

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

- Direktor: Prof. Dr. med. B. E. Strauer –

**Einfluss von flavanolreichem Kakao auf
die Endotheldysfunktion bei Rauchern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Perré

2005

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

gez.: Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke

Inhaltsverzeichnis

LISTE DER ABKÜRZUNGEN UND CHEMISCHEN FORMELN	5
I. EINLEITUNG	7
1. FUNKTIONEN UND METABOLISMUS DES STICKSTOFFMONOXIDS	7
2. ENDOTHELDYSFUNKTION ALS VORSTUFE DER ARTERIOSKLEROSE	9
3. RAUCHEN FÜHRT ZU ENDOTHELDYSFUNKTION	11
4. KARDIOVASKULÄRE EFFEKTE VON NAHRUNGSANTIOXIDANTIEN	11
II. HYPOTHESE UND SPEZIFISCHE ZIELE	15
III. MATERIAL UND METHODEN.....	17
1. STUDIENKOLLEKTIVE.....	18
2. UNTERSUCHUNGSPROTOKOLLE	19
<i>Zeitverlauf.....</i>	<i>20</i>
<i>Dosisfindung.....</i>	<i>21</i>
<i>Randomisierte Doppelblind-Studie im Crossover-Design.....</i>	<i>22</i>
<i>Mechanistische Studien: NO-Abhängigkeit und Ascorbinsäure-Synergismus.....</i>	<i>24</i>
3. MESSUNG DER FLUSSVERMITTELTEN DILATATION DER ARTERIA BRACHIALIS.....	25
<i>Untersuchungsprotokoll.....</i>	<i>27</i>
<i>Analyse des Durchmessers der Arteria brachialis.....</i>	<i>28</i>
<i>Dopplersonographische Messung des Blutvolumenflusses.....</i>	<i>29</i>
4. QUANTIFIZIERUNG VON NO-METABOLITEN IM PLASMA	30
<i>Blutentnahmeprotokoll.....</i>	<i>30</i>
<i>Chemilumineszenzdetektion von RXNO und Nitrit.....</i>	<i>31</i>
<i>Fluss-Injektions-Analyse zur Bestimmung von Nitrat.....</i>	<i>37</i>
5. QUANTIFIZIERUNG VON FLAVANOLEN UND AUSGEWÄHLTEN FLAVANOLMETABOLITEN IM PLASMA	39
6. STATISTISCHE VERFAHREN	40
IV. ERGEBNISSE.....	41
1. CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATIONEN.....	41
2. ZEITABHÄNGIGE STEIGERUNG DER FLUSSVERMITTELTEN VASODILATATION NACH GABE VON	

FLAVANOLREICHEM KAKAO.....	42
3. DOSISABHÄNGIGE ABSORPTION UND WIRKUNG VON FLAVANOLEN IN KAKAO.....	43
4. EINFLUSS VON FLAVANOLREICHEM KAKAO AUF DIE ENDOTHELDYSFUNKTION VON RAUCHERN	46
5. WIRKUNGSMECHANISMEN: NO UND ASKORBINSÄURE	48
V. DISKUSSION	51
1. METHODENKRITIK.....	51
<i>Bestimmung der Endothelfunktion als FMD.....</i>	<i>51</i>
<i>Chemilumineszenzdetektion von RXNO und Nitrit im Plasma.....</i>	<i>54</i>
<i>Quantifizierung von Nitrat im Plasma mittels Fluss-Injektions-Analyse.....</i>	<i>55</i>
2. ABHÄNGIGKEIT DES FLAVANOLEFFEKTES VON DER VERABREICHTEN KAKAOMENGE UND DEM FLAVANOLMETABOLISMUS	56
3. EINFLUSS VON FLAVANOLREICHEM KAKAO AUF DIE ENDOTHELDYSFUNKTION BEI RAUCHERN	57
4. POTENTIELLE WIRKUNGSMECHANISMEN VON FLAVANOLEN.....	59
5. KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK	61
VI. ZUSAMMENFASSUNG	62
VII. LITERATURVERZEICHNIS	64
VIII. DANKSAGUNG	75
IX. LEBENS LAUF	76

Liste der Abkürzungen und chemischen Formeln

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
AHA	American Heart Association
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor (=NO)
FBF	Unterarmblutfluss (Forearm Blood Flow)
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flussvermittelte Dilatation der Arteria brachialis (flow mediated dilation)
GTN	Glyzeroltrinitrat
Hb O ₂	oxygeniertes Hämoglobin
hFCD	Kakaogetränk mit hohem Flavanolgehalt (179-185 mg, „high flavanol cocoa drink“)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikal *
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (interzelluläres Adhäsions- Molekül-1)
JNC	Joint National Committee
IFCD	Kakaogetränk mit niedrigem Flavanolgehalt (<11 mg, „low flavanol cocoa drink“)
MOD	Magneto-optische Diskette
MW	Mittelwert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NO·	Stickstoffmonoxid *
NO ⁺	Nitrosoniumion
NO ⁻	Nitrosylanion
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
n. s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion *
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PW	Pulsed Wave-Doppler
RF	Risikofaktor

RXNO	Summe der gebundenen NO-Spezies im Plasma
RSH	Thiol
RSNO	S-Nitrosothiol
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SE	Standardfehler (Standard Error)
SNO-Alb	S-Nitrosoalbumin
TIF	Tagged Image Format
Tab.	Tabelle
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Gefäßzelladhäsionsmolekül-1)
VVP	Venenverschlussplethysmographie
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

(* Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

I. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Europa, Nordamerika und Asien dar.^{1,2} Im Jahr 2003 verstarben allein in Deutschland 396.622 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, 69.362 davon an einem Herzinfarkt und 37.579 an einem Schlaganfall (statistisches Bundesamt). Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen entstehen auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße. Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen im Sinne einer Endotheldysfunktion scheinen eine zentrale Rolle sowohl bei der Entstehung als auch dem Fortschreiten einer Arteriosklerose zuzukommen.^{3,4} Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine Endotheldysfunktion therapeutisch rückführbar sein kann, so dass die Progression der Arteriosklerose durch eine verbesserte Endothelfunktion verlangsamt werden kann.⁵ So konnte beispielsweise ein Teil der schon seit längerem bekannten prognostisch günstigen Eigenschaften von ACE- und CSE-Hemmern auf eine gesteigerte Bioverfügbarkeit von NO zurückgeführt werden.⁶⁻⁸ An der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, um die Endotheldysfunktion spezifisch zu beeinflussen, besteht großes klinisches und sozioökonomisches Interesse.

1. *Funktionen und Metabolismus des Stickstoffmonoxids*

Im Gefäßendothel gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) diffundiert sowohl in die Gefäßwand als auch in das Gefäßlumen und scheint an der Regulation aller wichtiger Funktionen des Gefäßendothels beteiligt zu sein.⁴ Luminal hemmt NO die Adhäsion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten an die Gefäßwand.⁴ Zusätzlich verfügt NO über eine antiinflammatorische Wirkung⁹ und senkt die endotheliale Permeabilität^{10,11}. In der Gefäßwand relaxiert NO die glatten Muskelzellen über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase.¹² Weiterhin scheint es sowohl die Proliferation und Migration als auch die Produktion von Matrixproteinen der glatten Muskelzellen zu hemmen¹³. Somit kommt dem endothelial gebildeten NO eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung sowohl der

Gefäßfunktion als auch der Gefäßstruktur zu.^{4;14}

Gebildet wird NO im Gefäßendothel aus der Aminosäure L-Arginin mittels der endothelialen Isoform der NO-Synthase (eNOS).^{15;16} Als Kofaktoren sind unter anderem NADPH und O₂ an dieser Reaktion beteiligt und neben NO entstehen L-Citrullin und NADP⁺. Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron. In biologischen Medien ist es sehr labil, so dass es im Vollblut nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, bevor es zu Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Aufgrund dieser Tatsache wurde bis vor kurzem angenommen, dass die biologische Wirksamkeit von NO räumlich und zeitlich sehr begrenzt ist.¹⁷

Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass ein zirkulierender NO-Speicher (RXNO) existiert, so dass NO in bioaktiver Form an verschiedene Plasmakomponenten gebunden transportiert und systemisch wirksam werden kann.¹⁸⁻²⁰ Es konnte gezeigt werden, dass inhaliertes und intravenös appliziertes exogenes NO durch das Gefäßsystem transportiert wird und seine gefäßdilatorische Wirkung auch in distalen Leitungs- und Widerstandsgefäßen entfalten kann.^{19;21}

Die Frage, welche Komponenten genau zur Bildung des plasmatischen, zirkulierenden NO-Speichers (RXNO) beitragen, ist noch nicht gänzlich geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussionen.^{22;23} Zunächst wurde angenommen, dass sich der zirkulierende NO-Pool hauptsächlich aus S-Nitrosothiolen (RSNO), S-Nitrosoalbumin (>80%) und zu einem geringeren Teil aus S-Nitrosohämoglobin, S-Nitrosoglutathion und S-Nitrosocystein zusammensetzt.²⁴ Die intravenöse Applikation von isolierten RSNOs bedingt eine Vasodilatation¹⁹, eine Inhibition der Plättchen-Aktivierung²⁵, eine Unterbrechung der Embolisation von Karotisstenosen²⁶ sowie einen Schutz vor Ischämie- und Reperfusionsschäden²⁷. In aktuelleren Studien konnten auch N-Nitrosoproteine und Eisen-Nitrosyl-Komplexe^{23;28} sowie Nitrit²⁹ als zirkulierende NO-Speicher identifiziert werden.

2. Endotheldysfunktion als Vorstufe der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung aller Arterien mit schweren klinischen Folgen wie Herzinfarkt und Apoplex. Eine Störung der endothelialen Funktion und damit der Integrität der Gefäßwand gilt als frühes Schlüsselereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose.³

Formalpathologisch handelt es sich bei der Arteriosklerose um eine entzündliche Erkrankung mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltraten in der Gefäßintima.³ Bereits im Kindesalter sind vereinzelt Makrophagenansammlungen mit intrazellulären Fettablagerungen in der Intima nachweisbar³⁰. Im weiteren Verlauf entstehen zusätzlich extrazelluläre Fettablagerungen sowie regressive Veränderungen mit einem bindegewebigen Umbau und Verkalkungen, welche als fortgeschrittene Läsionen oder Plaques bezeichnet werden.³¹ Diese können entweder zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Einengung führen oder durch ein appositionelles Thrombuswachstum auf dem Boden eines rupturierten Plaques akute ischämische Ereignisse wie Herzinfarkt oder Schlaganfall hervorrufen.^{32:33}

Lange war die Ätiologie der Arteriosklerose unbekannt. Erst mit den Ergebnissen der Framinghamstudie wurde 1961 das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert.³⁴ Aufgrund empirisch erhobener Daten schien der arteriellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie, dem Diabetes mellitus und dem Rauchen eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, eines Herzinfarkts oder eines Schlaganfalls zuzukommen.³⁵ Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über die Induktion einer Endotheldysfunktion die Entwicklung und Progression einer Arteriosklerose begünstigen.^{3:32:33} Der Begriff der Endotheldysfunktion wird zur Beschreibung einer Vielzahl von pathologischen Situationen verwendet, in denen Störungen essentieller Endothelfunktionen auftreten. Klinisches Korrelat einer Endotheldysfunktion ist eine Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation, welche in großen Teilen durch eine reduzierte biologische Aktivität von NO bedingt ist.³⁶ Eine verbreitete und etablierte

Methode, die endothelabhängige Vasodilatation nicht-invasiv mittels Ultraschall zu erfassen, ist die Bestimmung der flussabhängigen Dilatation (FMD).

Einer reduzierten biologischen Aktivität von NO können verschiedene, sich überschneidende Pathomechanismen zugrunde liegen. Sie kann durch eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), einen Substrat- oder Kofaktoren-Mangel der eNOS, eine eingeschränkte Aktivierung der eNOS oder einen beschleunigten NO-Abbau verursacht sein.³⁶ Unter anderem führen die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und das chronische Zigarettenrauchen zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie beispielsweise Superoxidanionen (O_2^-)³⁷, welche NO unter Peroxynitritbildung deaktivieren können. Peroxynitrit ist endotheltoxisch^{38;39;40} und kann die NO-Synthase u. a. durch Inaktivierung von Tetrahydrobiopterin (BH_4), einem wichtigen Kofaktor der NOS, inhibieren. Dies führt zu einer Einschränkung der NO-Bildung bzw. sogar zu einer gesteigerten Bildung von Superoxid.⁴¹ Weiterhin scheint der Bildung von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem endogenen Inhibitor der NO-Synthase eine Bedeutung in der Endotheldysfunktion zuzukommen.^{42;43} Als weiterer Faktor wird ein Mangel an L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase diskutiert.⁴⁴ Durch reaktive Sauerstoffspezies kommt es zu einer gesteigerten Bildung von oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL) in der Gefäßwand. Wird dieses von Makrophagen aufgenommen, kommt es zur Bildung von Schaumzellen und Ausschüttung von chemotaktischen Entzündungsmediatoren. Die verminderte Menge an bioverfügbarem NO begünstigt die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und die Adhäsion von Thrombozyten. Die proatherogene Wirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren scheint somit zumindest in Teilen durch eine chronische eingeschränkte biologische Aktivität von NO durch vermehrten oxidativen Stress verursacht zu sein.⁴⁵

3. Rauchen führt zu Endotheldysfunktion

Zigarettenrauchen gilt als der wichtigste vermeidbare kardiovaskuläre Risikofaktor, so rauchten in Deutschland im Jahr 2003 33,2% der männlichen und 22,1% der weiblichen Bevölkerung (statistisches Bundesamt). Epidemiologische Studien belegen, dass chronisches Zigarettenrauchen mit einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des Myokardinfarkts assoziiert ist.⁴⁶⁻⁵¹ Passivrauchen geht mit einer annähernd 30%igen Steigerung des KHK-Risikos einher, im Vergleich dazu ist das Risiko bei aktiven Rauchern um etwa 80% erhöht.^{52;53} Zigarettenrauchen führt zu einer akuten Einschränkung der endothelabhängigen Dilatation und der NO-Synthese.^{54;55} Wie oben beschrieben, ist vermehrter oxidativer Stress und das damit assoziierte NO-Defizit ein wichtiger Faktor für die Initiation und die Progression der Arteriosklerose.⁵⁶⁻⁵⁸ Beim Zigarettenrauchen kommt es nicht nur direkt, durch die im inhalieren Rauch enthaltenen freien Radikale, sondern auch indirekt, durch endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies, wie beispielsweise die entkoppelte eNOS, die Xanthinoxidase oder die mitochondriale Atmungskette, zu einer Vermehrung freier Radikale im Körper.^{59;60;61} Dies führt zur Entwicklung eines maladaptiven Phänotyps, welcher durch ein proatherogenes und prothrombotisches Milieu charakterisiert ist.^{3;62} Tatsächlich führen Rauchen und Passivrauchen zu einer Steigerung inflammatorischer Prozesse^{63;64}, zu einer vermehrten Bildung oxidierten LDL-Cholesterins⁶⁵ und zu einer gesteigerten Plättchenaggregation^{66;67}.

4. Kardiovaskuläre Effekte von Nahrungsantioxidantien

Epidemiologische Studien zeigen eine inverse Korrelation zwischen obst- und gemüsericher Ernährung und der Inzidenz schwerwiegender kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit.^{68 69;70} In diesem Zusammenhang sind Flavonoide, eine Gruppe von polyphenolen Antioxidantien mit einem natürlichen Vorkommen (Tab. 1) in Gemüsen, Früchten und in Getränken wie Tee und Rotwein, von besonderem

Interesse.⁷¹

Tabelle 1. Gesamtflavanolgehalt verschiedener handelsüblicher Lebensmittel ^{72;73}

	Flavanolgehalt	
dunkle Schokolade	4,45	mg/g
Rotwein	0,21	g/l
Preiselbeeren-Saft	0,14	g/l
Äpfel	0,49-1,01	mg/g
Schwarztee	1,06	g/l

Flavonoide stellen die größte Gruppe an Nahrungspolyphenolen dar. Die wichtigsten Flavonoid-Untergruppen sind die Flavone, die Flavonole, die Isoflavone, die Anthocyanine, die Flavanone sowie die Flavanole. Letztere wiederum umfassen die Monomere Catechin und Epicatechin sowie Procyanidine als polymere Formen (Abb. 1). Abhängig von der Behandlung und Aufarbeitung können auch auf Kakao basierende Lebensmittel eine reiche Flavanol-Quelle darstellen (Tab. 1). Im menschlichen Plasma konnten nach Aufnahme von flavanolreichem Kakao sowohl die Monomere Epicatechin und Catechin als auch dimere Procyanidine identifiziert werden.⁷⁴⁻⁷⁶

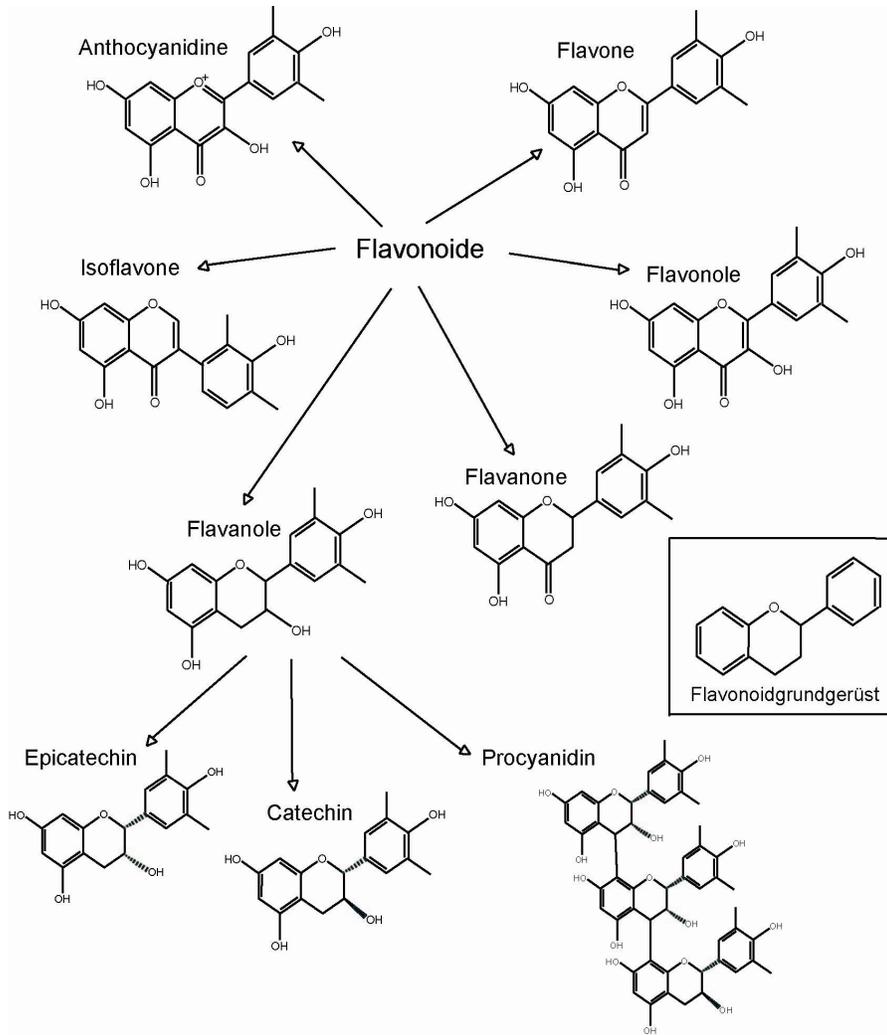


Abbildung 1. Struktur der wichtigsten Flavonoid-Untergruppen.

Das besondere Interesse an Flavonoiden rührt daher, dass sie einen Hauptteil der Nahrungsantioxidantien darstellen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* potentielle vasoprotektive und antiatherogene Effekte beschrieben sind. Diese Effekte werden in großen Teilen einer antioxidativen Wirkung auf den NO Stoffwechselweg zugeschrieben. *In vitro* Effekte umfassen eine Inhibition von inflammatorischen Prozessen^{77;78}, eine Thrombozytenhemmung^{79;80}, einen Schutz gegen oxidativen Stress^{81;82} und eine gesteigerte NO-Produktion⁸³. Weiterhin wurde an isolierten Aortenringen eine Steigerung der endothelabhängigen Dilatation, begleitet von einer erhöhten Aktivität der NO-Synthase

gezeigt.⁸⁴ *In vivo* konnte bei Apo-E-defizienten Mäusen durch Fütterung von Tee-Catechinen eine Arteriosklerose verhindert werden.⁸⁵ Desweiteren bewirkte eine flavonoidreiche Diät bei Ratten eine Steigerung der NO-Synthase-Aktivität.⁸⁶ Ein Anstieg des Flavonoidgehaltes im menschlichen Plasma nach Wein- oder Teegenuss war mit einer Verbesserung der endothelialen Funktion, im Sinne einer Steigerung der flussvermittelten Dilatation assoziiert.^{87;88}

II. Hypothese und spezifische Ziele

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Flavanolen in Kakao auf die bei Rauchern bestehende Endotheldysfunktion untersucht. Dies geschah unter der Hypothese, dass die orale Aufnahme eines flavanolreichen Kakaotranks (hFCD, high flavanol cocoa drink) die bei Rauchern bestehende Endotheldysfunktion spezifisch therapeutisch beeinflussen kann. Als Maß für die Endotheldysfunktion wurde in allen Versuchsserien die flussabhängige Dilatation der Arteria brachialis (FMD) bestimmt. Des Weiteren wurden NO-Metabolite sowie ausgewählte Flavanole und deren Abbauprodukte im Plasma quantifiziert.

Zur Untermauerung der oben genannten Hypothese wurden vier Versuchsserien mit jeweils spezifischen Zielen durchgeführt.

Ziele der ersten Versuchsserie (Zeitverlauf) waren (a) die Bestimmung der Effektgröße des hFCDs auf die FMD bei Rauchern zur Fallzahlabstimmung und (b) die Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Wirkung nach Gabe des hFCDs zur Versuchsplanung einer größeren randomisierten Doppelblindstudie.

Ziele der zweiten Versuchsserie (Dosisfindung) waren (a) die Bestimmung der optimalen Dosierung des hFCDs für die folgende, größere randomisierte Doppelblindstudie, (b) der Nachweis einer dosisabhängigen Resorption von Flavanolen und (c) die Identifikation bestimmter Flavanolabbauprodukte im Plasma.

Ziel der dritten Versuchsserie (randomisierte Doppelblind-Studie im Crossover-Design) war es, (a) die positive Wirkung des hFCDs auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern an einem größeren Kollektiv zu verifizieren und (b) zu beweisen, dass die Wirksamkeit des hFCDs tatsächlich auf den hohen Flavanolgehalt zurückzuführen ist.

Ziel der vierten Versuchsserie (Mechanistische Studien: NO-Abhängigkeit und Ascorbinsäure-Synergismus) war es, einen Einblick in den Wirkungsmechanismus des

hFCDs zu erhalten. Nach Gabe des hFCDs wurde additiv intravenös L-NMMA, ein kompetitiver Antagonist der NO-Synthase verabreicht, um so eine potentielle NO-Abhängigkeit des beobachteten Effektes nachzuweisen. In einer weiteren Versuchsserie wurde nach oraler Aufnahme des hFCDs zusätzlich Ascorbinsäure infundiert, um einen potentiellen additiven Effekt zu überprüfen.

III. Material und Methoden

In der vorliegenden Studie wurde in vier Untersuchungsserien der akute Einfluss antioxidantienreicher Nahrung am Beispiel eines standardisierten Kakaotranks mit hohem Flavanolgehalt (hFCD=“high flavanol cocoa drink“) auf die Endothelfunktion von Rauchern untersucht.

In der ersten Versuchsserie (Zeitverlauf) wurde nach Gabe des hFCDs oder Wassers die flussabhängige Dilatation der Arteria brachialis (FMD=*engl. flow-mediated dilation*) über 6 Stunden bestimmt.

In der zweiten Versuchsserie (Dosisfindung) wurde der Einfluss verschiedener Dosen des hFCDs auf die FMD untersucht. Des Weiteren erfolgte die Quantifizierung bestimmter NO-Metabolite sowie der Flavanole und ausgewählter Abbauprodukte im Plasma.

In der dritten Versuchsserie (randomisierte Doppelblind-Studie im Crossover-Design) wurde Probanden im Crossover-Design an zwei unterschiedlichen Tagen hFCD und ein identisches Kakaotränk mit niedrigem Flavanolgehalt (lFCD=“low flavanol cocoa drink“) als Negativkontrolle doppelblind verabreicht. Als klinische Zielparameter wurden die FMD und plasmatische NO-Metabolite bestimmt.

In der vierten Versuchsserie (Mechanistische Studien: NO-Abhängigkeit und Ascorbinsäure-Synergismus) wurde zunächst überprüft, ob eine durch Flavanole verursachte Verbesserung der Endothelfunktion über einen NO-Synthase-abhängigen Mechanismus vermittelt wird und somit durch einen kompetitiven Substratantagonisten (L-NMMA *iv*), aufgehoben werden kann. In einer weiteren Versuchsserie wurde nach Gabe des flavanolreichen Kakaotranks zusätzlich Ascorbinsäure verabreicht, um einen potentiellen additiven Effekt zu überprüfen.

Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Votum Prof. Dr. med. M. Kelm).

1. Studienkollektive

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ausschließlich Personen mit einem bestehenden Nikotinabusus rekrutiert. Als Raucher klassifiziert wurden diejenigen, die jemals täglich mindestens 20 Zigaretten über ≥ 1 Jahr (ein Packungsjahr) geraucht haben.⁸⁹

Die Klassifizierung des Risikoprofils erfolgte im Rahmen einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung bei der Rekrutierung. Am ersten Untersuchungstag, vor Einnahme des jeweiligen Getränks, wurde bei jedem Patienten nüchtern Blut zur Bestimmung eines Routinelabors entnommen. Im Institut für Klinische Chemie der Heinrich-Heine Universität wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: kleines Blutbild, Bestimmung der Serumspiegel von Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamt- sowie HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeriden, Glukose und CRP. HDL- und LDL-Cholesterin wurden erst ab einem Gesamtcholesterin von >180 mg/dl bestimmt. Ausschlusskriterien waren eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, eine Hypercholesterinämie sowie das Vorliegen einer hochgradigen Herzinsuffizienz (NYHA III-IV). Patienten mit chronisch konsumierenden Erkrankungen, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz, hochgradigen Herzrhythmusstörungen und akuten Entzündungen ($\text{CRP} \geq 0,5$ mg/dl) wurden ebenfalls ausgeschlossen. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien⁹⁰ bzw. der WHO-Richtlinien⁹¹ diagnostiziert, wenn bei drei Messungen an drei separaten Tagen arterielle Blutdrücke von $>140/>90$ mmHg vorlagen oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der WHO⁹² und ADA⁹³ diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen der Plasmaglukosespiegel nüchtern bei >126 mg/dl lag, ein oraler Glukosetoleranztest mit 2 Stunden-Werten von >200 mg/dl vorlag oder falls zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten von >200 mg/dl bestand. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. In Anlehnung an die Richtlinien der AHA und des NHLBI wurde eine Hypercholesterinämie definiert als

Vorliegen eines Gesamtcholesterins >240 mg/dl, eines LDL-Cholesterins >160 mg/dl, eines HDL-Cholesterins <35 mg/dl⁹⁴ oder einer bestehenden cholesterinsenkenden Therapie. Hämodynamisch wirksame Medikamente wurden 24 h vor der Untersuchung abgesetzt. Die Studienteilnehmer wurden aus dem Patientengut der Kardiologie der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie aus Klinikpersonal und deren Bekannten rekrutiert.

2. Untersuchungsprotokolle

Die Probanden aller vier Versuchsserien wurden im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Daran schloss sich eine Anamneseerhebung und körperliche Untersuchung an. Am Morgen des ersten Untersuchungstages erfolgte zunächst eine Blutabnahme zur Bestimmung des Routinelabors.

Die beiden verwendeten Kakaogetränke (CocoaVia, Mars Inc., USA) unterschieden sich deutlich bezüglich ihres Flavanolgehaltes (hFCD: 179-185 mg/100 ml, bzw. IFCD: <11 mg/100 ml), die sonstigen Inhaltsstoffe und der Energiegehalt waren aneinander angepasst (Tab. 2). In allen Versuchsserien außer der zweiten Versuchsserie (Dosisfindung) wurden jeweils 100 ml des jeweiligen Kakaogetränks verabreicht. Die so durch das hFCD aufgenommene Flavanolmenge (179-185 mg) entspricht ungefähr der in einem Liter Rotwein oder einer halben Tafel Bitterschokolade.⁷² Der hohe Flavanolgehalt des hFCDs konnte durch eine spezielle Art der Kakaoaufbereitung und bestimmte Produktionstechniken erreicht werden. Das IFCD ist bezüglich seiner Zusammensetzung und seines Flavanolgehaltes handelsüblichen Kakaogetränken vergleichbar.

Tabelle 2. Zusammensetzung des hFCDs sowie des IFCDs.

pro 100 ml:	flavanolreiches Kakaogetränk (hFCD)	flavanolarmes Kakaogetränk (IFCD)
Flavanolgehalt [mg]	176-185	<11
Monomere [mg]	70-74	<1
Epicatechin [mg]	20-22	<1
Procyanidine [mg]	106-111	<10
Koffein [mg]	9	4
Theobromin [mg]	129	126
Energie [kJ] ([kcal])	307 (73)	277 (66)
Protein [g]	3	3.1
Kohlenhydrate [g]	13.2	12.1
davon Zucker [g]	12.4	11.8
Fett [g]	0.89	0.57

Zeitverlauf

Im Rahmen einer ersten Pilotstudie wurde an zwei unterschiedlichen Tagen der Zeitverlauf der FMD nach oraler Aufnahme des hFCDs (n=5) oder 100 ml Leitungswasser (n=2) als Negativkontrolle bestimmt. Die Messzeitpunkte waren vor sowie 1*, 2, 3*, 4 und 6 Stunden nach Aufnahme des jeweiligen Getränks (* nur nach Gabe des hFCDs). Weiterhin wurden die Herzfrequenz mittels EKG und der arterielle Blutdruck auskultatorisch nach Riva-Rocci bestimmt. (Abb. 2)

Ziele dieser Untersuchungsserie waren (a) die Bestimmung der Effektgröße zur Fallzahlabstschätzung und (b) die Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Wirkung zur Versuchsplanung einer größeren randomisierten Doppelblindstudie.

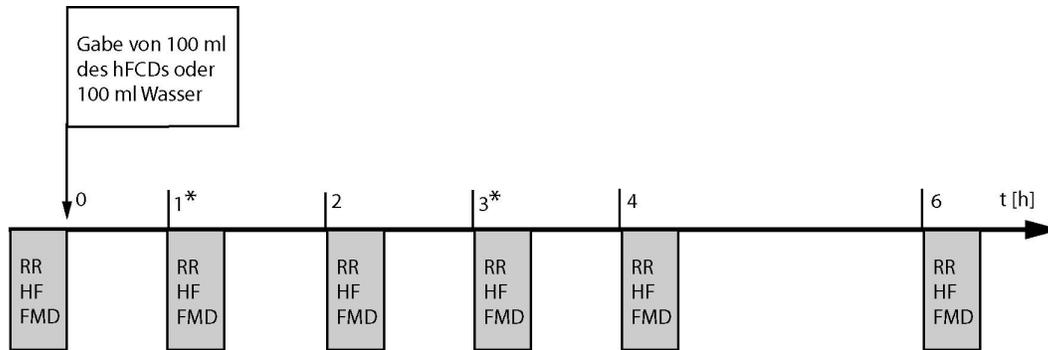


Abbildung 2. Protokoll der ersten Versuchsserie (Zeitverlauf). (* Messung erfolgte zu diesem Zeitpunkt nur nach Gabe des hFCDs; RR=Blutdruck; HF=Herzfrequenz; FMD=flussvermittelte Dilatation)

Dosisfindung

In einer weiteren Untersuchungsserie (n=4) wurden vier unterschiedliche Mengen des hFCDs und Wasser als Negativkontrolle an verschiedenen Tagen verabreicht. Dies geschah (a) zur Bestimmung einer optimalen Dosierung für die folgende, größere randomisierte Doppelblindstudie, (b) zum Nachweis einer dosisabhängigen Resorption von Flavanolen und (c) zur Identifikation bestimmter Flavanolabbauprodukte im Plasma. An den Untersuchungstagen wurden vor sowie 2 Stunden nach oraler Aufnahme von 50, 100, 200, sowie 300 ml des hFCDs oder 100 ml Wasser die FMD, die Herzfrequenz und der Blutdruck bestimmt. Weiterhin wurden jeweils Blutproben entnommen und aus dem Plasma Nitrit, Nitrat, gebundenes NO (RXNO) und ausgewählte Flavanolmetabolite bestimmt. Die verabreichten Mengen des Kakaotranks enthielten 88-92 mg (50 ml), 176-185 mg (100 ml), 352-370 mg (200 ml) sowie 528-555 mg (300 ml) Gesamtflavanole. (Abb. 3)



Abbildung 3. Protokoll der zweiten Versuchsserie (Dosisfindung). (RR=Blutdruck; HF=Herzfrequenz; FMD=flussvermittelte Dilatation; RXNO=Konzentration des gebundenen NOs im Plasma; NO₂⁻=Nitritkonzentration im Plasma; NO₃⁻=Nitratkonzentration im Plasma)

Randomisierte Doppelblind-Studie im Crossover-Design

Mit den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungsserien wurde eine randomisierte, kontrollierte Studie im Crossover-Design mit doppelter Verblindung durchgeführt. Die Randomisierungsliste wurde von Dr. R. Willers (Universitätsrechenzentrum der HHU Düsseldorf) erstellt. In die Studie wurden 11 gesunde Raucher nach anamnestischem Ausschluss von Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Bluthochdruck eingeschlossen. Eine Studienteilnehmerin musste nachträglich ausgeschlossen werden, da sich im klinischen Labor hohe Cholesterinspiegel fanden. Die Probanden dieser Versuchsserie wurden an zwei unterschiedlichen Tagen (Crossover-Design) untersucht. Am ersten Versuchstag erhielten sie doppelblind entweder 100 ml des hFCDs oder 100 ml des IFCDs, am zweiten Versuchstag wurde den Probanden das jeweils komplementäre Getränk verabreicht. Die beiden Getränke waren optisch und geschmacklich nicht voneinander zu unterscheiden, der Energie- sowie Koffein und Theobromingehalt in beiden Kakaogetränken waren angepasst (Tab. 2). Vor sowie zwei Stunden nach Einnahme der jeweiligen Kakaogetränks wurden die FMD, der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt. Parallel wurden Blutproben entnommen

aus denen Nitrit, Nitrat und RXNO im Plasma bestimmt wurden. (Abb. 4)

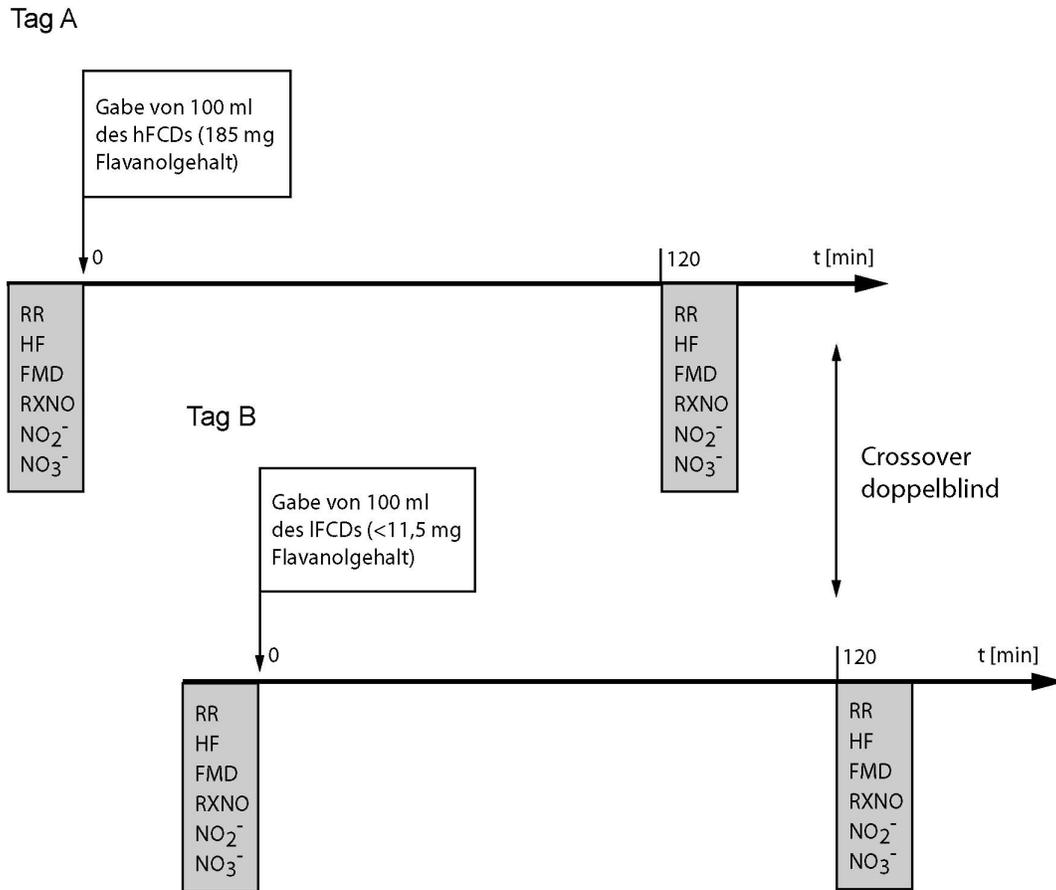


Abbildung 4. Protokoll der dritten Versuchsserie (Doppelblindstudie im Crossover-Design). (RR=Blutdruck; HF=Herzfrequenz; FMD=flussvermittelte Dilatation; RXNO=Konzentration des gebundenen NOs im Plasma; NO₂⁻=Nitritkonzentration im Plasma; NO₃⁻=Nitratkonzentration im Plasma)

Mechanistische Studien: NO-Abhängigkeit und Ascorbinsäure-Synergismus

NO-Abhängigkeit

In Rahmen dieser Serie (n=4) wurde untersucht, ob eine Steigerung der FMD nach flavanolreichem Kakao durch L-NMMA (L-N^G-Mono-Methyl-L-Arginin; Clinalfa AG, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Deutschland), einen kompetitiven Antagonisten der NO-Synthase, aufgehoben werden kann. Dies geschah, um eine potentielle NO-Abhängigkeit des beobachteten Effektes nachzuweisen. Jeweils vor sowie zwei Stunden nach Einnahme des hFCDs wurden die FMD, der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt. Parallel wurden Blutproben entnommen aus denen Nitrit, Nitrat und RXNO im Plasma bestimmt wurden. Anschließend erhielten die Probanden über eine halbe Stunde L-NMMA intravenös verabreicht (initiale Aufdosierung: 1 mg/kg KG*min über 3 min, anschließende Erhaltungsdosis: 0,2 mg/kg KG*min über 27 min). Nach Abschluss der Infusion wurden erneut oben genannte Untersuchungen durchgeführt. (Abb. 5)

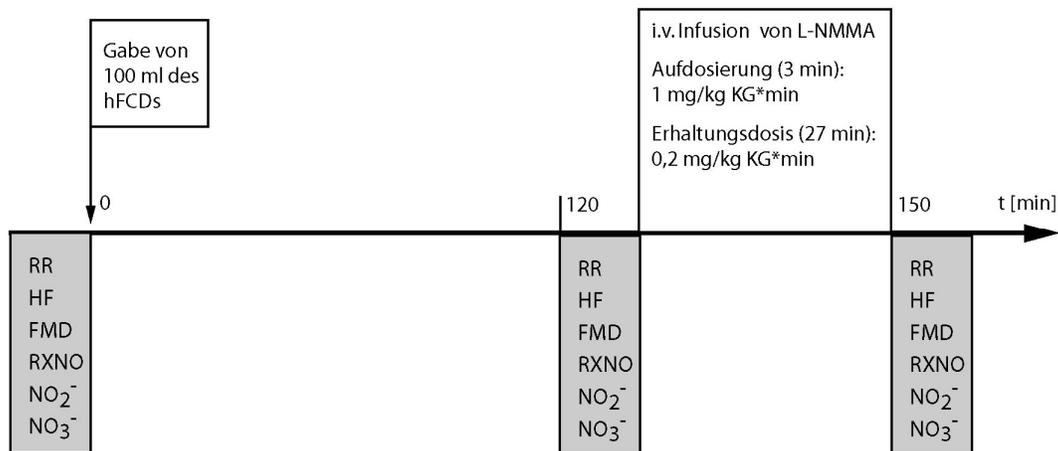


Abbildung 5. Protokoll der Versuchsserie zur Überprüfung der NO-Abhängigkeit des Kakaoeffektes. (RR=Blutdruck; HF=Herzfrequenz; FMD=flussvermittelte Dilatation; RXNO=Konzentration des gebundenen NOs im Plasma; NO₂⁻=Nitritkonzentration im Plasma; NO₃⁻=Nitratkonzentration im Plasma)

Ascorbinsäure-Synergismus

In der letzten Serie (n=4) erhielten die Probanden nach Gabe von 100 ml des hFCDs zusätzlich Ascorbinsäure (Cebion 500 mg N forte, Amp. a 5 ml; Merck KgaA, Darmstadt), um einen potentiellen additiven Effekt auf die FMD und die im Plasma bestimmten NO-Metabolite zu überprüfen. Dabei entsprach das Untersuchungsprotokoll dem der vorherigen Serie, wobei den Probanden statt der L-NMMA-Infusion 2 g Ascorbinsäure auf 20 ml NaCl im Bolus intravenös verabreicht wurden. (Abb. 6)

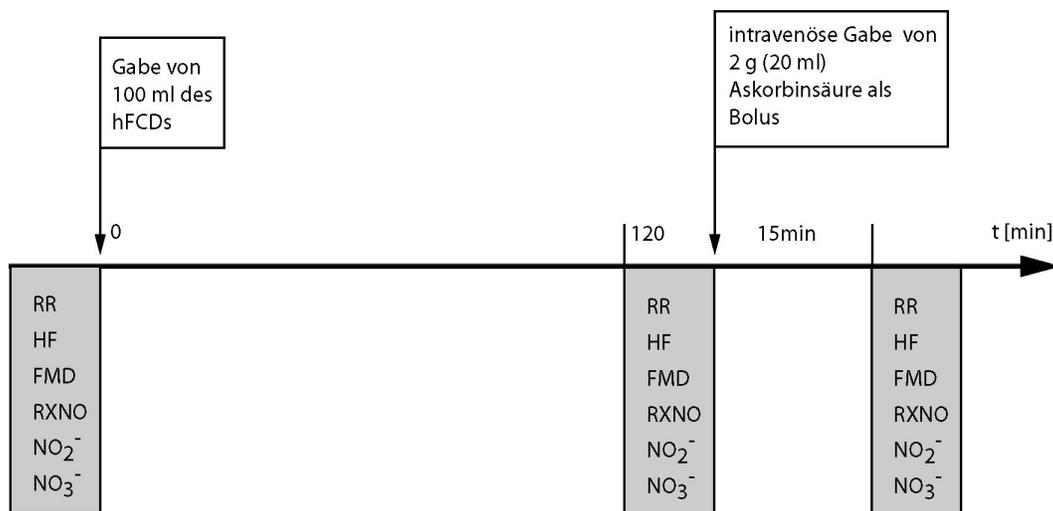


Abbildung 6. Protokoll der Versuchsserie zur Überprüfung eines potentiellen Ascorbinsäure-Synergismus. (RR=Blutdruck; HF=Herzfrequenz; FMD=flussvermittelte Dilatation; RXNO=Konzentration des gebundenen NOs im Plasma; NO₂⁻=Nitritkonzentration im Plasma; NO₃⁻=Nitratkonzentration im Plasma)

3. Messung der flussvermittelten Dilatation der Arteria brachialis

Das Prinzip der duplexsonographischen Untersuchung der flussvermittelten und endothelabhängigen Vasodilatation (FMD=*engl. flow mediated dilation*) ist die Bestimmung der Diameterzunahme der Arteria brachialis nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthese durch einen gesteigerten Blutvolumenfluss.

Hierzu wurde der Diameter der Arteria brachialis sowohl unter Ruhebedingungen als auch im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebietes der Arterie bestimmt. Die Messung des Diameters der Arteria brachialis erfolgte nicht invasiv mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschalls (15 MHz Linear Array Schallkopf, Hewlett Packard, Sonos 2000, USA). Induziert wurde die reaktive Hyperämie durch 5-minütige Insufflation einer am proximalen Unterarm befindlichen Blutdruckmanschette. Aus der ischämischen Vasodilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet resultiert eine Steigerung des Blutvolumenflusses im Bereich der Leitungsarterie. Diese Flussteigerung geht mit einer Steigerung der Schubspannung einher, welche über eine vermehrte Stickstoffmonoxidfreisetzung zu einer Dilatation der Arteria brachialis führt. Etwa 60 s nach Beendigung der Ischämie erreicht diese endothelabhängige Vasodilatation ihr Maximum.

Prinzipiell kann einer verminderten FMD neben einer verminderten NO-Synthese des Endothels auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO-Abbau zugrunde liegen. Deshalb wurde als Positivkontrolle bei jedem Patienten am Ende einer Versuchstage die endothelunabhängige Vasodilatation nach sublingualer Gabe von 400 µg Glyceroltrinitrat (GTN; Nitrolingual mite, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co., Deutschland) quantifiziert. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass GTN zu keiner signifikanten Steigerung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis führt und die Wirkung somit nicht endothelabhängig ist. Die maximale Dilatation wurde nach 4 min bestimmt.

Sowohl die flussvermittelte, endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Vasodilatation nach Gabe von GTN wurden als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter (100%) angegeben.

Untersuchungsprotokoll

Alle Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23 °C zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens begonnen. Zuerst wurde die Arteria brachialis duplexsonographisch aufgesucht, dann im B-Mode längs dargestellt. Die Eindringtiefe des Ultraschalls wurde auf 3 cm festgelegt. Der Durchmesser wurde dadurch identifiziert, dass man sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand klar vom Lumen abgrenzen konnte. Anschließend wurde der Bereich direkt um das Gefäß mit der Zoomfunktion vergrößert. Der Kontrast zwischen Arterienwand und Arterienlumen wurde durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen optimiert. Nach Markierung der Schallkopfposition am Arm wurden weder die Schallkopforientierung noch die Geräteeinstellungen während der gesamten Untersuchung verändert.

Die folgenden Schritte wurden bei jeder FMD-Untersuchung durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Ruhephase in liegender Position erfolgte zunächst die Bestimmung des Ruhediameters. Parallel dazu wurde mittels PW-Doppler die Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen gemessen.

Anschließend wurde eine am proximalen Unterarm lokalisierte Blutdruckmanschette für fünf Minuten auf 250 mmHg insuffliert. Unmittelbar nach Lösung der Stauung wurde dopplersonographisch die maximale Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie bestimmt, 60 s später wurde der Durchmesser bestimmt (FMD). Anschließend erfolgte eine weitere Registrierung der Fließgeschwindigkeit.

Nach der letzten FMD-Messung des Tages erfolgte bei jedem Probanden eine erneute 10-minütige Ruhephase mit anschließender Bestimmung der Fließgeschwindigkeit und des Durchmessers der Arteria brachialis. Im Anschluss daran wurden 400 µg Glyceroltrinitrat (Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als Zerbeißkapsel sublingual verabreicht. Vier Minuten später erfolgte die Quantifizierung des Durchmessers und der Fließgeschwindigkeit.

Analyse des Durchmessers der Arteria brachialis

Die Bestimmung des Durchmessers der Arteria brachialis erfolgte anhand von Längsschnitten. Diese wurden mit Hilfe eines hochauflösenden 15 MHz Linear Array Schallkopfes (Hewlett Packard, Sonos 2000, USA) aufgezeichnet. Die Vermessung des Arterienradius wurde EKG-gesteuert am Ende der Diastole (R-Zacke) durchgeführt. Als Eckpunkt der Diametermessungen diente die M-Linie. Diese echoarme M-Linie stellt den Übergang zwischen Adventitia und Media dar. Zur Diametermessung wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen und der schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt.

Bei der angewandten Methode zur Bestimmung des Arterienradius wurde mit Hilfe des Ultraschallgerätes jeweils eine Bildschleife aufgenommen und digital gespeichert. Jede Bildschleife bestand aus ca. 60 Einzelbildern und umfasste dadurch 3-4 Herzzyklen. Das EKG wurde immer mit aufgezeichnet, um die R-Zacken-getriggerte Vermessung des Arterienradius zu ermöglichen.

Der Transfer der Daten vom Ultraschallgerät auf den Computer erfolgte mit Hilfe eines Wechseldatenträgers (MOD). Am PC wurden die Bilder mit einer speziell dafür entwickelten Software in ein Standardbildformat (TIF-Format) konvertiert (Brachial Converter, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA). Die so konvertierten Bildschleifen konnten nachfolgend in die zur Diametermessung verwendete Software (Brachial Analyser, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) importiert werden.

Dort wurde der zu vermessende Gefäßabschnitt manuell markiert und das Programm anhand von mitgelieferten Eichmarken kalibriert. Anschließend wurden die Gefäßwände automatisch detektiert und farbig angezeigt. Die farbig markierten Begrenzungen der Gefäßwand wurden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild geprüft. Die Bestimmung des Radius erfolgte R-Zacken synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen

Messpunkten im definierten Messabschnitt.

Dopplersonographische Messung des Blutvolumenflusses

Die Messung der Fließgeschwindigkeit erfolgte mittels PW-Doppler. Der Messpunkt wurde hierzu in die Gefäßmitte der Arteria brachialis gelegt. Bei der Berechnung der Fließgeschwindigkeit geht der Kosinus des Einstrahlungswinkels in den Nenner der Dopplergleichung mit ein. Somit ist bei 90° eine Messung unmöglich ($\cos 90^\circ=0$) und bei Annäherung des Winkels von 0° an 90° steigt der Messfehler. Grundsätzlich erfolgten alle Messungen bei einem Dopplerwinkel von $<60^\circ$, da dieser als äußerste Grenze für quantitative Flussmessungen erachtet wird. Der Winkel zwischen Gefäßachse und Dopplerstrahl wurde durch manuelles Anpassen einer Hilfslinie parallel zum Arterienverlauf bestimmt. Aus der Dopplerregistrierung wurde die maximale, minimale und durchschnittliche Fließgeschwindigkeit ermittelt.

Aus Fließgeschwindigkeit und Diameter wurde der Volumenfluss durch die folgende Formel berechnet:

$$\text{Volumenfluss [ml/min]} = \pi \times (\text{Diameter [mm]} / 2)^2 \times \text{Fließgeschwindigkeit [cm/sec]} \times 0,6$$

Der Blutvolumenfluss wurde sowohl unter Ruhebedingungen als auch in der reaktiven Hyperämie unmittelbar nach Beendigung der 5-minütigen Unterarmischämie bestimmt.

4. Quantifizierung von NO-Metaboliten im Plasma

Stickstoffmonoxid ist in biologischen Medien sehr labil und besitzt im Vollblut nur eine kurze Halbwertszeit, bevor es zu Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Aufgrund dieser Tatsache wurden in dieser Studie Nitrit, Nitrat und das gebundene NO im Plasma (RXNO) als Marker für die eNOS-Aktivität bestimmt.

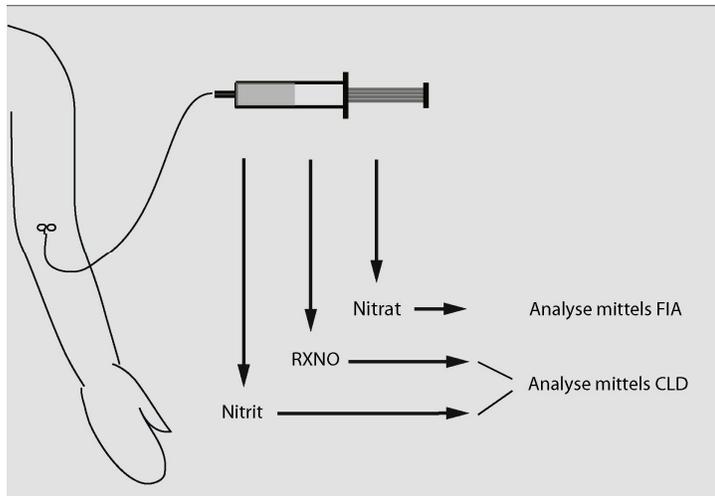


Abbildung 7. Analyseverfahren der einzelnen NO-Metabolite. (Nitrat=Nitratkonzentration im Plasma; RXNO=Konzentration des gebundene NOs im Plasma; Nitrit=Nitritkonzentration im Plasma)

Blutentnahmeprotokoll

Die Blutentnahmen erfolgten beim nüchternen Probanden nach fünfminütiger Ruhe aus einer Kubitalvene. Die Punktion wurde mit Einwegkanülen (W.I.N. 21G, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Entnahme von Blut in Vakuümröhrchen (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Großbritannien) zur Bestimmung des Routinelabors (kleines Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Glukose, CRP). Ein weiteres Heparin-Vakuümröhrchen wurde zur Bestimmung des Flavanolgehaltes im Plasma abgenommen. Anschließend wurden 2 ml Blut zur Quantifizierung von Nitrit und gebundenem NO (RXNO) im Plasma abgenommen. Die Entnahme erfolgte in 2 ml Einwegspritzen (Amefa 2 ml Luer, B. Braun Melsungen AG, Deutschland), die luftblasenfrei aufgezoogen wurden.

Chemilumineszenzdetektion von RXNO und Nitrit

Die biochemische Quantifizierung von Nitrit und RXNO im Plasma erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenzdetektion (CLD).

Prinzip der Chemilumineszenzdetektion

Die Bestimmung von NO in flüssigen und in gasförmigen Proben, basierend auf der Chemilumineszenzreaktion mit Ozon, ist eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden. Das Prinzip der Chemilumineszenzdetektion ist die Quantifizierung des Lichtes, das bei der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Ozon proportional zur vorhandenen NO-Konzentration frei wird.

Zur Bestimmung des NO-Gehaltes flüssiger Proben wurden diese zunächst mit Hilfe einer gasdichten Spritze durch ein ebenfalls gasdichtes Kunststoffseptum in das Reaktionsgefäß der Anlage injiziert. Dieses Reaktionsgefäß ist von einem Wasserbad ummantelt, das ständig auf 80°C geheizt ist, und wird von unten durch eine Fritte von einem konstanten Fluss des inerten Gases Helium durchströmt. Bei Raumtemperatur liegt der Löslichkeitskoeffizient von NO bei ~20, so dass das in der flüssigen Probe gelöste Stickstoffmonoxid rasch von der Flüssigkeits- in die Gasphase übertritt. Dieser Prozess wird durch die im Reaktionsgefäß sprudelnde Flüssigkeit und den konstanten Heliumfluss noch beschleunigt. Das nun gasförmige NO wird durch den Heliumfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators fortgetragen. Zum Schutz der Anlage strömt das Gas dabei zunächst durch einen Kühlungsbereich und anschließend durch ein mit 1-molarer Natriumhydroxid-Lösung gefülltes Gefäß, das als Dampf-Falle dient. In der Reaktionskammer des NO-Analysers (CLD88 NOe, Eco Physics, Dürnten, Schweiz) wird das NO mittels einer Photoreaktion quantifiziert. Der Reaktionskammer wird neben dem Gasgemisch, das die Proben enthält, auch aus Sauerstoff generiertes Ozon (O₃) zugeleitet. Dieses reagiert bei der Chemilumineszenzreaktion mit dem NO, wobei Stickstoffdioxid entsteht, das sich teils in

einem angeregten Zustand befindet (NO_2^*). NO_2^* ist instabil und fällt bald wieder in seinen Grundzustand zurück, wobei die frei werdende Energie entweder in Form von Lichtquanten ($h\nu$) ausgesandt oder auf andere Moleküle übertragen wird. (Formeln siehe Abb. 8)

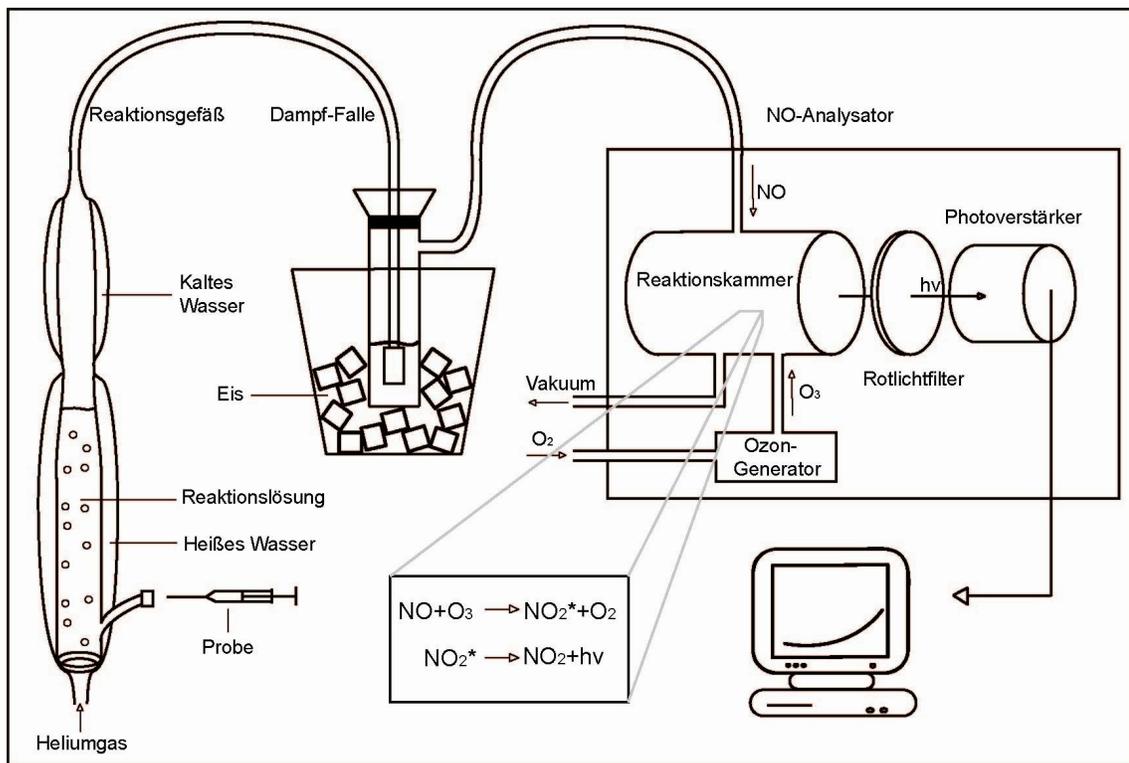


Abbildung 8. Aufbau der Chemilumineszenzdetektions-Anlage. Die zu untersuchende Probe wird in ein Reaktionsgefäß injiziert. NO tritt in die Gasphase über und gelangt mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators, wo die Lichtreaktion mit O₃ stattfindet.

Damit die Menge an ausgesandten Quanten tatsächlich zu der NO-Konzentration der Probe proportional ist, muss die Anzahl der in der Reaktionskammer befindlichen Moleküle möglichst gering gehalten werden. Dies wird durch eine Reduktion des Druckes in der Reaktionskammer auf 7-8 mmHg erreicht. Weiterhin verhindert der niedrige Druck eine Oxidation von Stickstoffmonoxid durch Sauerstoff und der Druckgradient zieht die Proben in die Reaktionskammer. Die Temperatur in der Reaktionskammer muss konstant gehalten werden, da sie sich auf die Chemilumineszenzreaktion auswirkt.

Die Reaktion zwischen NO und O₃ läuft sehr schnell ab (10⁻⁷ l mol/1s) und hat eine sehr niedrige Aktivierungsenergie von 10,5 kJ. Dadurch ist es möglich auch schnelle NO-Konzentrationsänderungen zu erfassen. Außerdem wird das Signal nicht durch höher oxidierte Stickoxide verfälscht, da diese wesentlich langsamer mit Ozon reagieren und eine höhere Aktivierungsenergie benötigen. Das durch die Photoreaktion emittierte Licht befindet sich im Rot- und Infrarotbereich des Spektrums (~640-3000 nm). Es gelangt von der Reaktionskammer durch einen Rotlichtfilter zu einem Photoverstärker (Abb. 8). Der Rotlichtfilter verhindert die Verstärkung von Licht anderer Wellenlängen wie zum Beispiel von ultravioletten Emissionen durch Reaktionen von Alkenen und schwefelhaltigen Verbindungen. Um ein Ansteigen des Dunkelsignals zu vermeiden, müssen die Temperaturen im Photoverstärker konstant niedrig gehalten werden und sowohl Ozon als auch Helium müssen in einem konstanten Fluss strömen.

Die durch den NO-Analysator gewonnenen Daten wurden einem Rechner zugeleitet. Zur Datenauswertung diente das Programm Eurochrom, wobei die Größe des Signals als Fläche unter der Kurve bestimmt wurde. Mit Hilfe einer Nitrit-Eichreihe konnte aus dieser anschließend der NO-Gehalt der Probe errechnet werden.

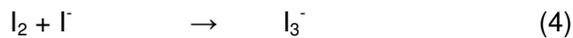
Quantifizierung von Nitrit und gebundenem NO mittels Chemilumineszenzdetektion

Um aus Nitrit und gebundenem NO (RXNO) Stickstoffmonoxid freizusetzen, bedarf es einer reduktiven Reaktionslösung. Diese besteht aus 0,38 g Jod und 1 g Kaliumjodid gelöst in 10 ml hochreinem Wasser für die Chromatographie und 55 ml Essigsäure. In das Reaktionsgefäß der CLD-Anlage wurden jeweils circa 18 ml der Reaktionslösung injiziert, wobei die Reaktionslösung durch das umgebende Wasserbad auf 80°C erhitzt wurde, bevor die zu untersuchenden Proben injiziert wurden. Die reduktive Lösung setzt aus dem in der Probe enthaltenem Nitrit (NO₂⁻) zunächst Nitrosiumionen (NO⁺) frei (Gleichung 1). Die Nitrosiumionen reagieren mit Jodid (I⁻) weiter zu NO (Gleichungen 2 und 3).



Das auf diese Weise äquimolar aus Nitrit gebildete NO kann im NO-Analysator mittels Photoreaktion quantifiziert werden.

Die Vermessung des RXNOs im Plasma durch Chemilumineszenz-Detektion erfordert wie unten beschrieben eine besondere Art der Probenaufbereitung, um allein das aus RXNO freigesetzte NO zu messen. Durch die beschriebene Reaktionslösung aus Kupfer (Cu^-), Iod (I_2) und Iodid (I^-) wird NO vermutlich über Nitrosiumionen (NO^+) freigesetzt (Gleichungen 4 bis 6).⁹⁵



Probenaufarbeitung

Alle vorbereiteten Lösungen, die Spritzen und die Zentrifugen wurden während der gesamten Aufarbeitung auf 4°C gekühlt. Die Aufarbeitungszeit betrug 30 min von der Blutentnahme bis zur Analyse. 2 ml Blut wurden in ein Röhrchen gefüllt (PP-Tube, sterile, 15 ml, Greiner Bio-one, Deutschland) in dem bereits 8 ml einer N-Ethylmaleimide und EDTA-Lösung vorgelegt waren (0,9% NaCl, B. Braun Melsungen AG, Deutschland mit N-Ethylmaleimide, Merck KGaA, Deutschland und Ethylenediaminetetraacetic acid, 0,5 M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland). Da N-Ethylmaleimide Sulfhydrylgruppen der Thiole alkyliert, stehen diese nicht mehr für die Bindung von NO zur Verfügung. Dadurch werden sowohl artifizielle Nitrosierungsreaktionen als auch Transnitrosierungsreaktionen und damit

der Abbau von gebildetem RSNO verhindert. Die nun verdünnten Blutproben wurden zunächst 15 min bei 1630 g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Anschließend wurde je ein ml des klaren Überstandes in zwei Safe-Lock Tubes (Safe-Lock Tubes 2 ml, Eppendorf AG, Deutschland) überführt, wobei in einem der beiden Gefäße bereits 100 µl Sulfanilamid-Lösung (0,5%iges Sulfanilamid in 0,1 M HCl) vorgelegt waren. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein sehr stabiles Diazoniumsalz, welches durch die Reaktionslösung nicht reduziert wird. Somit wird lediglich das gebundene NO gemessen. (Abb. 9)

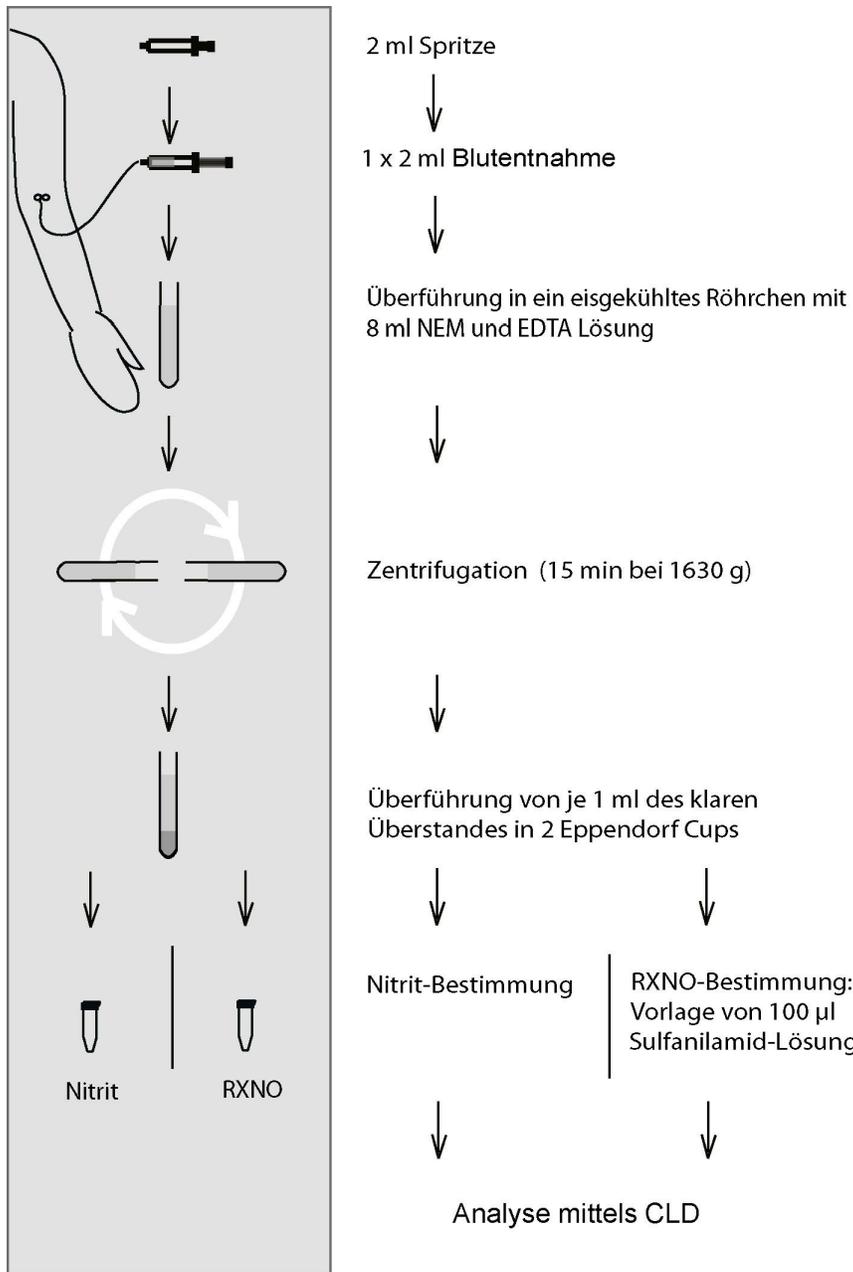


Abbildung 9. Ablaufschema der Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Nitrit- und RXNO-Konzentration im Plasma. (NEM=N-Ethylmaleimide; RXNO=gebundenes NO im Plasma; CLD=Chemilumineszenzdetektion)

Fluss-Injektions-Analyse zur Bestimmung von Nitrat

Prinzip der Fluss-Injektions-Analyse

Die Fluss-Injektions-Analyse diente in der vorliegenden Studie zur Nitratmessung. Zunächst wurde das in den Plasmaproben vorhandene Nitrat mit Hilfe der Nitratreduktase zu Nitrit reduziert, dieses wurde anschließend mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt.

Die Fluss-Injektions-Analyse (FIA) zur Nitritbestimmung im Plasma beruht auf der Griess-Reaktion. Hierbei wird der Farbstoff, der bei der Reaktion von Nitrit mit Naphthylethylendiamin entsteht, photometrisch quantifiziert. Die FIA-Anlage besteht aus einer HPLC-Pumpe (Sun Flow 100, Sunchrom HPLC Pump, Germany), einem automatischen Probenaufnehmer (Endurance, Spark, Holland), einem Photometer (Sycam, UV/VIS-Detektor S3205) und einem Integrator zur Datenaufnahme. Die HPLC-Pumpe dient dazu, das Farbreagenz mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 ml/min durch die Messzelle des Photometers zu pumpen. Das als Laufmittel dienende Griess-Farbreagenz besteht zu gleichen Teilen aus in 1%iger Salzsäure gelöstem Sulfanilamid und aus N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin. Die aufbereiteten Proben wurden mit einem automatischen Probenaufnehmer in das Farbreagenz injiziert. Auf dem Weg zur Messzelle reagiert das in den Proben enthaltene Nitrit mit dem Farbreagenz, indem Nitrit mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin eine Azokupplung bildet und es kommt zu einem inkompletten Farbumschlag. Dieser wird in dem nachgeschalteten Photometer in einer Messzelle mit einem Messvolumen von 8 µl bei einer Wellenlänge von 545 nm detektiert. Die durch die FIA-Anlage gewonnenen Daten wurden dem angeschlossenen Rechner zugeleitet. Zur Datenauswertung diente das Programm Chromgate, wobei die Größe des Signals als Fläche unter der Kurve bestimmt wurde. Mit Hilfe einer Nitrat-Eichreihe konnte aus dieser anschließend der Nitrat-Gehalt der Probe errechnet werden.

Probenaufarbeitung

Alle vorbereiteten Lösungen, die Spritzen und die Zentrifugen wurden während der gesamten Aufarbeitung auf 4°C gekühlt. 2 ml Blut wurden in ein Röhrchen gefüllt (PP-Tube, sterile, 15 ml, Greiner Bio-one, Deutschland) in dem bereits 8 ml einer Heparin-Lösung vorgelegt waren (0,9% NaCl, B. Braun Melsungen AG, Deutschland mit Liquemin N5000, Hoffmann La Roche AG, Deutschland). Die nun verdünnten Blutproben wurden zunächst 15 min bei 1630 g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Der klare Überstand wurde anschließend in ein gekühltes Ultrafiltrationsröhrchen (Centricon, Millipore Corporation, USA) überführt und bei 6000 g über einen Zeitraum von drei Stunden zentrifugiert. Das Ultrafiltrat wurde zur späteren Nitratbestimmung bei -80°C eingefroren. (Abb. 10)

Unmittelbar nach dem Auftauen, wurde das nitrathaltige Ultrafiltrat auf Microtiterplatten pipettiert und mit einer Nitratreduktase-Lösung (*Aspergillus* sp., Hoffmann La Roche AG, Deutschland) versetzt. In der folgenden 1 stündigen Inkubationszeit bei 25°C im Wärmeschrank wurde das Nitrat zu Nitrit umgesetzt. Die Nitratreduktase-Lösung enthielt neben der Nitratreduktase das Coenzym NADPH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), Glukose-6-Posphat (Merck KGaA, Deutschland) und Glukose-6-Posphat-Dehydrogenase (Hoffmann La Roche AG, Deutschland). Nach der Inkubationszeit wurden die Microtiterplatten in den automatischen Probenaufnehmer eingelegt.

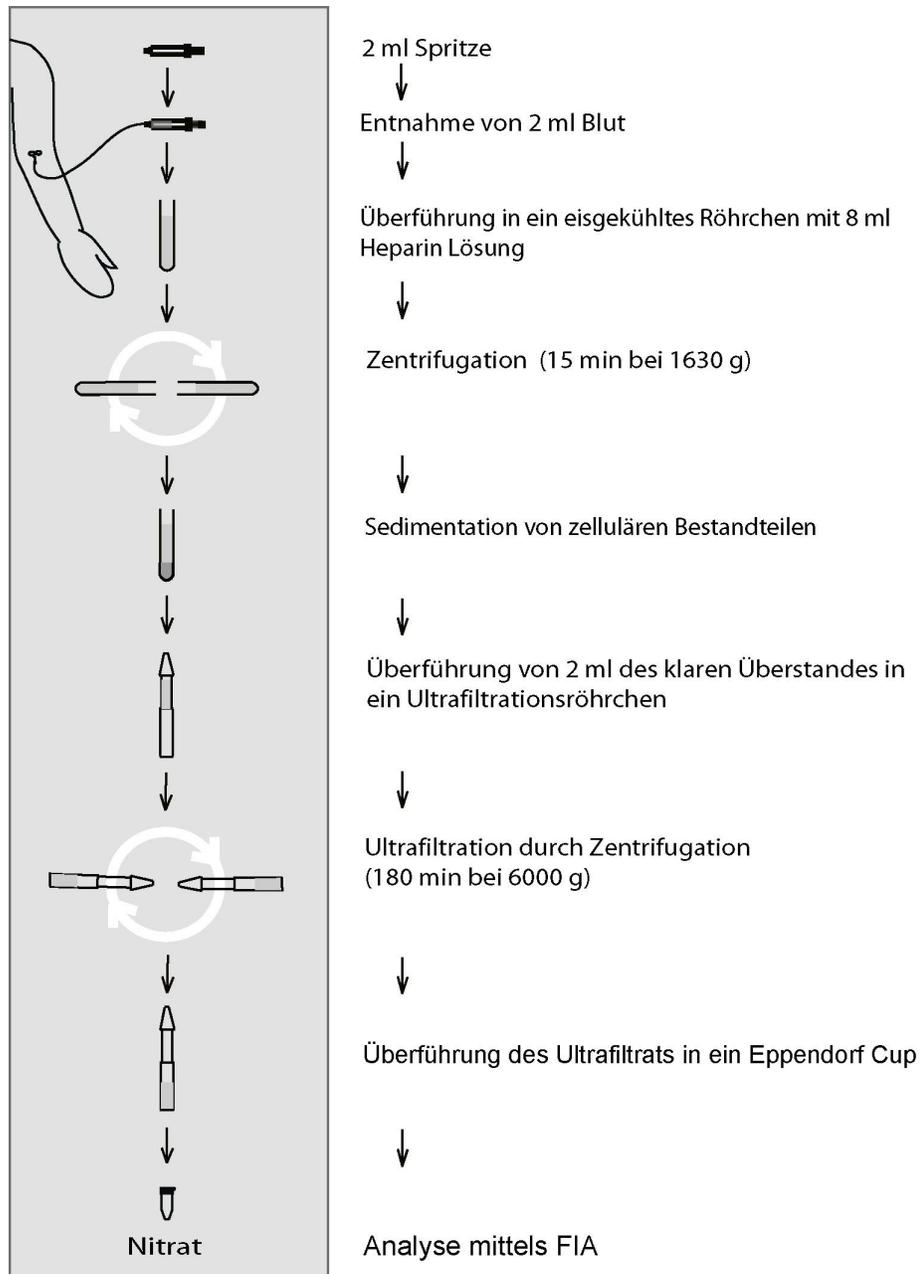


Abbildung 10. Ablaufschema der Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma. (FIA=Fluss-Injektions-Analyse)

5. Quantifizierung von Flavanolen und ausgewählten Flavanolmetaboliten im Plasma

Die Bestimmung der Flavanole (Catechin und Epicatechin) und der ausgewählten

Flavanolmetabolite (Epicatechin-7- β -D-Glucuronid, 4'-O-Methyl-Epicatechin, 4'-O-Methyl-Epicatechin- β -D-Glucuronid) im Plasma erfolgte mithilfe einer HPLC unter Anwendung eines FLD Detektionssystems. (Hewlett Packard 1100 Series; HPLC-Säule: Phenomex C18(2) 150x4,8 mm, 3 micron) Die Messungen wurden unter Beachtung der üblichen Standards durchgeführt.^{96;97} Die Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Schroeter, University of California, Davis, USA durchgeführt.

6. Statistische Verfahren

Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) angegeben. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde auf Normalverteilung geprüft. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) für Messwiederholungen auf signifikante Unterschiede überprüft. Einzelvergleiche der Haupteffekte wurden anschließend durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend dem Bonferroni-Konfidenzintervall korrigiert. Lineare Korrelationen wurden zweiseitig nach Pearson berechnet. Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSS-Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, release 11, SPSS Inc., USA) durchgeführt. Abbildungen wurden mit Origin (Origin, Version 7G, OriginLab Corporation, USA), Photoshop CS (Adobe Photoshop, Version 7.0) und Illustrator CS (Adobe Illustrator, Version 10, Adobe Systems, Inc., USA) erstellt.

IV. Ergebnisse

1. Charakteristika der Studienpopulationen

Alle Probanden waren hinsichtlich des Blutdrucks, der Herzfrequenz und der laborchemischen Parameter im normalen Referenzbereich. Bei der körperlichen Untersuchung ergaben sich keine pathologischen Befunde. Zwischen den Probanden der verschiedenen Versuchsserien bestanden keine signifikanten Unterschiede. (Tab. 3)

Tabelle 3. Charakterisierung der Probanden (1. Zeitverlauf, 2. Dosisfindung, 3. Randomisierte Doppelblind-Studie im Crossover-Design, 4. Mechanistische Studien: a. NO-Abhängigkeit, b. Ascorbinsäure-Synergismus, * Basalwerte vor Gabe von 100 ml hFCD, ** Basalwerte vor Gabe von 50 ml hFCD)

Untersuchungsserie		1.	2.	3.	4a.	4b.
n		5	4	11	4	4
Geschlecht	[m/w]	4/1	2/2	6/5	2/2	3/1
Alter	[Jahre]	44±6	26±1	31±1	38±7	38±7
Körpergröße	[cm]	180±4	174±3	172±3	175±4	175±4
Gewicht	[kg]	82±7	61±3	66±5	67±2	67±2
BMI	[kg/m ²]	26±2	20±1	22±1	22±1	22±2
MAP	[mmHg]	85±4*	82±2**	87±2*	81±3	85±3
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	167±17	164±10	192±5	197±16	185±29
LDL-Cholesterin	[mg/dl]			116±5	124±4	
HDL-Cholesterin	[mg/dl]			67±6	74±10	
Triglyceride	[mg/dl]	124±16	114±28	120±15	114±28	88±24
Glukose	[mg/dl]	89±2	83±0,9	86±1	87±4	91±9
CRP	[mg/dl]	0,3±0	0,1±0,09	0,3±0,1	0,1±0	0,1±0,09
Packungsjahre	[Jahre]	23±3	5±1	12±2	12±5	3±1
RXNO im Plasma	[nmol/l]		13±1**	21±3*	12±2	10±1
Nitrit im Plasma	[nmol/l]		131±31**	132±21*	115±33	153±39
Nitrat im Plasma	[µmol/l]		22±9**	43±8*	14±8	35±8
Diameter A. brachialis	[mm]	4,8±0,1*	3,7±0,3**	4,2±0,9*	4,5±0,4	4,2±0,5
FMD	[%]	2,6±0,5*	3,3±0,8**	4,5±0,8*	2,9±1,2	2,1±0,4
GTN	[%]	10,5±2,0*	13,6±2,8**	14,7±2,1*		12,2±2,0

2. Zeitabhängige Steigerung der flussvermittelten Vasodilatation nach Gabe von flavanolreichem Kakao

In der ersten Versuchsserie (Zeitverlauf) wurde die flussvermittelte Vasodilatation der Arteria brachialis (FMD) an zwei unterschiedlichen Tagen nach oraler Aufnahme von (1) flavanolreichem Kakao (hFCD) oder (2) Leitungswasser (je 100 ml) im Zeitverlauf über 6 Stunden gemessen. Nach Gabe des hFCDs, nicht jedoch nach Wasser, zeigte sich eine akute und reversible Zunahme der FMD (Abb. 11). So kam es 2-3 h nach Gabe des hFCDs zu einem signifikanten Anstieg der FMD von basal $2,6\pm 0,5\%$ auf $5,6\pm 0,4\%$ ($p < 0,001$). Die basalen FMD-Werte vor der jeweiligen Intervention (Gabe des hFCDs oder Wassers) waren nicht signifikant unterschiedlich ($2,6\pm 0,5\%$ vs. $2,3\pm 0,6\%$). Während des gesamten Untersuchungszeitraums blieb der basale Durchmesser der Arteria brachialis konstant ($4,78\pm 0,14$ mm). Der Blutdruck und die Herzfrequenz blieben zu allen Messzeitpunkten unverändert (RR_{sys} : 110 ± 7 mmHg; RR_{dia} : 70 ± 4 mmHg; MAP: 83 ± 5 mmHg; HF: 57 ± 5 /min)

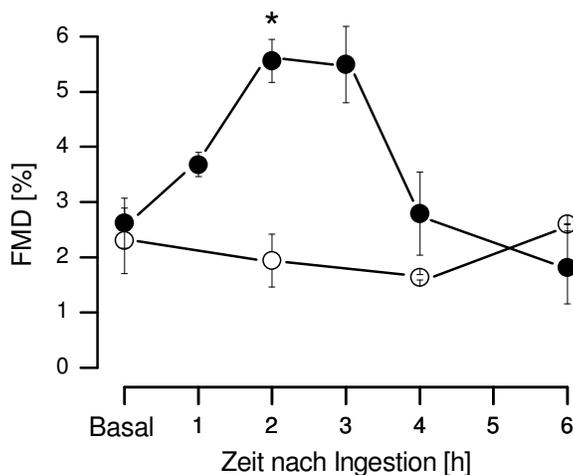


Abbildung 11. Signifikanter Anstieg der endothelabhängigen Dilatation (FMD) zwei Stunden nach Gabe des hFCDs (gefüllte Kreise) ($n=4$). Nach Gabe von Wasser (offene Kreise) kam es zu keinem Zeitpunkt zu signifikanten Änderungen der FMD ($n=2$). Symbole repräsentieren Mittelwerte \pm SE.

3. Dosisabhängige Absorption und Wirkung von Flavanolen in Kakao

Zur Bestimmung der optimalen Dosierung des flavanolreichen Kakaogetränks (hFCD) wurden in der zweiten Versuchsserie (Dosisfindung) 50-300 ml flavanolreicher Kakao oder Wasser (100 ml) an 4 unterschiedlichen Tagen verabreicht. Die FMD und die RXNO-Konzentration im Plasma wurden vor sowie 2 h nach Aufnahme des jeweiligen Getränks bestimmt. (Abb. 12) Die Ausgangswerte der FMD und der RXNO-Konzentration unterschieden sich an den verschiedenen Untersuchungstagen nicht signifikant voneinander. Nach Gabe von ≥ 100 ml des hFCDs (entspr. ≥ 179 -185 mg Flavanole) kam es zu einem signifikanten Anstieg der FMD, die RXNO-Konzentration im Plasma stieg bereits ab einer Dosierung von 50 ml des hFCDs (entspr. ≥ 88 -92 mg Flavanole) signifikant an. (Tab. 4)

Tabelle 4. FMD und Konzentration des RXNOs im Plasma (basal und 2 h nach Aufnahme der jeweiligen Flavanoldosis in Kakao, * jeweils $p < 0.05$ basal vs. 2 h; n=4; MW \pm SE)

	88-92 mg		176-185 mg		352-370 mg		528-55 mg	
	basal	2h	basal	2h	basal	2h	basal	2h
RXNO [nmol/l]	13 \pm 1	17 \pm 0*	14 \pm 1	23 \pm 1*	13 \pm 0	23 \pm 1*	13 \pm 1	17 \pm 0*
FMD [%]	3,4 \pm 0,8	4,1 \pm 0,6	2,2 \pm 1	5,9 \pm 0,6*	3,9 \pm 1,2	7,5 \pm 0,8*	3,1 \pm 0,4	8,2 \pm 2,1

Abbildung 12 zeigt die jeweiligen Anstiege der FMD und der RXNO-Konzentration im Plasma, berechnet als 2 h-Wert minus Basalwert. Die Plasmakonzentrationen von Nitrit und Nitrat blieben nach Gabe der verschiedenen Kakaomengen unverändert bezogen auf die Basalwerte (Nitrit: 131 \pm 31 nmol/l; Nitrat: 22 \pm 9 μ mol/l). Die endothelunabhängige Dilatation nach GTN gemessen jeweils im Anschluss an die 2 h Messungen sowie der Ruhedurchmesser der Arteria brachialis (3,64 \pm 0,31 mm Mittelwert aus 8 Messungen) blieben sowohl am jeweiligen Untersuchungstag als auch zwischen den Untersuchungstagen unverändert.

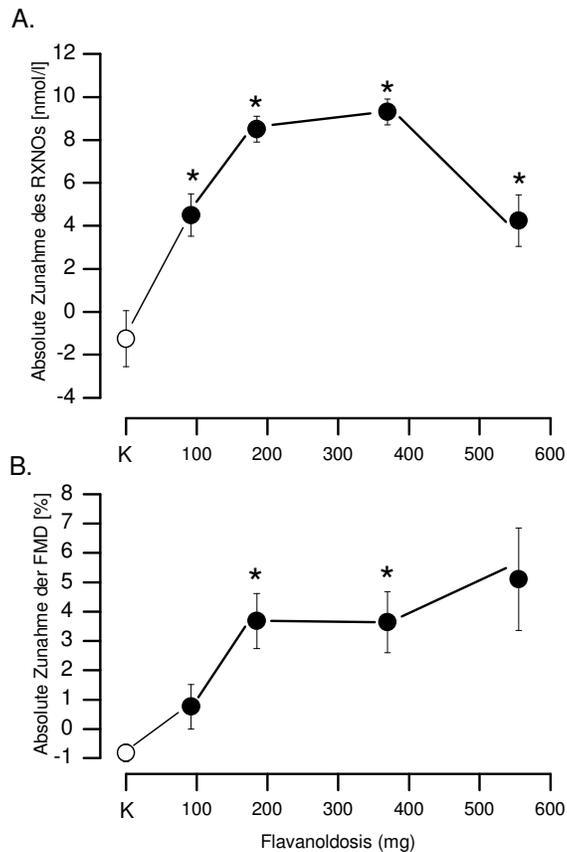


Abbildung 12. Der hFCD steigert zwei Stunden nach Ingestion dosisabhängig das gebundene NO (RXNO) im Plasma (A) sowie die FMD (B, gefüllte Kreise). Nach Gabe von Wasser als Kontrolle (K) kam es zu keinen signifikanten Änderungen. (leere Kreise) (Anstieg: gemittelte Steigerung des RXNOs im Plasma bzw. der FMD als 2 h-Wert minus Basalwert; * jeweils $p < 0.05$ basal vs 2 h; $n=4$; $MW \pm SE$)

Parallel wurden ausgewählte Flavane und Flavanolmetabolite im Plasma bestimmt. Sowohl die freien, aglykonischen Flavane als auch die konjugierten Flavanolmetabolite stiegen nach Gabe von ≥ 179 -185 mg Flavolen in Kakao signifikant im Plasma an. (Abb. 13). Bei einer Dosierung von nur 50 ml hFCD konnten bezogen auf die Basalwerte keine signifikanten Effekte beobachtet werden. (Tab. 5) Der Anstieg der Plasmakonzentrationen von Epicatechin ($r=0,75$, $p=0,005$), Catechin ($r=0,76$, $p=0,004$), Epicatechin-7- β -D-Glucuronid ($r=0,69$, $p=0,013$), 4'-O-Methyl-Epicatechin ($r=0,65$, $p=0,022$) und 4'-O-Methyl-Epicatechin- β -D-Glucuronid ($r=0,67$, $p=0,018$) korrelierte bei einer Dosierung von 50-200 ml des flavanolreichen Kakaotrinks sigifikant mit dem Anstieg der RXNO-Konzentration im Plasma. Die Steigerung der FMD korrelierte signifikant mit dem Anstieg des Epicatechins ($r=0,66$, $p=0,020$) und Catechins ($r=0,62$, $p=0,031$).

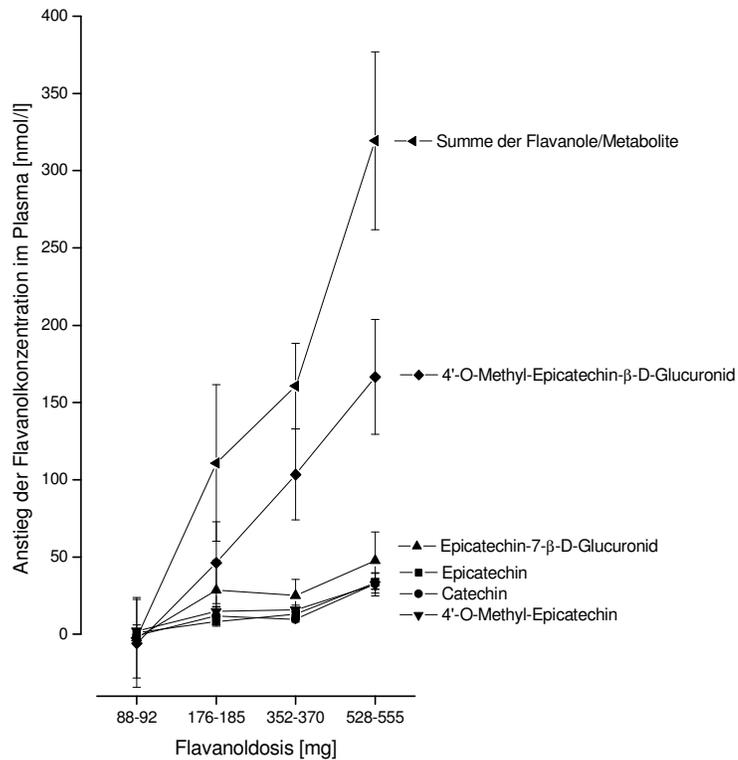


Abbildung 13. Anstieg der Flavanole und bestimmter Metabolite im Plasma 2 h nach Ingestion der verschiedenen Dosierungen des hFCDs

Tabelle 5. Konzentration der Flavanole und ausgewählter Flavanolmetabolite im Plasma basal und 2 h nach Aufnahme der jeweiligen Flavanoldosis in Kakao (* $p < 0.05$ basal vs. 2 h; MW \pm SE)

	88-92		176-185		352-370		528-555	
	basal	2 h	basal	2 h	basal	2 h	basal	2 h
Epicatechin [nmol/l]	3 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0	11 \pm 3*	6 \pm 3	19 \pm 6*	6 \pm 3	19 \pm 6*
Catechin [nmol/l]	10 \pm 2	9 \pm 3	7 \pm 2	19 \pm 7	8 \pm 2	18 \pm 3*	8 \pm 2	18 \pm 3*
Epicatechin-7-β-D-Glucuronid [nmol/l]	11 \pm 7	9 \pm 3	9 \pm 6	38 \pm 19	14 \pm 4	39 \pm 13*	14 \pm 4	39 \pm 13*
4'-O-Methyl-Epicatechin [nmol/l]	22 \pm 8	25 \pm 5	23 \pm 9	38 \pm 12	26 \pm 9	41 \pm 10*	26 \pm 9	41 \pm 10*
3'-O-Methyl-Epicatechin-β-D-Glucuronid [nmol/l]	157 \pm 31	151 \pm 46	156 \pm 32	202 \pm 40*	184 \pm 59	287 \pm 58*	184 \pm 59	287 \pm 58*

Nach keiner der vier verabreichten Kakaomengen kam es zu signifikanten Änderungen der gemessenen hämodynamischen Parameter Blutdruck oder Herzfrequenz bezogen auf die Basalwerte (RR_{sys}: 106 \pm 2 mmHg; RR_{dia}: 70 \pm 2 mmHg; MAP: 82 \pm 2 mmHg; HF: 52 \pm 3 /min).

4. Einfluss von flavanolreichem Kakao auf die Endotheldysfunktion von Rauchern

Basierend auf den Daten der beiden ersten Versuchsserien wurde eine Doppelblindstudie im Crossover-Design entworfen (n=11). Den Probanden wurde an zwei unterschiedlichen Tagen entweder 100 ml des flavanolreichen Kakaogetränks (hFCD, Flavanolgehalt 179-185 mg) oder ein bezüglich der anderen Inhaltsstoffe angepasstes, flavanolarmes Kontrollgetränk (IFCD, <11 mg Flavanele) verabreicht (Tab. 2).

Der hFCD bewirkte zwei Stunden nach Ingestion eine signifikante Steigerung der FMD ($4,2\pm 0,9\%$ auf $6,9\pm 0,9\%$, $p<0,01$) und der RXNO-Konzentration im Plasma (20 ± 3 nmol/l auf 29 ± 5 nmol/l, $p<0,01$). (Abb. 14 A. und B.) Die bei Rauchern gemessenen Basalwerte für die FMD und die RXNO-Konzentration im Plasma lagen deutlich unter den in unserer Arbeitsgruppe ermittelten Werten für gesunde Nichtraucher (FMD: $7,1\pm 0,6\%$, Plasma RXNO: 36 ± 2 nmol/L).¹⁸ Nach Gabe des IFCDs kam es zu keinem signifikanten Anstieg bezogen auf die beiden obigen Parameter (FMD: $4,5\pm 0,9\%$ zu $3,6\pm 0,9\%$; RXNO: 23 ± 4 nmol/l zu 20 ± 3 nmol/l). (Abb. 14 C. und D.) Die Ausgangswerte der FMD und der RXNO-Konzentration im Plasma sowie die endothelunabhängige Dilatation unterschieden sich an den beiden verschiedenen Studientagen nicht signifikant voneinander.

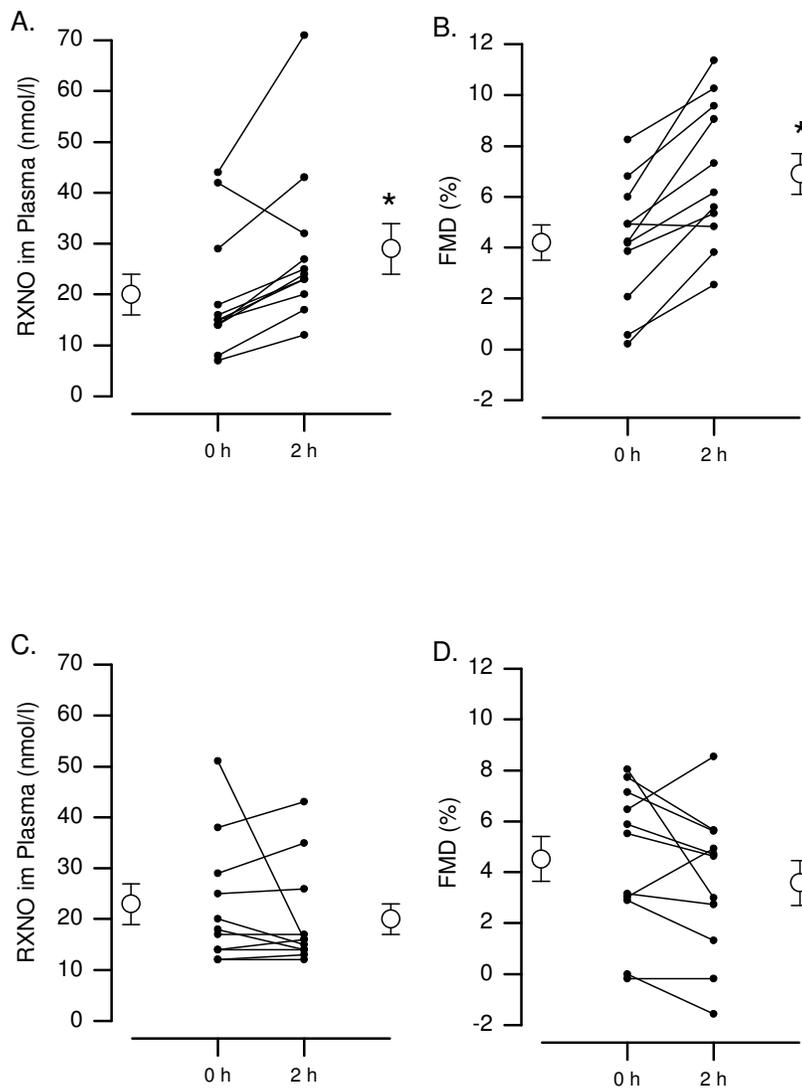


Abbildung 14. Signifikante Steigerung des RXNOs im Plasma (A.) und der FMD (B.) zwei Stunden nach Gabe des hFCDs. Der IFCD zeigte keine signifikanten Effekte bezogen auf die beiden obigen Parameter (C. und D.). (n=11; gefüllte Kreise: Einzelwerte; leere Kreise: MW±SE)

Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten und dem absoluten Anstieg sowohl der FMD ($r=0,69$, $p=0,02$) als auch der Plasma-RXNO-Konzentration ($r=0,73$, $p=0,011$) zwei Stunden nach Aufnahme des hFCDs. Zwischen der Anzahl der pack years und der Steigerung der FMD ($r=0,50$, $p=0,120$), bzw. der Plasma-RXNO-Konzentration ($r=0,4$, $p=0,218$) gab es keine signifikante Korrelation.

Der Blutvolumenfluss unter Ruhebedingungen und in der reaktiven Hyperämie änderte sich nach Gabe des hFCDs nicht signifikant. (Tab. 6) Die Steigerung des Blutvolumenflusses nach Deflation der Blutdruckmanschette führt zu einer Änderung der auf die Endothelzellen einwirkenden Schubspannung, was einen spezifischen Reiz zur NO-Freisetzung im zuführenden Leitungsgefäß darstellt. Da der absolute Anstieg des Blutvolumenflusses nach Gabe des hFCDs konstant blieb (Tab. 6), scheint die Verbesserung der FMD nach Aufnahme des hFCDs somit nicht in einer vermehrten physiologischen Stimulation der NO-Synthese begründet zu liegen.

Tabelle 6. Blutvolumenfluss unter Ruhebedingungen (Ruhe) und in der reaktiven Hyperämie (RH) sowie der absolute Anstieg des Blutvolumenflusses in der reaktiven Hyperämie (Diff. RH-Ruhe) basal und 2 h nach Aufnahme des hFCDs (MW±SE; n=11)

	basal			2 h		
	Ruhe	RH	Diff. RH-Ruhe	Ruhe	RH	Diff. RH-Ruhe
Blutvolumenfluss [ml/min]	180±37	725±55	546±53	142±39	670±80	585±28

Alle übrigen bestimmten angiologischen, hämodynamischen und biochemischen Parameter zeigten weder nach Gabe des hFCDs noch nach Gabe des IFCDs signifikante Abweichungen von den Basalwerten.

5. Wirkungsmechanismen: NO und Ascorbinsäure

Die vierte Versuchsserie wurde durchgeführt, um einen Einblick in den Wirkungsmechanismus des hFCDs zu gewinnen.

a. NO-Synthase-Abhängigkeit des beobachteten Effektes

Zur Überprüfung einer potentiellen NO-Synthase-Abhängigkeit des beobachteten Effektes wurde den Patienten nach Gabe des flavanolreichen Kakaotranks (hFCD) L-NMMA, ein Inhibitor der NO-Synthase (NOS) infundiert.

Die FMD sowie die RXNO-Konzentration im Plasma stiegen zwei Stunden nach Gabe des

hFCDs signifikant an (FMD: $2,9 \pm 1,2$ % auf $5,5 \pm 0,6$ %, $p < 0,05$ und RXNO: 12 ± 2 nmol/l auf 19 ± 2 nmol/l, $p < 0,005$) an. Durch die sich anschließende L-NMMA-Infusion kam es zu einer Aufhebung dieser Effekte (FMD: $0,5 \pm 0,8$ %, $p < 0,05$ und RXNO: 6 ± 1 , $p < 0,05$). (Abb. 15)

Die übrigen bestimmten biochemischen Parameter (NO_2^- und NO_3^- im Plasma) und der Ruhedurchmesser der Arteria brachialis zeigten weder nach Gabe des flavanolreichen Kakaotränkes noch nach L-NMMA-Infusion signifikante Veränderungen bezogen auf die Basalwerte. Nach der Infusion von L-NMMA kam es zu einem signifikanten Anstieg des diastolischen (66 ± 2 mmHg auf 83 ± 2 mmHg, $p \leq 0,001$) und des mittleren arteriellen Blutdrucks (80 ± 2 mmHg auf 93 ± 2 mmHg, $p < 0,005$) bezogen auf die Werte zwei Stunden nach Gabe des hFCDs. Alle übrigen hämodynamischen Parameter änderten sich zu keinem Zeitpunkt in signifikanter Weise.

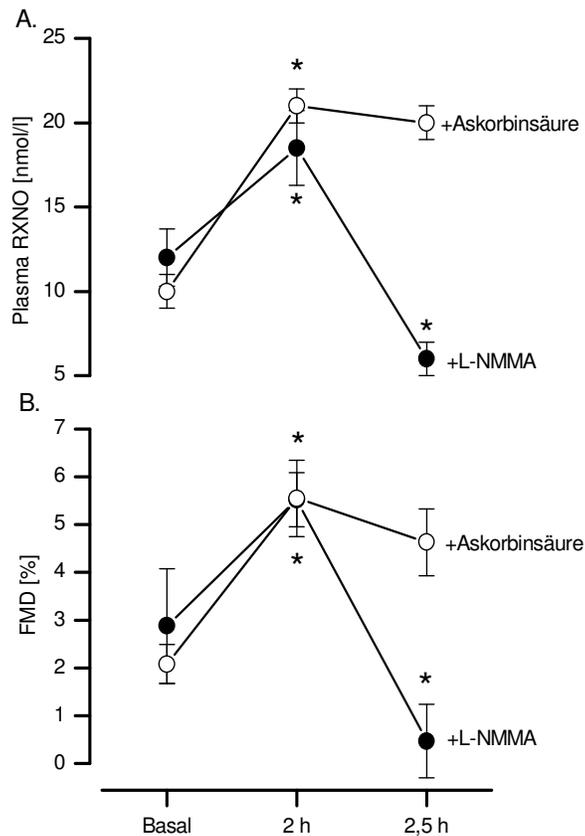


Abbildung 15. Flavanol-assoziierte Steigerung der RXNO-Konzentration im Plasma (A) und der FMD (B). Diese Steigerungen werden durch systemische Inhibition der NO-Synthase mittels L-NMMA i.v. über 30 min zurückgeführt (geschlossene Kreise). Durch i.v.-Gabe von Ascorbinsäure konnte keine weitere Steigerung erreicht werden (offene Kreise). (* $p < 0.05$ vs Basalwert; jeweils $n=4$; $MW \pm SE$)

b. Kein additiver Effekt durch Ascorbinsäure

Es ist bekannt, dass Ascorbinsäure bei Rauchern durch Steigerung von Tetrahydrobiopterin, das einen wichtigen Cofaktor der NOS darstellt, eine Verbesserung der Endothelfunktion bedingt.^{98;99} In dieser Versuchsserie wurde den Probanden daher nach Gabe des hFCDs additiv Ascorbinsäure verabreicht, um einen potentiellen synergistischen Effekt zu untersuchen. Die FMD und die RXNO-Konzentration im Plasma stiegen nach Gabe des hFCDs signifikant an (FMD: $2,1 \pm 0,4\%$ auf $5,6 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$ und RXNO: 10 ± 1 nmol/l auf 21 ± 1 nmol/l, $p \leq 0,001$). Nach zusätzlicher Infusion von Ascorbinsäure konnte kein additiver Effekt beobachtet werden (FMD: $4,6 \pm 0,7\%$ und RXNO: 20 ± 1 nmol/l). (Abb. 15) Dies deutet darauf hin, dass Kakaoflavanole und Ascorbinsäure über einen ähnlichen antioxidativen Mechanismus wirken. Die übrigen bestimmten angiologischen, hämodynamischen und biochemischen Parameter zeigten weder nach der Gabe des hFCDs noch nach der Infusion von Ascorbinsäure signifikante Veränderungen.

V. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind: Flavanole in Kakao führen bei Rauchern zu einer reversiblen und dosisabhängigen Steigerung der Endothelfunktion gemessen als FMD sowie zu einem Anstieg des RXNOs im Plasma. Die Höhe des Effekts ist positiv mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten am Vortag der Untersuchungen und mit dem Anstieg von Flavanolen und Flavanolmetaboliten im Plasma korreliert. Weiterhin sind die Effekte durch L-NMMA, einen kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase rückführbar. Durch zusätzliche Gabe von Ascorbinsäure lassen sich die Effekte nicht weiter steigern.

Im Folgenden soll die Bestimmung der Endothelfunktion mittels FMD und die biochemischen Analyseverfahren diskutiert werden. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der Studie im Kontext der gegenwärtigen Literatur erörtert. Wichtige Schlussfolgerungen werden unter klinischer Bedeutung und Ausblick zusammengefasst.

1. *Methodenkritik*

Bestimmung der Endothelfunktion als FMD

Bei den meisten Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung einer Endothelfunktion wird die dilatatorische Antwort von Leitungs- und Widerstandsarterien auf physikalische Stimuli oder vasoaktive Substanzen untersucht, welche an Endothelzellen zu einer mehr oder weniger spezifischen Steigerung der NO-Ausschüttung führen.^{100;101} Die pharmakologische Stimulation der NO-Synthase, zum Beispiel durch Azetylcholin oder Bradykinin, wird über endotheliale Membranrezeptoren und eine intrazelluläre G-Protein vermittelte Signalkaskade vermittelt, welche eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. In Abhängigkeit von Calmodulin führt dies zu einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase.^{102;103} Untersuchungsprotokolle, die eine pharmakologische Stimulation der endothelialen NO-Bildung voraussetzen, sind nur begrenzt routinemäßig einsetzbar, da die entsprechenden vasoaktiven Substanzen intraarteriell appliziert werden. Physikalische

Stimuli wie eine Änderung der Schubspannung führen über Konformitätsänderungen des endothelialen Zytoskeletts zu einer Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche eine Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität verursacht. So erreicht die eNOS schon bei subphysiologischen intrazellulären Kalziumkonzentrationen eine maximale Aktivität.¹⁰⁴

Die Bestimmung der FMD stellt seit Jahren ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion dar. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren³⁵ und deren Anzahl¹⁰⁵ mit einer Reduktion der FMD einhergehen: Hypercholesterinämie¹⁰⁵, Hypertonie, Diabetes mellitus^{106;107}, Zigarettenrauchen⁸⁹, höheres Lebensalter¹⁰⁸, männliches Geschlecht^{109;110}, positive Familienanamnese^{105;111} und bekannte koronare Herzkrankheit^{112;113}.

Neben den kardiovaskulären Risikofaktoren sind weitere biologische Einflussfaktoren der Vasomotion bekannt, die die Höhe der FMD beeinflussen können. So besteht eine negative Korrelation zwischen dem Ruhediameter der Arteria brachialis und der FMD.^{112;114} Weiterhin ist eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum am späten Nachmittag¹¹⁵ und eine Abhängigkeit von der Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone im Menstruationszyklus¹⁰⁹ bekannt. Auch die Nahrungsaufnahme kann die FMD beeinflussen, so kommt es bei akuter Hyperglykämie¹⁰⁷ und nach fettreicher Nahrung¹¹⁶ zu einer signifikanten Reduktion. Akuter psychischer Stress¹¹⁷ und akutes Zigarettenrauchen¹¹⁸ führen ebenfalls zu einer akuten Verminderung der FMD. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die endothelabhängige Dilatation möglichst konstant zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zur gleichen Tageszeit zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens an nüchternen Probanden nach 12-stündiger Nikotinkarenz begonnen. Die verwendeten Kakaotränke unterschieden sich lediglich in ihrem Flavanolgehalt, während alle anderen Inhaltsstoffe angepasst waren. Alle Untersuchungen erfolgten in einem vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 10-minütigen Ruhephase. Die Herzfrequenz und der Blutdruck, als Zeichen einer möglichen

sympathoadrenergen Stimulation, unterschieden sich vor und nach der Untersuchung nicht signifikant.

Neben den biologischen Einflussfaktoren auf die endothelabhängigen Dilatation kommen folgende Faktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht: (1.) die Größe des ischämischen Gebietes, (2.) die Ischämiezeit, (3.) die der Diametermessung zugrunde gelegten Eckpunkte, (4.) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie und (5.) innerhalb des Herzzyklus. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Blutdruckmanschette zur Erzeugung der Ischämie distal der Ellenbeuge angelegt, die Ischämiezeit betrug 5 Minuten und die FMD wurde 60 Sekunden nach Lösung der Stauung gemessen. Das verwendete Untersuchungsprotokoll entsprach somit den in den aktuellen Leitlinien¹¹⁹ empfohlenen Standards.

Drei Variablen repräsentieren die Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität von Ultraschalluntersuchungen: (1.) die technische Ausrüstung, (2.) der Untersucher, (3.) die Auswertung. (1.) Als technische Voraussetzung für nicht invasive Untersuchungen der Endothelfunktion galten zum Zeitpunkt der Untersuchungen lineare Schallköpfe mit Ultraschallfrequenzen von 15 MHz und einer axialen Auflösung von 0,1 mm als Standard.¹²⁰ (2.) Die Diameteränderungen der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Dilatation einer Arterie mit einem Ruhediameter von 3,8 mm liegen im Bereich von 0,1-0,6 mm (2,7%-16,7%). Es konnte gezeigt werden, dass Diameteränderungen von 0,1-0,2 mm korrekt bestimmt werden können. Unterschiede von 0,2 mm wurden zu 67% und Unterschiede von 0,1 mm zu 52% korrekt gemessen.¹²¹ (3.) Neben der Genauigkeit des Ultraschallgerätes und der Untersuchung selbst, hängt die Variabilität der Bestimmung von peripheren Gefäßdiametern weiterhin von der Art der Bilddatenanalyse ab. In den meisten publizierten Studien^{89;105;122;123;123} ist der Variationskoeffizient für die Messung der endothelabhängigen Dilatation zwischen 1 und 3% für die Intra- und Interobservervariabilität angegeben. In dieser Studie wurde ein in der eigenen Arbeitsgruppe entwickeltes PC-assistiertes Analysesystem

zur Diametervermessung angewandt. Sowohl die Intra- als auch die Inter-Observer-Differenzen konnten mit diesem Verfahren auf durchschnittlich 0,8% reduziert werden.¹²⁴

Die in dieser Studie ermittelten FMD-Werte stehen im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Werten^{89;105;125;126}.

Chemilumineszenzdetektion von RXNO und Nitrit im Plasma

Vor dem Hintergrund, dass eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion mit einer Einschränkung der endothelialen NO-Synthese bzw. der Bioverfügbarkeit von NO einhergeht und somit die Entwicklung einer Arteriosklerose begünstigen kann, wurden Metabolite des NO-Stoffwechselweges quantifiziert. Es wurden sowohl die direkten oxidativen NO-Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids, das Nitrit und das Nitrat, als auch das gebundene NO (RXNO) als potentielle Speicherform von bioaktivem NO quantifiziert.

Im menschlichen Plasma wird NO primär nahezu vollständig zu Nitrit umgesetzt. In Gegenwart von Erythrozyten reagiert Nitrit mit einer Halbwertszeit von 110 s weiter zu Nitrat.^{127;128} Durch die spezielle Probenaufarbeitung wurde versucht, diesen Abbau zu verlangsamen und weiterhin Nitrosierungs- und Transnitrosierungsreaktionen zu verhindern, um sowohl in Bezug auf die Nitrit- als auch auf die Konzentration des gebundenen NOs im Plasma Verfälschungen zu vermeiden. So wurden die venösen Blutproben direkt in eine 4°C kalte N-Ethylmaleimide und EDTA-Lösung überführt. Da N-Ethylmaleimide Sulfhydrylgruppen der Thiole alkyliert, stehen diese nicht mehr für die Bindung von NO zur Verfügung. Dadurch werden sowohl artifizielle Nitrosierungsreaktionen als auch Transnitrosierungsreaktionen und damit der Abbau von gebundenem NO verhindert. Außerdem wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme durch Zentrifugation von den zellulären Bestandteilen, insbesondere den Erythrozyten, befreit. Ein Teil des klaren Überstandes wurde mit Sulfanilamid versetzt, welches mit Nitrit ein sehr stabiles Diazoniumsalz bildet, das durch die Reaktionslösung nicht reduziert wird. Somit wird lediglich

das RXNO gemessen. Die Aufarbeitungszeit von der Blutentnahme bis zur Analyse betrug lediglich 30 min. Die Bestimmung des Nitrits und des gebundenen NOs im Plasma erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenzdetektion (CLD).

Die Angaben zur Konzentration des gebundenen NOs im Plasma weichen in der Literatur erheblich voneinander ab, das Spektrum reicht von $7,2 \pm 1,1$ nmol/l¹²⁹ bis zu $9,2 \pm 1,6$ μ mol/l.¹³⁰ Diese Diskrepanz mag in den verschiedenen analytischen Verfahren begründet liegen. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bei gesunden Probanden eine plasmatische Nitrosothiolkonzentration von 40 ± 7 nmol/l ermittelt werden.¹⁸ In dieser Studie wurde bei Rauchern eine plasmatische RXNO-Konzentration 20 ± 3 nmol/l gemessen, die nach oraler Gabe des flavanolreichen Kakaogetränks auf 29 ± 5 nmol/l gesteigert werden konnte (Serie 3). Verglichen mit anderen, in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von gebundenen NO¹³¹⁻¹³⁴, zeichnet sich die angewandte Chemiluminiszenz-Methode durch eine hohe Sensitivität und Spezifität für RXNO aus.¹³⁵

Quantifizierung von Nitrat im Plasma mittels Fluss-Injektions-Analyse

Nitrat stellt das stabile Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechsels dar. Die Nitratbestimmung erfolgte in dieser Studie mit Hilfe der Fluss-Injektions-Analyse. Zunächst wurde das in den Plasmaproben vorhandene Nitrat mit Hilfe der Nitratreduktase zu Nitrit reduziert, dieses wurde anschließend mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt.

Die Linearität der angewandten Methode zur Nitratbestimmung liegt bei 0-30 μ M bei einer minimalen Auflösung von 100 nM in wässrigen und plasmatischen Proben. Die Nitratwiederfindungsrate liegt bei $100 \pm 9\%$.

In der Literatur sind für die Nitratkonzentration im Plasma Werte im mikromolaren Bereich beschrieben (19-60 μ mol/l). Die in dieser Studie bestimmten Nitratkonzentrationen sind mit diesen Werten im Einklang.

2. Abhängigkeit des Flavanoleffektes von der verabreichten Kakaomenge und dem Flavanolmetabolismus

In der vorliegenden Studie konnte bei einer Dosierung von 100 ml des flavanolreichen Kakaotranks (hFCD) eine maximale Steigerung der FMD und der RXNO-Konzentration im Plasma erzielt werden. Bei einer höheren Dosierung des hFCDs (200 bzw. 300 ml) kam es eher zu einer Abnahme des beobachteten Effektes. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass ein größeres Volumen des hFCDs mit einer höheren kalorischen Belastung einhergeht, die wiederum mit einem gesteigerten postprandialen oxidativen Stress assoziiert ist.¹³⁶ Die positive Wirkung der Kakaoflavane auf die Gefäßfunktion könnte somit in Teilen durch höhere Glukose- und Triglyzeridspiegel aufgehoben werden. So kommt es zum Beispiel bei einer akuten Hyperglykämie oder Hypertriglyzeridämie nach fettreicher Kost zu einem signifikanten Abfall der FMD.^{107;116}

Zwei Stunden nach Aufnahme des flavanolreichen Kakaotranks zeigte sich eine maximale Steigerung der FMD. Resorptionsstudien von Flavanol aus Schokolade haben ebenfalls maximale Plasmaspiegel nach 2-3 h gezeigt, jedoch nicht zwischen einzelnen Metaboliten unterschieden.¹³⁷ Flavane sind Substrat eines ausgedehnten Phase I- und II-Metabolismus in Darm und Leber.^{75;76;138} Außerdem unterliegen sie einer Anzahl von Biotransformationen durch Enzyme der Darmmikroflora.¹³⁹ Somit existieren im Plasma sehr viele unterschiedliche sowohl primäre als auch sekundäre Flavanolmetabolite, die sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften teils deutlich von den ursprünglich aufgenommenen Flavanol unterscheiden. Es sind zwar schon einige Studien über den allgemeinen Flavanolmetabolismus nach Aufnahme bestimmter Früchte, Wein, Tee und Kakaoprodukten veröffentlicht, Informationen über Flavonoidmetabolite im Zusammenhang mit bestimmten pathologiebezogenen diätischen Interventionen sind bislang jedoch rar. Flavanolmetabolite liegen im Plasma meist als an Glucuronat oder Sulfat gebundene Konjugate vor. Bei den meisten Analyseverfahren erfolgt zunächst die Aufspaltung dieser Verbindungen mit Hilfe

einer Enzymhydrolyse zu Aglyconen und O-methylierten Flavanolderivaten. Auf diese Weise lässt sich zwar die Resorption der Flavanole und ihre Anwesenheit im Plasma im allgemeinen nachweisen, gleichzeitig gehen jedoch auch wichtige Informationen über die Identität bestimmter Flavanolmetabolite verloren. Ziel dieser Studie war es daher nicht nur, die Absorption der verabreichten Flavanole zu beweisen, sondern auch die Konzentrationen der wichtigsten im Blut zirkulierenden Flavanolmetabolite zu bestimmen. Da der Anstieg des RXNOs im Plasma signifikant mit einem Anstieg der ausgewählten Flavanolmetabolite im Plasma korrelierte, lässt sich vermuten, dass die beobachteten Effekte tatsächlich durch die Flavanole verursacht wurden. Nach Aufnahme des flavanolreichen Kakaotrinks konnte vor allem 3'-O-Methyl-Epicatechin- β -D-Glucuronid als einer der Hauptmetabolite im Plasma identifiziert werden, wobei Plasmakonzentrationen von bis zu 287 nmol/l gemessen werden konnten. Die Existenz weiterer Hauptmetabolite im Plasma, die unter Umständen für die beobachteten Effekte mitverantwortlich sind, ist natürlich nicht auszuschließen.

3. Einfluss von flavanolreichem Kakao auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern

Studien belegen die Existenz eines zirkulierenden NO-Pools (RXNO), so dass NO in bioaktiver Form, an verschiedene Plasmakomponenten gebunden, transportiert und systemisch wirksam werden kann.¹⁸⁻²⁰ Das gebundene NO besitzt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ähnliche vasoprotektive Eigenschaften wie Stickstoffmonoxid¹⁴⁰, so bewirkt es zum Beispiel eine Vasodilatation^{18;19}, eine Inhibition der Plättchenaggregation¹⁴¹ sowie eine Verminderung der Carotisembolisation²⁶. Cannon et al. konnten zeigen, dass inhaliertes NO während einer lokalen Inhibition der NO-Synthese eine Verminderung des Gefäßwiderstandes und eine Erhöhung des Blutflusses bewirkt.²¹ Studienergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die nach intraarterieller und intravenöser Infusion von Stickstoffmonoxid zu beobachtende Vasodilatation durch das gebundene NO im

Plasma vermittelt ist.¹⁹

Die FMD ist NO-abhängig und dient der Begutachtung der endothelialen Funktion.^{89;142} Es konnte gezeigt werden, dass die FMD der Arteria brachialis sehr gut mit der endothelialen Funktion anderer Leitungsarterien, inklusive der Koronararterien korreliert und ein guter Maßstab für die systemische NO-Synthese ist. Raucher zeigen eine verminderte endothelabhängige Dilatation, nach Gabe von Glyzeroltrinitrat kommt es jedoch zu einer normalen Vasodilatation.^{89;143} Dies spricht dafür, dass die Verminderung der endothelabhängigen Dilatation bei Rauchern nicht in einer allgemeinen Unfähigkeit der Arterien zur Relaxation begründet liegt, sondern vielmehr durch einen Mangel an endogen gebildetem Stickstoffmonoxid verursacht ist.

Auch die Basalwerte des RXNOs im Plasma waren bei Rauchern vermindert, verglichen mit den Werten, die unsere Arbeitsgruppe bei gesunden Nichtrauchern ermitteln konnte.¹⁸ Das legt den Schluss nahe, dass der bei Rauchern verminderte zirkulierende NO-Pool mit einer verminderten Endothelfunktion assoziiert ist und so unter Umständen zu der Entstehung einer chronischen Gefäßerkrankung beiträgt.

Wir konnten in dieser Studie erstmals zeigen, dass der Konsum eines flavanolreichen Kakaogetränks (hFCD) bei Rauchern nach mindestens zwölfstündiger Nikotinabstinenz einen dosisabhängigen Anstieg des RXNOs im Plasma und eine Steigerung der FMD bewirkt. Nach Verabreichung des flavanolarmen Kakaogetränks (lFCD) konnten keine signifikanten Änderungen der beiden Parameter beobachtet werden, was nahe legt, dass die beobachteten Effekte nach Gabe des hFCDs tatsächlich auf den hohen Flavanolgehalt zurückzuführen sind. Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Einklang mit bisherigen epidemiologischen und Interventionsstudien beim Menschen, die den positiven Einfluss von Kakaoflavanolen auf die kardiovaskuläre Gesundheit bestätigen.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Es ist zu vermuten, dass der vergrößerte zirkulierende NO-Pool einen Ausgleich lokaler NO-Defizite bewirkt, so dass es zum Beispiel zu einer Verminderung der Plättchen-Aggregation an arteriosklerotische

Plaques, zu einer Plaque-Stabilisation durch eine Inhibition der LDL-Oxidation und zu einer Dilatation stenosierter Leitungsgefäße kommt. Interessanterweise besteht eine positive Korrelation zwischen der Größe des RXNO- bzw. FMD-Anstiegs und der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten, eine Korrelation der beiden oben genannten Parameter mit der Anzahl der pack years besteht nicht. Diese Tatsache legt nahe, dass ein Teil des zu beobachtenden Effektes auf eine Umkehrung der Folgen des akuten Zigarettenrauchens zurückzuführen ist.

4. Potentielle Wirkungsmechanismen von Flavanolen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch das flavanolreiche Kakaogetränk (hFCD) verursachte Steigerung der FMD durch intravenöse Infusion von L-NMMA, einen kompetitiven Antagonisten der NO-Synthase, rückführbar ist. Auch die RXNO-Konzentration im Plasma fiel nach L-NMMA-Infusion signifikant ab. Durch Ascorbinsäure konnte nach Gabe des hFCDs kein additiver Effekt bezogen auf die FMD und die RXNO-Konzentration im Plasma erzielt werden.

Die Aufhebung der Kakaoeffekte nach Inhibition der NO-Synthase durch L-NMMA deutet darauf hin, dass flavanolreiche Kost unter anderem eine Steigerung der NO-Synthase-Aktivität bewirkt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der bisherigen Literatur. So konnten auch Fisher et al. zeigen, dass flavanolreicher Kakao bei gesunden Menschen eine NO-vermittelte Vasodilatation der Fingerzirkulation bewirkt.¹⁴⁷ Unter Umständen verfügen Flavanole über antioxidative Eigenschaften ähnlich denen von Vitamin C, so dass vorhandenes NO entweder vor einer Oxidation geschützt wird oder die NO-Synthase gesteigert wird. Welcher dieser beiden potentiellen Mechanismen für die beobachteten Effekte in dieser Studie verantwortlich ist oder ob vielmehr eine Kombination beider vorliegt, lässt sich aufgrund der aktuellen Datenlage nicht genau klären.

Es ist bekannt, dass die bei Rauchern verminderte endothelabhängige Dilatation durch

Infusion von Ascorbinsäure akut auf die Werte gesunder Nichtraucher angehoben werden kann, wobei ähnliche Dosen wie auch in unserer Studie verwendet wurden.¹⁴⁸ Sowohl durch den Zigarettenrauch selber als auch durch eine sekundär vermehrte endogene Bildung kommt es zu einem Anstieg der freien Radikale im Körper von Rauchern.⁶¹ Studien belegen, dass freie Radikale über eine Interaktion mit Tetrahydrobiopterin (BH₄), einen essentiellen Kofaktor der NO-Synthase, die NO-Synthase entkoppeln, wodurch es zu einer verminderten NO- und zu einer gesteigerten Superoxidanionen-Produktion kommt.⁵⁹ Diese Effekte tragen zu der Entstehung einer chronische endothelialen Dysfunktion bei Rauchern bei.⁹⁸ *In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass Ascorbinsäure über eine Stabilisierung von Tetrahydrobiopterin eine Steigerung der NO-Synthase und eine Verminderung der Superoxidanionen-Produktion bewirkt.^{98;149} Wir konnten zeigen, dass durch hFCD eine Verbesserung der FMD, begleitet von einer Steigerung des RXNOs im Plasma, erzielt werden kann. Durch die Infusion einer hohen Dosis Ascorbinsäure konnte kein additiver Effekt bezüglich der beiden Parameter erzielt werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Flavane unter Umständen über einen ähnlichen antioxidativen Mechanismus wie Ascorbinsäure wirken und die NO-Synthase über eine Stabilisierung des Tetrahydrobiopterin steigern. Dies steht im Einklang mit Studien, die eine erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma nach Aufnahme von flavanolreicher Nahrung oder Ascorbinsäure postulieren.^{148;150}

5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Die derzeitige Therapie der Arteriosklerose basiert hauptsächlich auf einer Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren. Bei einigen Therapieansätzen hat sich gezeigt, dass sie neben ihrer ursprünglich bekannten Wirkung auch direkten Einfluss auf die Endotheldysfunktion nehmen, indem sie die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen. So konnte beispielsweise ein Teil der schon seit längerem bekannten prognostisch günstigen Eigenschaften von ACE- und CSE-Hemmern auf eine gesteigerte Bioverfügbarkeit von NO zurückgeführt werden.⁶⁻⁸ In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Endotheldysfunktion und der Prognose einer koronaren Herzkrankheit besteht.^{151;152} Somit ist es verständlich, dass an einer spezifischen therapeutischen Beeinflussung der Endotheldysfunktion ein großes klinisches Interesse besteht. In der vorliegenden Studie konnte nun gezeigt werden, dass die einmalige Gabe eines flavanolreichen Kakaogetränks spezifisch und reversibel die Endothelfunktion bei Rauchern verbessern und eine Steigerung zirkulierender NO-Speicherformen bewirken kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen epidemiologischen und Interventionsstudien beim Menschen, die einen positiven Einfluss von Kakaoflavanolen auf die kardiovaskuläre Gesundheit belegen.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ In prospektiven Langzeitstudien wird nun geklärt werden müssen, ob durch die repetitive Gabe von Flavanolen in Kakao eine anhaltende Steigerung der Endothelfunktion erreicht werden kann und ob diese mit einer Verbesserung der Prognose einhergeht. Ebenfalls unklar ist bislang der genaue Wirkungsmechanismus, über den Flavanole in Kakao ihre vasoprotektiven Effekte entfalten und auch bezüglich des Metabolismus der Flavanole im menschlichen Körper sowie der spezifischen Bioaktivität einzelner Flavanolmetabolite ergeben sich noch viele offene Fragen.

VI. Zusammenfassung

Hintergrund: Epidemiologische Studien zeigen, dass eine gesteigerte Aufnahme von Flavonoiden mit einem reduzierten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist. Des Weiteren konnten Flavonoiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vasoprotektive und antiatherogene Effekte nachgewiesen werden. **Ziel** dieser Studie war es, den Effekt eines flavanolreichen Kakaotranks auf die flussvermittelte Dilatation der Arteria brachialis (FMD) und das gebundene NO im Plasma (RXNO) bei Rauchern zu beurteilen. **Methoden:** In einer randomisierten Doppelblind-Studie im Crossover-Design (n=11) wurde der Effekt eines oral verabreichten, flavanolreichen Kakaotranks (hFCD: 176-185 mg/100 ml Flavanolgehalt) und eines Kakaotranks mit niedrigem Flavanolgehalt (lFCD: <11 mg/100 ml Flavanolgehalt) auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern untersucht. In weiteren Versuchsserien wurden vier verschiedene Dosen des hFCDs (88-555 mg Flavanolgehalt) verabreicht sowie zusätzlich zur oralen Gabe des hFCDs Ascorbinsäure bzw. L-NMMA, ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase, intravenös infundiert (jeweils n=4). Als Maßstab für die Endotheldysfunktion wurden in allen o. g. Versuchsserien die Konzentration des RXNOs im Plasma, gemessen mittels Chemilumineszenzdetektion, und die FMD quantifiziert. In der Studie zur Dosisfindung wurden zusätzlich verschiedene Flavane sowie ausgewählte Flavanolmetabolite im Plasma bestimmt. **Ergebnisse:** Der hFCD führt zwei Stunden nach Ingestion zu einer reversiblen und dosisabhängigen Steigerung der FMD ($4,5 \pm 0,8\%$ auf $6,9 \pm 0,9\%$) sowie zu einem Anstieg des RXNOs im Plasma (21 ± 3 nmol/l auf 29 ± 5 nmol/l, je $p < 0,05$). Die Höhe des Effekts ist positiv mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten am Vortag der Untersuchungen und mit dem Anstieg von Flavanolmetaboliten im Plasma korreliert. Weiterhin sind die Effekte durch L-NMMA rückführbar. Durch zusätzliche Gabe von Ascorbinsäure lassen sich die Effekte nicht weiter steigern. **Zusammenfassung:** Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass flavanolreiche Nahrung eine Endotheldysfunktion akut verbessern kann. Langzeitstudien sind notwendig,

um zu untersuchen, ob kardiovaskuläre Ereignisse durch repetitive Flavanolaufnahme verhindert werden können.

VII. Literaturverzeichnis

1. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
2. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997;3:600-601.
3. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
4. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:295-314.
5. Celermajer DS. Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(2):325-333.
6. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry J-P, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of Endothelial function by Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Heart Failure; Role of Nitric Oxide, Prostanoids, Oxidant Stress, and Bradykinin. *Circulation.* 2000;102:351-356.
7. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
8. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation.* 1998;98:211-216.
9. De Caterina R, Libby P, Peng HB, 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;96:60-68.
10. He P, Zeng M, Curry FE. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell [Ca²⁺]_i. *Am J Physiol.* 1997;273:H747-H755.
11. Jung U, Ramos CL, Bullard DC, Ley K. Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. *Am J Physiol.* 1998;274:H1785-H1791.
12. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3:2007-2018.
13. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation.* 1998;97:1274-1281.
14. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion; Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist.* 1999;40:1300-1307.
15. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide

from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.

16. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Bohme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1988;154:213-216.
17. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8757-8761.
18. 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;109:1241-1248.
19. 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;91:470-477.
20. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7674-7677.
21. Cannon RO, Schechter AN, Panza JA, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Shelhamer JH, Gladwin MT. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest*. 2001;108:279-287.
22. Stamler JS. S-Nitrosothiols and the Bioregulatory Actions of Nitrogen Oxides Through Reactions with Thiol Groups. In: Current Topics in Microbiology and Immunology. 1995.
23. Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11477-11482.
24. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7674-7677.
25. Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith RE, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*. 1994;344:1458-1460.
26. Kaposzta Z, Martin JF, Markus HS. Switching off embolization from symptomatic carotid plaque using S-nitrosoglutathione. *Circulation*. 2002;105:1480-1484.
27. Hallström S, Gasser H, Neumayer C, Fugl A, Nanobashvili J, Jakubowski A, Huk I, Schlag G, Malinski T. S-Nitroso Human Serum Albumin Treatment Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Skeletal Muscle via Nitric Oxide Release. *Circulation*. 2002;105:3032-3038.
28. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1590-1596.
29. Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human

biology. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;32:423-429.

30. Stary HC, Bleakley Chandler A, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. *Circulation.* 1994;89:2462-2478.
31. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.
32. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326:242-250.
33. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med.* 1992;326:310-318.
34. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease -Six-Year Follow-up Experience- The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961;55:33-50.
35. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson PA, Reed J, Washington R, Smith SC. Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Guidance From Framingham. *Circulation.* 1998;97:1876-1887.
36. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
37. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991;91:31S-38S.
38. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.
39. Arteel GE, Schroeder P, Sies H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr.* 2000;130:2100S-2104S.
40. Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V. Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death and Differentiation.* 2001;8:515-527.
41. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukui T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001;103:1282-1288.
42. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99:1141-1146.
43. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial

- dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-1847.
44. Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, Tsao PS, Cooke JP. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*. 1999;99:1236-1241.
 45. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*. 1997;337:408-416.
 46. Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *Br Med J*. 1976;2:1525-1536.
 47. Doll R, Gray R, Hafner B, Peto R. Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors. *Br Med J*. 1980;280:967-971.
 48. Doll R, HILL AB. Lung cancer and other causes of death in relation to smoking; a second report on the mortality of British doctors. *Br Med J*. 1956;12:1071-1081.
 49. Hammond EC, Horn D. Landmark article March 15, 1958: Smoking and death rates--report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. By E. Cuyler Hammond and Daniel Horn. *JAMA*. 1984;251:2840-2853.
 50. Willett WC, Green A, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA, Rosner B, Monson RR, Stason W, Hennekens CH. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. *N Engl J Med*. 1987;317:1303-1309.
 51. Price JF, Mowbray PI, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J*. 1999;20:344-353.
 52. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ*. 1997;315:973-980.
 53. Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation*. 1991;83:1-12.
 54. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M. Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. *Am Heart J*. 2004;147:E5.
 55. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*. 2002;105:1155-1157.
 56. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J*. 2003;79:195-199.
 57. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-571.
 58. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431-1438.

59. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2003;107:2342-2347.
60. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686:12-27.
61. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1731-1737.
62. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*. 2002;106:640-642.
63. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol*. 2002;89:1117-1119.
64. Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1994;160:154-162.
65. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation*. 1996;93:1346-1353.
66. Rival J, Riddle JM, Stein PD. Effects of chronic smoking on platelet function. *Thromb Res*. 1987;45:75-85.
67. Fusegawa Y, Goto S, Handa S, Kawada T, Ando Y. Platelet spontaneous aggregation in platelet-rich plasma is increased in habitual smokers. *Thromb Res*. 1999;93:271-278.
68. 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;134:1106-1114.
69. 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;342:1007-1011.
70. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaanen M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:560-568.
71. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*. 1976;24:117-191.
72. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr*. 2000;130:2086S-2092S.
73. Duffy SJ, Keaney JF, Jr., 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;104:151-156.
74. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *American Society for Nutritional Sciences*. 2000;130:2073S-2085S.
 75. 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;33:635-641.
 76. 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. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:798-804.
 77. Mao T, Van De WJ, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr*. 2000;130:2093S-2099S.
 78. 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.
 79. Freedman JE, Parker III C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select Flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001;103:2792-2798.
 80. 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-2126S.
 81. Arteel GE, Schroeder P, Sies H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr*. 2000;130:2100S-2104S.
 82. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem*. 2001;382:1687-1696.
 83. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart 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;106:1614-1617.
 84. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr*. 2000;130:2105S-2108S.
 85. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr*. 2001;131:27-32.
 86. Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002;135:910-916.
 87. Duffy SJ, Keaney jr JF, Holbrook M, Gokce N, Swerdlow PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:151-156.

88. Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur Heart J.* 2000;21:74-78.
89. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.* 1993;88:2149-2155.
90. Mancia G, Grassi G. Joint National Committee VII and European Society of Hypertension/European Society of Cardiology guidelines for evaluating and treating hypertension: a two-way road? *J Am Soc Nephrol.* 2005;16 Suppl 1:S74-S77.
91. Whitworth JA, Chalmers J. World health organisation-international society of hypertension (WHO/ISH) hypertension guidelines. *Clin Exp Hypertens.* 2004;26:747-752.
92. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications. WHO/NCD/NCS/99.2. 1999. WHO.
93. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26 Suppl 1:S5-20.
94. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-3421.
95. 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.
96. Abd El Mohsen MM, Kuhnle G, Rechner AR. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1683-1702.
97. Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature.* 2003;426:787-788.
98. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res.* 2000;86:E36-E41.
99. Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:8254-8260.
100. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2000;32:293-304.
101. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001;104:191-196.
102. Busse R, Fleming A, Heckler M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J.* 1993;14:12-19.

103. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:682-685.
104. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601-605.
105. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24 (No. 6):1468-1474.
106. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*. 2002;105:576-582.
107. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:146-154.
108. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. The Effects of Age and Gender on Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasoactivity Are Stimulus-Dependent. *Clin Cardiol*. 2000;18:471-476.
109. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995;92:3431-3435.
110. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-476.
111. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RMA, Deanfield JE. Endothelium-Dependent Is Impaired in Young Healthy Subjects With a Family History of Premature Coronary Disease. *Circulation*. 1997;96:3378-3383.
112. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-1115.
113. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129:111-118.
114. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth Muscle Dysfunction Occurs Independently of Impaired Endothelium-Dependent Dilatation in Adults at Risk of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:123-127.
115. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, Kurita A, Ohsuzu F. Morning Attenuation of Endothelium-Dependent, Flow-Mediated Dilatation in Healthy Young Men: Possible Connection to Morning Peak of Cardiac Events? *Clin Cardiol*. 1999;22:417-421.
116. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial

- function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1997;79:350-354.
117. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2000;102:2473-2478.
 118. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of Acute Cigarette Smoking on Endothelium-Dependent Brachial Artery Dilatation in Healthy Individuals. *Am J Cardiol.* 1997;79:529-531.
 119. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
 120. Celermajer DS. Testing Endothelial Function Using Ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
 121. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M, Dietz K, Haring HU. [Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound]. *Ultraschall Med.* 2001;22:231-235.
 122. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical Aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995.
 123. Enderle MD, Balletshofer BM, Schmülling RM, Häring HU, Pfohl M. Early detection of atherosclerosis in type 2 diabetic patients using high resolution ultrasound. *Ultraschall Med.* 1998;19:16-21.
 124. Preik M, Lauer T, Heiss C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med.* 2000;21:195-198.
 125. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passiv Smoking And Impaired Endothelium-Dependent Arterial Dilatation In Healthy Young Adults. *N Engl J Med.* 1996;334:150-154.
 126. Schröder S, Enderle MD, Meisner C, Baumbach A, Herdeg C, Oberhoff M, Ossen R, Pfohl M, Karsch KR. Ultraschallmessung der Endothelfunktion der Arteria brachialis bei Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999;124:886-890.
 127. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.
 128. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects. Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
 129. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-Nitroso and S-

- Nitroso Proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1590-1596.
130. Tyurin VA, Liu S-X, Tyurina YY, Sussman NB, Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Kagan VE. Elevated levels of s-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res.* 2001;88:1210-1215.
 131. Samouilov A, Zweier JL. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal Biochem.* 1998;258:322-330.
 132. Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, MacDonald T, Gaston B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252:535-540.
 133. Ewing JF, Janero DR. Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium(III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:621-628.
 134. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain D, Kelm M. Simultaneous Determination of N-oxides, S-,N- and O-Nitroso- and Nitrosyl-Heme Compounds in Biological Tissues and Fluids: A Critical Reevaluation of the Assay Techniques for Quantitation of S-Nitrosothiols. *J Biol Chem.* 2002.
 135. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain 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;16:1775-1785.
 136. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005;135:969-972.
 137. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:22-26.
 138. 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. *Antioxid Redox Signal.* 2001;3:1023-1039.
 139. Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ, Ho CT, Yang CS. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:1042-1050.
 140. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Di Simplicio P. Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res.* 2001;89:E47.
 141. de Belder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S, Vallance PJ. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res.* 1994;28:691-694.
 142. Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-1319.
 143. Yugar-Toledo JC, Tanus-Santos JE, Sabha M, Sousa MG, Cittadino M, Tacito LH, Moreno H, Jr. Uncontrolled hypertension, uncompensated type II diabetes, and smoking have different patterns of vascular dysfunction. *Chest.* 2004;125:823-830.

144. Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA*. 2003;290:1029-1030.
145. Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets*. 2003;14:325-327.
146. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr*. 2004;23:197-204.
147. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*. 2003;21:2281-2286.
148. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H. Endothelium-dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: effect of vitamin C. *Am J Physiol*. 1997;273:H1644-H1650.
149. Heller R, Unbehauen A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*. 2001;276:40-47.
150. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr*. 2000;130:2109S-2114S.
151. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes jr DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
152. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.

VIII. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Geduld und das Vertrauen, das er in mich und meine Arbeit gesetzt hat.

Herrn Dr. med. C. Heiß möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Er stand mir in steter Hilfsbereitschaft beiseite, hat mich immer wieder von neuem motiviert und mir unendlich viel beigebracht.

Einen besonderen Dank für die fachkundige und technische Unterstützung möchte ich an dieser Stelle auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts aussprechen, darunter insbesondere Frau Dr. rer. nat. P. Kleinbongard und Herrn Dr. med. A. Dejam, die mir bei meinen Arbeiten im Labor stets zur Seite standen und mir jede Frage, derer es nicht wenige gab, bereitwillig beantwortet haben.

Herrn Dr. med. J. Balzer möchte ich für seine große Hilfe bei der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit, für seine wertvolle und konstruktive Kritik danken.

Herrn Dr. H. Schroeter danke ich für die Bestimmung der Flavanolkonzentrationen im Plasma.

Herrn Dr. R. Willers danke ich für die Erstellung der Randomisierungsliste.

Besonderer Dank gilt natürlich auch meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit auf jede nur denkbare Art und Weise unterstützt haben.

IX. Lebenslauf

Sandra Perré

St. Andreasstr. 9

41469 Neuss

Deutschland

29.05.1979 geboren in Neuss

Schulbildung

1985-1989 Sankt Andreas-Grundschule, Neuss-Norf

1989-1997 Marienberg Gymnasium, Neuss

1997 Abitur

Hochschulbildung

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

03/2001 Ärztliche Vorprüfung

03/2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

09/2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10/2004-10/2005 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf

11/2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Abstract

Einfluss von flavanolreichem Kakao auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern

Hintergrund: Epidemiologische Studien zeigen, dass eine gesteigerte Aufnahme von Flavonoiden mit einem reduzierten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist. Des Weiteren konnten Flavonoiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vasoprotektive und antiatherogene Effekte nachgewiesen werden. **Ziel** dieser Studie war es, den Effekt eines flavanolreichen Kakaotranks auf die flussvermittelte Dilatation der Arteria brachialis (FMD) und das gebundene NO im Plasma (RXNO) bei Rauchern zu beurteilen. **Methoden:** In einer randomisierten Doppelblind-Studie im Crossover-Design (n=11) wurde der Effekt eines oral verabreichten, flavanolreichen Kakaotranks (hFCD: 176-185 mg/100 ml Flavanolgehalt) und eines Kakaotranks mit niedrigem Flavanolgehalt (lFCD: <11 mg/100 ml Flavanolgehalt) auf die Endotheldysfunktion bei Rauchern untersucht. In weiteren Versuchsserien wurden vier verschiedene Dosen des hFCDs (88-555 mg Flavanolgehalt) verabreicht sowie zusätzlich zur oralen Gabe des hFCDs Ascorbinsäure bzw. L-NMMA, ein kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase, intravenös infundiert (jeweils n=4). Als Maßstab für die Endotheldysfunktion wurden in allen o. g. Versuchsserien die Konzentration des RXNOs im Plasma, gemessen mittels Chemilumineszenzdetektion, und die FMD quantifiziert. In der Studie zur Dosisfindung wurden zusätzlich verschiedene Flavane sowie ausgewählte Flavanolmetabolite im Plasma bestimmt. **Ergebnisse:** Der hFCD führt zwei Stunden nach Ingestion zu einer reversiblen und dosisabhängigen Steigerung der FMD ($4,5 \pm 0,8\%$ auf $6,9 \pm 0,9\%$) sowie zu einem Anstieg des RXNOs im Plasma (21 ± 3 nmol/l auf 29 ± 5 nmol/l, je $p < 0,05$). Die Höhe des Effekts ist positiv mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten am Vortag der Untersuchungen und mit dem Anstieg von Flavanolmetaboliten im Plasma korreliert. Weiterhin sind die Effekte durch L-NMMA rückführbar. Durch zusätzliche Gabe von Ascorbinsäure lassen sich die Effekte nicht weiter steigern. **Zusammenfassung:** Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass flavanolreiche Nahrung eine Endotheldysfunktion akut verbessern kann. Langzeitstudien sind notwendig, um zu untersuchen, ob kardiovaskuläre Ereignisse durch repetitive Flavanolaufnahme verhindert werden können.