

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Kelm

Einfluss oraler Gabe von (-)- Epicatechin
auf den gewebständigen und plasmatischen
Stickstoffmonoxid-Pool - eine Studie im Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin in
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Deborah Vanessa Janine Haack
2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent:: Priv.-Doz. Dr. Rassaf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Schott

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Liste der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (Angiotensin-Converting-Enzyme)
ASS	Acetylsalicylsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz-Detektor
DesoxyHb	desoxygeniertes Hämoglobin
DesoxyMb	desoxygeniertes Myoglobin
EC	(-)-Epicatechin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoff (NO)-Synthase
Fe II/III	Zwei-/dreiwertiges Eisen
FMD	Flussmedierte Dilatation
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunden
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
I ₂	Iod
IE	Internationale Einheiten
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (Low Density Lipoprotein)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEM	N-ethylmaleinimid
NO	Stickstoffmonoxid
NO-Häm	Nitrosyl- Hämkomplexe
NOS	Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
O ₂	Sauerstoff
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RNNO	N-Nitrosamine
RSNO	S-Nitrosothiole
RNO	kovalent gebundenes NO an einem Rest; Nitrosospezies
SA	Standardabweichung
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Metabolismus des Stickstoffmonoxids	1
1.1.2	Abbau und Transport des Stickstoffmonoxids.....	2
1.1.3	Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid	4
1.2	Rolle des NO-Pool bei Stoffwechselprozessen und Krankheiten	5
1.3	Struktur, Vorkommen und Nahrungsaufnahme von Flavanolen	6
1.4	Metabolismus von Flavanolen.....	7
1.5	Physiologische Funktion von Flavonoiden und deren Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten	9
1.6	Auswirkungen von Flavanolen auf den NO- Pool	10
1.7	Zielsetzung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1	Chemikalien, Lösungen und Gase	12
2.2	Verbrauchs- und sonstige Materialien.....	12
2.3	Geräte.....	13
2.4	Versuchstierkollektiv und Behandlungsprotokoll.....	13
2.5	In vivo Perfusion über die Aorta abdominalis.....	15
2.5.1	Vorbehandlung der Mäuse	15
2.5.2	Präparation und Perfusion.....	15
2.5.3	Organentnahme	18
2.6	Herstellung von Gewebemogenaten.....	18
2.7	Blutabnahme und Probenaufbereitung	19
2.8	Quantifizierung von Epicatechinmetaboliten im Plasma mittels HPLC.....	19
2.9	Analytische Quantifizierungen von Nitrit und Nitrosospezies in Gewebe und Plasma mittels reduktiver Gas-Phasen Chemilumineszenzdetektion.....	20
2.10	Analytische Quantifizierung von Nitrat in Gewebe und Plasma mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie	23
2.11	Mathematisch-statistische Methoden.....	24

3.	Ergebnisse	25
3.1	Etablierung der in vivo Perfusion über die Aorta abdominalis	25
3.1.1	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Gewebepreparation und –perfusion.	25
3.2	Diätetischer Einfluss auf den NO- Pool (durch Nahrungsentzug).....	28
3.3	Metabolismus des Epicatechins	30
3.4	Einfluss von Epicatechin auf Nitrit und Nitrosospezies in Gewebe und Plasma..	31
3.5	Analytische Quantifizierung von Nitrat in Gewebe und Plasma.....	34
4.	Diskussion	35
4.1	Quantifizierung des gewebständigen NO-Pools	35
4.2	Epicatechindosis und Metabolisierung	38
4.3	Einfluss von Epicatechin auf den gewebständigen und plasmatischen NO- Pool.....	39
4.4	Potentielle Wirkmechanismen von Epicatechin auf den NO-Pool	42
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	45
5.	Zusammenfassung.....	47
6.	Literaturverzeichnis	48
7.	Danksagungen.....	62

1. Einleitung

Kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen gelten in den Industrienationen mit steigender Tendenz als die häufigste Todesursache. Aus diesem Grund besteht ein großes klinisches und ökonomisches Interesse an der Entwicklung von Therapien zur Behandlung oder Prävention dieser Erkrankungen¹⁻⁴.

Arteriosklerotisch veränderte Gefäße, die sich aus der Dysfunktion des Endothels entwickeln, werden als Hauptursache für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen betrachtet^{5, 6}. Dabei haben physiologische Vorgänge, wie die Thrombozytenaggregation, die Gefäßpermeabilität und der Gefäßtonus, die Proliferation von Gefäßmuskulatur, sowie inflammatorische Prozesse und die Lipidperoxidation einen Einfluss auf die Endothelfunktion und die Entstehung von Arteriosklerose^{5, 7-10}. Diese Prozesse werden unter anderem von Stickstoffmonoxid (NO) reguliert, einem Radikal welches von NO-Synthasen produziert wird¹¹. Studien konnten zeigen, dass erniedrigte NO-Spiegel mit einer Endotheldysfunktion und einer erhöhten Anfälligkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergeht^{2, 5, 6}. Da die endotheliale Dysfunktion therapeutisch noch behandelbar ist, wird der Prävention bzw. Behandlung der endothelialen Dysfunktion durch Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit und -Bioaktivität besonderes Interesse entgegen gebracht¹².

Ein möglicher therapeutischer Ansatz in der Erhöhung der Bioaktivität und Bioverfügbarkeit von NO könnten Flavanole aus der Klasse der Polyphenole sein, wie sie in Kakao, Rotwein, Früchten und Tee vorkommen¹³⁻¹⁵. Ihnen konnten ebenfalls positive Wirkungen auf die Endothelfunktion und kardiovaskuläre Risikofaktoren nachgewiesen werden^{4, 13, 16}. Dabei konnte ein Zusammenhang zu den NO-Spiegeln im Endothel hergestellt werden¹⁷. Die vorliegende Arbeit thematisiert die metabolische Wirkung von Flavanolen auf die Bioverfügbarkeit bzw. Bioaktivität von Stickstoffmonoxid und seiner Stoffwechselprodukte.

1.1 Metabolismus des Stickstoffmonoxids

1.1.1 Synthese des Stickstoffmonoxids

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Radikal, welches von NO-Synthasen (NOS) unter Verwendung der Aminosäure L-Arginin, molekularem Sauerstoff (O₂) und

diverser Kofaktoren produziert wird^{18, 19}. L-Arginin wird sowohl über die Nahrung aufgenommen, als auch endogen im Harnstoffzyklus produziert²⁰. Zu den Kofaktoren gehören unter anderem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und Tetrahydropterin (BH₄)^{20, 21}. Die Isoformen der NOS werden unterschieden in die neuronale konstitutive (nNOS), die induzierbare (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS)¹¹. Eine mögliche Existenz von NOS in Erythrozyten^{22, 23} und Mitochondrien²⁴ ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie insbesondere distal von arteriellen Stenosen auftreten können, ist die sauerstoffabhängige Bildung von NO aus Arginin und Citrullin durch die NOS beeinträchtigt. Dies kann in diesen Bereichen zu einer endothelialen Dysfunktion führen²⁵.

1.1.2 Abbau und Transport des Stickstoffmonoxids

Das Radikal NO kann unter 1-Elektron-Transfer zum Nitrosylanion (NO⁻) reduziert oder zum Nitrosoniumion (NO⁺) oxidiert werden und mit molekularem Sauerstoff zu höheren Stickoxiden (NO₂ oder N₂O₃) weiterreagieren^{26, 27}. Diese Stickoxide können mit plasmatischen Thiolgruppen zu S-Nitrosothiolen (RSNO) oder mit Aminen zu N-Nitrosaminen (RNNO), aber auch mit anderen Proteinbestandteilen reagieren (Abb.1). Des Weiteren können sie zu Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) (Abb.1) reagieren²⁷⁻³⁰. Die Gesamtheit an kovalenten Protein-NO-Verbindungen wird in der vorliegenden Arbeit als Nitrosospezies (RNO) bezeichnet.

Das Hauptoxidaionsprodukt des NO- Stoffwechsels ist das Nitrit, welches weiter zu Nitrat oxidiert (Abb.1)²⁸. Nitrat stellt ein stabiles Abbauprodukt (HWZ 5-8 Stunden) des NO-Stoffwechsels dar, dessen Konzentration nicht primär von der NOS-Aktivität abhängt sondern mit der Alimentation, der Oxidation von Nitrit und der Nierenfunktion im Zusammenhang steht^{28, 31}. Ein Teil des Nitrits wird durch die Nahrung aufgenommen oder von Bakterien im Speichel über die Reduktion von Nitrat produziert³². Studien an verschiedenen Säugetierspezies konnten jedoch zeigen, dass circa 70% des Plasmanitrits aus der NO-Produktion durch die NOS entsteht^{33, 34}. Ähnliche Ergebnisse konnte man in Studien an nüchternen Menschen erzielen. Hier wurde ebenfalls der größte Anteil des gemessenen Nitrits auf die Produktion von NO durch die NOS zurückgeführt³². Es kann somit eine starke Korrelation des Nitritspiegels in Plasma und Gewebe

zur Aktivität der NOS angenommen werden ^{31, 35, 36}. Jansson et al konnten zeigen, dass Nitrat auch unabhängig von der Reduktion durch Bakterien zu Nitrit reduziert werden kann ³⁷. Auf diesen Weg könnte Nitrat zur NOS-unabhängigen Nitrit- und NO- Produktion beitragen ³⁸.

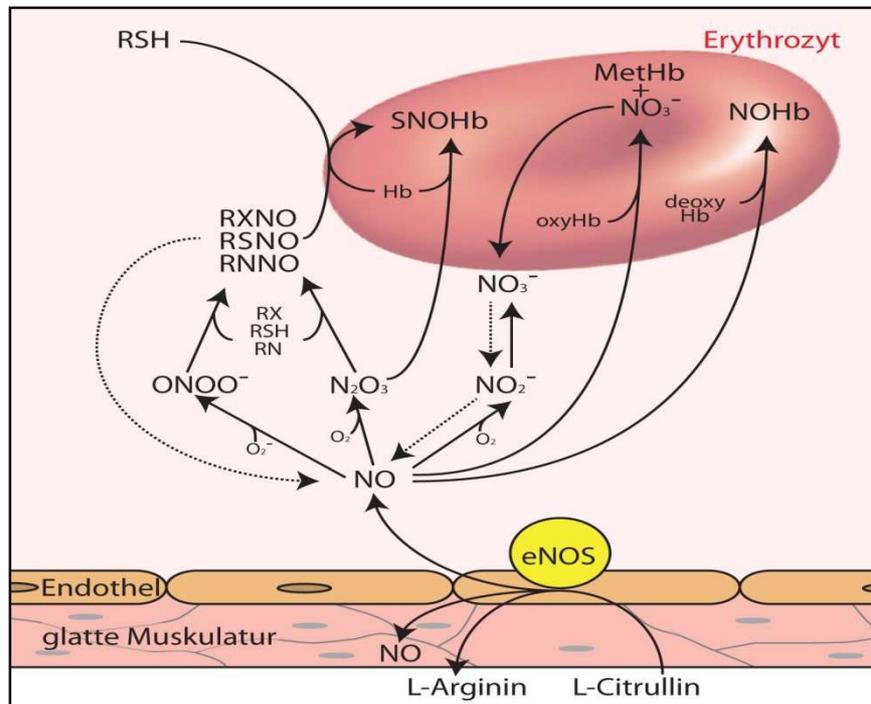


Abb. 1: Schema des NO-Metabolismus. NO_2^- - Nitrit; NO_3^- - Nitrat; N_2O_3 - Distickstofftrioxid; RSNO- S-Nitrosothiole; RNNO - N-Nitrosamine; RXNO - Nitrosospezies; Hb - Hämoglobin; oxyHb - oxygeniertes Hämoglobin; deoxyHb - deoxygeniertes Hämoglobin; ONOO^- - Peroxynitrit (Abbildung modifiziert nach Kelm et al. ³⁹, Bryan et al. ⁴⁰ und Dejam et al. ³¹)

Eine weitere Möglichkeit zur Metabolisierung von Stickstoffmonoxid besteht in dessen Reaktion mit Hämoglobin (Abb.1). Es werden drei verschiedene Reaktionen beschrieben: 1. Nach Autoxidation zu höheren Stickoxiden kann NO mit der Thiolgruppe des Hämoglobins zu SNOHb reagieren. 2. Mit oxygenierten Hämoglobin oder Myoglobin kann NO zu Methämoglobin und Nitrat reagieren ^{28, 31}. 3. Unter hypoxischen Bedingungen ist eine Reaktion von NO mit dem Eisenion von deoxygeniertem Myoglobin und Hämoglobin zum Nitrosylmyoglobin und zum Nitrosylhämoglobin in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff möglich. Diese Verbindungen werden als NO-Hämkomplexe bezeichnet ^{36, 41}. Ihre genaue Funktion und Regulation ist noch nicht bekannt, jedoch kann man vermutlich von der Menge der gebildeten NO-Häm quantitative Aussagen treffen über die NO- Produktion unter Hypoxie ³⁶.

Die Halbwertszeit von NO *in vivo* ist sehr kurz und liegt im Bereich von Mikrosekunden⁴². Dies macht eine direkte Messung von NO im Blut schwierig, da es noch während der Blutentnahme zu Nitrit, Nitrat, RNO und NO-Häm weiterreagiert. Nur durch die Bestimmung dieser stabileren Stoffwechselprodukte von NO bietet sich eine Möglichkeit der indirekten Bestimmung der NO-Bioverfügbarkeit^{27, 31, 40, 43}. So konnten nach intravenöser NO- Applikation erhöhte Spiegel von Nitrit, Nitrat, RSNOs und NO-Häm im menschlichen Plasma nachgewiesen werden^{44, 45}. NO kann demnach in Form von Stoffwechselprodukten entlang des Gefäßbettes transportiert werden und durch Freisetzung von NO aus diesen oder Transnitrosationsreaktionen hormonähnliche Wirkungen hervorrufen^{27, 42, 45}. Beispielsweise konnte nach RSNO-Applikation eine Inhibition der Thrombozytenaggregation, eine Aktivierung der Guanylylzyklase, ein verminderter Ischämie-/Reperfusionsschaden und eine Relaxation der venösen glatten Muskulatur bewirkt werden, die auf eine Freisetzung von NO aus RSNO zurückgeführt wurde^{27, 44, 45}. Verschiedene Versuchsansätze weisen darauf hin, dass NO in Form dieser Derivate auch in entfernten Organen (murinen Gehirn, Lunge, Herz, Nieren und Leber^{27, 40, 45}) weiter metabolisiert bzw. gespeichert wird und auf diese Weise ebenfalls eine wichtige Rolle in der vaskulären Homöostase übernimmt^{11, 42}. Durch die Bestimmung von Nitrit, Nitrat, NO-Häm und RXNOs im Gewebe und Plasma kann demnach auf die NO-Bioverfügbarkeit und –aktivität geschlossen werden⁶. Der Zusammenhang zwischen gewebständigem NO-Pool und zirkulierendem NO-Pool (Gesamtheit der Stoffwechselprodukte von NO) ist derzeit Gegenstand von Studien⁴⁵ und wird in der vorliegenden Arbeit thematisiert.

1.1.3 Die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid

Nitrit ist das Hauptoxidaionsprodukt von NO und dient als größter Transporter und bioaktiver Speicher für NO sowohl im Plasma, als auch im Gewebe^{31, 32, 40, 46-48}. Es kann auf enzymatischem und nicht-enzymatischem Weg zu NO reduziert werden^{31, 36}. Im azidischen Milieu, wie beispielsweise im Magen oder in entzündlichem Gewebe zerfällt es auf nicht-enzymatischen Weg zu NO und anderen Stickoxiden⁴⁹. Außerdem kann Nitrit unter hypoxischen Bedingungen (z.B. Myokardischämie) über Reaktionen mit deoxygeniertem Hämoglobin, deoxygeniertem Myoglobin^{31, 50}, deoxygeniertem Neuroglobin oder Cytoglobin³¹, anderen Enzymen mit Häm- oder Thiolgruppen oder Säuren wie Ascorbinsäure

^{36, 51} reduziert werden. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass auch die endotheliale NOS unter Hypoxie Nitrit zu NO umwandeln kann ³². Des Weiteren kann es durch die Xanthinoxidoreduktase und CYP 450 ³² im Blut zu NO umgewandelt werden. ^{31, 40, 46-48}.

In diesem Sinne konnten verschiedene Studien unter hypoxischen Bedingungen eine Reduktion der intravaskulären und gewebständigen Nitritspiegel mit einem gleichzeitigen Anstieg der RSNO- und NO-Häm-Spiegel feststellen und schlossen auf eine Reduktion von Nitrit zu NO und eine darauffolgende Nitrosation ^{32, 40, 52}. Dies ist von besonderem Interesse, wenn die Produktion über den endogenen L-Arginin/NO-Syntheseweg eingeschränkt ist (beispielsweise unter Hypoxie oder L-Argininmangel) ³⁸.

1.2 Rolle des NO-Pool bei Stoffwechselprozessen und Krankheiten

Stickstoffmonoxid und deren Stoffwechselprodukte spielen eine bedeutende Rolle in der vaskulären Homöostase (systemisch und zerebral) ^{11, 40, 53} und bei immunologischen Prozessen ⁵⁴⁻⁵⁶.

Die Bildung von NO führt über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße (Vasodilatation) ^{6, 21, 31, 57}. Auf diesem Weg wird der periphere Widerstand und damit der arterielle Blutdruck gesenkt ^{35, 58}.

Durch die Inhibition der Thrombozytenaggregation ^{7, 59, 60}, der Leukozytenadhäsion ^{8, 61}, der Lipidperoxidation und der Proliferation von glatter Muskulatur ⁹ wird eine antiarteriosklerotische Wirkung erzielt ^{7, 8, 12, 62-64}. Es wird daher angenommen, dass eine Beeinträchtigung der NO-Synthese arteriosklerotische Veränderungen begünstigt ⁵, da Störungen des NO-Stoffwechsels mit Hypertonie, Hypercholesterinämie, Thrombosen und zerebrovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten. ⁶. Der NO-Pool wird demnach als Marker für die Endothelfunktion diskutiert ^{5, 31, 34, 65, 66}.

Eine erhöhte NO-Zufuhr oder eine Aktivierung der NOS wirken unter hypoxischen Bedingungen in Geweben wie beispielsweise beim Ischämie/Reperfusionsschaden beim akuten Myokardinfarkt und darauffolgender Rekanalisation, protektiv. Dies geschieht unter anderem durch eine Modulation der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie das Hydroxylradikal und das Superoxidanion auf mitochondrialer Ebene ^{25, 32, 67-70}. Die Applikation von NO oder dessen Derivaten konnten schon in sehr niedrigen bzw. physiologischen

Dosierungen den Ischämie/Reperfusionsschaden und die Infarktgröße in murinen Herzen, Leber und Gehirnen von Ratten reduzieren^{32, 42, 50, 71, 72}.

Die positiven Effekte von NO auf die Endothelfunktion sind abhängig von dessen Konzentration, der Expositionsdauer und den Bedingungen im Gewebe. Exzessive NO-Produktionen oder -Applikationen können unter normoxischen Bedingungen über eine Bildung von Peroxynitrit (das Produkt der Reaktion zwischen Superoxidationradikalen und NO⁷³) und der Apoptose von kardialen Myozyten zu Gewebeschädigungen bis hin zum Herzversagen führen^{25, 74}. Man geht davon aus, dass demnach ein Vorteil von Nitrit und Nitrosospezies als NO-Donatoren gegenüber dem reinen Radikal NO in deren spezifischen Wirkung im ischämischen Gewebe besteht. Dort kann es zu NO reduziert werden ohne gesundes Gewebe negativ zu beeinflussen⁴⁸.

Aus therapeutischer Sicht ist eine Modulation der NO-Bioaktivität und -Bioverfügbarkeit in der Prävention und Behandlung von Endotheldysfunktionen als Vorstufe der Arteriosklerose und vaskulären Erkrankungen von Interesse^{6, 12, 48}. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte in der diätetischen Aufnahme von flavanolreicher Nahrung bestehen.

1.3 Struktur, Vorkommen und Nahrungsaufnahme von Flavanolen

Die Ernährung ist ein wichtiger Faktor in der Primär- und Sekundärprävention von chronischen Erkrankungen aus dem kardiovaskulären Formenkreis. Besonders Flavonoiden konnten in diesem Zusammenhang in mehreren epidemiologischen Studien protektive Effekte nachgewiesen werden^{14, 75}.

Flavonoide gehören zu der heterogenen Gruppe der Polyphenole^{14, 76}. Sie können abhängig von ihrem Oxidationszustand am heterozyklischen C-Ring in verschiedene Klassen eingeteilt werden: die Flavonole, die Flavone, die Isoflavone, die Anthocyanine, die Flavanone und die Flavanole. Bei den Flavanolen unterscheidet man wiederum Catechin, Epicatechin und dessen Oligomere, die Procyanidine (Abb. 2)¹⁴.

Vor allem Gemüse, Früchte, Tee und Rotwein stellen eine Quelle für Flavanole dar (Tabelle 1)^{14, 77, 78}. Auf Kakao (*Theobroma cacao*) und Kakaoextrakten basierende Lebensmittel setzten sich zum größten Teil aus Flavan-3-olen zusammen mit (-)- Epicatechin und (+)- Catechin als Hauptbestandteile. 12-18 % des Trockengewichts einer Kakaobohne besteht aus Epicatechinoligomeren^{14, 79-81} (Tabelle 1).

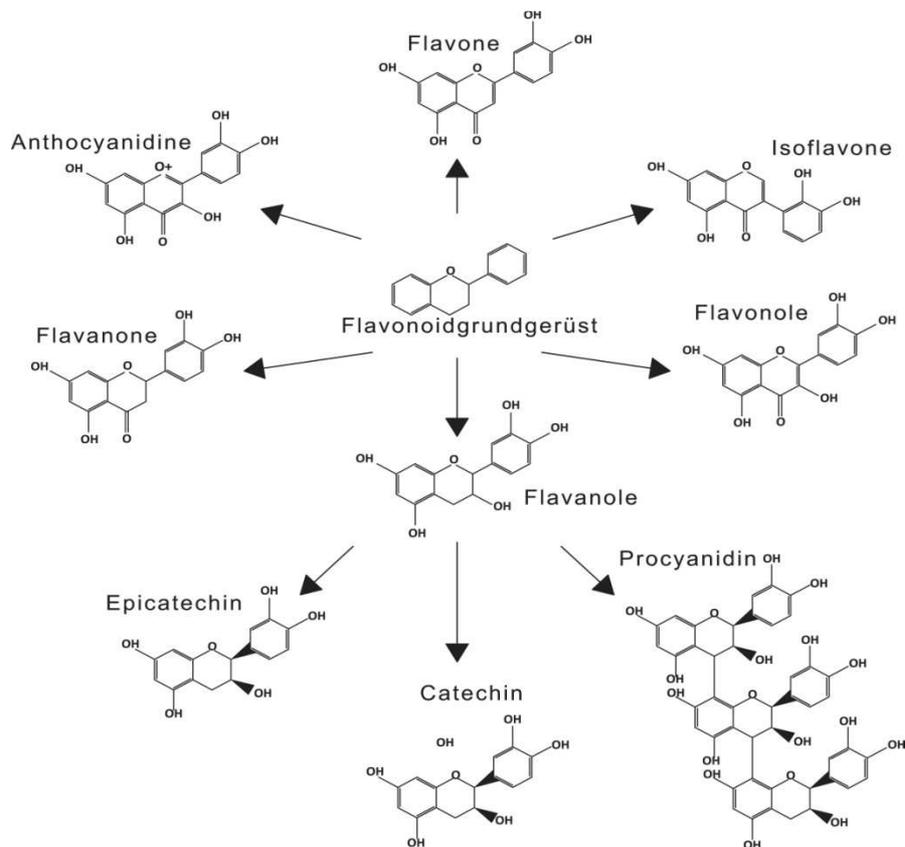


Abb. 2: Strukturformeln der Flavone, Anthocyanidine, Isoflavone, Flavanone, Flavonone und Flavanole ausgehende vom Flavonoidgrundgerüst.

Tabelle 1: Gesamtflavanolgehalt (Flavan-3-ol) verschiedener Lebensmittel ¹⁵

	Flavanolgehalt (mg/100g)
Schwarzer Teeaufguss	113,79
Rotwein	11,9
Dunkle Schokolade	53,49
Vollmilchschokolade	13,35
Grüner Teeaufguss	133,28

1.4 Metabolismus von Flavanolen

Schon 30 Minuten nach flavanolreicher Nahrungsaufnahme können Epicatechin, Catechin und Procyanidindimere nachgewiesen werden. Nach ein bis zwei

Stunden können maximale Konzentrationen im menschlichen Plasma gemessen werden^{14, 75}. Innerhalb von 8 Stunden werden 80% des aufgenommenen Epicatechins und dessen Metabolite, vergleichsweise schnell zu anderen Polyphenolen, durch die Nieren und die Leber ausgeschieden⁸⁰.

Die Flavonoide-Monomere und -Dimere werden intestinal absorbiert^{75, 82} und gemäß der Phase I und II Metabolisierung im Dünndarm und der Leber methyliert, glukuronidiert und sulfatiert⁸³⁻⁸⁷. Die nicht absorbierten Flavanole und solche, die im Dünndarm sowie der Leber aufgenommen, metabolisiert und zurück in das intestinale Lumen transportiert werden, gelangen in das Kolon. Von dort werden sie entweder direkt ausgeschieden oder von Mikroorganismen durch enzymatische Degradierung in eine große Bandbreite von neuen Metaboliten (kleinere Phenolsäuren und Valerolaktate) gespalten. Diese können wiederum aufgenommen und in der Leber metabolisiert werden^{85, 88, 89}. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Epicatechin und dessen Metabolite die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Abb. 3)^{2, 90}.

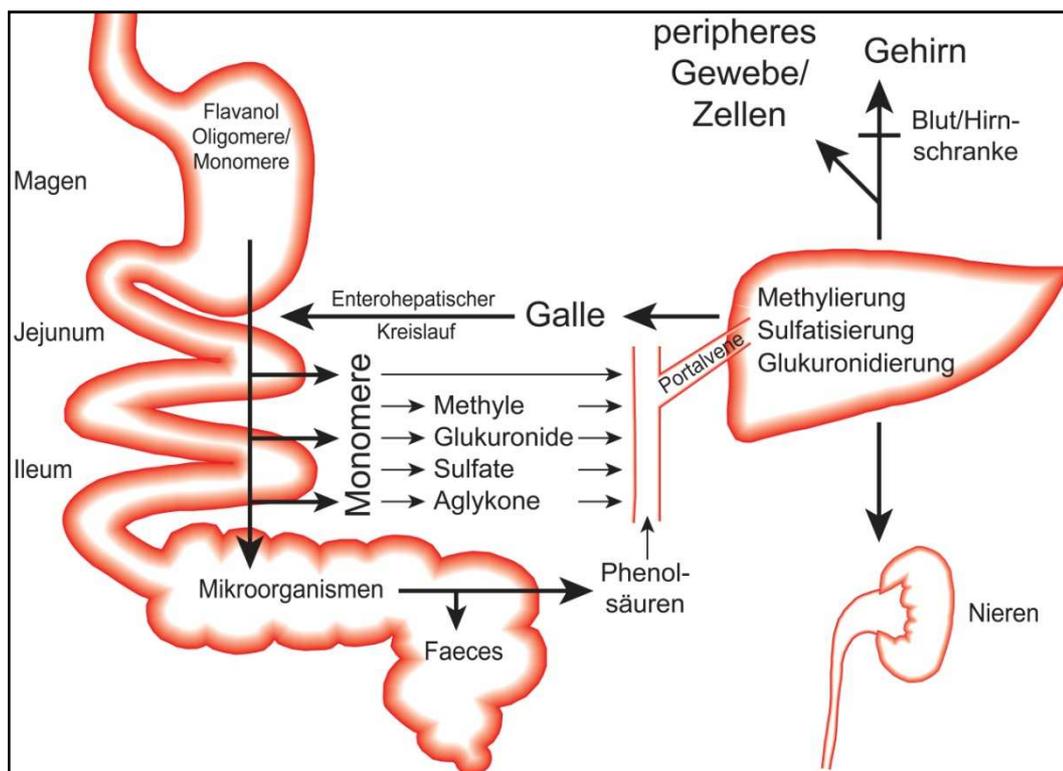


Abb. 3: Schematische Zeichnung des Metabolismus von Flavanolen (modifiziert nach Spencer^{84, 89} und Heiss et al.⁷⁵).

Als die wichtigsten bioaktiven Metabolite von Epicatechin, die man in Plasma und Urin nachweisen konnte, werden vor allem glukuronidiertes Epicatechin, 3-O-Methyl-Epicatechin, 4-O-Methyl-Epicatechin und O-Methyl glukuronidierte Formen diskutiert^{84, 89, 91, 92}. Darunter scheint das 3-O-Methyl-Epicatechin der stabilste Metabolit zu sein^{75, 93}. Die Wirkung der Metabolite scheint sich teilweise von der Wirkung des Epicatechins zu unterscheiden^{85, 86, 94}.

Wenige Fakten sind bekannt über die Verteilung von Flavonoiden und deren Metaboliten im Gewebe. In murinen Endothelzellen konnten höhere Epicatechinkonzentrationen gemessen werden als im Plasma. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass sich die extrazellulären Konzentrationen allgemein von den Intrazellulären unterscheiden und demnach möglicherweise auch andere Wirkungen beziehungsweise Wirkmechanismen haben⁹⁵.

1.5 Physiologische Funktion von Flavonoiden und deren Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten

In epidemiologischen Studien konnte bei vermehrter Aufnahme von Flavonoiden ein reduziertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (beispielsweise Bluthochdruck und koronare Herzkrankheiten) und Schlaganfälle festgestellt werden⁹⁶⁻⁹⁹. Diese wurde, ähnlich wie bei NO, unter anderem auf eine verbesserte Endothelfunktion zurückgeführt^{76, 77, 100 101-103}. Im Tiermodell konnte durch eine regelmäßige Aufnahme von Flavanolen beispielsweise eine aortale Plaquebildung bis zu 40% inhibiert⁷⁵ und die Infarktgröße in Rattenherzen durch einen Ischämie/Reperfusionsschaden um bis zu 30% verringert werden¹⁰⁴.

Mögliche Mechanismen über die Flavanole diese Wirkungen erzielen, schließen eine Verminderung der Thrombozytenaggregation¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ und LDL-Oxidation^{76, 95, 110-112}, sowie eine Inhibition von inflammatorischen Prozessen ein^{75, 109, 113, 114}. Ein Schutz vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies durch einen hemmenden Einfluss auf prooxidative Prozesse konnten ebenfalls beobachtet werden (z.B. Inhibition der NADPH- Oxidase¹¹⁵)^{101, 116}.

Heiss et al. konnten zeigen, dass unter Aufnahme eines flavanolreichen Kakaotranks im chronischen Rahmen über zwei bis vier Wochen unter anderem zirkulierende angiogenetische Zellen (CAC) mobilisiert werden. Kardiovaskuläre Funktionen und Reparationsmechanismen des Gefäßendothels

könnten auf diesem Weg aktiviert werden, was von besonderer klinischer bzw. therapeutischer Bedeutung wäre ¹¹⁷.

Es könnte ein Zusammenhang zwischen den positiven Effekten von Flavanolen und dessen Metaboliten und der NO-Bioverfügbarkeit und –Bioaktivität hergestellt werden ^{2, 17}.

1.6 Auswirkungen von Flavanolen auf den NO- Pool

Die Aufnahme von flavanolreichem Kakao führte bei Probanden mit reduzierter Endothelfunktion zu erhöhten RSNO- und Nitrit-Werten im Plasma. Dabei verdoppelte sich die Fluss-mediierte-Dilatation (FMD) ¹¹⁸, was auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit und Bioaktivität des NO durch die Flavanole zurückgeführt wurde ⁷⁷. Die Wirkung von reinem (-)- Epicatechin entspricht der Wirkung von flavanolreichem Kakao. Deshalb wird Epicatechin für die positiven Effekte auf die vaskuläre Funktion und die NO-fördernden Effekte von Kakaoprodukten verantwortlich gemacht ¹³. Die Erhöhung der NO-Spiegel durch Epicatechin konnte teilweise auf eine gesteigerte endotheliale NO-Synthase (eNOS)-Aktivität zurückgeführt werden ⁷⁷. Diese schnelle Wirkung kann jedoch nicht mit einer verstärkten Expression der endothelialen NO-Synthase erklärt werden ^{2, 95, 101, 116}. Stattdessen geht man davon aus, dass die Flavanole über mehrere Mechanismen den NO- Pool beeinflussen, so zum Beispiel durch die Hochregulation der NOS-Aktivität ⁹⁵. In diesem Zusammenhang werden vier wahrscheinliche Mechanismen in der Literatur beschrieben: 1. Epicatechinapplikationen führten zu einer Aktivierung der eNOS durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und eine Phosphorylierung der eNOS an Ser1177 und Ser633. Auf diesem Weg könnte eine erhöhte NO-Produktion in Gang gesetzt werden ^{2, 119}. 2. Schnorr et al. vermuten darüber hinaus, dass Epicatechin die erhöhten NO- Spiegel durch eine Modulation der Arginase-Aktivität in Erythrozyten verursacht. Daraus würde ebenfalls eine erhöhte Aktivität der eNOS resultieren, da mehr L-Arginin als Substrat zur NO-Produktion vorhanden wäre ¹²⁰. 3. Durch die Inhibition der NADPH Oxidase-Aktivität durch die Epicatechinmetabolite 3-O-Methyl-Epicatechin, 4-O-Methyl-Epicatechin und Epicatechin-Glukuronide fallen weniger Sauerstoffradikale an, die NO abfangen könnten. Dadurch steigt die Bioverfügbarkeit von NO. Interessanterweise ist reines Epicatechin dagegen ein Sauerstoffradikalfänger ohne direkte Wirkung auf die NADPH Oxidase ^{101, 116, 121, 122}. 4. Im saurem Milieu

konnten Polyphenole Nitrit zu NO reduzieren, welches durch die Magenschleimhaut diffundierte und zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führte^{123, 124}

Außerdem spekulieren Sies et al., dass die Möglichkeit einer Inhibition der Oxidation von NO zu Nitrit durch Epicatechin besteht und die gleichzeitige Bildung schädlicher Metabolite wie Superoxide und Peroxynitrit durch Flavanele verhindert wird⁹⁵.

1.7 Zielsetzung

Viele der positiven Wirkungen von Flavanolan im Allgemeinen und Epicatechin im Speziellen können auf die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit im Plasma zurückgeführt werden^{2, 17}. Mehrere Studien weisen mittlerweile darauf hin, dass der plasmatische NO-Pool in engem Zusammenhang mit dem gewebständigen NO-Pool steht. Beispielsweise geht man davon aus, dass gewebständiges Nitrit als extravaskulärer NO-Pool während Ischämie dienen kann. Die genauen Regulationsmechanismen und Funktionen von gewebständigen Nitrit, Nitrat und Nitrosospezies ist noch nicht endgültig geklärt^{27, 45}.

In der vorliegenden Arbeit wird im murinen Modell der akute Einfluss von Epicatechin auf den NO-Pool in verschiedenen Geweben untersucht und mit den Auswirkungen auf den plasmatischen NO-Pool in Verbindung gebracht.

Zur Quantifizierung des gewebständigen NO-Pools musste eine Methode zur Gewebepfusion im Mausmodell etabliert werden. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten demnach folgende Fragen mit Hilfe eines Mausmodells klären:

1. Welche Einflüsse müssen im Rahmen der Etablierung der Gewebepfusion im Mausmodell beachtet werden?
2. Welche Plasmakonzentrationen von Epicatechin und seinen Hauptmetaboliten können im Verlauf von 90 Minuten gemessen werden; zu welchem Zeitpunkt nach der diätetischen Gabe erreichen sie ihre höchsten Spiegel?
3. Welche Auswirkungen auf den NO-Pool kann man zu welchem Zeitpunkt im Gewebe und Plasma nach der alimentären Gabe von reinem (-)-Epicatechin unabhängig von anderen diätetischen Einflüssen messen?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Gase

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antifoam SE 15	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epicatechin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe
Helium	Linde, Unterschleißheim
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Jod	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumiodid	Merck, Darmstadt
Mercury-II-chloride	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Braun, Melsungen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
N-Ethylmaleimide	Merck, Darmstadt
PBS, Phosphat-gepufferte	
Salzlösung	Serag-Wiessner, Naila
Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	IES-GmbH, Krefeld
Sulfanilamid	Merck, Darmstadt
Urethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser	Millipore

2.2 Verbrauchs- und sonstige Materialien

Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Futter	Ssniff, Solingen
Gavagenadel	Fine Science Tools Inc., USA
Glasfritte	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Glaspistille	Schütte, Göttingen
Glas-Reaktionsgefäß	Verhees, Neuss

Irisschere	Fine Science Tools Inc., USA
Klammerhalter	Fine Science Tools Inc., USA
Klebeband	3 M Durapore
Nadel grau 27G	Becton Dickinson, Frankreich
Mikrofilter	Millipore, Eschborn
Mikroklammer	Fine Science Tools Inc., USA
Mikropinzette, gebogen	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikropinzette	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikroschere	Fine Science Tools Inc., USA
Pinzette, anatomisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Schläuche	Tygon®, Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Seide 5-0	Serag-Wiessner, Naila
Silikonschläuche	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Splitterpinzette	Aesculap AG, Tuttlingen
Strabismusschere	Fine Science Tools Inc., USA
Spritze	Becton Dickinson, USA
Spritze, gasdicht	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Tissue culture dish	Becton Dickinson, USA

2.3 Geräte

CLD Analysator	Typ CLD 88 NO, Ecophysics, Schweiz
ENO 20	Eicom, Japan
Homogenisator	Schütt, Göttingen
Kaltlichtquelle	Leica, Wetzlar
Küvettenphotometer	DU 800 Spektrophotometer, Beckman Coulter
Mikroskop (MS5)	Leica, Wetzlar
pH-Meter	Roth, Karlsruhe
Rollerpumpe	Isma Tec, Wertheim-Mondfeld
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

2.4 Versuchstierkollektiv und Behandlungsprotokoll

Die Untersuchungen wurden an männlichen C57Bl/6 Wildtypmäusen (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 12 +/- 2 Wochen durchgeführt. Ihr Körpergewicht variierte von 25 bis 35 g. Das Institut für Versuchstierkunde (VTK) der RWTH

Aachen übernahm die Unterbringung und Pflege aller Tiere (LANUV-Aktenzeichen 8.87-50.10.35.08.063/TV-10274G1 TVA RWTH-Aachen). Die Tiere wurden in Gruppen von maximal 10 in Käfigen (Makrolonschalen) auf staubfreiem Holzgranulat (JRS Lignocel Hygienic Animal Bedding) bei einer Raumtemperatur von 19-21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. In der TVA existiert ein 12-stündiger zirkadianer Lichtrhythmus mit einer jeweils 30-minütigen Dämmerungsphase. Keimarmes Trinkwasser und Ratte/Maus-Zuchtfutter wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Nach einer 7-tägigen Akklimationsphase waren die Mäuse für Untersuchungen freigestellt.

Die Tiere wurden in 5 Gruppen mit jeweils 5 bis 7 Mäusen unterteilt: eine unbehandelte, basale Gruppe ohne Futterentzug/Fastenperiode (1), eine für 4 Stunden fastende/ auf Futterentzug gesetzte Gruppe mit Gavage (0,0067ml/g KG in NaCl und 1,7% EtOH) ohne Epicatechin und Perfusion nach 30, 60 und 90 Minuten als Kontrollgruppe (2), eine für 4 Stunden auf Futterentzug gesetzte Gruppe mit Gavage von Epicatechin (35 mg/kg KG in NaCl und 1,7% EtOH gelöst, entsprechen 0,00667ml/g KG der Lösung mit einer Epicatechinkonzentration von 17,24mM) und Perfusion nach 30 Minuten (3), nach 60 Minuten (4) und nach 90 Minuten (5) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die Einteilung der Gruppen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
	Basale Gruppe	Kontroll-Gruppe	EC 30	EC 60	EC 90
Futterentzug (vor Behandlung)	keinen	über 4h	über 4 h	über 4 h	über 4 h
Gavage	keine	NaCl- Lösung	Epicatechin Lösung	Epicatechin Lösung	Epicatechin Lösung
Perfusion (8 Minuten nach Urethan- injektion)	direkt	nach 30,60,90 Minuten	nach 30 Minuten	nach 60 Minuten	nach 90 Minuten

Um eine optimale Löslichkeit des Epicatechins zu erreichen wurde es, entsprechend vorausgegangenen Löslichkeitsexperimenten, mit 1,7 % Ethanol in NaCl im Ultraschallbad gelöst. Die gewählte Dosis orientiert sich an vorangegangenen Studien^{77, 93, 125-130}. Um die Stabilität der Epicatechinlösung zu messen wurde diese am gleichen Tag und am darauffolgenden Tag photometrisch (Beckman Coulter) gemessen. Es zeigte sich keine Veränderung der Epicatechinlösung innerhalb 24 Stunden. Mit einer Gavagenadel und einer 1ml Spritze wurde die Flüssigkeit der Maus (der Gruppen 2-5) mit einem Volumen von 0,00667ml/g KG direkt in den Magen appliziert.

2.5 In vivo Perfusion über die Aorta abdominalis

Die Perfusion über die Aorta abdominalis bei den Mäusen geschah in Anlehnung an die Veröffentlichung von Bryan et al.⁴⁰

2.5.1 Vorbehandlung der Mäuse

Die Mäuse wurden gewogen und entsprechend ihrem Gewicht mit Urethan i.p. (1500mg/kg) betäubt. Zur Antikoagulation wurden 40 Internationale Einheiten Heparin in einem Volumen von 0,2ml i.p. injiziert. Zur Sicherung der Anästhesie wurde ein Schmerzreiz gesetzt und gegebenenfalls Urethan nachgespritzt. Acht Minuten nach Urethaninjektion wurde die Maus an allen vier Extremitäten mit Klebeband auf eine dafür vorgesehene Plastikschaale fixiert und präpariert.

2.5.2 Präparation und Perfusion

Die Präparation von dem ersten Schnitt bis zum Start der Rollerpumpe erfolgte innerhalb von 2-5 Minuten. Die Eröffnung des Bauchraums zwischen Xiphoid und Symphyse pubis erfolgte mit einer Stabismusschere und anatomischen Pinzette. Die Eingeweide wurden mit einer feinen Splitterpinzette nach außen verlagert, so dass freie Sicht auf die Vasa abdominalis und die linke Niere war (Abb. 4). Die weitere Präparation erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

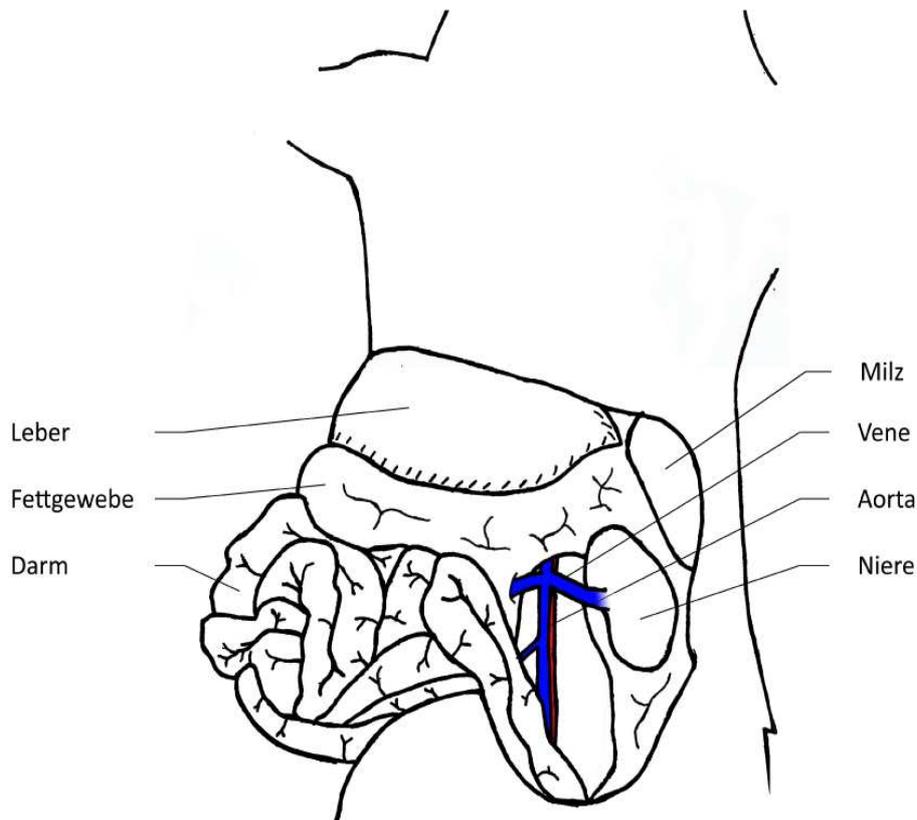


Abb. 4: Schemazeichnung Mausabdomen

Der infrarenale Teil der Vasa abdominalis wurde mit zwei feinen, gebogenen Mikropinzetten vom Peritoneum und umliegenden Gewebe gelöst und auf eine gebogene Pinzette gehoben. Mit dieser wurde Seide 5-0 hinter den Gefäßen durchgezogen und ein lockerer Knoten gebunden zur späteren Fixierung der Kanüle. Die Vena abdominalis (Durchmesser von ca 700 μ m) wurde nicht von der Aorta abdominalis (Durchmesser von ca 300-500 μ m) getrennt. Die Unterbindung der Vasa abdominalis erfolgte unmittelbar unterhalb des Abgangs der Vasa renalis mit einer Mikroklammer. Die Aorta abdominalis liegt laterodorsal zur Vena abdominalis und musste mit einer spitzen Mikropinzette nach ventral verschoben werden. Mit einer Mikroschere wurde ein kleines Loch in die Aorta abdominalis geschnitten und mit einer spitzen Mikropinzette offengehalten. Für die Perfusion wurden Nadeln (27G) manuell abgeschliffen und auf ihre Durchlässigkeit überprüft. Diese stumpfe Kanüle wurde in das mit einer Mikropinzette offengehaltene Gefäß geschoben und mit dem vorgefertigten Faden und zusätzlich der infrarenal gelegenen Mikroklammer fixiert (Abb.5).

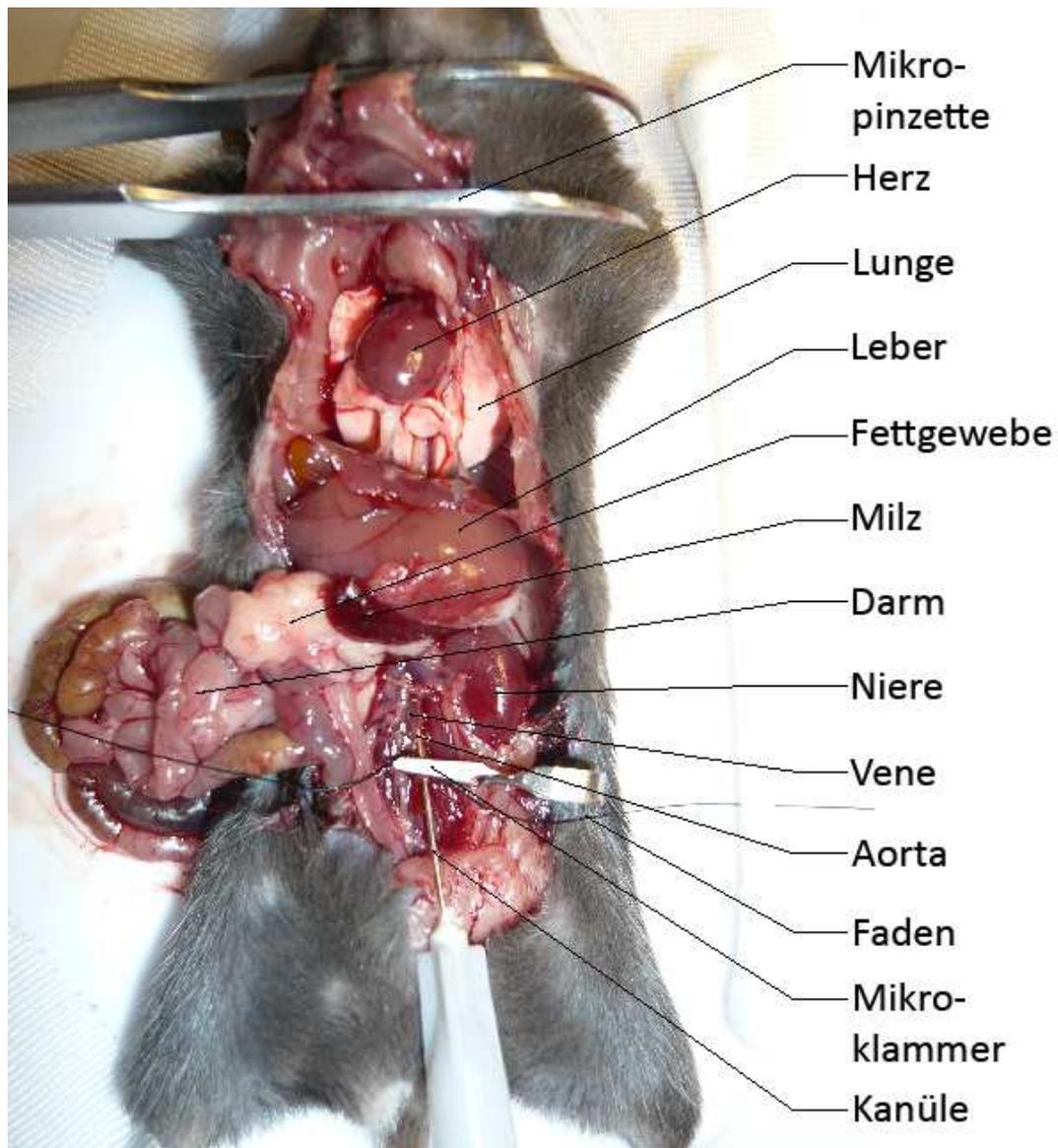


Abb. 5: Photographie der Präparation. Zur besseren Übersicht wurde die Milz mit dem Fettgewebe nach links verschoben. Die Kanüle liegt in der Aorta und ist mit einer Klammer und dem Faden doppelt fixiert. Zur Durchtrennung der Vena cava superior musste der Thorax eröffnet und mit einer feinen Pinzette die Thoraxwand hochgehalten werden.

Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax mit der Präparierschere und die Durchtrennung der Vena cava superior zum Abfluss von Blut und Puffer. Die Pumpe, die mit der Kanüle in der Aorta abdominalis verbunden war, wurde gleichzeitig aktiviert. Die Organe oberhalb der Kanüle wurden retrograd in situ mit einer speziellen Perfusionslösung bei einer Durchflussrate von 10ml/min für 2:30 Minuten perfundiert. Diese Lösung bestand aus PBS mit N-ethylmaleimid (NEM) / EDTA (10mM/ 2mM). Der Zusatz von NEM und EDTA inhibiert

Transnitrosylierungen durch die Blockade von freien SH-Gruppen, wodurch artifizielle Nitrosylierungen, als auch Thiol- und Ascorbat- vermittelter Abbau von endogenen RSNOs verhindert werden.

2.5.3 Organentnahme

Nach zweieinhalbminütiger Perfusion wurden die Organe in der Reihenfolge: Leber, Nieren, Herz, Lunge, Gehirn entnommen. Der Perfusionserfolg wurde unter anderem an der makroskopisch sichtbaren Blutleere der Leber gemessen. Die Präparation des Gehirns erfolgte über einen Hautschnitt im Nacken der Maus und einer Eröffnung und Freilegung der Schädelkalotte vom Os occipitale beginnend. Mit einer Splitterpinzette wurde das Gehirn vom Schädelknochen gelöst und entnommen. Die Organe wurden zusätzlich in einem Becherglas mit Perfusionslösung geschwenkt um sie von jeglichen Blutverunreinigungen zu befreien und anschließend auf Papier trocken getupft. Die Reihenfolge der Organentnahme diente der Minimierung der Präparationszeit und damit Gewebhypoxien welche Einfluss auf den NO-Pool hätten. Die entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem -80°C kalten Gefrierschrank gelagert.

2.6 Herstellung von Gewebhomogenaten

Die Organe wurden einzeln entnommen, gewogen, klein geschnitten und im Verhältnis 1:5 mit eiskaltem Homogenisierungspuffer verdünnt. Der Puffer besteht ähnlich zu der Perfusionslösung aus NaCl und EDTA/NEM (10mM/2,5mM) mit einem eingestellten pH-Wert von 7,4. Dieser Vorgang von der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter bis zur Homogenisierung durfte nicht länger als 2 Minuten dauern. Das Homogenisieren erfolgte mit Glaspistill und Homogenisator. Das Homogenat wurde lichtgeschützt auf Eis gelagert um einen photolytischen Abbau der Nitrosospezien zu verhindern¹³¹. Die Probe wurde in 5 Aliquots geteilt: 50µl für die Nitratbestimmung an der HPLC, 100µl für die Nitritbestimmung, 300µl für RSNO-Bestimmung, 300µl für RXNO-Bestimmung und 300µl für die NO-Hämbestimmung jeweils an der CLD. Lag ein zu geringes Probenvolumen vor, wie zum Beispiel bei dem Herz, wurden für die NO-Hämbestimmung nur 100µl Probe verwendet.

2.7 Blutabnahme und Probenaufbereitung

Für die Blutabnahme wurden die Mäuse, wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben, betäubt. Nach Eröffnung des Thorax wurden ca 750µl Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Das Blut für die NO- Poolbestimmung wurde in vorgekühlte Eppis mit 20µl NEM (10mM) und 3µl EDTA (0,5M) gegeben. Für die Epicatechinmetabolit- Bestimmung wurde das Blut dreier Mäuse einer Gruppe auf zwei EDTA (0,5M) enthaltende Eppendorf- Gefäße verteilt und Ascorbat (1mg/ml) hinzugefügt. Die Blutproben wurden 10min bei 800 G, 4° C zentrifugiert und das gewonnene Plasma in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80° C gelagert.

2.8 Quantifizierung von Epicatechinmetaboliten im Plasma mittels HPLC

Die Messung der Plasmaproben auf Epicatechin und –metabolite wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Schroeter (University of California, Davis, USA) mit der nachfolgend beschriebenen Methode analysiert.

Die sensitive qualitative und quantitative Bestimmung der Epicatechinmetabolite im Plasma wurde mittels einer Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie unter Anwendung eines FLD Detektionssystems durchgeführt. Als authentische Standards dienten 3'-O-methyl-epicatechin, 4'-O-methyl-epicatechin, Epicatechin und Catechin (alle Standards von Mars Incorporated, USA) welche mittels Massenspektroskopie und NMR Spektroskopie verifiziert wurden.

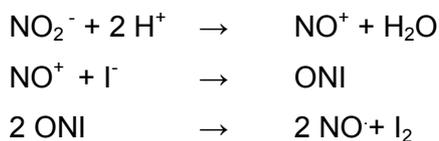
Zur HPLC Analyse wurde das Plasma (siehe Punkt 2.7) auf Eis aufgetaut und mit β -Glukuronidase und Sulfatase behandelt. Dies diente der Hydrolysisierung von Phase II Metaboliten von Epicatechin in seine 3' und 4'-O-methylierten Formen. Danach wurden sie mit dem doppelten ihres Volumens an Methanol gemischt (100%vol; -20° C) und bei 17000 G für 15min, 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet ein zweites Mal, wie oben beschrieben, in Methanol resuspendiert. Nach Zentrifugation und Sammeln des Überstands erfolgte ein dritter Waschschriff mit Methanol (50%vol). Die Überstände der drei Waschschriffe wurden gemischt und zentrifugiert (wie oben beschrieben). Mittels Rotationsverdampfer wurden die Lösemittel bei 4° C entfernt. Die Resuspension des Rückstands erfolgte mit 200µl Methanol (25%vol) womit die Metabolite in einer fünffach konzentrierteren Form vorlagen als im Plasma.

In das HPLC System wurden 50-100µl Proben aufgegeben und auf einer Umkehrphasentrennsäule (Phenomenex Luna C18 (2), 150x4 4.6, 3µm) mit

Vorsäule (Phenomenex C18 4 x 3.0mm) getrennt. Die Separation der Metabolite erfolgte mit Hilfe eines Acetonitril Gradienten in 50mM Methanolnatriumacetat (4%vol; pH 4.4) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. Die Konzentration des Acetonitrill wurde linear erhöht (zwischen 5 und 20 Minuten von 0% bis 10%; 20-28 Minuten von 10-12%; 28-34 Minuten von 12-20%; 34-41 Minuten von 20-30%; 41-45 Minuten von 30-71%) und bei 71% für 10 Minuten gehalten. Die Auswertung erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten der Fläche unter der Kurve mit denen der Standards. Mit Hilfe der Fläche unter der Kurve der Standards konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden, deren Steigung zur Bestimmung der Konzentrationen der Proben dient ⁷⁷.

2.9 Analytische Quantifizierungen von Nitrit und Nitrosospezies in Gewebe und Plasma mittels reduktiver Gas-Phasen Chemilumineszenzdetektion

Die Ozon-abhängige Gas-Phasen Chemilumineszenzdetektion (CLD) (Abb. 6) ist die Methode mit der höchsten Sensitivität (1nM) ^{132, 133} und Spezifität für die Bestimmung von Stickstoffmonoxid (NO) in gasförmigen oder flüssigen Proben. Durch geeignete Reaktionsbedingungen und Reaktionslösungen wird NO aus Nitrit und Nitrosospezies stöchiometrisch freigesetzt. Der Chemilumineszenz-Detektor registriert die Lichtquanten, die durch die Reaktion von NO mit Ozon entstehen. Ihm ist ein Glasreaktionsgefäß vorgeschaltet, welches mit 40ml einer auf Ethansäure basierende Reaktionslösung bestehend aus Kaliumjodid (45mM) und Jod (10mM) ¹³¹ befüllt und von 60°C warmen Wasser umspült wird. Diese Reaktionslösung ermöglicht die Reduktion von Nitrit und Nitrosospezies (S-Nitrosothiole, N-Nitrosamine) zu NO analog zu folgender Gleichung:



Mit einer gasdichten Glasspritze wird die flüssige Probe durch eine Kunststoffmembran in das Glasreaktionsgefäß injiziert. Das freigesetzte NO geht von der flüssigen in die gasförmige Phase über. Das Reaktionsgefäß wird von

einem inerten Trägergas (Helium) durchströmt. Dieses dient zum Transport des freien NO zum Analysator.

Das Gas durchströmt eine durch ein Wasserbad (4°C) gekühlte 1M Natriumhydroxidlösung (NaOH) als Schutz der Anlage vor Verunreinigungen und als Säurefalle bevor es die Reaktionskammer des NO-Analysators der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO, Ecophysics, Schweiz) erreicht.

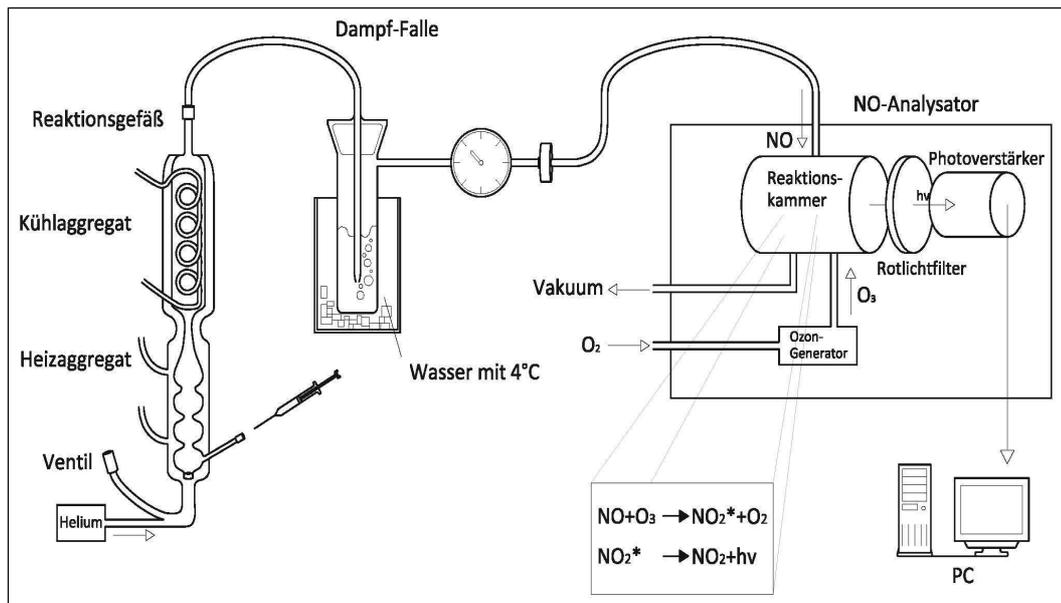
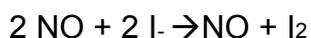
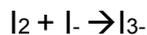


Abb. 6: Schematischer Aufbau der reduktiven Gas-Phasen Chemilumineszenzdetektion. Injektion einer Probe in das Reaktionsgefäß führt zu Reduktion von Nitrit und Nitrosospezies zu NO. Dieses wird durch das Inertgas Helium durch die NaOH-Falle zum NO-Analysator transportiert und das Signal an einen PC übermittelt.

Das Signal einer unbehandelten Probe setzt sich aus Nitrit und der Denitrosierung von RNO (Freisetzung von NO aus einer Bindung zwischen NO und Aminosäureseitenketten) zusammen.



Zur genaueren Bestimmung der Nitrosospezies (S-Nitrosothiole, N-Nitrosamine, Nitrosyleisenkomplexe) müssen die Proben vorbehandelt werden.

Zur Bestimmung von RNO werden 30µL 5%ige Sulfanilamidlösung in 300µl der Probe gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Sulfanilamid reagiert mit Nitrit zu einem stabilen Diazoniumsalz, welches nicht mehr reduziert werden kann. Die unbeeinträchtigten RNOs können unabhängig vom Nitritgehalt der Probe bestimmt werden.

Zur Bestimmung von Nitrosaminen (RNNO) wird 30µl Quecksilberchlorid in 300µl Probe gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wird auch hier mit 30µl 5%ige Sulfanilamidlösung für 15 Minuten inkubiert. S-Nitrosothiole sind Quecksilber-instabil. Nitrit wird durch das Sulfanilamid, wie oben beschrieben, gebunden und ebenso nicht erfasst.

Für die Bestimmung der Nitrosyleisenkomplexe, wie sie im Nitrosylmyoglobin und Nitrosylhämoglobin (NO-Häm) vorkommen, wird das Reaktionsgefäß auf 37° C runtergekühlt um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Als Reaktionsflüssigkeit dient 40ml Ferricyanidlösung (0,05M; 1,646 g Ferricyanid auf 100ml PBS bei pH 7,5). Unmittelbar vor Injektion der Probe wird 100µl Antifoam-Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben, welche Schaumbildung unterbindet. Freies bioaktives NO kann eine kovalente Bindung mit dem zentralen Eisenatom des Porphyrin-Ringes des Hämproteins eingehen. Im Ferricyanid-Assay wird das am zentralen Eisenatom gebundene NO durch Oxidation freigesetzt und quantitativ mittels CLD bestimmt. Es entsteht reduziertes Ferrocyanid und ein oxidiertes Hämprotein (z.B. Metmyoglobin oder Methämoglobin):



Die Datenaufnahme und Integration erfolgte über einen handelsüblichen Computer mit der Software Chromstar (SCPA, Weyhe-Leeste, Deutschland). Zur Berechnung des Signals wurde die Fläche unter der Kurve verwendet. Zur Eichung der Anlage wurden Nitritstandards mit aufsteigenden Konzentrationen 0, 50, 100, 150, 200 nM aufgegeben ^{27, 131, 133, 134}.

2.10 Analytische Quantifizierung von Nitrat in Gewebe und Plasma mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit dem ENO-20 (Abb.7) ist hoch sensitiv für Nitrit und Nitrat und in erster Linie zur eindeutigen Trennung von anderen Verbindungen geeignet. Sie beruht auf der Absorptionsänderung von Nitrit nach der Reaktion mit Griessreagenz ¹³⁵. Die Anlage besteht aus einer Trägerpumpe, einer Vorsäule, einer Separationssäule, einer Reduktionssäule, einer Reaktionspumpe und dem Detektor.

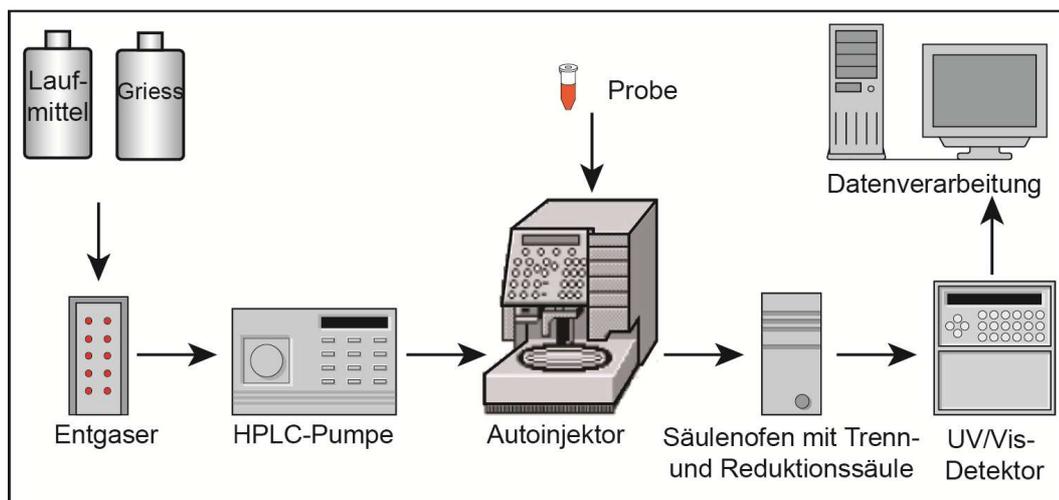


Abb. 7: Schematischer Aufbau des ENO 20

Zur Messung von Nitrat wurden 50µl Probe (Homogenat oder Plasma) mit 50µl Methanol (eiskühlt) versetzt und 10 Minuten bei 3°C mit 10000 G zentrifugiert. Zur Analyse wurde 20µl deproteinierter Überstand aufgegeben. Die Vorsäule dient zur Reinigung der Probe und zur Verlängerung der Haltbarkeit der Trennsäule. Nach 10 Gewebe- bzw. 100 Plasmaproben musste sie gewechselt werden. Das Packen der Vorsäule erfolgte mit NO packing gel (Eicom) welches in wenigen Millilitern Aceton aufgelöst und tröpfchenweise aufgegeben wurde. Zur weiteren Säuberung wurde die gepackte Vorsäule mit 4ml Methanol und 2ml destilliertem Wasser gespült. Zur Herstellung von Carrier und Reactor dienten Carrier- und Reactor A/B- Pulver (Eicom). Das Carrierpulver wurde mit 1000ml Lösung I (10% Methanol) und der Reactor B-Pulver mit 500ml Lösung I gemischt. Das Reactor A-Pulver wurde in 500ml Lösung II (2,5% v/w HCl in Lösung I) gelöst. Die Trennsäule teilt die einzelnen Komponenten abhängig von ihren verschiedenen Retentionszeiten auf, wodurch die Nitrit- und Nitratkonzentrationen separat voneinander bestimmt werden können. In der

Reduktionssäule wird Nitrat durch eine Verbindung aus Cadmium und reduziertem Kupfer zu Nitrit reduziert. Das Nitrit reagierte mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz welches mit N-1-Naphtylethylendiamid eine purpurne Azo-Verbindung bildete. Die durchflussspektromphotometrische Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 540nm. Das Signal wird in Volt umgerechnet (Eicom 500) und als Peak wiedergegeben. Zur Datenverarbeitung diente die Software Powerchrom. Die Konzentrationen konnten anhand der Fläche unter der Kurve errechnet werden. Vor jeder Messung wurde dreimal ein geprüfter Standard von 10µM Nitrat und 10µM Nitrit aufgegeben¹³³.

2.11 Mathematisch-statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Origin 7GSR2 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Die erhaltenen Messdaten wurden als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE) angegeben. Überprüfung der Gauß'schen Normalverteilung wurde der „Student's t-Test“ für unabhängige Stichproben zum Vergleich der Mittelwerte der fünf verschiedenen Versuchsgruppen verwendet (Excel, Microsoft Office 2007). Ein P- Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der in vivo Perfusion über die Aorta abdominalis

3.1.1 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Gewebepräparation und –perfusion

Um die akuten Auswirkungen von Epicatechin auf den NO-Pool im Gewebe und im Plasma zu charakterisieren, wurden C57 BL/6 Mäuse Epicatechin in einer definierten Dosis per Gavage direkt in den Magen appliziert. Zum Schutz vor Nitrit- und Nitratkontaminationen, bzw. durch freies Hämoglobin wurden die Organe vor ihrer Entnahme retrograd über die Aorta abdominalis perfundiert.

Während der Experimente wurden die Proben lichtgeschützt gelagert um den photolytischen Einfluss von UV-Strahlung auf den NO-Pool zu vermindern²⁷.

Zur Vermeidung von Blutgerinnseln in den Organen wurden die Mäuse 8 Minuten vor dem Hautschnitt mit Heparin antikoaguliert. Ausgehend von 20 I.E. Heparin wurde im Verlauf die Dosis auf 40 I.E. erhöht, aufgrund einer gelegentlich makroskopisch erkennbaren Marmorierung der Organe, blutiger Rückstände und Koagelbildungen.

Auf eine Trennung der Vena und Aorta abdominalis wurde verzichtet um Blut- und Zeitverluste zu vermeiden, da die resultierende Ischämie und Zeitverzögerung einen zu großen Einfluss auf den NO-Pool gehabt hätten²⁶. Aus dem gleichen Grund wurde zuerst der Faden um die Gefäße gezogen zur späteren Fixierung der Kanüle in der Aorta, bevor der Kreislauf unterbrochen wurde. Um größere Blutverluste bei Beginn der Präparation und Eröffnung der Aorta abdominalis zu verhindern wurde eine Mikroklammer unterhalb des Abgangs der Arteriae renalis um die Vena und Aorta abdominalis gelegt. Anfangs wurde eine weitere Mikroklammer kurz vor dem Abgang der Arteriae iliacae verwendet um Blutverluste aus den unteren Extremitäten (insbesondere der Vene durch die Präparation) zu verhindern. Im Verlauf wurde darauf verzichtet, da sie sich störend auf die Präparation der Aorta abdominalis sowie auf das Einführen der Kanüle auswirkte und Zeitverzögerungen nach sich zog. Eine vorsichtige und schnelle Präparation verhinderte Blutverluste und Ischämien.

Die Mikroklammer unterhalb der Arteriae renalis wurde nach Einlage der Kanüle in die Aorta abdominalis zur zusätzlichen Fixierung (über dem Seidenfaden) der Kanüle verwendet zur Verhinderung eines druckbedingten Lösens der Kanüle. Die Fixierung nur mit Seidenfaden oder Mikroklammer führte in 19% der Fälle zu

einer verfrühten Lösung der Kanüle und einer minderwertigen Perfusion der Organe.

Eine weitere Schwierigkeit lag in der Platzierung und Fixierung der abgestumpften Kanüle in der Aorta abdominalis, welche während der Präparation leicht einriss. Es musste vor allem auf die Vena abdominalis mit ihrer feinen Gefäßwand geachtet werden, sowie auf die umliegenden kleinen Gefäße, die bei Beschädigung hohe Blutverluste nach sich zogen.

Eine falsche Lage der Kanüle in der Bauchschiagader war durch eine zystische Ausstülpung der Adventitia nach Start der Perfusion zu erkennen.

Die Perfusion konnte erst nach Eröffnung des Thorax und der Durchtrennung der Vena cava superior gestartet werden, da der Druck zur Zerstörung der einzelnen Organe und Gefäße führte.

Erythrozyten werden als einer der Hauptspeicher für Nitrit im Blut betrachtet³¹, weshalb besonders auf eine vollständige Perfusion geachtet werden musste. Dies wurde unter anderem am Farbumschlag der Leber gemessen, welcher als Hinweis auf Blutleere gilt.

Zur Objektivierung des Perfusionserfolges wurde eine Perfusion mit Evans Blue durchgeführt. Die Organe färbten sich blau an bei einer Flussgeschwindigkeit von 10ml/min über 2:30 Minuten. Nur die Lunge zeigte einen im Vergleich schwächeren Farbumschlag. Eine Erhöhung des Druckes führte zur Zerstörung der Lunge und einzelner Organe.

Der Versuch der Perfusion über die linke Herzkammer zeigte eine makroskopisch minderwertige Perfusion der Organe, vor allem von Nieren und Leber.

Die einzelnen Organe wurden nach der Entnahme direkt in nitritarmen Wasser gespült um anhaftende Haare und Blutspritzer zu beseitigen, die falsch hohe Nitritwerte hervorrufen könnten.

3.1.2 Einfluss der Geschwindigkeit der Präparation auf den gewebsständigen NO-Pool

Versuche zur Etablierung der Perfusion über die Aorta abdominalis zeigten einen deutlichen Einfluss der Präparationsgeschwindigkeit auf den gewebsständigen Spiegel an Nitrit.

Die Bestimmung des Nitrits und der Nitrosospezies, sowie NO-Häm erfolgte mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion.

Die Präparationszeit wurde vom Hautschnitt bis zum Start der Rollerpumpe gemessen. In der Gruppe 3-4 Minuten zeigten sich die höchsten Nitritwerte im Vergleich zu den anderen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich schon zwischen den Gruppen 3-4 Minuten und 5-7 Minuten (Abb.8 und Tabelle 3). In den Gruppen der längeren Präparationszeit zeigten sich größere Varianzen der Werte. Daraus lässt sich schließen: je länger die Präparationszeit desto mehr exogene Faktoren führen zu einer Metabolisierung des Nitrits. Daher ist der tatsächliche Nitritwert der Organe nach längerer Präparation nicht mehr exakt messbar. Eine weitere Verkürzung der Präparationszeit unterhalb 2 Minuten war nicht möglich. Es gingen nur Mäuse in die Wertung ein deren Präparation unterhalb 4 Minuten lag und makroskopisch frei von Blutrückständen war (z.B. weiße Lunge, helle Leber).

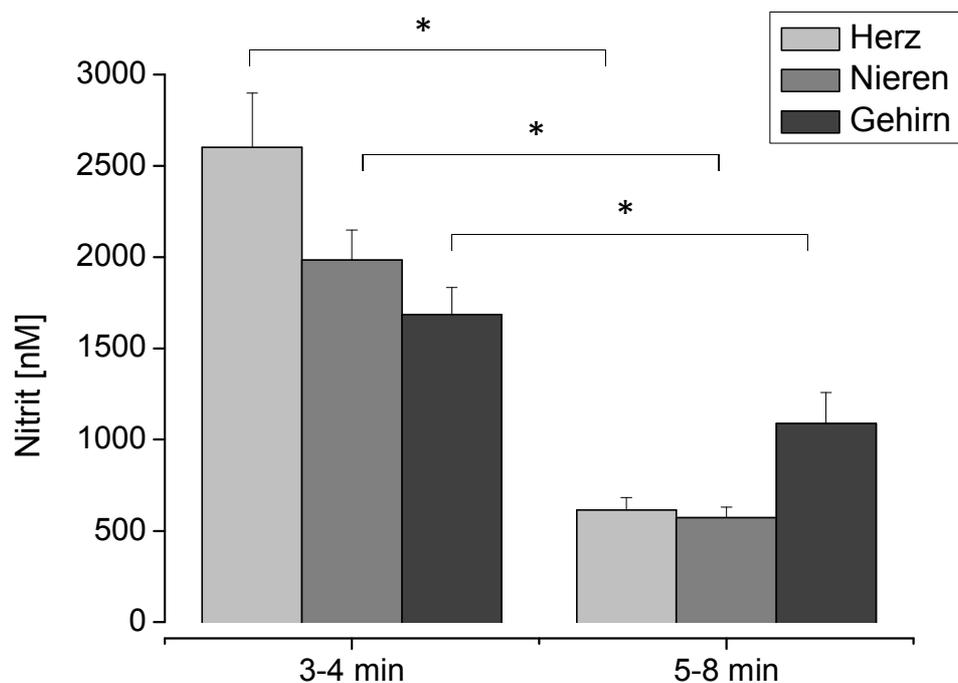


Abb. 8: Nitritgehalt der verschiedenen Organe abhängig von der Präparationsgeschwindigkeit exemplarisch an Herz, Nieren und Gehirn. Mit der Geschwindigkeit steigt auch der Nitritgehalt in den Organen (n=6-10).

Tabelle 3: Nitritgehalt in Abhängigkeit von der Präparationszeit. Der Nitritgehalt in den verschiedenen Organen steigt mit der Geschwindigkeit der Präparation. In allen Organen außer der Lunge kann ein signifikanter Unterschied der Nitritwerte zwischen der Gruppe 3-4 und 5-7 Minuten aufgezeigt werden (n=6-10; SE=Standardfehler, MW=Mittelwert).

	3-4 min MW ± SE (nM)	5-8 min MW ± SE (nM)	9-14 min MW ± SE (nM)	20-40 min MW ± SE (nM)	Signifikanzen (P< 0,05) 3-4 / 5-8 min
Herz	2602± 295	613 ± 70	482 ± 155	630 ± 283	0,0001
Leber	958 ± 138	540 ± 78	412 ± 105	259 ± 168	0,0303
Nieren	1984 ± 163	572 ± 57	733 ± 93	514 ± 183	0,00018
Lunge	2889 ± 65	746 ± 29	556 ± 216	916 ± 467	1,7878
Gehirn	1685 ± 148	1088 ± 170	500 ± 169	501 ± 199	0,0384

3.2 Diätetischer Einfluss auf den NO- Pool (durch Nahrungsentzug)

Um exogene Einflüsse auf die Nitritwerte durch beispielsweise Nahrungsaufnahme zu minimieren wurden für die weiteren Experimente jeweils vier Stunden Nahrungskarenz vor Gavage eingehalten.

Ein Vergleich der Nitritwerte im Gewebe und Plasma der basalen (ohne Futterentzug) mit der NaCl- (Gavage mit NaCl nach Futterentzug für vier Stunden) Gruppe zeigt sowohl im Plasma als auch im Gewebe (mit Ausnahme der Leber) eine signifikante Reduktion der Nitritwerte abhängig vom Fütterungszustand (Abb. 9A und 8B)

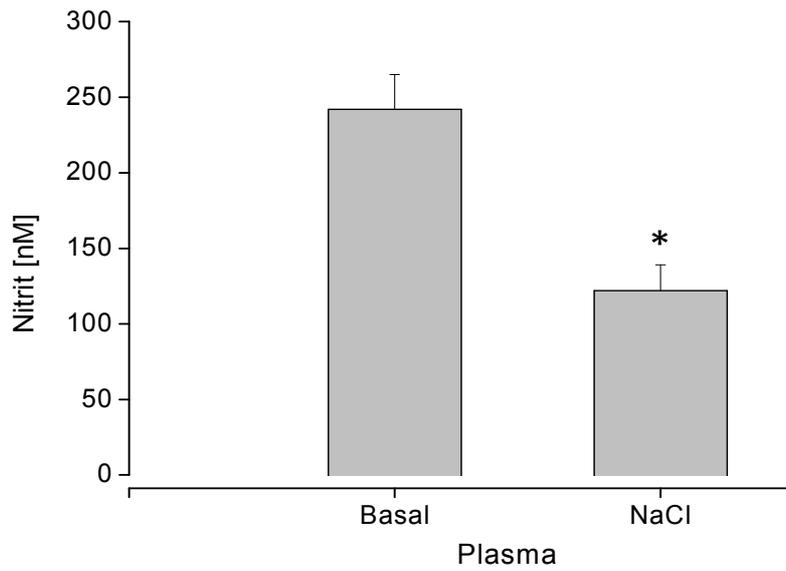
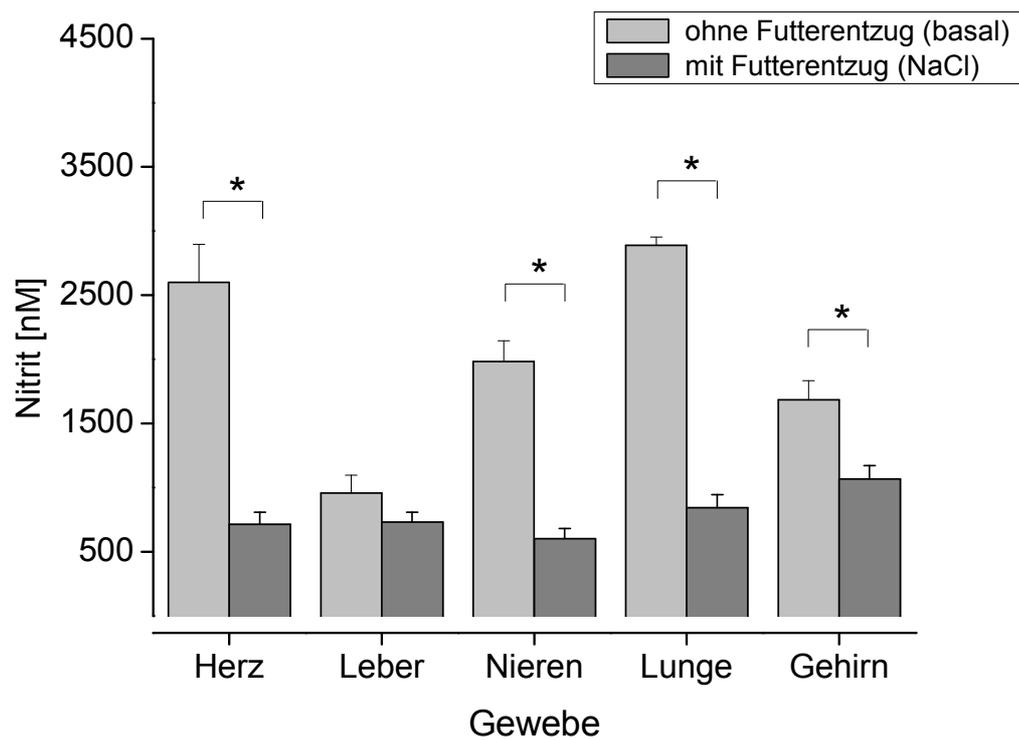
A**B**

Abb. 9A und 8B: Nitritgehalt im Plasma (A) und Gewebe (B) abhängig vom Ernährungszustand (ohne Futterentzug; mit vierstündigen Futterentzug; Trinkwasser ad libitum). Unter Futterentzug zeigt sich eine signifikante Reduktion des Nitritgehaltes im Plasma (A) und in den Organen (B) außer in der Leber ($p < 0,05$; $n = 5-9$).

3.3 Metabolismus des Epicatechins

Epicatechin und dessen Hauptmetabolite (3'- und 4'-O-Methyl-Epicatechin) wurden mittels HPLC im murinen Plasma bestimmt.

In der basalen (ohne Behandlung) und in der NaCl-Gruppe nach vierstündigem Futterentzug wurden konstant nur minimale Spuren von ca. 65 nM Epicatechin im Plasma detektiert. 30 Minuten nach Epicatechingavage waren die höchsten Werte für Epicatechin und Metabolite zu verzeichnen. Epicatechin und 3-O-Methyl-Epicatechin waren in höheren Konzentrationen zu messen als 4-O-Methyl-Epicatechin. Über die Zeit wurden die Konzentrationen kontinuierlich geringer. Nach 90 Minuten konnte noch bis zu 5838 nM im Plasma gemessen werden, wobei der größte Teil aus dem Hauptmetabolit von Epicatechin, dem 3-O-Methyl-Epicatechin bestand (Abb. 10). In keiner der fünf Gruppen wurde Catechin detektiert.

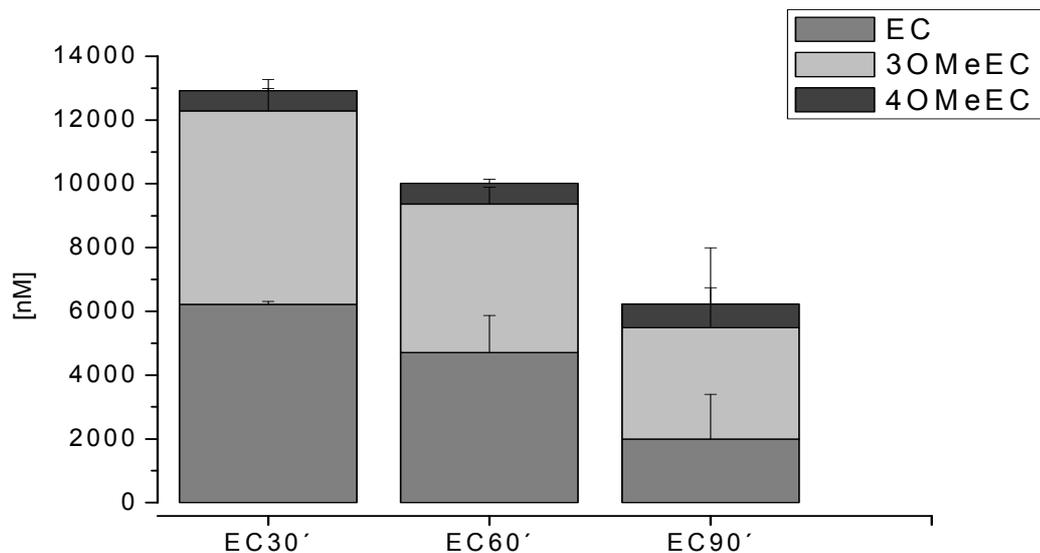
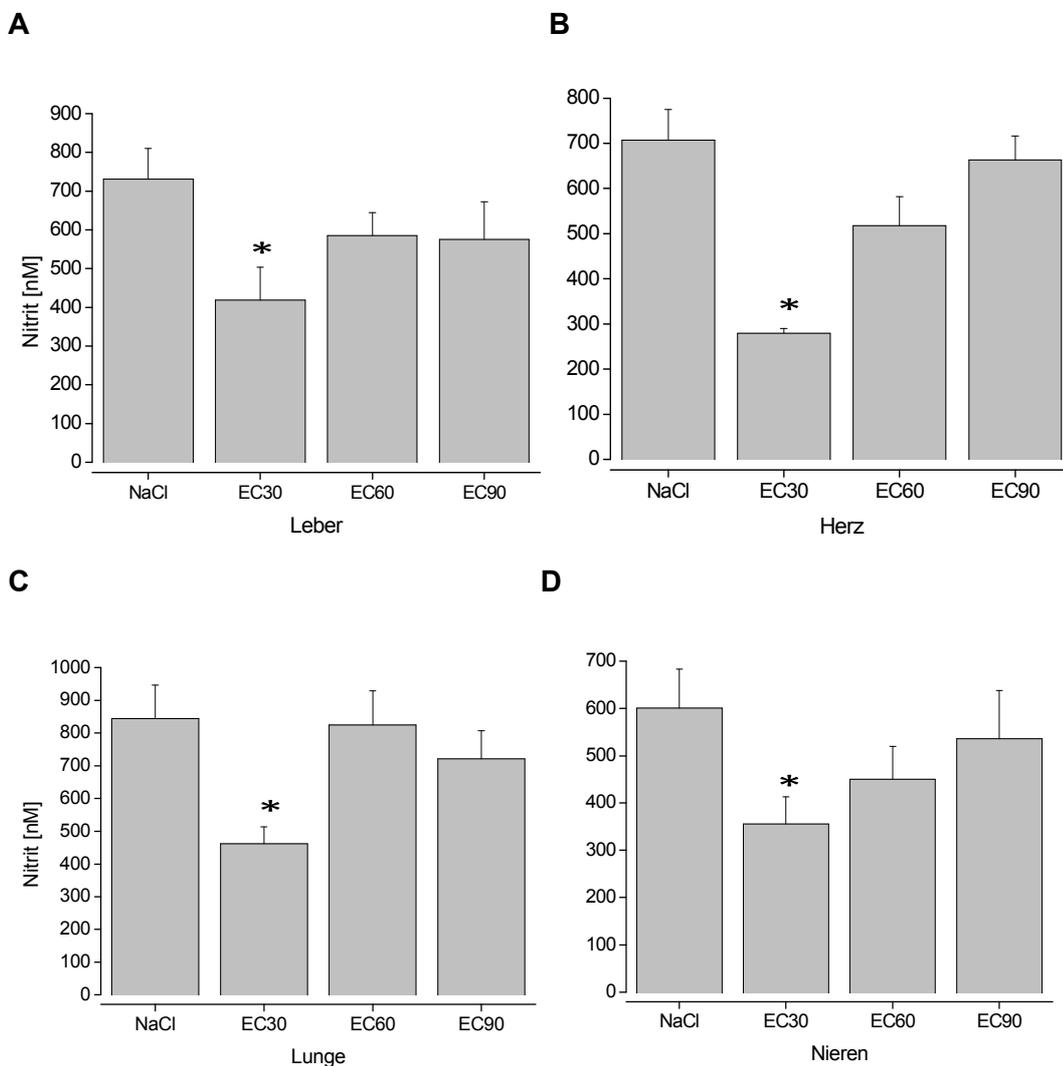


Abb. 10: Quantifizierung von Epicatechin und -metabolite im Plasma über einen zeitlichen Verlauf nach NaCl- und Epicatechingavage (nach 30, 60 und 90 Minuten) (3OMeEC= 3'-O- Methyl- Epicatechin; 4OMeEC= 4'-O-Methyl- Epicatechin; EC= Epicatechin; n= 3- 5; Fehlerbalken= SE).

3.4 Einfluss von Epicatechin auf Nitrit und Nitrosopezies in Gewebe und Plasma

Um den Einfluss von Epicatechin auf den gewebsständigen NO-Pool zu untersuchen wurde C57 BL/6 Mäusen entweder NaCl oder Epicatechin (35mg/kg KG in NaCl) per Gavage appliziert. Nach 30, 60 oder 90 Minuten erfolgte die Perfusion, die Entnahme und Messung der Organe. In der NaCl Gruppe hatte die Gavage keinen signifikanten Einfluss auf den Nitritgehalt der Organe, weder nach 30 Minuten noch nach 60 Minuten oder 90 Minuten (Daten nicht getrennt gezeigt).



E

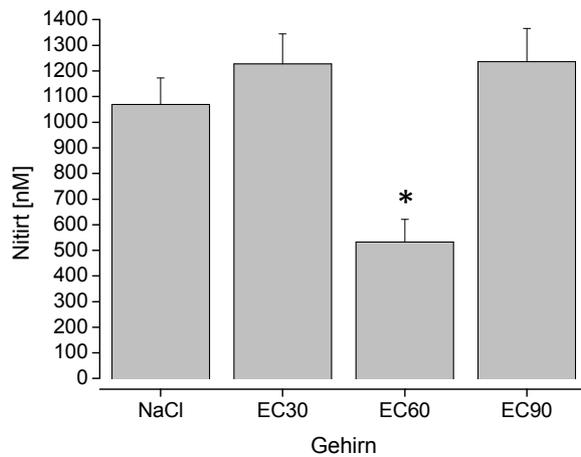


Abb. 11 A-E: Darstellung des Nitritgehalts im Gewebe abhängig von dem Zeitpunkt der Epicatechingabe (35mg/kg KG). Messung des Nitrits 30 Minuten nach Gavage (EC 30), nach 60 Minuten (EC 60) und nach 90 Minuten (EC 90). 30 Minuten nach Gavage zeigt sich eine signifikante Reduktion des Nitritspiegels (A-D), im Gehirn (E) nach 60 Minuten. Im Verlauf steigt der Nitritspiegel auf Normwerte (Vergleich NaCl-Gruppe) (*= $p < 0,05$; $n = 4-7$).

Die Epicatechingabe führte in allen Organen (außer dem Gehirn) zu einer signifikanten Senkung der Nitritwerte ($p < 0,05$; bzw $p < 0,001$) nach 30 Minuten, im Gehirn erst nach 60 Minuten. Nach 90 Minuten stieg der Nitritgehalt der Organe wieder auf die Ausgangswerte an (ähnlich der NaCl- Gruppe). Die Ausgangswerte der basalen Gruppe werden nicht wieder erreicht (Abb. 11A-E).

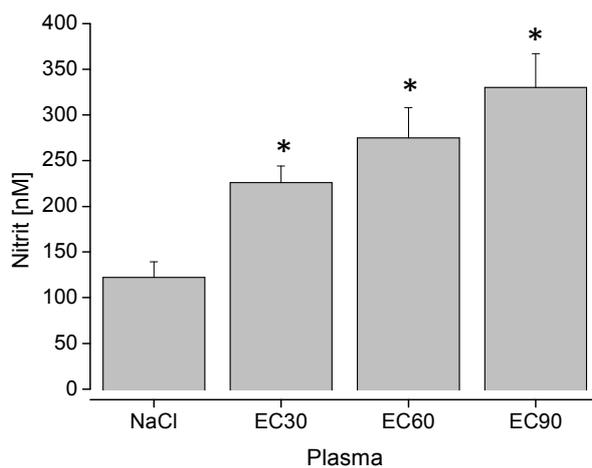


Abb. 12: Nitritmessung im Plasma. Die auf Nahrungsentzug und mit NaCl- Gavage behandelte Gruppe zeigt einen signifikanten Unterschied zu den mit Epicatechin behandelten Mäusen. Zwischen EC30 bis EC90 zeigt sich eine steigende Tendenz des Nitritspiegels ($n=4-7$; Fehlerbalken=SE).

Nitrit im Plasma unterschied sich signifikant zwischen der mit Epicatechin behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe. Es konnten bei sinkenden Nitritwerten im Gewebe gleichzeitig steigende Nitritwerte im Plasma bestimmt werden. Die Nitritwerte im Plasma der behandelten Mäuse zeigten über die Zeit eine steigende Tendenz ohne signifikante Unterschiede (Abb. 12).

Die Messung der RNOs zeigte außer in der Leber keinen signifikanten, akuten Einfluss von Epicatechin auf die Nitrosospezies (Abb. 13). Eine Tendenz war nicht ersichtlich. Die höchsten Werte wurden jeweils in der Leber gemessen. Nur hier konnte ein Einfluss von Epicatechin auf RNO detektiert werden. Die Gruppen EC30 und EC90 unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Eine Unterteilung in RSNO und RNNO erbrachte keine ersichtlichen Tendenzen oder Signifikanzen.

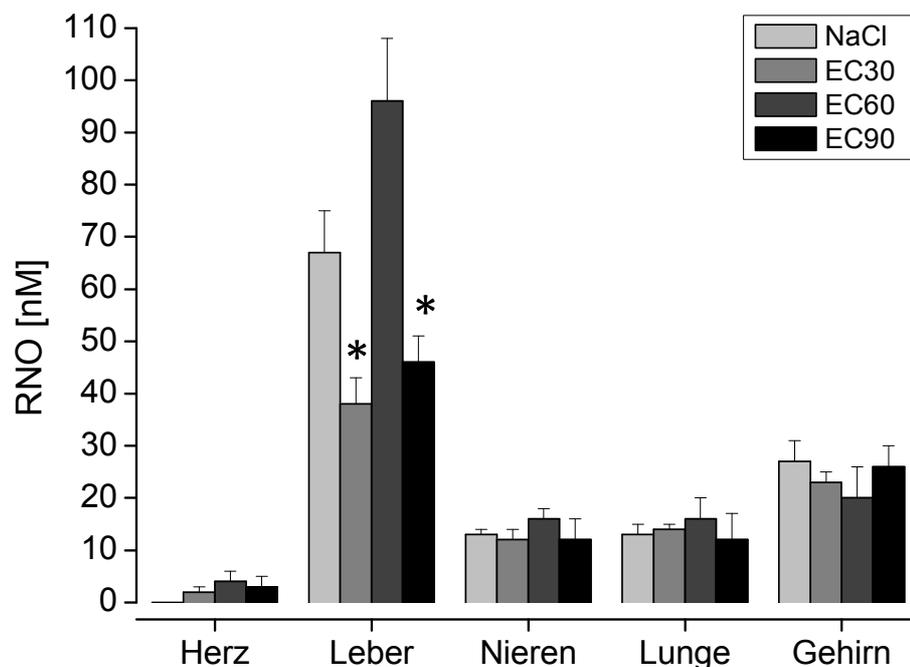


Abb. 13: Messung von RNO im Gewebe der verschiedenen Gruppen (NaCl-Gruppe, 30 Minuten nach Epicatechingabe (EC30), 60 Minuten danach (EC60) und 90 Minuten danach (EC90)). Es konnten lediglich in der Leber signifikante Unterschiede der EC 30 und EC90-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden (n= 4-7; Fehlerbalken=SE).

Die gemessenen Werte für NO-Häm tendierten in allen Gruppen in allen Organen, außer dem Gehirn, gegen 0 nmol/l. Nur im Gehirn konnten Werte von

11 ± 5 nmol/l in der basalen Gruppe, 7 ± 4 nmol/l in der NaCl-Gruppe, 3 ± 5 in der EC 30-Gruppe, 9 ± 4 nmol/l in der EC 60-Gruppe und 12 ± 2 nmol/l in der EC 90-Gruppe gemessen werden. Zwischen 30 Minuten und 90 Minuten unterschieden sich die Werte signifikant.

Aufgrund der geringen Probenmenge des Plasmas (geringes Blutvolumen der Mäuse) konnten die NO-Häm, RXNO- und RNNO-Werte im Plasma nicht bestimmt werden.

3.5 Analytische Quantifizierung von Nitrat in Gewebe und Plasma

Sowohl der gewebsständige als auch der plasmatische Nitratgehalt zeigte keine signifikanten Änderungen. Dies weist darauf hin, dass Epicatechin keinen direkten Einfluss auf Nitrat nimmt. Die Nitratwerte zeigten deutlich höhere Konzentrationen als die Nitritwerte und größere Schwankungen. Dies ist unter anderem auf die vergleichsweise (zur CLD) weniger sensitive Messmethode zurückzuführen. Wie oben aufgeführt haben die Nitratwerte einen geringen Einfluss auf die Nitritwerte und hängen unter anderem stärker mit der Alimentation zusammen. Im Vergleich zum Gewebe (Werte zwischen 2000nM bis 10000nM) konnten im Plasma Nitratwerte im Bereich zwischen 20000 nM und 40000nM gemessen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nitratwerte in Gewebe und Plasma (Bestimmung mit HPLC) nach NaCl- Gabe (1,7% Ethanol), 30 Minuten nach Epicatechingabe (EC30), 60 Minuten danach (EC60) und 90 Minuten danach (EC90). Es sind keine eindeutigen Tendenzen und keine Signifikanzen ersichtlich (n=3-7).

	NaCl MW ± SE (nM)	EC30 MW ± SE (nM)	EC60 MW ± SE (nM)	EC90 MW ± SE (nM)
Herz	5930 ± 677	5918 ± 911	2403 ± 1699	5317 ± 515
Leber	2561 ± 452	7196 ± 866	3986 ± 1218	4038 ± 761
Nieren	2211 ± 496	3901 ± 147	6659 ± 999	5446 ± 621
Lunge	7138 ± 512	4866 ± 67	3810 ± 710	6492 ± 630
Gehirn	5204 ± 924	8035 ± 441	4807 ± 1303	2987 ± 439
Plasma	22244 ± 3799	33049 ± 5306	23629 ± 2773	38489 ± 20088

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Wirkung von Epicatechin auf den NO-Pool im Gewebe und Plasma zu untersuchen.

Hierzu wurde die Gewebepfusion über die Aorta abdominalis und die Organentnahme am Mausmodell etabliert (Orientierung an Bryan et al. 2004)⁴⁰. Es wurde Epicatechin und dessen Metabolite im Plasma über die Zeit mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die Nitratbestimmung wurde ebenfalls anhand der HPLC durchgeführt. Die Detektion von Nitrit, RNO und RNNO erfolgte via Chemilumineszens, ebenso die Bestimmung von Nitrosyleisenkomplexe mit dem Ferricyanid-Assay.

Im Folgenden wird zunächst die Relevanz des NO- Pools im Gewebe im Rahmen der aktuellen Studienlage erläutert (4.1). Im Anschluss wird auf die Dosierung und Metabolisierung von Epicatechin eingegangen (4.2). Abschließend werden die Ergebnisse der Messungen von Epicatechin auf den NO-Pool diskutiert (4.3) und Überlegungen angestellt bezüglich der potentiellen Wirkmechanismen von Epicatechin und dessen Metabolite auf den NO- Pool (4.4). Der Abschnitt 4.5 fasst die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse zusammen und gibt einen Ausblick auf weiterführende Experimente zur Klärung noch offener Fragen bezüglich der Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene.

4.1 Quantifizierung des gewebständigen NO-Pools

Die NO-Bioverfügbarkeit und –Bioaktivität ist von verschiedenen Faktoren, insbesondere der Aktivität der NOS, Interaktionen mit löslicher Guanylcyclase und den Abbau zu Nitrit und Nitrat, sowie des azidischen Status abhängig.

Wenige Studien haben sich mit dem gewebständigen NO-Pool und dessen Konzentrationen beschäftigt. Das Wissen hierüber jedoch ist von grundlegender Bedeutung für die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen gewebständigen und plasmatischen NO-Pool und vaskulärer Homeostase¹³⁶. Rodriguez et al. vermuteten schon 2003 aufgrund ihrer Ergebnisse in vaskulärem Gewebe *in vitro*, dass die gemessenen NO-Produkte im Gewebe unter basalen Konditionen physiologische Funktionen erfüllen¹³⁶.

Durch eine definierte Methode der Gewebepfusion ist es möglich, den gewebständigen NO-Pool frei von Einflüssen des plasmatischen NO-Pools, Hämoglobin oder von Ischämie zu messen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO²⁶ können nur dessen Metabolite Nitrit, Nitrat, NO-Häm und RNO

bestimmt werden und dadurch auf die NO-Bioverfügbarkeit und NO-Bioaktivität geschlossen werden ¹³⁷. Ein Anstieg von diesen Metaboliten würde demnach auf freigesetztes NO hinweisen. UV-Licht kann NO freisetzen, weshalb die Versuche möglichst lichtgeschützt durchgeführt wurden ²⁷.

Die Perfusion über die Aorta abdominalis zeigte in der Evans Blue-Färbung eine vollständigere Perfusion als über die linke Herzkammer. Diese Methode wurde in Anlehnung an Experimente zur Messung des gewebsständigen NO-Pools von Bryan et al. ⁴⁰ an Ratten etabliert. Eine Bestimmung der NO-Spezies im Modell der Maus war bislang nicht etabliert. Die Messungen von Bryan et al. zeigten eine hohe Dynamik von NO-Produkten mit kurzen Halbwertszeiten in Verbindung mit der Gewebeoxygenation und dem Redoxstatus. Es konnte demonstriert werden, dass gewebsständiges Nitrit während kurzen hypoxischen Phasen als ein wichtiger extravaskulärer Pool für NO dient. Die Nitritanteile im Gewebe können als Indikator für oxidativen und nitrosativen Stress dienen ⁴⁰.

In der vorliegenden Studie übersteigen die gewebsständigen Nitritspiegel die plasmatischen Nitritspiegel um das zwei- bis vierfache und scheinen daher als wichtiger NO-Speicher zu fungieren.

Da die Halbwertszeit von Nitrit in Gegenwart von Erythrozyten im Sekundenbereich liegt ²⁶, mussten die Gewebe gut perfundiert werden und frei von Blutrückständen sein. Die Präparation, Perfusion und Probenaufbereitung erfolgte innerhalb weniger Minuten wodurch längere Liegezeiten der Proben verhindert wurden. Diese hätte zur Verfälschung der Ergebnisse geführt.

Ein Vergleich der Nitritwerte der Gewebeproben der verschiedenen Präparationszeiten, zeigten signifikante Unterschiede. Ein Vergleich der Gruppe mit einer Präparationszeit von 2-4 Minuten mit denen von 5-7 Minuten zeigten schon signifikant höhere Nitritwerte. Ein Unterschied von 2-4 Minuten zu 20-40 Minuten bewirkte mindestens eine Verdreifachung der Nitritspiegel mit verhältnismäßig geringeren Schwankungen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Bryan et al. ⁴⁰. Ursachen hierfür sind verschiedene exogene Faktoren, die auf den NO-Pool Einfluss nehmen, wie beispielsweise Ischämie durch Blutverluste aufgrund längerer Präparation, die Instabilität der NO-Produkte außerhalb des Organismus und Freisetzung von Nitrit durch UV-Licht.

Verschiedene Autoren suggerieren, dass ein Großteil des gewebsständigen Nitritspiegels von der Nahrungsaufnahme abhängt und nicht von der endogenen

NO- Produktion durch die eNOS ³⁶. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen, dass Nitritspiegel sowohl im Gewebe als auch im Plasma unter alimentärem Einfluss stehen. Eine vierstündige Nahrungskarenz führte zu einer signifikanten Reduktion der gewebsständigen Nitritspiegel. Die RSNO und RNO-Werte zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede im Gewebe bis auf die Leber. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie und anderen Autoren bezüglich der ebenfalls erniedrigten Nitritspiegel im Plasma ist unter anderem auf einen unterschiedlichen Metabolismus zwischen Maus und Mensch zurückzuführen oder auf die verhältnismäßig lange Fastenperiode.

Die Gewebeproben für die RNO und RNNO-Bestimmung wurden mit NEM und EDTA behandelt um Reaktionen von NO mit freien Sulfhydrylgruppen zu verhindern. Um eine zusätzliche Verfälschung durch Nitrit zu verhindern wurden die Proben mit Sulfanilamid versetzt, wodurch ein stabiles Diazoniumsalz mit Nitrit gebildet wird, welches nicht reduziert wird durch die verwendete Reaktionslösung ^{27, 131, 133}.

Die Konzentrationen von Nitrosospezies unterscheiden sich in verschiedenen Studien, weshalb vorgeschlagen wurde das Hauptaugenmerk auf Konzentrationsänderungen unter bestimmten Bedingungen zu legen und daraus Schlüsse zu ziehen und weniger auf die Konzentrationen selbst ²⁷.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen mit Ausnahme der RNO-Werte in der Leber keine signifikanten Unterschiede in den NO-Häm-, RNNO- und RSNO-Konzentrationen im Gewebe unter basalen Bedingungen, nach vierstündigem Fasten oder nach Epicatechingabe. Dies ist möglicherweise auf den kurzen Zeitrahmen der Studie zurückzuführen oder als Zeichen ihrer Stabilität zu werten. Kumar et al. konnten im Hind-Limb- Modell beispielsweise erst nach sieben Tagen einen Anstieg der RSNO- und RNNO- Werte durch Nitritgabe messen, obwohl NO schon vorher gebildet worden war ⁵².

Hingegen konnten Elrod et al. im Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber einen direkten Anstieg von hepatischen RNO-Spiegel nachweisen ⁴². In der vorliegenden Studie konnte 30 Minuten nach Epicatechingavage eine Reduktion der RNO-Werte in der Leber gemessen werden. In diesem Versuchsaufbau lag jedoch keine Ischämie vor, weshalb die RNO-Spiegel möglicherweise auch nicht anstiegen.

NO-Häm entsteht durch die Reaktion von oxygenierten Hämoglobin oder Myoglobin mit NO. Hohe NO-Häm Werte werden unter anderen als Marker für

nitrosativen Stress diskutiert^{25, 74, 138}. In den meisten Organen lagen die Werte für NO-Häm unterhalb der Detektionsgrenze. Nur im Gehirn konnten Werte im nanomolaren Bereich gemessen werden, die ähnlich wie Nitrit im Gewebe tendenziell durch Epicatechingabe nach 30 Minuten erst sanken und über die nächsten 60 Minuten wieder anstiegen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Bryan et al. überein, die verhältnismäßig hohe Spiegel für NO-Häm im Gehirn von Ratten messen konnten⁴⁰. Die Tatsache, dass NO-Häm-Produkte in den restlichen Geweben nicht gemessen werden konnten, lässt sich womöglich auf deren niedrige Konzentrationen und deren Instabilität⁴⁰ zurückführen. Es könnte als ein Zeichen für wenig Gewebeischämie während der Präparation gedeutet werden und für geringen nitrosativen Stress. Da mit dem Ferricyanidassay auch andere Nitrosyl-Eisenkomplexe gemessen werden ist die Bildung von anderen Nitrosyl-Eisenkomplexen/Transnitrosationen anders als Nitrosylhämoglobin bzw. Nitrosylmyoglobin im Gehirn denkbar.

4.2 Epicatechindosis und Metabolisierung

Als Orientierung zur Festlegung der Epicatechindosis wurden Daten aus vorangehenden Veröffentlichungen verwendet. In verschiedenen Studien erfolgten die Darreichungsformen entweder intragastral, in der Nahrung ad libitum oder aufgelöst im Trinkwasser ad libitum und die Dosierungen schwankten zwischen 100mg/kg/d¹²⁵, 500mg/kg⁹³, 20 und 500mg/kg¹²⁶, 2,5-30mg/kg/d¹²⁷ und 1- 10mg/kg/d^{77, 128-130}. In der vorliegenden Studie wurde deshalb eine mittlere Dosis von 35 mg/kg verwendet.

Karim et al. konnten eine dosisabhängige, endothelabhängige Relaxation (EDR) in Aortenringen von Kaninchen in vitro durch Procyanidine nachweisen¹³⁹. Andere Autoren konnten ebenfalls dosisabhängige Wirkungen von Flavanolen nachweisen (verstärkte FMD bei höheren Dosierungen)¹⁰⁰. Neuere Veröffentlichungen zeigten einen unterschiedlichen proangiogenetischen Effekt von niedrigeren (0,2mg/kg/d) und einen antiangiogenetischen Effekt von höheren (20mg/kg/d) Dosen von Polyphenolen (jedoch nicht EC) auf postischämische Neovaskularisation in vivo¹⁴⁰. Van Praag konnte zeigen, dass niedrige Dosen (15mg/kg/d) an Epicatechin die Gedächtnisfunktion und Angiogenese in Gehirnen von Mäusen positiv beeinflussten, ganz im Gegensatz zu höheren Dosen (30mg/kg/d). Sie zogen den Schluss dass höhere Epicatechindosen nicht

unbedingt besser für die Hirnfunktion sind ¹²⁷. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre die Untersuchung des NO-Pools mit niedrigeren Dosierungen von Interesse.

Im humanen Plasma konnte schon ein bis zwei Stunden nach Kakaoaufnahme Epicatechin und seine Hauptmetabolite nachgewiesen werden ^{75, 141}. In der vorliegenden Studie konnte man schon nach 30 Minuten eine maximale Konzentration von Epicatechin und –metaboliten im Plasma messen. Dieses ist unter anderem auf einem vom Menschen unterschiedlichen murinen Metabolismus zurückzuführen.

Für unsere Versuche verwendeten wir ausschließlich Mäuse und keine Ratten. Interessanterweise zeigen in vitro Studien, dass sich die Stoffwechsellagen von Mäusen und Menschen bezüglich Tee Polyphenolen mehr ähneln als die von Ratten und Menschen ⁸⁶.

Der Vorteil von Mäusen besteht des weiteren in der Möglichkeit des Einsetzens von Knock-Out-Mäusen in weiterführenden Studien.

Die verschiedenen Gewebe verschiedener untersuchter Spezies haben eine unterschiedliche Sensitivität zu Hypoxie. Deshalb kann man nicht alle Ergebnisse von Tierstudien auf den Menschen übertragen ³², weshalb Langzeitstudien am Menschen folgen müssten.

4.3 Einfluss von Epicatechin auf den gewebsständigen und plasmatischen NO-Pool

Flavanole konnten in verschiedenen Studien positive Effekte auf die Endothelfunktion, die Insulinsensitivität, den Blutdruck, die Thrombozytenaggregation ⁷⁵, die LDL-Oxidation ^{76, 95, 112} und der Leukozytenfunktion ¹⁴² nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung mehrerer Kohortenstudien konnte eine Reduktion des Mortalitätsrisikos bis zu 65% nachweisen ¹⁴³. Als mögliche Mechanismen werden eine vermehrte NO Bioaktivität, eine Modulation des Immunsystems und vermehrte endotheliale Gefäßreparaturmechanismen diskutiert ¹³.

Yamazaki et al. konnten im Ischämie/Reperusionsversuch in vivo zeigen, dass Epicatechin schon in niedriger Dosierung (1mg/kg/Tag) über zehn Tage zu einer Reduktion der Infarktgröße um 50% führte und drei Wochen nach Ischämie/Reperfusion eine Reduktion um 32% gemessen werden konnte, als

Hinweis für den positiven Langzeiteffekt auf das Remodelling. Diese Ergebnisse waren unabhängig von Änderungen der Hämodynamik durch Epicatechin. Es konnte eine deutliche Reduktion des oxidativen Stresses gemessen werden¹⁰⁴. Dies lässt vermuten, dass Epicatechin nicht nur einen Akuteffekt hat, sondern auch Langzeiteffekte, die sich von der akuten Wirkung unterscheiden.

Man geht davon aus, dass Flavanole einen Teil ihrer Wirkung über den Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit und NO-Bioaktivität erreichen. Beispielsweise konnte eine erhöhte NO Plasmakonzentration und arterielle Dilatation nach Verzehr eines flavanolhaltigen Kakaotränkes in Verbindung mit erhöhten zirkulierenden Flavanolmetaboliten im Menschen gemessen werden^{77, 144}.

Als ein Marker für die Wirkung von Flavanolen auf verschiedene Gewebe wurde der NO-Pool perfundierter Mäuseorgane gemessen.

In der vorliegenden Studie zeigten Messungen des Plasmas von Mäusen, die flavanolarmes Futter erhielten, basale Werte um die 65nM. Auch nach vierstündigem Futterentzug wurden noch konstante Epicatechinkonzentrationen um 65nM und keine Epicatechinmetabolite gemessen. Die maximale Epicatechin- und Metabolitkonzentration konnte 30 Minuten nach Epicatechingavage gemessen werden. Die Hauptmetabolite waren 3-O-Methyl-Epicatechin (etwa die gleiche Konzentration wie Epicatechin) und in etwas geringeren Konzentrationen 4-O-Methylepicatechin. Nach 90 Minuten waren die Konzentrationen deutlich gesunken, wobei die Konzentration von 3-O-Methyl-Epicatechin die der anderen Metabolite überstieg.

In dem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass ein hoher Spiegel an Epicatechin und -metaboliten im Plasma nach 30 Minuten zu einer reduzierten Nitritkonzentration in den verschiedenen Geweben führte. Über die Zeit und mit dem sinkenden Anteil an Epicatechin und -metaboliten stieg auch die Nitritkonzentration im Gewebe und glich sich den Ausgangswerten der NaCl-Gruppe wieder an, erreichte jedoch nicht die Konzentrationen der ohne Futterentzug gemessenen Mäuse.

Im Gehirn zeigt sich dieser Effekt erst 30 Minuten später im Vergleich zu den anderen Geweben. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Epicatechin erst die Blut-Hirn-Schranke überwinden muss. Aus dieser Studie kann auch der Schluss gezogen werden, dass Epicatechin oder dessen Metabolite die Blut-Hirn-Schranke überwinden, da sich ein signifikanter Unterschied der Nitritwerte nach 60 Minuten im Vergleich zur NaCl-Gruppe zeigt, genau wie in den anderen

Gewebe. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Chu et al. Deren Arbeitsgruppe etablierte eine neue Methode zur Messung von Flavanolen in Gewebe, mit der sie Epicatechin in Gehirnen von Ratten messen konnten¹⁴⁵. Auch andere Autoren konnten Epicatechin und dessen Metabolite in perfundierten Gehirnen bestimmen^{90, 127, 146}.

Des Weiteren wurden Nitrit und Nitrat nach Epicatechingabe im Plasma bestimmt. Um exogene Einflüsse zu minimieren wurde das Blut nach Entnahme direkt abzentrifugiert, weiter verarbeitet und innerhalb weniger Minuten gemessen um eine Metabolisierung von Nitrit und Nitrat und Bildung von artifiziellen Nitrosospezies durch den Einfrierprozess zu verhindern¹⁴⁷.

Im Plasma konnte eine signifikante Reduktion der Nitritwerte der unbehandelten Mäuse im Vergleich zu den auf Futterenzug gesetzten Mäusen gemessen werden. 30 Minuten nach Epicatechingabe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Nitritspiegel, die sich der Konzentration der unbehandelten Mäuse angleichen. Dies lässt vermuten, dass durch Epicatechin eine Freisetzung des gewebsständigen Nitrits ausgelöst wurde und die Homöostase der zirkulierenden Nitritspiegel nach der Fastenperiode auf diese Weise wiederhergestellt wurde. Die Nitritspiegel der mit Epicatechin behandelten Mäuse im Plasma stiegen danach über die Zeit tendenziell weiter an.

Die RNO- und RNO-Konzentrationen zeigten wie oben beschrieben in der Leber die höchsten Werte und signifikante Unterschiede über die Zeit. In den anderen Geweben zeigten sich keine Tendenzen als Reaktion auf die Epicatechingabe. Im Herzen konnten auffällig wenig RXNOs und keine RNOs gemessen werden.

Für NO-Häm konnten nur im Gehirn Werte gemessen werden. Die Werte zeigten die gleiche Tendenz wie die Nitritspiegel im Gewebe. Bei EC 30 wurden die niedrigsten Werte gemessen. Über die nächsten 60 Minuten stiegen die Werte signifikant an und erreichten ähnliche Konzentrationen wie die Werte der unbehandelten Mäuse für NO-Häm.

Die gemessenen Nitratwerte im Gewebe zeigten keine signifikanten Unterschiede oder Tendenzen. Dies ist unter anderem auch auf die vergleichsweise hohen Konzentrationen von Nitrat (mM) zu Nitrit (nM) zurückzuführen. Nitrat diente nicht als Marker für den NO-Pool und scheint nicht durch Epicatechingabe und der Nitritkonzentration beeinflusst zu werden sondern unterliegt in erster Linie der Alimentation.

4.4 Potentielle Wirkmechanismen von Epicatechin auf den NO-Pool

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Nitrit als Speicher für NO dient^{36, 148-150}. Nitrit wird über die Nahrung aufgenommen, kann durch die Oxidation von endogenem NO entstehen oder durch die Reduktion von alimentärem Nitrat durch Bakterien¹⁵¹. Nitrit kann durch deoxygeniertes Hämoglobin oder Myoglobin, Xanthinoxidoreduktase, Enzyme mit Häm- oder Thiolgruppen, Kupfer oder durch Säuren (z.B. Ascorbinsäure⁵¹) zu NO reduziert werden³⁶. Lundberg et al.¹⁵² konnten an Messungen der Ausatemluft von Probanden zeigen, dass abhängig vom Säuregrad des Magens die Exhalation von NO sinkt oder steigt. Ein in vitro Versuch mittels CLD (Daten nicht aufgeführt) zeigte, dass Epicatechin im Sauren (pH-Wert 1) und frei von anderen Einflüssen reduzierend auf Nitrit wirkt. Die aufgegebenen Nitritlösungen konnten in einer Epicatechin/HCL-Lösung (pH-Wert 1) anders als in der reinen HCL-Lösung (pH-Wert 1) zu fast 100% wiedergefunden werden. Neuere Studien konnten zeigen, dass Nitrit in Gegenwart von Polyphenolen im sauren Magen zu NO reduziert wird, durch die Magenschleimhaut diffundiert und zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt^{123, 124}. Auf diesem Weg könnte Epicatechin zusätzlich zum sauren pH-Wert im Magen reduzierend auf Nitrit wirken und NO produzieren. Dieser Mechanismus könnte vor allem auch unter hypoxischen Bedingungen im sauren Gewebe von Nutzen sein.

Im Zusammenhang mit den oben erwähnten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass Epicatechin Nitrit im Gewebe reduziert. Andere Autoren suggerieren die Möglichkeit einer Inhibition der Oxidation von NO zu Nitrit durch Epicatechin⁹⁵. Eine weitere Ursache könnte auch eine vermehrte Produktion von NO durch Epicatechin sein, welches dann zu Nitrit oxidiert wird.

Von dem signifikanten Unterschied der Nitritwerte im Plasma der NaCl- Gruppe und der Epicatechin- Gruppe kann man die Vermutung anstellen, dass die steigenden Nitritspiegel der Epicatechin-Gruppe im Plasma möglicherweise im Zusammenhang stehen mit mobilisiertem Nitrit aus dem Gewebe oder zu NO reduziertem Nitrit aus dem Gewebe. Die erhöhten NO-Spiegel würden zu einer Erhöhung der Nitritwerte im Rahmen des Abbauprozesses führen. Durch diesen Mechanismus könnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit des NO-Pools durch Epicatechin erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Aktivierung der NOS. 70% der Plasma Nitritspiegel konnten auf die Produktion von NO über die NOS zurückgeführt werden³³. Fisher et al. konnten zeigen, dass durch die Gabe eines NOS-

Inhibitors (L-NAME) die periphere Vasodilatation durch flavanolreichen Kakao aufgehoben werden konnte, was darauf schließen lässt, dass NO für die Kakao-induzierte Vasodilatation verantwortlich ist ¹⁴⁴. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die eine vermehrte eNOS Expression und darauffolgende erhöhte NO-Spiegel im akuten und chronischen Rahmen nach Aufnahme flavanolreichen Kakaos bzw. Epicatechins, sowie in vitro als auch in vivo messen konnten ^{77, 153}. In vitro-Versuche mit Aortenringen konnten zeigen, dass Procyanidine die endotheliale NOS aktivieren können ¹³⁹. Eine Exposition mit Polyphenolen aus rotem Wein in vitro führte ebenfalls zu einer erhöhten eNOS-Expression bzw. -Transkription sowie zu erhöhten NO-Spiegeln ¹⁵⁴. Vermutlich haben Flavanole neben direkten Wirkungen auf die eNOS auch inhibitorische Effekte auf Mechanismen, die die NOS-Aktivität negativ beeinflussen könnten, so zum Beispiel die NADPH-Oxidase ⁷⁵ und möglicherweise auch auf ihre mRNA-Stabilität (ähnlich der Wirkung von Fenofibrat auf die eNOS ⁶). In der vorliegenden Studie kann aufgrund der kurzen Behandlung nicht von einer vermehrten Genexpression der NOS ausgegangen werden. Jedoch konnten andere Studien eine vermehrte Phosphorylierung der eNOS durch Epicatechin ¹⁵⁵ nachweisen, eine vergrößerte intrazelluläre Kalziumkonzentration und eine Aktivierung von Östrogenrezeptoren in Endothelzellen durch Polyphenole, was zu einer Aktivierung der eNOS innerhalb von Minuten führt, die über mehrere Stunden anhält ¹¹⁹. Dies lässt vermuten, dass sich die akuten Effekte von Flavanolenden von den Langzeiteffekten unterscheiden. Die genauen Mechanismen, über die Epicatechin wirkt, sind nicht bekannt. Eine Kombination mehrerer Effekte im akuten Rahmen ist durchaus denkbar. Durch diese Mechanismen könnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit des NO-Pools (schon innerhalb kurzer Zeit) im Plasma durch Epicatechin erreicht werden.

Shahani et al. konnten zeigen, dass physiologische Spiegel an RSNOs im Gehirn zur Regulation von Zellfunktionen dienen. Andererseits führten hohe Spiegel zu nitrosativem Stress und zum Zelltod ⁶⁵. Dies könnte durchaus auch auf andere Gewebe übertragbar sein. Dann könnte im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Studie die Stabilität der gemessenen RNO-Werte als positiv gewertet werden und gegen die Entstehung von nitrosativem Stress durch möglicherweise freigesetztes NO durch Epicatechin sprechen.

Eine andere mögliche Erklärung könnte in Verbindung mit Studien stehen, die unter hypoxischen Bedingungen erhöhte RNO und NO-Häm-Spiegel messen konnten ⁴⁰. Möglicherweise kann man deshalb von dem niedrigen RNO und RNNO-Spiegel der vorliegenden Studie darauf schließen, dass im Gewebe keine Hypoxie vorlag oder es als Zeichen ihrer besonderen Stabilität unter physiologischen Bedingungen werten, bzw. dass sie nicht unter dem Einfluss von Epicatechin stehen. Epicatechin könnte, wie andere im Gewebe vorkommende Antioxidantien wie zum Beispiel Ascorbat oder Glutathion, sogar zu einer Beseitigung (scavenging) von nitrosierenden Agentien führen ^{32, 40}.

Flavanole konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* dosisabhängige antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden, so zum Beispiel die Inhibition der LDL-Oxidation, Inflamationsprozessen und der Thrombozytenaggregation, sowie generell vermehrte antioxidative Kapazitäten als Radikalfänger. Es wird angenommen, dass Flavanole über ihre antioxidativen Eigenschaften und ihren Einfluss auf den NO-Stoffwechsel, die Bildung von Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid unterbinden ¹⁴¹. Die reine Gabe von Nitrit führte in mehreren Studien ebenfalls zu einer Vasodilatation ^{35, 156} und einem reduzierten Ischämie/Reperfusionsschaden ^{52, 71, 72, 157}, jedoch vermag es nicht im Gegensatz zu Flavanolen die Bildung von Superoxidanionen ^{75, 116} zu verhindern. Hohen Konzentrationen von Nitrit konnten toxische Wirkungen nachgewiesen werden, zum Beispiel über die Bildung von Wasserstoffperoxid oder eine Methämoglobinämie ³². In der Verhinderung der Bildung dieser Stoffwechselprodukte könnte aus therapeutischer Sicht ein Vorteil von Epicatechin liegen.

Aufgrund der teilweisen Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen schließen verschiedene Autoren darauf, dass die Epicatechinmetabolite für bestimmte biologische Effekte verantwortlich sind ^{75, 121, 122}. So diskutieren Schewe et al., dass Flavanolglukuronide als lösliche Transportformen von Flavanolen im Blut dienen und als Aglykone gespeichert werden können ¹¹⁶. Die genauen Mechanismen und Angriffsziele von Epicatechin, dessen Metaboliten und anderen Flavanolen sind noch nicht vollständig geklärt ⁷⁵.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Eine erniedrigte NO-Bioaktivität steht in Verbindung mit endothelialer Dysfunktion, eingeschränkter vaskulärer Homeostase und Arteriosklerose⁵. Flavanole erhöhen die NO-Bioverfügbarkeit und schützen zusätzlich als Antioxidantien vor Radikalen und verhindern dadurch beispielsweise eine Oxidation von NO mit radikalen Sauerstoffspezies zum schädlichen Peroxynitrit^{13, 75, 95}. Des Weiteren spielen sie unter anderem eine Rolle in der Modulation des Immunsystems, der Thrombozytenaggregation und -adhesion, vaskulären Gefäßreparaturmechanismen⁷⁵, der Leukozytenadhesion, der LDL-Oxidation und Hypercholesterinämie¹³.

Langzeitstudien mit einer wiederholten Gabe von flavanolreicher Schokolade über mehrere Wochen konnten eine signifikante Senkung des Blutdrucks von hypertensiven Patienten nachweisen ähnlich der Wirkung von gebräuchlichen antihypertensiven Medikamenten^{13, 158, 159} und vermehrt S-Nitrosogluthation messen welches als NO-Speicher im Plasma gilt¹⁶⁰. Es konnte eine verbesserte Insulinresistenz und FMD sowohl bei hypertensiven Patienten als auch bei Gesunden gemessen werden¹⁶¹. Die positiven Wirkungen von Epicatechin und anderen Flavanolen konnten auch in anderen Bereichen gezeigt werden. So wird grüner Tee (reich an Epicatechin) in Japan beispielsweise als Getränk zur Krebsprävention betrachtet¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Es gibt viele Studien über die Wirkungen von flavanolreichem Kakao, jedoch wenig über die Wirkung von Epicatechin im Menschen. Da ein Großteil der Wirkung von flavanolreichen Kakao auf das Flavanol Epicatechin zurückgeführt werden konnte⁷⁷, wurde in dieser Studie die spezifische Wirkung von Epicatechin auf den gewebsständigen und plasmatischen NO-Pool im akuten Rahmen am Mausmodell untersucht. Die Untersuchung von Veränderungen des NO-Pools im Gewebe und Plasma auf längere Sicht nach chronischer Epicatechingabe wären in diesem Zusammenhang von Interesse. Der genaue Mechanismus, über den Epicatechin und andere Flavanole die NO-Bioverfügbarkeit erhöhen, ist Gegenstand weiterführender Studien. Da sich die Wirkung von Epicatechin in Kurzzeit- und Langzeitstudien zu unterscheiden scheint¹³ wäre beispielsweise eine Untersuchung des dosisabhängigen Effekts von Epicatechin auf den NO-Pool im Gewebe und Plasma von eNOS knock-out Mäusen im akuten und Langzeitversuch möglich. Außerdem müssten prooxidative schädliche Effekte von Epicatechin ausgeschlossen werden¹³.

Eine Behandlung mit Epicatechin oder anderen Flavanolen als Antioxidantien und Modulatoren der NO- Bioverfügbarkeit und –Aktivität im Zusammenhang mit dem Schutz bzw Aufhalten von endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose ist von wachsendem Interesse.

Die ersten Nahrungsergänzungsmittel in Form von Kakaopolyphenolen sind schon auf dem Markt erschienen (z.B. Kakao-Polyphenole von Nutrilife, Frankreich). So scheint auch der Einsatz von Epicatechin als Nahrungsergänzungsmittel zur Prävention der Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Thrombose, Krebserkrankungen, Herzinfarkte oder Schlaganfälle eine Rolle spielen. Epicatechin als Medikament könnte möglicherweise die Wirkung anderer Medikamente wie ACE-Hemmer, Statine oder ASS unterstützen. Der Vorteil gegenüber der Einnahme von flavanolreichen Kakaotränken oder flavanolreicher Schokolade wäre ein niedrigerer Kaloriengehalt.

Die genauen Wirkmechanismen, über die Epicatechin seine positiven Effekte erreicht, mögliche Nebenwirkungen und der Metabolismus im Menschen ist noch Gegenstand von Untersuchungen. Es müssen, nach einer Validierung am Tiermodell und in vitro Studien, große, randomisierte, Plazebo-kontrollierte Langzeitstudien mit harten Endpunkten wie Morbidität und Mortalität am Menschen durchgeführt werden ¹³.

5. Zusammenfassung

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Polyphenolen, welche besonders in Rotwein, Tee, Früchten und Kakao vorkommen, mit einer Reduktion der Mortalität und Morbidität einhergehen. Eines ihrer wichtigsten Vertreter ist das Epicatechin, welches als das Hauptflavanol in flavanolreichem Kakao identifiziert werden konnte.

Die positiven Effekte der Epicatechine auf das kardiovaskuläre System werden unter anderem im Zusammenhang mit einer erhöhten Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit und NO-Bioaktivität gesehen und deren protektiven Wirkung auf die endotheliale Dysfunktion.

Sowohl plasmatisches als auch gewebsständiges Nitrit und Nitrat, Oxidationsprodukte von NO, als auch das im Plasma gebundene NO, Nitrosospezies (RNO), gelten als endokrine Speicher von NO.

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Wirkung von oral aufgenommenen reinen Epicatechin auf den NO-Pool in einem murinen Modell sowohl im Plasma als auch im Gewebe charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es wurde eine neue Methode zur Gewebepfusion im Mausmodell etabliert, welche eine Charakterisierung von Nitrit, Nitrat und Nitrosospezies *in vivo* erlaubt.
2. 30 Minuten nach oraler Gabe von Epicatechin konnten bereits die höchsten Plasmakonzentrationen von Epicatechin und dessen Metabolite bestimmt werden.
3. Die orale Epicatechingabe führte zu einer signifikanten Reduktion des Nitritspiegels im Gewebe und einem gleichzeitigen Anstieg im Plasma.
4. Die Nitrosospezies waren von der Epicatechin-Gabe unbeeinflusst.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Tarride JE, Lim M, DesMeules M, Luo W, Burke N, O'Reilly D, Bowen J, Goeree R. A review of the cost of cardiovascular disease. *Canadian Journal of Cardiology* 2009;25:195-202.
- (2) Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)- Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 2010;55:1398-1405.
- (3) Statistisches Bundesamt Deutschland. Pressemitteilung Nr. 371: Todesursachenstatistik 2010.
- (4) Bayard V, Chamorro F, Motta J, Hollenberg NK. Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *International Journal of Medical Sciences* 2007;4:53-8.
- (5) Ignarro LJ, Napoli C. Novel features of NO, endothelial NOS and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:281-287.
- (6) Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res* 2009;32:1103-1108.
- (7) Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94:295-314.
- (8) Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-279.
- (9) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-7.
- (10) Widlansky ME, Gokce N, Keaney jr JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-60.
- (11) Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
- (12) Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion: therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist* 1999;40:1300-7.
- (13) Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009;119:1433-1441.

- (14) Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S-85S.
- (15) Nutrient Data Laboratory, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. USDA Database for the flavonoid content of selected foods. 2003.
- (16) Hollenberg NK. Vascular action of cocoa flavanols in humans: the roots of the story. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:99-102.
- (17) Brossette T, Hundsdörfer C, Kröncke KD, Sies H, Stahl W. Direct evidence that (-)-epicatechin increases nitric oxide levels in human endothelial cells. *Eur J Nutr*. 2011, 50; 595-599.
- (18) Closs EI, Scheld J-S, Sharafi M, Förstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 2000;57:68-74.
- (19) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
- (20) Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991;266:23790-5.
- (21) Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2003;284:R1-R12.
- (22) Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax TW, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Özyüyan B, Schnürch H-G, Gödecke A, Weber A-A, Robenek MJ, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006;107:2943-51.
- (23) Ulker P, Meiselman HJ, Baskur OK. Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010;45:169-175.
- (24) Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 2005;396:444-55.
- (25) Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefer DJ, Gladwin MT. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* 2007;204:2089-102.
- (26) Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:273-89.

- (27) Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating NO pool: Assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 2004;36:413-22.
- (28) Joshi MS, Ferguson TB, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan N, Feelisch M, Lancaster JR. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10341-6.
- (29) Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon III RO. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11482-7.
- (30) Paxinou E, Weisse M, Chen Q, Souza JM, Hertkorn C, Selak M, Daikhin E, Yudkoff M, Sowa G, Sessa WC, Ischiropoulos H. Dynamic regulation of metabolism and respiration by endogenously produced nitric oxide protects against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11575-80.
- (31) Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:423-9.
- (32) van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg EZJ, Gladwin MT. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Medicinal Research Reviews* 2009;29:683-741.
- (33) Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 2003;35:790-6.
- (34) Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;40:295-302.
- (35) Rassaf T, Kleinbongard P, Kelm M. Circulating NO Pool in Humans. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:341-8.
- (36) Gladwin MT, Schechter A, Kim-Shapiro DB, Patel R, Hogg N, Shiva S, Cannon R, Kelm M, Wink D, Espey M, Oldfield E, Pluta R, Freeman B, Lancaster J, Feelisch M, Lundberg JO. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol* 2005;1:308-14.
- (37) Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, Olsson A, Stensdotter M, Petersson J, Holm L, Weitzberg E, Lundberg JO. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol* 2008;4:411-7.
- (38) Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide formation from inorganic nitrate and nitrite. *Nitric Oxide Second Edition* 2010;2:539-553.

- (39) Kelm M, Yoshida K. Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. In: Feelisch M, Stamler J, eds. *Methods in nitric oxide research*. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1996;1:47-58.
- (40) Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4308-13.
- (41) Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A-S, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res* 1993;73:1121-7.
- (42) Elrod JW, Calvert JW, Gundewar S, Bryan NS, Lefer DJ. Nitric oxide promotes distant organ protection: evidence for an endocrine role of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:11430-11435.
- (43) Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest* 2002;109:1241-8.
- (44) Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res* 2002;91:470-7.
- (45) Rassaf T, Kelm M. Nitrite and Nitrosospecies in Blood and Tissue: Approaching the Gap Between Bench and Bedside. In: Van Faassen E, Vanin AS, eds. *Radicals of Life- The various form of nitric oxide*. 2006;1: 269-90.
- (46) Gladwin MT. Hemoglobin as a nitrite reductase regulating red cell-dependent hypoxic vasodilatation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:363-6.
- (47) Demoncheaux EAG, Higenbottam TW, Foster PJ, Borland CDR, Smith APL, Marriott HM, Bee D, Akamine S, Davies MB. Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide. *Clin Sci* 2002;102:77-83.
- (48) Pattillo CB, Bir S, Rajaram V, Kevil CG. Inorganic nitrite and chronic tissue ischaemia: a novel therapeutic modality for peripheral vascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2011;89:533-41.
- (49) Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature* 1994;368:502.
- (50) Hendgen-Cotta U, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability

in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10256-61.

- (51) Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1233-42.
- (52) Kumar D, Branch BG, Pattillo CB, Hood J, Thoma S, Simpson S, Illum S, Arora N, Chidlow JH, Jr., Langston W, Teng X, Lefer DJ, Patel RP, Kevil CG. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7540-5.
- (53) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric-Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- (54) MacMicking J, Xie Q-W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-50.
- (55) Nathan CF, Hibbs jr JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991;3:65-70.
- (56) De Caterina R, Libby P, Peng H-B, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-8.
- (57) Ahmed S, Nanda NC, Miller AP, Nekkanti R, Yousif AM, Pacifico AD, Kirklin JK, McGiffin DC. Usefulness of transesophageal three-dimensional echocardiography in the identification of individual segment/scallop prolapse of the mitral valve. *Echocardiography* 2003;20:203-9.
- (58) Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2005;108:225-56.
- (59) Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 1996;27:32-5.
- (60) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;7:1057-8.
- (61) Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J* 1993;7:1293-9.
- (62) Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney jr JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;337:408-16.
- (63) Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.

- (64) Loscalzo J. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 1995;333:251-3.
- (65) Shahani N, Sawa A. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for S-nitrosylation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;14:1493-504.
- (66) Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, Hamada S, Rassaf T, Matern S, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:573-9.
- (67) Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:16-23.
- (68) Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121-35.
- (69) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4695-9.
- (70) Heusch G, Post H, Michel MC, Kelm M, Schulz R. Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia. *Circ Res* 2000;87:146-52.
- (71) Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13683-8.
- (72) Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet S-F, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:1232-40.
- (73) Obrosova IG, Mabley JG, Zsengellér Z, Charniauskaya T, Abatan OI, Groves JT, Szabo C. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB J* 2005;19:401-3.
- (74) Gödecke A, Molojavyi A, Heger J, Flogel U, Ding Z, Jacoby C, Schrader J. Myoglobin protects the heart from iNOS-mediated nitrosative stress. *J Biol Chem* 2003;278:21761-6.
- (75) Heiss C, Keen CL, Kelm M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *European Heart Journal* 2010;31:2583-2592.
- (76) Duffy SJ, Keaney jr JF, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:151-6.
- (77) Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates

beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:1024-9.

- (78) Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 2000;130:2086S-92S.
- (79) Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:236-41.
- (80) Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res* 2000;33:635-41.
- (81) Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76:798-804.
- (82) Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:1106-10.
- (83) Spencer JP, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced death in neurons and fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 2001;31:1139-1146.
- (84) Spencer JP, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxidants and redox signaling* 2001;3:1023-39.
- (85) Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys* 2004;1:148-61.
- (86) Lambert JD, Sang S, Yang CS. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm* 2007;4:819-25.
- (87) Vaidyanathan JB, Walle T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* 2002;30:897-903.
- (88) Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad Biol Med* 2002;33:220-35.
- (89) Spencer JP. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *The Journal of Nutrition* 2007;133:3255S-61S.

- (90) Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;33:1693-1702.
- (91) Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, Rice-Evans C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 2001;354:493-500.
- (92) Harada M, Kan Y, Naoki H, Fukui Y, Kageyama N, Nakai M, Miki W, Kiso Y. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1999;63:973-977.
- (93) Okushio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F, Hara Y. Identification of (-)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *Drug Metab Dispos* 1999;27:309-16.
- (94) Watanabe H, Shimizu T, Nishihira J, Abe R, Nakayama T, Taniguchi M, Sabe H, Ishibashi T, Shimizu H. Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:1676-83.
- (95) Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr* 2005;81:304S-12S.
- (96) Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
- (97) Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 1996;156:637-42.
- (98) Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2001;134:1106-14.
- (99) Erdman J.W., Carson L., Kwik-Urbe C., Evans E.M., Allen R.R. Effects of cocoa flavanols on risk factors for cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;1:284-7.
- (100) Heiss C, Schroeter H, Balzer J, Kleinbongard P, Matern S, Sies H, Kelm M. Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;2:128-35.
- (101) Rassaf T, Kelm M. Cocoa flavanols and the nitric oxide-pathway: targeting endothelial dysfunction by dietary intervention. *Drug Discov Today* 2008;5:e273-e278.

- (102) Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1276-83.
- (103) Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx MW, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H, Kelm M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in mediated diabetic patients: a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2141-9.
- (104) Yamazaki KG, Romero-Perez D, Barraza-Hidalgo M, Cruz M, Cortez-Gomez B, Rivas M, Ceballos G, Villarreal FJ. Short and Long Term Effects of (-)-Epicatechin on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H761-7.
- (105) Freedman JE, Parker III C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafra MD, Folts JD. Select Flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;103:2792-8.
- (106) Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr* 2000;130:2120S-6S.
- (107) Pearson DA, Holt RR, Rein D, Paglieroni T, Schmitz HH, Keen CL. Flavanols and platelet reactivity. *Clin Dev Immunol* 2005;12:1-9.
- (108) Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH. Chocolate consumption and platelet function. *JAMA* 2002;287:2212-3.
- (109) Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;73:36-40.
- (110) Steffen Y, Schewe T, Sies H. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;17:1277-83.
- (111) Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, Sies H. Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin. *Free Radic Biol Med* 2007;42:955-70.
- (112) Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001;382:1687-96.
- (113) Mao T, Van De WJ, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr* 2000;130:2093S-9S.

- (114) Selmi C, Mao TK, Keen CL, Schmitz HH, Eric Gershwin M. The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:163-71.
- (115) Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, Zhou S, Zheng W, Liu G, Wei YS, Cai H, Liu DP, Liang CC. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2008;80:191-9.
- (116) Schewe T, Steffen Y, Sies H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:102-6.
- (117) Heiss C, Jahn S, Taylor MRWM, Angeli FS, Wong ML, Amabile N, Prasad M, Rassaf T, Ottaviani JI, Mihardja S, Keen CL, Springer ML, Boyle A, Grossman W, Glantz SA, Schroeter H, Yeghiazarians Y. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:218-224.
- (118) Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:74-80.
- (119) Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Étienne-Selloum N, Chataigneau T. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflug Arch-Eur J Physiol* 2010;459:853-862.
- (120) Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, Sies H. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2008;476:211-5.
- (121) Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2008;469:209-19.
- (122) Steffen Y, Schewe T, Sies H. (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:828-33.
- (123) Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Laranjinha J. Diffusion of nitric oxide through the gastric wall upon reduction of nitrite by red wine: physiological impact. *Nitric Oxide* 2010;22:235-241.
- (124) Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Laranjinha J. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *Toxicology* 2009;265:41-48.
- (125) van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH. Plant-derived flavanol (-)-epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *J Neurosci* 2007;27:5869-78.

- (126) Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;34:840-9.
- (127) van Praag H, Lucer MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Yip E, Afanador M, Schroeter H, Hammerstone J, Gage FH. Plant-Derived Flavanol (-) epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *The Journal of Neuroscience* 2007;27:5869-78.
- (128) Silva EL, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radical Biology & Medicine* 1998;24:1209-1216.
- (129) Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. In vivo comparison of the bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J.Nutr.* 2001;131:2885-2891.
- (130) Dwivedi G, Janardhanan R, Hayat S, Senior R. Detection of residual infarct-related coronary artery stenosis and multivessel disease after thrombolysis: comparison between myocardial contrast echocardiography and single photon emission computed tomography. *J Am Soc Echocardiogr* 2006;19:546-51.
- (131) Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdeheuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J* 2002;16:1775-85.
- (132) Grau M, Hendgen-Cotta U, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: Nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *Journal of Chromatography B* 2007;851:106-23.
- (133) Hendgen-Cotta U, Grau M, Rassaf T, Kelm M, Kleinbongard P. Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices. *Methods Enzymol* 2008;441:295-315.
- (134) Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A chemiluminescence-based assay for s-nitrosoalbumin and other plasma s-nitrosothiols. *Free Radic Res* 2000;32:1-9.
- (135) Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing sample. *Methods Enzymol* 2002;359:158-68.
- (136) Rodriguez J, Maloney RE, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:336-41.

- (137) Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12814-9.
- (138) Flögel U, Merx MW, Gödecke A, Decking UKM, Schrader J. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:735-40.
- (139) Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000;130:2105S-8S.
- (140) Baron-Menguy C, Bocquet A, Guihot AL, Chappard D, Amiot MJ, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic. *FASEB J* 2007;21:3511-21.
- (141) Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2005;81:298S-303S.
- (142) Alvarez P, Alvarado C, Mathieu F, Jiménez L, De la Fuente M. Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *Eur J Nutr* 2006;45:428-438.
- (143) Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:317S-25S.
- (144) Fisher NDL, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens* 2003;21:2281-6.
- (145) Chu KO, Wand CC, Chu CY, Rogers MS, Choy KW, Pang CP. Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction. *Journal of Chromatography B* 2004;810:187-195.
- (146) Faria A, Pestana D, Teixeira C, Couraud PO, Romero I, Weksler B, de Freitas V, Mateus N, Calhau C. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food Funct.* 2011;2[39-44].
- (147) Daiber A, Bachschmid M, Kavakli C, Frein D, Wendt M, Ullrich V, Munzel T. A new pitfall in detecting biological end products of nitric oxide-nitration, nitros(yl)ation and nitrite/nitrate artefacts during freezing. *Nitric Oxide* 2003;9:44-52.
- (148) Lundberg JO, Weitzberg E. NO Generation From Nitrite and Its Role in Vascular Control. *Thromb Vasc Biol* 2005;25:915-22.
- (149) Weitzberg E, Lundberg JO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* 1997;2:1-7.

- (150) Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993;7:349-60.
- (151) Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:691-701.
- (152) Lundberg JO, Weitzber E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994;35:1543-6.
- (153) Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290:1030-1.
- (154) Leikert JF, Räthel TR, Wohlfahrt P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial Nitric Oxide Synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-7.
- (155) Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C880-7.
- (156) Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon III RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003;9:1498-505.
- (157) Arora S, Smakowski P, Frykberg RG, Simeone LR, Freeman R, LoGerfo FW, Veves A. Differences in foot and forearm skin microcirculation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care* 1998;21:1339-44.
- (158) Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA* 2003;290:1029-30.
- (159) Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 2005;46:398-405.
- (160) Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;298:49-60.
- (161) Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 2005;81:611-4.
- (162) Sukanuma M, Saha A, Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. *Cancer Sci*. 2011;102:317-23.

- (163) Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, Corti A. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Research* 2006;66:1234-1240.
- (164) Tsao AS, Liu D, Martin J, Tang XM, Lee JJ, El-Naggar AK, Wistuba I, Culotta KS, Mao L, Gillenwater A, Sagesaka YM, Hong WK, Papadimitrakopoulou V. Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res* 2009;2:919-921.

7. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Tienush Rassaf und Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Überlassung des Themas, für ihre Geduld, die Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Des Weiteren möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei Frau Nadine Kaesler, Herrn Dr. M. Totzeck, Frau Dr. rer-nat. U. Hendgen-Cotta, Herrn Dr. med. C. Rammos, sowie allen Mitarbeitern des Kardiologischen Labors bedanken.

Ich möchte meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden danken für Ihre Hilfe und Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich immer moralisch und finanziell unterstützt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

11.09.2012, Deborah V. J. Haack