

**Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Ernährungsbasierte Modulation
der Kolon-Kanzerogenese *in vivo***

**Habilitationsschrift zur Erlangung der
Venia legendi
für das Fachgebiet Lebensmitteltoxikologie
an der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Dr. med. vet. Stephan Wilhelm Barth
aus Gevelsberg**

Hannover 2011

„An apple a day - is not enough“

(Taylor Mali)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen..... | VII |
| Liste der Publikationen, die Bestandteil der Habilitationsschrift sind..... | VIII |
| 1 EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Das Kolorektalkarzinom | 9 |
| 1.1.1 Chemisch induzierte Kolon-Kanzerogenese | 11 |
| 1.1.2 Mechanismen der Chemoprävention | 14 |
| 2 ERNÄHRUNGSBASIERTE MODULATION DER KOLON-KANZEROGENESE | 17 |
| 2.1 Bioaktivität von Obst und Gemüse | 17 |
| 2.1.1 Eigene humane Interventionsstudie..... | 19 |
| 2.2 Chemoprävention durch Apfelinhaltsstoffe | 21 |
| 2.2.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen | 23 |
| 2.3 Einfluss von Adipositas auf das Kolorektalkarzinom..... | 29 |
| 2.3.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen | 31 |
| 2.4 Chemoprävention durch Apfelinhaltsstoffe bei Adipositas | 37 |
| 2.4.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen | 37 |
| 2.4.2 Eigene humane Interventionsstudie..... | 40 |
| 3 ZUSAMMENFASSUNG | 46 |
| SUMMARY | 50 |
| 4 EIGENER ANTEIL AN DEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN | 53 |
| 5 LITERATURVERZEICHNIS | 56 |
| 6 PUBLIKATIONEN | 71 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------|--|
| AC | Aberrante Krypte |
| ACF | Aberrante Krypt Foci |
| AOM | Azoxymethan |
| BMI | Body Mass Index |
| BrdU | Bromodeoxyuridin |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CYP2E1 | Cytochrom-P-450 Isoform 2E1 |
| DMAB | 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl |
| DMH | 1,2-Dimethylhydrazin |
| EPIC | European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study |
| FABP | Fatty Acid-Binding Protein |
| FRAP | Ferric Reducing Activity of Plasma |
| HbA1c | Hämoglobin A1c |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| ICAM | Intercellular Adhesion Molecule |
| IGF-1 | Insulin-like Growth Factor-1 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| INSIG2 | Insulin-Induced Gene-2 |
| IQ | 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolin |
| KA | klarer Apfelsaft |
| KONT | isokalisches Kontrollgetränk |
| KRK | Kolorektalkarzinom |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| MAM | Methylazoxymethanol |
| MDA | Malondialdehyd |
| MNNG | <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin |
| MNU | <i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosoharnstoff |
| N⁷-MeG | 7- <i>N</i> -Methylguanin |
| NaCl | Natriumchlorid |

| | |
|--------------------------------|---|
| O⁶-MeG | 6-O-Methylguanin |
| ORAC | Oxygen Radical Absorbance Capacity |
| PAI | Plasminogen Activator Inhibitor |
| PGC1 | Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma Coactivator 1 |
| PhIP | 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin |
| PP | Polyphenol-Fraktion |
| PPARγ | Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| TA | naturtrüber Apfelsaft |
| TNF-α | Tumor Necrosis Factor alpha |
| TrS | Trubstoff-Fraktion |
| UCP | Uncoupling Protein |
| VCAM | Vascular Adhesion Molecule |
| W | Trinkwasser |

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

| | | |
|--------------|---|-----------|
| Abb.1 | Mechanismen der Kanzerogenese und der Chemoprävention | 11 |
| Abb.2 | Mikroskopische Darstellung der Kolonmukosa und aberranter Krypt Foci | 14 |

VERZEICHNIS DER TABELLEN

| | | |
|--------------|--|-----------|
| Tab.1 | Chemopräventive Wirkung durch Apfel(-Inhaltsstoffe) <i>in vitro</i> | 23 |
| Tab.2 | Regressionsanalysen | 34 |

LISTE DER PUBLIKATIONEN, DIE BESTANDTEIL DER HABILITATIONSSCHRIFT SIND:

- 1** **Barth SW**, Koch TCL, Watzl B, Dietrich H, Will F, Bub A (2011) Moderate effects of apple juice consumption on obesity related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. *Eur J Nutr* (epub ahead of print).
- 2** Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Fährndrich C, Bub A, Rechkemmer G, **Barth SW** (2009) Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: Impact of juice constituents and obesity. *Mol Nutr Food Res* 53: 1289-1302.
- 3** Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Bub A, **Barth SW** (2008) Obesity-related promotion of aberrant crypt foci in DMH-treated obese Zucker rats correlates with dyslipidemia rather than hyperinsulinemia. *Eur J Nutr* 47: 161-170.
- 4** **Barth SW**, Fährndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J Agric Food Chem* 55: 1181-1187.
- 5** Watzl B, Kulling SE, Möseneder J, **Barth SW**, Bub A (2005) A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am J Clin Nutr* 82: 1052-1058.
- 6** **Barth SW**, Fährndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G (2005) Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 26: 1414-1421.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Kolorektalkarzinom

Eine aktuelle Auswertung der nationalen Krebsregister aus 40 europäischen Ländern belegt, dass in Europa das **Kolorektalkarzinom** (KRK) mit 436.000 Neuerkrankungen pro Jahr (D: 70.000) **die häufigste Krebsart** bei Männern und Frauen ist [Ferlay et al. 2010]. Das KRK hat somit den Brustkrebs bezüglich der Rate der jährlichen Neuerkrankungen seit 2006 überholt [Ferlay et al. 2007], während KRK europaweit mit jährlich über 200.000 Todesfällen (D: 27.600) die zweithäufigste krebbedingte Todesursache hinter Lungenkrebs bleibt [Ferlay et al. 2010].

Derzeit wird geschätzt, dass zwar bis zu 35% aller KRK-Erkrankungen aus einer familiären Prädisposition entspringen, allerdings nur 6% aller KRK-Fälle einem eindeutig identifizierten, genetischen Syndrom zugeordnet werden können [Gallagher et al. 2011]. Hiervon abgeleitet wird somit die Mehrzahl aller KRK-Erkrankungsfälle unter dem komplexen Einfluss von **Lebensstilfaktoren wie Ernährung**, Bewegung, Rauchen, Alkohol, Übergewicht sowie Umweltfaktoren und Infektionen initiiert [American Cancer Society 2012; Gallagher et al. 2011; Annand et al. 2008]. Den Veränderungen des Lebensstils wird folglich ein hohes Potenzial zugesprochen, das Krebsrisiko maßgeblich positiv wie auch negativ zu beeinflussen [Khan et al. 2010; WCRF/AIRC 2007].

Ergebnisse aus Humanstudien, die die Prävention des KRK durch die Zufuhr einzelner Nahrungsinhaltsstoffe oder den Einfluss komplexer Ernährungsmuster auf die Kolonkanzerogenese direkt untersucht haben, liegen jedoch bislang nur begrenzt vor. Einerseits hängt dies mit dem experimentell schwer erfaß- und kontrollierbaren, multifaktoriellen Zusammenspiel der o.a. Faktoren in Wechselwirkung mit dem heterogenen genetischen Hintergrund zusammen. Andererseits liegt dies auch an der diagnostisch schlechten Zugänglichkeit des

Kolons und der teils klinisch latenten, mehrstufigen Pathogenese des KRK über einen jahrzehntelangen Zeitraum.

Nach dem Modell von Vogelstein und Kinzler [1993] ist die Krebsentstehung im Kolon ein mehrstufiger Prozess, der in die Phasen der **Initiation, Promotion und Progression** eingeteilt werden kann und durch ein zunehmendes malignes Potenzial der Krebs-(Vor)Stufen gekennzeichnet ist (**Abbildung 1**, links/Mitte). Im Verlauf dieses Prozesses entsteht durch die progressive Akkumulation genetischer Veränderungen ein selektiver Wachstumsvorteil für die betroffenen Kolonzellen. Diese können sich durch Hyperproliferation soweit klonal vervielfältigen, dass sich über hyperplastische Veränderungen und präneoplastische Dysplasien, sog. **Aberrante Krypt Foci** (ACF), und Adenomstadien ein Karzinom entwickeln kann.

Kolonkarzinomzellen zeichnen sich durch eine gesteigerte Proliferations- und eine verminderte Apoptoserate aus, was meist durch mutationsbedingte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und einer Aktivierung von Proto-Onkogenen verursacht wird [Pappou 2010]. Eher unwahrscheinlich ist dabei, dass nur eine einzelne Punktmutation die Kanzerogenese maßgeblich auslöst und den Prozess bis zur Ausbildung eines Karzinoms vorantreibt. Vielmehr wird eine ganze Kaskade an Mutationen im Verlauf der mehrstufigen Pathogenese beschrieben [Strachan und Read 1999], was letztlich neben der progressiven Hyperproliferation und weiter fortschreitenden Fehlregulation der Zellteilung und des Zellwachstums in Spätstadien auch die Metastasierung sowie die Angiogenese unterstützt.

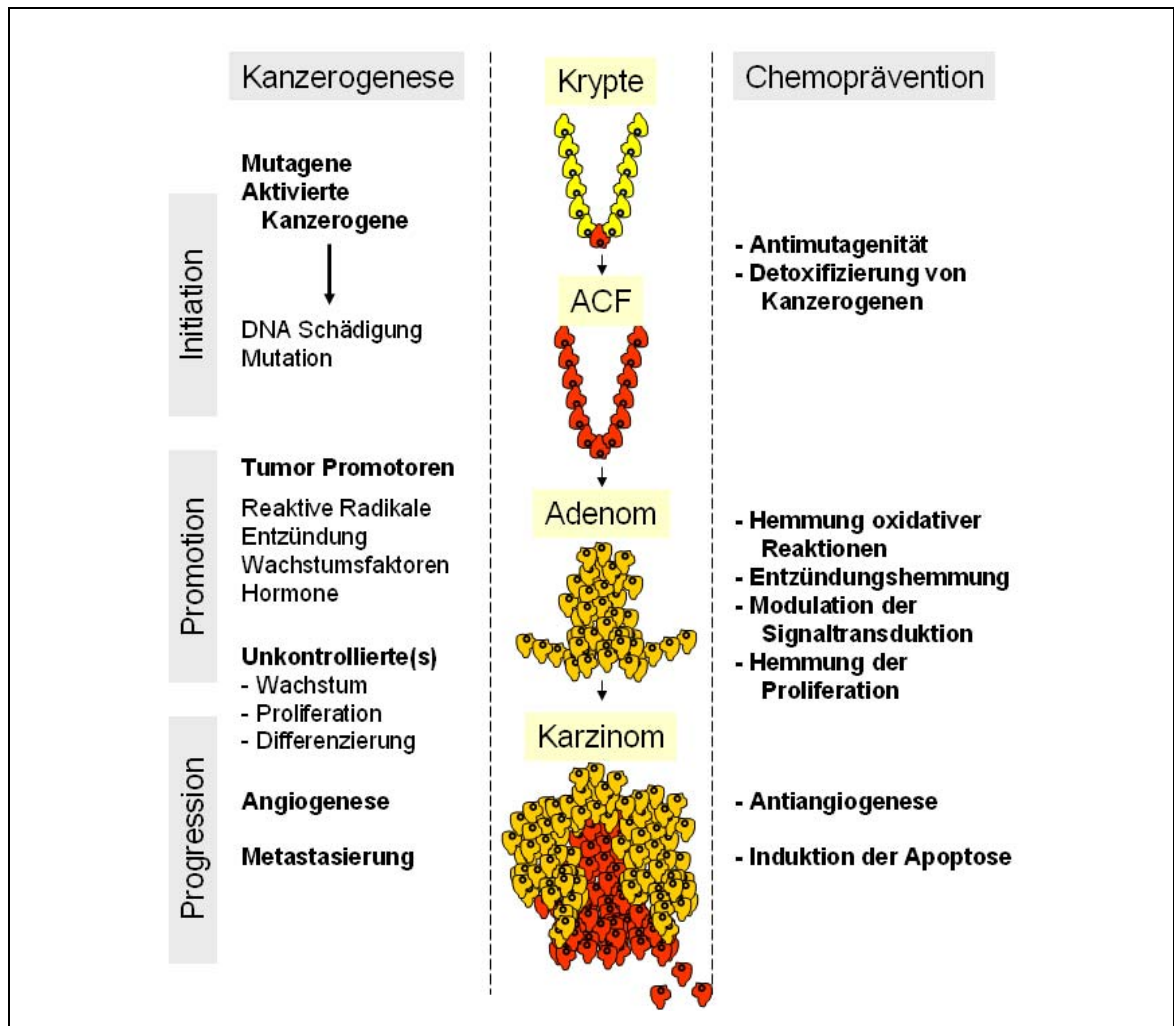


Abbildung 1: Grafische Darstellung: Mechanismen der Kanzerogenese (**links**) und der Chemoprävention (**rechts**). In der **Mitte** ist grafisch die Sequenz der morphologischen Veränderungen von einer initiierten Krypte über die Entstehung aberranter Krypt Foci (ACF) und Adenome bis zu metastasierenden Karzinomen dargestellt [modifiziert nach Gerhäuser 2008].

1.1.1 Chemisch induzierte Kolon-Kanzerogenese

Bereits im Jahr 1775 vermutete der englische Arzt Sir Percival Pott einen Zusammenhang zwischen Inhaltsstoffen in Rußpartikeln und dem Auftreten von Skrotalkarzinomen bei Schornsteinfegern [Lawley 1994]. Mittlerweile wird

geschätzt, dass etwa **90% aller Krebsfälle chemisch**, durch Inhaltsstoffe aus Zigaretten, Lebensmitteln oder der Umwelt, **induziert** werden [Doll und Peto 1981]. Auch für den Prozess der chemisch-induzierten Kanzerogenese ist beschrieben, dass die Tumorentstehung und -entwicklung in den bereits beschriebenen Phasen der Initiation, Promotion und Progression verläuft [Warren et al. 1996; Pitot 1989; Reddy et al. 1977; Bernblum und Shubik 1949] (**Abbildung 1**, links).

Während der **Initiation** sind die Zellen einem **kanzerogenen Agens** ausgesetzt, das erbgutschädigend wirkt und als initialer Stimulus für die Kanzerogenese gelten kann [Miller und Miller 1981]. Die Phase der Initiation ist irreversibel, führt bei exponierten Stammzellen auch bei einmaliger Exposition mit dem Agens unabhängig von der Höhe der Dosis zu einer DNA-Schädigung, die nach Zellteilung in Form von Mutationen in den Tochterzellen fest verankert bleiben kann. Betroffen sind durch diese mutagene oder DNA-Addukt-bildende Einwirkung chemischer Agentien häufig Genabschnitte in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, die im Rahmen der Zellzyklus-Kontrolle Zellwachstum, -teilung und -tod regulieren.

Tierexperimentell wurden bislang verschiedene Kanzerogene zur Initiation intestinaler Tumore eingesetzt. Hierzu gehören **1)** die Alkylnitrosamide *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (**MNNG**) [Schoental et al. 1969] und *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff (**MNU**) [Quin et al. 2000]; **2)** die heterozyklischen aromatischen Amine 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinolin (**IQ**) [Fujita 1999] und 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (**PhIP**) [Ito et al. 1991]; **3)** das aromatische Amin 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (**DMAB**) [Reddy et al. 1978].

Das im Labornager vorwiegend zur chemischen Induktion genutzte Kanzerogen ist **1,2-Dimethylhydrazin (DMH)** oder dessen Metabolit **Azoxymethan (AOM)** [Corpet und Tache 2002]. DMH ist ein sog. Prokanzerogen, das nicht als originäre Substanz, sondern erst durch endogene Metabolisierung, eine *N*-Oxidation und einen weiteren Hydroxylierungsschritt, im Organismus enzymatisch aktiviert wird [Weisburger und Fiala 1983]. Im Rahmen dieser endogenen Aktivierung wird DMH zunächst durch die hepatische Cytochrom P-

450 Isoform CYP2E1 als Enzym des Phase I Metabolismus in der Leber oder im Kolonepithel oxidiert und über die Zwischenstufe des AOM zu Methylazoxymethanol (MAM) umgewandelt. MAM besitzt unter physiologischen Bedingungen (37°C, neutraler pH-Wert) eine biologische Halbwertszeit von etwa 12 Stunden und gelangt nach hepatischer Aktivierung auch über den Blutstrom an das Kolonepithel. Es zerfällt unter Bildung eines **Alkyl-Radikals** [Nagasawa et al. 1972], das durch die katalytische Wirkung der Alkoholdehydrogenase im Kolonepithel freigesetzt wird [Sohn et al. 2001]. Dieses Alkyl-Radikal ist stark elektrophil und in der Lage, nukleäre DNA zu alkylieren [Herron und Shank 1982], was zur Bildung von 7-*N*-Methylguanin (N⁷-MeG) oder O⁶-MeG führt. Letzteres wird normalerweise von der 6-O-Methylguanin-DNA-Methyltransferase eliminiert [Pegg und Byers 1992]. Ist dies nicht der Fall, findet im Zuge der DNA-Replikation auf Grund der Strukturänderung eine Fehlpaarung des 6-O-Methylguanins mit Thymin statt, und es kommt daher zu einer GC → AT Transition. Somit wird die initiale Schädigung der Stammzellen in Form von DNA-Addukten in den Tochterzellen als Mutationen fixiert.

Krebsinduzierend wirkt DMH beim Labornager spezifisch im Kolon und ruft dort vergleichbare Läsionen hervor, wie sie im Verlauf der sporadischen Form der Kolon-Kanzerogenese beim Mensch entstehen [Pretlow et al. 1991; Druckrey 1970]. Dabei ähneln sich sowohl die Lokalisation der Läsionen im distalen Kolon als auch die Abfolge der pathologischen Ereignisse, ausgehend von der Bildung der ACF als präneoplastische Läsionen, die sich weiter zu Adenomen und Karzinomen entwickeln können [Mc Lellan et al. 1988; Bird et al. 1987; Weisburger und Fiala 1983] (**Abbildung 1**, Mitte). ACF zeichnen sich im Vergleich zu normalen Krypten durch ein vergrößertes und im Querschnitt teils ovales Kryptlumen sowie eine vergrößerte perikryptale Zone aus und können aus einer oder mehreren Krypten zusammengesetzt sein (**Abbildung 2** B,C). Letztere aus multiplen Krypten bestehende ACF haben ein im Vergleich zu einfachen ACF erhöhtes malignes Potenzial und besitzen somit als Frühmarker eines Karzinoms einen hohen prädiktiven Wert in der Auswertung

entsprechender Studien [Gupta und Schoen 2009; Raju 2008; Mori et al. 2005]. Anhand der deutlichen morphologischen Veränderungen der ACF lassen sich diese lichtmikroskopisch im Methylenblau-gefärbten Nativpräparat der Kolonschleimhaut einfach identifizieren. Um den Fortschritt der Kanzerogenese im Kolon zu beurteilen, werden im Rahmen einer herkömmlichen Auswertung der ACF nicht nur deren Anzahl, sondern auch deren Größe als Anzahl der aberranten Krypten (AC) pro ACF bestimmt [Mori et al. 2005] (**Abbildung 2**).

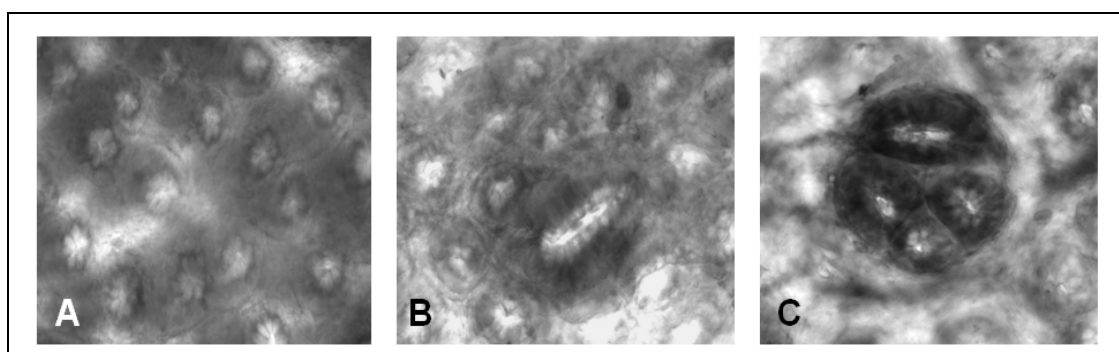


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Darstellungen: Normale Kolonschleimhaut (**A**), ein aus einer einzelnen (**B**) oder multiplen Krypten (**C**) bestehender aberranter Krypt Focus.

1.1.2 Mechanismen der Chemoprävention

Mittlerweile ist aus zahlreichen mechanistischen Untersuchungen bekannt, dass viele Inhaltsstoffe, die aus Obst und Gemüse isoliert wurden, in unterschiedlichen Testsystemen antimutagen, antioxidativ und entzündungshemmend wirken. Daraus wird insgesamt eine krebopräventive Wirkung abgeleitet [Pan et al. 2011, Beatty et al. 2000; Kelloff et al. 2000, Antony et al. 1999; Basile et al. 1999].

Die bereits für zahlreiche Lebensmittelinhaltsstoffe beschriebenen Wirkmechanismen bilden eine der Säulen des Konzeptes der sog. **Chemoprävention**. Diese ist nämlich *per definitionem* die Prävention, Inhibition oder Umkehr der Kanzerogenese durch die Zufuhr einer oder mehrerer chemischer Substanzen [Sporn 2011; Sporn und Newton 1979]. Der Einsatz chemopräventiver Substanzen verfolgt somit das Ziel, die maligne Transformation gesunder Zellen zu verhindern sowie den Prozess der Kanzerogenese zu verlangsamen, anzuhalten oder rückgängig zu machen. Chemoprävention kann mittels synthetischer Substanzen, wie sie z.B. in Arzneimitteln enthalten sind, aber auch in Form natürlicher **Lebensmittelinhaltsstoffe** als Teil der Ernährung realisiert werden [Ferguson 2010; Stoner et al. 1997].

Die **primäre Chemoprävention** zielt auf solche Mechanismen ab, die im Rahmen der **Initiation** insgesamt zu einer Anti-Mutagenese führen. Dazu gehören die durch chemopräventive Substanzen vermittelte Hemmung der Aufnahme der (Pro-)Kanzerogene sowie der Aktivierung von Pro-Kanzerogenen durch Phase I Enzyme (z.B. Cytochrom-P450 Isoenzyme) [Cabrera et al. 2010; Moon et al. 2006]. Ferner werden auch Mechanismen der Entgiftung und Ausscheidung beeinflusst. Dabei findet die Detoxifizierung durch Induktion sog. Phase II Enzyme (z.B. Glutathion-S-Transferasen) statt, die kovalente Bindungen polarer Gruppen an die Kanzerogene katalysieren und so zu einer Ausscheidung der dann wasserlöslichen Metabolite beitragen [Cabrera et al. 2010; Moon et al. 2006]. Darüber hinaus beeinflussen chemopräventiv wirksame Substanzen direkt die zellulären Mechanismen der DNA-Reparatur. Sie können somit zu einer schnellen Reparatur des initialen DNA-Schadens in Stammzellen beitragen [Shureiqi et al. 2000, Lee et al. 1999], ohne dass dieser im Rahmen der klonalen Zellteilung in Tochterzellen z.B. als Mutation fixiert werden kann (**Abbildung 1**, rechts oben).

Ergänzend zur antimutagenen Wirkung auf der Stufe der Initiation spielen **sekundär chemopräventive Substanzen** mit antiproliferativen und proapoptotischen Eigenschaften eine wichtige Rolle im Rahmen der

Chemoprävention in den Stadien der **Promotion und Progression** [Namasivayam 2011]. Neben der antioxidativen und entzündungshemmenden Wirkung durch Modulierung der Expression und Aktivität inflammatorischer und oxidativer Enzyme [Kundu und Surh 2005], führt die direkte Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionswege in transformierten Zellen zu einer Reduktion der Proliferation, des Zellwachstums sowie zur Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) [Alao 2007]. In fortgeschrittenen Stadien der Promotion und Progression können chemopräventiv wirksame Substanzen ferner die promovierende Wirkung endokriner Liganden abschwächen, indem sie auf der Ebene zellulärer Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Hormone sowie Rezeptor-abhängiger Signaltransduktionskaskaden wechselwirken. Ferner stellt die Induktion der Apoptose neben der Inhibition der Angiogenese den wichtigsten Mechanismus der Chemoprävention zur Verhinderung einer weiteren neoplastischen Transformation der Zellen sowie einer autonomen Blutversorgung des Tumorgewebes und Metastasierung am Ende der Progression dar [Steele und Kelloff 2005] (**Abbildung 1**, rechts Mitte und unten).

Bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe werden bezüglich ihrer chemopräventiven Eigenschaften der Gruppe der „**blocking agents**“ oder der „**suppressing agents**“ zugeordnet. Während Substanzen aus der ersten Gruppe auf der Stufe der Initiation bereits die primäre Schädigung modulieren, verhindern die „**suppressing agents**“ die weitere maligne Transformation bereits irreversibel initiiertes Zellen im Verlauf der Promotion und Progression. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass die Kombination von „**blocking agents**“ und „**suppressing agents**“ eine erheblich höhere chemopräventive Wirkung in Testsystemen als die Verabreichung der Einzelsubstanzen aufwies [Ip und Ganther 1991]. Dieses Phänomen der synergistischen Wirkung mehrerer Einzelsubstanzen in Bezug auf die chemopräventive Wirkung wurde bislang für die Kombination verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe sowie auch für die Kombination natürlicher mit synthetischen Substanzen gezeigt. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass das

chemopräventive Potenzial natürlicher Lebensmittel im Vergleich zu dem der jeweiligen Einzelsubstanzen erheblich höher sein könnte, da sie eine Vielzahl unterschiedlicher, zueinander additiv und/oder synergistisch sowie auch antagonistisch wirkender, sogenannter Bioaktivstoffe enthalten [Chachay et al. 2011; de Kok et al. 2011, 2008]. *Per definitionem* sind bioaktive Lebensmittelinhaltsstoffe solche Komponenten, die für den Menschen keinen nutritiven Nutzen haben, jedoch für eine Änderung des Gesundheitsstatus verantwortlich sein können [National Institutes of Health 2004]. Diese in Lebensmitteln enthaltene Bioaktivstoffe können einzeln oder in Kombination mit anderen Inhaltsstoffen eine gesundheitliche Wirkung besitzen. Durch diesen **kombinatorischen Effekt** vieler Inhaltsstoffe in Lebensmitteln, wie z.B. auch in Obst und/oder Gemüse, wären dann möglicherweise solche Nebenwirkungen auszuschließen, die bei eher hochdosierten Einzelsubstanzen auftreten könnten [Chachay et al. 2011; Omenn et al. 1996].

Zahlreiche populationsbasierte Studien deuten bereits darauf hin, dass der Verzehr komplexer Lebensmittel Mechanismen der Kanzerogenese modulieren können. Während **Obst und Gemüse** eine chemopräventive Wirkung besitzen können, wirkt z.B. eine hohe Aufnahme von tierischem Fett sowie eine daraus resultierende **Adipositas** eher krebsfördernd, wie in den folgenden Kapiteln zusammenfassend dargestellt wird.

2 ERNÄHRUNGSBASIERTE MODULATION DER KOLON-KANZEROGENESE

2.1 Bioaktivität von Obst und Gemüse

Die Auswertung von insgesamt 156 epidemiologischen Studien zeigte erstmals umfassend im Jahr 1992, dass ein hoher Verzehr von Obst und Gemüse das Erkrankungsrisiko für verschiedene Krebsarten halbieren kann [Block et al. 1992]. Dieses wurde auch nachfolgend im Jahr 1997 im Bericht des World Cancer Research Fund (WCRF) und des American Institute for Cancer Research (AICR) bestätigt. In der Neuauflage dieses Reports von 2007 wurde

hingegen die Evidenz für eine **Risikosenkung durch einen hohen Obst- und Gemüsekonsum** von „überzeugend“ [WCRF/AICR 1997] zu „wahrscheinlich“ [WCRF/AICR 2007] herabgestuft. Auch die Auswertung großer prospektiver Studien zeigte seither ein eher heterogenes Bild: Während Bingham et al. [2005] eine signifikante Reduktion des KRK-Risikos durch die Ballaststoffaufnahme über einen hohen Obst- und Gemüse-Verzehr nachweisen konnten, war dieser Effekt in anderen Studien nicht so deutlich [Gonzalez und Riboli 2010; Nomura et al. 2007] oder konnte nicht bestätigt werden [Park et al. 2007; Schatzkin et al. 2007]. Allerdings muss in diesem Kontext berücksichtigt werden, dass ein Großteil dieser Daten im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien retrospektiv ausgewertet wurden. Die zuverlässige Erhebung und valide Auswertung von Ernährungsdaten über einen großen Zeitraum ist sehr anfällig für Fehler. Daher sind prospektive Studien sowie humane Interventionsstudien zuverlässiger als Fall-Kontroll-Studien [Freedman 2011; Key 2011]. Trotzdem ist die Evidenz der gesundheitsfördernden Wirkung von Obst und Gemüse bei verschiedenen chronischen Erkrankungen nach wie vor unbestritten und bildet national wie international eine wichtige Grundlage für Ernährungsempfehlungen zur Prävention ernährungsmitbedingter Erkrankungen [Steffen 2006].

Interventionsstudien, die zuverlässig die Frage zur krebspräventiven Wirkung von Lebensmitteln/Lebensmittelinhaltsstoffen beim Menschen beantworten, sind jedoch nicht nur aus ethischen Gesichtspunkten, sondern auch wegen der schweren Zugänglichkeit von Biomarkern im Kolon schwierig durchführbar. Beim Menschen wirken in aller Regel endogene oder exogene (Pro-) Kanzerogene und Tumorpromotoren in sehr niedrigen Dosen und über einen lebenslangen Zeitraum. Außerdem führen genetische Polymorphismen sowie epigenetisch wirksame Umweltfaktoren zu einer heterogenen biologischen Antwort auf chemopräventiv wirksame Substanzen mit einer daraus resultierenden erheblichen inter-individuellen Varianz in den Messwerten. In letzter Konsequenz wären für einen „proof of evidence“ beim Menschen kontrollierte klinische Studien mit einem sehr großen Studien-Kollektiv über

einen mehrjährigen Zeitraum durchzuführen, was bislang für Obst und Gemüse noch nicht verwirklicht wurde. Alternativ geben jedoch auch über einen kurzen Zeitraum durchgeführte humane Interventionsstudien erste Hinweise darauf, ob bereits durch eine kurzzeitige Intervention bestimmte Zielparameter im Menschen beeinflusst werden können. Ferner lassen sog. **Biomarker** im Rahmen solcher Interventionsstudien eine Aussage über eine präventive Wirkung der Lebensmittel (-Inhaltsstoffe) gegen Krebserkrankungen zu.

Im Folgenden werden die Ergebnisse einer eigenen Studie zusammengefasst (**Publikation 5**), in dessen Rahmen der Einfluss einer hohen (8 Portionen täglich) und der einer geringen Obst- und Gemüse-Zufuhr (2 Portionen) auf inflammatorische Parameter, die als „Frühmarker“ mit der Entstehung einer Krebserkrankung assoziiert sein können, verglichen wurden.

2.1.1 Eigene humane Interventionsstudie

EINFLUSS EINER HOHEN OBST- UND GEMÜSE-AUFNAHME AUF SYSTEMISCHE INFLAMMATIONSMARKER

Watzl B, Kulling SE, Möseneder J, Barth SW, Bub A (2005) A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am J Clin Nutr* 82: 1052-1058.

Das Studienkollektiv für die Interventionsstudie rekrutierte sich aus normalgewichtigen (Body Mass Index; BMI<25), männlichen Probanden (n=63) im Alter von 32±9 Jahren unter Ausschluss von Rauchen und regelmäßiger Medikation. Im Rahmen der Anamnese sowie während der Studie wurde bei den Probanden mittels Häufigkeitsfragebogen die Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme mit einem im Rahmen der „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study“ (EPIC) entwickelten Protokoll abgefragt [Boeing et al. 1997]. Die Intervention (Studiendesign: kontrolliert,

randomisiert, parallel) erstreckte sich nach einer vierwöchigen Auswaschphase, während derer alle Probanden täglich 2 Portionen (100 g oder 200 ml pro Portion) Obst und Gemüse aufnahmen, über einen Zeitraum von vier Wochen. Nach randomisierter Gruppeneinteilung in drei Gruppen (2 Portionen, 5 Portionen, 8 Portionen; n=21/Gruppe) erhielten die Probanden je nach Gruppenzugehörigkeit täglich die entsprechende Anzahl Portionen definierter Obst- und Gemüse-Sorten. Als Probenmaterial standen aus der Intervention Blutproben zur Verfügung, die zu Beginn der Auswaschphase und unmittelbar vor sowie im Anschluss an die Interventionsphase entnommen wurden.

Als Biomarker einer chronischen, systemischen Inflammation wurde C-reaktives Protein (CRP) im Plasma bestimmt. CRP wurde durch die 4-wöchige Intervention mit 8 Portionen im Vergleich zur Gruppe, die 2 Portionen täglich bekommen hatte, signifikant reduziert. Die *ex vivo*-stimulierte Freisetzung von Zytokinen, wie z.B. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) aus peripheren Blutmonozyten, wurde nicht beeinflusst.

Zahlreiche populationsbasierte prospektive Studien belegen mittlerweile, dass die **CRP-Plasmakonzentration positiv mit dem KRK-Risiko** assoziiert ist [Aleksandrova et al. 2010; Allin KH et al. 2009; Gunter et al. 2006; Siemes et al. 2006; Trichopoulos et al. 2006; Ito et al. 2005]. Somit könnte die Senkung der CRP-Plasmakonzentration durch die Obst- und Gemüse-Zufuhr ein erster mechanistischer Hinweis für die krebspräventive Bioaktivität von Obst- und Gemüse-Inhaltsstoffen darstellen. Eine Meta-Analyse zahlreicher Studien zu dieser Thematik [Tsilidis et al. 2008] sowie eine aktuelle Auswertung von Daten aus der EPIC-Studie [Aleksandrova et al. 2010] bestätigen diese Vermutung. Allerdings muss in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, dass die CRP-Plasmakonzentration nicht nur positiv mit dem Krebsrisiko assoziiert ist, sondern auch mit abdominaler Adipositas, Hyperinsulinämie und Dyslipidämie [Pravenec et al. 2011; Festa A et al. 2001; Yudkin et al. 1999], die ihrerseits die Krebsentstehung beeinflussen können. Eine klare Trennung zwischen Adipositas sowie KRK ist somit auf der Grundlage der Bestimmung der CRP-Plasmakonzentration nicht möglich. Dies wiederum ist ein weiterer Hinweis

dafür, dass ein chronisches Entzündungsgeschehen in beiden Erkrankungen pathogenetisch eine zentrale Rolle spielt.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass die tägliche Zufuhr von 8 Portionen Obst und Gemüse weder die **antigenotoxische Kapazität** in Blutmonozyten noch die systemische **antioxidative Kapazität** signifikant beeinflusste [Briviba et al. 2008]. Wurde jedoch die Anzahl auf täglich 12 Portionen erhöht, konnte die antioxidative Kapazität bei solchen Probanden, die zu Beginn einer 3-wöchigen Intervention bereits einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt waren, signifikant verbessert werden [Thompson et al. 2005]. Ergebnisse einer anderen Studie deuten ferner darauf hin, dass nicht nur die täglich zugeführte Menge an Obst und Gemüse, sondern auch die Vielfalt der Obst- und Gemüse-Sorten das krebopräventive Potenzial wesentlich beeinflussen kann [Jansen et al. 2004].

2.2 Chemoprävention durch Apfelinhaltsstoffe

Die Bioaktivität von Obst und Gemüse war aus der selbst durchgeführten Kurzzeit-Interventionsstudie nur bezüglich der CRP-Plasmakonzentration deutlich, ohne jedoch eine antioxidative oder antigenotoxische Wirkung zu zeigen. Ferner ist das aus den bislang vorliegenden populationsbasierten Studien abgeleitete krebopräventive Potenzial verschiedener Obst- und Gemüsesorten eher uneinheitlich.

Der Apfel unterscheidet sich bezüglich der Risikosenkung für Krebs insofern, dass er auf Grundlage zahlreicher epidemiologischer Studien konsistent und deutlich das Potenzial zeigte, das Risiko für KRK senken zu können. So wurde das Risiko für das KRK durch Konsum von mindestens drei Äpfeln pro Woche im Vergleich zu einer Aufnahme von weniger als einem Apfel pro Woche um 60% gesenkt [Deneo-Pellegrini 1996]. Eine Meta-Analyse von Fall-Kontroll-Studien zeigte zudem, dass der Verzehr von mehr als einem Apfel pro Tag im Vergleich zum Konsum von weniger als einem Apfel pro Tag u.a. das Risiko für das KRK um 20% reduzierte [Gallus et al. 2005]. Weiterhin bestätigte die

Auswertung von fast 35.000 Teilnehmerinnen der „Nurses´ Health Study“ eine inverse Korrelation zwischen der Verzehrmenge an Äpfeln und dem Auftreten intestinaler Polypen und Adenomen [Michels et al. 2006].

Als **bioaktive Inhaltsstoffe** des Apfels stehen neben den Ballaststoffen wie **Pektin** vor allem die **Polyphenole** im Vordergrund [Eberhardt et al. 2000]. Diese bioaktiven Stoffe werden im Rahmen der üblichen Ernährung in großer Menge aufgenommen, da Äpfel aufgrund ihres verbreiteten Vorkommens im Obstbau gemäßigter Klimazonen einen wichtigen Bestandteil der „westlichen“ Ernährung darstellen. In Deutschland ist der Apfel mit einem jährlichen Pro-Kopf-Verzehr von 18,4 kg die populärste Fruchtart, ergänzt durch einen hohen durchschnittlichen Pro-Kopf-Verbrauch von fast 10 Litern Apfelsaft [Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie 2010]. Anteilig wird aufgrund der relativ hohen Verzehrsmenge täglich etwa ein Viertel der Gesamtpolyphenolmenge und etwa ein Drittel der täglichen Ballaststoffaufnahme durch den Apfel-Konsum abgedeckt [Vinson et al. 2001].

Die in verschiedenen Zellkultursystemen untersuchten Apfelinhaltsstoffe, die eine oder mehrere der bereits eingangs beschriebenen **chemopräventiven Wirkmechanismen** aktivieren, gehören zur Substanzgruppe der polyphenolischen **sekundären Pflanzenstoffe (Tabelle 1)**. Hier stehen je nach Apfelsorte und Erntezeitpunkt die Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalkone, Flavonole, Catechine und oligomere Procyanidine sowie bei roten Apfelsorten die Anthozyane im Vordergrund [Gerhäuser 2008].

Tabelle 1. Chemopräventive Wirkung durch Apfel(-Inhaltsstoffe) *in vitro*

| Mechanismus der präventiven Wirkung | Literatur |
|---|-----------|
| Antioxidative Aktivität | a |
| Antigenotoxische Wirkung | b |
| Hemmung von Phase I Enzymen; CYP, Cyclooxygenasen | c |
| Induktion von Phase II Enzymen; Glutathiontransferase | d |
| Modulation der Signaltransduktion | e |
| Hemmung der Zellproliferation | f |
| Induktion von Tumorsuppressor Genen | g |
| Induktion von Zellzyklus Arrest | h |
| Induktion von Apoptose | i |
| Antimetastatische Wirkung | j |
| Modulation der Immunantwort | k |

a Bellion et al. 2010, 2008 ; Lemperi et al. 2008; Spada et al. 2008; Wojdylo et al. 2008; Wolfe et al. 2008; Zessner H et al. 2008; Schäfer et al. 2006a,b; Lee et al. 2003; **b** Bellion et al. 2010; Platt et al. 2010; Veeriah et al. 2008a; McCann et al. 2007; Schäfer et al. 2006a; **c** Platt et al. 2010; Waldecker et al. 2008 a,b; Zessner et al. 2008; Pohl et al. 2006; **d** Veeriah et al. 2008a,b, 2006; **e** Fridrich et al. 2007; Yoon et al. 2007; Davis et al. 2006; Kern et al. 2006, 2005; Gosse et al. 2005; **f** Reagan-Shaw et al. 2010; Miura et al. 2007; Veeriah et al. 2007, 2006a; Olsson et al. 2004; **g** Fini et al. 2007; Balavenkatraman et al. 2006; **h** Reagan-Shaw et al. 2010; Pierini et al. 2008; Gosse et al. 2005; **i** Li Y et al. 2010; Maldonado-Celisa et al. 2008; Pierini et al. 2008; Yang et al. 2008; Fini et al. 2007; Balavenkatraman et al. 2006; Gosse et al. 2006, 2005; Seiler et al. 2006; **j** McCann et al. 2007; Miura et al. 2007; **k** Holderness et al. 2007.

2.2.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen

Aus der in **Tabelle 1** zusammengefassten Darstellung der Bioaktivität von Apfel-Inhaltsstoffen wird deutlich, dass eine Vielzahl von Studien zur Charakterisierung krebspräventiver Wirkungen und der zugrunde liegenden Mechanismen vorliegen. Diese wurden jedoch ausschließlich in Zellkulturmodellen durchgeführt. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf einen komplexen Organismus (Mensch, Labornager) wurde nicht überprüft.

Aufbauend auf diese *in vitro* Studien war es daher zunächst das Ziel eigener tierexperimenteller Studien, die chemopräventive Wirkung von Apfelsäften (naturtrüb, klar) zu untersuchen (**Publikation 6**). Diese Säfte wurden mit einem hohen Polyphenolgehalt hergestellt, der auch qualitativ weitgehend dem des Apfels entsprach. Im Rahmen von Fütterungsstudien wurden die Säfte in einem **Tiermodell** der chemisch induzierten Kolon-Kanzerogenese verwendet. Mit diesem Ansatz sollte zunächst die **Übertragbarkeit der bis dahin vorliegenden *in vitro* Ergebnisse auf ein *in vivo* Modell** überprüft werden. In einer daran anschließenden Studie wurden einzelne Fraktionen (Polyphenole, Trubfraktion) aus dem naturtrüben Apfelsaft selektiv extrahiert und hinsichtlich

ihres krebopräventiven Potenzials in einem Tierversuch miteinander verglichen (**Publikation 4**). Diese Untersuchung sollte zeigen, **welche der Fraktionen** aus dem Apfelsaft einzeln oder in Kombination **für die Bioaktivität des naturtrüben Saftes verantwortlich ist**.

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIKANZEROGENEN WIRKUNG VON KLAREM UND NATURTRÜBEM APFELSAFT AUF DIE CHEMISCH INDUZIERTER KOLON-KANZEROGENESE IN DER RATTE.

Barth SW, Fahndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G (2005) Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 26:1414-1421.

Für diese Fütterungsstudie wurden Fischer-F344-Ratten 10 Tage vor der ersten Applikation von DMH bzw. NaCl randomisiert in drei Gruppen (n=36 Tiere/Gruppe) aufgeteilt. Die Kontrollgruppe erhielt über einen Zeitraum von 7 Wochen bis zum Versuchsende Trinkwasser (W), die Interventionsgruppen erhielten jeweils *ad libitum* klaren Apfelsaft (KA) oder naturtrüben Apfelsaft (TA) als Tränke.

Zusammenfassend wies vor allem der trübe Apfelsaft in der vorliegenden Arbeit ein krebopräventives Potenzial auf. Dies äußerte sich in einer Reduktion der Zahl der DMH-induzierten ACF, der epithelialen Hyperproliferation und der genotoxischen Schädigung ohne Änderung der Expression proinflammatorischer Proteine oder Glutathion-assoziiierter Enzyme im Kolon der Tiere. Diese Effekte waren nach der Gabe von trübem Apfelsaft stärker als nach der Gabe von klarem Apfelsaft ausgeprägt (Proliferation) oder nur nach der Zufuhr von trübem Apfelsaft zu beobachten (ACF, DNA-Schäden).

Um die Bioaktivität des Trübsaftes einzelnen **Apfelsaft-Fractionen** zuordnen zu können, wurde eine weitere Interventionsstudie mit einem Polyphenol-Extrakt und der Trubstoff-Fraktion aus dem Trübsaft einzeln und in Kombination durchgeführt.

Die Dosierung dieser Fraktionen über die Getränke entsprach denen des trüben Apfelsaftes der 1. Interventionsstudie, nämlich 667 mg/l Polyphenole und 750 mg/l Trubstoffe. Die Trubstoff-Fraktion wurde mittels Ultrafiltration aus dem Trübsaft gewonnen und stellt den wichtigsten Unterschied zwischen klarem und trübem Apfelsaft dar. Die Trubstoffe werden beim klaren Apfelsaft im Rahmen der teils enzymatisch katalysierten „Schönung“ abgetrennt. Der Trub bestand aus Lipiden (48,6%), Proteinen (24,0%), neutralen Polysacchariden (7,4%), analytisch nicht identifizierbaren Polyphenolen (18,0%) und Mineralstoffen, was bereits publizierten Daten zur Zusammensetzung des Gesamttrubs entspricht [Dietrich et al. 1996; Peceroni und Gierschner 1993].

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANTIKANZEROGENEN WIRKUNG VON TRÜBSAFT-FRAKTIONEN AUF DIE CHEMISCH INDUZIERT KOLON-KANZEROGENESE IN DER RATTE.

Barth SW, Faehndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. J Agric Food Chem 55: 1181-1187.

Das Versuchsdesign der zweiten Fütterungsstudie mit den Fraktionen war bezüglich DMH-Behandlung, Gruppengrößen sowie Interventionszeitraum mit dem der Apelsaftintervention identisch. Randomisiert wurden die Tiere der Wasser- (W), Trübsaft- (TA), Trubstoff- (TrS), Polyphenol- (PP) oder TrS-PP-Gruppe zugeordnet (n=12/Gruppe). Zur Probenanalytik wurden bei der Sektion der Versuchstiere Blutproben gesammelt, sowie das distale Kolon für Untersuchungen der genotoxischen Schädigung der Mukosa (Comet Assay),

Hyperproliferation (BrdU Assay), tumorassoziierten Genexpression und Anzahl/Größe von ACF entnommen.

Wie bereits in der ersten Fütterungsstudie führte TA auch in dieser Interventionstudie zu einer signifikanten Hemmung der DMH-induzierten genotoxischen Schädigung der Kolonepithelzellen sowie zu einer Reduktion der epithelialen Hyperproliferation und der großen ACF (AC/ACF >4) im Vergleich zur Gruppe W/DMH.

Die Apfelsaft-Fractionen, einzeln oder kombiniert, zeigten eine geringere Bioaktivität als der Trübsaft. Mit Ausnahme der Kombination der Trubstoff- und Polyphenol-Fraktion (TrS-PP/DMH) senkten alle Fraktionen, einzeln oder in Kombination, im Vergleich zur Gruppe W/DMH signifikant die epitheliale Hyperproliferation, hatten jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl oder Größe der ACF im distalen Kolon. Wie bereits in der ersten Studie, waren auch in dieser Studie keine Gene in den unterschiedlichen Interventionsgruppen differenziell reguliert.

Auf der Grundlage der ersten Fütterungsstudie waren für den deutlich stärkeren Effekt des TA auf die untersuchten Biomarker solche Substanzgruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit verantwortlich, die ausschließlich im Trübsaft enthalten sind (Polysaccharide) oder die im Trub- und Klarsaft in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, wie z.B. Polyphenole aus den Gruppen der Flavanole, Flavonole, Dihydrochalkone und Phenolsäuren.

Pektin gehört als Polysaccharid zur Gruppe löslicher Ballaststoffe, die durch die Dickdarmflora metabolisiert als Abbauprodukte kurzkettige Fettsäuren ergeben. Unter den entstehenden kurzkettigen Fettsäuren stellt Butyrat den bislang bezüglich seiner Bioaktivität im Darmepithel relevantesten Metabolit dar [Comalada et al. 2006] und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose im Darmepithel [Thangaraju et al. 2009; Topping und Clifton 2001; Mortensen und Clausen 1996]. In verschiedenen Zellkulturexperimenten führte Butyrat zu einer Verminderung der zellulären Proliferationsrate und zu einer Induktion der

zellulären Differenzierung und Apoptose [Coradini et al. 2000, 1997; Medina et al. 1997; Whitehead et al. 1986; Chung et al. 1985]. Letztendlich wurde Butyrat auch auf der Grundlage tierexperimenteller Fütterungsstudien mit unterschiedlichen Ballaststoffsorten und -mengen als potenziell tumorsupprimierender Stoff propagiert, der im Kolonepithel durch die direkte Wechselwirkung mit zellulären Signaltransduktionswegen die Proliferation und das Zellwachstum positiv moduliert [Cao et al. 2011]. Diese Wirkung war auch in Tiermodellen der Kolon-Kanzerogenese zu beobachten, in denen Pektin eine signifikante Reduktion von präneoplastischen ACF und Tumoren bewirkte [Rao et al. 1998; McIntyre et al. 1993]. In den meisten dieser Tierstudien wurden jedoch mit 10 bis 20% Pektin im Futter erhebliche Ballaststoff-Mengen eingesetzt, die je nach Futterration eine tägliche Pektinmenge von mehr als 1 g ergaben. Diese Pektindosis lag somit erheblich über der errechneten Pektin-Dosis durch die Trübsaft-Intervention (etwa 20 mg/Tag). Auch die in einer kürzlich veröffentlichten Studie verwendete Dosis von Apfel-Polysacchariden lag mit etwa 2 g/Tag höher als die Dosis der in unserer Studie eingesetzten Trubfraktion. Auch dort führte die eingesetzte hohe Pektin-Dosis in einem modifizierten DMH-Mausmodell zu einer starken Reduktion der Tumorzahl im Kolon [Li et al. 2011]. Zusammenfassend ist daher fraglich, ob die Wirkung des Trübsaftes allein auf den vergleichsweise geringen Pektin- oder Polysaccharidgehalt der Trubfraktion zurückzuführen war, zumal in unserer zweiten Fütterungsstudie auch der Polyphenol-Extrakt aus dem Trübsaft die DMH-vermittelte Hyperproliferation signifikant reduzieren konnte.

Stellvertretend für verschiedene polyphenolhaltige Lebensmittel (Obst, Tee, Wein, etc.) wurden in zahlreichen tierexperimentellen Studien **polyphenolische Monosubstanzen** sowie auch **komplexe Polyphenolextrakte** zur Untersuchung einer chemopräventiven Wirkung verwendet. Basierend auf Ergebnissen von *in vitro* Studien wurde meist polyphenolischen Substanzgruppen das höchste krebopräventive Potenzial in Lebensmitteln zugesprochen [Warren et al. 2009; Caderni et al. 2000].

Bei der Übertragbarkeit der publizierten *in vitro* Ergebnisse auf ein Tiermodell oder auf den Menschen müssen jedoch der intestinale Metabolismus sowie die

Bioverfügbarkeit der untersuchten Substanzen berücksichtigt werden. Diese sind nämlich *in vivo* relevante Einflussgrößen für die Bioaktivität oral zugeführter Wirkstoffe, lassen sich jedoch im Rahmen von Zellkultur-Experimenten nur sehr schwer nachahmen [Del Rio et al. 2010; van Dorsten et al. 2010; Forester und Waterhouse 2009]. Auch zur Untersuchung der krebopräventiven Wirkung des Apfels wurden neben den eingangs aufgelisteten *in vitro* Experimenten mittlerweile verschiedene tierexperimentelle Studien veröffentlicht, die neben der Gruppe der **Chalkone** [Yadav et al. 2011] in erster Linie das chemopräventive Potenzial der **Procyanidine** untersuchten. So zeigte ein aus Äpfeln gewonnener Procyanidin-Extrakt im chemisch induzierten AOM-Tiermodell eine Reduktion der ACF-Anzahl um 50% [Gosse et al. 2005]. Auch in unseren Studien könnten daher die Procyanidine für die beobachtete signifikante Reduktion der großen ACF durch den trüben Apfelsaft sowie die Hemmung der DMH-vermittelten Hyperproliferation durch den Polyphenolextrakt verantwortlich sein. Allerdings werden diese Ergebnisse zur Bioaktivität der Procyanidine mittlerweile wieder in Frage gestellt. So konnte vor kurzem in einem DMH-Tiermodell mit einer human-adaptierten Darmflora gezeigt werden, dass die Intervention mit einem Apfel-Procyanidin-Extrakt nicht zu einer Reduktion der DMH-induzierten ACF-Anzahl oder -Größe, sondern sogar zu einer Zunahme der ACF-Anzahl führte [Lhoste et al. 2010].

Diese Ergebnisse weisen nicht nur darauf hin, dass die Übertragbarkeit von Ergebnissen zur Bioaktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen in Versuchstieren auf den Menschen modellbedingten Limitierungen unterliegt, sondern auch auf die Tatsache, dass gerade bei Monosubstanzen oder hochreinen Extrakten dosisabhängig adverse Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Auch in unserer Studie riefen keine der untersuchten Fraktionen zum trüben Apfelsaft vergleichbare antikanzerogene Effekte hervor. Ferner konnte die Bioaktivität des Saftes keiner der Einzelfraktionen eindeutig zugeordnet werden.

Zusammenfassend machen die Ergebnisse deutlich, dass im Rahmen einer krebopräventiven Ernährung die Einnahme von isolierten sekundären Pflanzenstoffen oder von Extrakten in Form von Nahrungsergänzungsmitteln

wenig sinnvoll erscheint. Viele Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass es die **Summe der Effekte aller Inhaltsstoffe** eines verzehrten Nahrungsmittels ist, die zu einer gewünschten krebspräventiven Wirkung führen kann [Renkawitz 1999]. Dieses Postulat erhält auch bezüglich des Apfels weitere Unterstützung durch jüngst veröffentlichte Ergebnisse von Poulsen et al. [2011]. Auch hier konnte, wie der Trübsaft in unserer Studie, die tägliche Fütterung von 5 g Apfel im Vergleich zur 0 g-Kontrollgruppe im DMH-Modell signifikant die Anzahl präneoplastischer ACF reduzieren. Somit bestätigen diese Veröffentlichung sowie unsere Arbeiten, dass das komplexe Lebensmittel häufig ein im Vergleich zu Einzelfractionen oder Monosubstanzen höheres bioaktives Potenzial ohne „Nebenwirkungen“ besitzt [Chachay et al. 2011].

2.3 Einfluss von Adipositas auf das Kolorektalkarzinom

Neben der positiven, krebspräventiven Wirkung der Ernährung kann auch eine **Krebsrisikoerhöhung durch die Ernährung** stattfinden. Nicht nur Rauchen, Alkohol und Bewegungsmangel, sondern auch eine fettreiche Ernährung, eine hohe Energieaufnahme sowie die daraus resultierende **Adipositas** werden zu den Risikofaktoren für das KRK gezählt. Ein globaler Vergleich zeigte, dass die höchsten KRK-Inzidenzen in den Regionen mit den höchsten Adipositas-Raten auftraten [Gunter und Leitzmann 2006]. Im Fall des KRK konnten Assoziationen mit dem „Body Mass Index“, einer Akkumulation des viszeralen Fettgewebes und körperlicher Inaktivität gezeigt werden (Fair und Montgomery 2009; Gunter und Leitzmann 2006).

Mechanistische Studien haben verschiedene **Risikofaktoren** identifiziert, die für die **positive Korrelation der Adipositas- mit der KRK-Inzidenz** verantwortlich sein könnten. Hier sind in erster Linie die Hypertriglyzeridämie, Hyperglykämie, Hypercholesterinämie und erhöhte Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren zu nennen, die mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Insulin und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) einhergehen. Diese Faktoren

können einzeln oder in Kombination nicht nur als reine **Energieträger** den veränderten Stoffwechsel von Tumorzellen unterstützen, sondern auch als zelluläre **Wachstumsfaktoren** Prozesse der Proliferation und Apoptose beeinflussen [Fair und Montgomery 2009; Huang und Chen 2009].

Weiterhin stellen biologische Mechanismen einer **Insulinresistenz** und einer chronischen Entzündung zusätzliche Bindeglieder zwischen Adipositas und KRK dar. Insulin und IGF-1 gelten als Wachstumsfaktoren und stimulieren anabole Prozesse. In hohen Plasmakonzentrationen begünstigen sie die Tumorentstehung, indem sie die zelluläre Proliferation fördern und die Apoptose hemmen [Tran et al. 2003; Koohestani et al. 1997; Koenuma et al. 1989].

Mittlerweile ist bekannt, dass das viszerale, intraabdominale Fettgewebe funktionell nicht allein auf die Speicherung von Fett und Triglyzeriden beschränkt ist, sondern die Fettzellen „Adipokine“ wie Leptin, Resistin und Adiponektin produzieren, die für die Adipozytenhomöostase und den Adipozytenmetabolismus verantwortlich sind [Catalan et al. 2011]. Diese Adipokine haben pro- (Leptin, Resistin) oder antiinflammatorische Eigenschaften (Adiponektin). Bei Adipositas infiltrieren ferner Makrophagen das viszerale Fettgewebe und sezernieren gemeinsam mit den Adipozyten Zytokine wie TNF α , IL-6 und C-reaktives Protein [Kern et al. 2003].

Aufgrund der **proinflammatorischen Eigenschaften** gelten Leptin und Resistin als Risikofaktoren für entzündliche Darmerkrankungen, die pathogenetisch als Ausgangspunkt für eine Initiation der Kanzerogenese diskutiert werden [Karmiris 2005]. In Folge einer chronischen Entzündung kann diese im Kolon zu DNA-Schäden führen und die Bildung neoplastischer Veränderungen forcieren [Jaiswal et al. 2000] sowie letztlich das Wachstum des KRK unterstützen [Catalan et al. 2011; Rohde et al. 2007]. Dagegen besitzt Adiponektin eine antiinflammatorische und antiangiogene Wirkung. Somit könnten die mit Adipositas assoziierten, verminderten Adiponektin-Plasmaspiegel zu einer Unterstützung der Gefäßeinsprossung in Tumoren und einer weiteren Verstärkung der chronischen Entzündungsreaktion führen [Wang 2005].

2.3.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen

Ziel der eigenen Untersuchungen war es zunächst, das DMH-initiierte KRK-Modell funktionell mit der Pathogenese einer Adipositas zu kombinieren, um in diesem komplexen Modell die Wechselwirkung beider Erkrankungen mechanistisch untersuchen zu können. Dazu wurde in einer ersten Studie eine Phänotypisierung des Modells bezüglich der Kolon-Kanzerogenese sowie der Korrelation mit metabolischen und endokrinen Adipositas-assoziierten Risikofaktoren für KRK durchgeführt (**Publikation 3**).

Als Modell für den adipösen, prädiabetischen Status beim Menschen diene die **Zucker-obese-Ratte**, die aufgrund einer Punktmutation auf beiden Allelen des Leptinrezeptorgens einen adipösen Phänotyp entwickelt und als gut etabliertes Tiermodell für den **Symptomenkomplex des Metabolischen Syndroms** gilt [Aleixandre und Miguel 2009]. Die 1961 erstmals entdeckte Spontanmutation [Zucker und Zucker 1961] beruht auf einer A/C Transition im Exon 6 des Leptinrezeptorgens mit daraus folgender Aminosäure-Substitution von Glutamin nach Prolin, die in einer deutlich verminderten Bindung von Leptin an Leptin-Rezeptoren im Hypothalamus resultiert [Chua et al. 1996]. Homozygote Zucker-obese-Ratten (*fa/fa*) zeigen auf Grund des Leptinrezeptor-Defektes und der damit verbundenen Leptinresistenz eine vermehrte Futteraufnahme (Hyperphagie) und eine stark erhöhte Körperfettmasse. Die Zucker-Ratte ist daher ein bewährtes Tiermodell für die humane Adipositas. Beiden gemein sind eine frühe Hypertrophie der Fettzellen, eine Hypertriglyzeridämie, Hypercholesterinämie [Zucker und Zucker 1963], die Ausbildung einer Insulinresistenz mit daraus resultierender Hyperinsulinämie sowie eine chronische Entzündung [Aleixandre und Miguel 2009].

EINFLUSS VON ADIPOSITAS AUF DIE CHEMISCH INDUZIERTER KOLON-KANZEROGENESE

Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Bub A, Barth SW (2008) Obesity-related promotion of aberrant crypt foci in DMH-treated obese Zucker rats correlates with dyslipidemia rather than hyperinsulinemia. Eur J Nutr 47: 161-170.

Weibliche Zucker-Ratten mit adipösem (*obese* = 48; *fa/fa*) und normalgewichtigen Phänotyp (*lean* = 24; *Fa/+*) wurden für die Studie verwendet. Nach einer einwöchigen Adaptationsphase wurden die *obese* Tiere randomisiert in eine *ad libitum* Gruppe (*n* = 24) und eine *pair fed* Gruppe (*n* = 24) aufgeteilt. Letztere erhielt eine an die Verzehrsmenge der *lean* Tiere angepasste Futterration. Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, zum einen den Genotyp und zum anderen die Höhe der Energieaufnahme als Risikofaktoren für das Kolonkarzinom separat zu untersuchen. Im Durchschnitt entsprach das *pair feeding* einer etwa 30%igen Energierestriktion pro Tag gegenüber den *obese ad libitum* Tieren. Jeweils einer Hälfte einer Tiergruppe (*n* = 12) wurde einmal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen intraperitoneal 1,2-Dimethylhydrazin (DMH; 20 mg/kg KG) oder 0,9% NaCl-Lösung injiziert. Der Sektionszeitpunkt wurde fünf Wochen nach der letzten der vier DMH- oder 0,9% NaCl-Injektionen gewählt. Dies entspricht in diesem Tiermodell pathogenetisch etwa dem Übergang der Initiation in die Promotionsphase der mehrstufigen Kolon-Kanzerogenese [Raju et al. 2002].

Zur Probenanalytik wurde bei den Sektionen das distale Kolon für Untersuchungen der genotoxischen Schädigung der Mukosa, der Proliferation, der ACF und der tumorassoziierten Genexpression entnommen. Daneben wurde das Blut für die Bestimmung von endokrinen und metabolischen Parametern gesammelt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass weder Genotyp-bedingte metabolische Faktoren noch die Höhe der Energieaufnahme einen signifikanten Einfluss auf die durch DMH-verursachte genotoxische Schädigung und DMH-induzierte Hyperproliferation in der Darmmukosa im distalen Kolon hatte.

Die Auswertung des ACF-Assays hingegen belegte einen signifikanten Einfluss des adipösen Genotyps sowie der Energieaufnahme auf die ACF-Bildung (Anzahl, Größe) im distalen Kolon. Die Zahl der ACF lag in der *obese ad libitum* Gruppe im Vergleich zur *lean* Kontrollgruppe etwa 20-fach höher, während die Energierestriktion in der *pair fed* Gruppe im Vergleich zur *obese ad libitum* Gruppe die ACF-Anzahl um etwa 60% reduzierte. Auch die Größe der ACF (aberrante Krypten/ACF [AC/ACF]) war in der *obese ad libitum* Gruppe im Vergleich zur *lean* Kontrollgruppe etwa 60% höher. Die ACF-Größe wurde durch die Energierestriktion um 20% verringert, so dass es in der *obese pair fed* Gruppe keinen signifikanten Unterschied der ACF-Größe zu der *lean* Gruppe mit identischer Energieaufnahme gab.

Um den direkten **funktionellen Zusammenhang zwischen dem metabolischen Syndrom und dem Kolonkarzinom** in dem etablierten Tiermodell zu überprüfen, wurden die Anzahl und die Größe der ACF als spezifische Kolonkarzinom-Biomarker mit Energieaufnahme, Körpergewicht und verschiedenen endokrinen und metabolischen Blutparametern korreliert. Wie aus **Tabelle 2** hervorgeht, bestand eine enge Korrelation zwischen ACF (Anzahl) bzw. AC/ACF (Größe) und dem Körpergewicht, der Energieaufnahme, den Cholesterin-, Malondialdehyd- (MDA) sowie den Leptin- und Triglyzerid-Plasmaspiegeln. Die Korrelation mit dem Insulinspiegel war zwar signifikant, trat aber im Vergleich zu den o.a. Parametern in den Hintergrund.

Tabelle 2: Korrelation der Anzahl und der Größe der ACF mit Energieaufnahme, Körpergewicht und verschiedenen endokrinen und metabolischen Blutparametern¹

| | Korrelations-Koeffizient für ACF (r^2 adj.) | p-Wert | Korrelations-Koeffizient für AC/ACF (r^2 adj.) | p-Wert |
|------------------------|--|---------|---|--------|
| Körpergewicht | 0,760 | <0,0001 | 0,530 | 0,0006 |
| Energieaufnahme | 0,755 | <0,0001 | 0,433 | 0,0024 |
| Cholesterin | 0,662 | <0,0001 | 0,596 | 0,0002 |
| MDA | 0,600 | 0,0002 | 0,361 | 0,0064 |
| Leptin | 0,480 | 0,0014 | 0,473 | 0,0016 |
| Triglyzeride | 0,443 | 0,0021 | 0,348 | 0,0075 |
| Insulin | 0,217 | 0,0340 | 0,286 | 0,0157 |

¹ Anzahl der ACF und Größe (AC/ACF) waren konstante Variablen, die mit den Adipositas-assoziierten Parametern korreliert wurden.

Insgesamt wurde gezeigt, dass sowohl der **adipöse Genotyp** als auch die **Energieaufnahme** potenzielle Einflussgrößen für die Stärke der Ausprägung von ACF im distalen Kolon der Zucker-Ratte waren. Ferner korrelierten **Parameter des Fettstoffwechsels** eng mit der ACF-Anzahl und -Größe im Kolon, während Insulin auf der Grundlage der Regressionsanalysen eine verhältnismäßig untergeordnete Rolle spielte.

In verschiedenen Adipositas-Tiermodellen wurde bislang untersucht, ob der in populationsbasierten Studien gezeigte **Zusammenhang zwischen Adipositas und KRK-Risiko** modellhaft simuliert werden kann, um diese Assoziation mechanistisch weiter aufklären zu können. AOM führte in fettreich gefütterten adipösen Mäusen im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren zu einer signifikant erhöhten Anzahl an ACF [Park et al. 2011]. Das verstärkte Auftreten von ACF bei fütterungsbedingter Adipositas konnte hingegen in einem entsprechenden Rattenmodell nicht belegt werden [Drew et al. 2007]. Versuchstiere, die aufgrund einer AOM-Behandlung [Mentor-Marcel et al. 2009; Hirose et al. 2004] oder eines genetischen Defektes [Gravaghi et al. 2008] präneoplastische ACF

oder Polypen entwickelten, zeigten in Kombination mit einer Leptinrezeptor *Knock-out*-bedingten Adipositas eine signifikante Erhöhung der Zahl der präneoplastischen Läsionen. Letztere Studien in der Maus bestätigen somit die Ergebnisse, die wir im Rahmen der Charakterisierung des KRK/Adipositas-Modells in der Zucker Ratte erzielt haben.

Für die **Adipositas-bedingte Promotion kanzerogener Prozesse** werden hauptsächlich Insulin und Leptin verantwortlich gemacht [Endo et al. 2011]. Diese können Rezeptor-vermittelt in der Kolonmukosa von KRK-Tiermodellen als Wachstumsfaktoren die Proliferation im Kolonepithel verstärken [Endo et al. 2011; Rondini et al. 2011]. Diese Wirkung von Insulin und Leptin konnte allerdings in früheren Studien nicht nachgewiesen werden [Ealey et al. 2008; Drew et al. 2007]. Auch unsere Studie zeigte eine eher untergeordnete, wenn auch signifikante Korrelation der Leptin- und Insulin-Plasmakonzentration mit der ACF-Anzahl und -Größe im Kolon.

Zusätzlich zur Adipositas-assoziierten Zunahme von ACF konnte in unserem Modell gezeigt werden, dass *pair feeding* mit einer relativen **Energierestriktion** von etwa 30% zu einer signifikanten Abnahme der ACF-Anzahl, aber nicht der ACF-Größe (AC/ACF) führte. Dies bestätigten auch Ergebnisse in anderen KRK-Tiermodellen, in denen durch eine Energierestriktion eine Abnahme präneoplastischer Dysplasien erreicht werden konnte [Rondini et al. 2011; Patel AC et al. 2004; Mai et al. 2003].

Eine Reduktion der ACF wurde generell mit verminderten DNA-Schäden [Xu et al. 1996], mit einer verminderten epithelialen Proliferationsrate [Barth et al. 2007] oder einer erhöhten Apoptoserate der Kolonzellen [Gali-Muhtasib et al. 2008] assoziiert. Da in unserer Arbeit die ACF-Anzahl durch den Genotyp und die Energieaufnahme beeinflusst wurde, sich jedoch die DNA-Schäden sowie die epitheliale Proliferationsrate nicht veränderten, stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen. DMH wird hauptsächlich durch CYP2E1 metabolisiert und entfaltet seine kanzerogene Wirkung vornehmlich durch die Bildung von **DNA-Addukten** [Rogers et al. 1977]. Somit kann eine

Änderung der CYP2E1-Aktivität über eine Änderung der Adduktbildung und genotoxischen Schädigung zu einer veränderten Bildung von ACF führen [Sohn et al. 2001, 1991]. In unserer Studie waren die DNA-Schäden hingegen in allen Gruppen gleich stark ausgeprägt. Dies deutete indirekt darauf hin, dass die Änderung der ACF-Anzahl durch Energierestriktion nicht über die Veränderung der CYP2E1-Aktivität und damit der Bioaktivierung des DMH vermittelt wurde, wie in anderen Studien beschrieben [Manjgaladze et al. 1993; Raucy et al. 1991].

Auch Änderungen der epithelialen **Proliferation** sind als Ursache für die erheblichen Unterschiede in der ACF-Größe und -Anzahl in unserer Studie eher unwahrscheinlich, da keine Gruppenunterschiede hinsichtlich der epithelialen Proliferationsrate nachweisbar waren. Wie von uns und von anderen [Jackson et al. 2003] in der Fischer Ratte beschrieben, ist die Initiation der Kolon-Karzinogenese durch DMH mit einer epithelialen Hyperproliferation im distalen Kolon assoziiert. Jedoch scheint es hierfür auch Ausnahmen zu geben, da eine signifikant geringere Anzahl DMH-induzierter ACF bei einer fettarmen im Vergleich zu einer fettreichen Fütterung mit Adipositas sogar mit einer Hyperproliferation im Kolonepithel der normalgewichtigen Tiere einherging [Hambly et al. 1997]. Die Ergebnisse der Charakterisierung unseres Tiermodells ließen auch darauf schließen, dass andere Mechanismen als die epitheliale Proliferationsrate für die Modulation der ACF-Bildung verantwortlich waren.

Raju et al. [2003] zeigten, dass eine Energierestriktion im Rahmen eines Postinitiationsprotokolls (beginnend eine Woche nach der letzten AOM-Injektion) das Heranwachsen der kleinen zu großen ACF inhibierte. Es ist ferner bekannt, dass kleine und große ACF sehr differenziert auf Wachstumseinflüsse reagieren [Lasko et al. 1995; Bird und Good 2000]. So können sich z.B. kleine ACF in der reversiblen Phase der Promotion [Pitot und Dragan 1991] durch Induktion der **Apoptose** [van Duuren et al. 1975] zurückbilden. Eine Erhöhung der Apoptoserate durch eine Energierestriktion [Platz 2002; Dunn et al. 1997] könnte folglich die Ursache dafür sein, dass die ACF-Anzahl auch in unserer Studie durch *pair feeding* reduziert wurde, ohne dass eine Änderung der Proliferationsrate nachweisbar war.

Neben einer direkten Beeinflussung der epithelialen Proliferations- und Apoptoserate im Kolon, kann durch Energierestriktion und Gewichtsabnahme auch die Ausprägung der chronischen **Entzündung** bei Adipositas verringert werden. Ferner zeigte eine kürzlich veröffentlichte Humanstudie, dass ein durch Energierestriktion herbeigeführter Gewichtsverlust bei adipösen Probanden nicht nur die chronische systemische Entzündung, sondern auch chronische Entzündungsreaktionen direkt im Kolon reduzieren konnte [Pendyala et al. 2011].

Zusammenfassend zeigen die Studien, dass einzelne Adipositas-assoziierte Faktoren, die eine nachweislich direkte und kausale Rolle für eine gesteigerte Kanzerogenese spielen könnten, nicht eindeutig indentifiziert sind. Viele der Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass das Zusammenspiel von proinflammatorischen Zytokinen mit Adipokinen, Insulin und wahrscheinlich auch Sexualhormonen für das erhöhte Krebsrisiko bei Adipositas verantwortlich ist [Kant und Hull 2011]. Somit ließe sich nur durch die Beeinflussung der Expression all dieser Faktoren eine Nahrungsmittel-basierte Krebsprävention bei Adipositas realisieren [Lund et al. 2011; Zeng et al. 2011].

Dementsprechend wurde das von uns charakterisierte Adipositas/KRK-Tiermodell nachfolgend für eine Fütterungsstudie mit naturtrübem Apfelsaft verwendet. In dieser Studie sollte, aufbauend auf die Phänotypisierung des Modells, die antikanzerogene Wirkung von Apfelsaft unter den im Tiermodell nachgewiesenen promovierenden Bedingungen der Adipositas untersucht werden (**Publikation 2**).

2.4 Chemoprävention durch Apfelinhaltsstoffe bei Adipositas

2.4.1 Eigene tierexperimentelle Untersuchungen

UNTERSUCHUNGEN ZUR MODULATION DER DMH-INDUZIERTEN KOLON-KANZEROGENESE DURCH NATURTRÜBEN APFELSAFT

Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Fähndrich C, Bub A, Rechkemmer G, Barth SW (2009) Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: Impact of juice constituents and obesity. *Mol Nutr Food Res* 53: 1289-1302.

In dieser Interventionsstudie wurden weibliche Zucker-Ratten mit adipösem (*obese*, n = 48) und normalgewichtigem Phänotyp (*lean*, n = 24) verwendet. Jeweils die Hälfte der *lean*, *obese pair fed* und *obese ad libitum* Gruppe erhielt naturtrüben Apfelsaft (TA) oder ein isokalorisches Kontrollgetränk (KONT). Die Intervention begann 1 Woche vor der ersten DMH- bzw. NaCl-Applikation. Fünf Wochen nach der letzten DMH/NaCl-Injektion wurde der Versuch mit den Sektionen zur Probenentnahme beendet.

Wie in der ersten Studie mit Zucker-*obese*-Ratten gezeigt werden konnte, weisen ausgewählte Adipositas-assoziierte metabolische Parameter (siehe **Tabelle 2**), u.a. die Leptin- und MDA-Plasmaspiegel, eine enge Korrelation mit der Anzahl und Größe der ACF auf. Ein Interventionseffekt von TA im Vergleich zum KONT zeigte sich jedoch nur bei den Cholesterinwerten innerhalb der *obese pair fed* Gruppe und bei den Leptinwerten innerhalb der *lean* Kontrollgruppe. Im Vergleich zur jeweiligen KONT-Gruppe veränderte die TA-Tränke weder die Energieaufnahme noch das Körpergewicht. Ferner führte die Intervention mit TA in keiner Interventionsgruppe zu einer signifikanten Reduktion der DMH-induzierten DNA-Schädigung oder epithelialen Hyperproliferation. Neben dem sehr deutlichen Einfluss des adipösen Genotyps und der Energieaufnahme auf die Anzahl und Größe der ACF, reduzierte die Intervention mit TA jedoch weder die Anzahl noch die Größe der ACF.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass im Gegensatz zu der ausgeprägten chemopräventiven Wirkung von TA in der „normalgewichtigen“ Fischer-F344-Ratte eine krebopräventive Bioaktivität durch TA in der Zucker-*obese*-Ratte nicht festzustellen war.

Diese fehlende Bioaktivität von TA in der Zucker-*obese*-Ratte könnte auch in einer unterschiedlichen Zusammensetzung des TA in der Zucker-*obese*- und

der Fischer-Ratten-Studie begründet sein. Die Zusammensetzung von Fruchtsäften unterliegt sowohl quantitativen wie auch qualitativen Schwankungen. So konnte gezeigt werden, dass z.B. der **Polyphenolgehalt** in Abhängigkeit von Apfelsorte, Reifungsdauer, Anbaujahr sowie Lagerung und Verarbeitung stark variieren kann [van der Sluis et al. 2005; Alonso-Salces et al. 2004; Lattanzio et al. 2001; Escarpa A et al. 1998]. Allerdings gab es bezüglich des Polyphenol-Profiles und der -Menge keine bedeutenden Unterschiede zwischen dem TA aus der Fischer-Ratten-Studie [Barth et al. 2005] und dem TA, der in der Fütterungsstudie mit den Zucker-*obese*-Ratten verwendet wurde [Koch et al. 2009]. Auch in Bezug auf Lagerung und Herstellung wurden beide Säfte gleich behandelt, so dass Schwankungen bezüglich der Zusammensetzung minimiert wurden.

Trotzdem zeigt diese Problematik, dass die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen aus Fütterungsstudien sowie aus humanen Interventionsstudien maßgeblich von der Zusammensetzung der verabreichten Produkte abhängt. Letzteres kann bei Extrakten oder Monosubstanzen besser standardisiert und kontrolliert werden. Dies könnte daher auch die Erklärung dafür sein, dass hauptsächlich polyphenolische [Uchiyama et al. 2011; Murase et al. 2011; Poudyal et al. 2010; Agouni 2009; Tanaka et al. 2008; Terra et al. 2009; Kao et al. 2000] oder Pektin-haltige **Extrakte** [Sanchez et al. 2011] anstelle der Lebensmittel selbst für entsprechende Fütterungsstudien verwendet wurden. In diesen Studien wurden meist entzündungshemmende Effekte sowie die positive Modulation Adipositas-assoziiierter metabolischer und endokriner Risikofaktoren in verschiedenen Adipositas-Modellen in Ratte und Maus untersucht. Eine Übertragbarkeit auf die Ernährung mit Lebensmitteln ist hier jedoch aufgrund der z. T. im nicht-physiologischen Dosisbereich eingesetzten Monosubstanzen sowie der im Vergleich zum Lebensmittel sehr reduzierten Komplexität der Extrakte nur bedingt möglich [Chachay et al. 2011].

2.4.2 Eigene humane Interventionsstudie

Die in vorangehenden Kapiteln beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass die genotoxische Schädigung, epitheliale Hyperproliferation sowie die Entstehung präneoplastischer Dysplasien im Kolonepithel durch einen polyphenolreichen Trübsaft positiv beeinflusst werden können. Die eingangs aufgelisteten Ergebnisse der *in vitro* Studien konnten somit weitgehend auf ein *in vivo*-Modell übertragen werden. Dagegen war diese Bioaktivität in einem Adipositas-Tiermodell nicht nachweisbar.

Daher leitet sich aus den Ergebnissen aller tierexperimenteller Fütterungsstudien insgesamt die Frage ab, inwieweit eine chemopräventive Wirkung von polyphenolreichem Trübsaft grundsätzlich auch **im Menschen** hervorgerufen werden kann. Bereits in unterschiedlichen Kolonkarzinom-Tiermodellen waren erhebliche Unterschiede bezüglich der Bioaktivität des Saftes zu verzeichnen.

Aufbauend auf die tierexperimentellen Studien war es somit das Ziel, den Einfluss einer Apfelsaft-Intervention auf Risikofaktoren für eine Krebserkrankung im Rahmen von drei Humanstudien zu untersuchen. Dabei wurden die Interventionsstudien mit Trübsaft jeweils in normalgewichtigen, in nicht-diabetischen Übergewichtigen sowie in Typ 2-Diabetikern durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der zweiten Studie in adipösen Patienten (BMI>27) vorgestellt und diskutiert (**Publikation 1**).

EINFLUSS EINER INTERVENTION MIT NATURTRÜBEM APFELSAFT AUF ADIPOSITAS-ASSOZIIERTE RISIKOFAKTOREN FÜR EINE KREBSERKRANKUNG

Barth SW, Koch TCL, Watzl B, Dietrich H, Will F, Bub A (2011) Moderate effects of apple juice consumption on obesity related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. Eur J Nutr (epub ahead of print).

Teilgenommen haben an dieser Interventionsstudie adipöse männliche Probanden (BMI>27, n=68) unter Ausschluss von Typ 2-Diabetikern und

Rauchern. Im Rahmen der Anamnese wurde bei den Probanden eine Körperfettbestimmung durchgeführt, verschiedene systemische Fettstoffwechsel-Parameter im Blut bestimmt sowie der Ausschluss von Typ 2-Diabetes über die Erfassung von HbA1c und die Durchführung eines Glukose-Belastungstests erreicht.

Die Intervention (Studiendesign: kontrolliert, randomisiert, parallel, einfach-blind) erstreckte sich nach einer zweiwöchigen Auswaschphase über einen Zeitraum von vier Wochen. Nach randomisierter Gruppeneinteilung in zwei Gruppen (Kontrolle n=30; Trübsaft; n=38) erhielten die Probanden je nach Gruppenzugehörigkeit täglich den Trübsaft oder ein zum Saft isokalorisches Kontrollgetränk mit einem Saft-identischen Gehalt an Fruchtsäuren, Mineralstoffen und Vitamin C (750 ml/Tag).

Als anthropometrische Daten wurden Körpergewicht und BMI, der Körperfettanteil und die fettfreie Körpermasse mittels Bioelektrischer-Impedanzanalyse sowie der Taillenumfang bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen führte die vierwöchige Intervention in übergewichtigen Männern nach Verzehr des naturtrüben Apfelsafts zu einer statistisch signifikanten Abnahme des prozentualen Körperfettanteils ($p=0,004$), begleitet von einem Anstieg der fettfreien Körpermasse ($p=0,033$). Körpergewicht, BMI und Taillenumfang blieben dabei unbeeinflusst.

Als Parameter des Fettstoffwechsels wurden Triglyzeride und Gesamtcholesterin, LDL- und HDL-Cholesterin sowie freie Fettsäuren im Blut der Teilnehmer untersucht. Des Weiteren wurden die Plasmakonzentrationen der Adipokine Leptin, Resistin und Adiponektin analysiert. Keiner dieser Plasma-Parameter wurde selektiv durch die Apfelsaft-Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert.

Darüber hinaus wurden Biomarker der systemischen Entzündung wie C-reaktives Protein (CRP), TNF- α , IL-6 und *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI) sowie *intercellular* und *vascular adhesion molecule* (ICAM und VCAM) durch den Verzehr des naturtrüben Apfelsafts im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst.

Außerdem hatte der Trübsaft keinen Effekt auf die antioxidative Kapazität, die mittels FRAP und ORAC bestimmt wurde. Während der systemische Antioxidantienstatus offensichtlich nicht beeinflusst wurde, konnte die zelluläre antioxidative Kapazität verbessert werden. Das Auftreten oxidativ induzierter DNA-Strangbrüche in mononukleären Blutzellen der Apfelsaft-Gruppe war nämlich signifikant verringert.

Adipositas ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Pathogenese von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren sowie deren Interaktion beeinflusst wird. Genvarianten, die Adipositas bedingen, könnten auch die Prädisposition, an Dickdarmkrebs zu erkranken, erhöhen. Deswegen wurde im Rahmen der Humanstudie der **Einfluss genetischer Varianten** untersucht. Dabei lag der Fokus auf einer möglichen Interaktion zwischen Genotyp und Apfelsaftkonsum in Bezug auf Änderungen von Parametern des Fett- und Glucosemetabolismus sowie der Adipokin-Plasmakonzentrationen. Hierzu wurden sechs „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNP) untersucht: INSIG2 -10 kb G/C (Insulin-induced gene 2), IL-6 -174 G/C (Interleukin 6), PGC1 Gly482Ser (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1), FABP2 Ala54Thr (Fatty acid-binding protein 2), UCP3 -55C/T (Uncoupling protein 3) und PPAR γ 2 Pro12Ala (Peroxisome proliferator-activated receptor γ 2).

Im Fall der Träger der mutierten IL-6-174 C/C-Allelvariante führte die Apfelsaft-Intervention zu einer signifikanten Abnahme des Körperfetts, während bei Probanden mit dem G/G- und G/C-Genotyp keine signifikante Reduktion des Körperfett-Anteils durch die 4-wöchige Apfelsaft-Intervention auftrat.

Bislang durchgeführte humane Interventionsstudien mit Äpfeln oder Apfelprodukten waren hauptsächlich auf deren **antioxidative Wirkung** fokussiert. In einer Fruchtsaftstudie wurde der Antioxidantienstatus 30 min nach der Aufnahme untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Orangensaft die beste antioxidative Wirkung besaß und dass auch Apfelsaft die antioxidative Kapazität signifikant verbesserte, jedoch andere Säfte, wie z.B. Birnensaft, keinen signifikanten Effekt aufwiesen [Ko et al. 2005]. Diese Ergebnisse zur

antioxidativen Wirkung konnten für die einmalige Aufnahme von Apfelsaft [Chrzczanowicz et al. 2008], für ein Apfelhomogenat [Maffei 2007] sowie nach Aufnahme von täglich 1 kg Äpfeln über 4 Tage bestätigt werden [Mayer et al. 2001]. Während in einer weiteren Studie der Verzehr von einmalig 1 kg Äpfeln den systemischen Antioxidantienstatus nicht veränderte, konnte der Schutz lymphozytärer DNA gegenüber einer genotoxischen Schädigung nachgewiesen werden [Briviba et al. 2007]. Letztere antigenotoxische Wirkung in peripheren Lymphozyten konnte auch in unserer hier beschriebenen Studie bestätigt werden. Jedoch ließ sich, wie bereits nach einmaliger Aufnahme durch 1 kg Äpfel [Briviba et al. 2007], eine Beeinflussung des systemischen Antioxidantienstatus durch die 4-wöchige Saftintervention nicht bestätigen.

Dies unterstützt zusätzlich die derzeit kontroverse Diskussion zur Spezifität der antioxidativen Wirkung bei Frucht- oder Fruchtsaft-Intervention, die sich nicht eindeutig auf die antioxidative Wirkung von polyphenolischen Inhaltsstoffen fokussieren lässt. Vielmehr belegen verschiedene Studien, dass diese antioxidative Wirkung hauptsächlich auf Harnsäure zurückzuführen ist, die bei einer Frucht(-saft)-Intervention als Folge der hohen zugeführten Fruktosemenge im Plasma zirkuliert und in vielen Testsystemen eine erhebliche antioxidative Aktivität besitzt [Yuan et al. 2011; Godycki-Cwirko et al. 2010; Lotito und Frei 2006].

Neben einer fehlenden systemischen antioxidativen Wirkung der Intervention ist weiterhin anzumerken, dass auch eine Modulation des **CRP-Plasmaspiegels** durch die Intervention nicht feststellbar war. Letzteres muss jedoch nicht im Widerspruch zur eingangs vorgestellten Studie von Watzl et al. [2005] stehen, da in dieser Studie die zugeführte „Dosis“ an Obst und Gemüse im Vergleich zur hier beschriebenen Apfelsaftstudie mit 8 Portionen höher sowie die Auswahl der Produkte vielseitiger war. Beides, die Menge wie auch die Variation an Obst- und Gemüsesorten, beeinflussen das krebspräventive Potenzial der Ernährung [Jansen et al. 2004].

Im Rahmen dieser Studie wurden ferner verschiedene Kandidatengene typisiert, die nicht nur mit Symptomen des Metabolischen Syndroms assoziiert sind, sondern auch ein Risiko für das Kolonkarzinom darstellen können.

Interaktionen zwischen der Ernährung und dem Genom könnten nämlich die Ursache dafür sein, dass die Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf Risikofaktoren wie z. B. Plasmalipide, Blutdruck und Körpergewicht zwischen einzelnen Individuen sehr unterschiedlich ist [Katan et al. 1997]. Ergänzt um die Daten der Genotypisierungen zeigten unsere Ergebnisse, dass der Apfelsaft nicht nur generell in der gesamten Interventionsgruppe zu einer Abnahme des prozentualen Körperfetts führte, sondern eine signifikante Reduktion der Fettmasse ausschließlich in IL-6-174 C/C-, nicht jedoch in G/G- oder G/C-Varianten zu verzeichnen war.

Dieser **IL-6-174 SNP** wurde bereits als relevante Genvariante für Adipositas-assoziierte Pathologien beschrieben. So konnten Assoziationen zwischen dieser Genvariante und der Entstehung und Ausprägung von Übergewicht [Wernstedt et al. 2004] sowie der Körperfettmasse [Strandberg et al. 2008] festgestellt werden. Weiterhin wird auch das Erkrankungsrisiko für Bluthochdruck [Humphries et al. 2001] und Insulinresistenz [Goyenechea et al. 2007; Herbert et al. 2006] von diesem SNP mitbeeinflusst.

Dieser IL-6-Polymorphismus scheint jedoch nicht nur ein Marker für Risikogruppen Adipositas-assoziiierter Pathologien zu sein, sondern beeinflusst ferner die Bioaktivität von Nahrungsinhaltsstoffen in Bezug auf deren präventives Potenzial gegen weitere chronische Erkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass eine Polyphenol-reiche Ernährung erst in Verbindung mit niedrigen IL-6-Plasmaspiegeln [Bobe et al. 2010] oder unter Berücksichtigung des IL-6-174-SNP [Bobe et al. 2011] die Rezidiv-Rate von Kolonadenomen signifikant senken konnte. Auch die antiinflammatorische Wirkung eines Papaya-Extraktes war in einer mit Senioren durchgeführten Interventionsstudie nur unter Berücksichtigung der IL-6-Genvarianten signifikant [Marotta et al. 2007].

Zusammenfassend wird anhand dieser Ergebnisse das Postulat bestätigt, dass durch das genetische Profil eines Menschen nicht nur ein Erkrankungsrisiko determiniert werden kann, sondern in Wechselwirkung mit der Ernährung weiterhin das präventive (oder auch das krankmachende) Potenzial von Lebensmittelinhaltsstoffen beeinflusst wird.

Darauf aufbauend entwickeln sich im Bereich der Ernährungsforschung immer mehr Forschungsansätze, die Aspekte einer auf den genetischen Hintergrund abgestimmten „**individualisierten Ernährung**“ immer stärker berücksichtigen. Grundlegende mechanistische Studien zur Bioverfügbarkeit und Bioaktivität von Lebensmitteln und deren Inhaltsstoffen werden jedoch auch weiterhin in **Modellsystemen** (Zellkultur, Tiermodell) stattfinden. Diese werden daher auch in Zukunft eine wichtige Ergänzung zu **humanen Interventionsstudien** bilden.

3 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche epidemiologische Studien belegen den Zusammenhang zwischen Ernährungs- und Lebensstil-Faktoren mit dem Risiko, an einem Kolorektalkarzinom (KRK) zu erkranken. Verschiedene Obst-Arten, wie z.B. der Apfel, können das KRK-Risiko senken, während Adipositas und Typ 2-Diabetes das Risiko erhöhen. Wirkmechanismen, die eine Proliferationshemmung, Induktion der Apoptose sowie eine zytotoxische Wirkung von Apfelinhaltsstoffen in Tumorzellen vermitteln, wurden bislang in Zellkultursystemen charakterisiert. Ziel unserer *in vivo* Untersuchungen war es, die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf einen lebenden Organismus (Labortier, Mensch) zu überprüfen, um Aussagen zu einer möglichen krebspräventiven Wirkung machen zu können und zugrundeliegende Mechanismen *in vivo* aufzuklären. Bei den Interventions- und Fütterungsstudien standen Obst und Gemüse, sowie im Speziellen der Apfel im Fokus der Untersuchungen.

Im Rahmen humaner Interventionsstudien führte die tägliche Zufuhr von 8 Portionen Obst und Gemüse (100 g oder 200 mL pro Portion) im Vergleich zu einer niedrigen Aufnahme (2 Portionen) über einen Zeitraum von 4 Wochen zu einer signifikanten Abnahme des Inflammationsmarkers C-reaktives Protein (CRP) im Plasma. Hingegen hatte der tägliche Verzehr von 750 mL naturtrübem Apfelsaft über 4 Wochen bei Adipösen keinen Einfluss auf proinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF α) oder CRP. In dieser Studie wurde die Körperfettmasse, als ein weiterer Risikofaktor für KRK, durch den naturtrüben Apfelsaft im Vergleich zu einem isokalorischen Kontrollgetränk reduziert. Bei Trägern einer mutierten IL-6-174 C/C-Allelvariante führte die Apfelsaft-Intervention im Vergleich zum Kontrollgetränk zu einer signifikanten Abnahme des Körperfetts (-2%), während bei Probanden mit dem G/G- und G/C-Genotyp keine signifikante Reduktion des Körperfett-Anteils durch die 4-wöchige Apfelsaft-Intervention auftrat. Den Ergebnissen dieser zwei humanen Interventionsstudien zufolge, reduzierte bei Normalgewichtigen eine hohe

Verzehrmenge verschiedener Obst- und Gemüse-Arten den Inflammationsmarker CRP, der als Risikofaktor auch mit dem KRK-Risiko korreliert. Wird hingegen von Adipösen nur eine Obst-Art (Apfel) in Form eines Saftes aufgenommen, wird dieser Inflammationsmarker nicht beeinflusst, während die Körperfettmasse ausschließlich bei Probanden mit einem bestimmten IL-6 Genotyp reduziert wurde.

Parallel zu den Interventionsstudien durchgeführte tierexperimentelle Fütterungsstudien in einem mit dem Prokanzerogen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) chemisch induzierten KRK-Rattenmodell ergaben, dass die 7-wöchige *ad libitum* Aufnahme von täglich etwa 20 mL eines naturtrüben Apfelsaftes im Vergleich zur Trinkwasser-Gruppe neben einer signifikanten Reduktion großer präneoplastischer Dysplasien (-50%) auch genotoxische Schäden (-60%) und die epitheliale Hyperproliferation (-40%) im distalen Kolon signifikant reduzierte. Klarsaft, mit einer weitgehend fehlenden polysaccharidhaltigen Trubfraktion, hatte eine signifikante, jedoch geringere antiproliferative Wirkung (-15%), ohne eine signifikante Wirkung auf die Genotoxizität oder der Ausprägung (Größe, Anzahl) präneoplastischer Dysplasien. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass solche Substanzgruppen für die Bioaktivität des Trübsaftes verantwortlich sein könnten, die im Trübsaft entweder ausschliesslich, in einer höheren Menge oder anderem Spektrum (Polyphenole, Trub) als im Klarsaft vorkommen.

Auf diese Arbeitshypothese aufbauend, fand eine weitere Fütterungsstudie statt. Eine 7-wöchige Aufnahme zum Trübsaft adäquater Mengen einer Polyphenolfraktion (667 mg/l) oder Trubfraktion (750 mg/l) einzeln (Polyphenole: -20%; Trub: -24%) oder in Kombination (-20%) hatte nicht nur eine signifikant schwächere antiproliferative Wirkung als der Trübsaft (-35%) im Vergleich zur Trinkwassergruppe, sondern besaß auch keinen Einfluss auf die genotoxischen Schäden oder die Entwicklung präneoplastischer Dysplasien. Somit konnte auf Grundlage dieser Fütterungsstudie keine der Fraktionen als die Fraktion mit der Bioaktivität des Trübsaftes identifiziert werden.

In weiterführenden tierexperimentellen Studien wurde das KRK-Rattenmodell mit der Pathogenese einer Adipositas kombiniert, indem die Kanzerogenese mit

DMH in einem genetischen Adipositas-Rattenmodell (Zucker-obese-Ratte) induziert wurde. Adipositas (*obese: fa/fa*) führte im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe (*lean: Fa/+*) zu einer signifikanten, 20-fach höheren Anzahl DMH-induzierter präneoplastischer Dysplasien, während kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der genotoxischen Schäden und epithelialen Hyperproliferation im distalen Kolon zu beobachten war. Neben dem Körpergewicht und der Energieaufnahme, war die errechnete Korrelation der Plasma-Konzentrationen von Cholesterin, Triglyzerid und Malondialdehyd mit der Größe und Anzahl dieser Krebsvorstufen am höchsten. In diesem kombinierten Tiermodell ließ sich somit der pathophysiologische Zusammenhang zwischen Adipositas und der KRK-Kanzerogenese modellhaft simulieren.

Darauf aufbauend wurde in diesem kombinierten Tiermodell eine abschließende 9-wöchigen Fütterungsstudie mit einer täglichen Aufnahme von 10-15 ml Trübsaft oder eines isokalorischen Kontrollgetränkes (Zucker, Fruchtsäuren, Mineralien, Vitamin C, pH-Wert entsprechend Trübsaft) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass der Trübsaft im Vergleich zum Kontrollgetränk keinen Einfluss auf die DMH-induzierte epitheliale Hyperproliferation, genotoxische Schädigung sowie die Anzahl und Größe präneoplastischer Dysplasien im distalen Kolon hatte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aller Studien, dass durch den Verzehr von Obst und Gemüse oder von naturtrübem Apfelsaft verschiedene Parameter beeinflusst werden können, die nicht nur im Tiermodell sondern auch beim Menschen entweder als Risikofaktoren oder als beteiligte zelluläre Parameter im Kolon mit der Kanzerogenese assoziiert sind. Allerdings belegen die Studienergebnisse auch, dass nicht nur die Bioaktivität sondern wahrscheinlich auch die Verfügbarkeit der Lebensmittel (-Inhaltsstoffe) maßgeblich durch die Art der Darreichungsform (flüssig *versus* fest), das Spektrum und die Dosis der Lebensmittel (Obst/Gemüse *versus* Apfel-Saft *versus* Saft-Fraktion) sowie die Spezies (Mensch *versus* Laborratte), den Phänotyp (normalgewichtig *versus* adipös) und den Genotyp funktionell relevanter Polymorphismen beeinflusst wird.

Trotz dieser Limitierungen geben die vorgestellten *in vivo* Untersuchungen einen Hinweis auf mögliche zelluläre Mechanismen, die einer krebspräventiven Wirkung komplexer Lebensmittel zugrunde liegen könnten. Nach Beleg der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Tiermodell auf den Menschen wäre es in Zukunft somit möglich, durch ein entsprechendes Ernährungsverhalten (patho-) physiologische Prozesse im Sinne einer Chemoprävention frühzeitig zu beeinflussen.

Summary

Numerous epidemiological studies document a correlation between nutrition and lifestyle factors and the risk of developing colorectal cancer (CRC). Several types of fruit, for example apples, can lower the risk of developing CRC, whereas obesity and type II diabetes increase the risk.

Modes of action that inhibit tumor cell proliferation, induce apoptosis, and mediate cytotoxicity of apple compounds have so far been characterized in cell culture systems. The goal of the *in vivo* analyses was to examine whether the *in vitro* results could be transferred to a living organism (lab rodent, human) in order to draw conclusions as to a possible cancer preventive effect and to elucidate the underlying mechanisms *in vivo*. During the intervention and feeding studies fruits and vegetables, especially apples, were at the focal point of research.

In the course of human intervention studies, the daily intake of 8 portions of fruits and vegetables (100 g or 200 ml per portion) compared to a low intake (2 portions) over a period of 4 weeks lead to a significant decrease of the inflammation marker C-reactive protein (CRP) in plasma. In contrast, the daily consumption of 750 ml cloudy apple juice over a period of 4 weeks had no effect on proinflammatory cytokines (IL-6, TNF α) or CRP in obese subjects. In this study the body fat mass, as an additional risk factor for CRC, was reduced by the cloudy apple juice compared to an isocaloric control beverage. In individuals bearing a mutated IL-6-174 C/C allelic variation the apple juice intervention lead to a significant reduction (-2 %) of body fat mass compared to the control beverage, whereas subjects with the G/G and G/C genotype did not show a significant reduction of the body fat mass. According to the results of these two intervention studies, a high consumption of various types of fruits and vegetables by normal-weight subjects reduced the inflammation marker CRP, which also correlates as a risk factor for CRC. However, when obese subjects consumed only one type of fruit (apples) in form of apple juice, this inflammation marker was not influenced, while the body fat mass was only reduced in subjects with a specific IL-6 genotype.

Animal feeding studies were performed in a rodent model, chemically induced with the procarcinogen 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) for developing CRC. The 7-week *ad libitum* intake of approx. 20 ml cloudy apple juice daily compared to a

drinking water group aside from reducing large preneoplastic dysplasia (-50 %) also significantly reduced genotoxic damages (-60 %) and the epithelial hyperproliferation (-40 %) in the distal colon. Clear apple juice, mostly lacking the polysaccharide-containing cloud fraction, either had a significantly lower antiproliferative effect than the cloudy juice (-15 %) or completely lack bioactivity on genotoxicity and grade (size, number) of preneoplastic dysplasia. These results indicate that those substance groups could be responsible for the bioactivity of the cloudy juice which either occur exclusively or in a higher amount, or in another spectrum (polyphenols, cloud) than in the clear juice.

As deduced from this working hypothesis, another feeding study was conducted. Based on the concentrations in cloudy juice, a 7-week intake of comparable amounts of a polyphenol fraction (667 mg/l) or cloud fraction (750 mg/l), separately (polyphenols: -20 %; cloud: -24 %) or in combination (-20 %), not only had a significantly weaker antiproliferative effect than the cloudy juice (-35 %) compared to the drinking water group, but also had no influence on the genotoxic damages or the development of preneoplastic dysplasia. Therefore, on the basis of this feeding study none of the fractions could be identified as the fraction with the bioactivity of the cloudy juice.

In continuing animal studies the CRC rodent model was combined with the pathogenesis of obesity by inducing the carcinogenesis with DMH in a genetically obese rat model (Zucker obese rat). Obesity (obese: fa/fa) compared to the normal-weight control group (lean: Fa/+) lead to a significant, 20 times higher number of DMH-induced preneoplastic dysplasia, while no significant difference regarding epithelial genotoxicity and hyperproliferation in the distal colon could be detected. Aside from a close calculated correlation of body weight and energy intake with pre-cancer stages, the correlation of the plasma concentrations of cholesterol, triglycerides, and malondialdehyde with the size and number of these preneoplastic dysplasia was the highest. Thus, in this combined animal model the pathophysiological relationship between obesity and the CRC carcinogenesis was successfully simulated.

Based on these results we took this combined animal model and conducted a final 9-week feeding study with a daily intake of 10 – 15 ml cloudy juice or an isocaloric control beverage (sugar, fruit acids, minerals, vitamin C, pH-value

corresponding to cloudy juice). In obese, the cloudy juice compared to the control did not influence the DMH-induced epithelial hyperproliferation, genotoxic damage, as well as number and size of preneoplastic dysplasia in the distal colon.

In conclusion, the results of all studies demonstrate that by consuming fruits and vegetables or cloudy apple juice several parameters can be influenced, which not only in rodents but also in humans are associated with the colon carcinogenesis either as risk factors or as contributing cellular parameters.

However, the study results also prove that not only bioactivity but probably also bioavailability of the foods (or food compounds) are significantly influenced by the type of formulation (liquid vs. solid), the spectrum and dose of the foods (fruits/vegetables vs. apple juice vs. juice fraction), as well as the species (human vs. rodent), the phenotype (normal-weight vs. obese), and the genotype of functionally relevant polymorphisms.

In spite of these limitations, the presented *in vivo* analyses provide an indication of possible cellular mechanisms that could be the basis of the cancer preventive effect of complex foods.

After having demonstrated that the results of the rodent models can be transferred to the human status, it would consequently be possible in future to influence at an early stage (patho-) physiological processes in terms of a chemoprevention through appropriate dietary behaviour.

4 EIGENER ANTEIL AN DEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEITEN

Der Anteil der beteiligten Autorinnen und Autoren an den Publikationen 1-6 wird wie folgt differenziert:

1. Idee, Versuchsdesign
2. Methodenentwicklung
3. Versuchsdurchführung
4. Auswertung, Diskussion
5. Erstellen des Manuskripts
6. Korrespondierender Autor

1 **Barth SW**, Koch TCL, Watzl B, Dietrich H, Will F, Bub A (2011) Moderate effects of apple juice consumption on obesity related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. Eur J Nutr [epub ahead of print]

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Barth, Bub |
| 2. Methodenentwicklung | Barth, Bub, Koch, Will, Dietrich |
| 3. Versuchsdurchführung | Barth, Bub, Koch, |
| 4. Auswertung, Diskussion | Barth, Bub, Koch, Watzl |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Barth, Bub, Koch, Watzl, Will, Dietrich |
| 6. Korrespondierender Autor | Bub |

2 Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Fährdrich C, Bub A, Rechkemmer G, **Barth SW** (2009) Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: Impact of juice constituents and obesity. Mol Nutr Food Res 53: 1289-1302.

- | | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Barth |
| 2. Methodenentwicklung | Barth, Bub, Koch, Fährdrich, Briviba |
| 3. Versuchsdurchführung | Barth, Koch, Fährdrich |

-
- | | |
|------------------------------|---|
| 4. Auswertung, Diskussion | Barth, Bub, Koch, Briviba, Watzl |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Barth, Bub, Koch, Briviba, Watzl, Rechkemmer |
| 6. Korrespondierender Autor | Barth |

3 Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Bub A, **Barth SW** (2008) Obesity-related promotion of aberrant crypt foci in DMH-treated obese Zucker rats correlates with dyslipidemia rather than hyperinsulinemia. Eur J Nutr 47: 161-170.

- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Barth |
| 2. Methodenentwicklung | Barth, Bub, Koch, Briviba |
| 3. Versuchsdurchführung | Barth, Koch |
| 4. Auswertung, Diskussion | Barth, Bub, Koch, Briviba, Watzl |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Barth, Bub, Koch, Briviba, Watzl, |
| 6. Korrespondierender Autor | Barth |

4 **Barth SW**, Fähndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. J Agric Food Chem 55: 1181-1187.

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Barth |
| 2. Methodenentwicklung | Barth, Bub, Fähndrich, Will, Briviba |
| 3. Versuchsdurchführung | Barth, Fähndrich |
| 4. Auswertung, Diskussion | Barth, Bub, Fähndrich, Will, Dietrich, Briviba, Watzl, Rechkemmer |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Barth, Bub, Koch, Briviba, Will, Watzl |
| 6. Korrespondierender Autor | Barth |

5 Watzl B, Kulling SE, Möseneder J, **Barth SW**, Bub A (2005) A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. *Am J Clin Nutr* 82: 1052-1058.

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Watzl, Bub, Barth |
| 2. Methodenentwicklung | Watzl, Bub, Barth, Kulling |
| 3. Versuchsdurchführung | Bub, Möseneder |
| 4. Auswertung, Diskussion | Watzl, Bub, Barth, Kulling, Möseneder |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Watzl, Bub, Barth, Kulling, Möseneder |
| 6. Korrespondierender Autor | Watzl |

6 **Barth SW**, Fähndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G (2005) Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. *Carcinogenesis* 26: 1414-1421.

| | |
|------------------------------|---|
| 1. Idee, Versuchsdesign | Barth |
| 2. Methodenentwicklung | Barth, Bub, Fähndrich, Will, Briviba, Watzl |
| 3. Versuchsdurchführung | Barth, Fähndrich |
| 4. Auswertung, Diskussion | Barth, Bub, Fähndrich, Will, Dietrich, Briviba, Watzl, Rechkemmer |
| 5. Erstellen des Manuskripts | Barth, Bub, Koch, Briviba, Will, Watzl, Rechkemmer |
| 6. Korrespondierender Autor | Barth |

5 LITERATURVERZEICHNIS

Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martínez MC, Andriantsitohaina R (2009) Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One* 4: 1-8.

Alao JP (2007) The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 6: 24-40.

Aleixandre A, Miguel M (2008) Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48: 905-912.

Aleksandrova K, Jenab M, Boeing H, Jansen E, Bueno-de-Mesquita HB, Rinaldi S, Riboli E, Overvad K, Dahm CC, Olsen A, Tjønneland A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Palli D, Krogh V, Tumino R, Vineis P, Panico S, Kaaks R, Rohrmann S, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, van Duijnhoven FJ, Leufkens AM, Peeters PH, Rodríguez L, Bonet C, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Navarro C, Barricarte A, Palmqvist R, Hallmans G, Khaw KT, Wareham N, Allen NE, Spencer E, Romaguera D, Norat T, Pischon T (2010) Circulating C-reactive protein concentrations and risks of colon and rectal cancer: a nested case-control study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol* 172: 407-418.

Allin KH, Bojesen SE, Nordestgaard BG (2009) Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol* 27:2217-2224.

Alonso-Salces RM, Barranco A, Abad B, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2004) Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *J Agric Food Chem* 52: 2938-2952.

American Cancer Society (2012) *Cancer facts & figures 2012*. Atlanta, Ga: American Cancer Society.

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (1999) Immunomodulatory activity of curcumin. *Immunol Invest* 28: 291-303.

Balavenkatraman KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Ostman A, Böhmer FD (2006) DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* 25: 6319-6324.

Barnes CJ, Cameron IL, Hardman WE, Lee M (1998) Non-steroidal anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *Br J Cancer* 77: 573-580.

Barth SW, Faehndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. *J Agric Food Chem* 55: 1181-1187.

Basile A, Giordano S, Lopez-Saez JA, Cobianchi RC (1999) Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479-1482.

Beatty ER, O'Reilly JD, England TG, McAnlis GT, Young IS, Geissler CA, Sanders TA, Wiseman H (2000) Effect of dietary quercetin on oxidative DNA damage in healthy human subjects. *Br J Nutr* 84: 919-925.

Bellion P, Digles J, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2010) Polyphenolic apple extracts: effect of raw material and production method on antioxidant effectiveness and reduction of DNA damage in CaCo-2 cells. *J Agric Food Chem* 58: 6636-6642.

Bellion P, Hofmann T, Pool-Zobel BL, Will F, Dietrich H, Knaup B, Richling E, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2008) Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2. *J Agric Food Chem* 56: 6310-6317.

Bingham SA, Norat T, Moskal A, Ferrari P, Slimani N, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, González CA, Ardanaz E, Navarro C, Quirós JR, Key TJ, Day NE, Trichopoulou A, Naska A, Krogh V, Tumino R, Palli D, Panico S, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Ocké MC, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E (2005) Is the association with fiber from foods in colorectal cancer confounded by folate intake? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1552-1556.

Bird RP, Good CK (2000) The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Toxicol Lett* 112-113: 395-402.

Bird RP (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37: 147-151.

Block G, Patterson B, Subar A (1992) Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29.

Bobe G, Albert PS, Sansbury LB, Lanza E, Schatzkin A, Colburn NH, Cross AJ (2010) Interleukin-6 as a potential indicator for prevention of high-risk adenoma recurrence by dietary flavonols in the polyp prevention trial. *Cancer Prev Res* 3: 764-775.

Bobe G, Murphy G, Albert PS, Sansbury LB, Young MR, Lanza E, Schatzkin A, Colburn NH, Cross AJ (2011) Do interleukin polymorphisms play a role in the prevention of colorectal adenoma recurrence by dietary flavonols? *Eur J Cancer Prev* 20: 86-95.

Boeing H, Bohlscheid-Thomas S, Voss S, Schneeweiss S, Wahrendorf J (1997) The relative validity of vitamin intakes derived from a food frequency questionnaire compared to 24-hour recalls and biological measurements: results from the EPIC pilot study in Germany. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Epidemiol* 26: S82-90.

Briviba K, Bub A, Möseneder J, Schwerdtle T, Hartwig A, Kulling S, Watzl B (2008) No differences in DNA damage and antioxidant capacity between intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr Cancer* 60: 164-170.

Briviba K, Stracke BA, Rüfer CE, Watzl B, Weibel FP, Bub A (2007) Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *J Agric Food Chem* 55: 7716-7721.

Cabrera M, Lavaggi ML, Croce F, Celano L, Thomson L, Fernández M, Pintos C, Raymondo S, Bollati M, Monge A, López de Ceráin A, Piro OE, Cerecetto H, González M (2010) Identification of chalcones as in vivo liver monofunctional phase II enzymes inducers. *Bioorg Med Chem* 18: 5391-5399.

Caderni G, De Filippo C, Luceri C, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, Remy S, Cheynier V, Dolara P (2000) Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* 21: 1965-1969.

Cao Y, Gao X, Zhang W, Zhang G, Nguyen AK, Liu X, Jimenez F, Cox CS Jr, Townsend CM Jr, Ko TC (2011) Dietary fiber enhances TGF-beta signaling and growth inhibition in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Epub ahead of print].

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, Hernández-Lizoain JL, Baixauli J, Valentí V, Pardo F, Salvador J, Frühbeck G (2011) Up-regulation of the novel proinflammatory adipokines lipocalin-2, chitinase-3 like-1 and osteopontin as well as angiogenic-related factors in visceral adipose tissue of patients with colon cancer. *J Nutr Biochem* 22: 634-641.

Chachay VS, Kirkpatrick CM, Hickman IJ, Ferguson M, Prins JB, Martin JH (2011) Resveratrol - pills to replace a healthy diet? *Br J Clin Pharmacol* 72: 27-38.

Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, de Graft-Johnson J, Krajewski W, Krol M, Markowski J, Kostka T, Nowak D (2008) Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 46: 342-349.

Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL (1996) Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* 45: 1141-1143.

Chung YS, Song IS, Erickson RH, Sleisenger MH, Kim YS (1985) Effect of growth and sodium butyrate on brush border membrane-associated hydrolases in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res* 45: 2976-2982.

Comalada M, Bailón E, de Haro O, Lara-Villoslada F, Xaus J, Zarzuelo A, Gálvez J (2006) The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 487-497.

Coradini D, Biffi A, Costa A, Pellizzaro C, Pirronello E, Di Fronzo G (1997) Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines. *Cell Prolif* 30: 149-159.

Corpet DE, Tache S (2002) Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer* 43: 1-21.

Davis PA, Polagruto JA, Valacchi G, Phung A, Soucek K, Keen CL, Gershwin ME (2006) Effect of apple extracts on NF-kappaB activation in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Biol Med* 231: 594-598.

de Kok TM, van Breda SG, Briedé JJ (2011) Genomics-based identification of molecular mechanisms behind the cancer preventive action of phytochemicals: potential and challenges. *Curr Pharm Biotechnol* [Epub ahead of print].

de Kok TM, van Breda SG, Manson MM (2008) Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr* 47: 51-59.

Del Rio D, Borges G, Crozier A (2010) Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Br J Nutr* 104: S67-90.

Deneo-Pellegrini H, De SE, Ronco A (1996) Vegetables, fruits, and risk of colorectal cancer: a case-control study from Uruguay. *Nutr Cancer* 25: 297-304.

Dietrich H, Peceroni S, Gierschner K, Zimmer E, Will F (1996) Neue Erkenntnisse zu dem Phänomen der Trübungsstabilität. Erste Ergebnisse aus dem laufenden Forschungsprogramm. Flüssiges Obst 63: 7-10.

Doll R and Peto R (1981) *The causes of cancer*, Oxford University Press, Oxford, UK.

Drew JE, Farquharson AJ, Padidar S, Duthie GG, Mercer JG, Arthur JR, Morrice PC, Barrera LN (2007) Insulin, leptin, and adiponectin receptors in colon: regulation relative to differing body adiposity independent of diet and in response to dimethylhydrazine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G682-691.

Druckrey H (1970) Production of colon carcinoma by 1,2-dimethylhydrazines and axozyalkanes. In: *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium/ comp. and ed. by Walter J. Burdette, Springfield, Ill, 578-579.*

Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC (1997) Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 57: 4667-4672.

Ealey KN, Lu S, Archer MC (2008) Development of aberrant crypt foci in the colons of ob/ob and db/db mice: evidence that leptin is not a promoter. *Mol Carcinog* 47: 667-677.

Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405: 903-904.

Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A (2011) Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut* [Epub ahead of print].

Escarpa A, Gonzalez MC (1998) High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromatogr A* 823: 331-337.

Fair AM, Montgomery K (2009) Energy balance, physical activity, and cancer risk. *Methods Mol Biol* 472: 57-88.

Feinberg A, Zedeck MS (1980) Production of a highly reactive alkylating agent from the organospecific carcinogen methylazoxymethanol by alcohol dehydrogenase. *Cancer Res* 40: 4446-4450.

Ferguson LR (2010) Dietary influences on mutagenesis--where is this field going? *Environ Mol Mutagen* 51: 909-918.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581-592.

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46: 765-781.

Festa A, D'Agostino R Jr, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, Haffner SM (2001) The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*;25: 1407-1415.

Fini L, Selgrad M, Fogliano V, Graziani G, Romano M, Hotchkiss E, Daoud YA, De Vol EB, Boland CR, Ricciardiello L (2007) Annurca apple polyphenols have potent demethylating activity

and can reactivate silenced tumor suppressor genes in colorectal cancer cells. *J Nutr* 137: 2622-2628.

Forester SC, Waterhouse AL (2010) Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 58: 5320-5327.

Freedman LS, Schatzkin A, Midthune D, Kipnis V (2011) Dealing with dietary measurement error in nutritional cohort studies. *J Natl Cancer Inst* [Epub ahead of print].

Fridrich D, Kern M, Pahlke G, Volz N, Will F, Dietrich H, Marko D (2007) Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* 51: 594–601.

Fujita H, Nagano K, Ochiai M, Ushijima T, Sugimura T, Nagao M, Matsushima T (1999) Difference in target organs in carcinogenesis with a heterocyclic amine, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline, in different strains of mice. *Jpn J Cancer Res* 90: 1203-1206.

Gallagher DJ, Smith JD, Offit K, Stadler ZK (2010) Diagnosing hereditary colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 9: 205-211.

Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, Evert M, El-Najjar N, Peters B, Jurjus A, Roessner A, Schneider-Stock R (2008) Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *J Cell Mol Med* 12: 330-342.

Gallus S, Talamini R, Giacosa A, Montella M, Ramazzotti V, Franceschi S, Negri E, La VC (2005) Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann Oncol* 16: 1841-1844.

Gerhauser C (2008) Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med* 74: 1608-1624.

Godycki-Cwirko M, Krol M, Krol B, Zwolinska A, Kolodziejczyk K, Kasielski M, Padula G, Grębocki J, Kazimierska P, Miatkowski M, Markowski J, Nowak D (2010) Uric acid but not apple polyphenols is responsible for the rise of plasma antioxidant activity after apple juice consumption in healthy subjects. *J Am Coll Nutr* 29: 397-406.

Gonzalez CA, Riboli E (2010) Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 46: 2555-2562.

Gossé F, Roussi S, Guyot S, Schoenfelder A, Mann A, Bergerat JP, Seiler N, Raul F (2006) Potentiation of apple procyanidin-triggered apoptosis by the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 in human colon cancer-derived metastatic cells. *Int J Oncol* 29: 423–428.

Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26: 1291–1295.

Goyenechea E, Parra D, Martínez JA (2007) Impact of interleukin 6 -174G>C polymorphism on obesity-related metabolic disorders in people with excess in body weight. *Metabolism* 56: 1643-1648.

Gravaghi C, Bo J, Laperle KM, Quimby F, Kucherlapati R, Edelmann W, Lamprecht SA (2008) Obesity enhances gastrointestinal tumorigenesis in Apc-mutant mice. *Int J Obes* 32: 1716-1719.

Gunter MJ, Leitzmann MF (2006) Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. *J Nutr Biochem* 17: 145-156.

Gunter MJ, Stolzenberg-Solomon R, Cross AJ, Leitzmann MF, Weinstein S, Wood RJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D, Sinha R (2006) A prospective study of serum C-reactive protein and colorectal cancer risk in men. *Cancer Res* 66: 2483-2487.

Gupta AK, Schoen RE (2009) Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Curr Opin Gastroenterol* 25: 59-65.

Hambly RJ, Rumney CJ, Cunninghame M, Fletcher JM, Rijken PJ, Rowland IR (1997) Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. *Carcinogenesis* 18: 1535-1539.

Herbert A, Liu C, Karamohamed S, Liu J, Manning A, Fox CS, Meigs JB, Cupples LA (2006) BMI modifies associations of IL-6 genotypes with insulin resistance: the Framingham Study. *Obesity* 14: 1454-1561.

Herron DC, Shank RC (1982) DNA methylation during chronic administration of 1,2-dimethylhydrazine in a carcinogenic regimen *Carcinogenesis* 3: 857-860.

Hirose Y, Hata K, Kuno T, Yoshida K, Sakata K, Yamada Y, Tanaka T, Reddy BS, Mori H (2004) Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis* 25: 821-825.

Holderness J, Jackiw L, Kimmel E, Kerns H, Radke M, Hedges JF, Petrie C, McCurley P, Glee PM, Palecanda A, Jutila MA (2007) Select plant tannins induce IL-2R α up-regulation and augment cell division in gammadelta T cells. *J Immunol* 179: 6468-6478.

Huang XF, Chen JZ (2009) Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer. *Obes Rev* 10: 610-616.

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ (2001) The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 22: 2243-2252.

Ip C, Ganther HE (1991) Combination of blocking agents and suppressing agents in cancer prevention. *Carcinogenesis* 12: 365-367.

Ito N, Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Esumi H, Takayama S, Sugimura T (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 12: 1503-1506.

Ito Y, Suzuki K, Tamakoshi K, Wakai K, Kojima M, Ozasa K, Watanabe Y, Kawado M, Hashimoto S, Suzuki S, Tokudome S, Toyoshima H, Hayakawa N, Kato K, Watanabe M, Ohta Y, Maruta M, Tamakoshi A; JACC Study Group (2005) Colorectal cancer and serum C-reactive protein levels: a case-control study nested in the JACC Study. *J Epidemiol*;15: S185-189.

Jackson PE, O'Connor PJ, Cooper DP, Margison GP, Povey AC (2003) Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 24: 527-533.

Jaiswal AK (2000) Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29: 254-262.

- Jansen MC, Bueno-de-Mesquita HB, Feskens EJ, Streppel MT, Kok FJ, Kromhout D (2004) Quantity and variety of fruit and vegetable consumption and cancer risk. *Nutr Cancer* 48: 142-148.
- Kant P, Hull MA (2011) Excess body weight and obesity--the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 224-238.
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 141: 980-987.
- Karmiris K, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA (2005) The emerging role of adipocytokines as inflammatory mediators in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 11: 847-855.
- Katan MB, Grundy SM, Willett WC (1997) Should a low-fat, high-carbohydrate diet be recommended for everyone? Beyond low-fat diets. *N Engl J Med* 337: 563-566.
- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, Sigman CC (2000) Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 130: 467S-471S.
- Kern M, Pahlke G, Balavenkatraman KK, Bohmer FD, Marko D (2007) Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 55: 4999-5006.
- Kern M, Pahlke G, Ngiewih Y, Marko D (2006) Modulation of key elements of the Wnt pathway by apple polyphenols. *J Agric Food Chem* 54: 7041-7046.
- Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D (2005) Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 49: 317-328.
- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2003) Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- α expression. *Diabetes* 52: 1779-1785.
- Key TJ (2011) Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer* 104: 6-11.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H (2010) Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 293: 133-143.
- Ko SH, Choi SW, Ye SK, Cho BL, Kim HS, Chung MH (2005) Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J Med Food* 8: 41-46.
- Koenuma M, Yamori T, Tsuruo T (1989) Insulin and insulin-like growth factor 1 stimulate proliferation of metastatic variants of colon carcinoma 26. *Jpn J Cancer Res* 80: 51-58.
- Koohestani N, Tran TT, Lee W, Wolever TM, Bruce WR (1997) Insulin resistance and promotion of aberrant crypt foci in the colons of rats on a high-fat diet. *Nutr Cancer* 29: 69-76.
- Kundu JK, Surh YJ (2005) Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Mutat Res* 591: 123-146.
- Lamperi L, Chiuminatto U, Cincinelli A, Galvan P, Giordani E, Lepri L, Del Bubba M (2008) Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *J Agric Food Chem* 56: 6536-6546.

Lasko CM, Bird RP (1995) Modulation of aberrant crypt foci by dietary fat and caloric restriction: the effects of delayed intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 49-55.

Lattanzio V, Di VD, Linsalata V, Bertolini P, Ippolito A, Salerno M (2001) Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *J Agric Food Chem* 49: 5817-5821.

Lawley PD (1994) Historical origins of current concepts of carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 65: 17-111.

Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY (2003) Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 51: 6516-6520.

Lee SK, Song L, Mata-Greenwood E, Kelloff GJ, Steele VE, Pezzuto JM (1999) Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res* 19: 35-44.

Lhoste EF, Bruneau A, Bensaada M, Cherbuy C, Philippe C, Bruel S, Sutren M, Rabot S, Guyot S, Duée PH, Latino-Martel P (2010) Apple proanthocyanidins do not reduce the induction of preneoplastic lesions in the colon of rats associated with human microbiota. *J Agric Food Chem* 58: 4120-4125.

Li Y, Liu L, Niu Y, Feng J, Sun Y, Kong X, Chen Y, Chen X, Gan H, Cao S, Mei Q (2011) Modified apple polysaccharide prevents against tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer: role of galectin-3 and apoptosis in cancer prevention. *Eur J Nutr* [Epub ahead of print].

Li Y, Niu Y, Wu H, Sun Y, Li Q, Kong X, Liu L, Mei Q (2010) Modified apple polysaccharides could induce apoptosis in colorectal cancer cells. *J Food Sci* 75: H224-229.

Lotito SB, Frei B (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 41: 1727-1746.

Lund EK, Belshaw NJ, Elliott GO, Johnson IT (2011) Recent advances in understanding the role of diet and obesity in the development of colorectal cancer. *Proc Nutr Soc* 70: 194-204.

Maffei F, Tarozzi A, Carbone F, Marchesi A, Hrelia S, Angeloni C, Forti GC, Hrelia P (2007) Relevance of apple consumption for protection against oxidative damage induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Br J Nutr* 97: 921-927.

Mai V, Colbert LH, Berrigan D, Perkins SN, Pfeiffer R, Lavigne JA, Lanza E, Haines DC, Schatzkin A, Hursting SD (2003) Calorie restriction and diet composition modulate spontaneous intestinal tumorigenesis in *Apc(min)* mice through different mechanisms. *Cancer Res* 63: 1752-1725.

Maldonado-Celisa ME, Roussia S, Foltzer-Jourdainne C, Gossé F, Lobstein A, Habold C, Roessner A, Schneider-Stock R, Raul F (2008) Modulation by polyamines of apoptotic pathways triggered by procyanidins in human metastatic SW620 cells. *Cell Mol Life Sci* 65: 1425-1434.

Manjgaladze M, Chen S, Frame LT, Seng JE, Duffy PH, Feuers RJ, Hart RW, Leakey JE (1993) Effects of caloric restriction on rodent drug and carcinogen metabolizing enzymes: implications for mutagenesis and cancer. *Mutat Res* 295: 201-222.

- Marotta F, Koike K, Lorenzetti A, Naito Y, Fayet F, Shimizu H, Marandola P (2007) Nutraceutical strategy in aging: targeting heat shock protein and inflammatory profile through understanding interleukin-6 polymorphism. *Ann N Y Acad Sci* 1119: 196-202.
- Mayer B, Schumacher M, Brandstätter H, Wagner FS, Hermetter A (2001) High-throughput fluorescence screening of antioxidative capacity in human serum. *Anal Biochem* 297: 144-153.
- McCann MJ, Gill CI, O' Brien G, Rao JR, McRoberts WC, Hughes P, McEntee R, Rowland IR (2007) Anticancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food Chem Toxicol* 45: 1224-1230.
- McIntyre A, Gibson PR, Young GP (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 34: 386-391.
- McLellan EA, Bird RP (1988) Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* 48: 6187-6192.
- Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD (1997) Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 57: 3697-3707.
- Mentor-Marcel RA, Bobe G, Barrett KG, Young MR, Albert PS, Bennink MR, Lanza E, Colburn NH (2009) Inflammation-associated serum and colon markers as indicators of dietary attenuation of colon carcinogenesis in ob/ob mice. *Cancer Prev Res* 2: 60-69.
- Michels KB, Giovannucci E, Chan AT, Singhanian R, Fuchs CS, Willett WC (2006) Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* 66: 3942-3953.
- Miller EC, Miller JA (1981) Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 47: 1055-1064.
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K (2007) Effect of apple polyphenol extract on hepatoma proliferation and invasion in culture and on tumor growth, metastasis, and abnormal lipoprotein profiles in hepatoma-bearing rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 2743-2750.
- Moon YJ, Wang X, Morris ME (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20: 187-210.
- Mori H, Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hara A (2005) Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 155: 1-9.
- Mortensen PB, Clausen MR (1996) Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 216: 132-148.
- Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, Shibuya Y, Hase T (2011) Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E122-133.
- Nagasawa HT, Shirota FN, Matsumoto H (1972) Decomposition of methylazoxymethanol, the glycone of cycasin, in D 2 O. *Nature* 236: 234-235.
- Namasivayam N (2011) Chemoprevention in experimental animals. *Ann N Y Acad Sci* 1215: 60-71.
- National Institutes of Health (2004) Federal Register 69: 55821-55822.

Nomura AM, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Pike MC, Kolonel LN (2008) Association of vegetable, fruit, and grain intakes with colorectal cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 88: 730-737.

Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD (2004) Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agric Food Chem* 52: 7264-7271.

Omenn GS (1996) Micronutrients (vitamins and minerals) as cancer-preventive agents. *IARC Sci Publ* 96: 33-45.

Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT (2011) Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res* 55: 32-45.

Pappou EP, Ahuja N (2010) The role of oncogenes in gastrointestinal cancer. *Gastrointest Cancer Res Suppl* 1: S2-S15.

Park SY, Kim JS, Seo YR, Sung MK (2011) Effects of diet-induced obesity on colitis-associated colon tumor formation in A/J mice. *Int J Obes* [Epub ahead of print].

Park Y, Subar AF, Kipnis V, Thompson FE, Mouw T, Hollenbeck A, Leitzmann MF, Schatzkin A (2007) Fruit and vegetable intakes and risk of colorectal cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Am J Epidemiol* 166: 170-180.

Patel AC, Nunez NP, Perkins SN, Barrett JC, Hursting SD (2004) Effects of energy balance on cancer in genetically altered mice. *J Nutr* 134: 3394S-3398S.

Peceroni S, Gierschner K (1993) Trübe Fruchtsäfte und fruchthaltige Getränke mit schwebstabilen Trubstoffen. *Getränkeindustrie* 10: 788-798.

Pegg AE, Byers TL (1992) Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *FASEB J* 6: 2302-2310.

Pendyala S, Neff LM, Suárez-Fariñas M, Holt PR (2011) Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* 93: 234-242.

Pierini R, Kroon PA, Guyot S, Ivory K, Johnson IT, Belshaw NJ (2008) Procyanidin effects on oesophageal adenocarcinoma cells strongly depend on flavan-3-ol degree of polymerization. *Mol Nutr Food Res* 52: 1399-1407.

Pitot HC, Dragan YP (1991) Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J* 5: 2280-2286.

Pitot HC (1989) Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80: 599-607.

Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, Muckel E, Glatt H (2010) Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res* 703: 90-98.

Platz EA (2002) Energy imbalance and prostate cancer. *J Nutr* 132: 3471S-3481S.

Pohl C, Will F, Dietrich H, Schrenk D (2006) Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J Agric Food Chem* 54: 10262-10268.

- Poudyal H, Campbell F, Brown L (2010) Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr* 140: 946-953.
- Poulsen M, Mortensen A, Binderup ML, Langkilde S, Markowski J, Dragsted LO (2011) The effect of apple feeding on markers of colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 63: 402-409.
- Pravenec M, Kajiya T, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Simáková M, Silhavý J, Malínská H, Oliyarnyk O, Kazdová L, Fan J, Wang J, Kurtz TW (2011) Effects of human C-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension* 57: 731-737.
- Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51: 1564-1567.
- Qin X, Shibata D, Gerson SL (2000) Heterozygous DNA mismatch repair gene PMS2-knockout mice are susceptible to intestinal tumor induction with N-methyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* 21: 833-838.
- Raju J, Bird RP (2003) Energy restriction reduces the number of advanced aberrant crypt foci and attenuates the expression of colonic transforming growth factor beta and cyclooxygenase isoforms in Zucker obese (fa/fa) rats. *Cancer Res* 63: 6595-6601.
- Raju J (2008) Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer. *World J Gastroenterol* 14: 6632-6635.
- Rao CV, Chou D, Simi B, Ku H, Reddy BS (1998) Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis* 19: 1815-1819.
- Raucy JL, Lasker JM, Kraner JC, Salazar DE, Lieber CS, Corcoran GB (1991) Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat. *Mol Pharmacol* 39: 275-280.
- Reagan-Shaw S, Eggert D, Mukhtar H, Ahmad N (2010) Antiproliferative effects of apple peel extract against cancer cells. *Nutr Cancer* 62: 517-524.
- Reddy BS, Watanabe K, Weisburger JH (1977) Effect of high-fat diet on colon carcinogenesis in F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, or methylnitrosourea. *Cancer Res* 37: 4156-4159.
- Reddy BS, Watanabe K (1978) Effect of intestinal microflora on 2,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 61: 1269-1271.
- Renkawitz A (1999) Bioaktive sekundäre Pflanzenstoffe. *Ernährungsreport* 7: 3-10.
- Rogers KJ, Pegg AE (1977) Formation of O6-methylguanine by alkylation of rat liver, colon, and kidney DNA following administration of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 37: 4082-4087.
- Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, Rosenberg R, Marthen C, Doll D, Holzmann B, Siewert JR, Janssen KP (2007) Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer* 121: 1717-1723.
- Rondini EA, Harvey AE, Steibel JP, Hursting SD, Fenton JI (2011) Energy balance modulates colon tumor growth: Interactive roles of insulin and estrogen. *Mol Carcinog* 50: 370-382.

Sánchez D, Quiñones M, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A (2011) Soluble fiber-enriched diets improve inflammation and oxidative stress biomarkers in Zucker fatty rats. *Pharmacol Res* 64: 31-35.

Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C (2006a) Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 50: 24-33.

Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C (2006b) Modulation of oxidative cell damage by reconstituted mixtures of phenolic apple juice extracts in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 50: 413-417.

Schatzkin A, Mouw T, Park Y, Subar AF, Kipnis V, Hollenbeck A, Leitzmann MF, Thompson FE (2007) Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Clin Nutr* 85: 1353-1360.

Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, Dobs A, Savage PJ (1999) Increased blood glucose and insulin, body size, and incident colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1147-1154.

Schoental R, Bensted JP (1969) Gastro-intestinal tumours in rats and mice following various routes of administration of N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine and N-ethyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine. *Br J Cancer* 23: 757-764.

Seiler N, Chaabi M, Roussi S, Gossé F, Lobstein A, Raul F (2006) Synergism between apple procyanidins and lysosomotropic drugs: Potential in chemoprevention. *Anticancer Res* 26: 3381-3385.

Shureiqi I, Reddy P, Brenner DE (2000) Chemoprevention: general perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 33: 157-167.

Siemes C, Visser LE, Coebergh JW, Splinter TA, Witteman JC, Uitterlinden AG, Hofman A, Pols HA, Stricker BH (2006) C-reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam Study. *J Clin Oncol* 24: 5216-5222.

Sohn OS, Fiala ES, Requeijo SP, Weisburger JH, Gonzalez FJ (2001) Differential effects of CYP2E1 status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer Res* 61: 8435-8440.

Spada PD, de Souza GG, Bortolini GV, Henriques JA, Salvador M (2008) Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *J Med Food* 11: 144-151.

Sporn MB, Newton DL (1979) Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* 38: 2528-2534.

Sporn MB (2011) Perspective: The big C - for Chemoprevention. *Nature* 471: S10-11.

Steele VE, Kelloff GJ (2005) Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutat Res* 591: 16-23.

Steffen LM (2006) Eat your fruit and vegetables. *Lancet* 367: 278-279.

Stoner GD, Morse MA, Kelloff GJ (1997) Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ Health Perspect* 105: 945-954.

Strachan T, Read AP (1999) *Human Molecular Genetics 2*. 2nd Edition USA: John Wiley & Sons Inc.

Strandberg L, Mellström D, Ljunggren O, Grundberg E, Karlsson MK, Holmberg AH, Orwoll ES, Eriksson AL, Svedberg J, Bengtsson M, Ohlsson C, Jansson JO (2008) IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. *Obesity* 16: 710-713.

Sung B, Prasad S, Yadav VR, Lavasanifar A, Aggarwal BB (2011) Cancer and diet: How are they related? *Free Radic Res* [Epub ahead of print].

Tanaka T, Yasui Y, Ishigamori-Suzuki R, Oyama T (2008) Citrus compounds inhibit inflammation- and obesity-related colon carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer* 60: 70-80.

Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M (2009) Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 20: 210-218.

Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD, Mellinger JD, Smith SB, Digby GJ, Lambert NA, Prasad PD, Ganapathy V (2009) GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res* 69: 2826-2832.

Thompson HJ, Heimendinger J, Gillette C, Sedlacek SM, Haegele A, O'Neill C, Wolfe P (2005) In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. *J Agric Food Chem* 53: 6126-6132.

Topping DL, Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81: 1031-1064.

Tran TT, Gupta N, Goh T, Naigamwalla D, Chia MC, Koohestani N, Ehrotra S, McKeown-Eyssen G, Giacca A, Bruce WR (2003) Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 47-56.

Trichopoulos D, Psaltopoulou T, Orfanos P, Trichopoulou A, Boffetta P (2006) Plasma C-reactive protein and risk of cancer: a prospective study from Greece. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 381-384.

Tsilidis KK, Branchini C, Guallar E, Helzlsouer KJ, Erlinger TP, Platz EA (2008) C-reactive protein and colorectal cancer risk: a systematic review of prospective studies. *Int J Cancer* 123: 1133-1140.

Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A, Yajima H (2011) Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition* 27: 287-292.

van der Sluis AA, Dekker M, van Boekel MA (2005) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *J Agric Food Chem* 53: 1073-1080.

van Dorsten FA, Grün CH, van Velzen EJ, Jacobs DM, Draijer R, van Duynhoven JP (2010) The metabolic fate of red wine and grape juice polyphenols in humans assessed by metabolomics. *Mol Nutr Food Res* 54: 897-908.

van Duuren BL, Sivak A, Katz C, Seidman I, Melchionne S (1975) The effect of aging and interval between primary and secondary treatment in two-stage carcinogenesis on mouse skin. *Cancer Res* 35: 502-505.

Veeriah S, Balavenkatraman KK, Böhmer F, Kahle K, Glei M, Richling E, Scheppach W, Pool-Zobel BL (2008) Intervention with cloudy apple juice results in altered biological activities of ileostomy samples collected from individual volunteers. *Eur J Nutr* 47: 226-234.

Veeriah S, Miene C, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Sauer J, Böhmer F, Wöfl S, Pool-Zobel BL (2008) Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int J Cancer* 122: 2647-2655.

Veeriah S, Hofmann T, Glei M, Dietrich H, Will F, Schreier P, Knaup B, Pool-Zobel BL (2007) Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J Agric Food Chem* 55: 2892-2900.

Veeriah S, Kautenburger T, Habermann N, Sauer J, Dietrich H, Will F, Pool-Zobel BL (2006) Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Mol Carcinog* 45: 164-174.

Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie (2010) Daten und Fakten zur deutschen Fruchtsaftindustrie.

Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.

Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-141.

Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D (2008) Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem* 19: 587-593.

Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Veeriah S, Will F, Dietrich H, Pool-Zobel BL, Schrenk D (2008) Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. *Nutrition* 24: 366-374.

Wang Y, Lam KS, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJ, Xu A (2005) Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner. *J Biol Chem* 280: 18341-18347.

Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, Lupton JR, Taddeo SS, Hong MY, Carroll RJ, Chapkin RS, Turner ND (2009) Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* 139: 101-105.

Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 271: 29483-29488.

WCRF, World Cancer Research Fund / AICR, American Institute for Cancer Research (1997) Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR.

WCRF, World Cancer Research Fund / AICR, American Institute for Cancer Research (2007) Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR.

Weisburger JH, Fiala ES (1983) Experimental colon carcinogens and their mode of action. In: *Experimental colon carcinogenesis/ Autrup, Herman, Boca Raton*, 27-50.

Wernstedt I, Eriksson AL, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtic S, Hedner T, Hultén LM, Wiklund O, Ohlsson C, Jansson JO (2004) A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 1272-1279.

Whitehead RH, Young GP, Bhathal PS (1986) Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut* 27: 1457-1463.

Wojdylo A, Oszmianski J, Laskowski P (2008) Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J Agric Food Chem* 56: 6520-6530.

Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH (2008) Cellular antioxidant activity of common fruits. *J Agric Food Chem* 56: 8418-8426.

Xu M, Bailey AC, Hernaez JF, Taoka CR, Schut HA, Dashwood RH (1996) Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis* 17: 1429-1434.

Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB (2011) The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol* 11: 295-309.

Yamada K, Araki S, Tamura M, Sakai I, Takahashi Y, Kashihara H, Kono S (1998) Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma in situ. *Int J Epidemiol* 27: 794-798.

Yang KC, Tsai CY, Wang YJ, Wei PL, Lee CH, Chen JH, Wu CH, Ho YS (2008) Apple polyphenol phloretin potentiates the anticancer actions of paclitaxel through induction of apoptosis in human hep G2 cells. *Mol Carcinog* 48: 420-431.

Yoon H, Liu RH (2007) Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF-kappaB activation in human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem* 55: 3167-3173.

Yuan L, Meng L, Ma W, Xiao Z, Zhu X, Feng JF, Yu H, Xiao R (2011) Impact of apple and grape juice consumption on the antioxidant status in healthy subjects. *Int J Food Sci Nutr* [Epub ahead of print].

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 972-978.

Zeng H, Lazarova DL (2011) Obesity-related colon cancer: dietary factors and their mechanisms of anticancer action. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Epub ahead of print].

Zessner H, Pan L, Will F, Klimo K, Knauff J, Niewöhner R, Hümmer W, Owen R, Richling E, Frank N, Schreier P, Becker H, Gerhauser C (2008) Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol Nutr Food Res* 52: S28-44.

Zucker LM, Zucker TF (1961) Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 52: 275-278.

Zucker TF, Zucker LM (1963) Phosphatides and cholesterol in the rat body: effects of growth, diet and age. *J Nutr* 80: 20-24.

6 PUBLIKATIONEN

1. **Barth SW**, Koch TCL, Watzl B, Dietrich H, Will F, Bub A (2011) Moderate effects of apple juice consumption on obesity related markers in obese men: impact of diet-gene interaction on body fat content. Eur J Nutr [epub ahead of print]
2. Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Fährndrich C, Bub A, Rechkemmer G, **Barth SW** (2009) Prevention of colon carcinogenesis by apple juice in vivo: Impact of juice constituents and obesity. Mol Nutr Food Res 53: 1289-1302.
3. Koch TCL, Briviba K, Watzl B, Bub A, **Barth SW** (2008) Obesity-related promotion of aberrant crypt foci in DMH-treated obese Zucker rats correlates with dyslipidemia rather than hyperinsulinemia. Eur J Nutr 47: 161-170.
4. **Barth SW**, Fährndrich C, Bub A, Watzl B, Will F, Dietrich H, Rechkemmer G, Briviba K (2007) Cloudy apple juice is more effective than apple polyphenols and an apple juice derived cloud fraction in a rat model of colon carcinogenesis. J Agric Food Chem 55: 1181-1187.
5. Watzl B, Kulling SE, Möseneder J, **Barth SW**, Bub A (2005) A 4-wk intervention with high intake of carotenoid-rich vegetables and fruit reduces plasma C-reactive protein in healthy, nonsmoking men. Am J Clin Nutr 82: 1052-1058.
6. **Barth SW**, Fährndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G (2005) Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats. Carcinogenesis 26: 1414-1421.