



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von Magnolol auf Marker der  
intestinalen Barrierefunktion:  
Untersuchungen in einem ex vivo-Modell“

verfasst von / submitted by

Elisabeth Habersatter BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Ina Bergheim



## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ina Bergheim bedanken, die es mir ermöglicht hat, wertvolle Erfahrungen im Labor ihrer Arbeitsgruppe zu sammeln und die meine Masterarbeit betreut und koordiniert hat. Sie hat für alle Probleme, die aufgetaucht sind, Lösungen gefunden und mir den Weg für meine weiteren Schritte geebnet.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. Anja Baumann für die großartige Betreuung im Labor bedanken. Ich habe mich stets sehr gut unterstützt gefühlt und ihren Einsatz sehr geschätzt. Ich möchte mich aber auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die zahlreichen Tipps bedanken, sowie für die Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde. Einen speziellen Dank an Beate Gärtner, die für mich extra kleine Handschuhe bestellt hat, sowie an Beatrix Zartler, die in organisatorischen Dingen eine große Hilfe war.

Den anderen Masterstudent\*innen danke ich für nette Gespräche und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Franziska Kromm bedanken, die mich bei meinen Nitritmessungen unterstützt hat, sowie bei Julia Jelleschitz, mit welcher ich gemeinsam sämtliche Methoden erlernt habe und die mir vor allem bei den Everted Sac-Versuchen zur Seite gestanden ist.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums emotional und finanziell unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die fremden Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Wien, September 2021

---

Elisabeth Habersatter

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Selbstständigkeitserklärung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung .....	11
1.1 Aufbau, Funktion und Bedeutung der intestinalen Barriere.....	11
1.2 Fructose als Modulator metabolischer Erkrankungen.....	15
1.3 Magnolol: Vorkommen und physiologische Wirkung.....	19
1.4 Zielsetzung.....	21
2 Materialien.....	22
2.1 Allgemeines .....	22
2.2 Everted Sac .....	23
2.3 Xylose-Messung.....	25
2.4 Arginase-Messung .....	25
2.5 Proteinbestimmung nach Bradford .....	26
2.6 Nitrit-Messung.....	26
3 Methoden.....	27
3.1 Everted Sac aus Dünndarmgewebe .....	27
3.2 Bestimmung der Darmpermeabilität mittels Xylose-Messung.....	31
3.3 Messung der Arginaseaktivität .....	32
3.4 Proteinbestimmung nach Bradford .....	34
3.5 Bestimmung der Nitrit-Konzentration.....	35
4 Ergebnisse .....	36
4.1 Xylosemessung.....	36
4.2 Messung der Arginaseaktivität .....	37
4.3 Nitrit-Messung.....	38
5 Diskussion.....	40

5.1	Das ex-vivo Everted Sac-Modell zur Untersuchung des Einflusses von Nahrungsbestandteilen auf die Darmbarrierefunktion .....	41
5.2	Einfluss von Fructose und Magnolol auf die intestinale Permeabilität .....	42
5.3	Einfluss von Magnolol auf Marker des NO- / Argininmetabolismus .....	44
6	Fazit und Ausblick.....	46
	Zusammenfassung .....	47
	Summary .....	48
	Literatur .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	Anhang .....	66

# Abkürzungsverzeichnis

Arg	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl	Calciumchlorid
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1
(d)dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENPP7	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 7
Eppi	Eppendorf tube
Ev.	Everted Sac
F	Fructose
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HFCS	High fructose corn syrup
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IgA	Immunglobulin A
IGEPAL	IGEPAL® CA-630 =Octylphenoxy-Poly(ethylenoxy)ethanol
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K	Kontrolle
KHK	Ketohexokinase
KRH-Puffer	Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer
L	Liter
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein

LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol/Liter
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase
mm	Millimeter
mM	Millimol
MLC	Myosin II regulatory light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MMP	Magermilchpulver
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Muc	Mucin
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung / non-alcoholic fatty liver disease
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PPAR-γ	Peroxisom proliferator-activated receptor gamma
RhoA	Ras homolog family member A
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SREBP1c	Sterol regulatory element-binding protein-1
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N' Tetramethyldiamine
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VLDL	Very low density lipoproteins
Xyl	Xylose

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der intestinalen Barriere im Dünndarm .....	13
Abbildung 2: Chemische Struktur von Saccharose .....	15
Abbildung 3: Chemische Struktur von Fructose .....	16
Abbildung 4: Fructosetransport im Dünndarm .....	17
Abbildung 5: Chemische Struktur von Magnolol und Honokiol.....	19
Abbildung 6: Umwandlung von Xylose in Furfural, anschließende Reaktion mit Phloroglucinol zur Bildung des gefärbten Phloroglucids .....	31
Abbildung 7: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.....	36
Abbildung 8: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.....	37
Abbildung 9: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden .....	37
Abbildung 10: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden .....	38
Abbildung 11: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm, die mit Fructose behandelt wurden .....	38
Abbildung 12: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm, die mit Fructose behandelt wurden .....	39
Abbildung 13: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms.....	66
Abbildung 14: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms.....	66
Abbildung 15: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms.....	66
Abbildung 16: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms.....	67
Abbildung 17: Einfluss von 5 und 50 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm .....	67
Abbildung 18: Einfluss von 1 und 10 $\mu\text{M}$ Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm .....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES (KRH)-Puffers .....	27
Tabelle 2: Gebrauchslösungen für die Inkubation der Everted Sacs .....	28
Tabelle 3: Zusammensetzung von Fructose- Xylose- und Xylose-Fructose-Lösung.....	29
Tabelle 4: Pipettierschema für die Versuchsbedingungen der Everted Sacs.....	29
Tabelle 5: Farbreagenz für D(+)-Xylose-Messung.....	32
Tabelle 6: Standardreihe Xylosemessung.....	32
Tabelle 7: Lösungen für die Messung der Arginaseaktivität .....	32
Tabelle 8: Lysepuffer .....	33
Tabelle 9: Pipettierschema für die Standardreihe bei der Arginase-Messung.....	33
Tabelle 10: Standardverdünnungsreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford .....	34
Tabelle 11: Herstellung der Nitrit-Standardverdünnungsreihe .....	35

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau, Funktion und Bedeutung der intestinalen Barriere

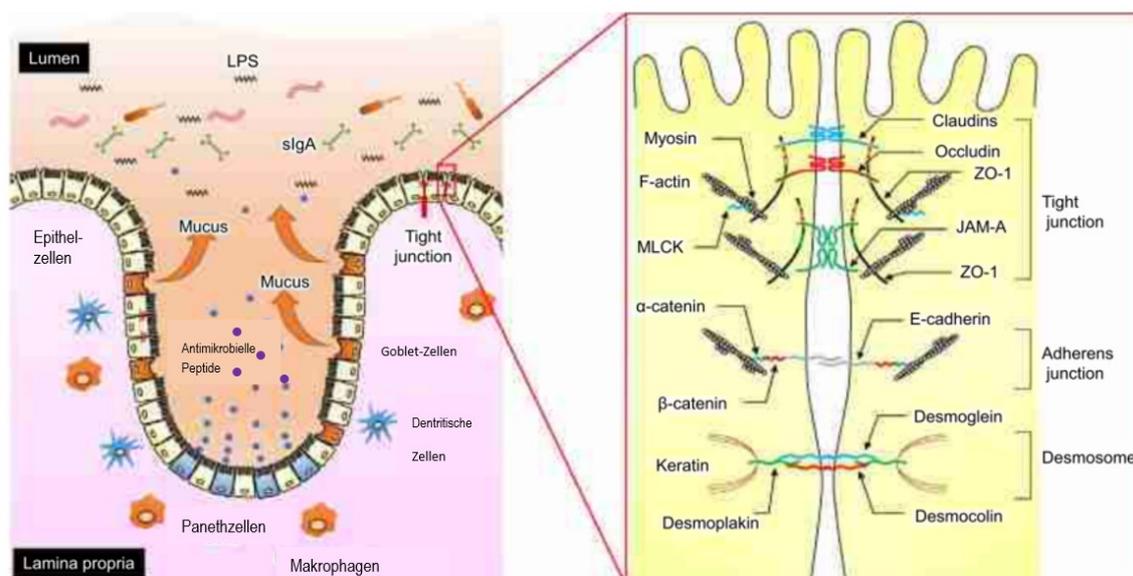
Die menschliche Darmbarriere hat eine Fläche von etwa 400m<sup>2</sup> und ihr Anteil am körperlichen Energieaufwand beträgt etwa 40% [1]. Milliarden von Bakterien besiedeln diese Schleimhautoberfläche. Ihnen gegenüber steht das größte Immunsystem des menschlichen Körpers. Eine intakte Darmbarriere verhindert einen Verlust von Wasser und Elektrolyten und schützt vor dem Eindringen von Antigenen, Mikroorganismen und Toxinen [2, 3]. Jedoch werden über die Darmbarriere auch Moleküle zwischen Wirt und Umgebung ausgetauscht und die Aufnahme von Nährstoffen aus der Nahrung, sowie die Abfallsekretion müssen gewährleistet sein. Die Schleimhaut hat also zwei scheinbar gegensätzliche Funktionen. Zum einen ermöglicht sie die friedliche Koexistenz mit Darmsymbionten, ohne eine chronische Entzündung auszulösen, zum anderen eine dosierte Entzündungs- und Abwehrreaktion auf Krankheitserreger [4, 5]. Um diese zu gewährleisten, besteht die intestinale Barriere aus physikalischen, chemischen und biologischen Komponenten inklusive Mucus, Epithelzellen, die durch Tight Junctions verbunden sind, Immunzellen und dem intestinalen Mikrobiom [6].

Im Darmlumen werden Bakterien und Antigene durch Magensäure und Pankreassekret abgebaut. Kommensale Bakterien verhindern die Besiedelung durch Pathogene, indem sie antimikrobielle Substanzen produzieren [7–10]. Nahe des Epithels schützt eine Schleimschicht, die aus Wasser, sowie sezernierenden und membrangebundenen Mucinen besteht, vor dem Eindringen von Mikroorganismen und Toxinen [11]. Das sezernierende Mucin Muc2, ein Glykoprotein, spielt eine wesentliche Rolle beim Schutz des Epithels. Muc2-Knockout-Mäuse entwickelten in einer Studie spontan eine schwere Dickdarmentzündung und entzündungsinduzierten Kolorektalkrebs [12, 13]. Im Dünndarm bildet die einfache Schleimschicht eine Diffusionsbarriere, die reich an antimikrobiellen Substanzen wie Defensinen, Lysozym und IgA ist. Diese können bei Bedarf von Paneth-Zellen abgesondert werden können [11]. Da der Schleim nicht mit der Darmwand verbunden ist, bewegt er sich in peristaltischen Wellen und transportiert Bakterien in den Dickdarm [14]. Im Dickdarm ist der Mucus in zwei Schichten organisiert: eine innere und eine äußere. Die innere Schicht ist praktisch undurchlässig für Bakterien und bildet eine Barriere, die Mikroorganismen vom Epithel trennt. Sie ist auch für die Hydrierung und Regeneration verantwortlich und wirkt als Schutzschild gegen Verdauungsenzyme [15]. Die äußere Schleimschicht des Dickdarms ist wie im Dünndarm weniger dicht und unverbunden mit der Darmwand. Im Gegensatz zur inneren Schleimschicht, die steril ist, ist die äußere Schleimschicht von Bakterien besiedelt, wobei die Daten darauf hinweisen, dass dort vor allem *Bacterioides acidifaciens*, *Bacterioides fragilis* und *Akkermansia muciniphila* vorkommen. Diese verhindern das Wachstum pathogener Stämme und regulieren

biochemische Vorgänge, die für den Erhalt der Struktur und Funktion des Gastrointestinaltrakts wichtig sind [16].

Ein wesentliches Element der physikalischen Darmbarriere ist das Epithel (**Abbildung 1**). Das Dünndarmepithel besteht aus einer einzigen Schicht hochprismatischer Enterozyten, die mit sekretorischen Becher-, Paneth- und enteroendokrinen Zellen durchsetzt sind [17]. Um das Eindringen von Mikroorganismen, Toxinen und Antigenen zu verhindern, gleichzeitig aber den Einstrom von Ionen und gelösten Stoffen zu ermöglichen, sind benachbarte Epithelzellen durch den apikalen Junktionskomplex verbunden, zu dem Tight Junctions (*zonula occludens*), Adherens Junctions (*zonula adherens*) und Desmosomen (*macula adherens*) zählen [6, 18]. Die Tight Junctions bilden eine selektiv durchlässige Barriere, die im Allgemeinen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des parazellulären Transports darstellt. Tight Junction-Komplexe bestehen aus Claudinen, Zonula occludens und Occludinen. Die Adherens Junction (bestehend aus E-cadherin,  $\alpha$ -catenin und  $\beta$ -Catinin) und das Desmosom bieten essentielle adhäsive und mechanische Eigenschaften, die zur Barrierefunktion beitragen, aber den parazellulären Raum nicht versiegeln [3, 6].

Unter der Epithelschicht befindet sich die *Lamia propria*, eine lockere Bindegewebsschicht, die Blut- und Lymphgefäße, Immunzellen und andere Komponenten enthält. Epithel und *Lamina propria* bilden die Zotten- und Kryptenarchitektur des Dünndarms [6]. In den Krypten befinden sich Stammzellen, Panethzellen, die antimikrobielle Peptide freisetzen und zur Aufrechterhaltung der Stammzellnische beitragen [9], sowie enteroendokrinen Zellen. Paneth- und enteroendokrine Zellen sind nicht aktiv proliferativ [6]. Tochterzellen, die aus der Teilung von Stammzellen hervorgehen, wandern aus der Krypta heraus und in Richtung der Zotten [6]. Die unter der *Lamina propria* liegende *Muscularis mucosae* trennt die Mukosa von der Submukosa. Die Submukosa enthält größere Gefäße, Lymphgefäße, Fettgewebe und Immunzellen. Die *Muscularis propria* des Darms wird durch eine Ring- und eine Längsmuskelschicht gebildet [6].



**Abbildung 1: Aufbau der intestinalen Barriere im Dünndarm.** Intestinale Epithelzellen bilden eine physikalische und biochemische Barriere gegen die Diffusion von Krankheitserregern, Toxinen und Allergenen aus dem Darmlumen in das Schleimhautgewebe (links). Das Zusammenspiel einer adhäsiven Mucusschicht, von Immunglobulin A, antimikrobiellen Peptiden und interzellulären Tight Junctions bildet das komplexe System der intestinalen Barriere. Die Tight Junctions werden durch einen Multiproteinkomplex gebildet, der sich im apikalen Teil der lateralen Membran von Epithelzellen befindet (rechts). Die TJ-Struktur umfasst Transmembranproteine wie Claudin, Occludin und JAM-A (Junctional Adhesion Molecule-A) sowie intrazelluläre Plaque-Proteine wie ZO (Zonula Occludens) und Cingulin. Modifiziert nach [19]

### Schädigung der Darmbarriere

Störungen der intestinalen Barrierefunktionen können zu schwerwiegenden gastrointestinalen sowie extraintestinalen Beschwerden führen. Das sogenannte „*Leaky-Gut-Syndrom*“ wird durch eine erhöhte intestinale Permeabilität aufgrund von Veränderung der Expression und Funktion von Tight Junction-Proteinen verursacht [3]. Infolge einer Immunaktivierung kann es zu chronischen Entzündungen des Darmgewebes kommen. Durch eine bakterielle Translokation können Endotoxine über den Blutkreislauf in die verschiedenen Organe gelangen, was mit der Entstehung verschiedenster extraintestinaler Erkrankungen wie alkoholischen und nicht-alkoholischen Lebererkrankungen, Diabetes, Adipositas und chronischen Nierenerkrankungen in Verbindung gebracht wird [19].

Erkrankungen, die mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität verbunden sind, treten vor allem in westlichen Ländern auf, in denen die Ernährung reich an Fett und raffinierten Kohlenhydraten ist. In einer Vielzahl von Studien zeigte sich, dass vor allem Fructose einen wesentlichen Einfluss auf die intestinale Permeabilität hat und dass ein übermäßiger Konsum negative Effekte auf die intestinale Barrierefunktion hat, indem sie zum Beispiel Tight Junction-Proteine schädigt [3]. Immer wieder konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung, die nicht nur mit einer generellen Überernährung, sondern im Speziellen auch mit einer erhöhten Fett- und Fructoseaufnahme assoziiert wird, mit Veränderungen

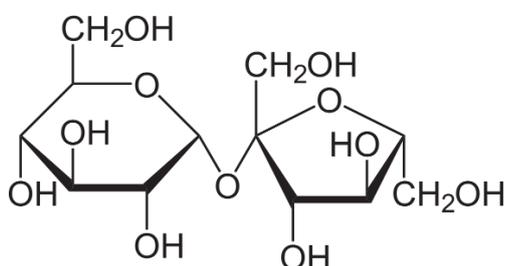
der intestinalen Barrierefunktion sowie einem erhöhten bakteriellen Endotoxinspiegel zusammenhängt [20–24].

### Mechanismen

Ein Verlust der Barrierefunktion geht mit einer erhöhten Permeabilität der parazellulären Tight Junctions infolge der Aktivierung der Myosin Light Chain Kinase (MLCK) und der Phosphorylierung von Myosin II regulatory light chain (MLC) einher. Die MLCK-Aktivierung löst eine Kontraktion des Aktinmyosinrings aus, wodurch es zu einer Reorganisation der Struktur und Zusammensetzung der Tight Junctions sowie der Endozytose von Occludin kommt. Dies kann durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ausgelöst werden [25]. Auch der Natrium-Nährstoff-Cotransport erhöht die parazelluläre Permeabilität durch die Aktivierung von MLCK, was ebenfalls zu einer Reorganisation des Aktinmyosinrings führt [26–28]. Dies ist essenziell für die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darmlumen. Allerdings kommt es hierbei zu keiner Endozytose von Occludin, die für die wesentlich stärkere Zunahme der makromolekularen Permeabilität bei der Aktivierung von MLCK durch Zytokine verantwortlich ist [25, 29]. Als Gegenspieler der MLCK kann die Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) betrachtet werden [30]. Die Aktivität beider Enzyme wird beispielsweise durch RhoA beeinflusst, einer GTPase, die infolge ihrer Aktivierung mithilfe von Guanosin triphosphat (GTP) MLCP inhibieren und dadurch die Phosphorylierung der MLC fördern kann, was zu einer Kontraktion des Zytoskeletts führt und dadurch die Stabilität der Tight Junction Proteine beeinflusst [31–33]. Diese kann auch durch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Tight Junction Proteine beeinflusst werden. Für den Erhalt der intestinalen Integrität ist ein Gleichgewicht der phosphorylierten und dephosphorylierten Tight Junction Proteine entscheidend [34]. Pathogene und Entzündungsmediatoren können eine erhöhte Aktivität verschiedener Kinasen (z.B. ROCK [35]) induzieren, wodurch es zu einer Phosphorylierung der Tight Junction Proteine kommt. Dadurch können diese nicht mehr mit anderen Proteinen des Komplexes interagieren und der parazelluläre Spalt öffnet sich [19, 36].

## 1.2 Fructose als Modulator metabolischer Erkrankungen

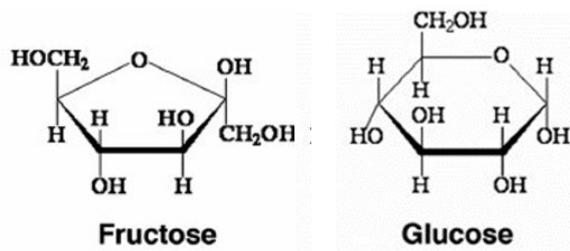
Fructose ist ein Monosaccharid mit der Summenformel  $C_6H_{12}O_6$ , das natürlicherweise in Obst, Gemüse und Honig vorkommt [37]. Fructose kann in Lebensmitteln in freier Form, gebunden an Glucose als das Disaccharid Saccharose (**Abbildung 2**) und in polymerisierter Form in Fructanen vorliegen [38]. Verarbeitete Lebensmittel werden in Europa hauptsächlich mit Saccharose gesüßt, die je zur Hälfte aus Glucose und Fructose besteht [39]. In den USA werden kohlenstoffhaltige Getränke, Backwaren, Obstkonserven, Marmeladen und Milchprodukte heute hauptsächlich mit high fructose corn syrup (HFCS) gesüßt, der üblicherweise zwischen 42 und 92 Prozent Fructose enthält und eine kostengünstigere Alternative zu Haushaltszucker (Saccharose) darstellt [40, 41].



**Abbildung 2: Chemische Struktur von Saccharose.** Saccharose ist ein Disaccharid, das aus einem Molekül Fructose und einem Molekül Glucose besteht, die über eine glykosidische Bindung miteinander verbunden sind [42].

### Konsum

Der Fructosekonsum in den westlichen Industrienationen ist in den vergangenen Jahrzehnten rasant gestiegen [40, 43]. In der aktuellen WHO-Leitlinie wird empfohlen, dass die verzehrte Menge an freien Zuckern bei Erwachsenen und Kindern weniger als 10 % der empfohlenen täglichen Kalorienzufuhr betragen sollte [44]. Freie Zucker sind Monosaccharide (Glucose und Fructose), sowie Disaccharide (Saccharose und Lactose), die entweder schon natürlich in Lebensmitteln wie Honig, Sirup und Fruchtsaft enthalten sind oder bei der Verarbeitung zugesetzt werden [45, 46]. Aus Verzehrsstudien geht hervor, dass der tatsächliche Anteil des verzehrten freien Zuckers an der Gesamtkalorienzufuhr in Deutschland bei Erwachsenen derzeit bei 13-14 % und bei Kindern bei 15-17,5 % liegt, was die empfohlene Obergrenze von 10 % bei Weitem übersteigt [47, 48]. In Österreich liegt die Aufnahme freier Zucker laut Österreichischem Ernährungsbericht 2017 bei Männern bei 16, bei Frauen bei 17 Energieprozent [49]. Der Großteil des aufgenommenen freien Zuckers stammt in Deutschland aus Süßwaren (36 %) und zuckerhaltigen Getränken wie Fruchtsäften und Nektaren (26 %) sowie Limonaden (12 %) [50].

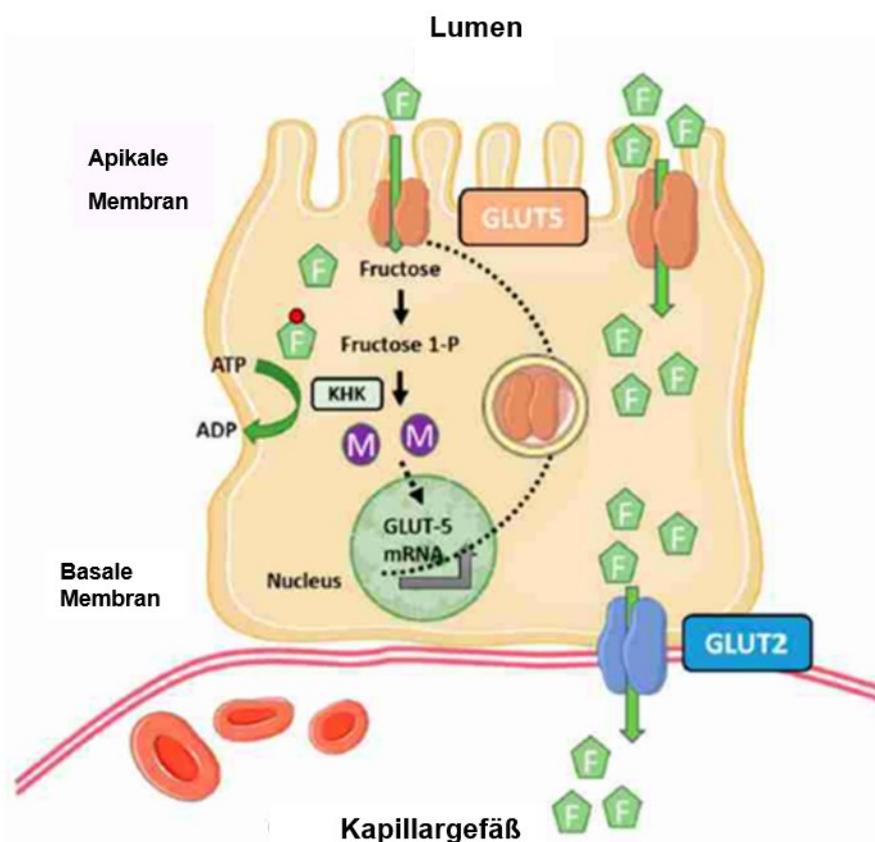


**Abbildung 3: Chemische Struktur von Fructose** (links) und Glucose (rechts), modifiziert nach [43].

Fructose hat zwar eine ähnliche Struktur wie Glucose (**Abbildung 3**), die gleiche chemische Formel ( $C_6H_{12}O_6$ ) und den selben Brennwert (4 kcal/g), wird im Körper aber anders verstoffwechselt (siehe nachfolgender Absatz). Zudem empfinden Menschen Fructose verglichen mit Glucose und Saccharose als süßer. Fructose hat einen geringeren glykämischen Index als Glucose und ist weniger sättigend, wodurch es zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme kommen kann [51, 52].

Der Stoffwechsel der über die Nahrung aufgenommenen Fructose wird im Dünndarm, dem primären Organ der Fructoseaufnahme, eingeleitet [53]. Studien weisen darauf hin, dass GLUT5 der primäre Transporter für die Aufnahme von Fructose aus dem Darmlumen in das Zytosol der Enterozyten ist. Eine hohe Fructoseaufnahme könnte womöglich die mRNA-Expression von GLUT5 induzieren und damit die Resorptionskapazität langfristig steigern [54, 55]. Anders als Glucose gelangt Fructose insulinunabhängig mittels erleichterter Diffusion in die Enterozyten [55], wo ein Teil der Fructose bereits durch die Kethexokinase (=Fructokinase) mit Adenosintriphosphat (ATP) als Phosphatgruppendonator phosphoryliert wird. Das entstandene Fructose-1-Phosphat wird durch Aldolase B in Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Anschließend katalysiert die Triokinase die Phosphorylierung von Glycerinaldehyd mit ATP, wodurch Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) entsteht [54, 56]. GAP wird über die Gluconeogenese in Glucose umgewandelt oder über den Weg der Glykolyse der Lipogenese bzw. der  $\beta$ -Oxidation zugeführt [57].

Die Kapazität des Darms, Fructose zu absorbieren, ist sättigbar [58] und liegt bei gesunden Erwachsenen zwischen weniger als 5 und mehr als 50 Gramm [59]. Wenn diese Kapazität überschritten wird, gelangt die überschüssige Fructose über GLUT2 in das Blut der Pfortader und weiter zur Leber [56]. Nicht absorbierte Fructose kann durch die osmotische Belastung des distalen Dün- und Dickdarm zu gastrointestinalen Symptomen beitragen [58]. Zudem kann Fructose durch intestinale Bakterien fermentiert werden, wodurch es zur Bildung von Gasen und anderen bakteriellen Metaboliten kommen kann. Diese können die Darmmotilität beeinträchtigen und intestinale Symptome wie Bauchschmerzen oder Blähungen verursachen [60].



**Abbildung 4: Fructosetransport im Dünndarm.** Fructose (F) wird mit GLUT5 durch die Bürstensaummembran transportiert und gelangt so in das Cytosol der Enterozyten, wo sie durch die Ketohehexokinase (KHK) phosphoryliert wird und es zu einem Abfall der intrazellulären ATP-Spiegel kommt. Die Fructose wird zum Teil abgebaut, der Rest wird mit GLUT2 über die basolaterale Membran in den Portalkreislauf freigesetzt – modifiziert nach [61].

Im Nüchternzustand beträgt die Plasmakonzentration peripherer Fructose etwa 0,01 – 2 mM. Nach der Aufnahme von Fructose kann die Plasmakonzentration kurzfristig auf das Fünf- bis Zehnfache ansteigen, wobei die Plasmakonzentration innerhalb von zwei Stunden wieder auf das Nüchternniveau absinkt [62–65]. Dies ist vor allem auf die effiziente Extraktion durch die Leber zurückzuführen, die zwar nur 15 % bis 30 % einer oralen Glukosebelastung, aber bis zu 70 % einer oralen Fructosebelastung extrahieren kann [66, 67]. Die hepatische Fructoseaufnahme erfolgt über GLUT2. Hepatozyten können aus Fructose gewonnene Kohlenstoffatome in Glucose, Glycogen, Lactat, Lipide, Kohlenstoffdioxid und andere Metabolite umwandeln [68]. Aus Fructose gewonnene Metabolite treten in den Triosephosphatpool ein und umgehen die Phosphofruktokinase, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glycolyse, wodurch es zu einer uneingeschränkten hepatischen Fructolyse kommt. Ein Überangebot von Fructose führt dadurch zu einem raschen Anstieg von Substrat für Glycogenproduktion und Lipogenese. Fructose gilt sowohl als Substrat, als auch als Auslöser der hepatischen *de novo*-Lipogenese [69]. Glycogen und Fett dienen als Energiereserve, was evolutionär gesehen von großem Vorteil war [70, 71], heute aber angesichts der steigenden Prävalenz von Adipositas und dem metabolischen Syndrom ein enormes gesundheitliches Problem darstellt [57, 70].

### Metabolische Effekte von Fructose

Metabolische Erkrankungen werden aufgrund zahlreicher Studien mit einer erhöhten Aufnahme von Fructose in Verbindung gebracht [40, 72–75]. Bergheim *et al.* konnten zeigen, dass die chronische Aufnahme einer dreißigprozentigen Fructoselösung bei Mäusen nicht zu einer Gewichtszunahme, jedoch zu einer Verfettung der Leber führt und über eine erhöhte intestinale Translokation von Endotoxinen auch direkt proinflammatorische Effekte hat [76]. Bei Marek *et al.* entwickelten Wildtypmäuse, die über 12 Wochen hinweg eine 30-prozentige Fructoselösung tranken, viszerale Adipositas mit entzündlichen Veränderungen im Fettgewebe sowie eine Insulinresistenz. Dies war bei Ketohexokinase-negativen Mäusen nicht der Fall. Marek *et al.* führten diese Effekte deshalb auf den KHK-abhängigen Fructosestoffwechsel in der Leber zurück [77].

Auch in epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Fructosekonsum und einem vermehrten Auftreten kardiovaskulären Erkrankungen, nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) und Typ 2-Diabetes beobachtet [78–81]. Der genaue Mechanismus, durch den ein übermäßiger Fructosekonsum zu metabolischen Entgleisungen führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Theorie ist, dass diese Effekte durch eine Schädigung der intestinalen Barrierefunktion zustande kommen, wodurch es zu einer Translokation luminaler Komponenten in den Wirt kommen kann [1, 82]. Nier *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die bakteriellen Endotoxinspiegel im peripheren Plasma übergewichtige Kinder mit NAFLD wesentlich höher waren als bei jenen, die zwar übergewichtig waren, jedoch keine NAFLD entwickelt hatten. Auch die LBP (Lipopolysaccharid binding protein)-Spiegel waren in der Gruppe der übergewichtigen Kinder mit NAFLD signifikant erhöht. Zudem zeigte sich bei den Kindern mit NAFLD eine erhöhte Konzentration an Entzündungsmarkern wie TNF- $\alpha$  und IL-6 [83].

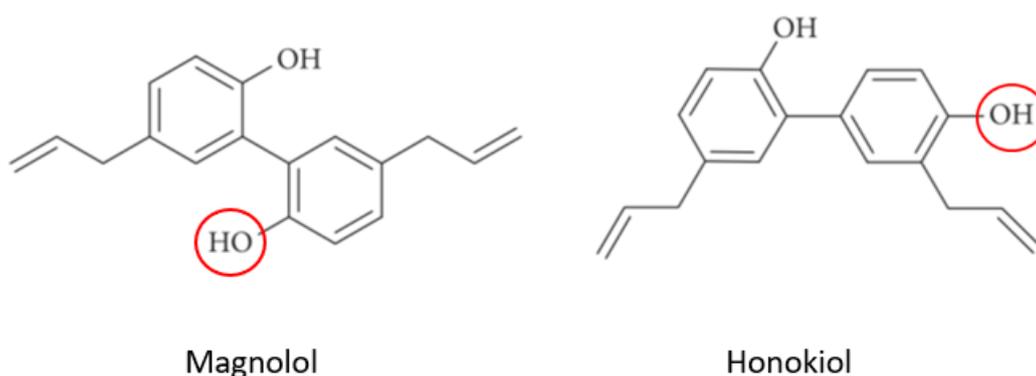
### Effekte von Fructose auf die Darmbarriere

Zahlreiche Studien im Tiermodell deuten darauf hin, dass Fructose an der Regulation der Darmpermeabilität wesentlich beteiligt ist und dass ein übermäßiger Fructosekonsum zu einer Funktionsstörung der Tight Junction-Proteine führen kann [76, 82, 84–90]. Spruss *et al.* fanden im Dünndarm von mit Fructose gefütterten Mäusen verminderte Occludin- und ZO-1-Proteinspiegel und eine erhöhte Translokation bakterieller Endotoxine [82].

Die achtwöchige Exposition mit Trinkwasser, das 30% (w/v) Fructose enthielt, führte bei Ratten und Mäusen zu einer Induktion von CYP2E1 und iNOS im Dünndarmgewebe. Zusätzlich kam es zu Veränderungen des Mikrobioms, Leaky Gut und einem erhöhten Endotoxinspiegel, den die Autoren auf den Verlust intestinaler Tight und Adherens Junction-Proteine durch nitrooxidativen Stress zurückführten. Bei CYP2E1 (Cytochrom P450-2E1)-negativen Mäusen konnten anders als bei Wildtypmäusen keine pathologische Veränderung der Dünndarmschleimhaut festgestellt

werden. Cho *et al.* schlossen daraus, dass der Mechanismus, über den Fructose die intestinale Permeabilität erhöhen sowie zu einer Endotoxämie und Leberfibrose führen kann, durch CYP2E1 vermittelt wird [91]. Auch Kawabata *et al.* beobachteten, dass Fructose im Mausmodell die Dickdarmbarriere schädigte und dass dieser Effekt zeit- und konzentrationsabhängig war [84]. In Humanstudien bestätigten sich die schädigenden Effekte von Fructose auf die intestinale Barrierefunktion nicht immer. Kuzma *et al.* fanden keinen Unterschied im Plasmaspiegel von Zonulin und LPS-bindendem Protein (LBP), einem Marker für Endotoxämie, bei Personen, die sich acht Tage lang reich an Fructose, HFCS oder Glucose ernährten [92]. Auch Nier *et al.* konnten keinen Unterschied zwischen den LBP-Konzentrationen nach einer dreitägigen isokalorischen Fructose- versus einer Glucoseintervention feststellen. Allerdings kam es bei der Fructoseintervention, nicht aber bei der Glucoseintervention, zu einem signifikanten Anstieg des Endotoxinplasmaspiegels [89].

### 1.3 Magnolol: Vorkommen und physiologische Wirkung



**Abbildung 5: Chemische Struktur von Magnolol und Honokiol** [93]

Magnolol (5,5'-Diallyl-2,2'-dihydroxybiphenyl) ist eine polyphenolische Binaphthalinverbindung und ein strukturelles Isomer von Honokiol (**Abbildung 5**) [93]. Das Neolignan wird aus der Stammrinde von *Magnolia officinalis* isoliert. Diese Pflanzenrinde wird in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin zur Behandlung von Nervosität, Angst, Schlafstörungen, allergischen Erkrankungen, Abdominalbeschwerden, Verstopfung, Husten und Atemnot verwendet [94].

Magnolol hat ein breites Spektrum an positiven Wirkungen gezeigt, darunter entzündungshemmende [95, 96], antimikrobielle [97, 98], antibakterielle [99, 100], antioxidative [101, 102], antiangiogene [103, 104], krebshemmende [105, 106], neuroprotektive [107, 108], kardiovaskularprotektive [109, 110] und lipolytische Aktivitäten [111, 112].

### Antiinflammatorische Wirkung

In einer Studie von Reddy *et al.* führte die Induktion von PPAR- $\gamma$  zu einer Deaktivierung von Alveolarmakrophagen und einer Verminderung LPS-induzierter Entzündungsreaktionen. Dies führen die Autoren auf Hemmung des Nuklearfaktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und die unterdrückte Expression nachgeschalteter proinflammatorischer Zytokine durch PPAR $\gamma$  zurück [95]. Lin *et al.* konnten zeigen, dass die intraperitoneale Verabreichung von 10 bzw. 20 mg Magnolol/kg Körpergewicht bei einer durch LPS induzierten Lungenverletzung in Ratten über eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  und eine verminderte Expression von NF- $\kappa$ B zu einer Verbesserung der Symptome und der Entzündungsantwort führt [113]. Auch bei durch Dextransodiumsulfat-induzierter Ulcerativer Colitis in Mäusen kam es bei einer Verabreichung von 25-100 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht durch die Herabregulation von NF- $\kappa$ B und die vermehrte Expression von PPAR- $\gamma$  zu einer verminderten Expression von TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL) -1 $\beta$  und IL-12. Zudem erhöhte Magnolol die Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1 und Occludin [96]. In einer Studie von Zhao *et al.* führte die intragastrische Verabreichung von 5-15 mg Magnolol/kg Körpergewicht in Mäusen mit DSS-induzierter Ulcerativer Colitis über die Wiederherstellung des Tryptophanmetabolismus zu einer Reduktion der Dickdarmentzündung [114]. Bei Rennmäusen, in denen durch die intravenöse Injektion von 4 mg LPS pro Kilogramm Körpergewicht eine Sepsis ausgelöst worden war, verhinderte eine Injektion von 20 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht durch Regulierung von SCF/c-kit und NO-Signalen die sepsisbedingte Dysmotilität des Darms [115].

### Stoffwechselregulation

In APOA5 c.553G>T-Mäusen schien Magnolol den Triglyceridspiegel zu senken und dadurch einer Hyperlipidämie entgegenzuwirken [112]. In 3T3-L1-Zellen verstärkte Magnolol dosisabhängig die Adipocytendifferenzierung und die Glucoseaufnahme, wodurch es zu einer Verbesserung der Glucosespiegel kam [116]. Mögliche antidiabetische Effekte von Magnolol könnten auch auf seine inhibitorischen Effekte auf die  $\alpha$ -Glucosidase zurückzuführen sein, die zu einer verzögerten Glucoseabsorption und zu einem verringerten Blutzuckerspiegel führen [117]. Zur Behandlung von Typ-II-Diabetes und dem metabolischen Syndrom werden PPAR- $\gamma$ -Agonisten eingesetzt. Fakhrudin *et al.* diskutieren Magnolol als solchen [118]. Bei Mäusen hatte die Verabreichung von Magnolol mit Honokiol über einen Zeitraum von vier Wochen vermutlich über die Aktivierung von AMPK positive Effekte auf Fettleber und die SREBP-1c-vermittelte hepatische Lipogenese [119]. In mit Ölsäure geschädigte HepG2-Zellen schützte die Exposition mit 4  $\mu$ g/ml Magnolol vor einer Steatose. Bei Mäusen mit durch Tyloxapol-induzierter Hyperlipidämie führte die intraperitoneale Injektion von 10 bzw. 20 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht zu einem Absinken der Triglycerid- und Cholesterinspiegel sowie zu einer Reduktion der hepatischen Lipidakkumulation. Dies wurde von Tian *et al.* auf eine Aktivierung

von Akt/AMPK/PPAR $\alpha$  Signalwegen und die Unterdrückung der MAPK/NF- $\kappa$ B/SREBP1c-Signalkaskade zurückgeführt [120].

In einer Studie von Suh *et al.* verbesserte Magnolol die Insulinsekretion bei Insulinresistenz und das Überleben sowie die Funktion von  $\beta$ -Zellen. Außerdem verstärkt es die Aktivität von Glyoxalase I und schützt vor der Methylglyoxal-induzierten Glycation in  $\beta$ -Zellen, die zu Insulinresistenz beiträgt [121].

Die geringe Bioverfügbarkeit von  $17,5 \pm 9,7$  Prozent nach intervenöser Verabreichung und 4 bis 5 Prozent nach oraler Gabe, sowie die schlechte Wasserlöslichkeit erschweren die klinische Anwendung [122, 123]. Dennoch scheint es sich angesichts der zahlreichen positiven Effekte des Neolignans, die in Studien nachgewiesen werden konnten, um eine vielversprechende Substanz zu handeln. In dieser Arbeit soll der Einfluss des Neolignans auf die fructoseinduzierte Schädigung der Darmbarrierefunktion untersucht werden.

#### 1.4 Zielsetzung

Eine Schädigung der intestinalen Barrierefunktion wird heute mit den unterschiedlichsten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine gestörte Darmbarriere geht mit einem erhöhten Übertritt bakterieller Toxine einher, die im Kontext mit der Entstehung verschiedenster Erkrankungen diskutiert werden. Hierzu zählt auch die NAFLD [83]. Eine hohe Fructoseaufnahme, wie sie sich in westlichen Industrienationen etabliert hat, scheint die intestinale Barrierefunktion zu beeinträchtigen [3, 61, 124].

Magnolol, einem Neolignan, das aus der Stammrinde der *Magnolia officinalis* extrahiert wird, werden viele gesundheitsfördernde Wirkungen zugesprochen. Ob und wie es auf die Darmbarriere wirkt, ist bisher nicht geklärt, jedoch soll es die Darmschleimhaut intakt halten, vor einer Mucositis schützen und gastrointestinalen Dysfunktionen vorbeugen [125, 126].

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Magnolol auf die fructoseinduzierten Veränderungen der Darmpermeabilität zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

1. Führt eine Behandlung mit Magnolol im *ex-vivo* Everted Sac Modell des Dünndarms zu Veränderungen von Markern der Darmbarrierefunktion?
2. Schützt Magnolol vor fructoseinduzierten Veränderungen der Darmpermeabilität?

## 2 Materialien

### 2.1 Allgemeines

#### Puffer/Lösungen/Chemikalien:

Ethanol (EtOH) vergällt ( $\geq 99,8\%$ )

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Destilliertes Wasser

Laborbestand

Flüssigstickstoff (N)

Air Liquide Austria, Schwechat, Österreich

#### Verbrauchsmaterialien:

Alufolie

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Entsorgungsbeutel

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Eppis (0,5, 1,5, 2ml)

Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland

Falcons (15 und 50ml)

Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland

Laborhandschuhe

STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen (2,5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 5ml)

Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland

Stainless Steel Beads (5mm)

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

#### Geräte:

Analysenwaagen VWR® LA Classic

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Bechergläser

Schott AG, Mitterteich, Deutschland

Dewar-Transportgefäß (Stickstoffbehälter)

KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk - Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Eisboxen

Laborbestand

Freezer (-20°C)

Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland

Freezer (-80°C)

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Glasflaschen 1L

Schott AG, Mitterteich, Deutschland

Mixing Block MB-102

Bioer Technology, Alpha laboratories Limited, Hampshire, UK

Kolbenhubpipetten

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Kühlschrank (4°C)

Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland

Magnetrührer PCE-MSR 100

PCE GmbH, Meschede, Deutschland

Orion pH-Meter (Model 420A)	Laborbestand
Schwimmteile	Laborbestand
SpectraMax M3 Mikroplattenreader	SpectraMax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA
Tischzentrifuge	Laborbestand
TissueLyser II	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Trockeneisbehälter	Laborbestand
Vortex Heidolph EAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Wiegeschälchen	Laborbestand
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

**Software:**

Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

**2.2 Everted Sac**

Duodenum von C57BL/6J Mäusen	Eigenzucht der SPF-Haltung, Universität Wien
------------------------------	--

**Puffer/Lösungen/Chemikalien:**

Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid ( $\geq 99,5\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D(-)-Fructose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gasgemisch (95% $\text{O}_2$ /5% $\text{CO}_2$ )	Air Liquide, Deutschland
HEPES (PUFFERAN $\text{®} \geq 99,5\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid ( $\geq 99,5\%$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Materialien

Magnolol (≥95% (HPLC))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (Pulver; anhydrous, 99,5%)	ThermoFisher GmbH, Kandel, Deutschland
Natriumchlorid (≥99,9%, CELLPURE®)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
D(+)-Xylose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### Verbrauchsmaterialien:

Glaspasteurpipetten ohne Wattestopfen 2ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Obergarn M782 (Extra Stark, 100% Polyester)	Gütermann GmbH, Gutach-Breisgau, Deutschland
Spritzen (1ml)	Maxima Henry Schein®Inc., Melville, USA

### Geräte:

Erlenmayerkolben 250ml	Schott
Gavagenadeln	Laborbestand
Gewebeschere und Pinzetten	Laborbestand
Lineal	Laborbestand
Magnet + Magnetstab	Laborbestand
Messzylinder 1000ml	Brand
Petrischalen	Laborbestand
Schere für Faden	Laborbestand

## 2.3 Xylose-Messung

### Puffer/Lösungen/Chemikalien:

37% konzentrierte Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Benzoessäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Xylose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (anhydrous)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phloroglucin-Dihydrat (≥98%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.4 Arginase-Messung

### Chemikalien/Puffer/Lösungen:

α-ISPF (alpha-Isonitrosopropiophenone)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EMSURE® Ethanol absolute for Analysis	Merck GaA, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff (≥99,5%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Arginin (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid ≥99 %, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mangan(II)-Chlorid Tetrahydrat	ThermoFisher GmbH, Kandel, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl, PUFFERAN®≥99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Triton-X 100

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,  
Deutschland

**Geräte:**

Thermo-Shaker (PST-60HL)

BioSan SIA, Riga, Lettland

**2.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

**Chemikalien/Puffer/Lösungen:**

Bovines Serumalbumin (BSA)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,  
Deutschland

Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

**Geräte:**

Mikrotiterplatten BRANDplates<sup>®</sup>, 96 well

VWR International GmbH, Darmstadt,  
Deutschland

Multikanalpipette (300µl)

EPENDORF Austria GmbH, Österreich

**2.6 Nitrit-Messung**

**Chemikalien/Puffer/Lösungen:**

Griess Kit

Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

### 3 Methoden

#### 3.1 Everted Sac aus Dünndarmgewebe

Die „Everted Sac“-Technik wird verwendet, um den Transport von Substanzen von der Mucosa zur Serosa zu untersuchen [127]. Es handelt sich um ein *Ex-vivo*-Modell zur Nachstellung von Abläufen im Darm, bei dem der Darm (hier Dünndarm) umgestülpt, mit Puffer gefüllt und gegenüber Substanzen exponiert wird. Um einen möglichen protektiven Effekt von Magnolol auf die Fructose-induzierte Schädigung der Darmbarriere bzw. eine erhöhte intestinale Permeabilität zu untersuchen, wurde das Modell nach von Hamilton und Butt (2013) in modifizierter Form angewandt [128].

##### Herstellung der Magnolollösung:

10mg des wasserunlöslichen Magnolols wurden in 0,75 ml DMSO gelöst. 100 µl dieser Lösung wurden anschließend in 9,9 ml KRH-Puffer (**Tabelle 1**) gelöst, wodurch eine Stocklösung mit einer Konzentration von 0,5 mM entstand. Aus der Stocklösung wurden dann im Weiteren folgende Gebrauchslösungen hergestellt (**Tabelle 2**).

**Tabelle 1: Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES (KRH)-Puffers** (wurde bei 4°C gelagert)

	<b>Chemikalien</b>	<b>Menge</b> (gelöst in 1L ddH <sub>2</sub> O)
<b>Lösung 1:</b> 10x Salzlösung	NaCl (1,15 M)	67,2 g
	KCl (50 mM)	3,73 g
	MgSO <sub>4</sub> (anhydrous, 12 mM)	1,44 g
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	2,94 g
<b>Lösung 2:</b> 10x HEPES-Lösung	HEPES (250 mM)	59,5 g
<b>Lösung 3:</b> 10x KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM)	1,36 g
<b>Herstellung 1 L KRH-Puffer</b>		
1. 100 ml Lösung 1 + 100 ml Lösung 2 + 100 ml Lösung 3 + 500 ml ddH <sub>2</sub> O		
2. pH-Wert auf 7,4 einstellen		
3. 2 g BSA hinzufügen, mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen		

BSA = Bovines Serumalbumin

Tabelle 2: Gebrauchslösungen für die Inkubation der Everted Sacs

Mangololkonzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Menge 0,5 $\mu\text{M}$ Stocklösung [ $\mu\text{l}$ ]	Menge KRH-Puffer +/- Fructose und/oder Xylose [ $\mu\text{l}$ ]
0	0	5000
1	49,9	4950,1
10	499,4	4500,6
5	99,8	4900,2
50	998	4002

Ablaufschema des Inkubationsversuchs:

1. Herstellung der Everted Sac aus Dünndarmgewebe
2. Vorinkubation des Gewebes in KRH-Puffer mit 0-50 $\mu\text{M}$  Magnolol
3. Inkubation der Everted Sacs mit Magnolol und/oder Fructose
4. Nachinkubation der Everted Sacs mit Xylose

Herstellung der Everted Sacs aus Dünndarmgewebe von Mäusen:

Die C57/BL6-Mäuse, die aus der SPF-Haltung der Universität Wien stammten, wurden durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Dünndarm entnommen, in zwei ca. 11 cm lange Teile geschnitten und mit einer eiskalten DPBS-Lösung gespült, um Verdauungsrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Darmstücke in eine Petrischale mit KRH-Puffer (Herstellung siehe **Tabelle 1**) überführt und in sechs gleich lange Stücke à 3,5 cm geschnitten. Die Darmstücke wurden mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig auf eine Gavagenadel gezogen, am überstehenden Ende mit einer zweiten Gavagenadel fixiert und über diese zweite Nadel gezogen, sodass sich die Mucosa mit ihrer Bürstensaummembran am Ende außen befand. Anschließend wurden die Darmstücke von einer Seite mit Garn zugeknotet, indem das jeweilige Darmstück mit einer Pinzette angehoben wurde und eine zweite Person einen unterhalb der Pinzette einen Doppelknoten band. Von der anderen Seite wurden die Darmstücke mithilfe einer Spritze mit etwa 200  $\mu\text{l}$  KRH-Puffer befüllt und anschließend auch von dieser Seite zugeknotet. Anschließend wurden die Everted Sacs gewogen und es wurde von Knoten zu Knoten ihre Länge gemessen. Die Darmstücke bzw. die fertigen Everted Sacs wurden während der ganzen Zeit in KRH-Puffer auf Eis gelagert.

Inkubation

Die Inkubation in Fructose-, Xylose-, Fructose-Xylose-Lösung bzw. reinem KRH-Puffer mit oder ohne Magnolol erfolgte im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C unter Begasung mit einem Gemisch aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Inkubationspuffer sind in **Tabelle 3** beschrieben.

**Tabelle 3: Zusammensetzung von Fructose- Xylose- und Xylose-Fructose-Lösung**

<b>Fructoselösung 5 mM:</b>	<b>Xyloselösung 0,1 %:</b>	<b>Xylose 0,1 % - Fructose 5 mM-Lösung:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 mg Fructose</li> <li>- 111 ml KRH-Puffer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 mg Xylose</li> <li>- 100 ml KRH-Puffer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 mg Fructose</li> <li>- 111 mg Xylose</li> <li>- 111 ml KRH-Puffer</li> </ul>

Die Vorinkubation der Everted Sacs erfolgte in KRH-Puffer mit 0-50  $\mu$ M Magnolol (siehe **Tabelle 4**) und dauerte 10 Minuten.

Für die Hauptinkubation wurden die Everted Sacs in Falcons umgelagert, die je nach Versuchsbedingung noch zusätzlich Fructose enthielt. Die Fructosekonzentration des fructosehaltigen Inkubationspuffer betrug 5mM und wurde aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Bergheim übernommen [129].

Nach 55 Minuten wurden die Everted Sacs erneut umgelagert, wobei die Lösungen für die Nachinkubation zusätzlich mit Xylose versetzt waren. Die Magnololstocklösung wurde hierfür also mit Xylose- bzw. Xylose-Fructose-Lösung (siehe **Tabelle 3**) versetzt. Die Nachinkubation dauerte 5 Minuten.

**Tabelle 4** zeigt das Pipettierschema, das für die Magnololkonzentrationen von 5 bzw. 50  $\mu$ M angewandt wurde.

**Tabelle 4: Pipettierschema für die Versuchsbedingungen der Everted Sacs:** 0-499,4 $\mu$ l 0,5mM Magnololstocklösung wurden je nach Versuchsbedingung und Inkubationsphase mit verschiedenen Inkubationspuffern auf ein Gesamtvolumen von 5ml verdünnt.

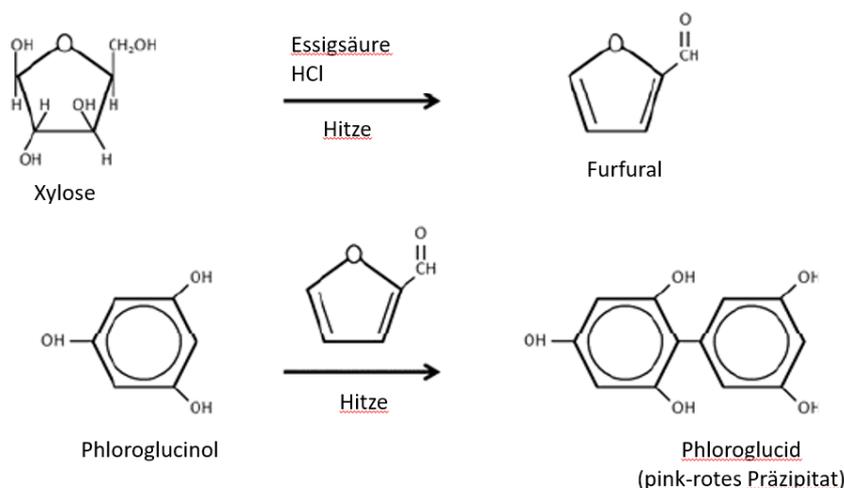
<b>Versuchs- bedingung</b>	<b>Menge Stocklösung (0,5 mM Magnolol)</b>	<b>Inkubationspuffer</b>		
		<b>Vorinkubation 10 min</b>	<b>Hauptinkubation 55 min</b>	<b>Nachinkubation 5 min</b>
Kontrolle	-	5 ml KRH-Puffer	5 ml KRH-Puffer	5 ml Xyloslösung
1 $\mu$ M Magnolol	9,99 $\mu$ l	4990,1 $\mu$ l KRH-Puffer	4990,1 $\mu$ l KRH-Puffer	4990,1 $\mu$ l Xyloslösung
5 $\mu$ M Magnolol	49,9 $\mu$ l	4950,1 $\mu$ L KRH-Puffer	4950,1 $\mu$ L KRH-Puffer	4950,1 $\mu$ L Xyloslösung
10 $\mu$ M Magnolol	99,9 $\mu$ l	4900,1 $\mu$ l KRH-Puffer	4900,1 $\mu$ l KRH-Puffer	4900,1 $\mu$ l Xyloslösung
50 $\mu$ M Magnolol	499,4 $\mu$ l	4500,6 $\mu$ L KRH-Puffer	4500,6 $\mu$ L KRH-Puffer	4500,6 $\mu$ L Xyloslösung

5 mM Fructose	-	5 ml KRH-Puffer	5 ml Fructoselösung	5 ml Fructose-Xyloselösung
5 mM Fructose + 1 µM Magnolol	9,99 µl	4990,1 µl KRH-Puffer	4990,1 µl Fructoselösung	4990,1 µl Fructose-Xyloselösung
5 mM Fructose + 5 µM Magnolol	49,9 µl	4950,1 µL KRH-Puffer	4950,1 µL Fructoselösung	4950,1 µL Fructose-Xyloselösung
5 mM Fructose + 10 µM Magnolol	99,9 µl	4900,1 µl KRH-Puffer	4900,1 µl Fructoselösung	4900,1 µl Fructose-Xyloselösung
5 mM Fructose + 50 µM Magnolol	499,4µl	4500,6 µL KRH-Puffer	4500,6 µL Fructoselösung	4500,6 µL Fructose-Xyloselösung

Nach der Prä-, Pro- und Nachinkubation wurden die Gewebesäcke aufgeschnitten, wobei die Flüssigkeit, die sich in den Sacs befand, aufgefangen und bei -20°C verwahrt wurde. Sie diente der späteren Xylose-Messung (**Kapitel 3.2**). Das Gewebe wurde nach erneutem Abwiegen zerschnitten, bei -80°C gelagert und für die Messung der Arginaseaktivität (**Kapitel 3.3**) sowie der Nitritkonzentration (**Kapitel 3.5**) verwendet.

### 3.2 Bestimmung der Darmpermeabilität mittels Xylose-Messung

Zur Bestimmung der intestinalen Permeabilität wurde der D-Xylose-Assay nach Hayashi *et al.* [130] verwendet. Bei dieser Methode wird Xylose zu Furfural umgesetzt und dieses anschließend mit Phloroglucinol zu Phloroglucid, einem pink-roten Präzipitat (siehe **Abbildung 6**) gefällt. Die Intensität von Phloroglucid wird photometrisch ermittelt, wodurch die Xylosekonzentration bestimmt werden kann [131].



**Abbildung 6: Umwandlung von Xylose in Furfural, anschließende Reaktion mit Phloroglucinol zur Bildung des gefärbten Phloroglucids.** Modifiziert nach [131]

In der letzten Phase der Inkubation wurden die Everted Sacs für 5 Minuten in einer xylosehaltigen Lösung inkubiert (**Kapitel 3.1**), die je nach Versuchsbedingung auch noch Fructose und/oder Magnolol enthielt. Je geschädigter das Gewebe und in der Folge die intestinale Permeabilität war, desto höher sollte am Ende die Xylosekonzentration im Everted Sac sein.

Das Farbreagenz (**Tabelle 5**) wurde bereits am Vortag hergestellt und dunkel gelagert. Das enthaltene Phloroglucinol reagiert während der Reaktion mit dem aus der Xylose umgesetzten Furfural zu Phloroglucid.

Am Tag der Messung wurden die Proben mit der Flüssigkeit aus den Everted Sacs auf Eis aufgetaut, gevortext und bei 1000 rpm und 4°C für 1-2 Minuten zentrifugiert, um noch ungelöste Bestandteile zu extrahieren. Je 500 µl Farbreagenz wurden in entsprechenden Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wurden je 5 µl von Proben, Sample Blank (KRH-Puffer), Standards (**Tabelle 6**), bzw. Reagent Blank (ddH<sub>2</sub>O) hinzugefügt. Die Messung der Proben wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, Standards und Blanks wurden in Zweifachbestimmung gemessen.

Anschließend erfolgte eine Inkubation am „Mixing Block“ bei 100°C, wobei die Proben konstant bei einer Geschwindigkeit von 300 rpm für 4 Minuten geschüttelt wurden. Die Proben, Standards und Blanks wurden im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen,

bevor je 200 µl in eine 96 Well-Platte pipettiert wurden. Die Extinktion wurde bei 554 nm im SpectraMax M3 gemessen. Anhand der Xylose-Standards konnte eine Standardgerade mit entsprechender Geradengleichung erstellt werden. Der Xylosegehalt der Proben konnte mithilfe dieser Geradengleichung berechnet werden.

**Tabelle 5: Farbreagenz für D(+)-Xylose-Messung**

Chemikalie	Menge
Phloroglucinol	0,5 g
Essigsäure (100 %)	100 ml
Salzsäure HCl (37 %)	10 ml

Phloroglucin-Dihydrat wurde im Säuregemisch gelöst und bis zur Verwendung dunkel gelagert.

**Tabelle 6: Standardreihe Xylosemessung** (wurde bei Raumtemperatur gelagert)

	D(+)-Xylose [mg]	Lösungsmittel [L]	Konzentration [mg/L]
Standard 1	52,6	0,5	0,7
Standard 2	97,6	0,5	1,3
Standard 3	195,2	0,5	2,6

Verwendetes Lösungsmittel: 3,9 g Benzoesäure in 1,5 L ddH<sub>2</sub>O

### 3.3 Messung der Arginaseaktivität

Die Arginase ist ein Enzym, das die Spaltung von L-Arginin zu L-Ornithin katalysiert, wobei Harnstoff (Urea) abgespalten wird. Die Ureakonzentration, die bei dieser Methode photometrisch gemessen wird, ermöglicht anhand einer Standardgerade die Berechnung der Arginaseaktivität. Die Messung wurde nach dem Protokoll von Corraliza *et al.* mit Darmgewebe, das am Ende der Inkubation der Everted Sacs (**Kapitel 3.1**) gewonnen wurde, durchgeführt [132].

#### Durchführung der Messung

Vor Beginn der Messung wurden die in **Tabelle 7** angeführten Lösungen sowie der Lysepuffer (**Tabelle 8**) für das Homogenisieren der Proben hergestellt.

Die bei -80°C eingefrorenen Gewebestückchen wurden mit 100 µl Lysepuffer (**Tabelle 8**) und einem 5 mm Bead in einem TissueLyser II bei einer Frequenz von 30 Hz/s für 30 Sekunden homogenisiert.

**Tabelle 7: Lösungen für die Messung der Arginaseaktivität** (wurden bei 4°C gelagert)

Lösung	Substanz	Lösemittel
0,5 M L-Arginin (pH=9,7)	871 mg L-Arginin	10 ml ddH <sub>2</sub> O
Urea-Stocksolution	80 mg Harnstoff	10 ml ddH <sub>2</sub> O
α-ISPF	450 mg	5 ml Ethanol
10% Triton-X-100	1 ml 100% Triton-X-100	9 ml ddH <sub>2</sub> O

1M Tris-HCl (pH=7,4)	1,576 g Tris HCl	10 ml ddH <sub>2</sub> O
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O (100mM)	197,9 mg	10 ml ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 8: Lysepuffer** (Menge reicht für 3 Everted Sacs)

Substanz	Menge
ddH <sub>2</sub> O	10,98 ml
MnCl <sub>2</sub>	600 µl
Tris-HCl	300 µl
Protease-Inhibitor	60 µl
Triton-X 100	60 µl

Danach wurde das Lysat für 10 Minuten bei 4°C und einer Frequenz von 13000 rpm zentrifugiert, um das Lysat von ungelösten Zellresten zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen, auf Eis gelagert und in mehreren Schritten bis zu einer Verdünnung von 1:100 mit Lysepuffer verdünnt. Lebergewebe, das als Referenz diente, wurde bis zu einer Verdünnung von 1:250 verdünnt.

Die verdünnten Proben wurden zur Enzymaktivierung für 10 Minuten bei 55°C am Mixing Block erhitzt. Anschließend wurden je 50 µl der aktivierten Proben mit 50 µl L-Arginin im Duplikat angesetzt. Als Blank wurden in Einfachbestimmung 50 µl der Proben mit 50 µl destilliertem Wasser versetzt. Proben und Blanks wurden im Mixing-Block für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Währenddessen wurde eine nach dem Schema in **Tabelle 9** eine Urea-Standardverdünnungsreihe vorbereitet. Je 100 µl der Standards wurden im Duplikat angesetzt.

**Tabelle 9: Pipettierschema für die Standardreihe bei der Arginase-Messung**

	Urea-Konzentration [µg/µl]	Urea-Verdünnungsreihe	ddH <sub>2</sub> O [µl]
A	0,8	100 µl Urea-Stocksolution*	900
B	0,4	500 µl A	500
C	0,2	500 µl B	500
D	0,1	500 µl C	500
E	0,05	500 µl D	500
F	0,025	500 µl E	500
G	0		

\*Urea-Stocksolution: 80 mg Urea in 10 ml dH<sub>2</sub>O

Zum Abstoppen der Reaktion wurden alle Proben und Standards mit je 800 µl „Stop-Lösung“ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:3:7) und 50 µl α-ISPf versetzt, wodurch es zu einer Farbreaktion kam.

Anschließend wurden Proben und Standards für 45 Minuten bei 100°C im Mixing Block inkubiert. Danach wurden 200 µl pro Probe bzw. Standard in eine 96-Well-Platte pipettiert und zur Vermeidung einer Kristallbildung durch  $\alpha$ -ISPF bei 60°C für 10 Minuten auf den Thermoshaker gestellt. Die Extinktion der Proben wurde im Photometer bei 540 nm bestimmt. Zur Auswertung wurde eine Urea-Standardreihe erstellt. Die Daten wurden anhand der Proteinkonzentration der Proben normalisiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (siehe **Kapitel 3.4**).

### 3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Gesamtproteinkonzentration in den untersuchten Homogenaten der Everted Sacs zu bestimmen, wurde eine photometrische Quantifizierung nach Bradford (1976) durchgeführt [133]. Die Methode basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 durch die Bindung an Proteine von 465 auf 595 nm, wodurch es zu einem Farbumschlag von rot nach blau kommt. Mithilfe einer photometrischen Auswertung und einer Proteinstandardgerade kann der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe festgestellt werden.

Die Lysate und die jeweiligen Extraktionspuffer wurden mit destilliertem Wasser verdünnt, wobei der Verdünnungsfaktor abhängig von den Probenlysaten war. Die Proben für die Messung der Arginaseaktivität wurden in einem Verhältnis von 1:10, die Proben für die Bestimmung der Nitritkonzentration in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Das BioRad Farbreagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die BSA-Standardverdünnungsreihe wurde nach dem Schema in **Tabelle 10** hergestellt.

**Tabelle 10: Standardverdünnungsreihe für die Proteinbestimmung nach Bradford**

	<b>Protein</b>	<b>Verdünnter Lysepuffer</b>	<b>Konzentration [mg BSA/ml]</b>
A	2µl BSA-Stocksolution (0,1µg/µl)	198µl	1,0
B	100µl A	100µl	0,5
C	100µl B	100µl	0,25
D	100µl C	100µl	0,125
E	100µl D	100µl	0,0625
F		100µl	0

Anschließend wurden je 5 µl der Proben bzw. Standards in Dreifachbestimmung in eine durchsichtige 96 Well-Platte pipettiert. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jedem 200 µl Farbreagenz pro Well hinzugefügt. Die Platte wurde im Photometer bei Raumtemperatur für 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde bei 590 nm die Extinktion bestimmt. Anhand der BSA-Standardgerade konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

### 3.5 Bestimmung der Nitrit-Konzentration

Nitrit ist ein wichtiges physiologisches Boten- und Effektormolekül und eines der primären, stabilen Abbauprodukte von Stickstoffmonoxid [134]. Der Nitritgehalt der Proben wurde mittels einer Diazotierungsreaktion, die 1879 von Peter Griess erstmals beschrieben wurde, und einer anschließenden photometrische Messung erfasst [135]. Die Messung wurde mithilfe des Griess Reagent Systems der Firma Promega durchgeführt.

Etwa 3-4 mm große Stücke des Darmgewebes aus dem Everted Sac-Versuch wurden mit 120  $\mu$ l DPBS im TissueLyser mit einem 5 mm Bead bei einer Frequenz von 30 Hz/s für 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 Minuten bei einer Frequenz von 12.000 rpm und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis gelagert.

Zur Herstellung der Standardkurve wurden 2  $\mu$ l Nitrit-Standard (0,1 M) 1:1000 mit DPBS verdünnt, woraus sich eine Nitritkonzentration von 100  $\mu$ M ergab. Die Standardverdünnungsreihe wurde nach dem Schema in **Tabelle 11** direkt in einer 96 Well-Platte im Triplikat hergestellt. Von den Proben wurden im Duplikat je 40  $\mu$ l in Wells pipettiert.

**Tabelle 11: Herstellung der Nitrit-Standardverdünnungsreihe**

	Nitrit- Verdünnungsreihe	DPBS [ $\mu$ l]	Nitritkonzentration [ $\mu$ M]
A	80 $\mu$ l Nitrit-Standard	-	100
B	40 $\mu$ l A	40	50
C	40 $\mu$ l B	40	25
D	40 $\mu$ l C	40	12,5
E	40 $\mu$ l D	40	6,25
F	40 $\mu$ l E	40	3,13
G (40 $\mu$ l wurden verworfen)	40 $\mu$ l F	40	1,56
H	-	40	0

Zu Standards und Proben wurden jedem Well mit einer Mehrkanalpipette 40  $\mu$ l Sulfonamidlösung beigefügt. Nach einer zehnmütigen Dunkelinkubation bei Raumtemperatur wurden 40  $\mu$ l NED-Lösung hinzu pipettiert und die Platte wurde abermals für 10 Minuten dunkel inkubiert, wobei eine lila Färbung entstand. Die Absorption wurde anschließend bei 520 bis 550nm gemessen, wobei die Messung bei 540nm ausgewertet wurde. Anhand der Standardgerade wurde die Nitritkonzentration der Proben berechnet, wobei diese auf die Proteinkonzentration der Proben bezogen wurde. Diese wurde mittels Bradford-Assay (**Kapitel 2.5**) ermittelt.

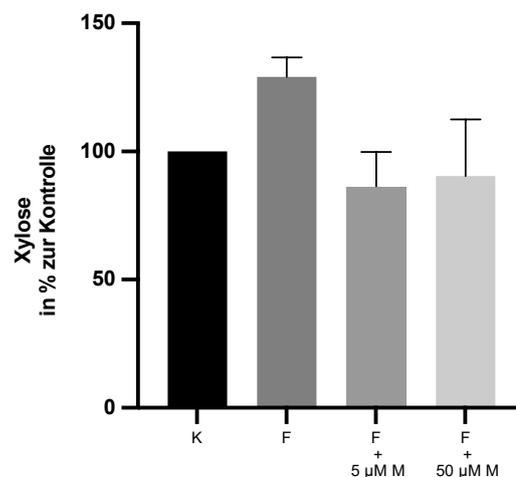
## 4 Ergebnisse

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses des Neolignans Magnolol auf die fructoseinduzierte Störung der intestinalen Barrierefunktion. In Vorversuchen wurde die optimale Fructosekonzentration ermittelt [129].

Des Weiteren wurden die Konzentrationen von Magnolol, die keine bzw. nur geringe Effekte auf die Parameter der Permeabilität haben, festgelegt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Anhang zusammengefasst.

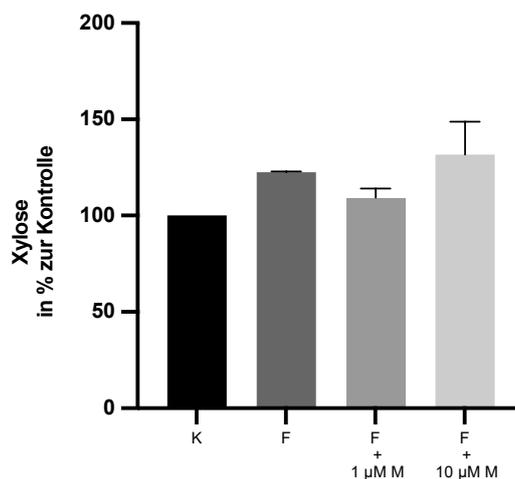
### 4.1 Xylosemessung

Um zu untersuchen, ob Magnolol die durch Fructose veränderte Darmpermeabilität im Everted Sac-Modell beeinflusst, wurden die Gewebesäckchen im Everted Sac-Versuch für fünf Minuten in einer Xylose-haltigen Lösung inkubiert. Wie in **Abbildung 7** zu sehen ist, führte die Inkubation in der 5 mM-Fructoselösung (Positivkontrolle) im Vergleich zur Negativkontrolle (reiner KRH-Puffer ohne Fructose) zu einer höheren Permeation von Xylose. Bei der Zugabe von 5 und 50  $\mu$ M Magnolol zur 5 mM-Fructoselösung war die Permeation geringer, erreichte jedoch aufgrund der Streuung nicht das Signifikanzniveau.



**Abbildung 7: Einfluss von 5 und 50  $\mu$ M Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.** Werte sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM, n=4-5. K: Kontrolle; F: Fructose [5mM]; M: Magnolol

Die Anreicherung des KRH-Puffers mit 1 $\mu$ M Magnolol führte zu einer geringeren Permeation von Xylose, was für 10 $\mu$ M nicht nachweisbar war (siehe **Abbildung 8**).



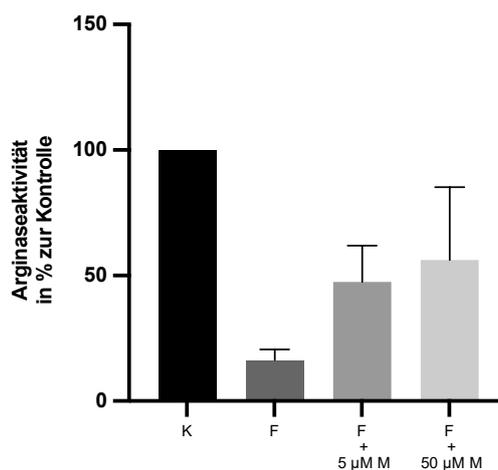
**Abbildung 8: Einfluss von 1 und 10 µM Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=4. K: Kontrolle; F: Fructose [5mM]; M: Magnolol

## 4.2 Messung der Arginaseaktivität

Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Bergheim deuten darauf hin, dass Veränderungen des Metabolismus von Stickstoffmonoxid- und Arginase-metabolismus in der Regulation der intestinalen Barrierefunktion von Bedeutung sind [129].

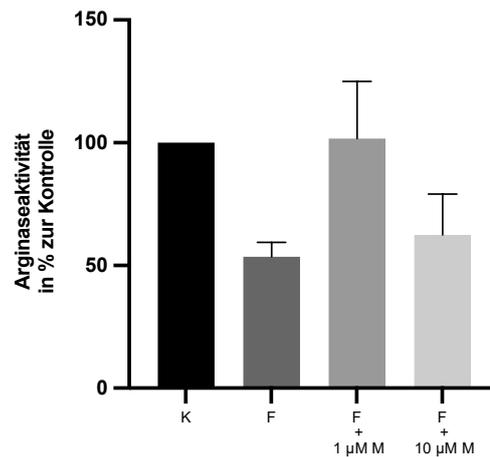
Um zu untersuchen, ob Magnolol einen Einfluss auf Veränderungen der intestinalen Arginaseaktivität hat, wurde die Arginaseaktivität in den Everted Sacs des Dünndarmgewebes nach der Behandlung mit Fructose ± Magnolol bestimmt.

Wie aus **Abbildung 9** ersichtlich ist, führte der Zusatz von 5 bzw. 50 µM Magnolol zur Fructoselösung zu einer höheren Arginaseaktivität des darin inkubierten Gewebes. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 9: Einfluss von 5 und 50 µM Magnolol auf Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=3. K = Kontrolle, F = Fructose [5mM], M = Magnolol

Auch durch den Zusatz von 1 und 10 µM Magnolol zur Fructoselösung kam es zu einer geringeren Reduktion der Arginaseaktivität des Everted Sac Dünndarmgewebes (siehe **Abbildung 10**).

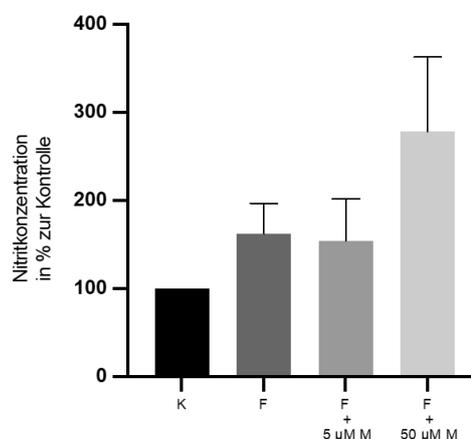


**Abbildung 10: Einfluss von 1 und 10 µM Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms, die mit Fructose behandelt wurden.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=4. K = Kontrolle, F = Fructose [5mM], M = Magnolol

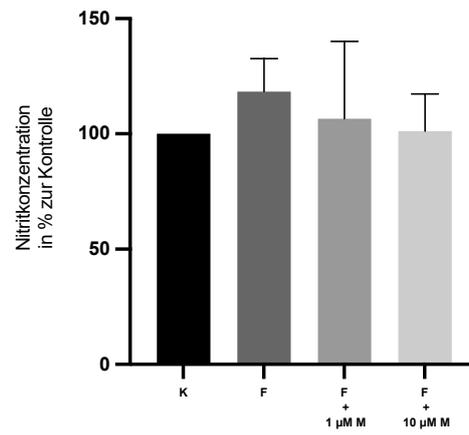
### 4.3 Nitrit-Messung

Um den Einfluss von Magnolol auf die Fructose-induzierte Veränderung der Bildung von Stickstoffmonoxid zu untersuchen, wurde die Konzentration von Nitrit, einem stabilen Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid (NO), in Dünndarmgewebe von Everted Sacs, die mit Fructose ± Magnolol behandelt wurden, bestimmt.

Wie in **Abbildung 11** und **Abbildung 12** zu sehen ist, war die Nitritkonzentration in den Gewebesäckchen, die in KRH-Puffer mit 5mM Fructose inkubiert worden waren, etwas höher als in jenen Gewebesäckchen, die in reinem KRH-Puffer inkubiert worden sind. Die Beigabe von 5 µM Magnolol (**Abbildung 11**) sowie 1 und 10 µM Magnolol (**Abbildung 12**) schien die Nitritkonzentration geringfügig zu reduzieren. Leider gab es auch hier keine Signifikanzen, was vermutlich in erster Linie der geringen n-Zahl von 3-5 und der relativ hohen Streuung innerhalb der Versuchsbedingungen zuzuschreiben ist.



**Abbildung 11: Einfluss von 5 und 50 µM Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm, die mit Fructose behandelt wurden.** Die Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=4-5. K = Kontrolle, F = Fructose [5mM], M = Magnolol



**Abbildung 12: Einfluss von 1 und 10  $\mu\text{M}$  Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm, die mit Fructose behandelt wurden.** Die Werte sind dargestellt als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ,  $n=4$ . K = Kontrolle, F = Fructose [5mM], M = Magnolol

## 5 Diskussion

Die weltweit steigende Prävalenz metabolischer Erkrankungen, wie beispielsweise Adipositas, Typ 2-Diabetes oder Hyperlipidämie, stellt ein gewaltiges gesundheitspolitisches Problem dar [136]. Das Metabolische Syndrom – das Clustering verschiedener metabolischer Komorbiditäten - wird durch die Weltgesundheitsorganisation als pathologischer Zustand definiert, der durch abdominelle Adipositas, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Hyperlipidämie gekennzeichnet ist [137]. Durch die Ausbreitung des westlichen Lebensstils (hochkalorische, ballaststoffarme Ernährung mit viel Fett und Zucker, wenig körperliche Aktivität) ist das Metabolische Syndrom zu einem globalen Gesundheitsproblem geworden, von dem längst nicht mehr nur Industrie-, sondern vor allem auch Entwicklungsländer betroffen sind. Die Prävalenz wird auf etwa ein Viertel der Weltbevölkerung geschätzt [136]. Das Syndrom begünstigt die Ausbreitung anderer (kardio-) metabolischer Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Schlaganfall [136]. Die NAFLD (Nichtalkoholische Fettlebererkrankung) gilt als hepatische Manifestation des Metabolischen Syndroms [138] und ist weltweit eine der häufigsten Lebererkrankungen [139]. Die Prävalenz wird auf etwa 24 % (Europa 23 %, bzw. 5-44 % je nach Land) geschätzt und steigt stetig [140, 141].

Ein erhöhter Zuckerkonsum wird als eine der Hauptursachen für die weltweite Ausbreitung von Fettleibigkeit und Diabetes sowie die damit einhergehenden kardiometabolischen Risiken angesehen. Besonders schädlich scheint sich hier eine hohe Aufnahme von Fructose auszuwirken [70].

In Tiermodellen geht eine hohe Fructoseaufnahme mit einer Verschlechterung der intestinalen Barrierefunktion einher, wodurch es zu einer Translokation bakterieller Endotoxine kommt [87]. Ähnliches wird auch für den Menschen diskutiert [142]. Die Portalvene verbindet den Darm und die Leber („Darm-Leber-Achse“) [143]. Dies könnte den Zusammenhang von Endotoxinen und dem Fortschreiten von NAFLD und anderen Erkrankungen erklären [144]. Wie sich in zahlreichen Studien [76, 145–151] gezeigt hat, kann ein hoher Fructosekonsum inflammatorische Prozesse begünstigen. Einerseits kann die aus dem Abbau von Fructose resultierende vermehrte Lipogenese zur übermäßigen Bildung von Fettgewebe führen, das metabolisch aktiv ist und unter anderem proinflammatorische Metabolite freisetzt [152]. Andererseits kann eine hohe Fructoseaufnahme in isolierter Form die Entstehung einer mikrobiellen Dysbiose, die im Zusammenhang mit der NAFLD als förderlich angesehen wird, induzieren, indem sie Entzündungsprozesse, Insulinresistenz und intestinale Permeabilität moduliert [138].

Bisher ist jedoch nicht genau geklärt, wie bzw. über welche Signalwege Fructose die intestinale Barrierefunktion schädigt. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Masterarbeit untersucht, ob die Behandlung mit Magnolol in verschiedenen Konzentrationen im *ex vivo*-Everted Sac Modell protektive Effekte auf die intestinale Barrierefunktion hat und ob das Neolignan vor fructoseinduzierten Veränderungen der Darmpermeabilität schützt.

## 5.1 Das ex-vivo Everted Sac-Modell zur Untersuchung des Einflusses von Nahrungsbestandteilen auf die Darmbarrierefunktion

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung des Einflusses von Fructose und Magnolol auf die intestinale Barrierefunktion ein sogenanntes „Everted Sac“ Modell verwendet. Hierzu wurde Dünndarmgewebe von Mäusen entnommen und entsprechend zu sogenannten „Everted Sacs“ gebaut. Das *in-vitro* Everted Sac-Modell wurde 1954 von Thomas Hastings Wilson und Gerald Wiseman [127] eingeführt. Seitdem wurden an dem Modell Änderungen und Verbesserungen vorgenommen, um die Lebensfähigkeit des Gewebes zu erhöhen und ein intaktes Schleimhautepithel zu erhalten, das die *in-vivo*-Bedingungen nachahmt [153]. Das Modell ermöglicht die Untersuchung von Absorption, Transport sowie Interaktionen verschiedener Substanzen [154].

Vorteile des Modells sind eine relativ große Absorptionsfläche und das Vorhandensein einer Mucusschicht [153]. Außerdem werden weniger Tiere benötigt also für *in vivo*-Versuche [154]. Everted Sac-Versuche eignen sich, um zu testen, wie sich verschiedene Konzentrationen einer Substanz auf relevante Marker auswirken, bevor Tierversuche durchgeführt werden. Während bei Zellkulturversuchen nur eine Art von Zellen – beispielsweise T84-Colonzellen oder Caco 2-Zellen – vorliegt, setzt sich ein Everted Sac aus Dünndarm von Mäusen aus zahlreichen verschiedenen Zelltypen zusammen und ist komplexer als *in vitro*-Modelle, in denen kaum noch Enzymaktivität stattfindet [154]. Verglichen mit Caco-2 Zellen, die ursprünglich aus einem humanen Dickdarmtumor gewonnen wurden und sich für Studien zur oralen Absorption eignen, ist das Everted Sac Modell besser geeignet, um den Transport von Substanzen durch das Dünndarmepithel zu untersuchen [153, 155]. Ebenfalls vorteilhaft gegenüber anderen *in vitro*-Modellen ist das relativ kleine Volumen im Everted Sac, wodurch es zu einer schnelleren Akkumulation von Substanzen kommt [156].

Zu den Nachteilen zählt das Fehlen einer aktiven Blut- und Nervenversorgung [156], wodurch die Lebensfähigkeit des Gewebes unter physiologischen Bedingungen auf etwa zwei Stunden limitiert ist [153]. Darüber hinaus kann es während des Umstülpens zu einer Schädigung des Darmgewebes kommen, wodurch die Ergebnisse verzerrt wären [156]. Zudem wird die *Muscularis mucosae* meist nicht entfernt, was dazu führen kann, dass der Transport der Substanzen unterschätzt wird, da diese zur Bindung an Muskelzellen neigen [154]. Verschiedene Faktoren beeinflussen das Ergebnis. Darunter Alter [157, 158], Geschlecht [159], Spezies und Ernährung des Tieres [160], das verwendete Darmsegment (Ileum, Jejunum, Duodenum bzw. Colon) [161–163], ebenso experimentelle Faktoren wie der pH-Wert im Inneren des Darmsackes sowie im Inkubationsmedium [164–166], die Temperatur [167, 168] und die Konzentration der verwendeten Substanzen [169]. Die Methode ist relativ einfach und tiersparend und eignet sich beispielsweise für das Screening verschiedener Substanzen bzw. Konzentrationen dieser, bevor Tierversuche durchgeführt werden [154].

## 5.2 Einfluss von Fructose und Magnolol auf die intestinale Permeabilität

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Fructose einen Einfluss auf die Integrität der Darmwand hat. Bergheim *et al.* konnten zeigen, dass Mäuse, die mit Fructose gefüttert wurden, höhere Plasmaendotoxinspiegel aufwiesen und die hepatische Fettakkumulation signifikant erhöht war [76]. Dies könnte mit den Auswirkungen von Fructose auf Tight Junction-Proteine zusammenhängen. Spruss *et al.* konnten zeigen, dass Mäuse, die mit Fructose gefüttert wurden, verminderte Spiegel an Occludin und ZO-1-Proteinen hatten. Sie konnten zudem eine Überaktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-9 und MMP-13), die am posttranslationalen Abbau von Occludin beteiligt sind, sowie einen verminderten Spiegel an TIMP-1 (Tissue inhibitor of MMP-1) nachweisen. Durch eine Behandlung mit Metformin kam es zu einer Reduktion der negativen Effekte von Fructose auf die Tight Junction-Proteine [82, 90]. Auch bei Ratten führte eine Fütterung mit Fructose zu einem verminderten Spiegel an Tight Junction-Proteinen [86, 91]. Der Mechanismus, durch den Fructose die Durchlässigkeit des Darms erhöht, ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielt inflammatorische Dysfunktion eine Rolle. Bei Mäusen, die mit Fructose gefüttert wurden, kam es zu einer Herabregulation von NLRP6 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing 6) im Dickdarmgewebe. NLRP6 ist eine Domäne des Inflammasoms, die an der Regulation der Regeneration intestinaler Epithelzellen beteiligt ist [88, 170].

Eine andere Theorie verknüpft die negativen Effekte von Fructose auf die Darmbarriere mit dem durch Alkohol induzierbaren Enzym Cytochrom P450-2E1 (CYP2E1), das hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und dort unter anderem für den Abbau von Alkohol zuständig ist [91, 171]. Die CYP2E1-Induktion oder -Aktivierung ist in der Regel mit einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden. Dies wurde auch bei fructoseexponierten Ratten und Wildtyp-Mäusen beobachtet, nicht aber bei Cyp2e1-Null-Mäusen [91]. Im Dünndarm fructoseexponierter Ratten waren CYP2E1- und iNOS-Proteine, Marker für oxidativen bzw. nitrativen Stress, deutlich erhöht [91]. Bei Fettlebererkrankungen wurde festgestellt, dass nicht nur hepatisches [172], sondern auch intestinales CYP2E1 in erhöhten Mengen vorliegt. Ein erhöhter Spiegel an intestinalem CYP2E1 könnte über die posttranslationale Modifikationen der Tight- und Adhärenz Junction-Proteine sowie der Apoptose von Enterozyten zu einer Störung der intestinalen Barrierefunktion sowie einer Endotoxämie beitragen, wie es bei Nagetieren unter Alkoholexposition nachgewiesen wurde [173].

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung mit Fructose zu einer vermehrten Permeation von Xylose durch das Dünndarmgewebe, wobei das Signifikanzniveau nur im gepaarten Vergleich erreicht wurde (siehe Anhang). Die Behandlung mit 1, 5 und 50  $\mu\text{M}$  Magnolol scheint die fructoseinduzierte Permeation von Xylose im Everted Sac-Modell des Dünndarms von C57/BL6-Mäusen zu vermindern. Bei einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  des Neolignans war dies nicht nachweisbar. Dass die Unterschiede das Signifikanzniveau nicht erreichen, dürfte an der

geringen n-Zahl von 4-5 liegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen mit jenen von Deng *et al.* einher, die zeigen konnten, dass Magnolol in einem durch *Escherichia coli* induzierten Diarrhoe-Mausmodell protektive Effekte auf die intestinale Barriere hatte. In diesen Studien führte die intraperitoneale Gabe von 300 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht zu einer Erhöhung der Zottenlänge und Kryptentiefe, sowie zu einer Verringerung der Anzahl von Becherzellen und des Verhältnisses von Zottenhöhe zu Kryptentiefe. Zudem verhinderte eine Verabreichung von 500 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht die Apoptose intestinaler Epithelzellen [125]. Weiterhin konnten Shen *et al.* nachweisen, dass Magnolol die Expression der Tight Junction-Proteine ZO-1 und Occludin in Mäusen mit durch Dextransulfatsodium induzierter Colitis erhöht [96]. Tight Junction-Proteine sind wichtige Bestandteile der intestinalen Barriere und essentiell für die Integrität der intestinalen Mucosa [174]. Zudem weist die Studie von Shen *et al.* darauf hin, dass die orale Gabe von 25, 50 bzw. 100 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht bei Mäusen mit experimentell induzierter Colitis in Colongewebe die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 über die Regulierung des Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) hemmt [96].

Chen *et al.* fanden, dass bei Masthühnern, die mit *Salmonella pullorum* infiziert worden waren, die Anreicherung des Futters mit 300 mg/kg Magnolol zu einer Vermehrung von Lactobacillus und zu einer Reduktion von Streptokokken führt [175]. Auch Sakaue *et al.* wiesen dem Neolignan eine antimikrobielle Wirkung gegen Streptokokken nach [100]. Lactobazillen scheinen protektive Effekte auf die Darmbarriere zu haben, das Eindringen luminaler Pathogene in den Wirt zu verhindern und das Immunsystem zu stimulieren [176, 177]. Außerdem führte die Magnololintervention bei Chen *et al.* zu einer gesteigerten Expression von ENPP7 und SAT1 [178]. ENPP7 ist ein Enzym, das Sphingomyelin zu Ceramiden hydrolysiert und entzündungshemmend wirkt [179]. Ceramide spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität des Darmepithels [180]. SAT1 ist wichtig für den Polyaminmetabolismus, der essentiell für das mucosale Wachstum sowie die Barrierefunktion ist [181]. Polyamine wie beispielsweise Spermidin sind kleine polykationische Moleküle, die aus dem Metabolismus von L-Arginin stammen [182]. Spermidin bzw. L-Arginin scheinen die Entwicklung regulatorischer T-Zellen zu fördern und dadurch positive Auswirkungen auf die Darmimmunität zu haben [183]. Eine verminderte Polyaminkonzentration kann die intestinale Barrierefunktion beeinträchtigen [184, 185].

Basierend auf den bereits diskutierten Ergebnissen anderer Studien wurde hier untersucht, ob Magnolol vor einer fructoseinduzierten Veränderung der intestinalen Permeabilität schützt. Wenngleich das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde, weisen die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass Magnolol die Permeabilität im Darm, die durch Fructose induziert wird, verändern kann. Weitere Studien sind jedoch nötig, um zu untersuchen, ob dies auch *in vivo* nachweisbar ist.

### 5.3 Einfluss von Magnolol auf Marker des NO- / Argininmetabolismus

Studien deuten darauf hin, dass das Enzym Arginase die Funktion des Endothels modulieren [186, 187] und bei der Regulation der intestinalen Permeabilität eine Rolle spielen könnte [188]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Veränderungen der Arginaseaktivität zur Entwicklung einer intestinalen Barrieredysfunktion beitragen könnten [129]. Rajcic *et al.* fanden, dass eine Supplementation mit 2,5 g Citrullin pro Kilogramm Körpergewicht im Mausmodell vor dem Voranschreiten einer bereits bestehenden NAFLD bzw. NASH schützt. Sie führten dies auf Veränderungen der intestinalen Arginaseaktivität und der intestinalen Permeabilität zurück [129]. In der vorliegenden Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass die durch Fructose verminderte Arginaseaktivität in Everted Sac-Dünndarmgewebe durch den Zusatz von 1, 5, 10 und 50  $\mu\text{M}$  Magnolol zu der fructosehaltigen Inkubationslösung gestiegen ist. Allerdings wurde das Signifikanzniveau aufgrund der kleinen n-Zahl und der relativ großen Streuung nicht erreicht.

Ergebnisse in Nagetiermodellen mit Endotoxämie deuten darauf hin, dass eine Supplementation von L-Citrullin und L-Arginin die intrazelluläre NO-Produktion normalisiert und die iNOS-Konzentration senkt [189], was als entscheidend für die Funktion der Darmbarriere angesehen wird [190, 191]. Eine erhöhte Nitritproduktion im intestinalen Gewebe wird mit einer Störung der Darmbarriere assoziiert [91]. Bei Rajcic *et al.* führte die Supplementation mit L-Citrullin zu einer Reduktion der erhöhten Nitritkonzentrationen im Dünndarm der mit einer fett-, fructose- und cholesterinreichen Diät gefütterten Mäuse [129]. Auch in anderen Organen kam es durch eine Supplementierung mit L-Citrullin zu einer Normalisierung der iNOS-abhängigen NO-Synthese [192]. Der Rückgang der Nitritkonzentrationen durch die Supplementation mit L-Arginin, war mit geringeren Rückgängen der Arginase-Aktivität im Dünndarmgewebe verbunden [129]. Arginase hat sich bereits als Gegenregulator von Stickstoffmonoxid-Synthasen, darunter auch iNOS, erwiesen und reguliert damit auch die Bioverfügbarkeit von NO [193]. Die Aktivierung von iNOS und die Überproduktion von NO werden mit einer Dysfunktion der intestinalen Barriere assoziiert [194].

Eine Studie von Wang *et al.* deutet darauf hin, dass Magnolol durch die Reduktion der NO-Produktion zu einer Verbesserung der gastrointestinalen Funktion beitragen könnte [195]. Im Mausmodell konnte das Neolignan zudem die sepsisinduzierte NO-Produktion und iNOS-Expression verhindern [115].

Auch Chen *et al.* stellten fest, dass eine Supplementation von 200 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht bei Masthühnern zu einer verminderten iNOS-Expression und NO-Produktion führte [175]. In einem durch *Escherichia coli* induzierten Diarrhöe-Mausmodell führte die Gabe von 100, 300 bzw. 500 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht zu einer verminderten Konzentration an NO und 300 bzw. 500 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht zu einer verringerten iNOS-Aktivität [125]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Magnolol einen

positiven Effekt auf die intestinale Barrierefunktion haben könnte [175], da eine erhöhte Nitritproduktion im intestinalen Gewebe, wie bereits diskutiert wurde, als Risikofaktor für eine Störung der Darmbarriere angesehen wird [91].

Der Zusatz von 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  Magnolol zu der Fructoselösung, in der die Everted Sacs inkubiert wurden, führte zu einer geringfügigen Reduktion der Nitritkonzentration, wohingegen die Aktivität der Arginase sich erhöhte. Leider sind auch diese Ergebnisse nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Wie weiter oben bereits beschrieben wurde, weisen jedoch bereits zahlreiche Studien darauf hin, dass Magnolol - möglicherweise aufgrund seiner antiinflammatorischen Wirkung – die NO-Produktion sowie die iNOS-Expression hemmen könnte [115, 125, 175, 195, 196]. In Mäusen konnten durch Oxaliplatin induzierter oxidativer Stress und Entzündungsreaktionen durch Magnolol unterdrückt werden. Dies wurde auf die Induktion von Glutathion, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase zurückgeführt. Zudem kam es zu einer Herabregulation von NF- $\kappa$ B und der nachfolgenden proinflammatorischen Zytokine. Des Weiteren führte die Magnololintervention zu einer Aufrechterhaltung der Occludinexpression [197]. Hu *et al.* stellten fest, dass Magnolol *in vitro* die Expression der Metalloproteinase 13 (MMP13) regulierte [196]. MMP-13 ist am posttranslationalen Abbau des Tight Junction-Proteins Occludin beteiligt [82]. Hu *et al.* führten die positiven Effekte von Magnolol auf die Aktivierung der PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B-Signalkaskade zurück [196]. Auch Lin *et al.* gehen davon aus, dass die antiinflammatorische Wirkung von Magnolol auf einer Aktivierung von PPAR- $\gamma$  und einer verminderten Expression von NF- $\kappa$ B beruhen [95, 113].

## 6 Fazit und Ausblick

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die NO-Synthese im Dünndarmgewebe durch Fructose verändert wird, wodurch es zu einer erhöhten NO-Konzentration und einer verringerten Arginaseaktivität kommt. Die Zugabe von Magnolol scheint zu einer Normalisierung von Arginaseaktivität und NO-Konzentration zu führen. Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Ergebnissen anderer darauf hin, dass Magnolol vor einer fructose-induzierten Schädigung der intestinalen Barriere schützen könnte [96, 125]. Der molekulare Mechanismus, der diesem potenziell schützenden Effekt von Magnolol auf die Darmbarriere zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die antiinflammatorische Wirkung von Magnolol eine Rolle spielt [96]. Die Untersuchung von Tight Junction-Proteinen sowie der MLCK (Myosin light chain kinase) oder der ROCK-Aktivität könnten Aufschlüsse über molekulare Mechanismen bzw. zugrundeliegende Signalkaskaden liefern.

Studien am Menschen werden benötigt, um zu untersuchen, ob Magnolol auch beim Menschen vor einer Schädigung der intestinalen Barrierefunktion sowie damit assoziierten Erkrankungen schützt. Dosen von 300 – 500 mg Magnolol pro Kilogramm Körpergewicht, die in tierexperimentellen Studien angewandt werden, wären bei einer 70 Kilogramm schweren Person 21 – 35 g Magnolol. Dies würde einer pharmakologischen Dosis entsprechen und ist auf natürlichem Wege, beispielsweise durch den Konsum von Magnolientee, wohl kaum zu erreichen. Die geringe Bioverfügbarkeit, die schlechte Wasserlöslichkeit erschweren zudem die klinische Anwendung.

Dennoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Magnolol eine vielversprechende Substanz ist, die in Zukunft auch in der westlichen Medizin eine Rolle spielen könnte. Es sind weiterführende Studien notwendig, die Hinweise auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen liefern. Erkenntnisse zu der Dosierung und Darreichungsform können zudem eine wertvolle Grundlage für die Therapie intestinaler Barrieredysfunktionen bei Menschen darstellen und zur Prävention von assoziierten Morbiditäten, wie der NAFLD, beitragen.

## Zusammenfassung

Eine Störung der intestinalen Barrierefunktion wird mit der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen wie beispielsweise dem Metabolischen Sndrom sowie der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) assoziiert. Unter anderem wird eine hohe Fructoseaufnahme mit der Entstehung der genannten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Tierexperimentelle Studien weisen darauf hin, dass ein hoher Fructosekonsum auch unabhängig von einer positiven Energiebilanz zur Entstehung metabolischer Erkrankungen führen kann. Hierbei scheint neben dem insulinunabhängigen Abbau des Monosaccharids auch eine Schädigung der intestinalen Barrierefunktion sowie eine daraus resultierende Translokation bakterieller Endotoxine in die Portalvene von Bedeutung zu sein. Magnolol, einem Neolignan, das aus der Stammrinde der *Magnolia officinalis* isoliert wird, wurden in Studien unter anderem antiinflammatorische und antibakterielle Wirkungen nachgewiesen. Es scheint einen Einfluss die intestinale Integrität zu haben. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Behandlung mit 1, 5, 10 und 50  $\mu\text{M}$  Magnolol im *ex-vivo* Everted Sac Modell des Dünndarms zu Veränderungen der Darmbarrierefunktion führt und ob das Neolignan vor fructoseinduzierten Veränderungen der Darmpermeabilität schützt. Um die Permeation des Gewebes zu erfassen, wurden Xylosemessungen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Arginaseaktivität im *ex vivo*-Dünndarmgewebe bestimmt. Weiterhin wurde die NO-Konzentration im Dünndarmgewebe photometrisch bestimmt. Die Fructoseintervention führte tendenziell zu einer stärkeren Permeation von Xylose durch das Darmgewebe, zu einer verringerten Arginaseaktivität und zu einem Anstieg der Nitritkonzentration. Durch die Zugabe von Magnolol sank die Xylosekonzentration in den Everted Sacs und damit die Permeabilität des Gewebes. Die Arginaseaktivität war durch den Zusatz von Magnolol höher und die Nitritkonzentration geringer. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Magnolol eine protektive Wirkung auf die intestinale Barrierefunktion haben könnte, wenn auch aufgrund der Streuung sowie der kleinen n-Zahl keine Signifikanz erreicht werden konnte. Es sind weitere Studien *in vivo* notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu klären. Weiterführende Tierversuche und Humanstudien können wichtige Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von Magnolol auf die intestinale Barrierefunktion liefern.

## Summary

The disruption of the intestinal barrier function is associated with the pathogenesis of various diseases, including the so-called metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Studies suggest an association of these diseases with fructose intake. Furthermore results of studies also suggest that a high fructose consumption can add to the development of metabolic diseases independently of a positive energy balance. Results of animal studies suggest that chronic elevated intake of fructose is associated with an intestinal barrier dysfunction and an increased translocation of bacterial endotoxins. Magnolol, a neolignan isolated from the stem bark of *Magnolia officinalis*, is known to possess anti-inflammatory and antibacterial effects. It seems also to modulate intestinal integrity. Starting from this background the present study aimed to determine if a supplementation of magnolol can attenuate the development of fructose-induced intestinal barrier dysfunction.

In the present study, it was investigated whether treatment with 1, 5, 10 and 50  $\mu\text{M}$  magnolol leads to changes in intestinal barrier function in the *ex-vivo* Everted Sac model of the small intestine and whether the neolignan protects against fructose-induced changes in intestinal permeability. Xylose measurements were performed to assess tissue permeation. Barrier function was determined by arginase activity in small intestinal tissue *ex vivo*. Furthermore, the NO concentration in the small intestinal tissue was determined photometrically. The significance level could not be reached due to the small sample number, but the results suggest that magnolol may have a protective effect on intestinal barrier function. Further *in vivo* studies are needed to clarify the underlying mechanisms. Subsequent animal and human studies may provide important clues to a possible therapeutic benefit of magnolol on the intestinal barrier function.

## 7 Literatur

1. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM (2014) Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 14:189. doi:10.1186/s12876-014-0189-7
2. Brandtzaeg P (2011) The gut as communicator between environment and host: immunological consequences. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1:S16-32. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.006
3. Binienda A, Twardowska A, Makaro A, Salaga M (2020) Dietary Carbohydrates and Lipids in the Pathogenesis of Leaky Gut Syndrome: An Overview. *Int J Mol Sci* 21(21). doi:10.3390/ijms21218368
4. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336(6086):1268–1273. doi:10.1126/science.1223490
5. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT (2012) Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489(7415):231–241. doi:10.1038/nature11551
6. Buckley A, Turner JR (2018) Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(1). doi:10.1101/cshperspect.a029314
7. Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12(5):319–330. doi:10.1007/s11894-010-0131-2
8. Riley MA, Wertz JE (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56(1):117–137. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
9. Bevins CL, Salzman NH (2011) Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 9(5):356–368. doi:10.1038/nrmicro2546
10. Korjamo T, Heikkinen AT, Mönkkönen J (2009) Analysis of unstirred water layer in in vitro permeability experiments. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(12):4469–4479. doi:10.1002/jps.21762
11. Johansson MEV, Hansson GC (2016) Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 16(10):639–649. doi:10.1038/nri.2016.88
12. van der Sluis M, Koning BAE de, Bruijn ACJM de, Velcich A, Meijerink JPP, van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AWC (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131(1):117–129. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.020
13. Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L (2002) Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 295(5560):1726–1729. doi:10.1126/science.1069094
14. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EEL, Wising C, Johansson MEV, Hansson GC (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the

- first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* 260(1):8–20. doi:10.1111/imr.12182
15. Cai R, Cheng C, Chen J, Xu X, Ding C, Gu B (2020) Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the mucus layer in the colon. *Gut Microbes* 11(4):680–690. doi:10.1080/19490976.2020.1735606
  16. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS (2017) Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 5(4):e1373208. doi:10.1080/21688370.2017.1373208
  17. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Bergé M, Cenac C, Waget A, Klopp P, Iacovoni J, Klopp C, Mariette J, Bouchez O, Lluch J, Ouarné F, Monsan P, Valet P, Roques C, Amar J, Bouloumié A, Théodorou V, Burcelin R (2012) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61(4):543–553. doi:10.1136/gutjnl-2011-301012
  18. Cummings JH, Antoine J-M, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B (2004) PASSCLAIM--gut health and immunity. *Eur J Nutr* 43 Suppl 2:II118-II173. doi:10.1007/s00394-004-1205-4
  19. Suzuki T (2020) Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Anim Sci J* 91(1):e13357. doi:10.1111/asj.13357
  20. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier K-P, Bischoff SC, Bergheim I (2008) Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* 138(8):1452–1455. doi:10.1093/jn/138.8.1452
  21. Volynets V, Küper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, Königsrainer A, Bischoff SC, Bergheim I (2012) Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 57(7):1932–1941. doi:10.1007/s10620-012-2112-9
  22. Hashemi kani A, Alavian SM, Esmailzadeh A, Adibi P, Azadbakht L (2013) Dietary Quality Indices and Biochemical Parameters Among Patients With Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Hepat Mon* 13(7):e10943. doi:10.5812/hepatmon.10943
  23. Nier A, Engstler AJ, Maier IB, Bergheim I (2017) Markers of intestinal permeability are already altered in early stages of non-alcoholic fatty liver disease: Studies in children. *PLoS ONE* 12(9):e0183282. doi:10.1371/journal.pone.0183282
  24. Shi L, Liu ZW, Li Y, Gong C, Zhang H, Song LJ, Huang CY, Li M (2012) The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. *Biomed Environ Sci* 25(4):383–391. doi:10.3967/0895-3988.2012.04.002

25. He W-Q, Wang J, Sheng J-Y, Zha J-M, Graham WV, Turner JR (2020) Contributions of Myosin Light Chain Kinase to Regulation of Epithelial Paracellular Permeability and Mucosal Homeostasis. *Int J Mol Sci* 21(3). doi:10.3390/ijms21030993
26. Jerrold R. Turner, Brian K. Rill, Susan L. Carlson, Denise Carnes, Rachel Kerner, Randall J. Mrsny, and James L. Madara Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation
27. Berglund JJ, Riegler M, Zolotarevsky Y, Wenzl E, Turner JR (2001) Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6):G1487-93. doi:10.1152/ajpgi.2001.281.6.G1487
28. Madara JL, Pappenheimer JR (1987) Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J. Membrin Biol.* 100(2):149–164. doi:10.1007/BF02209147
29. Clayburgh DR, Musch MW, Leitges M, Fu Y-X, Turner JR (2006) Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 116(10):2682–2694. doi:10.1172/JCI29218
30. Cunningham KE, Turner JR (2012) Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann N Y Acad Sci* 1258:34–42. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06526.x
31. Vandembroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 1123:134–145. doi:10.1196/annals.1420.016
32. Kasai Y, Morino T, Mori E, Yamamoto K, Kojima H (2020) ROCK inhibitor combined with Ca<sup>2+</sup> controls the myosin II activation and optimizes human nasal epithelial cell sheets. *Sci Rep* 10(1):16853. doi:10.1038/s41598-020-73817-3
33. Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* 164(3):427–439. doi:10.1083/jcb.200306172
34. Anderson JM, van Itallie CM (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(2):a002584. doi:10.1101/cshperspect.a002584
35. Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T (2008) Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *The American Journal of Pathology* 172(2):521–533. doi:10.2353/ajpath.2008.070076
36. Paradis T, Bègue H, Basmaciyani L, Dalle F, Bon F (2021) Tight Junctions as a Key for Pathogens Invasion in Intestinal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci* 22(5). doi:10.3390/ijms22052506
37. Zhang D-M, Jiao R-Q, Kong L-D (2017) High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients* 9(4):335. doi:10.3390/nu9040335

38. GIBSON PR, NEWNHAM E, BARRETT JS, SHEPHERD SJ, MUIR JG (2007) Review article: fructose malabsorption and the bigger picture. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 25(4):349–363. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.03186.x
39. Hesecker H, Hesecker B (2014) Die Nährwerttabelle. Über 40.000 Nährstoffangaben - einfache Handhabung - Übersichtstabellen zu Laktose, Fruktose, Purin, Jod und trans-Fettsäuren, 3. Aufl. Umschau, Neustadt an der Weinstraße
40. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79(4):537–543. doi:10.1093/ajcn/79.4.537
41. Hanover LM, White JS (1993) Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58(5 Suppl):724S-732S. doi:10.1093/ajcn/58.5.724S
42. (2021) Saccharose. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Saccharose&oldid=213830493>. Zugegriffen: 26. September 2021
43. Charrez B, Qiao L, Hebbard L (2015) The role of fructose in metabolism and cancer. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 22(2):79–89. doi:10.1515/hmbci-2015-0009
44. AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (2021) WHO Zucker Empfehlungen. <https://www.ages.at/themen/ernaehrung/who-zucker-empfehlungen/>. Zugegriffen: 06. September 2021
45. Stricker S, Rudloff S, Geier A, Steveling A, Roeb E, Zimmer K-P (2021) Fructose Consumption-Free Sugars and Their Health Effects. *Dtsch Arztebl Int* 118(5):71–78. doi:10.3238/arztebl.m2021.0010
46. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P (2004) The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutr* 7(1A):245–250. doi:10.1079/phn2003592
47. Bagus T Reformulierung\_Thema-Zucker
48. Perrar I, Schadow AM, Schmitting S, Buyken AE, Alexy U (2019) Time and Age Trends in Free Sugar Intake from Food Groups among Children and Adolescents between 1985 and 2016. *Nutrients* 12(1). doi:10.3390/nu12010020
49. WKO - Wirtschaftskammer Österreich (2018) Faktencheck Zucker. [https://www.wko.at/branchen/industrie/nahrungsgenussmittelindustrie/Faktencheck\\_Zucker\\_November\\_2018.html](https://www.wko.at/branchen/industrie/nahrungsgenussmittelindustrie/Faktencheck_Zucker_November_2018.html). Zugegriffen: 06. September 2021
50. DGE - Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2021) Empfehlung zur maximalen Zuckerzufuhr in Deutschland. <https://www.dge.de/presse/pm/empfehlung-zur-maximalen-zuckerzufuhr-in-deutschland/?L=0&cHash=9afa2ea16a80bdf1f8e36177d42612e>. Zugegriffen: 06. September 2021

51. Page KA, Chan O, Arora J, Belfort-DeAguiar R, Dzuira J, Roehmholdt B, Cline GW, Naik S, Sinha R, Constable RT, Sherwin RS (2013) Effects of fructose vs glucose on regional cerebral blood flow in brain regions involved with appetite and reward pathways. *JAMA* 309(1):63–70. doi:10.1001/jama.2012.116975
52. Grembecka M (2015) Natural sweeteners in a human diet. *Rocz Panstw Zakl Hig* 66(3):195–202
53. Jang C, Hui S, Lu W, Cowan AJ, Morscher RJ, Lee G, Liu W, Tesz GJ, Birnbaum MJ, Rabinowitz JD (2018) The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab* 27(2):351-361.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.016
54. Hers HG (1952) La fructokinase du foie. *Biochimica et Biophysica Acta* 8:416–423. doi:10.1016/0006-3002(52)90067-X
55. Ferraris RP, Choe J-Y, Patel CR (2018) Intestinal Absorption of Fructose. *Annu Rev Nutr* 38:41–67. doi:10.1146/annurev-nutr-082117-051707
56. Mayes PA (1993) Intermediary metabolism of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58(5 Suppl):754S-765S. doi:10.1093/ajcn/58.5.754S
57. Taskinen M-R, Packard CJ, Borén J (2019) Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 11(9). doi:10.3390/nu11091987
58. Rumessen JJ (1992) Fructose and related food carbohydrates. Sources, intake, absorption, and clinical implications. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27(10):819–828. doi:10.3109/00365529209000148
59. Rumessen JJ, Gudmand-Høyer E (1986) Absorption capacity of fructose in healthy adults. Comparison with sucrose and its constituent monosaccharides. *Gut* 27(10):1161–1168. doi:10.1136/gut.27.10.1161
60. Skoog SM, Bharucha AE (2004) Dietary fructose and gastrointestinal symptoms: a review. *Am J Gastroenterology* 99(10):2046–2050. doi:10.1111/j.1572-0241.2004.40266.x
61. Merino B, Fernández-Díaz CM, Cózar-Castellano I, Perdomo G (2019) Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease. *Nutrients* 12(1):94. doi:10.3390/nu12010094
62. SUGIMOTO K, KAWASAKI T, TOMODA M, NAKAGAWA K, HAYASHI S, INUI H, KAJIMOTO Y, YAMANOUCHI T (2010) Lowering of Postprandial Hyperfructosemia in Humans by Eucalyptus Leaf Extract: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Crossover Study. *FSTR* 16(5):509–512. doi:10.3136/fstr.16.509
63. Preston GM, Calle RA (2010) Elevated Serum Sorbitol and not Fructose in Type 2 Diabetic Patients. *Biomark Insights* 5:33–38. doi:10.4137/bmi.s4530
64. Hui H, Huang D, McArthur D, Nissen N, Boros LG, Heaney AP (2009) Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients. *Pancreas* 38(6):706–712. doi:10.1097/MPA.0b013e3181a7c6e5

65. Wahjudi PN, Patterson ME, Lim S, Yee JK, Mao CS, Lee W-NP (2010) Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 43(1-2):198–207. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.08.028
66. Lam P (2011) Effects of Consuming Dietary Fructose versus Glucose on de novo Lipogenesis in Overweight and Obese Human Subjects. *Berkeley Scientific Journal* 15(2). doi:10.5070/BS3152011589
67. Tappy L, Lê K-A (2012) Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease? *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 36(6):554–560. doi:10.1016/j.clinre.2012.06.005
68. Iizuka K (2017) The Role of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Intestinal and Hepatic Fructose Metabolism. *Nutrients* 9(2):181. doi:10.3390/nu9020181
69. Jegatheesan P, Bandt J-P de (2017) Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. *Nutrients* 9(3):230. doi:10.3390/nu9030230
70. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA (2018) Fructose metabolism and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* 128(2):545–555. doi:10.1172/JCI96702
71. Johnson RJ, Stenvinkel P, Andrews P, Sánchez-Lozada LG, Nakagawa T, Gaucher E, Andres-Hernando A, Rodriguez-Iturbe B, Jimenez CR, Garcia G, Kang D-H, Tolan DR, Lanaspa MA (2020) Fructose metabolism as a common evolutionary pathway of survival associated with climate change, food shortage and droughts. *J Intern Med* 287(3):252–262. doi:10.1111/joim.12993
72. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ (2009) Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119(5):1322–1334. doi:10.1172/JCI37385
73. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspa MA (2013) Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* 62(10):3307–3315. doi:10.2337/db12-1814
74. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glasscock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T (2009) Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocrine Reviews* 30(1):96–116. doi:10.1210/er.2008-0033
75. Legeza B, Marcolongo P, Gamberucci A, Varga V, Bánhegyi G, Benedetti A, Odermatt A (2017) Fructose, Glucocorticoids and Adipose Tissue: Implications for the Metabolic Syndrome. *Nutrients* 9(5). doi:10.3390/nu9050426

76. Bergheim I, Weber S, Vos M, Krämer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC (2008) Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol* 48(6):983–992. doi:10.1016/j.jhep.2008.01.035
77. Marek G, Pannu V, Shanmugham P, Pancione B, Mascia D, Crosson S, Ishimoto T, Sautin YY (2015) Adiponectin resistance and proinflammatory changes in the visceral adipose tissue induced by fructose consumption via ketohexokinase-dependent pathway. *Diabetes* 64(2):508–518. doi:10.2337/db14-0411
78. Welsh JA, Sharma A, Abramson JL, Vaccarino V, Gillespie C, Vos MB (2010) Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA* 303(15):1490–1497. doi:10.1001/jama.2010.449
79. Basu S, Yoffe P, Hills N, Lustig RH (2013) The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS ONE* 8(2):e57873. doi:10.1371/journal.pone.0057873
80. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ, Abdelmalek MF (2008) Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 48(6):993–999. doi:10.1016/j.jhep.2008.02.011
81. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76(5):911–922. doi:10.1093/ajcn/76.5.911
82. Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I (2012) Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest* 92(7):1020–1032. doi:10.1038/labinvest.2012.75
83. Nier A, Brandt A, Conzelmann IB, Özel Y, Bergheim I (2018) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Overweight Children: Role of Fructose Intake and Dietary Pattern. *Nutrients* 10(9):1329. doi:10.3390/nu10091329
84. Kawabata K, Kanmura S, Morinaga Y, Tanaka A, Makino T, Fujita T, Arima S, Sasaki F, Nasu Y, Tanoue S, Hashimoto S, Ido A (2019) A high-fructose diet induces epithelial barrier dysfunction and exacerbates the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int J Mol Med* 43(3):1487–1496. doi:10.3892/ijmm.2018.4040
85. Do MH, Lee E, Oh M-J, Kim Y, Park H-Y (2018) High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* 10(6). doi:10.3390/nu10060761
86. Seki K, Kitade M, Nishimura N, Kaji K, Asada K, Namisaki T, Moriya K, Kawaratani H, Okura Y, Takaya H, Sawada Y, Sato S, Nakanishi K, Yoshiji H (2018) Oral administration of fructose exacerbates liver fibrosis and hepatocarcinogenesis via increased intestinal permeability in a rat steatohepatitis model. *Oncotarget* 9(47):28638–28651. doi:10.18632/oncotarget.25587
87. Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaff MJ, Wehkamp J, Bischoff SC (2017) Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-

- Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *J Nutr* 147(5):770–780. doi:10.3945/jn.116.242859
88. Li J-M, Yu R, Zhang L-P, Wen S-Y, Wang S-J, Zhang X-Y, Xu Q, Kong L-D (2019) Dietary fructose-induced gut dysbiosis promotes mouse hippocampal neuroinflammation: a benefit of short-chain fatty acids. *Microbiome* 7(1):98. doi:10.1186/s40168-019-0713-7
89. Nier A, Brandt A, Rajcic D, Bruns T, Bergheim I (2019) Short-Term Isocaloric Intake of a Fructose- but not Glucose-Rich Diet Affects Bacterial Endotoxin Concentrations and Markers of Metabolic Health in Normal Weight Healthy Subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* 63(6):e1800868. doi:10.1002/mnfr.201800868
90. Spruss A, Bergheim I (2009) Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 20(9):657–662. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.05.006
91. Cho Y-E, Kim D-K, Seo W, Gao B, Yoo S-H, Song B-J (2021) Fructose Promotes Leaky Gut, Endotoxemia, and Liver Fibrosis Through Ethanol-Inducible Cytochrome P450-2E1-Mediated Oxidative and Nitrative Stress. *Hepatology* 73(6):2180–2195. doi:10.1002/hep.30652
92. Kuzma JN, Cromer G, Hagman DK, Breymer KL, Roth CL, Foster-Schubert KE, Holte SE, Weigle DS, Kratz M (2016) No differential effect of beverages sweetened with fructose, high-fructose corn syrup, or glucose on systemic or adipose tissue inflammation in normal-weight to obese adults: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 104(2):306–314. doi:10.3945/ajcn.115.129650
93. Zhang J, Chen Z, Huang X, Shi W, Zhang R, Chen M, Huang H, Wu L (2019) Insights on the Multifunctional Activities of Magnolol. *Biomed Res Int* 2019:1847130. doi:10.1155/2019/1847130
94. Rempel V, Fuchs A, Hinz S, Karcz T, Lehr M, Koetter U, Müller CE (2013) Magnolia Extract, Magnolol, and Metabolites: Activation of Cannabinoid CB2 Receptors and Blockade of the Related GPR55. *ACS Med. Chem. Lett.* 4(1):41–45. doi:10.1021/ml300235q
95. Reddy RC, Keshamouni VG, Jaigirdar SH, Zeng X, Leff T, Thannickal VJ, Standiford TJ (2004) Deactivation of murine alveolar macrophages by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(3):L613-9. doi:10.1152/ajplung.00206.2003
96. Shen P, Zhang Z, He Y, Gu C, Zhu K, Li S, Li Y, Lu X, Liu J, Zhang N, Cao Y (2018) Magnolol treatment attenuates dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis by regulating inflammation and mucosal damage. *Life Sciences* 196:69–76. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.016
97. Lu S-H, Hsu W-L, Chen T-H, Chou T-C (2015) Activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway involves the anti-inflammatory activity of magnolol in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated mouse RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 29(2):770–778. doi:10.1016/j.intimp.2015.08.042

98. Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J, Park D (2004) In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. *Eur J Pharmacol* 496(1-3):189–195. doi:10.1016/j.ejphar.2004.05.047
99. Dong J, Ding H, Liu Y, Yang Q, Xu N, Yang Y, Ai X (2017) Magnolol protects channel catfish from *Aeromonas hydrophila* infection via inhibiting the expression of aerolysin. *Veterinary Microbiology* 211:119–123. doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.005
100. Sakaue Y, Domon H, Oda M, Takenaka S, Kubo M, Fukuyama Y, Okiji T, Terao Y (2016) Anti-biofilm and bactericidal effects of magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol* 60(1):10–16. doi:10.1111/1348-0421.12343
101. Chen J-H, Kuo H-C, Lee K-F, Tsai T-H (2014) Magnolol protects neurons against ischemia injury via the downregulation of p38/MAPK, CHOP and nitrotyrosine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 279(3):294–302. doi:10.1016/j.taap.2014.07.005
102. Parray HA, Lone J, Park JP, Choi JW, Yun JW (2018) Magnolol promotes thermogenesis and attenuates oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition* 50:82–90. doi:10.1016/j.nut.2018.01.017
103. Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, Ferrara N (2013) Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* 120(1):106–114. doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.038
104. Yang B, Xu Y, Yu S, Huang Y, Lu L, Liang X (2016) Anti-angiogenic and anti-inflammatory effect of Magnolol in the oxygen-induced retinopathy model. *Inflamm. Res.* 65(1):81–93. doi:10.1007/s00011-015-0894-x
105. Cheng Y-C, Hueng D-Y, Huang H-Y, Chen J-Y, Chen Y (2016) Magnolol and honokiol exert a synergistic anti-tumor effect through autophagy and apoptosis in human glioblastomas. *Oncotarget* 7(20):29116–29130. doi:10.18632/oncotarget.8674
106. McKeown BT, McDougall L, Catalli A, Hurta RAR (2014) Magnolol causes alterations in the cell cycle in androgen insensitive human prostate cancer cells in vitro by affecting expression of key cell cycle regulatory proteins. *Nutrition and Cancer* 66(7):1154–1164. doi:10.1080/01635581.2014.951736
107. Weng C-C, Chen Z-A, Chao K-T, Ee T-W, Lin K-J, Chan M-H, Hsiao I-T, Yen T-C, Kung M-P, Hsu C-H, Wey S-P (2017) Quantitative analysis of the therapeutic effect of magnolol on MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease using in vivo 18F-9-fluoropropyl-(+)-dihydrotrabenazine PET imaging. *PLoS ONE* 12(3):e0173503. doi:10.1371/journal.pone.0173503
108. Guo C, Ma L, Zhao Y, Peng A, Cheng B, Zhou Q, Zheng L, Huang K (2015) Inhibitory effects of magnolol and honokiol on human calcitonin aggregation. *Sci Rep* 5:13556. doi:10.1038/srep13556
109. Liang X, Xing W, He J, Fu F, Zhang W, Su F, Liu F, Ji L, Gao F, Su H, Sun X, Zhang H (2015) Magnolol administration in normotensive young spontaneously hypertensive rats

- postpones the development of hypertension: role of increased PPAR gamma, reduced TRB3 and resultant alleviative vascular insulin resistance. *PLoS ONE* 10(3):e0120366. doi:10.1371/journal.pone.0120366
110. Karki R, Ho O-M, Kim D-W (2013) Magnolol attenuates neointima formation by inducing cell cycle arrest via inhibition of ERK1/2 and NF-kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830(3):2619–2628. doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.015
111. Chen J-S, Chen Y-L, Greenberg AS, Chen Y-J, Wang S-M (2005) Magnolol stimulates lipolysis in lipid-laden RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 94(5):1028–1037. doi:10.1002/jcb.20361
112. Chang C-K, Lin X-R, Lin Y-L, Fang W-H, Lin S-W, Chang S-Y, Kao J-T (2018) Magnolol-mediated regulation of plasma triglyceride through affecting lipoprotein lipase activity in apolipoprotein A5 knock-in mice. *PLoS ONE* 13(2):e0192740. doi:10.1371/journal.pone.0192740
113. Lin M-H, Chen M-C, Chen T-H, Chang H-Y, Chou T-C (2015) Magnolol ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through PPAR- $\gamma$ -dependent inhibition of NF-kB activation. *International Immunopharmacology* 28(1):270–278. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.051
114. Zhao L, Xiao H-T, Mu H-X, Huang T, Lin Z-S, Zhong LLD, Zeng G-Z, Fan B-M, Lin C-Y, Bian Z-X (2017) Magnolol, a Natural Polyphenol, Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Molecules* 22(7). doi:10.3390/molecules22071218
115. Miao B, Zhang S, Wang H, Yang T, Zhou D, Wang B (2013) Magnolol pretreatment prevents sepsis-induced intestinal dysmotility by maintaining functional interstitial cells of Cajal. *Inflammation* 36(4):897–906. doi:10.1007/s10753-013-9617-z
116. Choi S-S, Cha B-Y, Lee Y-S, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo J-T (2009) Magnolol enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Life Sciences* 84(25-26):908–914. doi:10.1016/j.lfs.2009.04.001
117. Pulvirenti L, Muccilli V, Cardullo N, Spatafora C, Tringali C (2017) Chemoenzymatic Synthesis and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of Dimeric Neolignans Inspired by Magnolol. *J. Nat. Prod.* 80(5):1648–1657. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00250
118. Fakhrudin N, Ladurner A, Atanasov AG, Heiss EH, Baumgartner L, Markt P, Schuster D, Ellmerer EP, Wolber G, Rollinger JM, Stuppner H, Dirsch VM (2010) Computer-aided discovery, validation, and mechanistic characterization of novel neolignan activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Pharmacol* 77(4):559–566. doi:10.1124/mol.109.062141
119. Lee J-H, Jung JY, Jang EJ, Jegal KH, Moon SY, Ku SK, Kang SH, Cho IJ, Park SJ, Lee JR, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW (2015) Combination of honokiol and magnolol inhibits hepatic steatosis through AMPK-SREBP-1 c pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* 240(4):508–518. doi:10.1177/1535370214547123

120. Tian Y, Feng H, Han L, Wu L, Lv H, Shen B, Li Z, Zhang Q, Liu G (2018) Magnolol Alleviates Inflammatory Responses and Lipid Accumulation by AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Activation. *Front. Immunol.* 9:147. doi:10.3389/fimmu.2018.00147
121. Suh KS, Chon S, Jung W-W, Choi EM (2017) Magnolol protects pancreatic  $\beta$ -cells against methylglyoxal-induced cellular dysfunction. *Chemico-Biological Interactions* 277:101–109. doi:10.1016/j.cbi.2017.09.014
122. Sheng Y-L, Xu J-H, Shi C-H, Li W, Xu H-Y, Li N, Zhao Y-Q, Zhang X-R (2014) UPLC-MS/MS-ESI assay for simultaneous determination of magnolol and honokiol in rat plasma: application to pharmacokinetic study after administration emulsion of the isomer. *J Ethnopharmacol* 155(3):1568–1574. doi:10.1016/j.jep.2014.07.052
123. Lin S-P, Tsai S-Y, Lee Chao P-D, Chen Y-C, Hou Y-C (2011) Pharmacokinetics, bioavailability, and tissue distribution of magnolol following single and repeated dosing of magnolol to rats. *Planta Med* 77(16):1800–1805. doi:10.1055/s-0030-1271159
124. Herman MA, Samuel VT (2016) The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol Metab* 27(10):719–730. doi:10.1016/j.tem.2016.06.005
125. Deng Y, Han X, Tang S, Li C, Xiao W, Tan Z (2018) Magnolol and Honokiol Attenuate Apoptosis of Enterotoxigenic Escherichia Coli-Induced Intestinal Epithelium by Maintaining Secretion and Absorption Homeostasis and Protecting Mucosal Integrity. *Med Sci Monit* 24:3348–3356. doi:10.12659/MSM.910350
126. Xia T, Zhang J, Han L, Jin Z, Wang J, Li X, Man S, Liu C, Gao W (2019) Protective effect of magnolol on oxaliplatin-induced intestinal injury in mice. *Phytother Res* 33(4):1161–1172. doi:10.1002/ptr.6311
127. Wilson TH, Wiseman G (1954) The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol* 123(1):116–125. doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005036
128. Hamilton KL, Butt AG (2013) Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *Advances in Physiology Education* 37(4):415–426. doi:10.1152/advan.00017.2013
129. Rajcic D, Baumann A, Hernández-Arriaga A, Brandt A, Nier A, Jin CJ, Sánchez V, Jung F, Camarinha-Silva A, Bergheim I (2021) Citrulline supplementation attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in female mice through mechanisms involving intestinal arginase. *Redox Biol* 41:101879. doi:10.1016/j.redox.2021.101879
130. Hayashi M, Hirose H, Senga S, Onitsuka A, Fuwa S, Mori Y, Yamada T (2000) Effect of portal hypertension caused by chronic high venous pressure on small-intestinal sugar absorption. *Nutrition* 16(1):30–33. doi:10.1016/S0899-9007(99)00187-2
131. Kiszonas AM, Courtin CM, Morris CF (2012) A Critical Assessment of the Quantification of Wheat Grain Arabinoxylans Using a Phloroglucinol Colorimetric Assay. *Cereal Chemistry Journal* 89(3):143–150. doi:10.1094/CCHEM-02-12-0016-R

132. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods* 174(1-2):231–235. doi:10.1016/0022-1759(94)90027-2
133. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
134. Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63(1):175–195. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.001135
135. Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12(1):426–428. doi:10.1002/cber.187901201117
136. Saklayen MG (2018) The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 20(2):12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
137. Alberti K, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 15(7):539–553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
138. Lambertz J, Weiskirchen S, Landert S, Weiskirchen R (2017) Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol* 8:1159. doi:10.3389/fimmu.2017.01159
139. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ (2016) Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 65(2):425–443. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.005
140. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64(1):73–84. doi:10.1002/hep.28431
141. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E (2018) Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(1):11–20. doi:10.1038/nrgastro.2017.109
142. Saffouri GB, Shields-Cutler RR, Chen J, Yang Y, Lekatz HR, Hale VL, Cho JM, Battaglioli EJ, Bhattarai Y, Thompson KJ, Kalari KK, Behera G, Berry JC, Peters SA, Patel R, Schuetz AN, Faith JJ, Camilleri M, Sonnenburg JL, Farrugia G, Swann JR, Grover M, Knights D, Kashyap PC (2019) Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders. *Nat Commun* 10(1):2012. doi:10.1038/s41467-019-09964-7
143. Xue L, He J, Gao N, Lu X, Li M, Wu X, Liu Z, Jin Y, Liu J, Xu J, Geng Y (2017) Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. *Sci Rep* 7:45176. doi:10.1038/srep45176

144. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ (2006) A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290(3):F625-31. doi:10.1152/ajprenal.00140.2005
145. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray ID, Allard JP (2013) Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 58(1):120–127. doi:10.1002/hep.26319
146. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, Sarfati G, Nubret E, Kapel N, Waligora-Dupriet A-J, Bergheim I, Cynober L, De-Bandt J-P (2016) Effect of specific amino acids on hepatic lipid metabolism in fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr* 35(1):175–182. doi:10.1016/j.clnu.2015.01.021
147. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Volynets V, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I (2012) Toll-like receptors 1-9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *Br J Nutr* 107(12):1727–1738. doi:10.1017/S0007114511004983
148. Wei X, Song M, Yin X, Schuschke DA, Koo I, McClain CJ, Zhang X (2015) Effects of Dietary Different Doses of Copper and High Fructose Feeding on Rat Fecal Metabolome. *J. Proteome Res.* 14(9):4050–4058. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00596
149. Kavanagh K, Wylie AT, Tucker KL, Hamp TJ, Gharaibeh RZ, Fodor AA, Cullen JMC (2013) Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates. *The American Journal of Clinical Nutrition* 98(2):349–357. doi:10.3945/ajcn.112.057331
150. Jin R, Willment A, Patel SS, Sun X, Song M, Mannery YO, Kosters A, McClain CJ, Vos MB (2014) Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *International Journal of Hepatology* 2014:560620. doi:10.1155/2014/560620
151. Minicis S de, Rychlicki C, Agostinelli L, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Mingarelli E, Facinelli B, Magi G, Palmieri C, Marzioni M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G (2014) Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. *Hepatology* 59(5):1738–1749. doi:10.1002/hep.26695
152. Kawai T, Autieri MV, Scalia R (2021) Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 320(3):C375-C391. doi:10.1152/ajpcell.00379.2020
153. Barthe L, Woodley JF, Kenworthy S, Houin G (1998) An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 23(2):313–323. doi:10.1007/BF03189357
154. Alam MA, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM (2012) Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *J Pharm Pharmacol* 64(3):326–336. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x

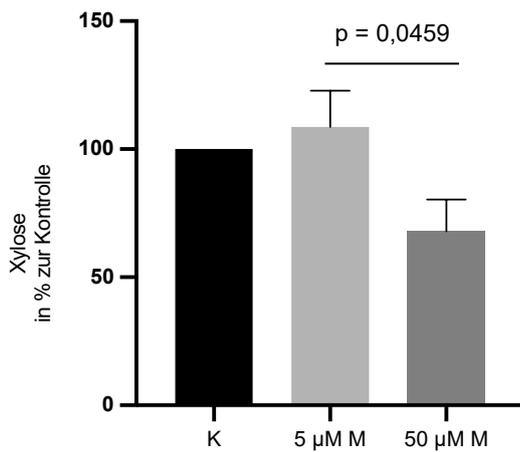
155. Lafforgue G, Arellano C, Vachoux C, Woodley J, Philibert C, Dupouy V, Bousquet-Mélou A, Gandia P, Houin G (2008) Oral absorption of ampicillin: role of paracellular route vs. PepT1 transporter. *Fundam Clin Pharmacol* 22(2):189–201. doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00572.x
156. Praveen V. Balimane, Saeho Chong, Richard A. Morrison (2000) Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption
157. Fujioka Y, Mizuno N, Morita E, Motozono H, Takahashi K, Yamanaka Y, Shinkuma D (1991) Effect of age on the gastrointestinal absorption of acyclovir in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43(7):465–469. doi:10.1111/j.2042-7158.1991.tb03515.x
158. Said HM, Sharifian A, Bagherzadeh A (1990) Transport of biotin in the ileum of suckling rats: characteristics and ontogeny. *Pediatr Res* 28(3):266–269. doi:10.1203/00006450-199009000-00023
159. Liu XD, Wang XL, Xie L, Wang GJ (2005) Different effect of erythromycin on absorption kinetics of nimodipine in male and female rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 30(1-2):69–73. doi:10.1007/BF03226410
160. Guo J, Ping Q, Jiang G, Dong J, Qi S, Feng L, Li Z, Li C (2004) Transport of leuprolide across rat intestine, rabbit intestine and Caco-2 cell monolayer. *International Journal of Pharmaceutics* 278(2):415–422. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.03.031
161. Quevedo MA, Briñón MC (2009) In vitro and in vivo pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Research* 83(2):103–111. doi:10.1016/j.antiviral.2009.03.010
162. Tian R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y (2002) Effects of grapefruit juice and orange juice on the intestinal efflux of P-glycoprotein substrates. *Pharmaceutical Research* 19(6):802–809. doi:10.1023/A:1016100715125
163. Tan T, Kuramoto M, Takahashi T, Nakamura H, Nakanishi Y, Imasato Y, Yoshimura H (1989) Characteristics of the gastrointestinal absorption of morphine in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 37(1):168–173. doi:10.1248/cpb.37.168
164. Chung YH, Nishigaki R, Iga T, Hanano M (1985) The mechanism of intestinal transport of sulfamethoxazole and the effect of chlorpromazine in rat everted intestine. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 8(2):142–149. doi:10.1248/bpb1978.8.142
165. ENDO T (1986) Gastrointestinal absorption of inorganic mercuric compounds in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 83(2):187–196. doi:10.1016/0041-008X(86)90295-4
166. Chan WY, Bates JM, Rennert OM, Mahmood A, Torres-Pinedo R (1984) Intestinal transport of manganese from human milk, bovine milk and infant formula in rats. *Life Sciences* 35(24):2415–2419. doi:10.1016/0024-3205(84)90449-1
167. Kleinow KM, Johnston BD, Holmes EP, McCarrol ME (2006) Rhodamine 123 permeability through the catfish intestinal wall: Relationship to thermal acclimation and acute temperature change. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144(3):205–215. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.007

168. Hauer-jensen M, Wilson HD, Schedl HP (1988) Morphological and functional recovery of rat small intestine following localized hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia* 4(5):527–535. doi:10.3109/02656738809027696
169. Suresh D, Srinivasan K (2007) Studies on the in vitro absorption of spice principles--curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food and Chemical Toxicology* 45(8):1437–1442. doi:10.1016/j.fct.2007.02.002
170. Yin J, Sheng B, Yang K, Sun L, Xiao W, Yang H (2019) The protective roles of NLRP6 in intestinal epithelial cells. *Cell Prolif* 52(2):e12555. doi:10.1111/cpr.12555
171. Forsyth CB, Voigt RM, Keshavarzian A (2014) Intestinal CYP2E1: A mediator of alcohol-induced gut leakiness. *Redox Biol* 3:40–46. doi:10.1016/j.redox.2014.10.002
172. Song B-J, Akbar M, Abdelmegeed MA, Byun K, Lee B, Yoon SK, Hardwick JP (2014) Mitochondrial dysfunction and tissue injury by alcohol, high fat, nonalcoholic substances and pathological conditions through post-translational protein modifications. *Redox Biol* 3:109–123. doi:10.1016/j.redox.2014.10.004
173. Cho Y-E, Yu L-R, Abdelmegeed MA, Yoo S-H, Song B-J (2018) Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury. *J Hepatol* 69(1):142–153. doi:10.1016/j.jhep.2018.02.005
174. Tian S, Guo R, Wei S, Kong Y, Wei X, Wang W, Shi X, Jiang H (2016) Curcumin protects against the intestinal ischemia-reperfusion injury: involvement of the tight junction protein ZO-1 and TNF- $\alpha$  related mechanism. *Korean J Physiol Pharmacol* 20(2):147–152. doi:10.4196/kjpp.2016.20.2.147
175. Chen F, Zhang H, Du E, Jin F, Zheng C, Fan Q, Zhao N, Guo W, Zhang W, Huang S, Wei J (2021) Effects of magnolol on egg production, egg quality, antioxidant capacity, and intestinal health of laying hens in the late phase of the laying cycle. *Poult Sci* 100(2):835–843. doi:10.1016/j.psj.2020.10.047
176. Hou Q, Huang Y, Wang Y, Liao L, Zhu Z, Zhang W, Liu Y, Li P, Chen X, Liu F (2020) *Lactobacillus casei* LC01 Regulates Intestinal Epithelial Permeability through miR-144 Targeting of OCLN and ZO1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30(10):1480–1487. doi:10.4014/jmb.2002.02059
177. Muscariello L, Siena B de, Marasco R (2020) *Lactobacillus* Cell Surface Proteins Involved in Interaction with Mucus and Extracellular Matrix Components. *Curr Microbiol* 77(12):3831–3841. doi:10.1007/s00284-020-02243-5
178. Chen F, Zhang H, Du E, Fan Q, Zhao N, Jin F, Zhang W, Guo W, Huang S, Wei J (2021) Supplemental magnolol or honokiol attenuates adverse effects in broilers infected with *Salmonella pullorum* by modulating mucosal gene expression and the gut microbiota. *J Anim Sci Biotechnol* 12(1):87. doi:10.1186/s40104-021-00611-0
179. Duan R-D (2018) Alkaline sphingomyelinase (NPP7) in hepatobiliary diseases: A field that needs to be closely studied. *WJH* 10(2):246–253. doi:10.4254/wjh.v10.i2.246

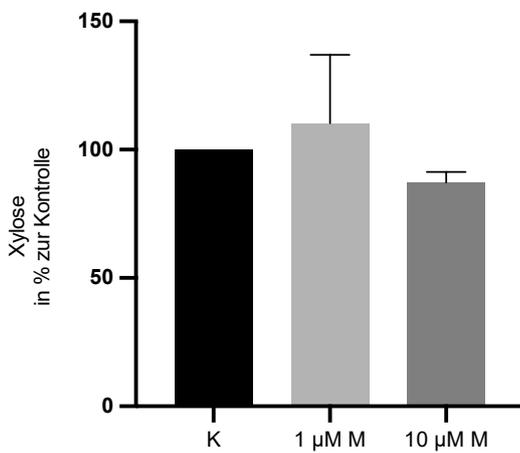
180. Huang F-C (2017) The Role of Sphingolipids on Innate Immunity to Intestinal Salmonella Infection. *Int J Mol Sci* 18(8):1720. doi:10.3390/ijms18081720
181. Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, Kroemer G (2018) Spermidine in health and disease. *Science* 359(6374):eaan2788. doi:10.1126/science.aan2788
182. Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5(8):641–654. doi:10.1038/nri1668
183. Carriche GM, Almeida L, Stüve P, Velasquez L, Dhillon-LaBrooy A, Roy U, Lindenberg M, Strowig T, Plaza-Sirvent C, Schmitz I, Lochner M, Simon AK, Sparwasser T (2021) Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine. *J Allergy Clin Immunol* 147(1):335-348.e11. doi:10.1016/j.jaci.2020.04.037
184. Bekebrede AF, Keijer J, Gerrits WJJ, Boer VCJ de (2020) The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients* 12(1). doi:10.3390/nu12010197
185. Ma L, Ni Y, Wang Z, Tu W, Ni L, Zhuge F, Zheng A, Hu L, Zhao Y, Zheng L, Fu Z (2020) Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice. *Gut Microbes* 12(1):1–19. doi:10.1080/19490976.2020.1832857
186. Kövamees O, Shemyakin A, Pernow J (2016) Amino acid metabolism reflecting arginase activity is increased in patients with type 2 diabetes and associated with endothelial dysfunction. *Diabetes and Vascular Disease Research* 13(5):354–360. doi:10.1177/1479164116643916
187. Lucas R, Yang G, Gorshkov BA, Zemskov EA, Sridhar S, Umapathy NS, Jezierska-Drutel A, Alieva IB, Leustik M, Hossain H, Fischer B, Catravas JD, Verin AD, Pittet J-F, Caldwell RB, Mitchell TJ, Cederbaum SD, Fulton DJ, Matthay MA, Caldwell RW, Romero MJ, Chakraborty T (2012) Protein kinase C- $\alpha$  and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47(4):445–453. doi:10.1165/rcmb.2011-0332OC
188. Badaut J, Copin J-C, Fukuda AM, Gasche Y, Schaller K, Da Silva RF (2012) Increase of arginase activity in old apolipoprotein-E deficient mice under Western diet associated with changes in neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 9(1):132. doi:10.1186/1742-2094-9-132
189. Wijnands KAP, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA, Poeze M (2012) Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS ONE* 7(5):e37439. doi:10.1371/journal.pone.0037439
190. Xu D-Z, Lu Q, Deitch EA (2002) Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 17(2):139–145. doi:10.1097/00024382-200202000-00010
191. Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL (2004) Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 21(3):261–270. doi:10.1097/01.shk.0000112346.38599.10

192. Lee K-E, Kang Y-S (2018) L-Citrulline restores nitric oxide level and cellular uptake at the brain capillary endothelial cell line (TR-BBB cells) with glutamate cytotoxicity. *Microvascular Research* 120:29–35. doi:10.1016/j.mvr.2018.05.010
193. Durante W, Johnson FK, Johnson RA (2007) Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(9):906–911. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x
194. Mu K, Yu S, Kitts DD (2019) The Role of Nitric Oxide in Regulating Intestinal Redox Status and Intestinal Epithelial Cell Functionality. *Int J Mol Sci* 20(7). doi:10.3390/ijms20071755
195. Wang X, Zhang C, Zheng M, Gao F, Zhang J, Liu F (2019) Metabolomics Analysis of L-Arginine Induced Gastrointestinal Motility Disorder in Rats Using UPLC-MS After Magnolol Treatment. *Front. Pharmacol.* 10:183. doi:10.3389/fphar.2019.00183
196. Hu Z-C, Luo Z-C, Jiang B-J, Fu X, Xuan J-W, Li X-B, Bian Y-J, Ni W-F, Xue J-X (2019) The Protective Effect of Magnolol in Osteoarthritis: In vitro and in vivo Studies. *Front Pharmacol* 10:393. doi:10.3389/fphar.2019.00393
197. Xia T, Zhang J, Han L, Jin Z, Wang J, Li X, Man S, Liu C, Gao W (2019) Protective effect of magnolol on oxaliplatin-induced intestinal injury in mice. *Phytother Res* 33(4):1161–1172. doi:10.1002/ptr.6311

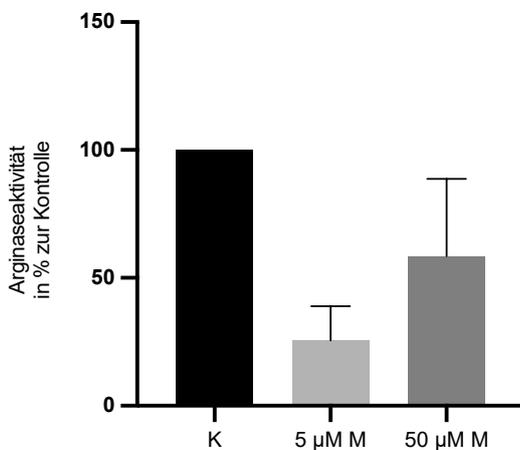
## Anhang



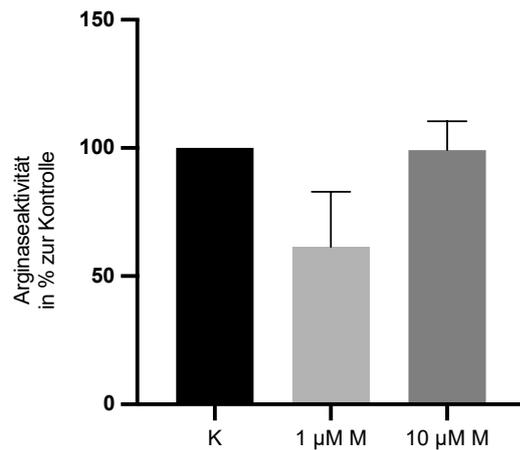
**Abbildung 13: Einfluss von 5 und 50 µM Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=4-5. K: Kontrolle; M: Magnolol



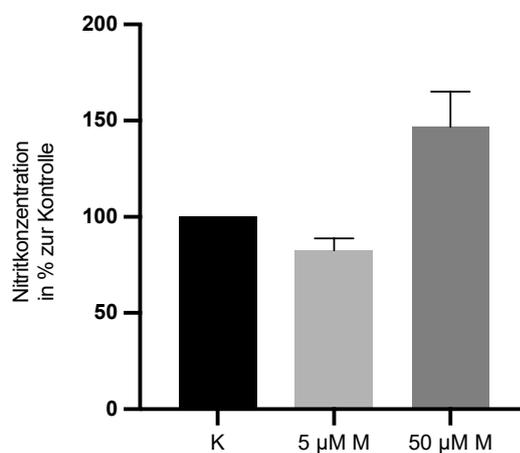
**Abbildung 14: Einfluss von 1 und 10 µM Magnolol auf die Permeation von Xylose in Everted Sacs des Dünndarms.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=3-4. K: Kontrolle; M: Magnolol



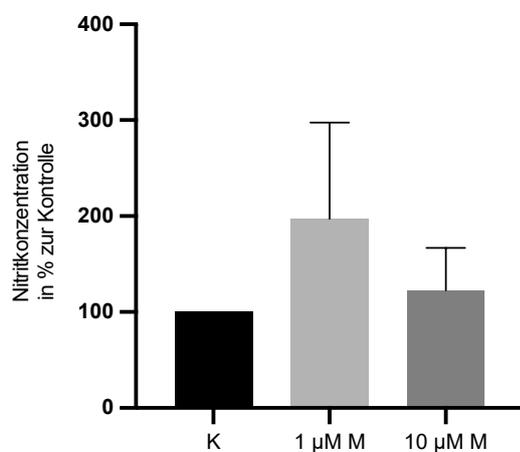
**Abbildung 15: Einfluss von 5 und 50 µM Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=3. K: Kontrolle; M: Magnolol



**Abbildung 16: Einfluss von 1 und 10 µM Magnolol auf die Arginaseaktivität in Everted Sacs des Dünndarms.** Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=3-4. K: Kontrolle; M: Magnolol



**Abbildung 17: Einfluss von 5 und 50 µM Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm.** Die Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=4-5. K: Kontrolle; M: Magnolol



**Abbildung 18: Einfluss von 1 und 10 µM Magnolol auf die Nitritkonzentration in Everted Sacs aus Dünndarm.** Die Werte sind dargestellt als MW ± SEM, n=3. K: Kontrolle; M: Magnolol