



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Schutzwirkung von Safran  
auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Zellschädigung  
in HepG2-Zellen

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser:	Michael Bilek
Matrikel-Nummer:	0300006
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Wien, im März 2010



Meine Anerkennung gilt...

...Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Möglichkeit an diesem Projekt beteiligt sein zu dürfen, sowie für seine tadellose Betreuung und umgängliche Art.

...Agrarökonom Johannes Pinterits für die Bereitstellung des Probenmaterials und die zahlreichen nützlichen Tipps.

...Prof. Mag. Dr. Susanne Till für die Unterstützung und guten Ratschläge während des gesamten Projektes.

...meiner Laborpartnerin Mag. Felizitas Moll für Ihre kameradschaftliche Einstellung sowie Ihrer stets positiven und freundlichen Art.

...meiner Familie für die Motivation und die Unterstützung in allen Bereichen. Vor allem meinem Bruder, der nicht nur beim Buchstabieren schwieriger Worte eine Hilfe war.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ALLGEMEINES.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>AUFBAU DER PFLANZE/BOTANIK.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>INHALTSSTOFFE DES SAFRANS.....</b>	<b>4</b>
4.1	PROTROCROCIN .....	4
4.2	CROCETIN-GLYKOSIDE .....	4
4.3	CROCIN .....	5
4.4	PICROCROCIN .....	6
4.5	SAFRANAL .....	6
<b>5</b>	<b>SAFRANANBAU IN ÖSTERREICH .....</b>	<b>7</b>
5.1	SAFRANPRODUKTE .....	7
<b>6</b>	<b>KULTIVIERUNG .....</b>	<b>9</b>
6.1	KLASSISCHE SAFRANKULTIVIERUNG .....	9
6.1.1	<i>Anbaumethoden.....</i>	<i>10</i>
6.1.2	<i>Ernte ab Mitte Oktober.....</i>	<i>11</i>
6.1.3	<i>Weitere Behandlung.....</i>	<i>12</i>
6.2	MASCHINELLE SAFRANKULTIVIERUNG .....	13
6.2.1	<i>Präparieren des Bodens.....</i>	<i>13</i>
6.2.2	<i>Das Einpflanzen .....</i>	<i>13</i>
6.2.3	<i>Blüten sammeln.....</i>	<i>14</i>
6.2.4	<i>Trennung der Narbenäste.....</i>	<i>15</i>
6.2.5	<i>Trocknung .....</i>	<i>15</i>
6.2.6	<i>Rückschluss.....</i>	<i>15</i>
<b>7</b>	<b>QUALITÄT .....</b>	<b>16</b>
<b>8</b>	<b>FÄLSCHUNGEN .....</b>	<b>16</b>
8.1	FÄLSCHEN DER FÄDEN .....	17
8.2	FÄLSCHEN DES PULVERS.....	17
<b>9</b>	<b>PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN .....</b>	<b>18</b>
<b>10</b>	<b>AKTUELLER STAND DER WISSENSCHAFT .....</b>	<b>20</b>
<b>11</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
11.1	BESCHAFFUNG DES PROBENMATERIALS – VON DER ERNTE BIS ZUR LAGERUNG .....	25
11.2	09.OKTOBER.2008.....	25
<b>12</b>	<b>ZELLKULTUR ALLGEMEIN .....</b>	<b>28</b>
12.1	HEPG2-ZELLEN .....	28
12.2	GERÄTE .....	28
12.2.1	<i>Laminar Flow .....</i>	<i>28</i>
12.2.2	<i>Wasserbad .....</i>	<i>28</i>
12.2.3	<i>Brutschrank.....</i>	<i>28</i>

## II

12.3	SUBSTANZEN UND MATERIALIEN .....	29
12.4	VERWENDETE LÖSUNGEN .....	30
12.4.1	MEM.....	30
12.4.2	FCS.....	30
12.4.3	PBS .....	30
12.4.4	Trypsin .....	30
12.4.5	non essential Amino Acids.....	30
12.4.6	DMSO .....	30
12.5	HERSTELLEN DER LÖSUNGEN .....	31
12.5.1	Komplementiertes Medium (500 ml).....	31
12.5.2	Unkomplementiertes Medium (500 ml) .....	31
12.5.3	NaCl-Lösung (0,9 %) .....	31
12.5.4	Sodumpyruvat (500 mM) .....	31
12.5.5	Einfriermedium.....	31
<b>13</b>	<b>ZELLKULTUR.....</b>	<b>32</b>
13.1	MEDIUMWECHSEL .....	32
13.1.1	Phenolrot.....	32
13.2	PASSAGE/SUBKULTIVIERUNG ADHÄRENTER ZELLEN .....	33
13.2.1	Zellzahlbestimmung .....	34
13.2.2	Trypanblautest.....	34
13.2.3	Hämocytometer/Neubauer Zählkammer .....	35
13.2.4	Kryokonservierung.....	36
<b>14</b>	<b>VERSUCHSANSÄTZE .....</b>	<b>36</b>
14.1	TAG 1.....	37
14.2	TAG 2.....	37
14.3	TAG 3.....	37
<b>15</b>	<b>ALTERNATIVER BEHANDLUNGSWEG MIT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>38</b>
15.1	PRINZIP .....	38
15.2	DURCHFÜHRUNG.....	38
<b>16</b>	<b>ELEKTROPHORESE / COMET ASSAY .....</b>	<b>39</b>
16.1	SUBSTANZEN UND MATERIALIEN .....	39
16.2	PRINZIP .....	40
16.2.1	Elektrophorese .....	40
16.2.2	Comet Assay.....	40
16.3	VERWENDETE LÖSUNGEN .....	41
16.3.1	Lyselösung .....	41
16.3.2	Elektrophoresepuffer.....	41
16.3.3	Neutralisationspuffer .....	41
16.3.4	Low melting agarose (LMA) .....	42
16.3.5	Normal melting agarose (NMA).....	42
16.3.6	Ethidiumbromid (20 µg/mL).....	42
16.4	DURCHFÜHRUNG.....	42
<b>17</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>44</b>
17.1	TRYPANBLAUTEST.....	44
17.2	COMET ASSAY .....	46
<b>18</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>48</b>
<b>19</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG .....</b>	<b>50</b>

20	ZUSAMMENFASSUNG .....	52
21	SUMMARY .....	53
22	LITERATURVERZEICHNIS .....	54

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SAFRAN .....	2
ABBILDUNG 2: PANNONISCHER SAFRAN (MIT KNOLLE) .....	3
ABBILDUNG 3: PANNONISCHER SAFRAN (HÄNDISCH HERAUSGELÖST) .....	3
ABBILDUNG 4: CROCETIN-GLYKOSIDE UND GENTIOBIOSE (OCHIAI, 2007) .....	5
ABBILDUNG 5: STRUKTURFORMEL VON CROCIN (AUNG, 2007) .....	5
ABBILDUNG 6: STRUKTURFORMEL VON PICROCROCIN .....	6
ABBILDUNG 7: STRUKTURFORMEL VON SAFRANAL (KANAKIS, 2007).....	6
ABBILDUNG 8: SAFRAN-FELD AM TAG DER ERNTE (KLINGENBACH, OKTOBER 2008).....	7
ABBILDUNG 9: FRESKO KNOSSOS .....	11
ABBILDUNG 10: FRESKO SANTORIN .....	11
ABBILDUNG 11: GETROCKNETE SAFRANFÄDEN.....	12
ABBILDUNG 12: ECHTER SAFRANFADEN .....	17
ABBILDUNG 13: WACHSTUMSRATEN DER ZELLINIEN .....	20
ABBILDUNG 14: DNA MIGRATION NACH UNTERSCHIEDLICHER BEHANDLUNG.....	21
ABBILDUNG 15: HAMILTON-SKALA-VERLAUF DER SAFRAN- UND PLACEBOGRUPPE WÄHREND DER BEHANDLUNG .....	22
ABBILDUNG 16: ARBEITER BEIM BEHUTSAMEN ERNTEN DES SAFRANS .....	26
ABBILDUNG 17: CROCUS SATIVUS L. UNMITTELBAR NACH DER ERNTE .....	26
ABBILDUNG 18: GETRENNTE BESTANDTEILE DES SAFRANS.....	26
ABBILDUNG 19: HEPG2-ZELLEN UNTER DEM MIKROSKOP .....	28
ABBILDUNG 20: BRUTSCHRANK FÜR ZELLKULTUREN .....	28
ABBILDUNG 21: MEM-FLASCHE 500ML .....	30
ABBILDUNG 22: WÖCHENTLICHER KULTIVIERUNGSZYKLUS DER HEPG2-ZELLEN .....	34
ABBILDUNG 23: NEUBAUER ZÄHLKAMMER.....	35
ABBILDUNG 24: GITTERNETZ ZUM AUSZÄHLEN DER ZELLEN .....	35
ABBILDUNG 25: AUSZÄHLEN DER ZELLEN MITTELS HÄMOCYTOMETER.....	35
ABBILDUNG 26: ERGEBNISSE DES TRYPANBLAUTESTS (NARBENÄSTE) .....	44
ABBILDUNG 27 ERGEBNISSE DES TRYPANBLAUTESTS (TEPALEN) .....	45
ABBILDUNG 28: ERGEBNISSE DES COMET-ASSAYS (NARBENÄSTE) .....	46
ABBILDUNG 29: ERGEBNISSE DES COMET-ASSAYS (TEPALEN).....	47

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: SUBSTANZEN UND MATERIALIEN DIE ZUR DURCHFÜHRUNG DER ARBEIT BENÖTIGT WURDEN .....	29
TABELLE 2: FARBVERLAUF VON PHENOLROT IM ZELLKULTURMEDIUM .....	32
TABELLE 3: ZEITLICHER ABLAUF DER ARBEITSSCHRITTE .....	36
TABELLE 4: SUBSTANZEN UND MATERIALIEN ELEKTROPHORESE UND COMET ASSAY.....	39

## 1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Safrans (*crocus sativus L.*) auf eine spezielle Zelllinie (HepG2) untersucht. Dieses *in vitro* Studiendesign wurde gewählt, um damit die Wirkungsweise von Safran auf zellulärer Ebene eines humanen Systems zu beleuchten.

Durch den wieder etablierten Anbau des Gewürzes in Österreich scheint Safran in unseren Breiten an Attraktivität gewonnen zu haben, was der Untersuchung eine aktuelle und greifbare Brisanz verleiht.

Das Gewürz ist schon seit längerem Gegenstand verschiedenster wissenschaftlicher Untersuchungen, wobei sich die Bemühungen dabei fast ausschließlich auf die Wirkstoffe der Narbenäste beschränken.

In der hier verfassten Arbeit wurden sowohl die Narbenäste als auch die Blütenblätter (Tepalen) des Safrans verwendet. Mittels Zellzahlbestimmung wurde die Vitalität der HepG2-Zellen nach der Behandlung mit den verschiedenen Extrakten ermittelt. Ferner wurde auch die DNA-Stabilität der Zellen untersucht. Es wurde also versucht insbesondere die genotoxischen als auch die cytotoxischen Wirkungen des Safrans zu erfassen. Untersuchungsmethoden der Wahl waren der Trypanblautest zur Zellzahlbestimmung sowie dem Comet-Assay zur Bestimmung der DNA-Schädigung. Der Fokus liegt im Speziellen auf einer etwaigen Schutzwirkung des Safrans auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Zellschädigung in jenen Zellen. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist bekannt für seine oxidative Wirkung, die zu Zellschäden führen kann. Insbesondere die carotinoiden Inhaltsstoffe des Safrans haben mittels ihrer Fähigkeit Peroxylradikale zu binden und somit zu inaktivieren, Potential, einem solchen oxidativen Stress entgegenzuwirken.

Die Arbeit wurde in Kooperation mit meiner Kollegin Felizitas Moll durchgeführt. Sie konzentrierte sich in Ihrem Teil auf die Wirkung von Safran auf DNA-Stabilität und Zellvitalität von HepG2-Zellen.

## 2 Allgemeines

Safran ist eine alte Gewürz- und Färberpflanze. Sein Name leitet sich vom arabischen Wort „zafaran“ = Gelbsein ab.

Eventuell wurde Safran schon zum Färben verwendet, noch bevor er als Gewürz Bedeutung fand. Da die Narben sehr stark färben wenn sie nass sind, wurden sie als Pigment eingesetzt. Tatsächlich war Safran einer der ältesten gelben Textilfarbstoffe der Menschheit.

Botanisch betrachtet gehört Safran zu der Familie der Schwertliliengewächse (*Iridaceae*). Der Safrankrokus (*Crocus sativus L.*) bildet keine Früchte und vermehrt sich

über seine Tochterknollen. Die Erntezeit der leuchtend roten Narbenäste – sie stellen das eigentliche Gewürz dar – beginnt Anfang Oktober.

Die Ernte der Narbenäste ist aufwändig, da sie händisch erfolgt. Für 1 kg Trockenmasse sind 150.000 – 200.000 dieser Narben nötig. Im Normalfall geben etwa 120 Blüten 1 Gramm Safran, das entspricht 360 Safranfäden. Das Gramm ist sehr hochpreisig. Für ein Gericht für 4 Personen reichen 10 Fäden.

Bezüglich des Preises findet man in der Literatur sehr stark abweichende Werte. Sie reichen von 3 Euro pro Gramm bis hin zu mehr als 20 Euro pro Gramm. Grund hierfür sind die oft unterschiedliche Qualität des Produktes sowie Fälschungen. Unbestritten ist jedoch die Position des Safrans als die weltweit teuerste Gewürzdroge. Interessant scheint auch die Tatsache, dass Safran als Gewürz mit keinem anderen Gewürz harmonisiert. Ob seines individuellen Aromas stellt Safran hier wohl einen Einzelgänger dar. (TILL, 2004)



**Abbildung 1: Safran**

### 3 Aufbau der Pflanze/Botanik

*Crocus sativus L.* ist eine mehrjährige, langsam wachsende Pflanze, die mit der Herbstzeitlosen gewisse Ähnlichkeit hat. (SCHRÖDER, 1991) Die Pflanze kann eine Größe von 8 bis 30 Zentimeter erreichen. Der auf der Knolle sitzende Fruchtknoten bildet im Herbst die violetten Blüten. Diese sogenannten Perigonblätter sind zu einer ca. 15 Zentimeter langen Röhre verwachsen.



**Abbildung 2: pannonischer Safran (mit Knolle)**

Die Pflanze besitzt 3 zusammengewachsene Fruchtblätter (=Staubblätter). Sie sind in ihrer Färbung stark gelb und stellen den männlichen Teil der Pflanze dar.

Aus der Blüte ragen 3 Narbenäste hervor – scharlachrot und mit gelbem Rand. Sie sind im Inneren mit dem Griffel verwachsen. Diese roten Narbenschkel bilden das uns bekannte Gewürz. Sie sind am oberen Ende trichterförmig erweitert und erreichen eine Länge von 1 – 5 Zentimeter. Der Geruch ist aromatisch, der Geschmack etwas bitter. (SCHRÖDER, 1991) Die Fäden sind zerbrechlich und lassen sich leicht zerreiben. Beim Kauen färbt sich der Speichel rot/orange. (PFLICHTENHEFT)



**Abbildung 3: pannonischer Safran (händisch herausgelöst)**

Ob ihres tetraploiden Charakters ist die Pflanze unfruchtbar/steril. Sie vermehrt sich vegetativ durch Knollenteilung.

## **4 Inhaltsstoffe des Safrans**

Während der letzten Jahrzehnte war die Erforschung der Inhaltsstoffe des Safrans Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Safran setzt sich aus schätzungsweise 150 flüchtigen sowie einigen nichtflüchtigen Verbindungen zusammen. 40 – 50 Hauptbestandteile konnte bisher identifiziert werden. Anhand jener Daten lassen sich die Inhaltsstoffe in die Gruppen Farbstoffe, Geschmackstoffe sowie flüchtige Aromastoffe einteilen. Die wichtigsten pharmakologisch aktiven Metaboliten dieser Gruppen sind Crocin, Picrocrocin und Safranal. Weiters findet man in Safran Proteine, verschiedene Zucker, Vitamine, Flavonoide, Aminosäuren, Mineralstoffe und andere chemische Verbindungen. (ABDULLAEV, 2002)

### **4.1 *Protocrocin***

Protocrocin ist ein sogenanntes Carotinoid-Digentiobiosid-diglucosid. Der Nachweis des Protocrocins ist bisher noch nicht gelungen. Man nimmt an, dass viele im Safran enthaltene Spaltprodukte von diesem Molekül ausgehen.

### **4.2 *Crocetin-Glykoside***

Crocetin ist eine Dicarbonsäure, die die zentrale Verbindung der Crocetin-Glykoside darstellt. Je nach Substituenten ergeben sich die im Safran enthaltenen Moleküle Dicrocin, Tricrocin und Crocin. (siehe Abbildung 4). Diese Pigmente sind Farbstoffe und damit für die orange-rote Farbe des Safrans verantwortlich. Sie sind Gegenstand neuester Untersuchungen, in denen versucht wird eine Struktur – Aktivitäts Beziehung herzustellen. Im Fokus steht hier vor allem das antioxidative Potential der Verbindungen. (OCHIAI et al., 2007)

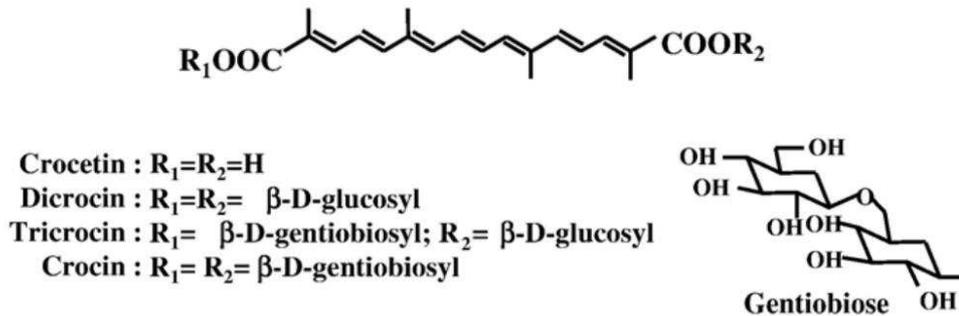


Abbildung 4: Crocetin-Glykoside und Gentiobiose (OCHIAI, 2007)

### 4.3 Crocin

Crocin ist ein gut wasserlöslicher Farbstoff. Zwischen 10 und 25 % sind im Safran enthalten. Seinen wasserlöslichen Charakter erhält das Molekül durch die Veresterung mit Gentiobiose (Disaccharid aus 2 D-Glucose Molekülen). Laut einer aktuellen Studie besitzt Crocin aphrodisierende Wirkung. (HOSSEINZADEH et al., 2008). Auch scheint das Molekül über starke antioxidative Kapazität zu verfügen. So wies eine Studie dem Crocin einen besseren antioxidativen Effekt als dem  $\alpha$ -Tocopherol nach. (OCHIAI et al., 2004)

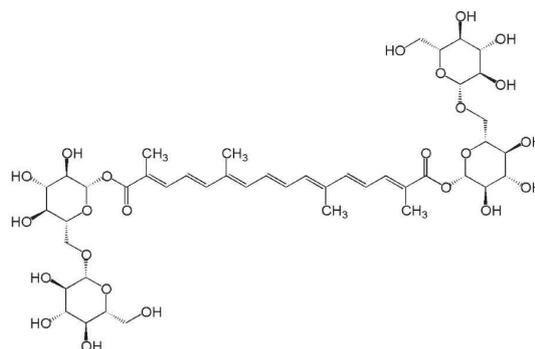


Abbildung 5: Strukturformel von Crocin (AUNG, 2007)

#### 4.4 Picrocrocin

Wird auch „Safranbitter“ genannt. Es handelt sich um eine nicht flüchtige Substanz, die eine glycosidische Bindung enthält. Frischer Safran enthält 4 % Picrocrocin. Das Molekül wird z.B. durch Erwärmen in Glucose und Safranal gespalten. (HÄNSEL, 2004)

Dies lässt deutlich werden, warum frischer Safran bitter schmeckt, und er erst nach Trocknung sowie mehrmonatiger Lagerung sein typisches Aroma entfaltet.

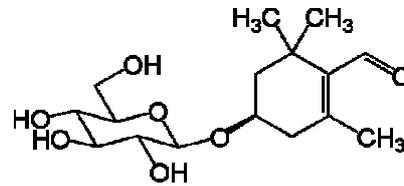


Abbildung 6: Strukturformel von Picrocrocin

#### 4.5 Safranal

Safranal (= 4,5-Dehydro- $\beta$ -cyclocitral) stellt mit einem Anteil von 47 % an den flüchtigen Stoffen den kardinalen Aromastoff in der Droge dar. Das Monoterpen entsteht durch Glucoseabspaltung von Picrocrocin. Hydroxy-Safranal (= 4-Hydroxy- $\beta$ -cyclocitral) ist einer jener Stoffe, die für das endgültige Aroma mitverantwortlich sind. Auch könnte es ein Zwischenprodukt bei der Bildung des Safranals sein. (HÄNSEL, 2004)

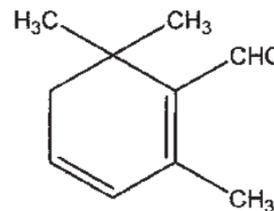


Abbildung 7:  
Strukturformel von Safranal  
(KANAKIS, 2007)

## 5 Safranbau in Österreich

Safran wird seit 2006 wieder erfolgreich in Österreich (unter anderem in Klingebach, Burgenland) angebaut. Dieser „pannonische Safran“ wird auf einer Anbaufläche von ca. 1,5 Hektar kultiviert.

Die Safranproduktion in Klingebach wird von dem Landwirt Johannes Pinterits betrieben. Er hat österreichweit die längste Erfahrung im Umgang mit Safran und arbeitet



**Abbildung 8: Safran-Feld am Tag der Ernte (Klingebach, Oktober 2008).**

schon seit längerem mit dem Institut für Ernährungswissenschaften zusammen. Die in dieser Arbeit verwendeten Krokusse stammen zur Gänze aus seiner Ernte von 2008.

Zwar produziert Johannes Pinterits schon seit mehreren Jahren Safran, hierbei handelt es sich jedoch nicht um die Erstkultivierung.

Tatsächlich wurde in Österreich schon bereits vor über 100 Jahren Safran angebaut. So kann man in einem Dokument aus dem Jahr 1844 nachlesen, dass der damals kultivierte „*Crocus austriacus*“ von hoher Qualität war und gegenüber dem französischen Safran den Vorzug erhielt. Wörtlich heißt es in dieser, noch in althochdeutsch verfasster Schrift:

*„... und davon zuweilen einen nicht geringen Gewinn zieht, weil der Österreichische Safran dem Französischen vorgezogen wird und deshalb höher im Preise stehet. ...“*

(LINK, 1844)

### 5.1 Safranprodukte

Einst kam dem Safran eine große Bedeutung als Farbstoff und edles Parfüm zu. Ein gebräuchliches Speisengewürz stellte Safran nicht dar. Vielmehr diente er als Statussymbol. So kam es, dass man früher griechische Herrscher safranfarbene Gewänder trugen, und im Theater der blumige Safrangeruch zu vernehmen war. (TILL,

2004) Zwar wird die Droge heute nicht mehr medizinisch verwendet, und ist auch in der pharmazeutischen Technologie durch synthetische Farbstoffe ersetzt worden. Trotzdem hat Safran – neben seiner primären Verwendung als Gewürz – in vielen anderen Produktsparten Einzug gehalten.

Beispiele für Produkte, die mit Safran heutzutage veredelt werden:

- Liköre
- Kosmetika
- Süßwaren

Der pannonische Safran wird unter anderem zu diesen Produkten weiterverarbeitet:

- Safrankexe
- Safrannudeln
- Cremehonig
- Safranpralinen
- Spezialkosmetika
- Seifen

Ogleich Safran durch synthetische Farbstoffe weitgehend ersetzt wurde, findet er nach wie vor Verwendung zum Färben und Aromatisieren nichtalkoholischer Getränke.

(HÄNSEL, 2004)

## 6 Kultivierung

*Crocus sativus L.* gehört zur großen Familie der Schwertliliengewächse (*Iridaceae*). Der Artname „*Sativus*“ weist bereits darauf hin, dass es sich um eine Kulturform handelt. *Crocus sativus L.* stellt also eine gezüchtete selektierte Form dar. Die Narbenäste – der weibliche Anteil der Blüte – werden auf Länge gezüchtet, um den Ertrag zu steigern. Safran wird aus dem Safrankrokus gewonnen. Krokus ist eine Gattung mit ca. 80 Arten, die zum Großteil im Frühling blühen (wie z.B. der Gartenkrokus). Der Safrankrokus blüht im Herbst zusammen mit 20 anderen Arten dieser Gattung. (Ö1 RADIOSENDUNG, 2008)

Kultiviert wird das Gewürz unter anderem in folgenden Ländern: Aserbaidschan, Frankreich, Israel, Marokko, Türkei, Ägypten und Mexiko. Die jährlich produzierte Menge von etwa 50 Tonnen hat einen Wert von ungefähr 50 Millionen Dollar. Der Hauptgrund für den enormen Preis ist, dass Safran nach wie vor von Hand kultiviert und geerntet wird. (ABDULLAEV, 2002)

### 6.1 **Klassische Safrankultivierung**

Die Safranknollen werden Ende August angebaut, indem Sie ca. 10 cm tief in den Boden gesetzt werden, mit ca. 10 cm Abstand zu einander. Vier bis fünf Wochen darauf beginnen sie zu blühen. Von da an – meist Anfang Oktober – dauert die Blüte zwei bis drei Wochen. Dies ist gleichzeitig die Zeit der Ernte.

Das sogenannte Safrangras bildet sich im November und Dezember. Diese Blätter bleiben die ganze kalte Jahreszeit über grün – auch bei extremer Kälte. (PINTERITS, 2008)

Der Winter ist für *Crocus sativus* die Zeit des Wachstums. Hier werden Energie aufgenommen und Reservestoffe für die nächste Saison eingelagert. Auch ist dies die Zeit der vegetativen (ungeschlechtlichen) Vermehrung, indem Knollen gebildet werden. Ist diese Phase abgeschlossen (Anfang/Mitte Juni) folgt die Dormanz. Diese Ruhephase dauert – abhängig von Region und Klima - ungefähr bis Anfang September.

Dieser jährliche Zyklus lässt sich gut verstehen, wenn man die Abstammung des Safrankrokus berücksichtigt. In Griechenland (dem Herkunftsland des Safrans) steht über die Sommermonate praktisch keine Flüssigkeit zur Verfügung. Im Winter hingegen regnet es relativ viel. Der genetische Rhythmus der Pflanze hat sich folglich auf eine Ruhephase im Sommer und eine Wachstumsphase im Winter eingestellt. Dieser Zyklus blieb unverändert, obgleich der Safrankrokus schon über ca. 4000 Jahre kultiviert wird. (Ö1 RADIOSENDUNG, 2008)

### 6.1.1 Anbaumethoden

Der Anbau selbst ist von Land zu Land sehr verschieden. Schon bei der Frage wie tief man die Knolle in die Erde setzt oder ob man sie jedes Jahr wieder herausnehmen soll gibt es keine einstimmige Antwort.

Zwei Methoden zum Setzen der Knollen haben sich (in Österreich) bewährt:

1. Löcher stechen:

Abhängig vom Boden werden Löcher von unterschiedlicher Tiefe in das Erdreich gestochen. Meist wird eine Einsetz-Tiefe von 8 – 12 Zentimeter gewählt. Hier spielt unter anderem auch die Durchlässigkeit des Bodens eine Rolle. Befinden sich die Krokusknollen nicht in der richtigen Tiefe bilden sie sogenannte Zugwurzeln aus, welche die Knollen nach unten ziehen.<sup>1</sup>

Grundsätzlich spielen neben der Durchlässigkeit des Bodens einige andere Faktoren eine Rolle bei der Tiefenwahl der Knollensetzung:

- Die Tochterknolle wächst oberhalb der Mutterknolle
- Winterfrost muss gut überstanden werden. Aufgrund des kalten Winters werden beispielsweise in der Schweiz die Knollen bis zu 20 Zentimeter tief gesetzt.

---

<sup>1</sup> Johannes Pinterits konnte dieses Phänomen bislang nicht beobachten.

## 2. Furchen ziehen:

Bei dieser Methode werden die Knollen in eine Furche gelegt. Dieser Vorgang wird auch „Kiellegen“ genannt. Der Aushub einer zweiten parallel gezogenen Furche dient zum zuschütten der Ersten.

Der Prozess des Pflanzens ist Anfang September abgeschlossen. Bereits wenige Wochen (~4) danach kommen die ersten Blüten. Dabei werden sogenannte Siphone sichtbar, die sich 2 – 3 Zentimeter über der Erde öffnen, wodurch die eigentliche Blüte zum Vorschein kommt.

### 6.1.2 Ernte ab Mitte Oktober

Mit dem Erscheinen der Blüten beginnt auch die Ernte. Diese dauert meist bis Ende Oktober, also 2 – 3 Wochen. Da das Gewürz durch Sonneneinwirkung an Aroma verliert werden die Blüten bereits in den frühen Morgenstunden geerntet.

Das Herauslösen der Narbenschenkel wird anderenorts durchgeführt.

Bei einer alternativen Erntemethode werden die Narbenäste direkt am Feld gelöst,



**Abbildung 10: Fresko Santorin**

wodurch die Blüte angeblich weniger verletzt würde. Als Vorteil wird bei dieser Methode genannt, dass die am Feld zurückbleibenden Blütenreste eine Winterweide für Bienen darstellen. (Ö1 RADIOSENDUNG, 2008)

Malereien (entdeckt in den 1980ern) scheinen zu bestätigen, dass schon früher beide Erntemethoden angewandt wurden.

Auf einem Fresko in Knossos erkennt man einen Jüngling, der Safran erntet indem er die ganze Blüte abreißt.

Auf Santorin, ebenfalls in Griechenland, lässt sich ein weiteres Fresko bestaunen, dass sich auch die Safranernte zum Thema gemacht hat. Auf jener Wandmalerei ernten 2 junge Frauen nur die Narben, und nehmen nicht die ganze Blüte.



**Abbildung 9: Fresko Knossos**

### 6.1.3 Weitere Behandlung

Nach dem Herauslösen werden die Safranfäden getrocknet. Bei diesem Vorgang verlieren die Narben 4/5 ihres Gewichtes. Auch wird bei diesem Vorgang das für Safran typische Aroma ausgeprägt. Üblicherweise wird über Feuer oder Glut geröstet. Die Trocknung stellt auch einen riskanten Arbeitsschritt dar. Bei zu hoher Hitze bzw. bei zu langer Einwirkzeit können die Narbenäste empfindlich geschädigt werden. Der pannonische Safran wird für 24 Stunden bei etwa 50 °C getrocknet. Die fertig getrockneten Narbenäste sind ca. ein bis drei Zentimeter lang und in ihrer Farbe tiefrot. (siehe Abbildung 12)

Zur Aufbewahrung des Safrans bieten sich Porzellan-, Glas- oder Metallbehältnisse an. Das Gewürz ist hygroskopisch und lichtempfindlich, und sollte deshalb entsprechend gelagert werden. Jedoch verliert Safran auch bei korrekter Lagerung rasch an Aroma. Es empfiehlt sich daher der Kauf von kleineren Mengen. (TEUSCHER, 2003)



**Abbildung 11: getrocknete Safranfäden**

Das Aroma ist im ersten Jahr nach der Ernte am besten, verliert danach aber ständig an Intensität. Eine Lagerung von 2 Jahren oder mehr macht daher wenig Sinn (ERNÄHRUNG AKTUELL, 2008). Eine Studie konnte aufzeigen, dass die Faktoren Temperatur und Feuchtigkeit einen entscheidenden Einfluss auf den Abbau der pharmakologisch aktiven Stoffe des Safrans haben. (ABDULLAEV, 2002)

## **6.2 Maschinelle Safrankultivierung**

Safran ist – wie bereits erwähnt – eine empfindliche Pflanze, die mit besonderer Sorgfalt behandelt werden muss. Die unterschiedliche Größe der Pflanzenteile sowie die Tatsache, dass die Narbenäste schwer zu erreichen sind, machen eine vollständige Mechanisierung der Arbeitsschritte sehr schwer. Trotzdem gibt es Bemühungen die Kultivierung durch landwirtschaftliches Gerät zu unterstützen.

In bislang durchgeführten Versuchen wurde bereits vorhandenes landwirtschaftliches Gerät für die maschinelle Safrankultivierung adaptiert.

### **6.2.1 Präparieren des Bodens**

Für das Bearbeiten des Bodens (Furchen ziehen – ca. 300 Millimeter tief) können übliche landwirtschaftliche Maschinen verwendet werden. In einer Testreihe wurde hierfür eine Kartoffel-Pflanzmaschine benutzt. Das Erdreich sollte in einer Weise präpariert sein, die einen Wasserstau verhindert. Dieser würde sich schädlich auf die Ernte auswirken.

Auch das Düngen kann mit herkömmlichen landwirtschaftlichen Geräten erfolgen. Aufgrund der oft kleinen Anbaufläche wird diese Arbeit meist händisch durchgeführt.

### **6.2.2 Das Einpflanzen**

Bei der mechanischen Pflanzung der Knolle gibt es zahlreiche Hürden zu überwinden. Safran ist klein und empfindlich, und muss in den richtigen Abständen im Boden platziert werden. Auch seine Ausrichtung im Boden ist von entscheidender Bedeutung. Für diesen Arbeitsschritt scheint der Einsatz eines Zwiebel-Pflanzers am Sinnvollsten. Dieser muss unter anderem an die Größe der Safran-Knolle adaptiert werden.

Ein Nachteil dieser Methode ist die ungenaue Ausrichtung der Knolle im Erdreich. Sie kann schräg oder sogar verkehrt in der Erde liegen. Versuche haben gezeigt, dass eine geneigte Ausrichtung zu verzögerter Sprossung und erhöhtem Blütenwachstum führt.

Eine „auf den Kopf gestellte“ Ausrichtung führt sowohl zu verzögerter Sprossung als auch zu einer verminderten Produktion.<sup>2</sup>

Die Arbeitszeit für diese Variante beträgt 5 Stunden (für ein 1000 m<sup>2</sup> großes Feld).

Händisch würde diese Arbeit mehr als 100 Stunden dauern. (NEGBI, 1999)

### 6.2.3 Blüten sammeln

Safran wird üblicherweise in den Morgenstunden geerntet, wenn die Blüten noch geschlossen sind, da man sich so eine bessere Qualität erwartet. Durch manuelle Arbeit können von einer Person pro Stunde zwischen 8 und 16 kg Safran geerntet werden. Das entspricht ca. 2000 – 4000 Krokussen.

Die naheliegendste Überlegung zur maschinellen Durchführung dieser Arbeit wäre es wohl, einen Rasenmäher so zu kalibrieren, dass er die Pflanze sehr weit unten abschneidet, diese sammelt und die Blätter abtrennt. Allerdings hat sich gezeigt, dass es durch eine derartige Methode zu einer negativen Entwicklung der Knollen kommt.

Die Safranernte zu Mechanisieren ist also eine der schwierigsten Aufgaben. Auch weil es ökonomisch nicht lohnend erscheint dürfte es die einzige Möglichkeit sein, bereits vorhandene Geräte entsprechend für diese Arbeit zu adaptieren. Ein – mit einer solchen Gerätschaft durchgeführten – Test (es handelte sich um eine zweckentfremdete Oliven-Sammelmaschine) zeigte wenig Erfolg. Ein geringerer Ertrag war die Folge von Blüten die nicht aufgesammelt- und Verunreinigungen (Blätter u.ä.) die mit gesammelt wurden. Letztere mussten in späteren Arbeitsschritten wieder entfernt werden. Weiters scheint das maschinelle Ernten einen negativen Effekt auf die Färbekraft des Gewürzes zu haben. Ebenfalls beeinträchtigt dürfte das Aroma sein, hier kommt es möglicherweise durch die Reaktion von Picrocrocin zu Safranal zu einem bitteren Einschlag. (NEGBI, 1999)

---

<sup>2</sup> Landwirt Johannes Pinterits sieht das jedoch nicht als größeres Problem an, da sich die Tochterknollen im folgenden Jahr von alleine richtig orientieren. Die suboptimale Ausrichtung und der damit einhergehende geminderte Ertrag scheinen also nur im Jahr des Aussetzens von Bedeutung zu sein.

### **6.2.4 Trennung der Narbenäste**

Das Abtrennen der Narbenäste von den übrigen Pflanzenteilen ist eine zeitintensive Aufgabe. Eine Person schafft durchschnittlich 500 - 1500 Stück in einer Stunde. Bei 140.000 Blüten würde das einem Aufwand von 93 – 280 Stunden entsprechen, einem Gewicht von ungefähr 1 kg.

In einem Versuch wurde die Trennung von Stilen, Staubblättern und Blütenblättern in einem Windkanal getestet. Das Problem das sich hier stellt hängt mit der Anatomie der Pflanze zusammen. Oftmals sind Blütenhülle und Stile noch zu sehr miteinander verwachsen, sodass sie im Windkanal nicht getrennt werden können. Auch eine zuvor durchgeführte Trocknung löst dieses Problem nicht. Meist haften die Bestandteile danach sogar noch hartnäckiger aneinander.

### **6.2.5 Trocknung**

Mittels herkömmlicher Trocknung benötigt man ca. 17 Stunden für die Trocknung einer Menge von 5 - 6 kg. Im Versuch wurden Dehydrationskammern verwendet, in denen die Ernte für 3 Stunden bei 48 °C verweilt. Dies bringt zwar eine beachtliche Zeitersparnis, jedoch hat diese Behandlung negativen Einfluss auf die organoleptische Qualität des Safrans. (NEGBI, 1999)

Nach dem Trocknungsprozess kann das Produkt zu Pulver gemahlen werden. Hierfür empfiehlt sich der Einsatz von elektrischen Kaffeemühlen.

### **6.2.6 Rückschluss**

Der Safranbau kann teils durch Maschineneinsatz unterstützt werden (diese müssen allerdings zuerst entsprechend umgerüstet werden), bestimmte Arbeitsschritte müssen jedoch nach wie vor von Hand durchgeführt werden. (NEGBI, 1999)

## **7 Qualität**

International wird die Qualität des Gewürzes nach bestimmten ISO-Normen gemessen. Mittels physikalischen und chemischen Methoden werden die Inhaltsstoffe nachgewiesen.

In Österreich sind folgende zwei Qualitätsstufen von Bedeutung:

1. Elegierter Safran: hier werden nur die Narbenäste verwendet; er ist frei von Griffelresten
2. Natureller Safran: Der naturelle Safran kann bis zu 10 % der gelben Griffelanteile enthalten

(ERNÄHRUNG AKTUELL, 2008)

## **8 Fälschungen**

Da Safran als das teuerste Gewürz gilt, sind Verfälschungen bei dem „roten Gold“ nichts Ungewöhnliches. Billigsafran, der nicht aus kontrolliertem Fachhandel stammt, ist so gut wie immer verfälscht. Es gibt verschiedene Versionen, wobei es leichter ist Safranpulver zu fälschen als Safranfäden. Auch heute noch findet man Fälschungen am Markt.

In verschiedenen alten Sprachen ähneln die Namen für Safran, Saflor und Kurkuma einander. Auch ob ihrer Verwendung als Färbemittel wurden sie schon damals miteinander verwechselt. Das Verfälschen von Safran scheint also lange Tradition zu haben. (TILL, 2004)

Beliebte Varianten sind das Untermischen ähnlich aussehender Blütenteile sowie die Droge mittels Flüssigkeiten schwerer zu machen. (NEUMANN, 2005)

## 8.1 Fälschen der Fäden

Die Fäden werden z.B. mit Öl, Zuckerwasser oder Honig beschwert, um das Gewicht des Safrans zu erhöhen.

Den fertig getrockneten Safranfäden können auch andere Pflanzen beigemischt werden wie etwa Saflor (= Färberdistel), Ringelblume (*Calendula officinalis*) oder Kurkuma (=Gelbwurz). Ein geschultes Auge kann Narbenäste des Safrans von Saflorblüten eindeutig unterscheiden. Eleganter Safran ist glänzend, leuchtend tiefrot. Die Narbenäste sind deutlich zu erkennen besitzen einen aromatisch-fruchtigen Geruch. Die

zum Fälschen verwendeten Pflanzenteile des Saflors hingegen sind orange und gelb. Es gibt keine Narbenäste und der Geruch ist wenig aromatisch bis unangenehm. Echte Safranfäden erkennt man unter anderem an ihrem trompetenförmigen Ende. In drastischeren Fällen werden Griffel von Mais oder auch rote Plastikfasern verwendet. (Ö1 RADIOSENDUNG, 2008)



**Abbildung 12: echter Safranfaden**

## 8.2 Fälschen des Pulvers

Zur Fälschung von Safranpulver kann im Grunde jedes rote Pulver verwendet werden. Gängige Mittel zum Strecken sind Paprikapulver, Kurkumapulver, gefärbte Stärke, rote Kreide und rotes Sandelholz. Werden diese Produkte mit echtem gemörsertem Safranpulver vermischt, so kann man diese Verfälschung quasi nur noch im Labor nachweisen. Beim Kauf von Safran empfiehlt sich daher die Fäden dem Pulver vorzuziehen. (Ö1 RADIOSENDUNG, 2008)

## 9 Physiologische Wirkungen

Auch wenn Safran als gesundes und teures Gewürz gilt, so gibt es doch eine obere Grenze der unbedenklichen Zufuhr. Scheinbar macht auch hier – wie auch in vielen anderen Bereichen – die Dosis das Gift. Maximal 1,5 Gramm Safran am Tag gelten als unbedenklich. Bereits eine Menge von 5 - 10 Gramm kann zu schweren Vergiftungen führen wie Erbrechen, Schwindel, Benommenheit und Gebärmutterblutungen bei Frauen. Eine Menge von 20 Gramm wird in der Literatur stets als die für den Menschen letale Dosis betrachtet. (TILL, 2008) Die Vergiftungserscheinungen sind mannigfaltiger Natur. Verminderte Reaktionsfähigkeit sowie ein unbändiger Lachreiz stellen sich nach einem kurzen Erregungszustand ein. Danach folgen unterschiedliche Symptome wie etwa beschleunigter Puls, Herzklopfen, Durchfall, Erbrechen und Sinnestäuschungen bis hin zu Exitus. Beim Pflücken der Narbenäste können Frauen Uterusblutungen bekommen (ROTH, 2008)<sup>3</sup>. Jedenfalls wird dem Safran eine abortive Wirkung zugeschrieben. Die dafür nötige Dosis beträgt 10 Gramm. Zu einer schweren Purpura kommt es bereits nach 5 Gramm. (ROTH, 2008) Tatsächlich wurde Safran früher missbräuchlich als Abortivum genutzt.

Dem Safran wird eine appetitanregende und verdauungsfördernde Wirkung nachgesagt (TEUSCHER, 1994). In der Volksmedizin ist oft von einer schmerzstillenden, krampflösenden Wirkung die Rede. (WEIDINGER, 2008). Auch eine Wirkung als Nervenberuhigungsmittel wird *crocus sativus* nachgesagt. (HÄNSEL, 2004) Ebenfalls als schmerzstillendes Mittel und Beruhigungsmittel findet Safran in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung. (OCHIAI et al, 2007)

Volkskundlich wird Safran desweiteren bei folgenden Krankheiten eingesetzt:

- Nervensystem: Schlaflosigkeit, Lähmungen
- Respirationstrakt: Asthma, Erkältung, Husten
- Kardiovaskuläres System: Herzerkrankungen
- Krebs

---

<sup>3</sup> Johannes Pinterits konnte diese Aussage nicht bestätigen.

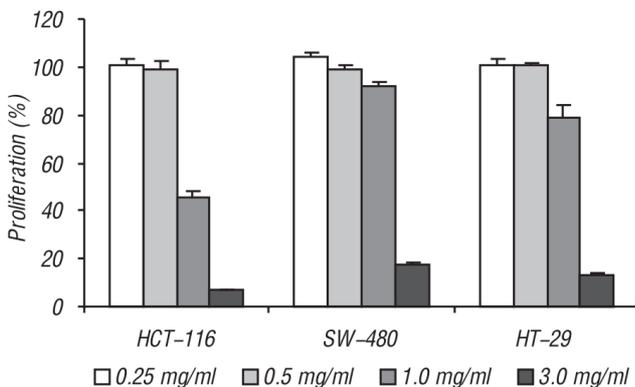
- Verdauungssystem: Flatulenz, Magenbeschwerden, Kolik
- Herz-Kreislaufsystem: Blutkrankheiten, Hypoxie
- Augenkrankheiten
- Infektionskrankheiten: Scharlach, Pocken
- Muskulatur und Knochen: Lähmungen, Gicht
- Urogenitalsystem: Gebärmutterblutungen, Amenorrhoe (ABDULLAEV, 2002)

Aktuelle wissenschaftliche Forschung zeigt positive Wirkungen einzelner Inhaltsstoffe auf. Meist scheinen Carotinoide für diese verantwortlich zu sein. Antikrebswirkung sowie Schutz vor Arteriosklerose stehen im Fokus der derzeitigen Forschungsarbeiten. (ERNÄHRUNG AKTUELL, 2008)

## **10 Aktueller Stand der Wissenschaft**

Die Studie mit dem Titel „Crocine from crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells“ befasste sich 2007 mit der Wirkung von Crocin und einem Safran-Extrakt auf humane Darmkrebszellen.

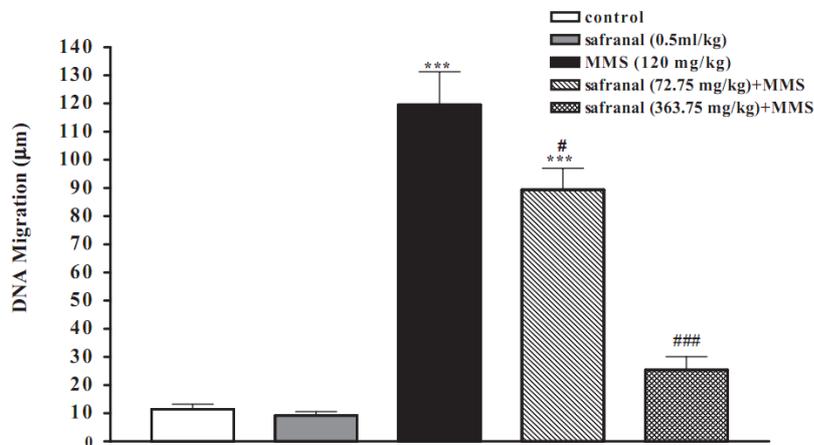
Gegenstand der Untersuchungen waren folgende Zelllinien: HCT-116, SW-480 und HT-29. Analysemethoden waren HPLC sowie MTS (modified trichrome stain). Die Studie konnte tatsächlich nachweisen, dass Crocin sowie das Safran-Extrakt einen hemmenden Effekt auf das Wachstum dieser Krebszellen haben. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Beeinträchtigung von nicht-Krebszellen kommt. Die Abbildung zeigt die Wirkung von Crocin in verschiedener Konzentration auf die 3 Zelllinien. Zur stärksten Proliferationshemmung kam es bei der Zelllinie HCT-116. (AUNG H.H et al., 2007)



**Abbildung 13: Wachstumsraten der Zelllinien**

Ebenfalls im Jahr 2007 fand eine Studie statt die sich mit der Wirkung des Safrans auf DNA-geschädigte Mausorgane beschäftigte. Laut dieser Studie hat Safran eine hemmende Wirkung auf das genotoxisch-wirkende MMS (Methyl-Methansulfonat). Die Mäuse wurden in 5 Gruppen geteilt, die unterschiedlich behandelt wurden. Untersucht wurden die DNA-Migration in den Organen Leber, Lunge, Niere und Milz.

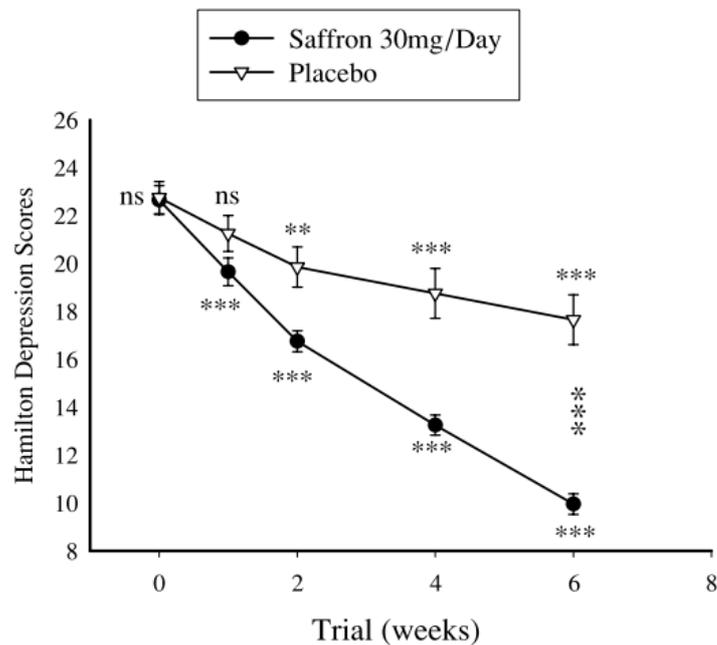
Nachstehendes Diagramm zeigt die Ergebnisse der 5 Gruppen im Organ Leber.



**Abbildung 14: DNA Migration nach unterschiedlicher Behandlung**

Die Ergebnisse bei den anderen Organen nehmen einen vergleichbaren Verlauf. Stets zeigen die MMS-belasteten Proben auch die höchste DNA-Migration. Bei der Leber (Abbildung 15) ist die DNA-Migration der Gruppe-Safranal (363,75mg/kg) um das 7,31-fache geringer als bei der reinen MMS-Gruppe. Die Studie konnte zeigen, dass Safranal einen hemmenden Effekt auf MMS-induzierte DNA-Schädigung besitzt. (HOSSEINZADEH H. u. SADEGHNIA H.R, 2007)

Eine Studie zur Wirkung von Safran auf Depressionen gab es im Jahr 2005. 40 Personen zwischen 18 und 55 Jahren nahmen an der Studie teil. Auf der Hamilton-Skala (Diagnosewerkzeug zur Ermittlung der Schwere einer Depression) mussten jene Teilnehmer einen Wert von mindestens 18 aufweisen (Ein Wert von 15 bis 18 wird als milde bis mittelschwere Depression angesehen). Die Probanden wurden in 2 Gruppen geteilt, wobei Gruppe 1 Safrankapseln einnahm (30mg/Tag), und Gruppe 2 ein Placebo erhielt. Das Ausgangsniveau der Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die nachfolgende Abbildung zeigt den Verlauf der beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum von 6 Wochen.



**Abbildung 15: Hamilton-Skala-Verlauf der Safran- und Placebogruppe während der Behandlung**

Der Verlauf zeigt einen signifikanten Unterschied zum Ausgangswert, dies gilt jedoch auch für die Placebo-Gruppe. Desweiteren zeigt sich Ende der 6 Wochen, dass sich auch die beiden Gruppen voneinander signifikant unterscheiden. Vergleiche mit ähnlichen Studien sind hier nicht möglich, da diese Studie die erste dieser Art war. Sofern man der Untersuchung Glauben schenken darf, wirkt Safran einer Depression entgegen. Weitere Studien scheinen notwendig. (AKHONDZADEH S. et al., 2005) Eng mit Depressionen in Zusammenhang steht die Krankheit erektile Dysfunktion (ED). (SHIRI et al., 2007) Eine aktuelle Pilotstudie hat die Wirkung von *crocus sativus L.* auf ED untersucht. Mittels entsprechenden Tests (NPT = nocturnal penile tumescence; IIEF-15 = index of erectile function questionnaire) wurde der Effekt der Droge auf ED evaluiert. 20 Patienten nahmen an der Studie teil, wobei sie jeden Tag (Gesamtdauer der Studie = 10 Tage) eine Tablette (200 mg Safran) einnahmen. Es stellte sich heraus, dass es bei den genannten Kriterien des Tests zu Beginn und am Ende zu signifikanten Unterschieden kam. Wie aus der Studie hervorgeht hat das Gewürz einen positiven Effekt bei der Behandlung von ED. Jedoch muss beachtet werden, dass die Anzahl der getesteten Patienten gering war und es weder Kontroll- noch Placebogruppe gab. Weiters gibt die Studie keinen Aufschluss darüber, welcher der Inhaltsstoffe für die postulierte Wirkung verantwortlich sein könnte. Auch stellt der Preis des Safrans eine Barriere dar, um ihn

zur Behandlung sexueller Dysfunktionen einzusetzen. (SAMSA et al., 2009) In einem Tierversuch (HOSSEINZADEH et al., 2008) wurden ähnliche Parameter untersucht, und zwar das sexuelle Verhalten von männlichen Ratten nach der Gabe von einem Safranextrakt sowie seinen isolierten Einzelkomponenten (Safranal und Crocin) in hoher Dosis. Dabei zeigte Crocin in jeder verabreichten Dosis Effekte auf die getesteten Messgrößen, was die Vermutung unterstützt, dass Crocin eine aphrodisierende Wirkung besitzt. Safranal hingegen zeigte keinen vergleichbaren Effekt, zeigte in dieser Studie sogar einen gegenteiligen Effekt an. Das ebenfalls wirkungsvolle Extrakt hatte einen vergleichsweise geringen Crocin-Gehalt. Es scheint als wenn der Gehalt dieses Carotinoids nur geringen Einfluss auf die aphrodisierende Wirkung des Safrans besitzt. In der Studie wird betont, dass synergistische Effekte mehrerer Inhaltsstoffe, wie etwa Crocin, Crocetin, Dimethyl-Crocetin Flavonoide, Vitamine, Aminosäuren und Mineralstoffe für den erhobenen Effekt verantwortlich sein könnten.

Eine Humanstudie befasste sich mit der Wirkung des Crocetins auf physische Ermüdung. Es handelte sich hierbei um eine doppelblinde, placebokontrollierte Studie, mit 14 freiwillige Teilnehmern (7 Männer und 7 Frauen). Die Probanden wurden in die Gruppen „Crocetin“, „Ascorbinsäure“ und „Placebo“ eingeteilt (randomisiert). Der eigentliche Test wurde auf einem Fahrrad-Ergometer durchgeführt. Die Probanden mussten sich dabei für 2 x 120' (gesamt 240') bei gleichbleibender Arbeitsbelastung einem Ausdauerstest unterziehen. Während dieser physischen Belastung gab es an 2 Zeitpunkten (30' und 210') für 10" einen Test mit maximaler Geschwindigkeit ohne Arbeitswiderstand. Ein Vergleich der beiden Zeitpunkte ergab eine signifikante Steigerung von der 30'-Marke zur 210'-Marke bei den männlichen Teilnehmern, die das Crocetin-Präparat erhielten. Die „Ascorbinsäure-Gruppe“ zeigte keine deutlichen Unterschiede zur Placebo-Gruppe (weder Männer noch Frauen). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass durch die Gabe von Crocetin die Ausdauerleistung während einer Belastung gesteigert werden kann. Die Tatsache, dass lediglich bei den männlichen Teilnehmern eine Leistungssteigerung zu erkennen war, wird auf die antioxidative Wirkung des Crocetins zurückgeführt und/oder auf die verbesserte Sauerstoffzufuhr des Muskels. Allerdings kann letztlich keine eindeutige Aussage getroffen werden, da zum einen das getestete Kollektiv sehr klein war, und zum anderen nur gesunde Personen an der Studie teilnahmen. (MIZUMA et al., 2009)

Einzelne aktive Inhaltsstoffe des Safrans haben antioxidative Wirkung.

Ziel der hier verfassten Arbeit war es, eine Schutzwirkung des Safrans auf oxidativ gestresste HepG2 Zellen zu überprüfen.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der Trypanblautest angewandt, der durch das Einfärben beschädigter Zellwände ein Verhältnis zwischen unbeschädigten und geschädigten Zellen detektierbar macht. In einem weiteren Schritt wurde die Genotoxizität mittels Comet-Assay (SCGE) überprüft.

*Crocus sativus L.* wurde in dieser Kombination der Methoden bis dato noch nicht getestet. In dem nun folgenden Material- und Methoden-Teil wird das Design dieser Arbeit näher beschrieben.

## **11 Material und Methoden**

Als Probenmaterial für die Untersuchungen wurde österreichischer Safran aus dem Burgenland bezogen. Dieser wurde frisch geerntet, rasch getrennt und gefriergetrocknet. Es wurden Extrakte (Ethanol/Wasser 80/20) mit 2 unterschiedlichen Pflanzenteilen getestet (Narbenäste und Tepalen).

HepG2-Zellen, eine spezielle Lebertumorzelllinie, waren jenes Material, das mit den Extrakten behandelt wurde.

Untersuchungsmethoden waren Trypanblautest und Comet Assay. Ersterer sollte cytotoxische Effekte erkennen lassen. Der Comet Assay (SCGE) war die Methode, um eine mögliche genotoxische Wirkung ausmachen zu können.

Die Versuchsansätze wurden im Zellkulturlabor des Instituts für Ernährungswissenschaften durchgeführt. Nachdem das Arbeiten mit Zelllinien einen sterilen Arbeitsplatz bedurfte, wurden die Zellen stets unter entsprechenden Bedingungen unter dem Laminar Flow behandelt.

### ***11.1 Beschaffung des Probenmaterials – Von der Ernte bis zur Lagerung***

#### ***11.2 09. Oktober 2008***

Die verwendeten Pflanzen stammen von der Ernte des Landwirten Johannes Pinterits aus dem Jahr 2008. Dieser baut seit 2006 erfolgreich Safran in Österreich, genauer in Klingensbach (Burgenland), an.





**Abbildung 17: *Crocus sativus* L. unmittelbar nach der Ernte**

Nachdem das Aroma des Safrans möglichst gut erhalten

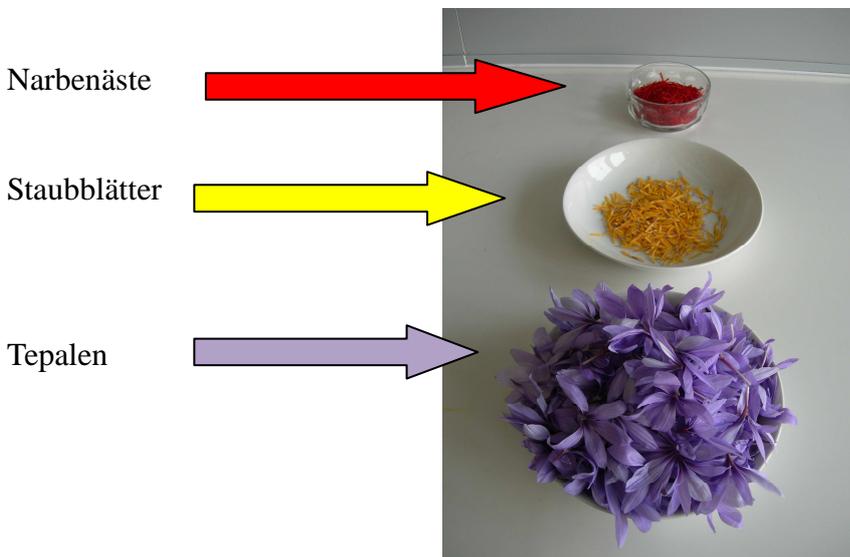
bleiben sollte, **Abbildung 16: Arbeiter beim behutsamen Ernten des Safrans**

musste das Sammeln bereits am frühen Morgen erfolgen. Um ca. 09.15 Uhr startete die Ernte. Etwa 20 Erntehelfern machte sich daran, die Krokusse in Handarbeit zu

sammeln. Die Pflanze wurde mitsamt der Blüte gepflückt. In diesem Zustand wurden

die Proben nach Wien gebracht. Die weitere Bearbeitung, die im Wesentlichen aus dem Herauslösen der Narbenäste bestand, wurde am Institut für Ernährungswissenschaften durchgeführt.

Das Zerlegen der zahlreich nach Wien mitgebrachten Safrankrokusse sollte sich als zeitintensive Arbeit erweisen. Die Pflanzenproben wurden sorgsam in folgende Bestandteile geteilt:



**Abbildung 18: getrennte Bestandteile des Safrans**

Gewicht der separierten Pflanzenbestandteile:

Narbenäste:	24,58 g
Staubblätter:	9,38 g
Tepalen:	88,84 g

In einer weiteren Trennung wurden lediglich die Narbenäste von den übrigen Pflanzenbestandteilen getrennt (Die Staubblätter wurden nicht von den Tepalen gelöst). Bei den durchgeführten Versuchen wurden stets Narbenästen oder Tepalen (inklusive Staubblätter) getestet.

Um die langfristige Konservierung der Inhaltsstoffe sicherzustellen wurden die getrennten Pflanzenbestandteile am darauffolgenden Tag gefriergetrocknet und bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 12 Zellkultur allgemein

### 12.1 HepG2-Zellen

Bei HepG2 Zellen handelt es sich um Lebertumorzellen, die einem 15 Jährigen Argentinier im Jahre 1975 entnommen wurden. Ihrer Eigenschaften nach sind die Zellen adhärent und wachsen in Form einer Schicht an der Oberfläche (Monolayer).

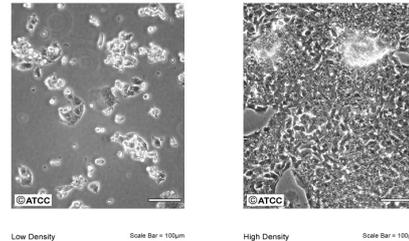


Abbildung 19: HepG2-Zellen unter dem Mikroskop

### 12.2 Geräte

#### 12.2.1 Laminar Flow

Sterile Werkbank. Regelmäßiges Desinfizieren mit 70 %igem Ethanol notwendig (Arbeitsfläche und Geräte).

#### 12.2.2 Wasserbad

Hier werden die verwendeten Lösungen auf 37 °C vorgewärmt.

#### 12.2.3 Brutschrank

Der Brutschrank (Inkubator) wird zur Kultivierung der Zellen benötigt. Temperatur und Atmosphäre werden konstant gehalten bei 37°C bzw. 5% CO<sub>2</sub>.



Abbildung 20: Brutschrank für Zellkulturen

### 12.3 Substanzen und Materialien

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
DMSO	Sigma	D5879
MEM	PAA Laboratories	E15-825
PBS	PAA Laboratories	H15-002
FCS	PAA Laboratories	A15-151
1 % Amino acids non essential	PAA Laboratories	M11-003
1 mM Sodium pyruvate, 98 %	Sigma	P2256
Trypsin/EDTA (10 x)	PAA Laboratories	L11-659
Trypan blue solution	Sigma	T8154
10 ml Einmal-Spritzen, Luer, VE = 80	Dr. F. Bertoni	309110
6-wellplates, flach, mit Deckel, TC treated, VE =50 Stk.	Dr. F. Bertoni	3810-006
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup> , TC treated, mit Belüftungskappe, 70 ml, VE = 100 Stk.	Dr. F. Bertoni	3103-025
15 ml Falconröhrchen		
50 ml Zentrifugenröhrchen, PP, steril, stehend, mit Schraubkappe, graduiert, VE = 250 Stk.	Dr. F. Bertoni	36050NPG
Injektionskanülen, Terumo eolus Nr 18, 26G x23, 0,45 x 23 mm	Apotheke	Lot 0606023

**Tabelle 1: Substanzen und Materialien die zur Durchführung der Arbeit benötigt wurden**

## 12.4 Verwendete Lösungen

### 12.4.1 MEM

Steht für „minimum essential medium“. Enthält die Nährstoffe für die Zellen (u.a. Vitamine, Aminosäuren, Glucose). Wird für gewöhnlich für Kulturen mit 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre eingesetzt.



**Abbildung 21:**  
**MEM-Flasche**  
**500ml**

### 12.4.2 FCS

Steht für „Fetal Calf Serum“. Andere Bezeichnungen wären FKS (Fetales Kälberserum) oder FBS (Fetas Bovine Serum). Es stellt das in der Zellkultur am häufigsten verwendete Serum dar. Ob seiner förderlichen Eigenschaften für das Zellwachstum ist FCS ein oftmals unverzichtbares Additiv. (BOXBERGER, 2007)

### 12.4.3 PBS

Steht für „phosphate buffered saline“, also phosphatgepufferte Salzlösung. Sie enthält kein Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>. Anwendungsmöglichkeiten sind z.B. das Waschen der Zellkultur oder das Verdünnen von konzentrierter Trypsinlösung.

### 12.4.4 Trypsin

Die verwendete Trypsinlösung ist ein Gemisch aus 9 Teilen PBS und 1 Teil Trypsin/EDTA (10x konz.). Sie wird zum Ablösen der Zellen verwendet.

### 12.4.5 non essential Amino Acids

Dient als Additiv des Mediums (komplementiert und unkomplementiert).

### 12.4.6 DMSO

= Dimethylsulfoxid, wird dem Einfriermedium als Schutzsubstanz zugesetzt (5 – 10 %) um die Bildung größerer Eiskristalle zu verhindern.

## **12.5 Herstellen der Lösungen**

### **12.5.1 Komplementiertes Medium (500 ml)**

445 ml MEM

50 ml FCS

5 ml non essential Amino Acids

1 ml Sodumpyruvat (500 mM)

### **12.5.2 Unkomplementiertes Medium (500 ml)**

495 ml MEM

5 ml non essential Amino Acids

1 ml Sodumpyruvat (500 mM)

### **12.5.3 NaCl-Lösung (0,9 %)**

0,9 g NaCl in 100 ml A. bidest. Lösen, sterilfiltrieren

### **12.5.4 Sodumpyruvat (500 mM)**

1,1 g Sodumpyruvat (MG = 110,04 g/l) in 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %) lösen, sterilfiltrieren

### **12.5.5 Einfriermedium**

40 % FCS

20 % DMSO

40 % unkomplementiertes Medium

## 13 Zellkultur

Neben den eigentlichen Versuchen stellen der Mediumwechsel sowie die Passage der Zellen die wesentlichen Routineaufgaben in der Zellkultur dar.

### 13.1 *Mediumwechsel*

Ein Wechsel des Mediums wird nach einiger Zeit des Wachstums nötig. Erkennbar wird dies durch eine allmähliche Orangefärbung des Mediums. Ob der steigenden Zellzahl werden die Nährstoffe immer rascher verbraucht, was mit einem steigen des pH-Wertes und einem Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs (Phenolrot) einhergeht. Zudem reichern sich mit der Zeit abgestorbene Zellen an. Durch deren Zersetzung kommt es nach und nach zum Anstieg cytotoxischer Substanzen wie z.B. Ammoniak. (BOXBERGER, 2007)

#### 13.1.1 Phenolrot

Den meisten Medien wird Phenolrot (= Phenolsulfonphtalein) als Farbindikator zur pH-Wert-Kontrolle zugesetzt. Dieser Indikator bietet den Vorteil der geringen Cytotoxizität. Zu einer markanten Gelbfärbung kommt es in einem sauren pH-Bereich. Ein basisches Medium geht mit einer violetten Färbung einher. (BOXBERGER, 2007) Den genauen Farbverlauf zeigt nachstehende Tabelle.

Farbe	pH-Wert
Gelb	6,5
Orange	7
Rot	7,4
Blaurot	7,6
Lila	7,8

**Tabelle 2: Farbverlauf von Phenolrot im Zellkulturmedium**

### **13.2 Passage/Subkultivierung adhärenter Zellen**

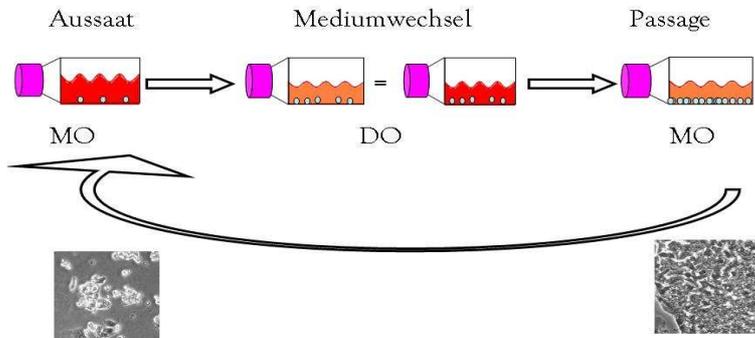
Grundsätzlich versteht man darunter das Überführen einer gewünschten Zellzahl in ein neues Kulturgefäß. Die Zellen sollen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben.

Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit lassen sich beim Verdünnen verschiedene Faktoren ermitteln. Transformierte, sich rasch proliferierende Zellen lassen sich stärker verdünnen (Faktor 1:10 bis 1:20) als langsam wachsende Zellen (Faktor 1:2 bis 1:5). Ist die gesamte Oberfläche des Kulturgefäßes mit Zellen bedeckt, so spricht man von Konfluenz. Zu diesem Zeitpunkt sollte subkultiviert werden, allerdings muss man mit der Passage nicht bis zur vollständigen Konfluenz warten. Es gilt zu beachten, dass die Proliferationsrate bei zu hoher Zelldichte stark abnimmt. Die Anzahl der bereits durchgeführten Passagen sollte stets protokolliert werden. Zwar sagt diese Passagezahl nichts über das eigentlich Alter der Zelllinie aus, doch kann sie als eine Art Belastungsmaß herangezogen werden.

Das Ablösen des Monolayers von der Unterlage erfolgt mittels Trypsin-Lösung (auf 37 °C vorgewärmt). Abhängig von Einwirkzeit und Konzentration kann es bei dem Trypsinierungsprozess zu negativen Auswirkungen auf Zelloberfläche und membranständige Strukturen (z.B. Rezeptoren) kommen. (BOXBERGER, 2007) Zuvor wird der Zellrasen mit PBS (auf 37 °C vorgewärmt) gewaschen, da eventuell verbliebenes Medium die Trypsinwirkung beeinträchtigen würde. Die optimale Einwirkzeit des Trypsins lässt sich durch Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop festlegen. Der Großteil der Zellen sollte dabei vom Boden abgehoben sein und in der Lösung schwimmen. (LINDL T., 2000)

An dieser Stelle wird durch Zugabe von Medium die Trypsinwirkung inaktiviert. Nachdem zentrifugiert wurde (5 min/800 rpm) werden die Zellen in neuem Medium resuspendiert, von dem dann mittels Zellzahlbestimmung das Volumen für die Aussaat bestimmt wird.

## Kultivierung



**Abbildung 22: Wöchentlicher Kultivierungszyklus der HepG2-Zellen**

### 13.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung wird bei jeder Passage durchgeführt, um das Volumen der weiter zu kultivierenden Zellsuspension zu ermitteln. Bei Vitalitätstests kommt das Verfahren ebenfalls zum Einsatz. Die Bestimmung erfolgt entweder im Hämocytometer oder automatisiert mit einem Zählgerät.

### 13.2.2 Trypanblautest

Die Färbung der Zellen mittels Trypanblau (Benzaminblau) ist eine Ausschlussfärbung, da der Farbstoff selektiv nur in tote Zellen eindringt. Aufgrund der Durchlässigkeit kann Trypanblau ins Cytoplasma gelangen. Membranen lebender Zellen kann der Farbstoff aufgrund seiner Größe ( $M = 960,8 \text{ g/mol}$ ) nicht passieren. Tote Zellen erscheinen daher unter dem Mikroskop tiefblau, lebende Zellen hingegen leuchtend hell. Ob der Zugehörigkeit zu den Azofarbstoffen ist beim Umgang mit Trypanblau Vorsicht geboten. Der Farbstoff steht im Verdacht gesundheitsschädigend zu wirken. (SCHMITZ, 2009)

### 13.2.3 Hämocytometer/Neubauer Zählkammer

Mit der Neubauer Zählkammer ist es möglich die Zellzahl durch Auszählen unter einem Mikroskop zu bestimmen. Nachdem die Zählkammer gereinigt und mit einem Deckglas versehen wurde kann die zu testende Lösung gemischt werden. Dazu wird ein entsprechend kleines Volumen der Zellsuspension sowie Trypanblau (Verhältnis 1:1) zuerst gemischt, und nach kurzer Einwirkzeit (ca. 1 Minute) in die Zählkammer pipettiert. Durch die Kapillarkraft wird die Suspension in den Spalt zwischen Deckglas und Hämocytometer gezogen. (BOXBERGER, 2007)



Abbildung 23: Neubauer Zählkammer

Die unter dem Mikroskop erkennbaren 4 Großquadrate werden ausgezählt. Sollten sich Zellen am Rand befinden, müssen 2 der 4 Ränder diskriminiert werden, wobei es keine Rolle spielt welche Ränder das sind. Wichtig ist nur, dass man während der gesamten Arbeit das Schema beibehält, und nicht währenddessen wechselt. In der folgenden Abbildung wurden der untere und rechte Rand des Großquadrates der Zählung ausgenommen.

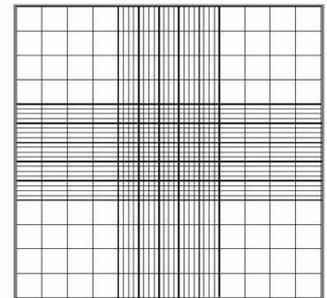


Abbildung 24: Gitternetz zum Auszählen der Zellen

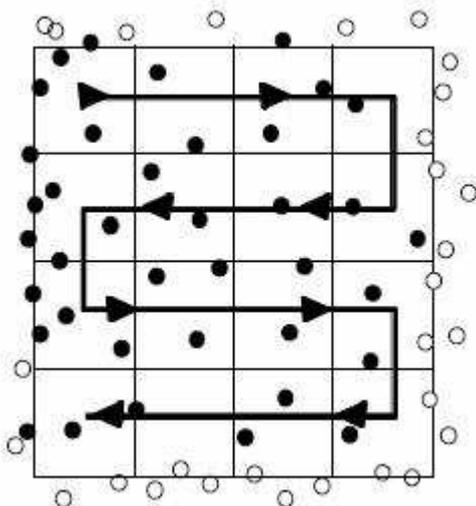


Abbildung 25: Auszählen der Zellen mittels Hämocytometer

Anschließend folgt die Berechnung der Zellzahl. Die Formel hierzu lautet:

$$\text{Mittelwert der 4 Großquadrate} \times 10^4 (\times VF) = \text{Zellen}/\mu\text{L}$$

### 13.2.4 Kryokonservierung

Darunter versteht man das Einfrieren von kleinen Mengen Zellsuspension, um diese bei Bedarf wieder aufzutauen. Die Methode stellt also ein Art Bevorratung dar, durch die man Zellen auf längere Zeit lagern kann. DMSO wirkt hierbei als Schutzsubstanz, die die Kristallbildung – und damit die Zerstörung der Zellwände – unterbindet.

Grundsätzlich erfolgt die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei – 196 °C. Kurzzeitig können Zellen auch bei – 80 °C gelagert werden. (LINDL, 2000)

## 14 Versuchsansätze

Tag	Arbeitsschritte
1	Passage, Herstellen der Safran-Extrakte
2	Inkubation der Zellen mit Safran-Extrakt
3	Zellzahl bestimmen, Lyse
4	Elektrophorese, Mediumwechsel
5	Auswertung mittels PC (Komet 5.5)

**Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der Arbeitsschritte**

### **14.1 Tag 1**

Nach der Passage werden von der verbleibenden Einzelzellsuspension 750.000 Zellen in jedes well der 6-well Platten pipettiert. Mittels Trypanblautest wird das dazu nötige Volumen errechnet. Anschließend wird jedem well zusätzlich 4 ml komplementiertes Medium zugegeben und kurz gespült. Die Zellen werden dann für 24 h inkubiert. Für das Safran-Extrakt werden die zu testenden Pflanzenbestandteile (Narbenäste = NÄ, Tepalen = T) mit Lösungsmittel gemischt - 3 ml EtOH:Wasser 80:20 (v/v). Getestet wurden unterschiedliche Konzentrationen des Probenmaterials (z.B. 1 T, 2 T, 3 T sowie 2 NÄ, 5 NÄ, 10 NÄ). Die so hergestellten Extrakte werden für ca. 3-5 sec am Vortex gemischt und anschließend für 24 h auf Raumtemperatur inkubiert.

### **14.2 Tag 2**

An Tag 2 werden zuerst die Extrakte vorbereitet. 0,4 %iges Extrakt wird durch folgende Verdünnung hergestellt:

0,4 %: 16  $\mu$ L + 3984  $\mu$ L Medium unkomplementiert

Nach den 24 h Inkubationszeit wird das Medium in den 6-well Platten abgesaugt, und durch die präparierten Safran-Extrakte ersetzt. Das erste well jeder Platte stellt die Negativ-Kontrolle dar (= 16  $\mu$ L Lösungsmittel + 3984  $\mu$ L Medium unkomplementiert). In späteren Experimenten war das zweite well stets die positiv-Kontrolle (Belastung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Anschließend wird wieder für 24 h inkubiert.

### **14.3 Tag 3**

Nach genauer Einhaltung der 24 h Inkubationszeit werden die 6-well Platten aus dem Brutschrank genommen und weiter bearbeitet. Die Lösungen werden in Falconröhrchen überführt und entsprechend beschriftet. Anschließend werden die Platten ähnlich wie

bei der Passage weiterbearbeitet. Nach dem spülen mit 1 ml PBS (wieder absaugen) werden die Zellen mit 300  $\mu\text{L}$  Trypsin versetzt, um sich von der Oberfläche abzulösen. Nach 4 min Einwirkzeit (Inkubator) wird die Trypsinwirkung durch Zugabe von 700  $\mu\text{L}$  komplementiertem Medium gestoppt. Nun werden die gelösten Zellen in die Falconröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (5 min/800 rpm). Das so entstandene Pellet wird in 500  $\mu\text{L}$  komplementiertem Medium gelöst und über eine Spritze in ein cap überführt. Von den so vorbereiteten Proben wird die Zellzahl bestimmt.

## **15 Alternativer Behandlungsweg mit $\text{H}_2\text{O}_2$**

### **15.1 Prinzip**

Mithilfe dieses Tests soll eine etwaig schützende Wirkung des Safrans auf HepG2 Zellen ersichtlich werden. Es soll ein Unterschied zwischen Cytotoxizität und Genotoxizität deutlich gemacht werden.

### **15.2 Durchführung**

Jene wells, die man mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bearbeiten möchte, wurden vor Ablauf der Inkubationszeit (Tag 3) mit einem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Mediumgemisch belastet. Sowohl Konzentration des Gemisches als auch seine Einwirkzeit auf die Zellen hatten während der Experimente variiert. Im Rahmen des Versuchsaufbaus wurden folgende Parameter getestet:

Konzentration  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0,1 %; 0,05 %; 0,04 %; 0,02 %; 0,01 %

Einwirkzeit  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 10 min, 15 min, 2 h

## **16 Elektrophorese / comet assay**

### **16.1 Substanzen und Materialien**

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
DMSO	SIGMA	D5879
EDTA	SIGMA	E6758-500G
NA <sub>2</sub> EDTA	VWR	443882G
Ethidium bromid	SIGMA	E1510-10ml
HCL (konz.)		
Histopaque-1077	SIGMA	H8889
Low melting Agarose	Invitrogen	15517014
NaCl	SIGMA	S5886
NaOH	SIGMA	S-5881
Normal melting Agarose	Invitrogen	15510019
PBS	SIGMA	D8537
Tris	SIGMA	T 1503
Triton X-100 BN Vacutainer Systems	SERVA Plymouth, UK	T8787
Deckgläser (24*60mm)		
Einmalhandschuhe, blaues Nitril	VWR	112-2220
Gelelektrophorese, horizontal	VWR	730-1796
Mikrozentrifugenröhrchen		
Objektträger mit Mattrand		
POWER Supply	Peqlab	55-EV231

**Tabelle 4: Substanzen und Materialien Elektrophorese und Comet Assay**

## **16.2 Prinzip**

### **16.2.1 Elektrophorese**

Elektrophoretische Verfahren beruhen auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Trennungseffekte, die sich durch die unterschiedliche Geschwindigkeit der Teilchen ergeben können zur analytischen Auswertung genutzt werden. Eine Vielzahl von Verbindungen lassen sich durch elektrophoretische Methoden trennen wie z.B. Aminosäuren, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Zucker (als Boratkomplexe) und Alkaloide. Bei diesen Substanzen stellt das Trennvermögen einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Methoden dar. Die Schwächen der Elektrophorese sind die lange Dauer und die begrenzte Reproduzierbarkeit. (RÜCKER et al., 1988)

### **16.2.2 Comet Assay**

Mittels Comet-Assay können DNA-Schäden an einzelnen Zellen ermittelt werden. Die Zellen wandern im elektrischen Feld der Elektrophorese, bei geschädigten Zellen kommt es bei diesem Vorgang zum Austritt von DNA. Das dabei entstehende Gebilde ähnelt in seinem Aussehen einem Kometen, dieser kann unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Kometen werden computerunterstützt entweder von Hand oder mit entsprechenden Zählprogrammen ausgezählt. So können beschädigte und unbeschädigte Zellen erfasst werden. Der Wert „% DNA in tail“ – also das Verhältnis von DNA im Kern zur ausgetretenen DNA – stellt einen Indikator der DNA-Schädigung dar.

Der Comet Assay – auch SCGE (single cell gel electrophoresis) genannt – hat mehrere Vorteile. Die Methode ist simpel und schnell durchzuführen, verlässlich und verhältnismäßig kostengünstig. Besonders gut ist der Comet Assay zur Testung auf Genotoxizität geeignet. (COLLINS et al., 1997)

## **16.3 Verwendete Lösungen**

### **16.3.1 Lyselösung**

Lysestocklösung:

2,5 M NaCl (146,1 g)

100 mM  $\text{NA}_2\text{EDTA}$  (37,2 g)

10 mM Tris (1,2 g)

lösen in 1 L Aqua bidest.

mit NaOH (8 g) pH 10 einstellen

löst sich erst nach pH-Einstellung

bei Raumtemperatur lagern

Lyselösung (für 80 ml):

80 ml Lyselösung = 72 ml Stock + 8 ml DMSO + 0,8 ml Triton X

### **16.3.2 Elektrophoresepuffer**

Der Elektrophoresepuffer muss immer frisch zubereitet werden. Sein Volumen ist von der Größe der Elektrophoresekammer abhängig.

2130 ml Aqua bidest.

59 ml NaOH

11 ml  $\text{NA}_2\text{EDTA}$

### **16.3.3 Neutralisationspuffer**

0,4 M Trizma Base (48,5 g) in 1000 ml Messkolben über Waagschale einwiegen und auf 1 l mit Aqua bidest. Auffüllen

mit konz. HCl pH 7,5 einstellen (ca. 10,5 ml 35 % HCl)  
bei Raumtemperatur lagern

### **16.3.4 Low melting agarose (LMA)**

125 mg LMA in 25 ml PBS lösen (2 x 15 sec bei Leistung 10 aufkochen lassen)

### **16.3.5 Normal melting agarose (NMA)**

Benötigt zur Vorbereitung der Objektträger. 1,5 g NMA einwiegen und in 100 ml PBS lösen. Das Gemisch mehrmals aufkochen und umrühren.

### **16.3.6 Ethidiumbromid (20 µg/mL)**

Wird zum Färben der DNA benötigt. Ob der mutagenen Wirkung ist beim Umgang mit der Substanz besondere Vorsicht geboten.

## **16.4 Durchführung**

Nachdem der Vitalitätstest durchgeführt wurde, werden von jeder Probe 50.000 Zellen auf einen Objektträger (Slide) aufgetragen. Dazu werden die errechnete Zellsuspensionsmenge und ca. 80 – 100 µl LMA (2 x in Mirowelle erwärmt, dann Wasserbad bei 37 °C) gemischt. Davon werden 80 µl auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Die Slides werden für 3-5 Minuten auf eine gekühlte Platte gelegt, danach wird das Deckglas entfernt, und die Slides für mind. 1 h in die Lyselösung gegeben (Kühlschrank).

Zur Durchführung der Elektrophorese wird zuerst die Kammer vorbereitet. Dazu wird sie mithilfe einer Wasserwaage waagrecht eingestellt und mit Eis umgeben. Nun wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Danach können die Objektträger aus der Lyselösung genommen werden. Die Slides werden zuerst mit Aqua bidest., dann mit

Elektrophoresepuffer gespült. Anschließend werden sie vorsichtig in die Elektrophoresekammer gelegt (eng aneinander liegend, symmetrisch, Beschriftung in eine Richtung). Bevor man startet wird die Kammer mit einer dunklen Plane abgedeckt. Im Falle der HepG2 Zellen dauert die nun folgende Unwinding-Phase 40 min, die Elektrophorese 20 min.

Die Einstellungen der Power Supply im Einzelnen:

Spannung	25 V
Strom	300 mA
Leistung	50 W
Zeiteinheit	h
Zeit:	00:20

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Slides aus der Kammer genommen und zuerst mit Neutralisationspuffer, dann mit bidestilliertem Wasser gespült. Lässt man die Objektträger anschließend trocknen, können sie nach diesem Schritt im Kühlschrank gelagert werden.

Zum Auswerten werden die Slides zunächst mit Ethidiumbromid gefärbt. Nach kurzer Einwirkzeit (ca. 1 min) bedeckt man den Objektträger mit einem Deckglas und wertet computerunterstützt (Komet 5.5) aus. Hierzu werden 50 Zellen pro Slide ausgewählt und mit dem Programm erfasst. Neben anderen Werten lässt sich auf diese Weise auch die für dieses Experiment interessante „%-DNA in tail“ ermitteln.

Zur statistischen Weiterbearbeitung wurde das Programm SPSS 15.0 verwendet. Die Normalverteilung wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Weiters wurden arithmetisches Mittel sowie Standardabweichung bestimmt. Da alle Werte normalverteilt waren, wurden Mittelwertunterschiede mit dem T-Test ermittelt, wobei ein Wert von  $p \leq 0,05$  als signifikant anzusehen war. (\*,  $p \leq 0,05$  und \*\*,  $p \leq 0,01$ )

## 17 Ergebnisse

### 17.1 Trypanblautest

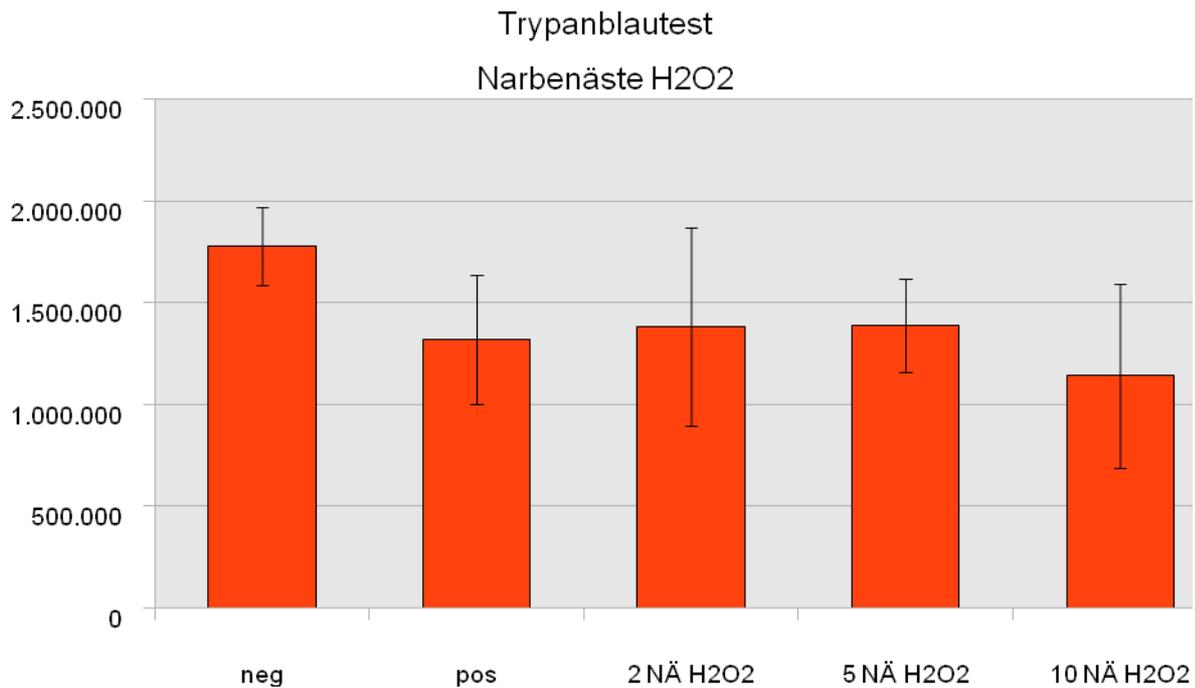
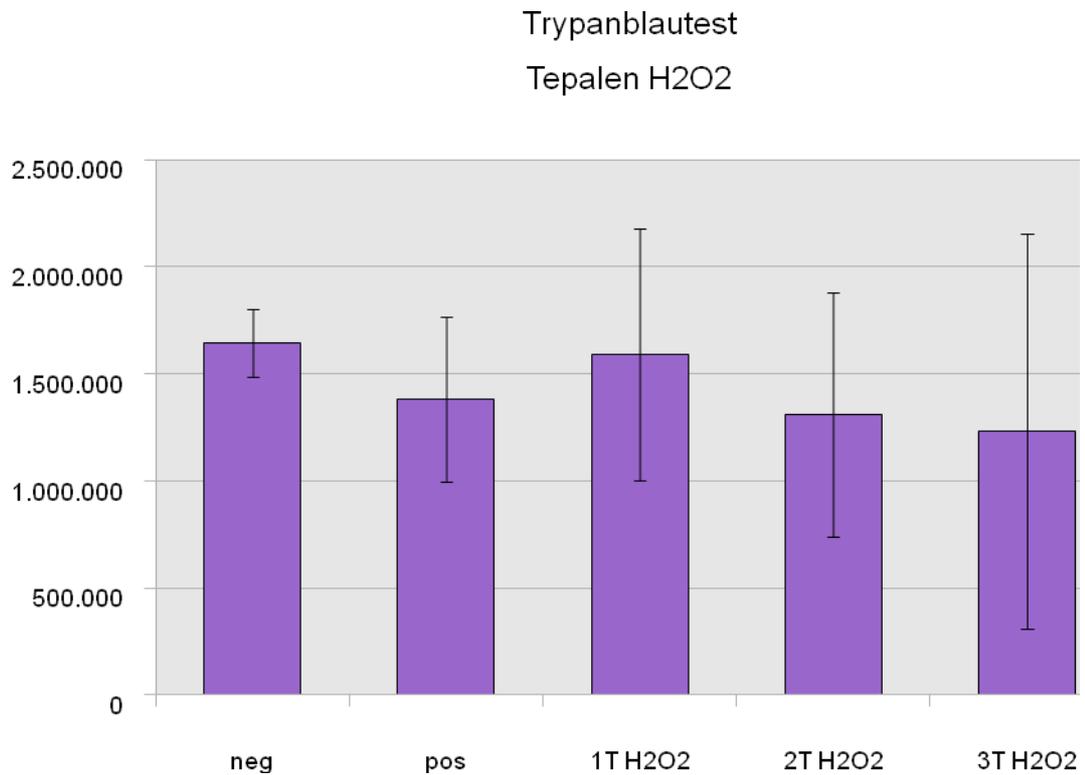


Abbildung 26: Ergebnisse des Trypanblautests (Narbenäste)

Der Trypanblautest bei den Narbenästen zeigt ein unklares Bild. Zwar ist die Zellzahl bei der positiv-Kontrolle im Vergleich zur negativ-Kontrolle deutlich reduziert, jedoch ist ob der Standardabweichung diese Differenz nicht signifikant.

Betrachtet man die 3 unterschiedlichen Konzentrationen der Narbenäste, so scheint die Zellzahlreduktion von der Konzentration abhängig zu sein, allerdings liegt auch hier keine statistische Signifikanz vor.



**Abbildung 27** Ergebnisse des Trypanblautests (Tepalen)

Bei den getesteten Tepalenextrakten zeigt sich ein ähnliches Bild. Wie zu erwarten sinkt die Zellzahl bei einer cytotoxischen Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (=Positivkontrolle).

Abbildung 27 demonstriert eine abnehmende Trypanblaufärbung (korrespondierend zur Zellzahl) mit Zunahme der Tepalenkonzentration. Allerdings ist hier eine Interpretation der Ergebnisse aufgrund der hohen Streuung nur schwer möglich. Abbildung 27 demonstriert eine abnehmende Trypanblaufärbung (korrespondierend zur Zellzahl) mit Zunahme der Tepalenkonzentration.

## 17.2 Comet Assay

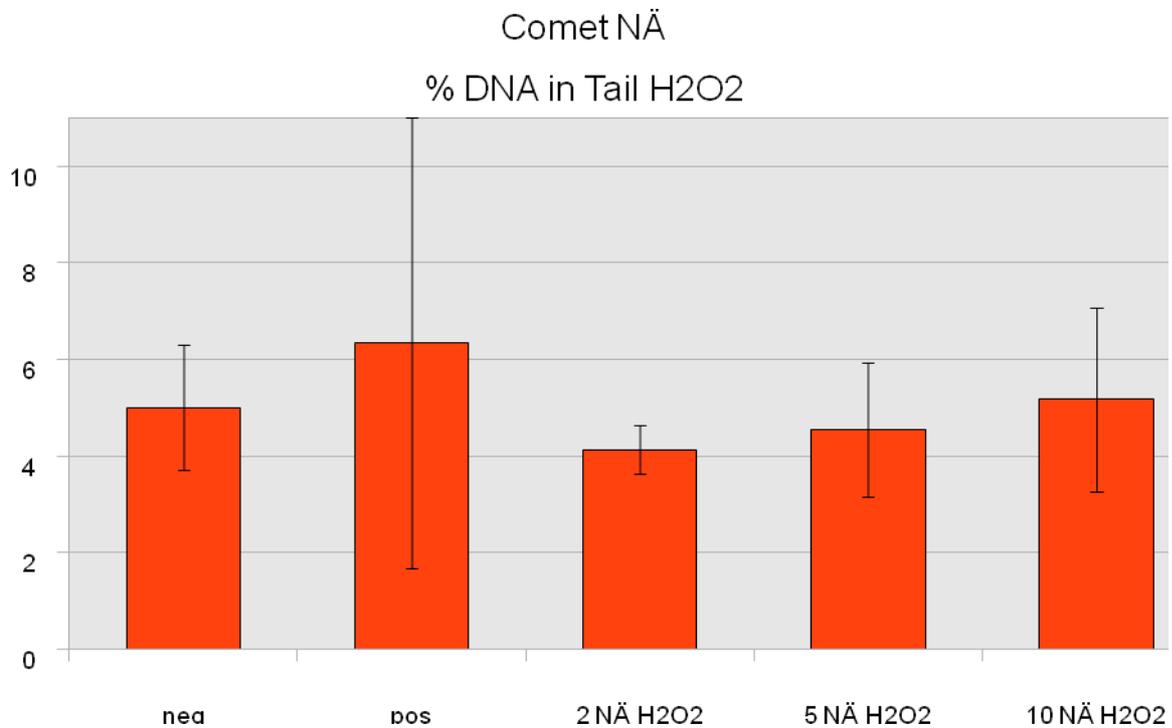
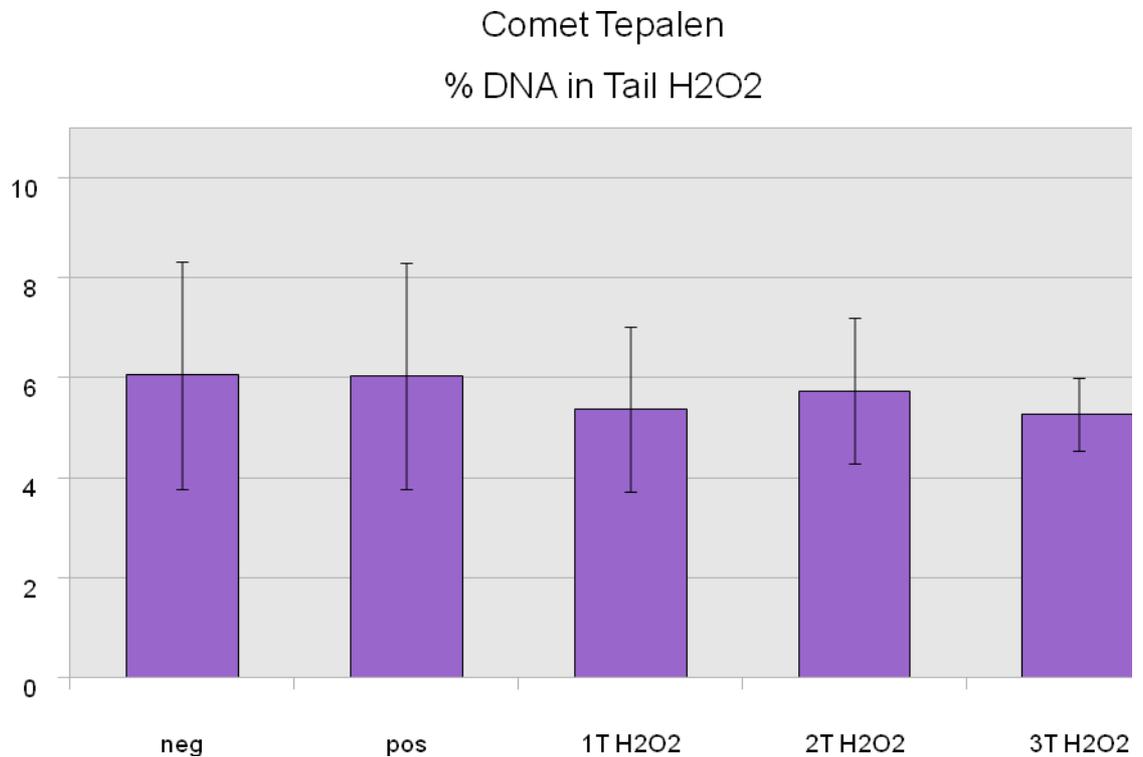


Abbildung 28: Ergebnisse des Comet-Assays (Narbenäste)

Der Verlauf bei den getesteten Narbenästen-Extrakten zeigt eine steigende Tendenz mit steigender Konzentration an, diese ist jedoch nicht signifikant. Grundsätzlich lässt sich hier wegen der hohen Standardabweichung keine eindeutige Aussage treffen. Eventuell haben geringere Konzentrationen der getesteten Extrakte einen schützenden Effekt. Es kommt zu keiner signifikanten DNA-Schädigung. Eine Studie die in ihrem Design mit dieser Arbeit vergleichbar ist zeigte einen hemmenden Effekt des Safranals auf DNA-Schädigung. (HOSSEINZADEH H. u. SADEGHNIA H.R, 2007) Im Gegensatz zu unserem *in vitro* Ansatz wurde bei dieser Studie jedoch mit Mausorganen gearbeitet.



**Abbildung 29: Ergebnisse des Comet-Assays (Tepalen)**

Die gesammelten Ergebnisse der durchgeführten Tests mittels Comet Assay zeigen ein durchwachsenes Bild. Es konnte keine signifikante DNA-Schädigung beobachtet werden. Möglicherweise wurden einzelne Inhaltsstoffe in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt. Da Tepalen in der von uns präparierten Weise in keiner ähnlichen Studie getestet wurden ist ein Vergleich hier nicht möglich. Weitere Studien werden notwendig sein um aussagekräftiger Ergebnisse liefern zu können.

## **18 Diskussion**

In der populärwissenschaftlichen-Heilkunde wird Safran unter anderem eine schmerzstillende und krampflösende Wirkung nachgesagt. Zwar sind diese Aussagen oft nicht wissenschaftlich unterstützt, doch zeigen auch sie das mögliche Potential der Inhaltsstoffe auf.

Die Inhaltsstoffe des Safrans werden gegenwärtig auf unterschiedlichste Wirkungen getestet. Wie aus den beschriebenen Studien entnommen werden kann, zeigen etwa Safranal und Crocin tatsächlich positive Effekte. So konnte beispielsweise dem Crocin eine antikanzerogene Wirkung nachgewiesen werden. Eine Studie (OCHIAI et al., 2007) zeigt ebenso das antioxidative Potential des Crocins auf. Es konnte veranschaulicht werden, dass von den 3 Crocetin-Glykosiden das Crocin die höchste antioxidative Kapazität besitzt.

In einer Studie aus dem Jahr 2002 wurden mehrere Hypothesen zum Mechanismus der antikanzerogenen Effekte des Safrans genannt: 1. Safran und seine Inhaltsstoffe wirken inhibitorisch auf die zelluläre DNA und RNA Synthese, nicht jedoch auf die Proteinsynthese. 2. Safran wirkt hemmend auf Radikalkettenreaktionen, da viele Carotinoide durch ihren fettlöslichen Charakter als membran-assoziierte Radikalfänger fungieren können. 3. Die metabolische Umwandlung von natürlich vorkommenden Carotinoiden zu Retinoiden. 4. Der zytotoxische Effekt des Safrans hängt von der Interaktion der Carotinoide mit der Topoisomerase II ab, einem Enzym der zellulären DNA-Protein Interaktion. (ABDULLAEV, 2002)

Ein etwaig zytotoxischer Effekt des Crocetins konnte in 2 Studien (MORJANI et al, 1990, TARANTILIS et al., 1994) nachgewiesen werden, während eine andere Arbeit (ESCRIBANO et al., 1996) diesen Effekt nicht zeigen konnte. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte ein zytotoxischer Effekt nicht mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse des Comet Assays sind nicht eindeutig. Bei den dargestellten Ergebnissen kommt es unter Einfluss von oxidativem Stress sowohl bei den Narbenästen als auch bei den Blütenblättern zu keinem signifikanten Schutz der Zellen vor DNA-Schädigung. Jedoch scheint eine höhere Konzentration der Narbenäste auch mit einer stärkeren DNA-Schädigung einherzugehen. Geringe Konzentrationen könnten

einen schützenden Effekt aufweisen.

Die Autoren der Studie (HOSSEINZADEH et al., 2007) arbeiteten ebenfalls mit Comet-Assays um die Wirkung von Safranal auf zuvor geschädigte Mausorgane festzustellen. Diese Studie konnte nachweisen, dass Safranal in entsprechender Konzentration einen hemmenden Effekt auf eine Methyl-Methansulfonat-induzierte DNA-Schädigung hat. Die Behauptung, Safranal könne die Wirkung genotoxischer Stoffe unterbinden wird durch diese Forschungsarbeit unterstützt.

Sowohl Trypanblautest als auch Comet Assay zeigen in der hier durchgeführten Arbeit bei den Tepalen lediglich ungenügende Ergebnisse. Es könnte sich ein eventueller Wirkstoffverlust während der Lagerung negativ auf die Ergebnisse der Tepalen ausgewirkt haben. Weitere Studien in diesem Bereich sind notwendig, wobei diese idealerweise unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden sollten.

## **19 Schlussbetrachtung**

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen keinen klaren Schluss auf eine mögliche Schutzwirkung des Safrans auf oxidativ gestresste Zellen zu. Im Besonderen zeigen die Resultate des Comet-Assays eine hohe Standardabweichung, wodurch über die Ergebnisse keine Aussage getroffen werden kann.

Das Arbeiten mit Zelllinien - in diesem Fall mit HepG2 Zellen - bringt Vor- und Nachteile mit sich. Zum einen arbeitet man mit lebenden Zellen, was beispielsweise eine Dosis-abhängige Wirkung erkennen lassen kann. Auch lassen sich Rückschlüsse auf den Zellstoffwechsel erkennen, wie etwa auf die Teilungsfähigkeit. Allerdings wird in Zellkulturstudien mit isolierten Systemen gearbeitet. Die Auswirkungen der untersuchten Stoffe auf jene Zellen kann also nicht ohne Weiteres auf den gesamten Organismus übertragen werden. Auch sind die Zellen nicht mehr Bestandteil eines Gewebeverbundes und damit von metabolischen und regulatorischen Vorgängen herausgelöst, wodurch etwa hormonelle oder immunologische Einflüsse wegfallen. Aus diesen Gründen muss man sich beim Interpretieren der Ergebnisse mit Zellkulturen die Frage stellen, in wie weit diese auf den Menschen übertragen werden können. Weiters erscheint es sinnvoll, die exakten Mechanismen die für die therapeutischen Wirkungen der Inhaltsstoffe verantwortlich sind genauer zu untersuchen. Hierzu wird es notwendig sein, diese biologisch aktiven Stoffe zu ermitteln und idealerweise in Humanstudien zu untersuchen.

Sowohl ältere als auch aktuelle Studien zeigen, dass Safran für die Behandlung verschiedenster Krankheiten (wie etwa Depressionen und unterschiedlichen Krebserkrankungen) angewandt werden kann. In der alternativen Medizin wurden dem Safran schon seit Generationen heilende Wirkungen nachgesagt, die nun auch von der Schulmedizin untersucht und zum Teil bereits bestätigt wurden.

Ergebnisse der Assays zeigten keine statistische Signifikanz im Hinblick auf Zellschutzwirkung; eine exakte Aussage über die Wirkung des Safrans ist daher nicht möglich. Insbesondere bei den Tests mit Tepalen fällt eine hohe Standardabweichung auf. Dass das Probenmaterial durch lange Lagerdauer an Inhaltsstoffen verloren hat ist eine mögliche Erklärung für diese Ungereimtheit.

Zusätzliche Studien in diesem Bereich werden jedenfalls notwendig sein, um genauere

Aussagen treffen zu können. Hier wäre es günstig, weitere Methoden sowie Materialien zu überdenken. Möglicherweise lassen sich auch durch ein anderes Studiendesign aussagekräftigere Ergebnisse erarbeiten.

Der hohe Preis des Gewürzes stellt allerdings nach wie vor eine schwer zu überwindende Hürde dar. Bemühungen die Kultivierung Safrans maschinell zu unterstützen blieben im Großen und Ganzen erfolglos. Es bleibt abzuwarten in wieweit die kostenintensive Produktion in eine pharmazeutische Verarbeitung einfließt.

## **20 Zusammenfassung**

Safran (*crocus sativus L.*) ist das teuerste Gewürz der Welt. Sein hoher Preis rührt von der Tatsache her, dass die Kultivierung von Hand durchgeführt wird. Wegen seiner Inhaltsstoffe ist *crocus sativus L.* Gegenstand verschiedener wissenschaftlicher Untersuchungen. In der Vergangenheit wurde einzelnen Inhaltsstoffen antioxidatives Potential und sogar antikanzerogene Wirkungen nachgewiesen. Crocin und Safranal waren in diesem Zusammenhang im Fokus diverser Studien.

Von einer Betrachtung isolierter Inhaltsstoffe wurde in dieser Arbeit abgesehen. In der hier durchgeführten *in-vitro* Studie wurden die zytotoxischen und genotoxischen Wirkungen von Narbenästen und Tepalen des Safrans auf Lebertumorzellen (HepG2-Zellen) getestet. Zusätzlich sollte eine potentielle Schutzwirkung des Safrans auf zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubierten Zellen nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der Trypanblautest angewandt, zur Ermittlung der DNA-Schädigung wurde der Comet-Assay genutzt.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit eine Tendenz einer erhöhten Zytotoxizität festgestellt werden. Vor allem bei höherer Konzentration von Narbenästen wurde dieses Resultat bestätigt. Sowohl bei den Narbenästen als auch bei den Tepalen kam es zu keiner signifikanten Schutzwirkung vor oxidativem Stress.

Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich folgern, dass mittels des hier angewandten wissenschaftlichen Aufbaus dem Safran keine Schutzwirkung, in hoher Konzentration jedoch zytotoxische Tendenzen zugeschrieben werden können.

## **21 Summary**

Saffron is the most expensive spice in the world, based on the harvesting condition which is still done by hand. Due to saffron's ingredients it is focus of ongoing studies. In the past, research could prove that several ingredients exhibit antioxidative and even anticancerogenic properties.

In this accomplished *in vitro* study, cytotoxic and genotoxic effects of saffron's stigmas and tepals on liver-cancer-cells (HepG2) were compared. In addition, an assumed protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubated cells was determined. The trypanblue-test was used in order to assign cell-vitality. The comet assay was used to prove DNA-damage. Especially at higher concentration of stigmas, a cytotoxic trend was assessed. Neither the stigmas nor the tepals have shown any protection from oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated HepG2 cells) in the current study.

Based on these observations, using the current scientific design, one cannot expect a protective effect of saffron. However, at high concentrations a cytotoxic tendency was noticed.

## **22 Literaturverzeichnis**

BOXBERGER H.J.; (2007): Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur – Einführung in Grundlagen und Techniken. WILEY – VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim. S. 97 – 101; 124 - 140

FRANKE W.; (1985): Nutzpflanzenkunde – Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Thieme; 3. unveränderte Auflage. 352

FRESHNEY R.I. (1992): Animal cell culture, Oxford University Press

HÄNSEL R.; STICHER O.; (2004): Pharmakognosie – Phytopharmazie. Springer Verlag, 7. Auflage; 571 - 573

LINDL T.; (2000): Zell- und Gewebekultur – Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 4. Auflage. 94 - 104

LINK JHF.; (1844): Auszug aus dem Sitzungs-Protokoll des Vereins zur Beförderung des Gartenbaues in Berlin, in den 207ten Versammlung am 27sten November 1842 – Verhandlungen des Vereins zur Beförderung des Gartenbaues in den Königlich Preußischen Staaten 1844; 26 - 27

MOSHE Negbi; (1999): Saffron – crocus sativus L. - Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles - harwood academic publishers; 115 - 126

NEUMANN H.; (2005): Zwischen Küche und Labor – Gewürzdrogen in Haushalt und Apotheke. Govi-Verlag; 29 - 30

NORMANN J.; (1991): Das große Buch der Gewürze. AT Verlag; 33

ROTH; DAUNDERER; KORMANN; (2008): Giftpflanzen – Pflanzengifte. Nikol Verlag, 5. Auflage; 275 - 276

RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS; (1988): Instrumentelle pharmazeutische Analytik – Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 407 - 413

SCHMITZ S.; (2009): Der Experimentator – Zellkultur. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage. S. 102 – 106; 207 - 210

SCHÖNFELDER I, SCHÖNFELDER P.; (2004): Das neue Handbuch der Heilpflanzen. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & CO.KG, Stuttgart, 154

SCHRÖDER R.; (1991): Kaffee, Tee und Kardamon – Tropische Genußmittel und Gewürze. Ulmer Verlag; 235 - 236

TEUSCHER E.; LINDEQUIST U.; (1994): Biogene Gifte Biologie, Chemie, Pharmakologie. Gustav Fischer Verlag, 2. Auflage. 176 - 177

TEUSCHER E.; (2003): Gewürzdrogen – Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter, Gewürzmischungen und ihrer ätherischen Öle. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 314 - 319

TILL S.; (2004): Die sinnliche Welt der Gewürze – Vom Abenteuer des guten Geschmacks. Kremayr & Scheriau/Orac, Wien; 127 - 131

ZIEGLER O.; PETZOLD A.; (2002): Drogenkunde. Reprint Verlag-Leipzig; 123 - 125

Internet-Quellen:

<http://www.annonischer-safran.at/>

<http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Safran>

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Man\\_gathering\\_saffron\\_Knossos\\_Crete\\_crocus\\_sativus\\_fresco.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Man_gathering_saffron_Knossos_Crete_crocus_sativus_fresco.jpg)

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b8/Saffron\\_gatherersSantorini-3.jpg/120px-Saffron\\_gatherersSantorini-3.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b8/Saffron_gatherersSantorini-3.jpg/120px-Saffron_gatherersSantorini-3.jpg)

<http://www.kraeuterpfarrer.at/kraeuterpfarrer/Kronenzeitung/index.php?action=detailed&page=1&id=219&suchetext=safraan&datumvon=&datumbis=>

Bilder:

<http://www.annonischer-safran.at/annonischer-safran/anbau.htm>

<http://www.annonischer-safran.at/safran/uebersicht.htm>

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Saffron-spice\\_adjusted.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Saffron-spice_adjusted.jpg)

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/57/Picrocrocin.png>

weitere Quellen:

Radiosendung vom 13.10.2008 – 17.10.2008, Ö1 „Vom Leben der Natur“, Bernhard Kaar

TILL S.; (2008): Safran – Das rote Gold der Könige. Ernährung aktuell 1/2008.  
Fachzeitschriften- Verlagsgesellschaft mbH. 9 - 11

Telefongespräch mit Johannes Pinterits vom 07.09.09 11:53 – 12:18 Uhr

Pflichtenheft Pannonischer Safran

Studien:

ABDULLAEV I.F.; (2002): Cancer Chemopreventive and Tumoricidal Properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). Laboratory of Experimental Oncology. 20 - 25

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

AUNG H.H.; WANG C.Z.; NI M.; FISHBEIN A.; MEHENDALE S.R.; XIE J.T.; SHOYAMA C.Y.; YUAN C.S. (2007): Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Experimental Oncology*. 175 - 180

COLLINS A. R.; DOBSON V.L.; DUSINSKA M.; KENNEDY G.; STETINA R.; (1997): The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 375. 183 – 193

ESCRIBANO J.; ALONSO G.L.; COCA-PRADOS M.; FERNANDEZ A. (1996): Crocin, safranal and picocrocine from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 23 - 30

HOSSEINZADEH H.; SADEGHNIA H.R. (2007): Effect of Safranal, a Constituent of *Crocus sativus* (Saffron), on Methyl Methanesulfonate (MMS)-Induced DNA Damage in Mouse Organs: An Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. 841 - 844

HOSSEINZADEH H.; ZIAEE T.; SADEGHI A.; (2008): The effect of saffron, *Crocus sativus* stigma, extract and its constituents, safranal and crocin on sexual behaviors in normal male rats. *Phytomedicine*. 491 - 495

KANAKIS D. C.; TARANTILIS A. P.; TAJMIR-RIAHI H.; POLISSIOU M. G. (2007): DNA Interaction with Saffron's Secondary Metabolites Safranal, Crocetin, and Dimethylcrocetin. *DNA and cell biology*. 63 - 70

MIZUMA H.; TANAKA M.; NOZAKI S.; MIZUNO K.; TAHARA T.; ATAKA S.; SUGINO T.; SHIRAI T.; KAJIMOTO Y.; KURATSUNE H.; KAJIMOTO O.; WATANABE Y. (2009): Daily oral administration of crocetin attenuates physical fatigue in human subjects. *Nutrition Research*. 145 - 150

MORJANI H.; TARANTILIS P.; POLISSIOU M.; MANFAIT M. (1990): Growth inhibition and induction of erythroid differentiation activity by crocin, dimethylcrocetin and  $\beta$ -carotene on K562 tumor cells. *Anticancer Res*. 1398 - 1406

OCHIAI T.; SHIMENO H.; MISHIMA K.; IWASAKI K.; FUJIWARA M.; TANAKA H.; SHOYAMA Y.; TODA A.; EYANAGI R.; SOEDA S. (2007): Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica*. 578 - 584

OCHIAI T.; OHNO S.; SOEDA S.; TANAKA H.; SHOYAMA Y.; SHIMENO H. (2004): Crocin prevents the death of rat pheochromocytoma (PC12) cells by its antioxidant effects stronger than those of  $\alpha$ -tocopherol. *Neurosci*. 61 - 64

SHAMSA A.; HOSSEINZADEH H.; MOLAEI M.; SHAKERI M.T.; RAJABI O.

(2009): Evaluation of *Crocus sativus* L. (saffron) on male erectile dysfunction: A pilot study. *Phytomedicine*. 690 – 693

SHIRI R.; KOSKIMÄKI J.; TAMMELA T.L.; HÄKKINEN J.; AUVINEN A.; HAKAMA M. (2007): Bidirectional relationship between depression and erectile dysfunction. *J. Urol*. 669 - 673

TARANTILIS PA.; MORJANI H.; POLISSIOU M.; MANFAIT M. (1994): Inhibition of growth and induction of differentiation promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from *crocus sativus* L. *Anticancer Res*. 1913 - 1918

# • *Lebenslauf* •

## Persönliche Daten

**Name:** BILEK Michael  
**Geburtsdatum:** 10. Oktober 1982  
**Adresse:** Schönbrunner Straße 102 /1/9, 1050 Wien  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsbürgerschaft:** Österreich

## Ausbildung

1998 – 2002 **HAK** Berufsförderungsinstitut Margaretenstraße  
Ausbildungsschwerpunkt: Wirtschaftsinformatik u. betriebl.  
Organisation  
(1050 Wien)

2002 - 2003 **Präsenzdienst**  
(2324 Zwölfaxing)

Seit 2003 **Uni-Wien:** Ernährungswissenschaften (Magisterstudium)  
(1090 Wien)

## Berufspraxis

Aug. 1999	<b>Generali AG</b> (1010 Wien)	Ferialpraxis
Nov. 1997 – Dez. 2000	<b>Artex</b> Kunstausstellungsservice GmbH (1060 Wien)	Aufsicht
Aug. 2001	<b>Baxter AG</b> (1221 Wien)	Qualitätssicherung
Aug. 2002	<b>Baxter AG</b> (1221 Wien)	Produktion & Vertrieb
Sept. – Okt. 2007	<b>Institut für Ernährungswissenschaften</b> (1090 Wien)	Labortätigkeit
Seit Sept. 2007	<a href="http://www.kampfkunstforum.at">www.kampfkunstforum.at</a>	Hapkido-Trainer
Seit Okt. 2008	<b>Institut für Ernährungswissenschaften</b> Arbeitsgruppe „Oxidativer Stress & DNA Stabilität“	Diplomand

## Zusätzliche Kenntnisse

**Sprachen:** - Deutsch, Englisch, Italienisch

**Sport:** - Ausbildung zum Fitlehrwart/allgemein  
- 1.Dan Hapkido

**EDV:** - solide MS-Office-Kenntnisse