,5% Ethanol/Wasser-Gemisch im Medium, sowie ebendiese Konzentrationen an reinem Ethanol und sterilem Wasser, getestet. Wieder stellte sich die 0,4% Konzentration der 80:20-Mischung als beste Konzentration heraus.

3.4.5 Testen der Extrakte

Um die optimale Menge an Narbenästen bzw. Tepalen für die Extrakte zu ermitteln, wurden verschiedene Mengen der Rohstoffe eingewogen und mit 80:20-Gemisch versetzt.

Da ein wesentlicher Punkt der Arbeit darin bestand, die praktische Relevanz der Ergebnisse zu testen, war es wichtig, die Einwaage möglichst authentisch zu gestalten, und nur so viel Probe einzuwägen, wie tatsächlich im Küchengebrauch verwendet wird. So wurden verschiedene Konzentrationen zwischen 1 und 3 Tepalen (T), sowie zwischen 2 und 10 Narbenästen (NÄ) getestet. Menge und Mischungsverhältnis des Lösungsmittels blieben immer gleich, bei 3ml 80/20-Ethanol/Wasser-Gemisch pro Konzentrationseinheit.

3.4.6 Probenaufbereitung

Unterschiedliche Mengen der Proben (Tepalen: 1T, 2T, 3T; Narbenäste: 2NÄ, 5NÄ, 10NÄ) wurden in je 3ml eines 80:20-Ethanol/Wasser-Gemisches gelöst und 24h im Dunkeln inkubiert. Vor und nach der Inkubationszeit wurden sie je 5 Sekunden geschüttelt (Vortex), um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten.

Probe	Einwaage [mg]	Probe	Einwaage [mg]
1T	64,0	2 NÄ	3,26
2T	126,0	5 NÄ	7,76
3T	238,5	10 NÄ	15,7

Tabelle 3: Probeneinwaage in mg

Nach der Inkubationszeit wurden die Extrakte mit unkomplementiertem Medium gemischt (0,4% Extrakt in 4ml Medium), auf die Zellen transferiert, und weitere 24h (genau!) inkubiert.

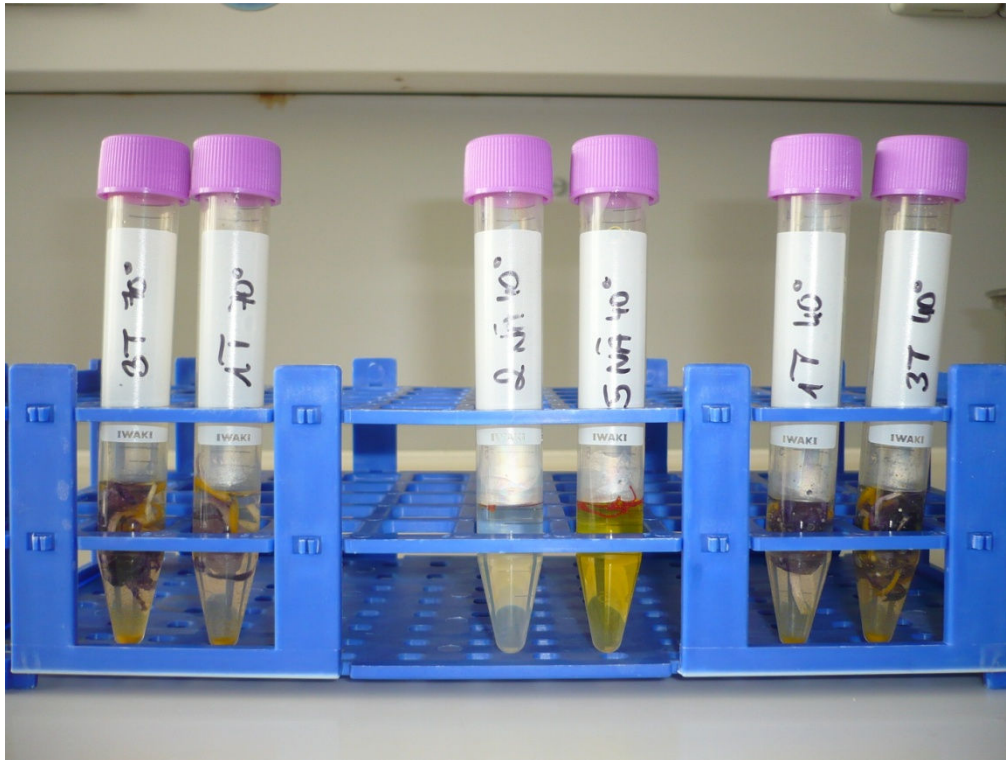


Abbildung 5: Probenaufbereitung in Zentrifugenröhrchen (15ml)

3.5 HepG2-Zellen

3.5.1 Charakterisierung der Zellen

Bei den Zellen, die für die Experimente im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurden, handelt es sich um menschliche Leberkarzinom-Zellen (HepG2), die 1975 aus der Leber eines 15-jährigen argentinischen Jungen isoliert wurden [Aden et al., 1979].

HepG2-Zellen sind im Durchschnitt 10µm groß, wachsen epithelähnlich, adhären im Monolayer, und zeigen eine dichteabhängige Proliferationshemmung.

HepG2 sind in der Lage, eine Reihe von Enzymproteinen zu synthetisieren, die typisch für primäre Hepatozyten sind [Fardel, 1992; Weinhold, 1994]. Da sie gute Wachstumseigenschaften zeigen, sowie Phase I und Phase II Enzyme besitzen, die normalerweise im Zuge der in vitro Kultivierung verloren gehen [Uhl et al., 2000], werden sie häufig für toxikologische Studien wie Zytotoxizitätstests [Babich et al., 1988; Shear et al., 1995] und Genotoxizitätstests [Doosdar, 1993; Chu, 1993] herangezogen.

3.5.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden als Monolayer in MEM kultiviert, das mit 10% (v/v) FBS, 2mM L-Glutamin, 1mM Sodiumpyruvat und 1% (v/v) non-essential amino acids versetzt wurde. Sie wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂, ohne Zusatz von Antibiotika, gelagert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage erneuert, einmal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Zum Zeitpunkt der Passage, sowie zu Beginn der Experimente, hatten die Zellen ungefähr 80% Konfluenz erreicht.

3.5.3 Passage

Einmal pro Woche, wenn die Zellen nahezu konfluent waren, wurden sie passagiert. Dazu wurden sie mit 3-4ml Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen, mit 1,5ml Trypsin-EDTA-Lösung (Inkubationszeit: 4 Min) von der Kulturflasche gelöst und vorsichtig zentrifugiert (5 Min, 800RPM).

Das dabei entstehende Pellet wurde in 10ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und diese Lösung durch eine Injektionsnadel gepresst, um die Zellen zu trennen und eine gleichförmige Einzelzellsuspension zu erhalten. 1/20 dieser Einzelzellsuspension wurde zur Weiterkultivierung in ein neues Fläschchen (mit 8ml vorgewärmtem Medium) ausgesetzt.

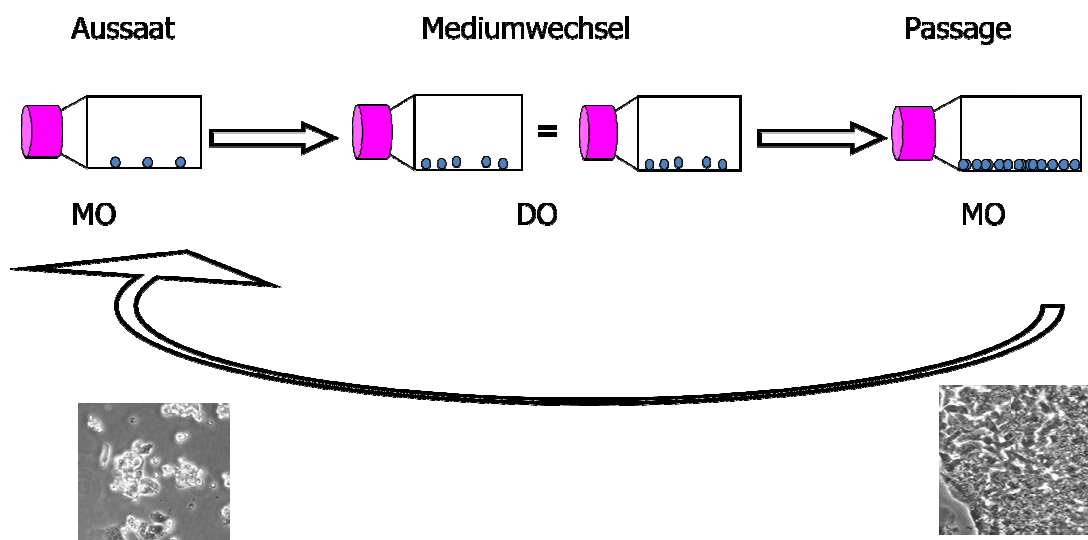


Abbildung 6: Wochenzyklus der Zellkultivierung



Abbildung 7: Kulturfläschchen zur Zellkultivierung, mit Medium und Zellrasen

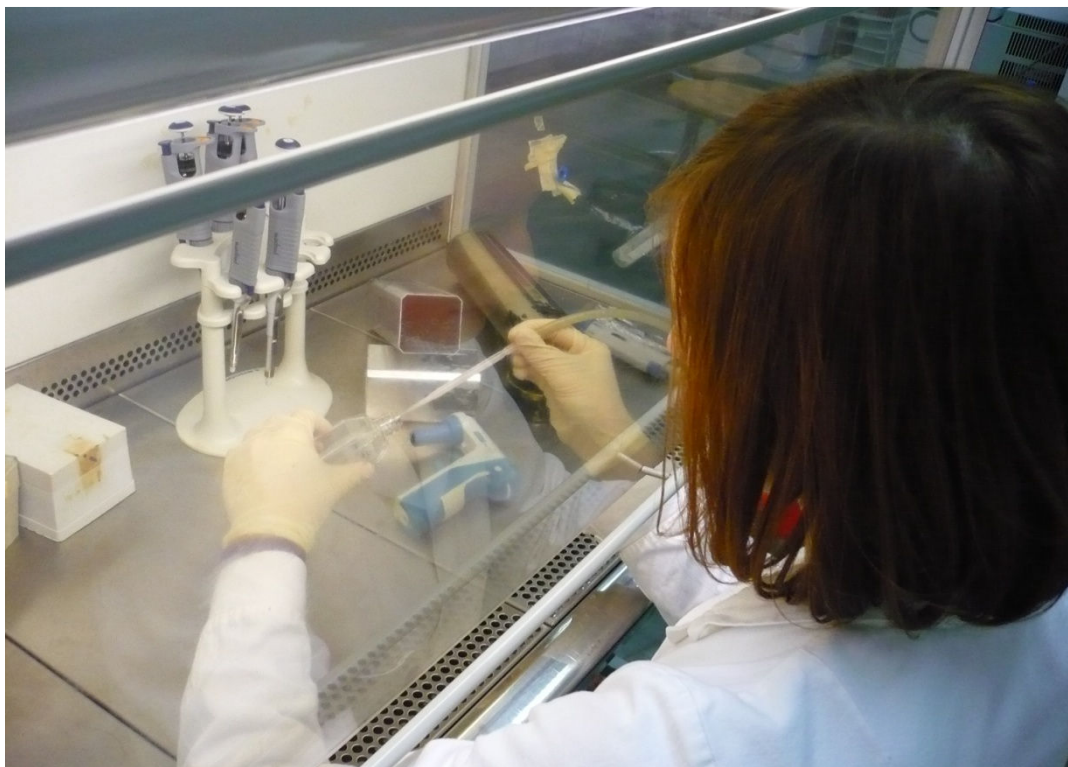


Abbildung 8: Arbeiten im Laminar Flow

Schema des wöchentlichen Arbeitsablaufes:

Wochentag	Tätigkeit
Montag	Zellen aussetzen Extrakte herstellen
Dienstag	Mediumwechsel Extrakte auf Zellen (24h)
Mittwoch	Trypanblautest Comet Assay: Lyse
Donnerstag	Comet Assay: Elektrophorese Mediumwechsel Zellkultur
Freitag	Auswertung

Tabelle 4: Schema des Arbeitsablaufes

3.6 Tests

3.6.1 Vorbehandlung der Zellen

Zum Test wurden die Zellen in 6-well-Platten (750.000 Zellen/well) in 4ml komplementiertem Medium ausgesetzt. Nach 24h Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit verschiedenen Safranextrakten (0,4% in 4ml unkomplementiertem Medium) versehen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,4% 80/20-Gemisch, jedoch ohne Safranextrakte, inkubiert wurden, ansonsten aber gleich behandelt wurden. Am Ende der Inkubationszeit wurden alle Zellen (in Lösung befindliche und anhaftende Zellen) gesammelt und für die weiteren Tests verwendet.

In einem zweiten Testansatz, der die antioxidative Wirkung von Safran bewerten sollte, wurden die Zellen 2 Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit mit 0,01% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in unkomplementiertem Medium gestresst. Dies sollte die Zellen oxidativ schädigen, und die positive Wirkung von Safran auf die DNA der geschädigten Zellen ermitteln [siehe Diplomarbeit Michael Bilek, 2010].

3.6.2 Trypanblau-Test

Der Trypanblau-Test ist ein einfacher Test, mit dem man Zellzahl und Zellvitalität einer Probe bestimmen kann. Er basiert auf der Farbausschlussmethode und dient der Feststellung des zellschädigenden Potentials einer Testsubstanz.

Trypanblau ist ein saurer Azofarbstoff, dessen Anionen an Zellproteine binden können. Der Farbstoff kann jedoch nur dann mit Zellen interagieren, wenn die Zellmembranen geschädigt sind. Inaktive Zellen mit defekter Zellmembran werden deshalb schnell dunkelblau gefärbt, aktive Zellen bleiben weiß, da sie den Farbstoff nicht ins Zellinnere aufnehmen. Unter einem Lichtmikroskop kann man tote und lebendige Zellen so leicht unterscheiden und zählen.

3.6.2.1 *Ablauf des Trypanblau-Test*

Am Ende der Inkubationszeit (siehe 3.6.1) wurde das Medium gesammelt, damit die im Medium schwimmenden Zellen nicht verloren gingen und in den Test miteinbezogen werden konnten.

Die Zellen wurden mit 1ml PBS pro well gewaschen und mit 300µl Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche der wells gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten wurden die Zellen in 1ml komplementiertem Medium resuspendiert und zu dem davor gesammelten Medium hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren (5 Min, 800RPM) wurde mittels Injektionsnadel eine Einzelzellsuspension hergestellt, der 20µl entnommen wurden.

Diese 20µl wurden mit weiteren 20µl der Trypanblau-Lösung versetzt und eine Minute lang inkubiert. Daraufhin wurden 20µl dieser Mischung in eine Neubauer Zählkammer (Hämocytometer) pipettiert und die Zellzahl, sowie das Verhältnis von lebendigen (weißen) und toten (blau gefärbten) Zellen, unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

Im Hämocytometer wurden jeweils 4 Eckquadrate ausgezählt und die daraus folgende Gesamt-Zellzahl pro Milliliter errechnet.

Als Ergebnis wird die Zahl der lebendigen Zellen in Prozent (%) der Negativkontrolle ausgedrückt. Das prozentuale Verhältnis von lebendigen zu toten Zellen wird durch den Anteil an toten Zellen an der gesamten Zellpopulation dargestellt.

Der Test wurde im Dreifachansatz durchgeführt, wobei jeder Ansatz einmal wiederholt wurde, d.h. es wurde jede Probe sechs Mal getestet (n=6).

3.6.3 **SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)-„Comet“-Assay**

Der Single Cell Gel Electrophoresis Assay („Comet“ Assay) stellt eine schnelle Methode zur Ermittlung von DNA-Schäden in Säugerzellen dar. Ursprünglich wurde der Comet Assay von Ostling und Johanson [Ostling and Johanson, 1984] zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen ins Leben gerufen. Durch die Weiterentwicklung von Singh et al., 1988, und Olive et al, 1989, die den Comet Assay vom neutralen ins alkalische Milieu übersiedelten, und somit die Detektion von Einzelstrangbrüchen möglich machten, wurde der Comet Assay bald zu einer umfassenden Methode für den Nachweis verschiedener Formen von DNA-Schäden: Einzelstrangbrüche, alkalilabile

Regionen, oxidative DNA-Schädigung und DNA Cross-Linking mit Biomolekülen wie DNA oder Proteinen können heute mittels Comet-Assay ermittelt werden [Anderson and Plewa, 1998].

Die Vorteile des Comet-Assay im Vergleich zu anderen Genotoxizitätstests liegen in der einfachen und schnellen Durchführung, der Möglichkeit DNA-Schäden in einzelnen Zellen nachzuweisen, sowie der Anwendbarkeit auf praktisch jeden eukaryotischen Zelltyp [Uhl et al., 2000].

Die Empfindlichkeit des Comet Assay gegenüber umweltrelevanten Mutagenen wird in vergleichenden Studien als gleich hoch oder sogar höher als bei anderen Genotoxizitätstests bewertet [Monteith, 1995; Gabelova, 1997; Tafazoli, 1998].

3.6.3.1 Prinzip des Comet Assay

Im Comet-Assay lassen sich DNA-Schäden durch Wanderung der DNA in einem elektrischen Feld und anschließender Auswertung der gewanderten DNA-Stücke ermitteln.

Die Zellen werden in Agarose-Gel auf Objektträgern fixiert und in Lyselösung gegeben, um zelluläre Proteine wie Zellmembran und Kernmembran zu entfernen. Anschließend werden die Objektträger horizontal in eine Elektrophoresewanne, gefüllt mit Elektrophoresepuffer, gelegt, wo sich die DNA-Stränge der lysierten Zellen unter basischen Bedingungen (pH 13) trennen (= „DNA-unwinding“).

In der anschließenden Elektrophorese wandert die entwundene DNA im elektrischen Feld. Dabei wandern in erster Linie DNA-Stücke von beschädigten Zellen. In unbeschädigten Zellen bleibt die hochmolekulare DNA vorwiegend gepackt im Zellkern und wandert deshalb kaum. Durch Färbung mit Ethidiumbromid, einem Reagens, das direkt an die DNA bindet, kann die DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

So lassen sich Zellen mit beschädigter DNA von Zellen mit intakter DNA unterscheiden.

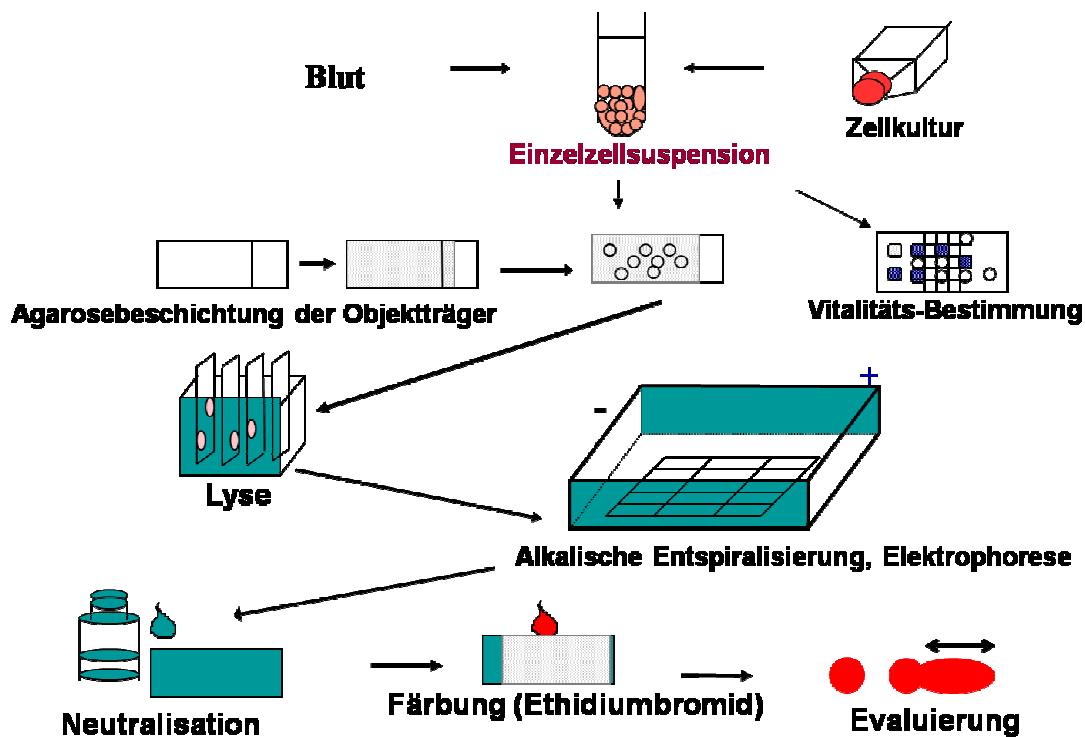
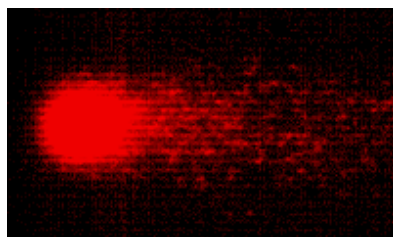


Abbildung 9: Ablauf des SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)-"Comet"-Assay

Ist die DNA beschädigt und wandert im elektrischen Feld, sieht man dies bei der Auswertung als „Komet“. Als Kopf des Kometen sieht man den Zellkern mit einem Teil intakter DNA, der Kometenschweif besteht aus den DNA-Fragmenten, die in der Elektrophorese vom Zellkern weg gewandert sind.



Die Größe des Schweifs bzw. das Ausmaß der DNA im Kometenschweif (% DNA in Tail) ist direkt proportional zur DNA-Schädigung der Zelle.

Zellen mit intakter DNA haben keinen Kometenschweif. Sie gleichen eher Sonnen oder Planeten.

3.6.3.2 Lösungen und Reagenzien für den Comet Assay

Lyselösung

2,5M NaCl (146,1g)

100mM Na₂EDTA (37,2g)

10mM Tris (1,2g)

In 1L Aqua bidest. lösen;

Durch Zugabe von konz. NaOH den pH-Wert auf 10 einstellen.

Direkt vor der Verwendung werden 1% Triton X und 10% DMSO hinzugefügt und die Lyselösung mindestens eine Stunde vor Gebrauch kühl gestellt.

Elektrophoresepuffer

Stocklösungen:

10N NaOH (80g/200ml Aqua bidest.)

200mM Na₂EDTA (14.89g/200ml Aqua bidest.)

Für 2200ml Elektrophoresepuffer (pH 13.6-13.7):

2130ml Aqua bidest.

59ml NaOH

11ml Na₂EDTA

Diese drei Reagenzien mischen und den Puffer vor Gebrauch kühlen.

Neutralisationspuffer

0,4M Tris (48.5g/1000ml Aqua bidest.)

Der pH-Wert wird mit konzentrierter HCl (25%) auf 7,5 eingestellt.

Low Melting Agarose (LMA)

125g LMA

25ml PBS

LMA wird in PBS gelöst, indem man die Mischung einige Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt. Dann im Wasserbad bei 37°C warm halten. Bei Raumtemperatur wird die LMA fest.

Normal Melting Agarose (NMA)

1,5g NMA

100ml PBS

NMA wird mit PBS in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie gut gelöst ist und keine Klumpen bildet. Objektträger werden mit NMA beschichtet, indem man sie in die heiße, flüssige Agarose taucht, die Unterseite abwischt und bei Raumtemperatur trocknen lässt.

Ethidiumbromid (20µg/mL)

10µl Stocklösung

5mL Aqua bidest.

3.6.3.3 Ablauf des Comet Assay

Der Comet-Assay wurde entsprechend der Richtlinien, die von Tice et al (1990; 2000) und Singh et al. (1988) erarbeitet wurden, durchgeführt.

Am Ende der Inkubationszeit (siehe 3.6.1) wurde das Medium aus den 6-wells gesammelt, damit schwimmende Zellen im Test berücksichtigt werden. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1mL PBS gewaschen, mit 300µl Trypsin/EDTA (4 Min Inkubationszeit) gelöst und mit 700µl Medium gespült. Diese Mischung wurde zu den in Lösung befindlichen Zellen gegeben und zentrifugiert (5 Min, 800 RPM). Die gewonnenen Zellpellets wurden mit 500µl Medium resuspendiert und durch eine Injektionsnadel gedrückt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen.

20µl dieser Einzelzellsuspension wurden mit 20µl Trypanblaulösung gemischt und die Zellzahl bestimmt. Das Volumen dieser Einzelzellsuspension, das einer Menge von 50.000 Zellen entsprach (durchschnittlich 20µl), wurde mit 80µl LMA gemischt und auf NMA-benetzten Objektträgern verteilt. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern bedeckt und auf einen Eisblock gelegt, bis die Agarose erhärtete. Dann wurden die Deckgläser wieder entfernt, und die Objektträger über Nacht, bei 4°C, in Lyselösung gelagert.

Nach der Lyse wurden die Zellen in Aqua dest. und Elektrophoresepuffer gespült und 40 Minuten im gekühlten Elektrophoresepuffer (pH 13,6-13,7) inkubiert. Dies ist die so

genannte „unwinding-Phase“, bei der die DNA im Zellkern entwunden und in ihre Einzelstränge geteilt wird. Gleich anschließend wurde die Elektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresewanne, bei 25V, 50W und 300mA, 20 Minuten lang durchgeführt.

Danach wurden die Objektträger 5 Minuten lang in Neutralisationspuffer eingelegt, kurz mit Aqua bidest. gespült, und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Die getrockneten Objektträger wurden mit 40µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt, mit einem Deckglas bedeckt, und unter einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem PC-Bildanalyse-System (Komet 5.5, *Kinetic Imaging*, Liverpool, UK) gekoppelt war, ausgewertet.

Jede Probe wurde im Dreifachansatz bestimmt, von jedem der drei Objektträger wurden 50 Zellen zufällig ausgewählt und deren DNA-Schädigung bestimmt. Als Parameter für die DNA-Schädigung galten die Prozent (%) der DNA im Kometenschweif.

Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mittels SPSS für Windows (Version 15.0). Aus den Einzeldaten der Tests wurden arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Alle Werte wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Ihre Signifikanz wurde mittels t-Test für unabhängige Stichproben, sowie durch einfaktorielle ANOVA (Bonferroni, Scheffé) getestet.

Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs:

Abbildung 10: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Trypanblau-Test

Der Trypanblau-Test gibt Aufschluss über die Zytotoxizität bzw. das zellschädigende Potential einer Substanz. Es handelt sich dabei um eine quantitative Methode, die das Ausmaß, nicht jedoch den Grund der Zellschädigung ermittelt.

Die Testsubstanz (Narbenäste bzw. Tepalen in 80/20-Ethanol/Wasser-Extrakt) wirkte 24 Stunden auf die HepG2-Zellen ein. Anschließend wurde der Trypanblau-Test durchgeführt.

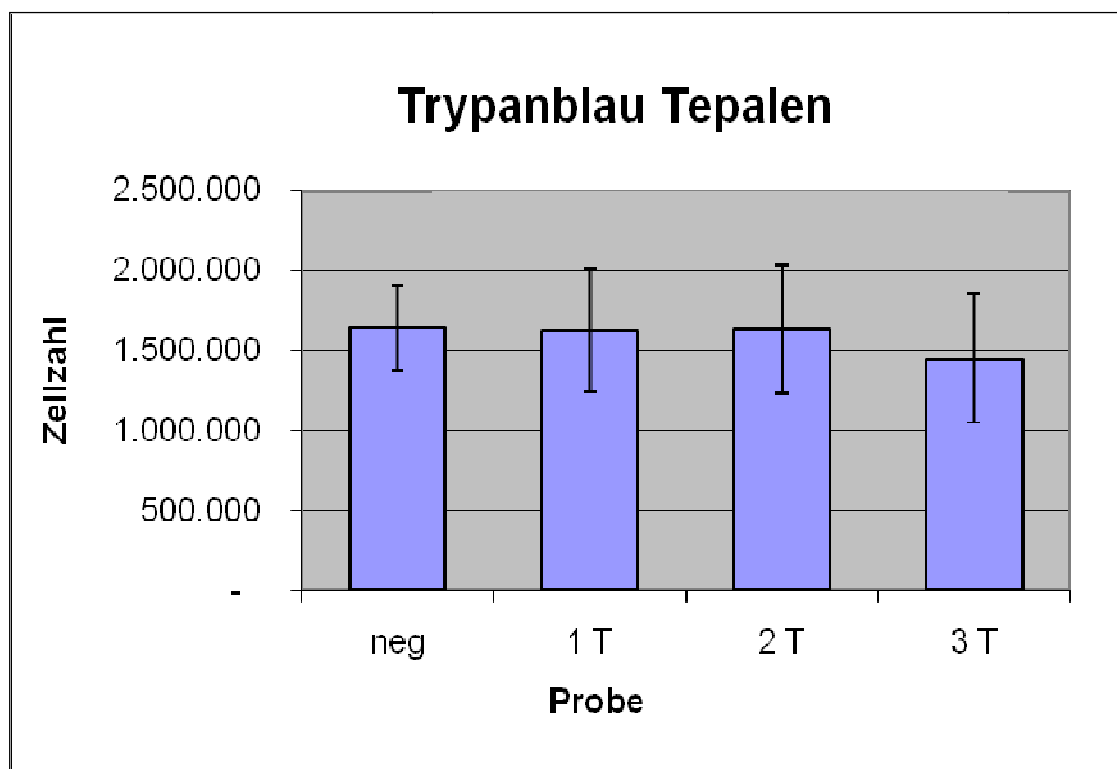
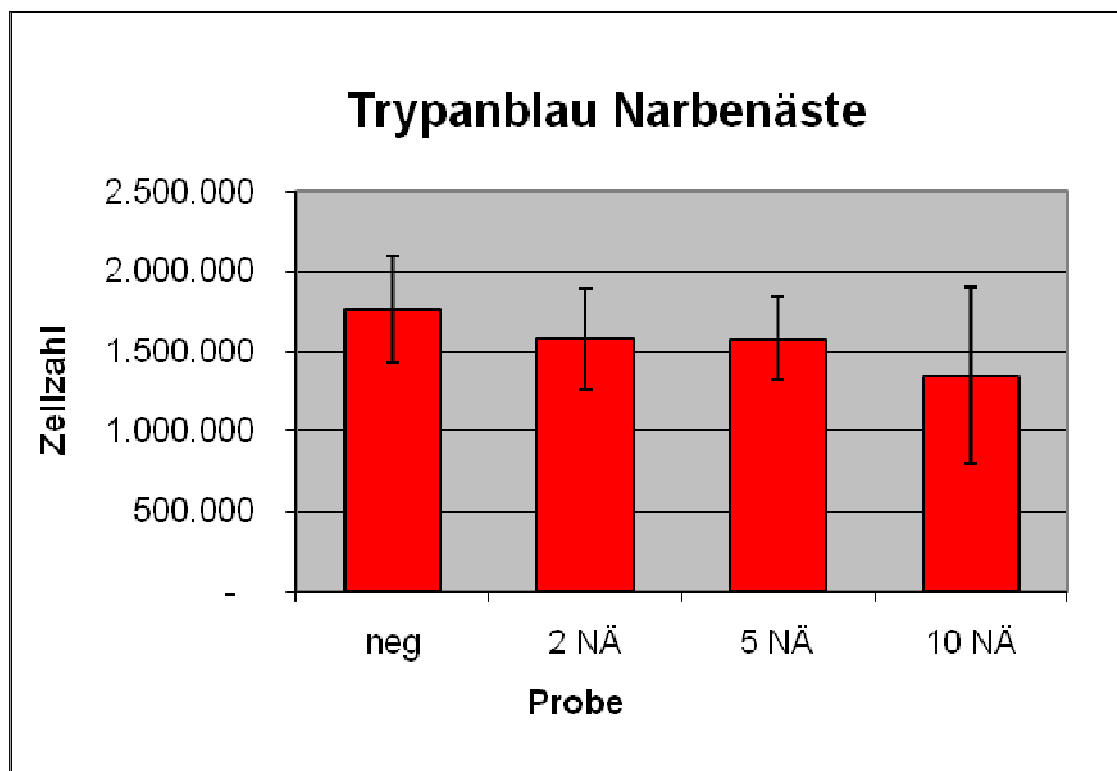
Intakte Zellen bleiben nach Einwirkung der Testsubstanz und Färbung mit Trypanblau farblos, tote Zellen, deren Zellmembran durchlässig wird, nehmen die Farbe auf und werden dunkelblau. Die Auswertung erfolgt durch Auszählung der lebenden und toten Zellen in einem Teil der Probe und anschließender Hochrechnung auf die gesamte Probe.

Die Ergebnisse werden in „Millionen lebender Zellen pro Probe“ bzw. in „% der Negativkontrolle“ dargestellt.

4.1.1 Trypanblau-Test der Narbenäste

Die 80/20-Ethanol/Wasser-Extrakte der Narbenäste wurden in folgenden Konzentrationen getestet: 2 Narbenäste (2 NÄ), 5 Narbenäste (5 NÄ), 10 Narbenäste (10 NÄ). Die Negativkontrolle (Neg) bestand aus reinem 80/20-Ethanol/Wasser-Gemisch ohne Narbenäste.

Im Vergleich der Proben mit der Negativkontrolle wird eine deutliche, konzentrationsabhängige Verringerung der Zellzahl durch den Safranextrakt sichtbar. Obwohl keiner der Werte statistische Signifikanz aufwies, lässt sich eine Tendenz der Mittelwerte erkennen. Bei 2 NÄ und 5 NÄ wurden im Durchschnitt 89,79% bzw. 89,65% der Zellzahl der Negativkontrolle erreicht, das heißt, die Safranproben verringerten die Zellzahl um ungefähr 10%. Bei 10 NÄ konnte ein noch deutlicher



Effekt beobachtet werden. Hier erreichte die Probe 76.54% der Negativkontrolle, die Zellzahl wurde also um 23,5% verringert.

Dies spricht für eine zytotoxische Wirkung des Extraktes der Narbenäste auf HepG2-Zellen, wie sie auch bei Tavakkol-Afshari et al. (2008) und Abdullaev et al. (2003) beobachtet wurde.

4.1.2 Trypanblau-Test der Tepalen

Die 80/20-Ethanol/Wasser-Extrakte der Tepalen wurden ebenfalls in drei Konzentrationen getestet: 1 Blüte (1T), 2 Blüten (2T), 3 Blüten (3T). Die Negativkontrolle bestand wiederum aus reinem 80/20-Ethanol/Wasser-Gemisch.

Bei den Tepalen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Narbenästen. Auch hier wurden die Zellzahlen leicht verringert, jedoch nicht so deutlich und nicht konzentrationsabhängig. Alle Werte liegen im Bereich der Negativkontrolle. Die ersten beiden Konzentrationen, 1T und 2T, zeigen eine vernachlässigbare Zellzahlreduktion von <1% im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Zellzahlen betrugen 99,26% bzw. 99,38% der Negativkontrolle. Erst in der höchsten Konzentration (3T) konnte eine eindeutige Verringerung der Zellzahl beobachtet werden (88,10% der Negativkontrolle).

Verglichen mit den Narbenästen sind die Ergebnisse der Tepalen-Extrakte wesentlich weniger prägnant und nicht konzentrationsabhängig. Es zeigt sich jedoch in höheren Konzentrationen ebenfalls eine nicht signifikante Verringerung der Zellzahl, was für eine leicht zytotoxische Wirkung der Tepalen gegenüber HepG2-Zellen spricht.

4.1.3 Diskussion

Da es sich bei den HepG2-Zellen einerseits um eine maligne Zelllinie, andererseits aber um ein allgemeines Zellmodell handelt, stellt sich im Trypanblautest natürlich die Frage, ob die beobachtete zytotoxische Wirkung auf andere, nicht-maligne Zellen übertragbar ist, oder nur für maligne Zellen Bedeutung hat. Wäre die Zellzahl reduzierende Wirkung auch bei nicht-malignen Zellen zu beobachten, würde dies für eine allgemein zytotoxische Wirkung des Safranextraktes sprechen und die Unbedenklichkeit des Gewürzes für den Menschen in Frage stellen. Beschränkt sich die

Zytotoxizität jedoch auf maligne Zellen, wäre dies ein interessanter Forschungsansatz für die Chemotherapie.

Abdullaev (2003) und Tavakkol-Afshari (2008) verglichen in ihren Untersuchungen den Einfluss von Safranextrakt auf maligne und nicht maligne Zellen, und kamen zu dem Schluss, dass die zytotoxische Wirkung mit ihren Untersuchungsmethoden in den getesteten Konzentrationen nur bei malignen Zellen auftritt.

Tavakkol-Afshari et al. (2008) arbeiteten ebenfalls mit HepG2-Zellen und untersuchten die Zytotoxizität von Ethanol-Safranextrakten (200-2000µg/ml) mittels MTT-Test. Bei einer Konzentration von 800µg/ml wurden die Zellzahlen in dieser Studie um ungefähr 30% gehemmt (auf 70% verringert), bei 2000µg/ml sogar um 50%. Unter 400µg/ml zeigten die Zellen fast keine Reaktion.

Abdullaev et al. (2003) nützten Safranextrakt-Konzentrationen zwischen 50 und 400µg/ml im Colony Formation Assay. Zwischen 100 und 400µg/ml konnte eine signifikante Verringerung der Zellzahl (40-70%) erreicht werden.

Escribano et al. (1996) fanden die LD50 (50% des Zellwachstums) im MTT-Test an malignen HeLa-Zellen bei 2,3mg/ml (2300µg/ml). Ab 4.000µg/ml waren keine Zellen mehr vorhanden.

Dies bedeutet, dass Safran in vitro ein gewisses chemotherapeutisches Potential besitzt, und zumindest in den getesteten Konzentrationen keine allgemeine, auf nicht-maligne Zellen übertragbare, zellschädigende Wirkung entfaltet.

In einigen Studien wird neben der bloßen Feststellung der Zytotoxizität auch darüber diskutiert, auf welche Art Safranextrakt zellschädigend wirkt.

Meist wird die induzierte Apoptose als wahrscheinlichster Wirkmechanismus genannt, da die abgestorbenen Zellen unter dem Mikroskop oder mit Apoptose-Tests (PI-Methode; Tavakkol-Afshari et al., 2008) als apoptotisch erkennbar waren. Tavakkol-Afshari identifiziert apoptotische Zellen durch morphologische Eigenschaften wie Chromatin-Kondensation, Zell- und Zellkern-Schrumpfen, Vesikelbildung und oligonukleosomale DNA-Fragmentierung. Da die Apoptose jedoch nur teilweise verantwortlich für den Safran-induzierten Zelltod war, muss noch ein anderer Mechanismus involviert sein.

Auch Escribano et al. (1996) vermuteten den apoptotischen Zelltod hinter der Zellzahlreduktion durch Crocin, da die Zellen unter dem Mikroskop vakuolenartige Felder, reduziertes Zytoplasma und Pyknotische Nuklei zeigten.

Abdullaev und Frenkel (1992) stellten fest, dass die untersuchten Safranextrakte die zelluläre DNA- und RNA-Synthese hemmten (50% Hemmung bei 100-150µg/ml), die zelluläre Proteinsynthese jedoch auch bei höheren Konzentrationen nicht beeinflussten. Die Hemmung der Nukleinsäuresynthese könnte also ein weiterer möglicher Wirkmechanismus des zytotoxischen Effekts von Safran sein.

Ein ähnlicher Test mit Quercetin als Testsubstanz im MTT-Test mit HepG2-Zellen zeigt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation von 70% der Kontrollgruppe bei 25µM und 60% bei 50µM [Ramos et al., 2008]. Dies beweist, dass auch andere antioxidativ wirksame Substanzen wie Quercetin (Radikalquencher) eine ähnliche zytotoxische Wirkung wie Safran entfalten können.

In unserem Fall waren wenige bis keine dunkelblauen Zellen zu finden (wie sie typisch für den Trypanblautest wären), dafür aber teilweise drastisch verringerte Zellzahlen. Aus diesem Grund liegen zwei mögliche Annahmen nahe: Entweder störte der Safranextrakt das Zellwachstum und bewirkte so eine Zellzahlreduktion im Vergleich zur Negativkontrolle. Oder der Extrakt schädigte manche Zellen derart, dass sie sich zum Zeitpunkt der Bestimmung bereits aufgelöst hatten. In letzterem Fall stellt sich dann die Frage, warum manche Zellen komplett aufgelöst wurden, wogegen andere praktisch unbeschädigt blieben, und welches Kriterium für diese Selektion entscheidend war.

Wirkungsweise und Wirkmechanismus der Tepalen lassen sich bisweilen nur vermuten: Es besteht die Möglichkeit, dass die Tepalen aufgrund ihrer ähnlichen Inhaltsstoffe eine ähnliche Wirkung wie die Narbenäste entfalten (wie auch bei ihrer antioxidativen Wirkung), jedoch wesentlich weniger stark konzentriert sind. Dies würde bedeuten, dass sie ebenfalls zytotoxisch gegenüber malignen Zellen, und nicht zytotoxisch gegenüber nichtmalignen Zellen wirken.

Da sich die Tepalen in einigen Inhaltsstoffen und Wirkungen jedoch auch von den Narbenästen unterscheiden (Kubo et al., 1999; Li et al., 2004), ist eine unterschiedliche Wirkung nicht auszuschließen.

4.2 SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)-„Comet“-Assay

Der SCGE-„Comet“-Assay dient dazu, DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, alkalilabile Regionen oder cross-linking in Zellen festzustellen, und damit das genotoxische Potential einer Testsubstanz zu ermitteln.

In dieser Studie wurde der Anteil der DNA im Kometenschweif (% DNA in Tail) bestimmt, und damit die Genotoxizität von Safran ermittelt.

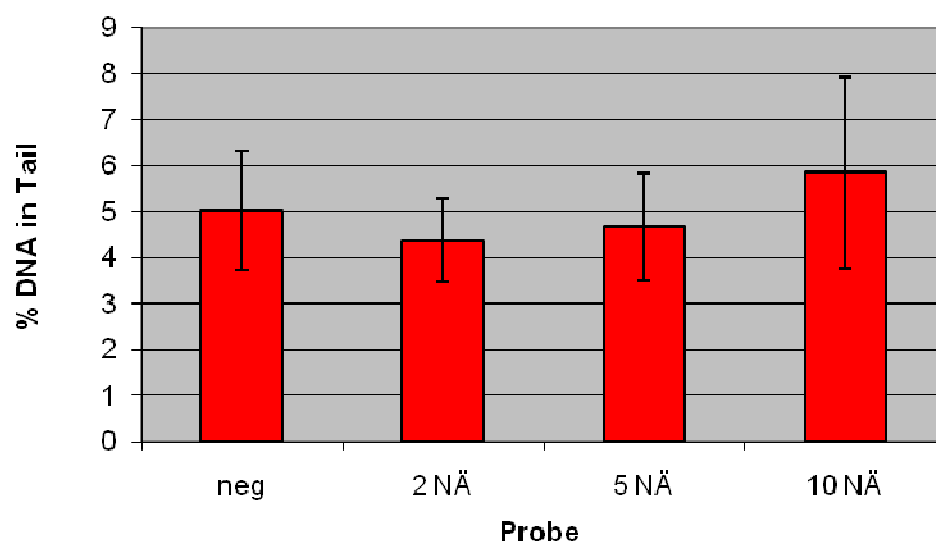
4.2.1 Comet Assay der Narbenäste

Da der Comet-Assay im Arbeitsablauf direkt an den Trypanblautest anschloss, wurden dieselben Proben in den gleichen Konzentrationen getestet. Für die Narbenäste bedeutet dies 3 Konzentrationen (2 NÄ, 5 NÄ, 10 NÄ), sowie eine Negativkontrolle (kein Safran).

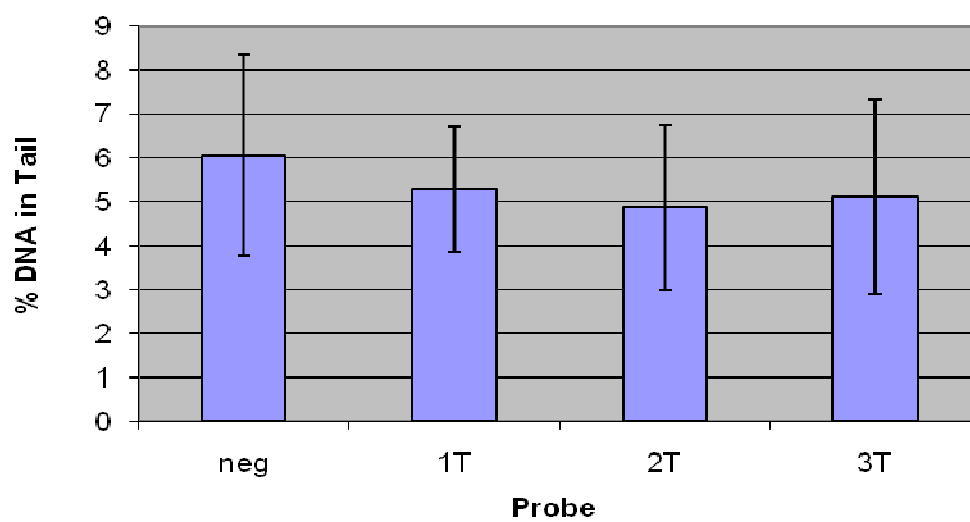
Alle Werte bewegten sich auf einem ähnlichen Niveau, zwischen 4% und 6% DNA in tail. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden geringeren Konzentrationen (2NÄ und 5NÄ) mit 4,37% und 4,66% eine geringere DNA-Schädigung aufwiesen als die Negativkontrolle (5,01%). Die höchste Konzentration der Narbenäste (10NÄ) zeigte eine DNA-Schädigung von 5,85% DNA in tail, und überstieg damit den Wert der Negativkontrolle.

Daraus lässt sich, trotz mangelnder Signifikanz, eine interessante Tendenz feststellen: in geringeren Konzentrationen scheint Safranextrakt die natürlich vorkommenden DNA-Schäden der Zellen nicht signifikant zu verringern, in höheren Konzentrationen wird die DNA-Schädigung der Zelle durch Safranextrakt jedoch tendenziell verstärkt.

Comet Assay Narbenäste



Comet Assay Tepalen



4.2.2 Comet Assay der Tepalen

Bei den Tepalen wurden wiederum die drei Konzentrationen 1T, 2T und 3T, sowie die Negativkontrolle, im Comet Assay getestet.

Wieder zeigte sich eine Verringerung der DNA-Schädigung bei den geringeren Konzentrationen 1T (5,29% DNA in Tail) und 2T (4,86% DNA in Tail) im Vergleich zur Negativkontrolle (6,05% DNA in Tail). Im Gegensatz zu den Narbenästen lag hier jedoch auch die höchste Konzentration 3T mit ihrem Mittelwert von 5,11% DNA in Tail unter der Negativkontrolle.

Daraus lässt sich schließen, dass die Tepalen in geringen Konzentrationen zwar ebenfalls die natürliche DNA-Schädigung tendenziell verringern, jedoch keine genotoxische Wirkung an HepG2-Zellen entfalten.

Die Safranextrakte (Narbenäste wie Tepalen) scheinen keine signifikant genotoxische Wirkung auf HepG2-Zellen zu entfalten, obwohl höhere Konzentrationen noch ausgetestet werden müssten, um eine weitere Entwicklung zu beobachten.

4.2.3 Diskussion

In einem ähnlichen Genotoxizitäts-Test mit HepG2-Zellen wurde mittels Comet-Assay die Genotoxizität vier bekannter Promutagene ermittelt. Im prominentesten Fall, Benzo(a)pyren, wurden Konzentrationen zwischen 1 und 100µM getestet. Bei einer Inkubationszeit von 24h wurden DNA-Tailmomente von ca. 5 (3µM) bis 18 (100µM) erreicht. Je länger die Inkubationszeit und je höher die Konzentration der Testsubstanz, desto stärker war die DNA-Schädigung [Trisnawaty et al., 2000].

Die Ergebnisse lassen sich zwar schwer mit den unseren vergleichen, da Yusuf et al. eine Testsubstanz mit konkreter Molarität untersuchten (in unserem Fall: 3,26-15,7 mg NÄ/3ml; 64-238,5 mg T/3ml), es lässt sich aber durchaus erkennen, dass starke Genotoxine wie Benzo(a)pyren in diesem Testsystem auch nach 24h Einwirkzeit große DNA-Schäden bewirken. Da dies in unserer Studie nicht der Fall war, kann man davon ausgehen, dass unsere Testsubstanz keine oder nur leichte genotoxische Wirkung ausübt.

In einer Studie von Musonda und Chipman (1998) wurden ebenfalls die DNA-Schäden an HepG2-Zellen mittels Comet Assay gemessen und das Ausmaß der Schäden je nach % der DNA in Tail in verschiedene Gruppen unterteilt: < 5 % DNA in Tail galt als nicht geschädigt, 5-20 % DNA in Tail stand für eine niedrige Schädigung, 20-40 % für eine mittlere, und 40-95 % für eine hohe DNA-Schädigung. Alles über 95 % galt als „totale DNA-Schädigung“. Bei der Testsubstanz Quercetin (10µM) lagen die meisten Zellen im Bereich < 20 % DNA in Tail, ähnlich wie bei der Negativkontrolle. Die Positivkontrolle H₂O₂ (200 µM) schädigte die meisten Zellen mittel bis hoch (20 - 95 % DNA in Tail). Würde man diese Einteilung auf die Ergebnisse unserer Studie übertragen, wären die DNA-Schäden alle im Bereich der nicht vorhandenen (< 5 %) oder leichten (5 – 20 %) Schädigung, was für eine nicht stark ausgeprägte Toxizität unserer Testsubstanz spricht. Das Ergebnis ist mit dem des Quercetins vergleichbar. Auch hier handelt es sich um eine antioxidativ wirksame pflanzliche Substanz, deren DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay im Bereich der Negativkontrolle liegt.

Woods et al. (1999) untersuchten den Effekt von β-Carotin auf H₂O₂-induzierte DNA-Schädigung in HepG2-Zellen mit dem Comet Assay und kamen zu dem Schluss, dass 10µM β-Carotin keine Schutzwirkung gegen H₂O₂ entfaltet, sondern im Gegensatz dazu die Zahl der DNA-Strangbrüche, insbesondere nach langen Inkubationszeiten, sogar noch erhöhen kann.

Aufgrund der Carotinoide, die auch in Safran-Narbenästen enthalten sind, wäre eine solche Reaktion bei Safran (in höheren Konzentrationen oder mit längeren Einwirkzeiten) ebenfalls durchaus möglich [siehe DA Michael Bilek].

5 Schlussbetrachtung

Ziel dieser Studie war es, in Österreich angebauten Safran (*Crocus sativus*) hinsichtlich seiner zytotoxischen und genotoxischen Wirkung gegenüber HepG2-Zellen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Narbenäste (Safrangewürz) sowie Tepalen (Blütenblätter) des Safrancrocus in 80% ethanolischer Lösung extrahiert und die Wirkung dieser Extrakte in verschiedenen Konzentrationen (1T, 2T, 3T; 2NÄ, 5NÄ, 10NÄ) mittels Trypanblautest und SCGE (Single-Cell-Gel-Electrophoresis)-„Comet“-Assay an HepG2-Zellen getestet. Ein wichtiger Gesichtspunkt lag dabei auf der Dosis der Safranextrakte, die einen normalen Hausgebrauch widerspiegeln sollte. Die Extrakte wurden 24h im Dunkeln inkubiert und anschließend zu 0,4% in Zellmedium gelöst und den Zellen zugegeben. Nach weiteren 24h Inkubationszeit wurden die Zellen von der Oberfläche ihrer 6-wells gelöst und mit Trypanblau ausgezählt. Im Anschluss wurde der Comet Assay durchgeführt. Dabei wurde das Ausmaß der DNA-Schädigung in den Zellen durch DNA-Wanderung im elektrischen Feld und anschließende Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt.

Die Ergebnisse des Trypanblautests wurden in „Mio Zellen pro Probe“, die Endwerte des Comet Assay in „% DNA in Tail“ angegeben.

Im Trypanblautest konnte keine signifikant zellschädigende Wirkung der Safranextrakte festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, vor allem im Test mit den Narbenästen, eine Tendenz zur dosisabhängigen Zellzahlreduktion der HepG2-Zellen, wie sie auch in anderen Studien beobachtet wurde [Escribano et al., 1996; Abdullaev et al., 2003].

Der Comet Assay ergab, dass die Safranextrakte mit keiner signifikant genotoxischen Wirkung im Zusammenhang stehen. Die feststellbaren DNA-Schäden an HepG2-Zellen lagen bei jeder Konzentration im Bereich der Negativkontrolle. In geringeren Konzentrationen der Safranextrakte (speziell bei den Narbenästen) schien die DNA-Schädigung etwas geringer als die der Negativkontrolle, in höheren Konzentrationen geringfügig höher.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Safran (Tepalen und Narbenäste) in den getesteten Konzentrationen *in vitro* nicht genotoxisch und nur bedingt zytotoxisch ist. Die beobachtete Tendenz zur Zytotoxizität bezieht sich mit großer Wahrscheinlichkeit nur auf maligne Zellen [Abdullaev et al., 2003; Tavakkol-Afshari et al., 2008; Escribano et al., 1996], wodurch sich interessante Forschungsperspektiven für Chemotherapie und Phytomedizin ergeben.

Die akute Toxizität der Safran-Narbenäste in hohen Dosen (>20g) ist bereits seit langem bekannt [Teuscher, 2002], jedoch in den Mengen, die normalerweise zum Würzen verwendet werden, für den Menschen nicht relevant. Auch der Test an HepG2-Zellen verdeutlicht, dass Safran in geringen Mengen keine erhebliche zytotoxische oder genotoxische Wirkung entfaltet.

Wie bereits in vielen Studien angedeutet [z.B. Assimopoulou et al., 2005; Papandreou et al., 2006; Premkumar et al., 2006; Jessie und Krishnakantha, 2005], werden dem Safran eher gesundheitsfördernde Wirkungen wie Antioxidativität, Immunregulation oder antithrombotische Aktivität zugeschrieben.

Die meisten bisherigen Studien über Safran (wie auch die vorliegende Arbeit) sind *in vitro* Studien, die interessante Einblicke in die mögliche Wirkungsweise einer Substanz geben, jedoch keine endgültigen Aussagen über die Wirkung im menschlichen Körper erlauben. Die Übertragung der Ergebnisse auf den lebenden Organismus ist deshalb nur bedingt möglich und müsste durch weitere Tierversuche und/oder Humanstudien abgesichert werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden die Narbenäste und Tepalen des österreichischen Safrancrocus (*Crocus sativus* L.) auf ihre zytotoxische und genotoxische Wirkung an HepG2-Zellen getestet.

Ziel war es, die Wirkung in haushaltsüblichen und ernährungswissenschaftlich interessanten Mengen zu beobachten. Die Proben wurden in je drei verschiedenen Mengen (Tepalen: 1T, 2T, 3T; Narbenäste: 2NÄ, 5NÄ, 10NÄ) mit 80% ethanolischer Lösung extrahiert, und die Zellen 24h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Zellzahl und Zellvitalität mittels Trypanblautest ermittelt. Anschließend wurde der Comet-Assay durchgeführt, um mögliche DNA-Schäden in den Zellen zu ermitteln.

Im Trypanblautest lagen alle Zellzahlen im Bereich der Negativkontrolle. Es zeigte sich jedoch, vor allem bei den Narbenästen, eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Zellzahlen, in Abhängigkeit der Dosis. Im Comet Assay konnte keine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden durch Safranextrakt festgestellt werden.

Es zeigte sich, dass Narbenäste und Tepalen der Safranpflanze in den getesteten Konzentrationen in vitro keine genotoxische und nur bedingt zytotoxische Wirkung gegen HepG2-Zellen entfalten.

Ein normaler Haushaltsgebrauch von Safran-Narbenästen und Tepalen scheint deshalb, auf Basis dieser Untersuchungen, unbedenklich. Aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit von Zelltests auf den gesamten Organismus müssten die Ergebnisse jedoch durch weitere Studien an Tier und Mensch abgesichert werden.

7 **Summary**

The present study was conducted to analyze the stigmas and petals of Austrian saffron (*Crocus sativus* L.) regarding their cytotoxic and genotoxic effects on HepG2 cells. One of the main aims was to observe the effects in relevant amounts for the average household and for nutritional sciences.

Samples were tested in three different concentrations per group (petals: 1T, 2T, 3T; stigmas: 2NÄ, 5NÄ, 10NÄ) and extracted with an 80% ethanolic solution, then incubated for 24 hours. After incubation of the cells, cell counts and cell viability were determined via trypan blue assay. Afterwards the comet (SCGE-) assay was performed to identify any DNA damage inflicted to the cells.

The trypan blue assay showed that all cell counts were in the range of the negative control group. However, a slight, non-significant and dose-dependent reduction in cell counts could be observed, especially in the stigmas group. Comet assay revealed no significant increase in DNA damage in saffron-treated cells.

To sum up, stigmas and petals of *Crocus sativus* L. displayed no genotoxic and only limited cytotoxic potential against HepG2 cells in vitro in the tested concentration range.

On the basis of these studies we can therefore conclude that a regular household usage of saffron stigmas and petals seems nonhazardous. Due to the restricted transferability of cell tests to the whole human body, however, further research in the form of animal and human studies will be necessary to confirm these results.

8 Literaturverzeichnis

ABDULLAEV F.I., RIVERON-NEGRETE L, CABALLERO-ORTEGA H, HERNANDEZ JM, PEREZ-LOPEZ I, PEREDA-MIRANDA R, ESPINOSA-AGUIRRE JJ. (2003) Use of in Vitro Assays to Assess the Potential Antigenotoxic and Cytotoxic Effects of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicology in Vitro*: 731-736

ABDULLAEV FI. (1994) Inhibitory Effect of Crocetin on Intracellular Nucleic Acid and Protein Synthesis in Malignant Cells. *Toxicology Letters* 40: 243-251

ABDULLAEV FI., FRENKEL GD. (1992) The Effect of Saffron on Intracellular DNA, RNA and Protein Synthesis in Malignant and Non-Malignant Human Cells. *BioFactors* 4: 43-45

ABDULLAH SA., MUBEEN A., MUZAMIL A., SOFIYAN F., SEEMA Y., NASRUL H., FAKHRUL I. (2005) Neuroprotection by Crocetin in a Hemi-Parkinsonian Rat Model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81: 805-813

ABE K., SAITO H. (2000) Effects of Saffron Extract and its Constituent Crocin on Learning Behaviour and Long-term Potentiation. *Phytotherapy Research* 14: 149-152

ADEN DP., FOGEL A., PLOTKIN S., DAMJANOV I., KNOWLES BB. (1979) Controlled Synthesis of HBsAg in a Differentiated Human Liver Carcinoma-Derived Cell Line. *Nature* 282(5739): 615-616

AHERNE SA., O'BRIEN NM. (1999) Protection by the Flavonoids Myricetin, Quercetin, and Rutin against Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage in Caco-2 and HepG2 Cells. *Nutrition and Cancer*, 34(2): 160-166

AKHONDZADEH S, TAHMACEBI-POUR N, NOORBALA AA, AMINI H, FALLAH-POUR H, JAMSHIDI AH, KHANI M. (2005) *Crocus sativus* L. in the Treatment of Mild to Moderate Depression: A Double-blind, Randomized and Placebo-controlled Trial. *Phytotherapy Research* 19: 148-151

AKHONDZADEH S., FALLAH-POUR H., AFKHAM K., JAMSHIDI AH., KHALIGHI-CIGAROUFI F. (2004) Comparison of *Crocus sativus* L. and Imipramine in the Treatment of Mild to Moderate Depression: A Pilot Double-blind Randomized Trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*: 4-12

AKHONDZADEH-BASTI A., MOSHIRI E., NOORBALA AA., JAMSHIDI AH., ABBASI SH., AKHONDZADEH S. (2007) Comparison of Petal of *Crocus sativus* L. and Fluoxetine in the Treatment of Depressed Outpatients: A Pilot Double-blind Randomized Trial. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 31: 439-442

ANDERSON D., PLEWA MJ. (1998) The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 13(1): 67-73

ASAI A., NAKANO T., TAKAHASHI M., NAGAO A. (2005) Orally Administered Crocetin and Crocins are Absorbed into Blood Plasma as Crocetin and its Glucuronide Conjugates in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7302-7306

ASHRAFI M., BATHAIE SZ., TAGHIKHANI M., MOOSAVI-MOVAHEDI AA. (2005) The Effect of Carotenoids Obtained from Saffron on Histone H1 Structure and H1-DNA Interaction. *Int J of Biological Macromolecules* 36: 246-252

ASSIMOPOULOU AM., SINAKOS Z., PAPAGEORGIOU VP. (2005) Radical Scavenging Activity of *Crocus sativus* L. Extract and its Bioactive Constituents. *Phytotherapy Research* 19: 997-1000

BABICH H., SARDANA MK., BORENFREUND E. (1988) Acute Cytotoxicities of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Determined in Vitro with the Human Liver Tumor Cell Line, HepG2. *Cell Biol. Toxicol.* 4(3): 295-309

BIESALSKI HK, GRIMM P. (2007) Taschenatlas Ernährung, 4. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2007: S. 372

BILEK, M. (2010) Schutzwirkung von Safran auf H₂O₂-Induzierte Zellschädigung in HepG2-Zellen. Diplomarbeit, Uni Wien.

CABALLERO-ORTEGA H., PEREDA-MIRANDA R., ABDULLAEV FI. (2007) HPLC Quantification of Major Active Components from 11 Different Saffron (*Crocus sativus* L.) Sources. Food Chemistry 100: 1126-1131

CARMONA M., ZALACAIN A., PARDO JE., LOPEZ E., ALVARRUIZ A., ALONSO GL. (2005) Influence of Different Drying and Aging Conditions on Saffron Constituents. Journal of Agricultural Food Chemistry 53: 3974-3979

CARMONA M., ZALACAIN A., SANCHEZ AM., NOVELLA JL., ALONSO GL. (2006) Crocetin Esters, Picrocrocin and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruit. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. J. Agric. Food Chem. 54: 973-979

CHANG PY., WANG CK., LIANG CT., KUO W. (1964) The Pharmacological Action of Zang Hong Hua (*Crocus sativus* L.) Effects on the Uterus and/or Strous Cycle. Yao Hsueh Hsueh Pao 11: 94-100

CHU FF., DOROSHOW JH., ESWORTHY RS. (1993) Expression, Characterization and Tissue Distribution of a New Cellular Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, GSHPx-GI. Journal of Biological Chemistry 268: 2571-2576

D'AURIA M., MAURIELLO G., RANA GL. (2004) Volatile Organic Compounds from Saffron. Flavour and Fragrance Journal 19: 17-23

DOOSTDAR H., GRANT MH., MELVIN MT., WOLF CR., BURKE MD. (1993) The Effects of Inducing Agents on Cytochrome P450 and UDP-Glucuronyltransferase Activities in Human HepG2 Hepatoma Cells. Biochem Pharmacol. 46(6): 629-635

ELMADFA I., LEITZMANN C. (2004) Ernährung des Menschen, 4. Auflage; UTB-Verlag, Stuttgart, 2004; S. 557

ESCRIBANO J., ALONSO GL., COCA-PRADOS M., FERNANDEZ JA. (1996) Crocin, Safranal and Picrocrocin from Saffron (*Crocus sativus* L.) Inhibit the Growth of Human Cancer Cells in Vitro. Cancer Letters 100: 23-30

FARDEL O., MOREL F., RATANASAVANH D., FAUTREL A., BEAUNE P., GUILLOUZO A. (1992) Expression of Drug Metabolizing Enzymes in Human HepG2 Hepatoma Cells. *Cellular and Molecular Aspects of Cirrhosis* 216: 327-330

GÁBELOVÁ A., SLAMENOVÁ D., RUZEKOVÁ L., FARKASOVÁ T., HORVÁTHOVÁ E. (1997) Measurement of DNA Strand Breakage and DNA Repair Induced with Hydrogen Peroxide Using Single Cell Gel Electrophoresis, Alkaline DNA Unwinding and Alkaline Elution of DNA. *Neoplasma* 44(6): 380-388

GÖÖCK, Roland (1981). *Buch der Gewürze*. Heyne Verlag, 1981; 167-172

GREGORY MJ., MENARY RC., DAVIES NW. (2005) Effect of Drying Temperature and Air Flow on the Production and Retention of Secondary Metabolites in Saffron. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5969-5975

GUTTERIDGE JMC., HALLIWELL B. (1994) *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford University Press: Oxford, New York, Tokyo.

HENDERSON L., WOLFREYS A., FEDYK J., BOURNER C., WINDEBANK S. (1998) The Ability of the Comet Assay to Discriminate Between Genotoxins and Cytotoxins. *Mutagenesis* 13(1): 89-94

HOEIJMAKERS JH. (2001) Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer. *Nature* 411: 366-374

HOSHYAR R., BATHAIE SZ., ASHRAFI M. (2008) Interaction of Safranal and Picrocrocin with ctDNA and Their Preferential Mechanisms of Binding to GC- and AT-Rich Oligonucleotides. *DNA and Cell Biology* 27(12): 665-673

HOSSEINZADEH H., ABOOTORABI A., SADEGHNIA HR. (2008) Protective Effect of *Crocus sativus* Stigma Extract and Crocin (trans-crocin 4) on Methyl Methanesulfonate-Induced DNA Damage in Mice Organs. *DNA and Cell Biology* 27(00): 1-8

- HOSSEINZADEH H., GHENAATI J. (2006) Evaluation of the Antitussive Effect of Stigma and Petals of Saffron (*Crocus sativus*) and its Components, Safranal and Crocin in Guinea Pigs. *Filoterapia* 77: 446-448
- HOSSEINZADEH H., NORAEI NB. (2009) Anxiolytic and Hypnotic Effect of *Crocus sativus* Aqueous Extract and its Constituents, Crocin and Safranal, in Mice. *Phytotherapy Research* 23: 768-774
- HOSSEINZADEH H., SADEGHNIA HR. (2007) Protective Effect of Safranal on Pentylentetrazol-Induced Seizures in the Rat: Involvement of GABAergic and Opioid Systems. *Phytomedicine* 14: 256-262
- HOSSEINZADEH H., SADEGHNIA HR., RAHIMI A. (2008) Effect of Safranal on Extracellular Hippocampal Levels of Glutamate and Aspartate During Kainic Acid Treatment in Anesthetized Rats. *Planta Med* 74: 1441-1445
- HOSSEINZADEH H., TALEBZADEH F. (2005) Anticonvulsant Evaluation of Safranal and Crocin from *Crocus sativus* in Mice. *Filoterapia* 76: 722-724
- HOSSEINZADEH H., YOUNESI HM. (2002) Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of *Crocus sativus* L. Stigma and Petal Extracts in Mice. *BMC Pharmacology*, 2002; 2(7): 1-8
- HOSSEINZADEH H., ZIAEE T., SADEGHI A. (2007) Effect of Saffron, *Crocus sativus* Stigma Extract and its Constituents, Safranal and Crocin, on Sexual Behaviors in Normal Male Rats. *Phytomedicine* 15: 491-495
- ISO (2003). Saffron (*Crocus sativus* Linnaeus) - Part 1: Specifications, Part 2: Test Methods. International Standards Organization: Geneva, Switzerland; ISO 3632-1/2
- JESSIE SW., KRISHNAKANTHA TP. (2005) Inhibition of Human Platelet Aggregation and Membrane Lipid Peroxidation by Food Spice, Saffron. *Molecular and Cellular Biochemistry* 278: 59-63

- KANAKIS CD., DAFERERA DJ., TARANTILIS PA., POLISSIOU MG. (2004) Qualitative Determination of Volatile Compounds and Quantitative Evaluation of Safranal and 4-Hydroxy-2,6,6-Trimethyl-1-Cyclohexene-1-Carboxaldehyde (HTCC) in Greek Saffron. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4515-4521
- KANAKIS CD., TARANTILIS PA., TAJMIR-RIahi HA., POLISSIOU MG. (2007) DNA-Interaction with Saffron's Secondary Metabolites Safranal, Crocetin and Dimethylcrocetin. *DNA and Cell Biology* 26(1): 63-70
- KASPER H. (2004) *Ernährungsmedizin und Diätetik*, 10. Auflage; Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, Jena; 444, 452
- KATZER G., FANSA J. (2007): *Picantissimo – Das Gewürzhandbuch*. Verlag: Die Werkstatt GmbH, Göttingen; 230-233
- KNASMÜLLER S., NERSESYAN A., MISIK M., GERNER C., MIKULITS W., EHRLICH V., HOELZL C., SZAKMARY A., WAGNER KH. (2008) Use of Conventional and –Omics Based Methods for Health Claims of Dietary Antioxidants: a Critical Overview. *British Journal of Nutrition* 99, E-Suppl. 1: ES3-ES52
- KOMMISSION E beim BfArM. (1987) *Croci Stigma*. BAnz. 76, 23.04.1987
- KOSCHUTNIG K. (2009) *Safety Assessment of Phytosterol Oxidation Products*. Dissertation Universität Wien, 2009; S. 57
- KUBO I., KINST-HORI I. (1999) Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase Inhibitory Activity and Inhibition Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4121-4125
- LECHTENBERG M., SCHEPMANN D., NIEHUES M., HELLENBRAND N., WÜNSCH B., HENSEL A. (2008) Quality and Functionality of Saffron: Quality Control, Species Assortment and Affinity of Extract and Isolated Saffron Compounds to NMDA and Sigma-1 Receptors. *Planta Med* 74: 764-772
- LI CY., LEE EJ., WU TS. (2004) Antityrosinase Principles and Constituents of the Petals of *Crocus sativus*. *J. Nat. Prod.* 67: 437-440

- LI N., LIN G., KWAN YG., MIN ZD. (1999) Simultaneous Quantification of Five Major Biologically Active Ingredients of Saffron by High-Performance-Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* 849: 349-355
- LONZANO P., CASTELLAR MR., SIMANCAS MJ., IBORRY JL. (1999) Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Method to Analyze Commercial Saffron (*Crocus sativus* L.) Products. *Journal of Chromatography A*, 830: 477-483
- LOOMIS TA. (1968) *Essential of Toxicology*. Lee and Febiger Verlag, Philadelphia, 1968; 67-78
- MARTIN G., GOH E., NEFF AW. (2002) Evaluation of the Developmental Toxicity of Crocetin on *Xenopus*. *Food and Chemical Toxicology* 40: 959-964
- MASUTANI H., OTSUKI R., YAMAGUCHI Y., TAKENAKA M., KANO H., TAKATERA K., KUNIMOTO Y., JODOI J. (2009) Fragrant Unsaturated Aldehydes Elicit Activation of the Keap1/Nrf2 System Leading to the Upregulation of Thioredoxin Expression and Protection against Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling* 11(5): 949-962
- MOHAJERI D., MOUSAVI G., MESGARI M., DOUSTAR Y., NOURI MHK. (2007) Subacute Toxicity of *Crocus sativus* L. (Saffron) Stigma Ethanolic Extract in Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2(4): 189-193
- MONTEITH DK., VANSTONE J. (1995) Comparison of the Microgel Electrophoresis Assay and Other Assays for Genotoxicity in the Detection of DNA Damage. *Mutation Research* 345(3-4): 97-103
- MUSONDA CA., CHIPMAN JK. (1998) Quercetin Inhibits Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-Induced NF- κ B DNA Binding Activity and DNA Damage in HepG2 Cells. *Carcinogenesis* 19(9): 1583-1589
- NEGBI M. (1999) *Saffron: Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1999: 1-9,19,31,32,45-49,65

OLIVE PL. (1989) Cell Proliferation as a Requirement of the Contact Effect in the Chinese Hamster V79 Spheroids. *Radiation Research* 117: 79-92

OROUDI SA., BEFANI CD., NENADIS N., KOLIAKOS GG., TSIMIDOU MZ. (2009) Further Examination of Antiradical Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract Rich in Crocins. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3080-3086

OSTLING O., JOHANSON KJ. (1984) Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123(1): 291-298

PAPANDREOU MA., KANAKIS CD., POLISSIOU MG., EFTHIMIOPOULOS S., CORDOPATIS P., MARGARITY M., LAMARI FN. (2006) Inhibitory Activity on Amyloid- β Aggregation and Antioxidant Properties of *Crocus sativus* Stigmas Extract and Its Crocin Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8762-8768

PELLEGRINI N., SERAFINI M., SALVATORE S., DEL RIO D., BIANCHI M., BRIGHENTI F. (2006) Total Antioxidant Capacity of Spices, Dried Fruits, Nuts, Pulses, Cereals and Sweets Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *Mol. Nutr. Food Res.* 50: 1030-1038

PREMKUMAR K., THIRUNAVUKKARASU C., ABRAHAM SK., SANTHIYA ST., RAMESH A. (2006) Protective Effect of Saffron (*Crocus sativus* L.) Aqueous Extract Against Genetic Damage Induced by Anti-Tumor Agents in Mice. *Human & Experimental Toxicology* 25: 79-84

RAINA BL., AGARWAL SG., BHATIA AK., GAUR GS. (1996) Changes in Pigments and Volatiles of Saffron (*Crocus sativus* L.) During Processing and Storage. *J. Sci. Food Agric.* 71: 27-32

RAMOS AA., LIMA CF., PEREIRA ML., FERNANDES-FERREIRA M., PEREIRA-WILSON C. (2008) Antigenotoxic Effects of Quercetin, Rutin, and Ursolic Acid on HepG2 Cells: Evaluation by the Comet Assay. *Toxicology Letters* 177: 66-73

SCHECK, C. (1997). Kulturgeschichte des Safrans. Diplomarbeit Uni Wien; S.7,8

SCHNELL, B. (2007) *Der Safran hat die Kraft zu kreftigen und zu stercken*. Gewürze in der mittelalterlichen Heilkunde. In: FANSA M., KATZER G., FANSA J. (2007) Chili, Teufelsdreck und Safran – Zur Kulturgeschichte der Gewürze. Verlag Die Werkstatt GmbH, Göttingen; S. 25-31; 34-35; 37-38

SHEAR NH., MALKIEWICZ IM., KLEIN D., KOREN G., RANDOR S., NEUMAN MG. (1995) Acetaminophen-Induced Toxicity to Human Epidermoid Cell Line A431 and Hepatoblastoma Cell Line HepG2, in Vitro, is Diminished by Silymarin. *Skin Pharmacology* 8(6): 279-291

SINGH NP., MCCOY MT., TICE RR., SCHNEIDER EL. (1988) A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA-Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175(1): 184-191

SOEDA S., OCHIAI T., PAOPONG L., TANAKA H., SHOYAMA Y., SHIMENO H. (2001) Crocin Suppresses TNF- α -induced Cell Death of Neuronally Differentiated PC-12 Cells. *Life Sciences* 69: 2887-2898

SOFIYAN S., MUZAMIL A., ABDULLAH SA., SEEMA Y., MUBEEN AA., BADARUZZAMAN K., TAUHEED I., FAKHRUL I. (2006) Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on Neurobehavioral and Neurochemical Changes in Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Medicinal Food* 9 (2): 246-253

TAFAZOLI M., BAETEN A., GEERLINGS P., KIRSCH-VOLDERS M. (1998) In Vitro Mutagenicity and Genotoxicity Study of a Number of Short-Chain Chlorinated Hydrocarbons Using the Micronucleus Test and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Technique (Comet Assay) in Human Lymphocytes. *Mutagenesis* 13(2): 115-126

TARANTILIS PA., POLISSIOU MG. (1997) Isolation and Identification of the Aroma Components from Saffron (*Crocus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* 45: 459-462

TAVAKKOL-AFSHARI J., BROOK A., MOUSAVI SH. (2008) Study of Cytotoxic and Apoptogenic Properties of Saffron Extract in Human Cancer Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology* 46(11): 3443-3447

TERMENTZI A, KOKKALOU E. (2008) LC-DAD-MS Analysis and Antioxidant Capacity of *Crocus sativus* Petal Extracts. *Planta Med.* 74(5): 573-581

TEUSCHER E. (2002) Gewürzdrogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; S. 314-318

TICE RR., AGURELL E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN A., KOBAYASHI H., MIYAMAE Y., ROJAS E., RYU JC., SASAKI YF. (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(3): 206-221.

TICE, RR., ANDREWS PW., SINGH NP. (1990) The Single Cell Gel Assay: A Sensitive Technique for Evaluating Intercellular Differences in DNA Damage and Repair. *Basic Life Sciences* 53: 291-301

TILL S. (2004) Die sinnliche Welt der Gewürze. Orac-Verlag, Wien; S. 127-131

TRISNAWATY YA., VIAN L., SABATIER R., CANO JP. (2000) In Vitro Detection of Indirect-Acting Genotoxins in the Comet Assay Using HepG2-Cells. *Mutation Research* 468: 227-234

UHL M., HELMA C., KNASMÜLLER S. (2000) Evaluation of the Single Cell Gel Electrophoresis Assay with Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Mutation Research* 468: 213-225

WEINHOLD PA., CHARLES L., FELDMAN DA. (1994) Regulation of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase in HepG2 Cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism* 1210(3): 335-347

WICHTL M. (2002) Teedrogen und Phytopharmaka. 4. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; S. 159-161

WISEMAN H. (1996) Dietary Influences on Membrane Function: Importance in Protection Against Oxidative Damage and Disease. *Nutritional Biochemistry* 7: 2-15

WOODS JA., BILTON RF., YOUNG AJ. (1999) β -Carotene Enhances Hydrogen Peroxide-Induced DNA-Damage in Human Hepatocellular HepG2 Cells. *FEBS Letters* 449: 255-258

XIANG M., QIAN ZY., ZHOU CH., LIU J., LI WN. (2006) Crocetin Inhibits Lycopocyte Adherence to Vascular Endothelial Cells Induced by AGEs. *Journal of Ethnopharmacology* 107: 25-31

YANG L., QIAN Z., YANG Y., SHENG L., JI H., ZHOU C., KAZI HA. (2008) Involvement of Ca^{2+} in the Inhibition by Crocetin of Platelet Activity and Thrombosis Formation. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9429-9433

YANG R., TAN X., THOMAS AM., SHEN J., QURESHI N., MORRISON DC., VAN WAY III CW. (2006) Crocetin Inhibits mRNA Expression for Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , and Inducible Nitric Oxide Synthase in Hemorrhagic Shock. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 30: 297-301

YOUNG AJ., LOWE GM. (2001) Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27

ZHOU CH., CHIAN CY., XIANG M., HE SY. (2007) Involvement of Ca^{2+} in the Inhibition by Crocetin of Angiotensin II-Induced ERK 1/2 Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *European Journal of Pharmacology* 554: 85-91

LEBENS LAUF

Vor- und Zuname: Felizitas Moll
Staatsbürgerschaft: österreichisch
Geburtsdatum und -ort: 8. Oktober 1985, Rum/Tirol
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1991 - 1995 Übungsvolksschule Wilten, Innsbruck
1995 - 2003 Akademisches Gymnasium, Innsbruck
seit 2004 Studium: Ernährungswissenschaften, Universität Wien
(Wahlschwerpunkt: Ernährung und Umwelt)
seit 2009 LA-Studium: Haushaltsökonomie und Ernährung / Englisch

Berufserfahrung:

Schuljahr 2003/04: Au pair in Vancouver, Kanada

August 2005: Praktikum bei Staud's Konserven, Wien

August 2007: Praktikum bei der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung

September 2007: Ferienjob bei Ströck Brot

Juli 2008: Praktikum im Diätcamp „Fit statt dick“ des Sacré-Coeur, Pressbaum

Juli/August 2009: Praktikum im Diätcamp „Fit statt dick“ des Sacré-Coeur, Pressbaum

Seit Oktober 2008: Ehrenamtliche Tätigkeit bei „Stark Bewegt“ (Verein zur Gewichtsreduktion übergewichtiger Kinder und Jugendlicher)

SS 09 + WS 09/10: Tutorin bei den „Übungen zur Ernährung des Menschen 2“, Uni Wien

Wien, im Jänner 2010

Felizitas Moll