

Aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Die Effekte einer flavanolreichen diätetischen Intervention
auf die vaskuläre Funktion
bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sarah Adamczyk
aus Berlin

2017

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Payam Akhyari

Den Patienten meiner Studie in Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit:

- C. Rammos, U. B. Hendgen-Cotta, J. Sobierajski, S. Adamczyk, G. R. Hetzel, W. Kleophas, F. Dellanna, M. Kelm, T. Rassaf,
Macrophage migration inhibitory factor is associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal disease,
International Journal of Cardiology, August 2013. 168(6): p. 5249-56

Zusammenfassung

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen beschleunigte, atherosklerotische Veränderungen der Gefäße auf. Daraus resultieren eine endotheliale Dysfunktion, erhöhter Blutdruck und Gefäßsteifigkeit. Ursächlich hierfür sind fortschreitende mikro- und makrovaskuläre Funktionsstörungen. Aus diesen Gründen weisen diese Patienten eine erhöhte Morbidität und Mortalität an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, den häufigsten Todesursachen in den westlichen Nationen, auf.

Die Ernährung stellt einen wichtigen modifizierbaren Faktor dar, welcher die kardiovaskuläre Gesundheit wesentlich beeinflusst. In diesem Zusammenhang haben Flavanole als pflanzliche Nahrungsbestandteile besondere Aufmerksamkeit erzielt. Erste interventionelle Arbeiten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnten zeigen, dass eine flavanolreiche Diät zu einer Verbesserung der Endothelfunktion und des Blutdrucks führt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte einer diätetischen Supplementierung von Flavanolen auf die beeinträchtigte Gefäßfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu untersuchen.

Dafür wurde eine placebokontrollierte, doppelblinde klinische Studie an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz durchgeführt, die aus zwei Teilen bestand. Den ersten Teil stellte die sogenannte Akutstudie dar, in der die Verträglichkeit der Prüfpräparate und deren kurzzeitigen Effekte auf die vaskuläre Funktion ermittelt wurden. Sie wurde mit 10 Patienten durchgeführt. Den zweiten Teil stellte die sogenannte Langzeitstudie dar, in der die Effekte einer chronischen Flavanoleinnahme untersucht wurden. 52 Patienten erhielten über 4 Wochen ein Getränk von 200 ml, welches entweder flavanolreich (kumulative Dosis/Tag 820 mg) oder frei von Flavanolen (0 mg) war. Ferner unterschieden sich die Testgetränke bezüglich Energiedichte, Makro- und Mikronährstoffen nicht. Am ersten und am letzten Tag der Studie wurden die Patienten vor der Dialyse untersucht. Die Gefäßfunktion wurde mittels flussmediierter Dilatation der A. brachialis (FMD) gemessen und die arterielle Steifigkeit mittels Pulswellengeschwindigkeit (PWV) dargestellt. Zudem wurde der Blutdruck gemessen und es wurden laborchemische Analysen durchgeführt. Innerhalb dieser Analysen wurde dem Zytokin *macrophage migration inhibitor factor* (MIF) besondere Aufmerksamkeit zuteil. Dieser zeigt sich bei Inflammation erhöht und nimmt eine zentrale Stellung in der Entstehung von Atherosklerose ein. Zudem stellen chronische inflammatorische Prozesse die Grundlage für die gesteigerten atherosklerotischen Gefäßveränderungen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz dar.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die MIF-Konzentration im Plasma erhöht ist und mit der endothelialen Funktion der A. brachialis und der arteriellen Gefäßsteifigkeit korreliert.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sowohl eine kurzzeitige als auch eine chronische diätetische Supplementierung von Flavanolen die vaskuläre Funktion bei terminaler Niereninsuffizienz verbessern kann. Zudem kann eine chronische diätetische Einnahme von Flavanolen den diastolischen Blutdruck und die Herzfrequenz beeinflussen.

Die Supplementierung mit Flavanolen stellt daher eine mögliche therapeutische Option dar, der vaskulären Dysfunktion entgegenzuwirken und damit den Gesundheitszustand bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu verbessern.

Abkürzungsverzeichnis

3ME5S	3-Methylepicatechin-5-sulfat
3ME7S	3-Methylepicatechin-7-sulfat
4ME5S	4-Methylepicatechin-5-sulfat
4ME7S	4- Methylepicatechin-7-sulfat
A.	Arteria
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AE	<i>adverse event</i>
AG	Antigen
AIx	<i>augmentation index</i>
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AP	<i>aortic pressures</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BNP	B-natriuretisches Peptid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHE	Cholinesterase
CK	Creatinin-Kinase
CK-MB	Creatinin-Kinase Muscle-Brain
CRP	C-reaktives Protein
DBP	<i>diastolic blood pressure</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
E3G	Epicatechin-3-glucuronid
E3S	Epicatechin-3-sulfat
E5S	Epicatechin-5-sulfat
ED	<i>ejection duration</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESRD	<i>end stage renal disease</i>
FMD	flussmedierte Dilatation
GCP	<i>good clinical practice</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HbA1c	glykosyliertes (adultes) Hämoglobin
HD	Hämodialyse
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinfarkt
Hkt	Hämatokrit
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IMD	Intima-Media-Dicke
IMT	<i>intima-media thickness</i>
KHK	koronare Herzkrankheit

KKS	Koordinationszentrum für klinische Studien
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
MIF	migrationsinhibierender Faktor
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
MW	Mittelwert
NKF	National Kidney Foundation
NMD	nitroglycerinmedierte Dilatation
NO	<i>nitric oxide</i> / Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PD	Peritonealdialyse
PP	<i>pulse pressure</i>
PWV	<i>pulse wave velocity</i>
r	Korrelationswert
SAE	<i>serious adverse event</i>
SBP	<i>systolic blood pressure</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SF-36	Short-Form 36
SREM	<i>structurally related epicatechin metabolites</i>
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon

1.	EINLEITUNG	1
1.1	DIE BEDEUTUNG DER TERMINALEN NIERENINSUFFIZIENZ FÜR DAS KARDIOVASKULÄRE SYSTEM	1
1.2	KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIERENINSUFFIZIENZ	2
1.2.1	DAS ZYTOKIN <i>MACROPHAGE MIGRATION INHIBITOR FACTOR</i>	3
1.3	ENDOTHELIALE DYSFUNKTION UND ATHEROSKLEROSE	3
1.4	PRÄVENTIONSMAßNAHMEN KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN	5
1.5	WIRKUNG VON FLAVANOLEN AUF DAS GEFÄßSYSTEM	7
1.6	FRAGESTELLUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	8
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	STUDIENDESIGN	9
2.1.1	STUDIENDESIGN DER AKUTSTUDIE	11
2.1.2	STUDIENDESIGN DER LANGZEITSTUDIE	11
2.2	UNTERSUCHUNGSPROTOKOLL	12
2.2.1	UNTERSUCHUNGSPROTOKOLL DER AKUTSTUDIE	13
2.2.2	UNTERSUCHUNGSPROTOKOLL DER LANGZEITSTUDIE	13
2.3	STUDIENKOLLEKTIV	13
2.4	BESCHREIBUNG DER PRÜFSUBSTANZ	14
2.5	BESTIMMUNG DER MIF-KONZENTRATION	15
2.6	BESTIMMUNG DER ENDOTHELIALEN FUNKTION	15
2.7	BESTIMMUNG DER HÄMODYNAMIK: BLUTDRUCK UND HERZFREQUENZ	16
2.8	MESSUNG DER GEFÄßSTEIFIGKEIT	17
2.9	BESTIMMUNG DER INTIMA-MEDIA-DICKE	17
2.10	BESTIMMUNG DER KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND NITRAT IM PLASMA	18
2.11	BESTIMMUNG DER FLAVANOLKONZENTRATION IM PLASMA	19
2.12	KLINISCHES ROUTINELABOR	20
2.14	ERNÄHRUNGSPROTOKOLL	20
2.15	SHORT-FORM (36)- GESUNDHEITSFRAGEBOGEN	21
2.16	MATHEMATISCH-STATISTISCHE AUSWERTUNG	22
3.	ERGEBNISSE	23
3.1	STUDIENKOLLEKTIV	23
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER STUDIENPOPULATION	23
3.2.1	AKUTSTUDIE	23
3.2.2	LANGZEITSTUDIE	24
3.3	MIF-PLASMASPIEGEL SIND BEI PATIENTEN MIT TERMINALER NIEREN-INSUFFIZIENZ ERHÖHT UND KORRELIEREN MIT DER GEFÄßFUNKTION UND DER GEFÄßSTEIFIGKEIT	25
3.4	DIÄTETISCHE FLAVANOLE VERBESSERN DIE ENDOTHELIALE FUNKTION	27
3.4.1	AKUTE VERBESSERUNG DER ENDOTHELIALEN FUNKTION	27
3.4.2	VERBESSERUNG DER ENDOTHELIALEN FUNKTION NACH CHRONISCHER FLAVANOLEINNAHME	28
3.5	EINFLUSS DER FLAVANOLSUPPLEMENTIERUNG AUF DIE HÄMODYNAMIK	29
3.5.1	DIÄTETISCHE FLAVANOLE ZEIGEN KEINEN EFFEKT AUF DEN BLUTDRUCK ODER	

	DIE HERZFREQUENZ IN DER AKUTSTUDIE	29
3.5.2	REDUKTION DES DIASTOLISCHEN BLUTDRUCKS NACH CHRONISCHER FLAVANOLEINNAHME	31
3.6	DIÄTETISCHE FLAVANOLE ZEIGEN KEINEN EFFEKT AUF DIE PULSWELLEN- GESCHWINDIGKEIT	33
3.7	DIE 4-WÖCHIGE FLAVANOLEINNAHME ZEIGTE KEINEN EFFEKT AUF DIE INTIMA-MEDIA-DICKE	33
3.8	DIE KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND NITRAT IM PLASMA WERDEN DURCH EINE SUPPLEMENTIERUNG VON FLAVANOLEN NICHT BEEINFLUSST	34
3.8.1	DIÄTETISCHE FLAVANOLE ZEIGEN KEINEN AKUTEN EFFEKT AUF DIE KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND NITRAT IM PLASMA	34
3.8.2	DIÄTETISCHE FLAVANOLE ZEIGEN KEINEN EFFEKT NACH CHRONISCHER EINNAHME AUF DIE KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND NITRAT IM PLASMA	35
3.9	ANSTIEG DER FLAVANOLMETABOLITE IM PLASMA DER PATIENTEN DURCH DIE SUPPLEMENTIERUNG VON FLAVANOLEN	36
3.9.1	NACHWEIS DER FLAVANOLMETABOLITE IM PLASMA UND DEREN ANSTIEG IN DER AKUTSTUDIE	36
3.9.2	NACHWEIS DER FLAVANOLMETABOLITE IM PLASMA UND DEREN ANSTIEG NACH DER CHRONISCHEN EINNAHME	36
3.10	LABORCHEMISCHE ROUTINEPARAMETER BLEIBEN NACH DER SUPPLEMEN- TIERUNG VON FLAVANOLEN UNVERÄNDERT	38
3.11	KEINE AUFFÄLLIGKEITEN IN DEN ERNÄHRUNGSPROTOKOLLEN DER PATIENTEN	38
3.12	ERGEBNISSE DES GESUNDHEITSFRAGEBOGENS SF-36	39
4.	DISKUSSION	40
4.1	BEWERTUNG DES STUDIENKOLLEKTIVS	41
4.2	EINFLUSS DER TERMINALEN NIERENINSUFFIZIENZ AUF DIE ZIRKULIERENDE MIF-KONZENTRATION	41
4.3	EFFEKTE DER FLAVANOLEINNAHME AUF DIE VASKULÄRE FUNKTION	42
4.4	EFFEKTE DER FLAVANOLEINNAHME AUF DEN BLUTDRUCK	45
4.5	EFFEKTE DER FLAVANOLE AUF DIE KONZENTRATIONEN VON NITRIT UND NITRAT	46
4.6	FLAVANOLMETABOLITE IM PLASMA TERMINAL NIERENINSUFFIZIENTER PATIENTEN	48
4.7	KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK	50
5.	LITERATURVERZEICHNIS	52
6.	DANKSAGUNG	58

1. Einleitung

Im Verlauf dieser Einleitung werden zunächst die Erkrankung der terminalen Niereninsuffizienz und die damit einhergehenden kardiovaskulären Folgeerkrankungen erklärt. Dabei wird insbesondere auf das Zytokin *macrophage migration inhibitor factor* eingegangen. Im Anschluss werden die Aufgaben eines gesunden Gefäßendothels und die der endothelialen Dysfunktion zugrunde liegenden pathologischen Prozesse dargestellt. Dann wird auf Präventionsmaßnahmen kardiovaskulärer Krankheiten eingegangen. Zuletzt werden die Flavanoide und ihre Funktion als präventive Maßnahme diese Erkrankungen betreffend vorgestellt.

1.1 Die Bedeutung der terminalen Niereninsuffizienz für das kardiovaskuläre System

Die Niereninsuffizienz ist definiert als irreversibler Funktionsverlust der Nieren. In dessen Folge kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration harnpflichtiger Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff im Blut. Als chronische Niereninsuffizienz führt sie zu einer irreversiblen, progredienten Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) als Ausdruck einer stetig abnehmenden Anzahl funktionsfähiger Nephrone. Die Mortalität des Patienten ist bereits bei geringer Nierenfunktionseinschränkung im Vergleich zu der des Nierengesunden deutlich erhöht. Zudem steigt diese mit zunehmender Niereninsuffizienz exponentiell an [1]. Anhand der GFR wird die chronische Niereninsuffizienz in fünf Stadien (I-V) nach NKF (National Kidney Foundation) eingeteilt. Beim Stadium V spricht man von einer terminalen Niereninsuffizienz mit einer verbliebenen GFR von <15 ml/min. Unbehandelt führt dieses Stadium zum Tode, da die harnpflichtigen Substanzen nicht mehr in ausreichender Menge mit dem Harn ausgeschieden werden können und somit im Blut verbleiben. Zum Überleben muss der Organismus daher von diesen anfallenden Giftstoffen gereinigt und befreit werden. Dafür wird eines der drei folgenden Nierenersatzverfahren notwendig: Blutwäsche (Hämodialyse, HD), Bauchfellwäsche (Peritonealdialyse, PD) oder Nierentransplantation. Die chronisch intermittierende Hämodialyse ist das am häufigsten angewandte Dialyseverfahren. Unter dem Verfahren der Hämodialyse versteht man die Entfernung von Plasma und Molekülen wie Elektrolyten, Harnstoff und Kreatinin. Dies erfolgt über ein

Filtersystem, das eine semipermeable Membran enthält. Dafür wird das Blut über eine künstlich angelegte arteriovenöse Fistel (Dialyse/Cimino-Shunt) aus dem Körper in das Filtersystem geleitet. Innerhalb dieses Filtersystems fließt das Blut über eine semipermeable Membran entlang eines Konzentrationsgefälles. Dadurch können harnpflichtige Stoffe aus dem Blut in die Spülflüssigkeit (Dialysat) diffundieren und somit aus dem Blut entfernt werden.

Derzeit werden in Deutschland ca. 70.000 Patienten dialysiert [2]. Die Erkrankung der terminalen Niereninsuffizienz ist in Deutschland von einer hohen Inzidenz geprägt. Zudem steigt die Zahl der Betroffenen in Deutschland stetig weiter an. Damit stellt die terminale Nephropathie ein Problem von zunehmender gesundheitspolitischer Bedeutung dar.

Patienten mit Niereninsuffizienz sind eine der am schnellsten wachsenden Populationen mit einem erheblich hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [3]. Aus diesen Gründen ist die Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen bei niereninsuffizienten Patienten von enormer Wichtigkeit.

Gerade diese Tatsachen lassen die auch gesamtgesellschaftliche und gesundheitspolitische Relevanz der in der hiesigen Studie untersuchten Fragestellungen deutlich werden [3].

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

Aufgrund der Tatsache, dass Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nicht nur an der eingeschränkten Nierenfunktion leiden, sondern auch an kardiovaskulären Erkrankungen, kommt es zu einem drastischen Anstieg der Morbidität und Mortalität des vorliegenden Patientenkollektivs [4]. Es existieren traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie u.a. Rauchen, Übergewicht, hohes Alter, hohe Blutfettwerte, hoher Blutdruck und Diabetes mellitus. Diese können die erhöhte Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen bei dem vorliegenden Patientenkollektiv allerdings nur teilweise erklären. Bei chronisch Nierenkranken kommen zudem nichttraditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Urämietoxine und chronische Inflammation hinzu [3, 5].

Vor dem Hintergrund, dass chronische inflammatorische Prozesse die Grundlage für die gesteigerten, atherosklerotischen Gefäßveränderungen von Patienten mit

Niereninsuffizienz darstellen, ist das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge von herausragendem Interesse.

1.2.1 Das Zytokin *macrophage migration inhibitor factor*

Macrophage migration inhibitor factor (MIF) ist ein Zytokin, das Zellen des Immunsystems durch chemokinähnliche Funktionen an den Ort einer entzündlichen Reaktion locken kann [6]. Er wird von verschiedenen Zelltypen, insbesondere von inflammatorischen Zellen wie Monozyten bzw. Makrophagen, aber auch von glattmuskulären Zellen und Kardiomyozyten, gebildet. MIF wirkt überwiegend proinflammatorisch und induziert die Bildung der Mediatoren TNF- α , Interleukin-1, -6 und -8. Dadurch nimmt MIF eine zentrale Stellung in der Entwicklung der Atherosklerose ein. So findet sich in vaskulären Endothelzellen einer bereits geschädigten Gefäßwand eine verstärkte MIF-Expression [6]. Zudem rückt MIF in den Fokus vieler Studien, die Pathologien wie das akute Koronarsyndrom, die stabile koronare Herzkrankheit und myokardiale Reperfusionsschäden untersuchen [7-9]. So konnte eine neuere Studie nachweisen, dass MIF ein Marker für eine Herzschädigung sein kann [10]. Diese Studien zeigen, dass Patienten mit akutem Myokardinfarkt hohe MIF-Konzentrationen im Plasma aufweisen [10] und diese erhöhten MIF-Konzentrationen wiederum mit instabilen Plaques korrelieren [7]. Bislang existieren keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen zirkulierenden MIF-Spiegeln und vaskulärer Dysfunktion in der Hochrisikogruppe der Niereninsuffizienten untersuchen. Da die terminale Niereninsuffizienz einer chronischen Inflammation gleichkommt [11], wurden die MIF-Konzentrationen in diesem Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.3 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Das gesunde Gefäßendothel ist von großer physiologischer Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Vasotonus. Es reguliert den Blutdruck unter anderem durch Bildung von Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO). NO übernimmt als Gefäßdilator eine zentrale Funktion in der lokalchemischen Durchblutungsregulation der Gefäße. Es aktiviert die zytosolische Guanylatzyklase, die aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisieren kann. Im Anschluss daran kann cGMP Enzyme aktivieren, die über

Phosphorylierungsreaktionen zur Gefäßdilatation führen. Des Weiteren beeinflusst das Endothel die rheologischen Eigenschaften des Bluts durch Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen. Zudem weist ein gesundes Endothel antikoagulative Eigenschaften auf: In gesunden Endothelzellen werden Substanzen gebildet, welche die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten verhindern [12].

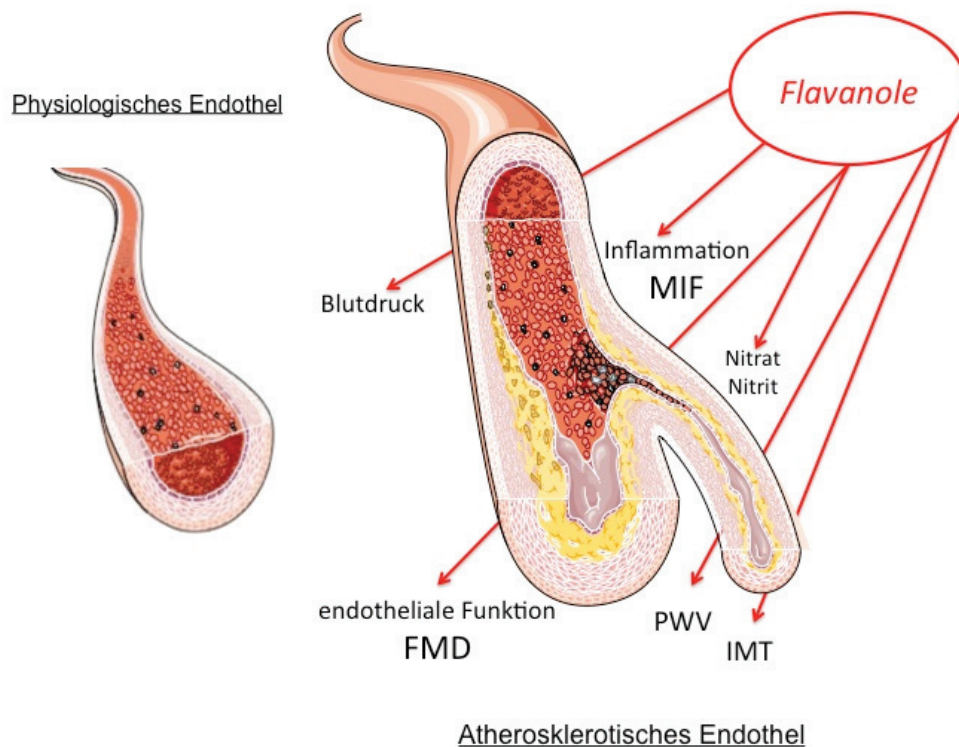


Abb. 1: Der Einfluss diätetischer Flavanoole auf die Gefäßfunktion bei terminaler Niereninsuffizienz. Das gesunde, physiologische Endothel im Vergleich zum atherosklerotischen Endothel, das durch endotheliale Dysfunktion verursacht wird.

Eine chronisch vorherrschende Inflammation im vaskulären System führt zu einer Funktionsstörung des Endothels. Dadurch kommt es zu Gefäßablagerungen, die aus Fett, Bindegewebe, Thromben und Kalk bestehen [12]. Aus diesen Ablagerungen resultieren eine Verdickung und Verhärtung der arteriellen Gefäßwand, die unter dem Begriff der Atherosklerose zusammengefasst werden [12]. Diese atherosklerotischen Veränderungen gehen mit einer beeinträchtigten Gefäßelastizität und einem reduzierten Gefäßlumen einher [12].

Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sind die atherosklerotischen Prozesse beschleunigt. Hierfür scheinen hauptsächlich eine Intima- und

Mediaverdickung, eine erhöhte Gefäßsteifigkeit, endotheliale Dysfunktion, oxidativer Stress und eine konstant vorherrschende Inflammation verantwortlich zu sein [13, 14].

Die endotheliale Dysfunktion ist somit sowohl ein initialer als auch ein kausaler Faktor in der Entwicklung der Atherosklerose [12, 15]. Zudem ist sie mit einer erhöhten Häufigkeit von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert [15-17].

Bei dieser Dysfunktion ist die Bildung von NO vermindert, wodurch die Regulation des Gefäßtonus eingeschränkt wird [18]. Die endotheliale Funktion gilt als verbessert, wenn das Endothel die Fähigkeit wiedererlangt, entsprechend der Anforderungen des Herz-Kreislauf-Systems zu reagieren [18]. Eine Erhöhung der NO-Verfügbarkeit gilt in diesem Sinne als präventive Maßnahme und wirkt damit einer endothelialen Dysfunktion entgegen [19].

Als Goldstandard in der Bestimmung der Endothelfunktion gilt die Messung der endothelabhängigen flussvermittelten Gefäßerweiterung (*flow-mediated dilatation*, FMD) [20]. In der vorliegenden Studie wurde diese gewählt, um die Wirkung einer diätetischen Supplementierung von Flavanolen auf die Endothelfunktion zu beurteilen. Einen weiteren Marker der Gefäßfunktion stellt die arterielle Gefäßsteifigkeit dar, die stark mit dem biologischen Alter der Gefäße korreliert [21]. Eine neuere Studie konnte bereits zeigen, dass die arterielle Gefäßsteifigkeit mit einer erhöhten Mortalität bei Dialysepatienten assoziiert ist [22]. Zur Bestimmung der arteriellen Gefäßsteifigkeit wird die Messung der Pulswellengeschwindigkeit (*pulse wave velocity*, PWV) empfohlen [23, 24]. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls angewandt, um den Einfluss des applizierten flavanolreichen Getränks auf die arterielle Gefäßsteifigkeit zu untersuchen.

1.4 Präventionsmaßnahmen kardiovaskulärer Erkrankungen

In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen existieren primäre, sekundäre und tertiäre Präventionsmaßnahmen. Primäre Maßnahmen haben den Erhalt der Gesundheit zum Ziel. Ein gesunder Lebensstil stellt ein Beispiel dafür dar. Er schließt eine gesunde Ernährung, sportliche Betätigung, Nikotinkarenz und gemäßigten Alkoholkonsum mit ein. Eine Medikamenteneinnahme bei

Bluthochdruck kann als Sekundärprävention Folgeerkrankungen verhindern. Invasive Eingriffe können schließlich als tertiäre Maßnahmen die Progredienz einer Erkrankung verlangsamen.

Eine gesunde Ernährung, die zu den primären Präventionsmaßnahmen gehört, stellt u.a. einen sehr wichtigen Faktor in der Prävention dar, weil sie stark beeinflussbar und modifizierbar ist [25]. Epidemiologische Daten haben gezeigt, dass Menschen aus dem Mittelmeerraum eine Ernährungsweise befolgen, die im Vergleich zu anderen Ernährungsstilen weniger mit chronischen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist [26]. Die mediterrane Ernährungsweise ist reich an Gemüse, Obst und Fisch. Olivenöl stellt die einzige direkte Fettquelle dar und es wird insgesamt wenig rotes Fleisch gegessen. Zudem gilt ein moderater Rotweingenuss während der Mahlzeiten als positiv. Dieser Ernährungsstil wirkt sich positiv auf den Blutdruck, die endotheliale Funktion, den Fettstoffwechsel und die Gewichtsregulierung aus und senkt damit die kardiovaskuläre Mortalität [27]. Durch ihn können viele Gefäßerkrankungen wie z. B. die periphere Verschlusskrankheit (pAVK), der Herzinfarkt (HI) und der Schlaganfall vermieden werden [28, 29].

Die DASH-Studie hat die Auswirkungen einer Ernährung mit viel Obst, Gemüse und reduziertem Fettgehalt auf den Blutdruck untersucht [30]. Die Ergebnisse zeigten, dass eine solche Diät den Blutdruck in der Größenordnung einer medikamentösen Behandlung senken kann [30].

Grüner Tee wirkt sich ebenfalls positiv auf den Gesundheitszustand aus: Es konnte nachgewiesen werden, dass der Blutdruck durch den regelmäßigen Konsum grünen Tees gesenkt werden kann [31]. Für diesen gesundheitsfördernden Effekt werden die im grünen Tee enthaltenen Flavanole verantwortlich gemacht [32].

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE, 2012) rät dazu, pro Tag fünf Portionen an Obst und Gemüse zu verzehren, um das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu senken. Neue Studienergebnisse korrigieren diese Empfehlung und raten zu mindestens sieben Portionen täglich [33]. Diese sind für eine gesunde Ernährung essentiell, denn sie enthalten Vitamine, Mineralstoffe, sekundäre Pflanzenstoffe, Ballaststoffe und gleichzeitig wenig Energie und Fett. Epidemiologische Studien haben zeigen können, dass der protektive Effekt einer obst- und gemüsereichen Ernährung auf die kardiovaskuläre Gesundheit teilweise

auf die in diesen Nahrungsmitteln enthaltenen Polyphenole (Flavanoide), besonders auf die Subklasse der Flavanole, zurückzuführen ist [34, 35].

1.5 Wirkung von Flavanolen auf das Gefäßsystem

Neben den primären Pflanzeninhaltsstoffen, die sich aus den enthaltenen Nährstoffen wie den Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten zusammensetzen, gibt es auch sekundäre Pflanzenstoffe. Diese sekundären Stoffe erfüllen unterschiedliche Funktionen: Sie dienen als Abwehrstoffe gegen Schädlinge, als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe. Die hierzu zählenden Polyphenole kommen in Pflanzen als Farb- und Geschmacksstoffe vor. Polyphenole sind für die protektive Wirkung von Gemüse und Obst verantwortlich [35]. Die am häufigsten vorkommende Untergruppe der Polyphenole bilden die Flavonoide. Diese besitzen eine gemeinsame ursprüngliche chemische Struktur und werden anhand ihrer verschiedenen Substituenten nochmals in die folgenden Untergruppen eingeteilt: Flavanole, Flavonole, Flavone, Isoflavone, Flavanone und Anthocyanine [34].

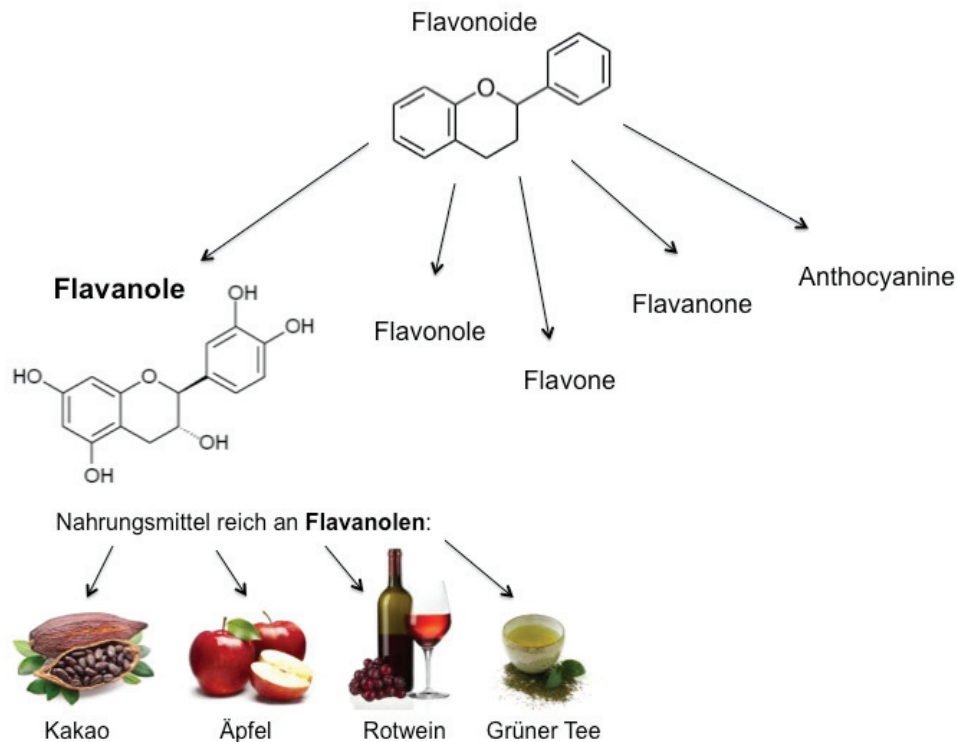


Abb. 2: Die Molekularstruktur diätetischer Flavanole und deren Vorkommen

Flavanole sind in Obst und Gemüse, aber auch in Kakao, Tee und Rotwein enthalten. Die meisten Flavanole liegen in der Nahrung in einer Oligomerstruktur vor. Für die beobachteten positiven Effekte der Flavanole auf die Gefäßfunktion scheinen jedoch die verstoffwechselten Monomer- und Dimerstrukturen der Flavanole verantwortlich zu sein [36, 37]. Zu diesen positiven Effekten zählen die Regenerierung der endothelialen Funktion, die Senkung des Blutdrucks und Verbesserungen der Insulinsensitivität [38-40].

Die verschiedenen pharmakologischen Mechanismen, die zu den genannten Effekten führen, sind noch nicht endgültig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass Flavanole eine Steigerung der NO-Bioaktivität bewirken, wodurch die flussabhängige Gefäßerweiterung verbessert wird [41]. (Weitere Studienergebnisse zeigen, dass Flavanole auch eine antithrombotische Wirkung haben [42].

Außerdem besitzen Flavanole antioxidative Eigenschaften. Interessanterweise gehören sie nicht den direkten Antioxidantien, sondern den indirekten Antioxidantien an [43, 44]. Direkte Antioxidantien können freie Radikale wie reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoffspezies abfangen. Indirekte Antioxidantien induzieren hingegen antioxidative Enzyme wie die Superoxid-Dismutase, die wiederum die schädlichen Radikale wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies inaktivieren [43].)

Studien konnten zeigen, dass die Wirkung von Flavanolen mit kardiovaskulären Effekten assoziiert ist: So wird die endothelabhängige Gefäßerweiterung durch eine akute und chronische Flavanoleinnahme verbessert [45, 46].

Ob die Verabreichung eines flavanolreichen Getränks die Gefäßfunktion bei terminaler Niereninsuffizienz beeinflusst, ist bis dato nicht bekannt. Sollte dies jedoch festgestellt werden, könnte sich dadurch eine neue Möglichkeit in der Behandlung terminal niereninsuffizienter Patienten eröffnen.

1.6 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Supplementierung von Flavanolen auf die Gefäßfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz untersucht werden. Zudem sollten die MIF-Konzentrationen bei terminal niereninsuffizienten Patienten im Kontext mit der vaskulären Funktion erörtert

werden. In Anbetracht des derzeitigen Wissensstands ergaben sich hierfür folgende Fragestellungen:

- 1) Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von MIF und der Gefäßfunktion bei Niereninsuffizienten?
- 2) Haben Flavanole bereits einen kurzzeitigen Einfluss auf die endotheliale Funktion bei terminaler Niereninsuffizienz?
- 3) Zeigen sich nach chronischer Supplementierung von Flavanolen bei terminaler Niereninsuffizienz Langzeiteffekte auf die vaskuläre Funktion?

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Um die Effekte einer diätetischen Supplementierung von Flavanolen auf die vaskuläre Funktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu untersuchen, wurde eine zweiteilige klinische Studie durchgeführt (siehe Abb. 3). Den ersten Teil stellte die Akutstudie dar, in der die Verträglichkeit der Prüfpräparate und deren kurzzeitigen Effekte an insgesamt 10 Patienten ermittelt wurden. Den zweiten Teil stellte die im Anschluss durchgeführte Langzeitstudie dar, in der die Effekte einer chronischen Flavanoleinnahme an insgesamt 52 Patienten untersucht wurden.

Alle Patienten wurden bezüglich der Ein- und Ausschlusskriterien der Studie auf ihre Eignung zur Teilnahme an derselben hin geprüft. Dabei waren die Haupteinschlusskriterien der Studie ein Mindestalter der Patienten von 18 Jahren und die Teilnahme der Patienten an der chronisch intermittierenden Hämodialyse. Die Hauptausschlusskriterien der Studie waren folgende Diagnosen: ein akutes Nierenversagen, eine Anurie, eine Hyperkaliämie, eine aktive maligne Erkrankung, eine Herzinsuffizienz des Stadiums III-IV nach NYHA, eine akute Infektion, eine höhergradige Herzrhythmusstörung und eine Schwangerschaft.

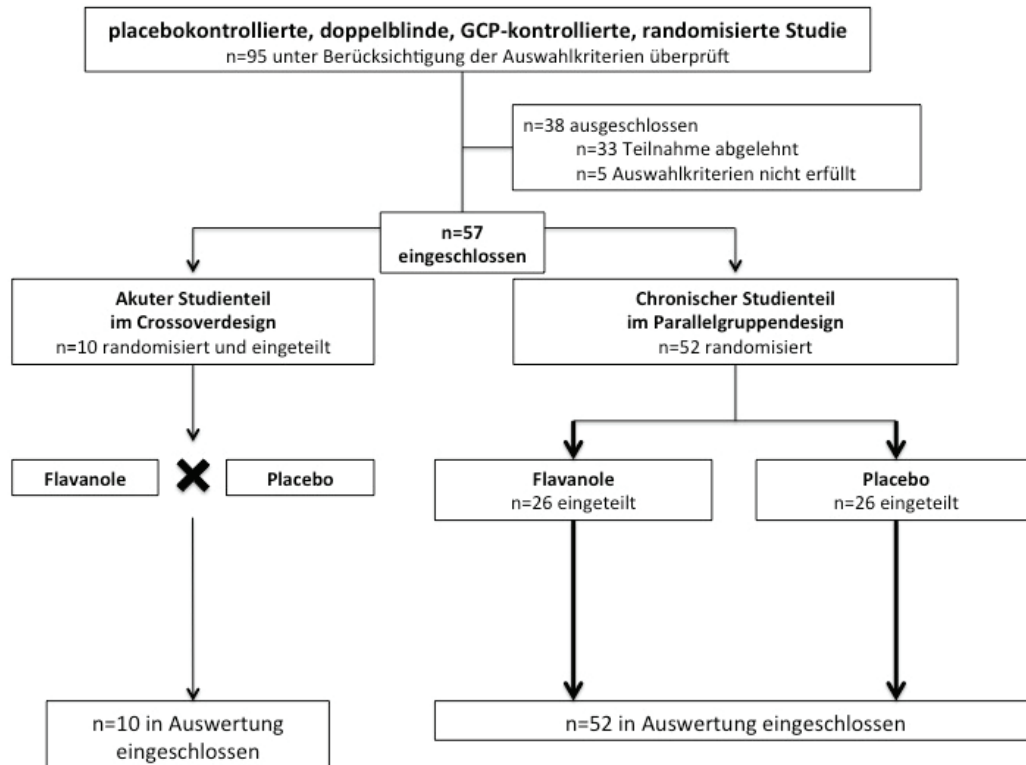


Abb. 3: Ablaufdiagramm der zweiteiligen Studie

Die Studie wurde randomisiert, doppelblind, placebokontrolliert und GCP-konform (*good clinical practice*, GCP) durchgeführt; die Randomisierung erfolgte durch das Koordinationszentrum für klinische Studien (KKS).

Sowohl die Patienten als auch die Untersucher waren bezüglich der Identität der Prüfpräparate verblindet. Alle Patienten wurden während der ersten Visite randomisiert. Dafür erhielten sie jeweils nach der Reihenfolge ihres Eintritts in die Studie eine Identifikationsnummer (1-52). Zudem enthielten die Prüfpräparate auf der Verpackung eine Chargennummer (B711J8 oder G3N45S). Diese Nummern dienten der Doppelverblindung. Erst nachdem die Studie vollständig abgeschlossen war, wurde entblindet.

Registriert wurde die in dieser Arbeit beschriebene klinische Studie unter der *Clinical Trials*-Nummer NCT00835887. Der Ethikantrag für die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 3587 genehmigt.

2.1.1 Studiendesign der Akutstudie

Ziel der Akutstudie war es, die Verträglichkeit und Sicherheit der beiden verwendeten Präparate zu überprüfen. Zudem sollten die Effekte auf die Gefäßfunktion nach einmaliger Einnahme des flavanolreichen Getränks und des Placebos untersucht werden.

Im Akutteil der Studie tranken die Patienten (n=10) an zwei dialysefreien Untersuchungstagen im Abstand von einer Woche im Cross-over Design (siehe Abb. 4) das flavanolhaltige und alternierend das flavanolfreie Getränk.

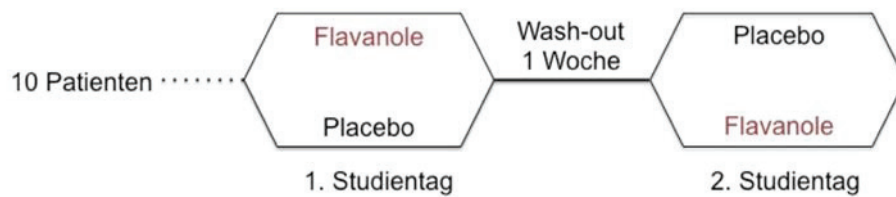


Abb. 4: Cross-over Design der Akutstudie

2.1.2 Studiendesign der Langzeitstudie

Ziel der Langzeitstudie war es, die Effekte einer chronischen Einnahme des flavanolreichen Getränks auf die Gefäßfunktion im Vergleich zu denen des Placebos zu untersuchen.

Im Langzeitteil der Studie sollten die Patienten (n=52) an 30 ± 5 Tagen jeweils täglich das flavanolhaltige oder das flavanolfreie Getränk trinken (Parallelgruppendesign).

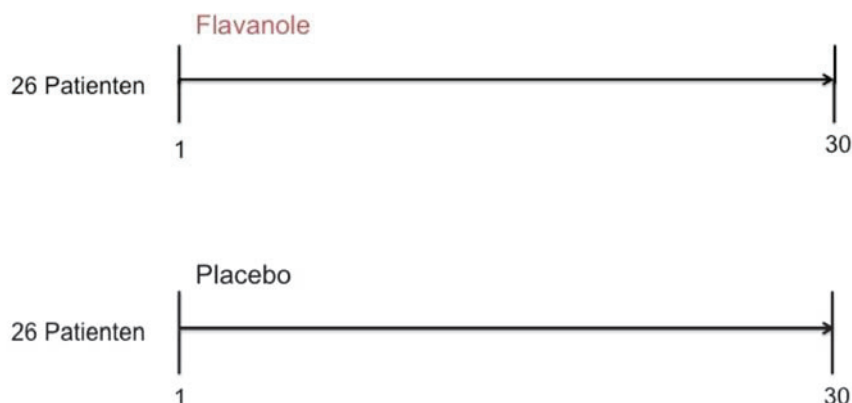


Abb. 5: Parallelgruppendesign der Langzeitstudie

Zu diesem Zweck wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt (siehe Abb. 5). Eine Gruppe (n=26) erhielt die Prüfsubstanz mit einer Konzentration von 820 mg Flavanolen pro Tag (siehe dazu unter 2.4 Tabelle 1: Zusammensetzung der Prüfpräparate). Zum Vergleich erhielt die andere Gruppe (n=26) das flavanolfreie Placebopräparat. Die Identität der jeweiligen diätetischen Intervention war während der Studiendurchführung sowohl den Prüfern als auch den Patienten unbekannt.

Jeweils am ersten und letzten Tag der Studie wurden die Patienten am jeweiligen Dialysetag untersucht. Der Dialysetag blieb dabei nach dem üblichen Turnus des Patienten bestehen: Erfolgte der erste Studientag beispielsweise an einem Mittwoch (Dialyseintervall: Montag, Mittwoch, Freitag), wurde der letzte Studientag vier Wochen später ebenfalls auf einen Mittwoch festgelegt.

2.2 Untersuchungsprotokoll

Zu Beginn der Studie wurden die Patienten über den Studienablauf und die dazugehörigen Untersuchungen aufgeklärt. Anschließend erfolgte eine kursorische internistische Anamnese, in der sowohl die Erkrankungen und die aktuelle Medikation als auch die kardiovaskulären Risikofaktoren erhoben wurden.

Des Weiteren wurde von jedem Patienten ein Ernährungsfragebogen sowie ein Fragebogen zum psychischen Gesundheitszustand (SF 36) ausgefüllt.

Nach einer 10-minütigen Entspannungsphase auf einer Liege wurde der Blutdruck manuell gemessen. Nach einer erneuten 10-minütigen Entspannungsphase wurde dann eine erste basale Ultraschalluntersuchung der A. brachialis durchgeführt: Die basale endothelabhängige Gefäßdilatation (FMD) wurde gemessen. Zudem wurde die Gefäßsteifigkeit anhand einer Pulswellenanalyse untersucht. Diese Analyse erfolgte mittels Applanationstonometrie der A. radialis, A. carotis und A. femoralis. Im Anschluss daran wurde Blut abgenommen, um sowohl Routineparameter als auch biochemische Parameter bestimmen zu können. Nach dem ersten Untersuchungsablauf durfte der Patient das in Leitungswasser aufgelöste Prüfpräparat trinken.

2.2.1 Untersuchungsprotokoll der Akutstudie

In der Akutstudie erfolgten die Untersuchungen am jeweiligen Untersuchungstag (siehe Abb. 6) zu den folgenden Zeitpunkten: basal ($t=-1$), eine Stunde nach Einnahme des Prüfpräparats ($t=1$), zwei Stunden nach der Einnahme ($t=2$), drei Stunden nach der Einnahme ($t=3$) und zum Abschluss der Sitzung ($t=4$ bzw. $t=5$). Für die im selben Rhythmus erfolgten Blutabnahmen wurde den Patienten am shuntfreien Arm ein Zugang gelegt.

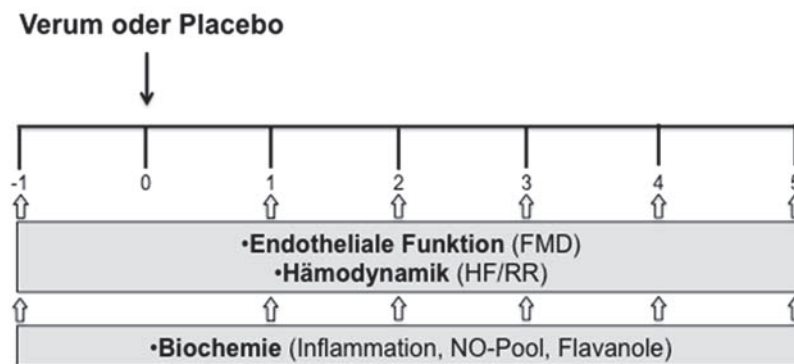


Abb. 6: Ablauf eines Untersuchungstags der Akutstudie

2.2.2 Untersuchungsprotokoll der Langzeitstudie

In der Langzeitstudie wurden die genannten Untersuchungen am ersten und am letzten Tag der Studie und damit jeweils an einem Dialysetag durchgeführt. Die Blutabnahmen erfolgten direkt aus dem arteriellen Schenkel der Dialysemaschine. Am Ende des ersten Studientags erhielten die Patienten noch das einzeln abgepackte Prüfpräparat für die selbstständige tägliche Einnahme bis zum Ende der Studie. Dabei wurden sie gebeten, die leeren Verpackungen nach erfolgter Einnahme aufzuheben und am letzten Tag der Studie gesammelt mitzubringen.

2.3 Studienkollektiv

Die Studie wurde mit Patienten durchgeführt, die an terminaler Niereninsuffizienz des Stadiums V nach NKF/KDOQI leiden und als Nierenersatzverfahren eine chronisch intermittierende Hämodialyse (HD) vornehmen lassen. Die Patienten der Studie wurden im Medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) DaVita Karlstraße GmbH in Düsseldorf akquiriert.

2.4 Beschreibung der Prüfsubstanz

Die in der Studie verabreichte Prüfsubstanz war ein natürliches Nahrungsergänzungsmittel, das von Mars Botanical (Mars, Inc. McLean, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Es handelte sich hierbei um ein himbeerfarbenes Pulver, das in weißen Plastikpäckchen verpackt war. Es war entweder als Verum reich an Flavanolen (410 mg pro Päckchen) oder als Placebo frei von diesen (0 mg). Bezüglich der restlichen Inhaltsstoffe unterschieden sich die zwei Prüfgetränke nicht (siehe Tabelle 1). Gekennzeichnet waren die unterschiedlichen Päckchen anhand eines aufgedruckten Buchstaben- und Zahlencodes: B711J8 versus G3N45S.

Es wurden jeweils zwei Päckchen in einem Glas stillen Wassers (200 ml) aufgelöst. Handelte es sich um das Verum, wurde somit täglich eine kumulative Dosis von 820 mg Flavanolen eingenommen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Prüfpräparate

Inhaltsstoffe:	Flavanolfreies Getränk:	Flavanolreiches Getränk:
Kakaoflavanol (mg)	Nicht Detektierbar	410
Monomere (mg)	ND	62
(-)- Epicatechin (mg)	ND	55
(-)- Catechin (mg)	ND	6
Dimere (mg)	ND	62
Trimere-Decamere (mg)	ND	285
Theobromin (mg)	56	50
Koffein (mg)	5	7
Energie (kcal)	25	25
Fett (g)	0	0
Kohlenhydrate (g)	6	6
Proteine (g)	0	0
Natrium (mg)	3	2
Kalium (mg)	76	100

2.5 Bestimmung der MIF-Konzentration

Da das Patientenkollektiv an einer erhöhten chronischen Inflammation leidet, sollte der *macrophage migration inhibitory factor* bestimmt werden. MIF unterliegt beim Menschen einer zirkadianen Rhythmik. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationen von demselben nur bei den Patienten untersucht, die ihre Dialyse vormittags begonnen hatten (n=39). Für die Bestimmung der MIF-Konzentration wurde während des Untersuchungsablaufs ein Heparinröhrchen entnommen, das 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde das Plasma in 200 µl-Portionen in 1,5 ml-Eppendorf Safe-Lock Gefäße™ pipettiert. Direkt im Anschluss wurden die Proben mithilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur Messung aufbewahrt.

Die MIF-Konzentration in den Plasmaproben wurde dann durch quantitative Antigen/Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) des Herstellers R&D Systems (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA) etablierten Protokollen entsprechend [47] gemessen. Bei dieser ELISA-Technik werden zwei Antikörper (AK) verwendet, die beide (an unterschiedlichen Epitopen) das zu messende Antigen (AG) binden. Der erste AK befindet sich dabei schon in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte. In einem ersten Schritt wird die Probe mit dem nachzuweisenden MIF-Antigen in die Vertiefungen der Titerplatte gegeben, damit die erste AK-AG-Bindung erfolgen kann. Nach einer Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte abgewaschen, um die nichtgebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. In einem zweiten Schritt wird ein Detektions-AK in die Vertiefungen zugefügt, um das gewünschte AK-AG-AK-Produkt zu erhalten. Die Platte wird daraufhin erneut gewaschen, um die nicht gebundenen Anteile zu entfernen. Anschließend kann das Antigen mithilfe eines Photometers detektiert und quantifiziert werden.

2.6 Bestimmung der endothelialen Funktion

Zur nichtinvasiven Erfassung der endothelialen Funktion wurde die flussvermittelte Vasodilatation duplexsonographisch gemessen. Die Ultraschalluntersuchungen wurden bei Raumtemperatur in einem ruhigen Dialyseraum durchgeführt. Vor der Untersuchung hatte der Patient jeweils immer eine Ruhephase von zehn Minuten.

Zu Beginn der FMD-Untersuchung wurde die A. brachialis des shuntfreien Arms mithilfe eines hochauflösenden 12 MHz Linear Array-Schallkopfs (Vivid i Ultrasound, GE Healthcare, München, Deutschland) im Bereich der Ellenbeuge longitudinal dargestellt. An der Stelle mit optimaler anteriorer sowie posteriorer Abgrenzbarkeit wurde der basale Gefäßdurchmesser (= Ruhediameter) bestimmt.

Um die endothelabhängige Vasodilatation messen zu können, wurde eine reaktive Hyperämie ausgelöst. Dafür wurde der Blutfluss mithilfe einer Blutdruckmanschette fünf Minuten lang durch suprasystolische Kompression (250 mmHg) am Unterarm gestaut. Nach Lösung der Kompression wurde die reaktive Hyperämie erzeugt. Abschließend wurden in den folgenden 100 Sekunden alle 20 Sekunden (jeweils drei Herzzyklen lang) Bilder der FMD aufgenommen. Diese Bilder konnten anschließend mithilfe einer Software (MIA Vascular Research Tools) ausgemessen werden [48].

Die FMD kann auch unabhängig von einer verminderten endothelialen Funktion eingeschränkt sein. Daher wurde zum Abschluss der Untersuchungen auch die endothelunabhängige Gefäßerweiterung untersucht. Dafür wurde den Patienten zunächst 400 µg Glyceroltrinitrat sublingual (Nitrolingual akut® Spray, G. Pohl-Boskamp, Deutschland) verabreicht. Im Anschluss wurde die NMD-Messung (nitroglycerinmedierte Dilatation, NMD) durchgeführt.

Bei beiden FMD-Verfahren wurde die prozentuale Zunahme des Gefäßdurchmessers (= Diameters) in Relation zum Ausgangsdurchmesser gemessen:

$$\text{FMD} = \frac{(\text{max. Hyperämiediameter} - \text{Ausgangsdiameter})}{\text{Ausgangsdiameter}} \times 100$$

2.7 Bestimmung der Hämodynamik: Blutdruck und Herzfrequenz

Zur Untersuchung der Wirkung einer Supplementierung von Flavanolen auf den Blutdruck und die Herzfrequenz wurden deren Werte nach einer Ruhephase von 10 min manuell erhoben. Die Zeitpunkte der Messungen waren mit denen der FMD-Messungen und Blutabnahmen identisch.

2.8 Messung der Gefäßsteifigkeit

Zur Messung der arteriellen Gefäßsteifigkeit wurde die Pulswelle der A. radialis aufgezeichnet und analysiert. Für diese Pulswellenanalyse wurde das SphygmoCor (AtCor Medical, Australia) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine nichtinvasive klinisch validierte Technologie, die auf der Applanationstonometrie beruht. Damit war es möglich, anhand peripherer Pulsdruckmessung (periphere Tonometrie) zentrale Blutdruckwerte und kardiovaskuläre Funktionsparameter zu erfassen.

Hierfür wurde ein stiftähnlicher Sensor senkrecht auf die A. radialis gehalten. An diesem Auflagepunkt enthält der Sensor eine druckempfindliche Membran, über die Pulswellen aufgezeichnet werden können. Anhand dieser oszillometrischen Aufzeichnungen war das verwendete Computerprogramm in der Lage, eine kalibrierte Blutdruckkurve der Aorta unter Zuhilfenahme einer sog. Transferfunktion abzuschätzen [49].

Zur Messung der Gefäßsteifigkeit wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit der peripheren Pulswelle (Pulswellengeschwindigkeit, PWV) errechnet. Dafür wurden die Pulswellen an zwei arteriellen Messpunkten aufgezeichnet: an der A. carotis und an der A. femoralis. Um die Zeit vom Beginn der Pulswelle, die mit der Auswurfphase des linken Ventrikels beginnt, bis zur Ankunft in der Peripherie ermitteln zu können, wurde parallel zur Messung ein EKG des jeweiligen Patienten aufgezeichnet. Anhand der zusätzlich ausgemessenen Distanz zwischen den beiden Messpunkten konnte schließlich die Pulswellengeschwindigkeit (= Weg/Laufzeit) errechnet werden.

2.9 Bestimmung der Intima-Media-Dicke

Um das allgemeine Ausmaß der Artherosklerose der großen Arterien einschätzen zu können, wurde die Intima-Media-Dicke (IMD, englisch IMT) der A. carotis bestimmt.

Die Messung derselben erfolgte bei jedem Patienten am ersten und am letzten Studientag. Dafür wurden per Ultraschall (12 MHz Linear Array-Schallkopf, Vivid i Ultrasound GE Healthcare, München, Deutschland) am Hals der Patienten jeweils Bilder der A. carotis (1 cm distal der Bifurkation der A. carotis communis) aufgenommen. Mithilfe dieser Aufnahmebilder konnten die Dicke der Intima und

die der Media ausgemessen werden. Die Intima bezeichnet die innerste Gefäßschicht aus Endothelzellen und die Media die mittlere Gefäßschicht aus glatten Muskelzellen. Sind die Werte größer als die Normwerte (z. B. im Alter von 60-70 Jahren: 0,7- 0,8 mm), liegen Gefäßwandverdickungen vor. Ab einer Dicke von 1,0 mm liegen pathologische Gefäßwandveränderungen vor [50]. Auf diese Weise kann das pathologische Ausmaß der Atherosklerose mithilfe der IMT-Messung ermittelt werden.

2.10 Bestimmung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma

Für die biochemischen Analysen wurden während jeder der Untersuchungen zweimal 3,6 ml Blut mittels 5 ml-Einwegspritzen (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) aufgezogen. Direkt im Anschluss wurden die zweimal 3,6 ml aus den 5 ml-Spritzen jeweils in separate 15 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Diese waren bereits mit 3,6 µl Heparin (Heparinnatrium, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, Wyhlen, Deutschland) gefüllt. Beide Röhrchen (gefüllt mit jeweils 3,6 µl Heparin + 3,6 ml Vollblut) wurden sofort danach für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert. Direkt danach wurde das klare Plasma aus den zwei Röhrchen in 1,5 ml-Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße™ aliquottiert. Im Anschluss wurden alle Proben mithilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur Vermessung gelagert.

Die Messung der Konzentrationen von Nitrat und Nitrit aus diesen Plasmaproben erfolgte nach etablierten Methoden mithilfe des automatischen NO_x-Analyzers ENO-20 (EiCom, Kyoto, Japan) [51, 52]. Für diese wurden die Plasmaproben langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden sie im Verhältnis 1:1 mit eisgekühltem Methanol vermengt. Direkt danach wurden die Proben bei 4°C für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde in spezielle HPLC-Reaktionsgefäße (Eppendorf-Reaktionsgefäß 3810, Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling, Deutschland) überführt. In dieser Form wurden die Plasmaproben in den dem NO_x-Analyser vorgeschalteten Autosampler gestellt. So wurden die Proben nacheinander bei einer Temperatur von 4°C gemessen.

Die Reaktionen, die dem Verfahren der Nitrat- und Nitritmessung zugrunde liegen, sind die Griess-Reaktion und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high*

performance liquid chromatography, HPLC). Bei der Griess-Reaktion wird bei Anwesenheit von Nitrit ein roter Azofarbstoff gebildet, dessen Farbintensität proportional zur Nitritmenge in der Probe ist. Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wird der Nitritgehalt durch die photometrische Messung der Absorption bestimmt. Zu Beginn der Messung werden das Nitrit und das Nitrat einer Probe aufgetrennt. Dies erfolgt mittels Umkehrphasenchromatographie: Die enthaltene Trennsäule (NO-PAK, EiCom, Dublin, Irland) ist hierbei mit einem Material (Polystyrol-Polymer) versehen, das eine höhere Affinität zu Nitrat aufweist. Anschließend wird das Nitrat mittels Cadmium-Kupfergranulat in der Reduktionssäule zu Nitrit reduziert.

Im Anschluss daran wurde das sog. Griess-Reagenz hinzugefügt, woraufhin rötlich-violette Diazoverbindungen entstanden. Diese Verbindungen wurden bei einer Wellenlänge von 540 nm absorbiert und konnten somit spektrophotometrisch gemessen werden. Dies erfolgte mithilfe des UV/Vis-Spektrophometers (EiCom, Dublin, Irland). Über eine Computerschnittstelle war es möglich, die Probenkonzentrationen von Nitrit und Nitrat als Integrale darzustellen. Eine Software (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) berechnete die Konzentrationen bzw. die Integrale. Dabei arbeitete sie laut Angaben des Herstellers mit Kalibrierungen durch standardisierte Nitrit- und Nitratlösungen.

Durch dieses Verfahren war es möglich, den Nitrit- und Nitratgehalt derselben Plasmaprobe getrennt voneinander bis zu einem Schwellenwert von 1 nmol/L zu detektieren.

2.11 Bestimmung der Flavanolkonzentration im Plasma

Für die Messung der Konzentration von Flavanolen wurden innerhalb der Untersuchungen immer jeweils zwei EDTA-Röhrchen abgenommen. Diese wurden unmittelbar nach der Abnahme für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden aus diesen zweimal 600 µl Plasma pipettiert und in speziell beschichtete 1,5 ml-Eppendorf-Safe-Lock-Gefäße™ überführt. Dabei wurde jeweils 3 µl Ascorbinsäure hinzugefügt. Anschließend wurden die einzelnen Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurden sie zum Studienkooperationspartner der University of California, Davis, USA geschickt. Dort konnten entsprechend etablierter Methoden Flavanolmetabolite detektiert

werden [53]. Die Flavanolkonzentrationen wurden mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) analysiert. Dabei wurden die Konzentrationen von folgenden strukturell ähnlichen Epicatechinmetaboliten gemessen:

- (-)-epicatechin-3'-b-D-glucuronide (E3'G)
- (-)-epicatechin-3'-sulfate (E3'S)
- (-)-epicatechin-5-sulfate (E5S)
- 3'-O-methyl(-)-epicatechin-5-sulfate(3'ME5S)
- 3'-O-methyl(-)-epicatechin-7-sulfate(3'ME7S)

2.12 Klinisches Routinelabor

Zur Bestimmung des Routinelabors wurden während des Untersuchungsablaufs Blutproben in Vakuümröhrchen (Vacutainer® Systems, Plymouth, Großbritannien) entnommen.

Im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden durch routinemäßige analytische Methoden folgende Parameter jedes Patienten bestimmt: Elektrolytwerte (Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat, Magnesium und Eisen), ein kleines Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, HB, Hkt, Thrombozyten), Enzyme (CK/CK-MB, LDH, GOT, GPT, GGT, AP, CHE, Amylase), Plasmaproteine (Gesamteiweiß, CRP, Troponin, Albumin, Cystatin C, Ferritin, Transferrin, Transferrinsättigung, Haptoglobin), Nierenretentionsparameter (Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Bilirubin gesamt), Cholesterinwerte (Cholesterin, Triglyceride, HDL-/ LDL-Cholesterin), Schilddrüsenwerte (TSH), Zuckerwerte (HbA1c) sowie Homocystein und BNP.

2.14 Ernährungsprotokoll

Um nachvollziehen zu können, wie sich die Patienten gewohnheitsgemäß ernähren, und um dadurch gegebenenfalls verursachten Auswirkungen auf die endotheliale Funktion nachgehen zu können, wurde für den ersten, den zehnten, den zwanzigsten und den letzten Studientag ein Ernährungsprotokoll geführt. Die Patienten sollten für einen Zeitraum von 24 Stunden aufschreiben, welche Nahrungsmittel und Getränke sie zu sich nahmen. In diesen Ernährungsprotokollen

wurde explizit nach dem Verzehr von Obst und Gemüse gefragt, die nach unterschiedlichen Sorten aufgelistet waren (Zitrusfrüchte/Südfrüchte, Beerenfrüchte, Kernobst, Steinobst, Salate/Blattgemüse, Fruchtgemüse, Hülsenfrüchte etc.). Zudem wurde auch der konkrete Verzehr von Fleisch, Fisch, Nudeln, Reis, Kartoffeln, Süßigkeiten und Schokolade erfragt. Des Weiteren wurden bezüglich der Getränke zwischen den Unterklassen Wasser, Tee (Grüner Tee, Schwarzer Tee, Kräutertee, Fruchtetee), Kaffee und Säfte differenziert. Jeweils Zutreffendes sollte auf dem Protokoll angekreuzt und mit der jeweils verzehrten Menge angegeben werden.

Somit wurde die Möglichkeit gesichert, bei eventuell untypisch hohen Messwerten einen Zusammenhang zur Ernährung aufdecken zu können.

2.15 Short-Form (36)- Gesundheitsfragebogen

Mittels des Short-Form (36)-Gesundheitsfragebogens wurde die gesundheitsbezogene Lebensqualität der Patienten erhoben. Dieser dient der Therapiekontrolle und der Verlaufsmessung. Zudem bewertet er den Nutzen medizinischer Therapien, indem er durch die gleichen spezifischen Fragen zu unterschiedlichen Zeitpunkten den individuellen Gesundheitszustand der Patienten in seinem jeweiligen Verlauf misst.

Der Fragebogen setzt sich aus den folgenden acht Skalen zusammen, die dazu dienen, das selbst eingeschätzte allgemeine Gesundheitsbefinden darzustellen:

- *körperliche Funktionsfähigkeit*
- *körperliche Rollenfunktion*
- *körperliche Schmerzen*
- *allgemeine Gesundheitswahrnehmung*
- *Vitalität*
- *soziale Funktionsfähigkeit*
- *emotionale Rollenfunktion*
- *psychisches Wohlbefinden*

In der Auswertung wurden die jeweils gegebenen Antworten der Patienten in prozentuale Werte transformiert. Hohe Werte entsprechen dabei einer besseren empfundenen Lebensqualität als niedrige Werte. Damit werden hohe Werte als

positiv bewertet. In den Skalen *allgemeine Gesundheitswahrnehmung*, *Vitalität* und *psychisches Wohlbefinden* gelten bereits mittlere Werte als normal bzw. nicht eingeschränkt: Da diese Skalen methodisch anders konstruiert wurden, sind hier solche mittleren Werte schon als positiv zu bewerten. Nur eine besonders hohe Selbsteinschätzung nämlich führt auch in diesen Skalen zu hohen Werten [54].

Ausgehend von diesen acht Hauptkomponenten wurden dann zwei Summenskalen erfasst, um die körperliche und die psychische Dimension des allgemeinen Gesundheitszustands zu erfassen:

- *körperliche Summenskala*
- *psychische Summenskala*

Dabei setzt sich die *körperliche Summenskala* aus den Skalen *körperliche Funktionsfähigkeit*, *körperliche Rollenfunktion*, *körperliche Schmerzen* und *allgemeine Gesundheitswahrnehmung* zusammen, wobei die *psychische Summenskala* aus den Skalen *Vitalität*, *soziale Funktionsfähigkeit*, *emotionale Rollenfunktion* und *psychisches Wohlbefinden* erfasst wird.

2.16 Mathematisch-statistische Auswertung

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism (Version 5.0). Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Zum Vergleich der Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Flavanolgruppe versus Placebogruppe) wurde der ungepaarte zweiseitige Student's t-Test angewendet. Bezüglich der Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurde der gepaarte t-Test verwendet. Als Signifikanzwert wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Insgesamt 95 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wurden bezüglich der Ein- und Ausschlusskriterien der Studie auf ihre Eignung zur Teilnahme an derselben hin geprüft. Von den 95 geprüften Patienten mussten gemäß dieser Kriterien n=38 ausgeschlossen werden, da n=5 die vorgegebenen Kriterien nicht erfüllten und n=33 ihr Einverständnis zur Teilnahme widerriefen (siehe Abb. 3). 57 Patienten wurden schließlich in die Studie eingeschlossen. Von diesen nahmen n=5 nur an der Akutstudie, n=47 nur an der Langzeitstudie und n=5 sowohl an der Akut- als auch an der Langzeitstudie teil. Die n=10 Patienten der Akutstudie nahmen die Prüfpräparate in randomisierter Reihenfolge im Abstand von einer Woche ein. Die n=52 Patienten der Langzeitstudie wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Somit gab es eine Gruppe mit n=26 Patienten, die das Flavanolpräparat einnahmen, und eine Parallelgruppe mit ebenfalls n=26, die das Placebo erhielten. In der Flavanolgruppe haben zwei Patienten die Einnahme des Prüfpräparats vorzeitig abgebrochen. Ein Patient erwies sich zudem als nicht compliant. Darüber hinaus kam es in derselben Gruppe bei zwei Patienten zu den folgenden unerwünschten Ereignissen (*adverse event*, AE): Angina, Schwindel und Reflux. Bei einem weiteren Patienten musste innerhalb des vierwöchigen Studienzeitraums ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (*serious adverse event*, SAE) notiert werden: Es kam zu einer Blutung. In der Placebogruppe wurde die Intervention von einem Patienten zu früh abgebrochen. Bei drei Patienten wurden die folgenden AEs notiert: Schwindel und Juckreiz. Bei allen genannten AEs und SAEs ist ein Zusammenhang zum Prüfpräparat unwahrscheinlich.

3.2 Charakterisierung der Studienpopulation

3.2.1 Akutstudie

n=10 Patienten (9 Männer und 1 Frau), die an der Akutstudie teilnahmen, waren durchschnittlich $64,1 \pm 3,1$ Jahre alt, $173,8 \pm 3,1$ cm groß und $87,6 \pm 3$ kg schwer (siehe Tabelle 2).

3.2.2 Langzeitstudie

Die Kontrollgruppe, die das Placebo einnahm, bestand aus insgesamt n=26 Personen (davon 20 Männer und 6 Frauen). Diese waren durchschnittlich $65,7 \pm 2,7$ Jahre alt, $174,5 \pm 2,2$ cm groß und $90,4 \pm 3,3$ kg schwer. Die Gruppe, die das Verum einnahm, bestand aus n=26 Personen (davon 18 Männer und 8 Frauen). Diese waren im Durchschnitt $65,5 \pm 2,7$ Jahre alt, $173,1 \pm 1,9$ cm groß und $84,6 \pm 4,1$ kg schwer. Die Gruppen unterschieden sich in Bezug auf das Alter, die Größe und das Gewicht nicht. Auch bezüglich der erhobenen klinischen Routineparameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakterisierung der Akut- und der Langzeitstudie mit der Aufteilung in Placebo- und Flavanolgruppe und den p-Werten

Charakteristika:	Akut	Placebo	Flavanole	p-Wert
	n=10	n=26	n=26	
Alter (j)	64 ± 3	66 ± 3	65 ± 3	0,96
Größe (cm)	174 ± 3	174 ± 2	173 ± 2	0,63
Gewicht (kg)	88 ± 3	90 ± 3	85 ± 4	0,28
BMI (kg/m²)	29 ± 1	29 ± 1	28 ± 1	0,3
männliches Geschlecht (n)	9	20	18	0,54
Nephropathie (n)				
Hypertensive N.	2	10	7	0,39
Diabetische N.	3	7	4	0,32
Polyzystische N.	1	5	4	0,72
Glomerulonephritis	2	3	8	0,09
andere/gemischt	2	1	3	0,31
Dialysedauer (Monate)	22 ± 6	37 ± 5	52 ± 7	0,09
Bluthochdruck (n)	9	25	23	0,96
Diabetes (n)	4	13	6	0,15
Raucher (n)	2	4	8	0,25
Hypercholesterinämie (n)	3	14	10	0,63
Medikamente (n)				
ASS	5	15	11	0,28

Statine	6	12	12	1,0
AT-Blocker	3	10	6	0,16
ACE-Hemmer	4	3	6	0,38
β-Blocker	6	16	13	0,4
Ca-Kanal-Inhibitor	6	10	11	0,96
Diuretika	9	19	16	0,39

3.3 MIF-Plasmaspiegel sind bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhöht und korrelieren mit der Gefäßfunktion und der Gefäßsteifigkeit

Die Analysen zeigten erhöhte MIF-Level im Plasma bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz n=39 im Vergleich zu den Werten gesunder Probanden n=16 (p=0,009). In dem Kollektiv der Nierenkranken betragen die basalen MIF-Konzentrationen $83,8 \pm 28,4$ ng/ml (MW \pm SD). Im Vergleich dazu betragen die MIF-Konzentrationen der im Alter entsprechenden Gesunden nur $62,7 \pm 14,3$ ng/ml (siehe Abb. 7 unter A). Die zum Vergleich dienende Gruppe aus gesunden Probanden wurde innerhalb einer anderen Studie des eigenen Labors (Kardiologisches Labor, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) untersucht.

Zudem zeigte sich (siehe Abb. 7 unter B), dass diese erhöhten MIF-Konzentrationen mit der endothelialen Funktion, gemessen an der FMD, bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz signifikant korrelieren ($r = -0,43$, $p = 0,007$, $n = 39$).

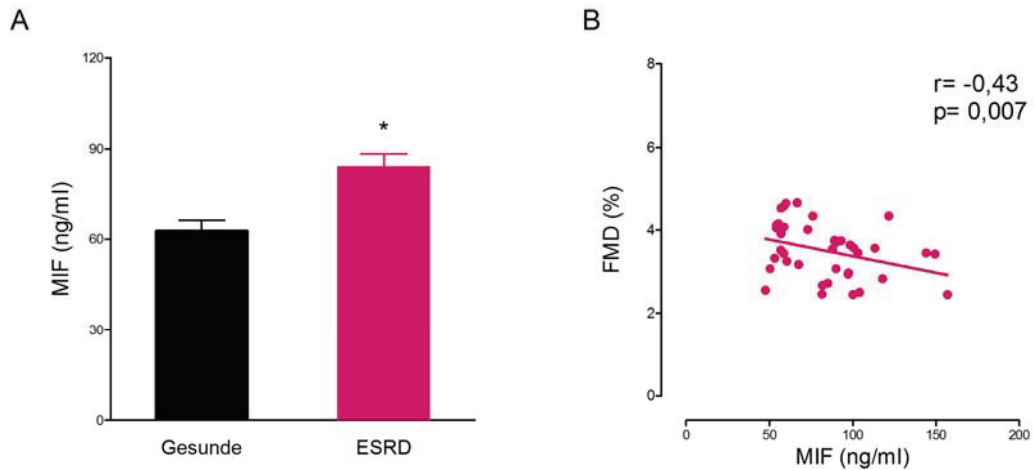


Abb. 7: MIF-Plasmaspiegel sind bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhöht und korrelieren mit der Gefäßfunktion (FMD).

(A) zeigt die im Vergleich zu Gesunden erhöhte MIF-Konzentration bei Niereninsuffizienten. (B) zeigt die signifikante negative Korrelation ($p=0,007$) zwischen den FMD-Werten und den MIF-Konzentrationen bei terminal Niereninsuffizienten (*end stage renal disease*, ESRD). [55]

Des Weiteren zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse, dass die zirkulierenden MIF-Konzentrationen eine statistisch signifikante Korrelation mit den Surrogatparametern der Gefäßsteifigkeit aufweisen. Es handelt sich hierbei um die Indikatoren, die mithilfe des SphygmoCor (AtCor Medical, Sydney, Australia) ermittelt wurden: den peripheren Pulsdruck (PP) und den normierten Augmentationsindex (AIx@75). Der periphere Pulsdruck ergab einen Korrelationswert (r) von 0,37 und einen p-Wert von 0,019 (siehe Abb. 8 unter A); der normierte Augmentationswert ergab einen Korrelationswert (r) von 0,42 und einen p-Wert von 0,028 (siehe Abb. 8 unter B).

Dagegen zeigte sich keine Korrelation zwischen den MIF-Leveln und der arteriellen Steifigkeit gemessen an der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ($p=0.299$).

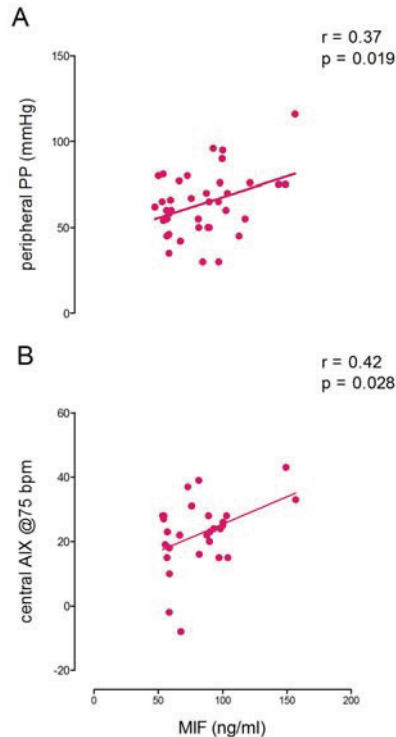


Abb. 8: MIF-Plasmaspiegel korrelieren mit den Parametern der Gefäßsteifigkeit.

(A) zeigt die Korrelationen zwischen den MIF-Konzentrationen und dem peripheren Pulsdruck (peripheral PP) und (B) die Korrelationen mit dem zentralen (auf eine einheitliche Herzfrequenz von 75 Schläge/min) normierten Augmentationsindex. [55]

3.4 Diätetische Flavanole verbessern die endotheliale Funktion

3.4.1 Akute Verbesserung der endothelialen Funktion

Die Gefäßfunktion der Patienten wurde anhand der FMD (flussvermittelte Dilatation der A. brachialis) gemessen. Der basale Wert, der zu Beginn des Studientags vor der Einnahme des Prüfpräparats aufgezeichnet wurde, betrug im Mittel $3,2 \pm 0,1$ %. Nach der Einnahme der Prüfpräparate zeigten sich in der Flavanolgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöhte FMD-Werte ($p < 0.0001$). Zum Zeitpunkt $t=1$ h ist der basale Wert in der Flavanolgruppe von 3,2 % auf 4,4 % gestiegen, zum Zeitpunkt $t=2$ h von 3,2 % auf 4,7 % (siehe Abb. 9).

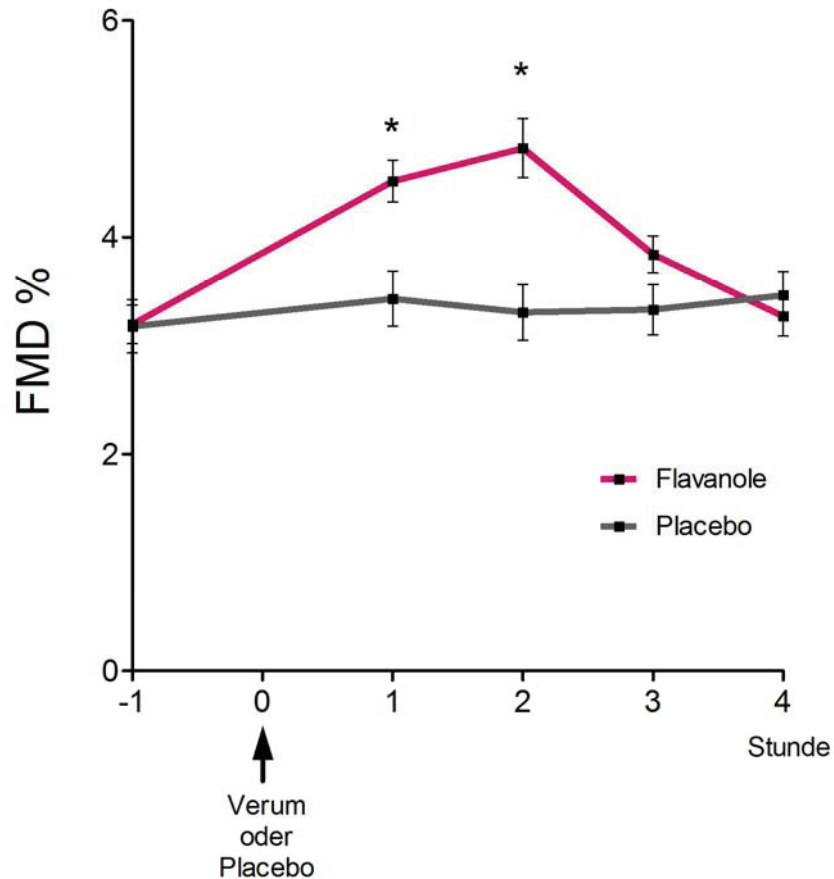


Abb. 9: Akute Verbesserung der FMD durch Flavanoleinnahme. Der Zeitpunkt $t=-1$ spiegelt die basale FMD-Messung wieder, der Zeitpunkt $t=0$ die Einnahme des jeweiligen Prüfpräparats. Zu den Zeitpunkten $t=1$ und $t=2$ kam es in der Flavanolgruppe zu einer signifikanten Zunahme der FMD im Vergleich zur Placebogruppe ($p < 0,0001$) ($*p < 0,05$).

3.4.2 Verbesserung der endothelialen Funktion nach chronischer Flavanoleinnahme

Die basale FMD der A. brachialis betrug in der Flavanolgruppe durchschnittlich $3,4 \pm 0,2$ % und in der Vergleichsgruppe $3,5 \pm 0,1$ % ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,6033$). Nach der 4-wöchigen Einnahme der Prüfsubstanz kam es in der Flavanolgruppe von $3,4 \pm 0,2$ % auf $3,9 \pm 0,2$ % im Vergleich zu der Placebogruppe (von $3,5 \pm 0,1$ % auf $3,5 \pm 0,1$ %) zu einer signifikanten Verbesserung der FMD ($p=0,0008$) (siehe Abb. 10).

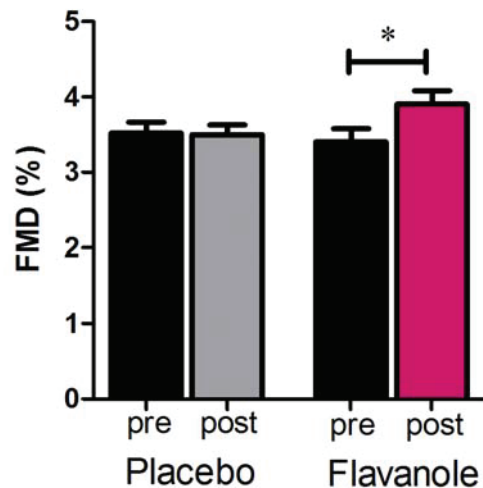


Abb. 10: Durch die chronische Flavanoleinnahme kam es zu einer signifikant verbesserten Gefäßfunktion. Die endotheliale Funktion der Patienten wurde anhand der FMD (flussvermittelte Dilatation der A. brachialis) gemessen. Die FMD der A. brachialis zeigt eine signifikante Verbesserung durch eine chronische, 4-wöchige Flavanoleinnahme (* $p < 0.05$).

3.5 Einfluss der Flavanolsupplementierung auf die Hämodynamik

3.5.1 Diätetische Flavanole zeigen keinen Effekt auf den Blutdruck oder die Herzfrequenz in der Akutstudie

In der Akutstudie zeigte sich kein Unterschied des mittleren Blutdrucks zwischen den zu vergleichenden Gruppen (siehe Abb. 11). Der mittlere Blutdruck betrug vor der Einnahme des Prüfpräparats in der Placebogruppe 96 ± 3 mmHg und nach der Einnahme zum Zeitpunkt $t=1$ 91 ± 3 mmHg. In der Verumgruppe lag der mittlere Blutdruck bei 92 ± 4 mmHg und zum Zeitpunkt $t=1$ bei 96 ± 3 mmHg.

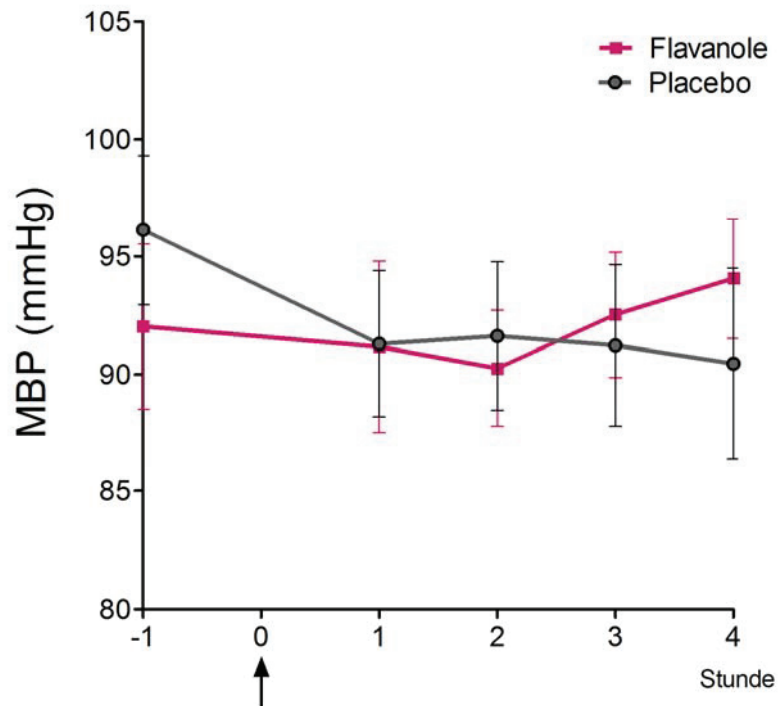


Abb. 11: Es kam zu keiner akuten Veränderungen des Blutdrucks.

Die Abbildung zeigt die Effekte der einmaligen Flavanoleinnahme auf den peripheren Blutdruck der Patienten (n=10).

In Bezug auf die Herzfrequenz konnte in der Akutstudie kein Unterschied zwischen den beiden zu vergleichenden Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 12). In der Placebogruppe betrug die mittlere Herzfrequenz vor der Einnahme des Prüfpräparats 74 ± 4 Schläge/min und nach der Einnahme zum Zeitpunkt $t=1$ 71 ± 5 Schläge/min. In der Flavanolgruppe lag die mittlere Herzfrequenz basal bei 72 ± 4 Schläge/min und zum Zeitpunkt $t=1$ bei 74 ± 4 Schläge/min.

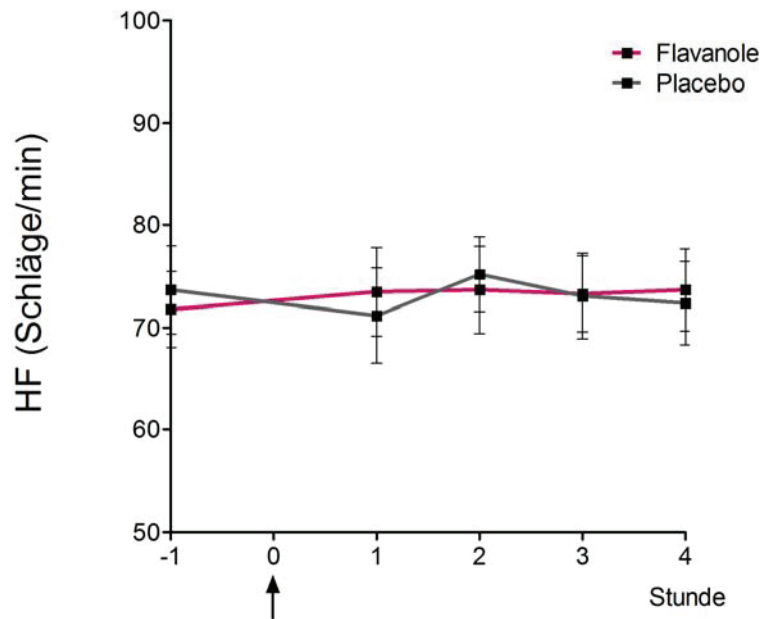


Abb. 12: Es kam zu keiner akuten Veränderung der Herzfrequenz durch die Flavanoleinnahme. Herzfrequenz gemessen in Schlägen pro Minute (Schläge/min) beider Gruppen.

3.5.2 Reduktion des diastolischen Blutdrucks nach chronischer Flavanoleinnahme

Die Messung des systolischen Blutdrucks zeigte kein Unterschied zwischen der Flavanolgruppe (von 139 ± 4 mmHg auf 142 ± 4 mmHg) und der Placebogruppe (von 136 ± 3 mmHg auf 138 ± 4 mmHg) nach der 4-wöchigen Intervention ($p=0,8$) (siehe Abb. 13 unter A).

Der diastolische Blutdruck hingegen sank in der Flavanolgruppe (von 73 ± 2 mmHg auf 69 ± 2 mmHg) im Vergleich zu der Placebogruppe (von 70 ± 2 mmHg auf 73 ± 3 mmHg) nach der 4-wöchigen Intervention ($p=0,03$) (siehe Abb. 13 unter B).

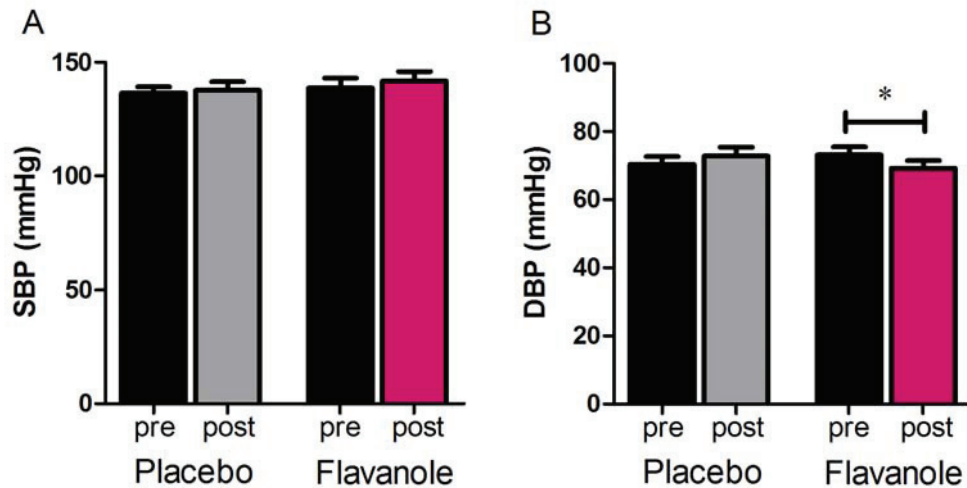


Abb. 13: Durch die chronische Flavanoleinnahme konnte der diastolische Blutdruck gesenkt werden, wohingegen der systolische Wert unverändert blieb. Die Abbildung bildet die Effekte der chronischen Supplementierung von Flavanolen auf den peripheren Blutdruck der Patienten ab. (A) zeigt den systolischen Blutdruck (SBP), der nicht beeinflusst werden konnte; (B) zeigt den diastolischen Blutdruck (DBP), der gesenkt werden konnte (* $p < 0.05$).

Die Herzfrequenz stieg in der Flavanolgruppe (vorher: 70 ± 2 Schläge/min, nachher: 74 ± 3 Schläge/min) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (vorher: 75 ± 3 Schläge/min, nachher: 74 ± 3 Schläge/min) nach der 4-wöchigen Intervention an ($p=0,01$) (siehe Abb. 14).

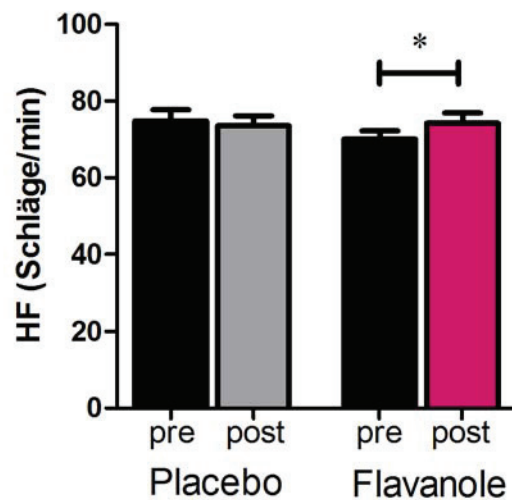


Abb. 14: Nach der chronischen Flavanoleinnahme zeigte sich ein Anstieg der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz stieg durch eine chronische 4-wöchige Flavanoleinnahme (* $p < 0.05$) an, während sich in der Kontrollgruppe keine Veränderung zeigte.

3.6 Diätetische Flavanole zeigen keinen Effekt auf die Pulswellengeschwindigkeit

Die Messung der Pulswellengeschwindigkeit ergab keinen Unterschied zwischen der Flavanolgruppe (von $11,9 \pm 1,1$ m/s auf $11,0 \pm 0,9$ m/s) und der Vergleichsgruppe (von $12,4 \pm 0,9$ m/s auf $12,0 \pm 1,1$ m/s) nach der 4-wöchigen Intervention ($p=0,32$).

3.7 Die 4-wöchige Flavanoleinnahme zeigte keinen Effekt auf die Intima-Media-Dicke

Bezüglich der Messung der Intima-Media-Dicke zeigte sich kein Unterschied zwischen der Flavanolgruppe (von $0,81 \pm 0,02$ mm auf $0,79 \pm 0,02$ mm) und der Kontrollgruppe (von $0,81 \pm 0,02$ mm auf $0,81 \pm 0,02$ mm) nach der 4-wöchigen Intervention ($p=0,28$) (siehe Abb. 15).

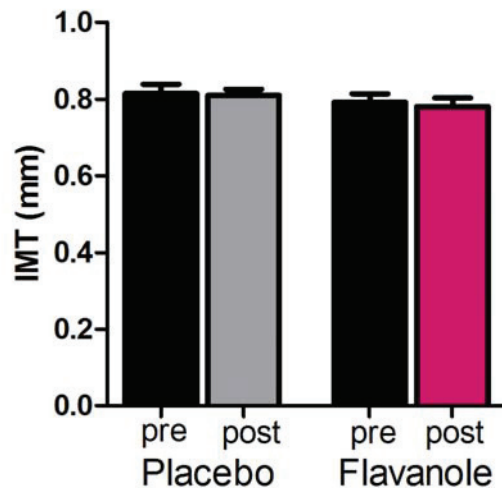


Abb. 15: Die Intima-Media-Dicke zeigte keine Veränderung nach der 4-wöchigen Flavanoleinnahme.

3.8 Die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma werden durch eine Supplementierung von Flavanolen nicht beeinflusst

3.8.1 Diätetische Flavanole zeigen keinen akuten Effekt auf die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma

Die Messungen der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat innerhalb der Akutstudie ergaben keine signifikanten Veränderungen nach der Einnahme des Prüfpräparats (siehe Abb. 16).

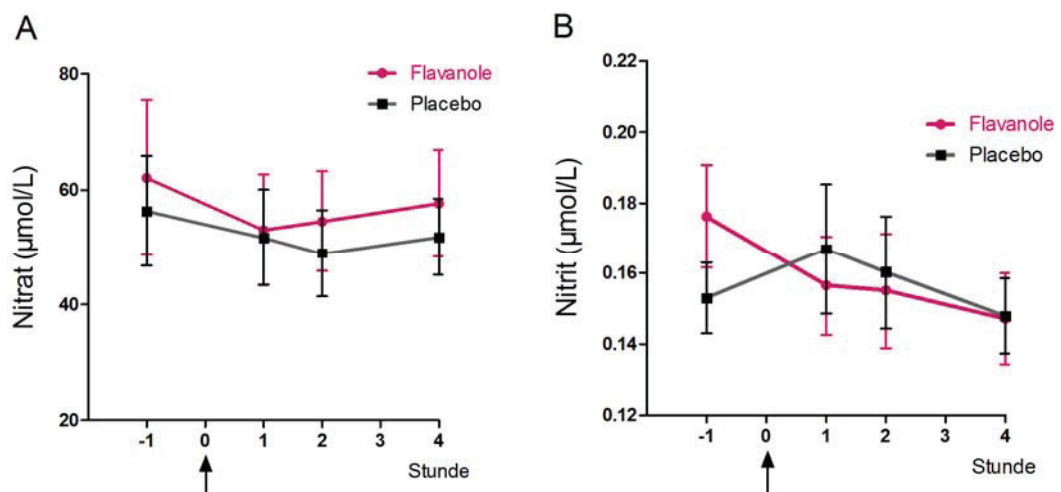


Abb. 16: Die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit werden durch die akute Flavanoleinnahme nicht beeinflusst. (A) zeigt die Konzentration von Nitrat und (B) die

Konzentration von Nitrit jeweils in $\mu\text{mol/L}$. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Einnahme des jeweiligen Prüfpräparats.

3.8.2 Diätetische Flavanole zeigen keinen Effekt nach chronischer Einnahme auf die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma

Die Nitritkonzentrationen des Plasmas zeigten kein Unterschied zwischen der Flavanolgruppe (von $0,31 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ auf $0,33 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$) und der Kontrollgruppe (von $0,34 \pm 0,05 \mu\text{mol/L}$ auf $0,35 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$) nach der 4-wöchigen Intervention ($p=0,49$) (siehe Abb. 17 unter A).

Bezüglich der Nitratkonzentrationen des Plasmas zeigte sich kein Unterschied zwischen der Flavanolgruppe (von $57,5 \pm 4,9 \mu\text{mol/L}$ auf $71,7 \pm 11,8 \mu\text{mol/L}$) und der Kontrollgruppe (von $84,5 \pm 11,8 \mu\text{mol/L}$ auf $76,8 \pm 8,0 \mu\text{mol/L}$) nach der 4-wöchigen Einnahme ($p=0,12$) (siehe Abb. 17 unter B).

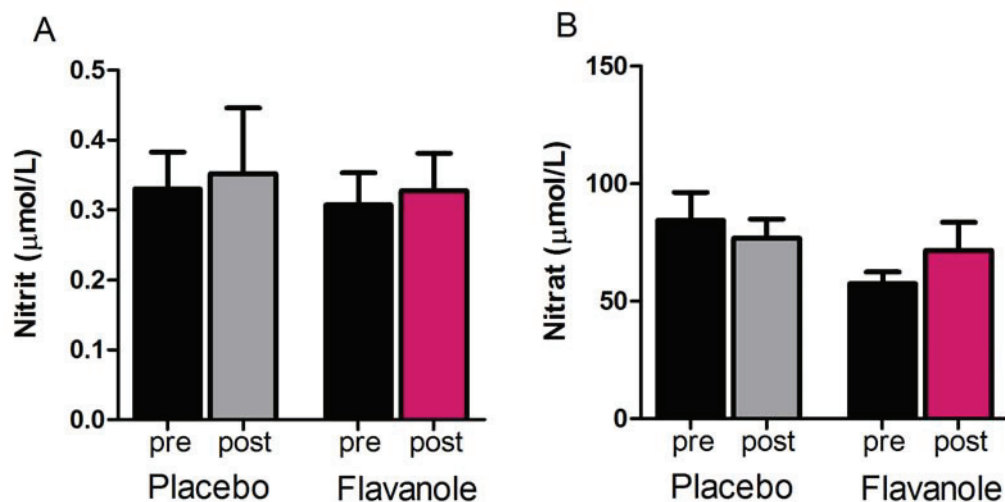


Abb. 17: Die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat werden durch die chronische Flavanoleinnahme nicht beeinflusst. (A) zeigt die Konzentration von Nitrit und (B) die Konzentration von Nitrat jeweils in $\mu\text{mol/L}$.

3.9 Anstieg der Flavanolmetabolite im Plasma der Patienten durch die Supplementierung von Flavanolen

3.9.1 Nachweis der Flavanolmetabolite im Plasma und deren Anstieg in der Akutstudie

Die nachgewiesenen Konzentrationen der strukturell ähnlichen Epicatechinmetabolite (*structurally related (-)-epicatechin metabolites*, SREM) zeigten, dass es im Verlauf eines Studientags der Akutstudie zu einem Anstieg der unterschiedlichen Metabolite kam (siehe Abb. 18). Die höchste Konzentration konnte zu jedem Zeitpunkt vom Epicatechin-3-glucuronid (E3G) festgestellt werden.

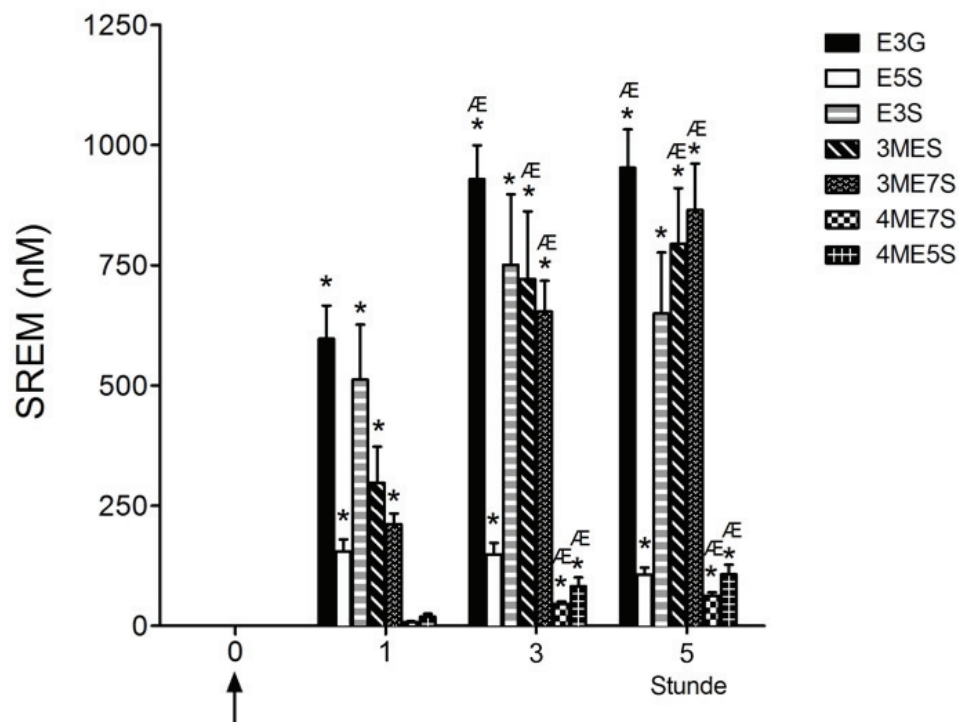


Abb. 18: Nach der akuten Flavanoleinnahme konnte ein Anstieg der Metabolite gemessen werden. Die Abbildung zeigt die Konzentrationen der Epicatechinmetabolite im zeitlichen Verlauf eines Studientags der Akutstudie. Der Pfeil zeigt die Einnahme des jeweiligen Prüfpräparats an (*p <0.05). [56]

3.9.2 Nachweis der Flavanolmetabolite im Plasma und deren Anstieg nach der chronischen Einnahme

Die Konzentrationsmessungen in der Langzeitstudie ergaben eine signifikante Zunahme der im Plasma nachgewiesenen Epicatechinmetabolite nach der 4-

wöchigen Einnahme in der Flavanolgruppe (siehe Abb. 19). Der basal gemessene Wert für die Konzentration von 3ME5S (3-Methylepicatechin-5-sulfat) lag bei $8,6 \pm 9$ nM und stieg nach der 4-wöchigen Flavanoleinnahme signifikant auf eine Konzentration von $885,7 \pm 108$ nM ($p < 0.05$) an.

3ME7S (3-Methylepicatechin-7-sulfat) stieg vom Basalwert $36,9 \pm 16$ nM auf $639,3 \pm 138$ nM an, während die basal gemessene Konzentration des E3S (Epicatechin-3-sulfat) von $0,8 \pm 0,8$ nM auf $200,8 \pm 95$ nM ($p < 0.05$) anstieg.

Die Ausgangskonzentration von E5S (Epicatechin-5-sulfat) lag bei $17,9 \pm 11$ nM; nach 4-wöchiger Einnahme von Flavanolen lag die Konzentration bei $240,5 \pm 81$ nM ($p < 0.05$). E3G (Epicatechin-3-glucuronid) stieg von $12,7 \pm 8$ nM auf $759,8 \pm 247$ nM ($p < 0.05$).

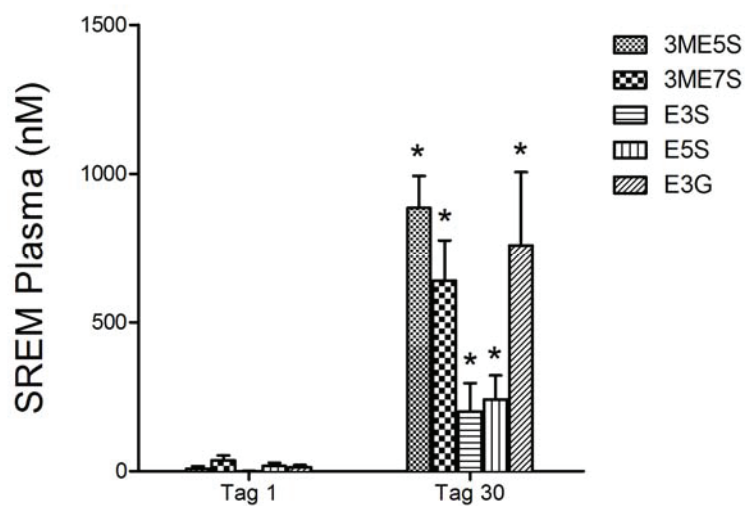


Abb. 19: Die 4-wöchige Flavanoleinnahme führt zu einer signifikanten Zunahme der Flavanolmetabolite im Plasma der Patienten. Diese Abbildung veranschaulicht die niedrigen Konzentrationen von Flavanolen am ersten Tag der Studie und die signifikant erhöhten am letzten Tag derselben (* $p < 0.05$).

3.10 Laborchemische Routineparameter bleiben nach der Supplementierung von Flavanolen unverändert

Die klinischen Routineparameter zeigten weder basal noch nach 4-wöchiger Intervention signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Einfluss der Einnahme von Flavanolen auf die klinischen Routineparameter

Parameter:	Flavanole		Placebo		p
	V1	V2	V1	V2	
CRP (mg/dl)	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,77
Kreatinin (mg/dl)	8,3 ± 0,5	8,4 ± 0,6	7,5 ± 0,5	7,8 ± 0,5	0,42
Cystatin C (mg/dl)	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,2	0,86
Kalium (mmol/l)	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,0 ± 0,1	0,06
Homocystein (µmol/l)	44,6 ± 4,7	48,0 ± 4,4	36,2 ± 1,7	39,6 ± 2,1	0,53
BNP (pg/ml)	10901±2299	10080±2195	7048±1787	5282±1242	0,63
Troponin (µg/l)	62,6 ± 9,4	66,6 ± 10,3	61,5 ± 8,0	62,9 ± 8,1	0,93
Gesamteiweiß (g/dl)	7,0 ± 0,1	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2	6,9 ± 0,1	0,65

Die Tabelle zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Routineparameter CRP, Kreatinin, Cystatin C, Kalium, Homocystein, BNP, Troponin und Gesamteiweiß.

3.11 Keine Auffälligkeiten in den Ernährungsprotokollen der Patienten

In der Analyse der Ernährungsprotokolle der Patienten konnten keine Auffälligkeiten bezüglich der Aufnahme flavanolreicher Produkte wie Schokolade, Rotwein, Obst etc. festgestellt werden.

3.12 Ergebnisse des Gesundheitsfragebogens SF-36

Die Analyse des Gesundheitsfragebogens SF 36 zeigte weder basal noch nach 4-wöchiger Intervention signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: : Der Einfluss der Flavanoleinnahme auf den Gesundheitszustand der Patienten gemessen mithilfe des SF-36

Skalen:	Kontrolle	Kontrolle	Flavanole	Flavanole	p
	V1	V2	V1	V2	
<i>Körperliche Funktionsfähigkeit</i>	55,2 ± 6,5	55,0 ± 5,6	64,0 ± 4,6	66,9 ± 4,5	0,3
<i>Körperliche Rollenfunktion</i>	42,3 ± 9,0	51,0 ± 8,6	56,3 ± 8,3	69,8 ± 7,6	0,26
<i>Körperliche Schmerzen</i>	74,9 ± 6,5	76,3 ± 5,9	79,8 ± 5,9	88,3 ± 4,3	0,28
<i>Allg. Gesundheitswahrnehmung</i>	50,0 ± 3,5	49,3 ± 3,7	52,8 ± 3,5	46,0 ± 4,6	0,41
<i>Vitalität</i>	53,7 ± 4,0	59,0 ± 3,7	54,8 ± 3,6	51,2 ± 4,0	0,3
<i>Soziale Funktionsfähigkeit</i>	87,0 ± 4,5	87,0 ± 4,2	88,5 ± 2,5	87,5 ± 3,2	0,37
<i>Emotionale Rollenfunktion</i>	84,6 ± 7,2	83,3 ± 7,5	80,3 ± 7,7	86,1 ± 6,4	0,5
<i>Psychisches Wohlbefinden</i>	83,0 ± 2,9	81,1 ± 3,5	83,0 ± 2,8	79,7 ± 3,1	0,79
<i>Körperliche Summenskala</i>	36,9 ± 2,6	37,8 ± 2,4	41,1 ± 2,1	43,0 ± 1,8	0,58
<i>Psychische Summenskala</i>	56,7 ± 2,1	56,3 ± 2,0	54,9 ± 1,7	53,1 ± 1,7	0,99

In der Tabelle sind die Mittelwerte der acht Subskalen und der zwei Summenskalen aufgeführt, die in den jeweiligen Gruppen sowohl vor (Visite 1) als auch nach (Visite 2) der 4-wöchigen Intervention evaluiert wurden. In der rechten Spalte sind die jeweils zugehörigen p-Werte aufgeführt.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits, den Stellenwert des inflammatorischen Zytokins MIF bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu charakterisieren. Andererseits sollte der Effekt einer akuten und chronischen diätetischen Flavanoleinnahme auf die Gefäßfunktion bei diesen Patienten untersucht werden. Dafür wurde den Patienten ein flavanolreiches Getränk verabreicht und die endotheliale Funktion mittels FMD gemessen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist die MIF-Konzentration im Plasma erhöht und korreliert mit der endothelialen Funktion der A. brachialis und der arteriellen Gefäßsteifigkeit.
2. Bereits eine kurzzeitige diätetische Einnahme von Flavanolen bei terminaler Niereninsuffizienz vermindert die endotheliale Dysfunktion.
3. Eine chronische diätetische Supplementierung von Flavanolen bei terminaler Niereninsuffizienz kann die vaskuläre Funktion verbessern und den diastolischen Blutdruck senken. Zudem kommt es zu einem Anstieg der Herzfrequenz.

Im Folgenden wird zunächst auf das vorliegende Studienkollektiv im Speziellen (4.1) und im Anschluss auf die erhöhten MIF-Konzentrationen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Allgemeinen (4.2) eingegangen. Anschließend werden die Effekte eines flavanolreichen Getränks auf die vaskuläre Funktion (4.3) und auf den Blutdruck (4.4) diskutiert. Daraufhin werden die Messungen sowohl der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat (4.5) als auch der Flavanolmetabolite (4.6) im Plasma der Patienten betrachtet. Im letzten Abschnitt (4.7) werden schließlich die Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Arbeit dargestellt sowie weiterführende Fragestellungen benannt.

4.1 Bewertung des Studienkollektivs

Das in dieser Arbeit vorliegende Studienkollektiv niereninsuffizienter Patienten zeigte innerhalb der zwei zu vergleichenden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Bezüglich der basalen Charakteristika wie Alter, Größe, Gewicht, Dialysedauer und Laborwerte (siehe Tabelle 2) unterschieden sich die Gruppen nicht.

Des Weiteren ist das vorliegende Patientenkollektiv repräsentativ für die terminal niereninsuffiziente Population. Dies wird durch die gemessenen klinischen Parameter wie Kreatinin, Troponin, BNP (B-natriuretisches Peptid) und der Dialysedauer wiedergespiegelt [57, 58].

Zudem blieben die klinischen Routineparameter einschließlich der Nierenparameter in der vorliegenden Studie konstant. Dies zeigt, dass die durchgeführte Supplementierung von Flavanolen eine sichere Methode darstellt, die endotheliale Dysfunktion zu vermindern und damit der Atherosklerose entgegenzuwirken.

Bei Niereninsuffizienten unterliegt das kardiovaskuläre System einem verfrühten und damit beschleunigten Alterungsprozess [59]. Diesbezüglich werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen angenommen, die zu dieser Gefäßalterung führen. Hierbei gelten die erhöhten Belastungen durch oxidativen Stress und Inflammation sowie verminderte Gegenregulationsmechanismen als relevant [59].

4.2 Einfluss der terminalen Niereninsuffizienz auf die zirkulierende MIF-Konzentration

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MIF-Konzentration im Plasma bei terminal niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ist. Dieses Ergebnis wird durch andere Studien bestätigt, die ebenfalls erhöhte MIF-Konzentrationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nachweisen konnten [60].

Diese Erkenntnis wird durch die Annahme bekräftigt, dass MIF eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Atherosklerose aufweist [61]. Terminal niereninsuffiziente Patienten leiden vermehrt an oxidativem Stress und einem dadurch erhöhten Gefäßschaden [11]. In Situationen mit erhöhter Inflammation und vermehrtem oxidativen Stress kommt es zur Erhöhung der Konzentration von Zytokinen im

Plasma. Dies könnte die Ursache der beim vorliegenden Studienkollektiv erhöhten MIF-Konzentrationen sein [11, 60].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zirkulierenden MIF-Konzentrationen mit der endothelialen Funktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz korrelieren. Die endotheliale Dysfunktion gilt als eines der frühesten Phänomene bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Sie geht mit einer beeinträchtigten Regulation des Gefäßtonus einher. Durch oxidativen Stress und Inflammation, beides bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bekannt [11], wird die endotheliale Dysfunktion aufrecht erhalten. Somit steigen die MIF-Konzentrationen an, während sich die endotheliale Funktion zunehmend verschlechtert.

Zudem scheint die endotheliale Dysfunktion in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren prognostisch relevant zu sein [62]. Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komorbiditäten auf, das vor allem durch beschleunigte atherosklerotische Prozesse bedingt ist [3, 63]. Vor dem Hintergrund der experimentellen Daten zum Einfluss von MIF auf die Inflammation in der arteriellen Gefäßwand liegt die Überlegung nahe, dass die erhöhten MIF-Spiegel bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu einem Progress der KHK bei dieser Patientenpopulation beitragen [6].

Fraglich bleibt, ob MIF durch Verfahren wie beispielsweise die Dialyse beeinflussbar ist. Diese Frage stellt sich vor allem, da die Patienten der Studie der intermittierenden Hämodialyse unterlagen. Diese kann durch ihre hohe Blutreinigungs- und Filterfunktion auch MIF aus dem Plasma filtern. Diese Tatsache könnte damit einen vorteilhaften Einfluss auf die erhöhten MIF-Level nehmen [64]. Hierfür müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.3 Effekte der Flavanoleinnahme auf die vaskuläre Funktion

Eine anhaltend eingeschränkte Nierenfunktion schädigt langfristig die Gefäße und das Gewebe. Sie führt schließlich zu dauerhaftem Organschaden. Den ersten Angriffspunkt in diesem Prozess stellen vor allem die Gefäße dar. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Diese wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit mittels FMD gemessen und konnte durch die Verabreichung eines flavanolreichen Getränks effektiv verbessert werden [56].

In der primären Prävention kardiovaskulärer Krankheiten stellt die Ernährung einen bedeutenden Faktor dar [65]. Studien haben gezeigt, dass eine Ernährung, die reich an Obst und Gemüse ist, das Risiko, an kardiovaskulären Krankheiten zu erkranken, senken kann [66, 67]. Der genaue Mechanismus, wie eine obst- und gemüsereiche Ernährungsweise positive Gesundheitseffekte bewirken kann, ist bislang noch unklar [68].

Flavanole sind vor allem in Obst und Gemüse, aber auch in Kakao, Tee und Rotwein enthalten. Die flavanolreichsten Quellen sind Schokolade und Kakao mit Konzentrationen von 920–1220 mg/100 g, Äpfel mit Konzentrationen von bis zu 120 mg/200 g und Tee mit Flavanolkonzentrationen von 300 mg/Aufguss. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Flavanolmetabolite erheblich variieren kann [34, 69].

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Flavaneinnahme und einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht [70]. Diese Annahme wird durch Studien unterstützt, die eine Verbesserung der Surrogatparameter wie der endothelialen Funktion [41, 46, 71-73] und des Blutdrucks [74, 75] durch eine Einnahme von Flavanol zeigen. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass Flavane vorteilhafte Effekte auf die endotheliale Funktion [72, 76] und damit auch auf das gesamte kardiovaskuläre System haben [77]. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden. In beiden durchgeführten Studien der vorliegenden Arbeit konnte die FMD durch die diätetische Einnahme von Flavanol signifikant verbessert werden. In der Akutstudie konnte sowohl eine als auch zwei Stunden nach der Flavaneinnahme eine Zunahme der FMD im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Zunahme bestätigte sich auch in der Langzeitstudie, in der die FMD durch die chronische Flavaneinnahme um 18 % der gemessenen Ausgangs-FMD verbessert worden ist.

Dieser Effekt wurde auch in einer Studie beschrieben, die Patienten mit Diabetes mellitus nach einer Flavangabe mittels FMD-Messung untersuchte [46]. Es wurde eine Tagesgesamtdosis von 963 mg Flavanol zugeführt [46]. In dieser Studie konnten ebenfalls sowohl eine akute Verbesserung der FMD von 3.7 auf 5.5 % als auch eine chronische Verbesserung der FMD um 30 % durch die Supplementierung von Flavanol beschrieben werden [46]. In einer weiteren vergleichbaren Studie zeigten sich ebenfalls signifikant verbesserte FMD-Werte von insgesamt 47 %.

Diese Studie wurde mit insgesamt n=16 Patienten mit koronarer Herzkrankheit durchgeführt. Über 30 Tage nahmen die herzkranken Patienten in zufälliger Reihenfolge ein flavanolreiches Kakaotrunk und nach einer Auswaschphase von einer Woche ein flavanolarmes Kakaotrunk ein [45]. In dieser Studie wurde eine Gesamtdosis von 750 mg Flavanolen pro Tag verabreicht [45].

Trotz vergleichbar hoher Konzentrationen an Flavanolen (820 mg), die verabreicht wurden, war die FMD-Zunahme um 18 % in der hiesigen Arbeit im Vergleich zu anderen Ergebnissen scheinbar gering [45, 46]. Fraglich ist, ob die vermeintlich geringe Verbesserung dennoch biologisch relevant ist. Interessanterweise zeigen Studien, welche die durch eine chronische Verabreichung erzielten Effekte kardiovaskulär potenter Medikamente wie ACE-Hemmer auf die endotheliale Funktion untersuchten, FMD-Verbesserungen von nur 1-2 % [78, 79].

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Studien mit den Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit durch eine chronische Einnahme von Flavanolen erzielt werden konnten, wird deutlich, dass Flavanole sogar einen höheren Effekt auf die Verbesserung der FMD haben als im klinischen Alltag verwendete Medikamente.

Eine weitere Komponente der Gefäßveränderungen bei terminal niereninsuffizienten Patienten stellt die Zunahme der IMT dar [80]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Veränderung derselben nach der chronischen Supplementierung von Flavanolen beobachtet werden. Dafür könnte das in dieser Studie gewählte Interventionsintervall von 30 Tagen verantwortlich sein. Um messbare Veränderungen der IMT zu erhalten, sind Untersuchungen über mehrere Monate bis Jahre hinweg notwendig [81]. Zudem erhielten die Patienten in den dazu durchgeführten Studien keine Flavanole, sondern zumeist Medikamente. Hierbei handelte es sich um lipidsenkende oder auch um blutdrucksenkende und antidiabetische Medikamente [81]. Welche Auswirkungen eine Supplementierung von Flavanolen auf die IMT haben kann, muss in weiteren Studien mit längeren Interventionsintervallen getestet werden.

Ein weiterer relevanter Faktor der Gefäßfunktion ist die arterielle Gefäßsteifigkeit, die mittels der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) dargestellt wird [24]. Verschiedene Studien konnten bereits nachweisen, dass die arterielle Gefäßsteifigkeit bei Dialysepatienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist

[22]. Im Interventionszeitraum dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie konnte kein Effekt festgestellt werden. Längere Einnahmezeiträume könnten allerdings gegebenenfalls andere Ergebnisse zeigen.

Die arterielle Gefäßsteifigkeit kann von strukturellen und funktionellen Veränderungen beeinflusst werden [82]. Dazu zählen die Beschaffenheit der arteriellen Gefäßwand und Veränderungen sowohl des Blutdrucks als auch ganz besonders der Herzfrequenz [83]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen Anstieg der Herzfrequenz nach der vierwöchigen Supplementierung von Flavanolen. Diese Beobachtung erklärt wahrscheinlich, warum es zu keiner sichtbaren Veränderung der PWV kam. Bestätigt wird diese Hypothese durch die folgende Erkenntnis: Wird die PWV auf eine einheitliche Herzfrequenz von 75 Schlägen/min normiert, kommt es zu signifikant reduzierten Werten der PWV in der Flavanolgruppe (von $13,5 \pm 1,5$ m/s auf $11,5 \pm 1,1$ m/s, $p=0,02$). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die arterielle Gefäßsteifigkeit stark von der Herzfrequenz beeinflusst wird.

4.4 Effekte der Flavanoleinnahme auf den Blutdruck

Mikrovaskuläre Funktionsstörungen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz führen zu einer beeinträchtigten Widerstandsregulation der Gefäße, welche im vorliegenden Studienkollektiv letztlich zur Entwicklung von Bluthochdruck beiträgt [84].

In der Langzeitstudie konnte eine Abnahme des diastolischen Blutdrucks von 4 mmHg beobachtet werden. Es existieren vergleichbare Beobachtungen in anderen Studien [76, 85]. Eine dieser Studien wurde mit gesunden Probanden durchgeführt, welche in fünf aufeinander folgenden Wochen pro Woche stetig ansteigende Flavanolkonzentrationen einnahmen [76]. Die Ergebnisse zeigen sowohl eine Abnahme des diastolischen Blutdrucks um 3 mmHg als auch eine Abnahme des systolischen Blutdrucks um 4,8 mmHg [76]. Eine vergleichbare Studie wurde mit $n=28$ gesunden und jungen Fußballspielern, die über zwei Wochen täglich einen flavanolreichen Schokoladenriegel zusätzlich zu ihrer gewöhnlichen Ernährung verzehrt haben, durchgeführt. In dieser Studie konnte eine Senkung des diastolischen Blutdrucks um 5 mmHg und eine Senkung des mittleren Blutdrucks um 5 mmHg festgestellt werden [85].

Gemeinsam mit vorherigen Ergebnissen anderer Studien legen diese Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass Flavanole einen blutdrucksenkenden Effekt besitzen [39].

In der vorliegenden Arbeit blieb der systolische Blutdruck nach der chronischen Supplementierung von Flavanolen unbeeinträchtigt. Diese Beobachtung könnte mit der erhöhten Gefäßsteifigkeit durch eine extreme Kalzifizierung der Gefäße bei niereninsuffizienten Patienten erklärt werden [86]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten, die sich einer Langzeitdialyse unterziehen, beschleunigte Atheroskleroseprozesse aufweisen [87].

Ferner weisen Studien auf einen altersabhängigen Abfall des diastolischen Blutdrucks hin [88]. Eine erhöhte Gefäßsteifigkeit scheint für die Reduzierung des diastolischen Blutdrucks ab dem 60. Lebensjahr verantwortlich zu sein [88]. Sie geht mit einer verminderten Kapazität der Reservoirgefäße einher [88]. Dadurch befindet sich weniger Blut in den Speichergefäßen, was schließlich zu verminderten diastolischen Blutdruckwerten führt [88]. Da Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine vermehrte Gefäßsteifigkeit aufweisen, wäre dies eine mögliche Begründung für einen insgesamt verminderten diastolischen Blutdruck. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich die verminderten diastolischen Blutdruckwerte allerdings erst nach der 4-wöchigen Intervention. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die beobachtete Senkung des diastolischen Blutdrucks auf die Flavanoleinnahme und nicht auf einen generellen altersbedingten Abfall der diastolischen Werte zurückzuführen ist.

4.5 Effekte der Flavanole auf die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat

Die verschiedenen pharmakologischen Mechanismen einer Supplementierung von Flavanolen, die zu den vorteilhaften Effekten auf die Gefäßfunktion führen, sind bisher noch nicht ausreichend geklärt. Die vaskulären Effekte der Flavanole sollen in einer erhöhten Aktivität der NO-Synthase, die für ein erhöhtes Angebot an bioaktivem NO sorgt, in Endothelzellen begründet liegen [89-91]. Des Weiteren gibt es Studien, die eine durch den Verzehr von Flavanolen bedingte gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit messen konnten [41, 92].

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Effekte auf die Nitrat- und Nitritwerte im Plasma beobachtet.

Interessanterweise konnte Janero et al. zeigen, dass es bei der Messung der Nitrat- und Nitritlevel einige bedeutende Störfaktoren gibt, die zu intraindividuell unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zu diesen Faktoren gehören nicht nur die Ernährung, Medikamente und Darmbakterien, sondern auch die renale Funktion [93]. Dies könnte der Grund dafür sein, dass es in dem vorliegenden Studienkollektiv bezüglich der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat zu keinen messbaren Unterschieden nach der Einnahme des flavanolreichen Getränks kam.

NO, das aus L-Arginin synthetisiert wird, ist maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Die NO-Synthase kann durch endogenes asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) inhibiert werden. Da ADMA zu Teilen über die Niere ausgeschieden wird, liegt es bei terminal Niereninsuffizienten im Plasma in erhöhten Konzentrationen vor. Die Akkumulation von endogenen Inhibitoren wie ADMA führt schließlich zu einer beeinträchtigten NO-Synthase, die auch für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich zu sein scheint [94, 95]. Diese Erkenntnis könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, dass es bei dem vorliegenden Studienkollektiv zu keinen messbaren Veränderungen der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat kam.

Des Weiteren zeigten sich in der hiesigen Arbeit keine Einflussnahme auf Entzündungsparameter und auch keine auf den myokardialen Ischämieparameter Troponin. Warum die Entzündungsparameter unbeeinflusst blieben, könnten die Ergebnisse einiger experimenteller Untersuchungen erklären: Es gibt Hinweise darauf, dass Flavanole die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren reduzieren können [96, 97]. Folglich werden weniger Interleukine produziert und es werden weniger Sauerstoffradikale freigesetzt. Zudem konnte beobachtet werden, dass Flavanole die Ausschüttung von Zytokinen wie die des Tumornekrosefaktors alpha modulieren können [98, 99]. Damit weisen Flavanole anti-inflammatorische Wirkungen auf.

Es erfordert spezielle Untersuchungen, um eine mögliche Einflussnahme der Flavanole auf die genannten Faktoren auf zellulärer und subzellulärer Ebene in diesem Kollektiv untersuchen zu können. Hierfür müssen weitere Studien durchgeführt werden.

4.6 Flavanolmetabolite im Plasma terminal niereninsuffizienter

Patienten

In der vorliegenden Arbeit konnten nach Einnahme eines flavanolreichen Getränks Flavanolmetabolite im Plasma nachgewiesen werden [56]. Dieser Nachweis gelang sowohl nach einmaliger als auch nach chronischer Einnahme des flavanolreichen Getränks.

Hierin stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit bisher veröffentlichten Erkenntnissen überein. Schroeter et al. verabreichte gesunden männlichen Probanden 917 mg Kakaoflavanole und konnte im Anschluss zirkulierende Flavanolmetabolite im Plasma der Probanden nachweisen. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Metabolit Epicatechin-7-O-glucuronid einen unabhängigen Prädiktor der vaskulären Effekte nach Flavanoleinnahme darstellt [72]. Ottaviani et al. konnte zeigen, dass die Flavanole in Abhängigkeit von ihrer stereochemischen Konfiguration in unterschiedlichen Mengen aufgenommen und metabolisiert wurden. Innerhalb dieser Studie nahmen gesunde männliche Probanden ein hochkonzentriertes Kakaoflavanolgetränk ein, das vier verschiedene Flavanolstereoisomere enthielt: (-)-epicatechin, (+)-epicatechin, (+)-catechin und (-)-catechin [100]. Obwohl die Ausgangskonzentration im Testpräparat für alle Stereoisomere mit 1,5 mg/kg Körpergewicht gleich war, wurden im Plasma unterschiedliche Konzentrationen der verschiedenen Metabolite nachgewiesen [100]. Des Weiteren zeigte sich, dass die höchste Konzentration aller Stereoisomere zwei Stunden nach Einnahme erreicht wurde und dass diese vier Stunden nach Einnahme bereits wieder abgesunken war [100]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es bezüglich der Absorption und des Metabolismus deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Flavanolisomeren gibt. Um eine suffiziente und langfristige Flavanolkonzentration im Plasma zu erreichen, müssen alle möglichen Einflussfaktoren bekannt sein. Neben der unterschiedlichen Absorption und dem unterschiedlichen Metabolismus spielt auch die Exkretion eine entscheidende Rolle. Diese drei Determinanten unterscheiden sich bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz von denen eines Gesunden. So zeigte sich bei den niereninsuffizienten Patienten nach einmaliger Einnahme von Flavanolen eine Steigerung der Flavanolkonzentration im Plasma [56]. Nach einer chronischen

Flavanoleinnahme konnte ebenfalls eine Zunahme der im Plasma gemessenen Flavanolkonzentration festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmen mit den Erkenntnissen anderer Studien überein, welche zeigen, dass der Metabolismus, die Anreicherung und die Ausscheidung für verschiedene Metabolite bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zu denen bei Gesunden unterschiedlich sind [101]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ebenfalls konform mit den Resultaten von Studien, die beobachteten, dass die Ausscheidungen der einzelnen Flavanolisomere unterschiedlich sind und von der Exkretionsrate des jeweiligen Flavanolmetaboliten abhängen [102].

Die Ernährungsprotokolle der Patienten haben gezeigt, dass die diätetische Intervention nicht durch andere Ernährungsgewohnheiten beeinflusst wurde. Schlussfolgernd bedeutet das, dass die Effekte, die sich bei den Patienten der Verumgruppe zeigten, auf die Flavanole des Prüfpräparats und auf keine anderen Flavanolquellen zurückzuführen sind.

Da Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz aufgrund ihrer Erkrankung eine eingeschränkte Lebensqualität aufweisen, war es ein weiteres entscheidendes Anliegen dieser Studie, mögliche Effekte auf das körperliche Wohlbefinden dieser Patienten zu untersuchen. Die Ergebnisse des SF 36-Fragebogens der vorliegenden Arbeit zeigten keine Veränderungen nach der 4-wöchigen Supplementierung von Flavanolen. Welche konkreten Auswirkungen eine chronische Einnahme von Flavanolen auf die Lebensqualität der Patienten haben könnte, ist noch nicht bekannt und müsste in weiteren Studien untersucht werden.

4.7 Klinische Bedeutung und Ausblick

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass bereits eine tägliche Einnahme von 820 mg Flavanolen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine Verbesserung der endothelialen Funktion bewirken kann. So konnte allein durch eine diätetische Intervention die Gefäßfunktion verbessert werden.

Die durchschnittliche Flavanoleinnahme eines Erwachsenen pro Tag wird auf 50–100 mg geschätzt [34, 103]. Für einen protektiven Effekt auf die Gesundheit eines gesunden Erwachsenen müsste laut der European Food Safety Authority (EFSA, 2012) eine tägliche Konzentration von 200 mg Flavanolen eingenommen werden. Diese Empfehlungen wurden für die gesunde Allgemeinbevölkerung ausgesprochen. Studien zeigen, dass bei bereits schwer erkrankten Personen höhere Konzentrationen eingenommen werden sollten, um einen positiven biologischen Effekt zu erhalten: In einer Studie mit herzkranken Patienten wurde eine Gesamtdosis von 750 mg Flavanolen pro Tag verabreicht [45]; in einer Studie mit Patienten, die unter Diabetes mellitus leiden, wurde in der Langzeitstudie eine Tagesgesamtdosis von 963 mg Flavanolen zugeführt [46].

Flavanole sind in vielen Produkten der täglichen Ernährung wie in Obst und Gemüse, grünem Tee und dunkler Schokolade enthalten. Daher könnte zukünftig eine Beratung der Patienten mit dem Hinweis auf den Nutzen einer flavanolreichen Ernährung erfolgen. Dies könnte schließlich zu einer dauerhaften Umstellung in der Ernährung führen, die vorteilhaft für das kardiovaskuläre System ist. Des Weiteren könnte eine unterstützende Zuführung über Nahrungsergänzungsmittel erfolgen. Auch als akute therapeutische Intervention könnte eine diätetische Verabreichung, z. B. in Form eines Getränks oder einer Tablette, in Betracht gezogen werden.

Dies wären einfach durchführbare Möglichkeiten, regelmäßig Flavanole einnehmen zu können und damit langfristig die Gefäßfunktion zu verbessern. Des Weiteren stellen sie im Vergleich zu bereits existenten Medikamenten, die in der Therapie kardiovaskulärer Krankheiten eingesetzt werden, eine natürliche und kostengünstige Option dar. Bevor ein in diesem Sinne neu etabliertes, standardisiertes Produkt in die Routineempfehlungen für eine kardiovaskuläre Gesundheit Einzug erhält, sind weitere Studien notwendig. Diese müssten bestätigen, dass eine langfristige Flavanoleinnahme bezüglich der Entstehung und Entwicklung von Gefäßkrankheiten vorbeugend wirken kann. Hierfür müssten auch relevante Endpunkte wie die Beeinflussung der Mortalität untersucht werden. Des

Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese Intervention auch einen Einfluss auf die Prognose bei terminal niereninsuffizienten Patienten aufweist.

Zusammenfassend konnte die diätetische Flavanolbehandlung in der vorliegenden Studie effektiv die endotheliale Dysfunktion vermindern [56]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien, die Flavanole verabreicht haben [45, 46], überein.

Zukünftig sollte überprüft werden, unter welchen Bedingungen eine diätetische Flavanolgabe als Prävention oder Therapie geeignet ist. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie die diätetische Verabreichung der Flavanole optimal umgesetzt werden kann.

5. Literaturverzeichnis

1. Tonelli, M., et al., *Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 2034-47.
2. Thumfart, J., et al., *Intensified hemodialysis in adults, and in children and adolescents*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(14): p. 237-43.
3. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
4. Parfrey, P.S., *Cardiac disease in dialysis patients: diagnosis, burden of disease, prognosis, risk factors and management*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15 Suppl 5**: p. 58-68.
5. Roberts, M.A., et al., *Cardiovascular biomarkers in CKD: pathophysiology and implications for clinical management of cardiac disease*. Am J Kidney Dis, 2006. **48**(3): p. 341-60.
6. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
7. Muller, II, et al., *Macrophage migration inhibitory factor is enhanced in acute coronary syndromes and is associated with the inflammatory response*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38376.
8. Makino, A., et al., *High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus*. Atherosclerosis, 2010. **213**(2): p. 573-8.
9. Luedike, P., et al., *Cardioprotection through S-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor*. Circulation, 2012. **125**(15): p. 1880-9.
10. Yu, C.M., et al., *Elevation of plasma level of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2001. **88**(7): p. 774-7.
11. Stenvinkel, P., *Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy*. Nephrology (Carlton), 2006. **11**(1): p. 36-41.
12. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
13. Giachelli, C.M., *Vascular calcification mechanisms*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 2959-64.
14. Locatelli, F., et al., *Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18**(7): p. 1272-80.
15. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
16. Perticone, F., et al., *Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 191-6.
17. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 948-54.
18. Quyyumi, A.A., *Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease*. Am J Med, 1998. **105**(1A): p. 32S-39S.
19. Kelm, M. and J. Schrader, *Control of coronary vascular tone by nitric oxide*. Circ Res, 1990. **66**(6): p. 1561-75.
20. Corretti, M.C., et al., *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(2): p. 257-65.*
21. O'Rourke, M.F. and J. Hashimoto, *Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. J Am Coll Cardiol, 2007. 50(1): p. 1-13.*
 22. Fortier, C., et al., *Aortic-brachial stiffness mismatch and mortality in dialysis population. Hypertension, 2015. 65(2): p. 378-84.*
 23. Roman, M.J., et al., *Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study. Hypertension, 2007. 50(1): p. 197-203.*
 24. Covic, A. and D. Siriopol, *Pulse wave velocity ratio: the new "gold standard" for measuring arterial stiffness. Hypertension, 2015. 65(2): p. 289-90.*
 25. Eyre, H., et al., *Preventing cancer, cardiovascular disease, and diabetes: a common agenda for the American Cancer Society, the American Diabetes Association, and the American Heart Association. Circulation, 2004. 109(25): p. 3244-55.*
 26. Sofi, F., et al., *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. BMJ, 2008. 337: p. 1344.*
 27. Sofi, F., et al., *Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score. Public Health Nutr, 2013: p. 1-14.*
 28. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. N Engl J Med, 2013. 368(14): p. 1279-90.*
 29. Garcia-Fernandez, E., et al., *Mediterranean Diet and Cardiometabolic Risk: A Review. Nutrients, 2014. 6(9): p. 3474-3500.*
 30. Appel, L.J., et al., *A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med, 1997. 336(16): p. 1117-24.*
 31. Peng, X., et al., *Effect of green tea consumption on blood pressure: A meta-analysis of 13 randomized controlled trials. Sci Rep, 2014. 4: p. 6251.*
 32. Khan, N. and H. Mukhtar, *Tea polyphenols for health promotion. Life Sci, 2007. 81(7): p. 519-33.*
 33. Oyebode, O., et al., *Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. J Epidemiol Community Health, 2014. 68(9): p. 856-62.*
 34. Heiss, C., C.L. Keen, and M. Kelm, *Flavanols and cardiovascular disease prevention. Eur Heart J, 2010. 31(21): p. 2583-92.*
 35. Arts, I.C. and P.C. Hollman, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr, 2005. 81(1 Suppl): p. 317S-325S.*
 36. Spencer, J.P., et al., *Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 272(1): p. 236-41.*
 37. Holt, R.R., et al., *Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. Am J Clin Nutr, 2002. 76(4): p. 798-804.*
 38. Engler, M.B., et al., *Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. J Am Coll Nutr, 2004. 23(3): p. 197-204.*
 39. Grassi, D., et al., *Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. J Nutr, 2008. 138(9): p. 1671-6.*

40. Grassi, D., et al., *Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(3): p. 611-4.
41. Heiss, C., et al., *Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols*. JAMA, 2003. **290**(8): p. 1030-1.
42. Rein, D., et al., *Cocoa inhibits platelet activation and function*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(1): p. 30-5.
43. Hu, M.L., *Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers*. Chang Gung Med J, 2011. **34**(5): p. 449-60.
44. Dinkova-Kostova, A.T. and P. Talalay, *Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52 Suppl 1**: p. S128-38.
45. Heiss, C., et al., *Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(3): p. 218-24.
46. Balzer, J., et al., *Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(22): p. 2141-9.
47. Sobierajski, J., et al., *Assessment of macrophage migration inhibitory factor in humans: protocol for accurate and reproducible levels*. Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 236-42.
48. Frick M, N.T., Schwarzacher SP, Wascher TC, Weidinger F, *Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert*. Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology 2002, 2002. **9**: p. 439-444.
49. Weber T, E.B., Zweiker R, Horn S, Sock S, Grüner P, Pichler M, Mayer G, Eisserer G, Magometschnigg D, Illyes M, *Pulswellengeschwindigkeit, zentraler Blutdruck und Augmentationsindex - "neue" Parameter zur Beschreibung eines Endorganschadens der arteriellen Strombahn bei Hypertonie. Pathophysiologie, Methodik prognostische Bedeutung Empfehlungen*. Journal für Hypertonie - Austrian Journal of Hypertension 2008, 2008. **12**: p. 7-13.
50. Prati, P., et al., *Carotid intima media thickness and plaques can predict the occurrence of ischemic cerebrovascular events*. Stroke, 2008. **39**(9): p. 2470-6.
51. Rassaf, T., et al., *Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(2): p. 295-301.
52. Rassaf, T., M. Feelisch, and M. Kelm, *Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(4): p. 413-22.
53. Ottaviani, J.I., et al., *Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(8): p. 1403-12.
54. Bullinger, M., *German translation and psychometric testing of the SF-36 Health Survey: preliminary results from the IQOLA Project. International Quality of Life Assessment*. Soc Sci Med, 1995. **41**(10): p. 1359-66.

55. Rammos, C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal disease*. Int J Cardiol, 2013. **168**(6): p. 5249-56.
56. Rassaf, T., et al., *Vasculoprotective Effects of Dietary Cocoa Flavanols in Patients on Hemodialysis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(1): p. 108-18.
57. Fink, J.C., et al., *Significance of serum creatinine values in new end-stage renal disease patients*. Am J Kidney Dis, 1999. **34**(4): p. 694-701.
58. Wang, A.Y. and K.N. Lai, *Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(9): p. 1643-52.
59. Kooman, J.P., et al., *Chronic kidney disease and premature ageing*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(12): p. 732-42.
60. Bruchfeld, A., et al., *Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation*. Mol Med, 2009. **15**(3-4): p. 70-5.
61. Pan, J.H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. Circulation, 2004. **109**(25): p. 3149-53.
62. Yeboah, J., et al., *Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study*. Circulation, 2007. **115**(18): p. 2390-7.
63. London, G.M., B. Pannier, and S.J. Marchais, *Vascular calcifications, arterial aging and arterial remodeling in ESRD*. Blood Purif, 2013. **35**(1-3): p. 16-21.
64. Qi, D., et al., *Cardiac macrophage migration inhibitory factor inhibits JNK pathway activation and injury during ischemia/reperfusion*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3807-16.
65. Stampfer, M.J., et al., *Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 16-22.
66. Joshipura, K.J., et al., *The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease*. Ann Intern Med, 2001. **134**(12): p. 1106-14.
67. He, F.J., et al., *Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies*. J Hum Hypertens, 2007. **21**(9): p. 717-28.
68. Dauchet, L., P. Amouyel, and J. Dallongeville, *Fruits, vegetables and coronary heart disease*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(9): p. 599-608.
69. Gotti, R., et al., *Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content*. Electrophoresis, 2009. **30**(16): p. 2922-30.
70. Mulvihill, E.E. and M.W. Huff, *Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health*. Can J Cardiol, 2010. **26 Suppl A**: p. 17A-21A.
71. Heiss, C., et al., *Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(7): p. 1276-83.
72. Schroeter, H., et al., *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 1024-9.

73. Hooper, L., et al., *Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 38-50.
74. Desch, S., et al., *Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis*. Am J Hypertens, 2010. **23**(1): p. 97-103.
75. Taubert, D., et al., *Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. **298**(1): p. 49-60.
76. Grassi, D., et al., *Cocoa consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation and arterial stiffness decreasing blood pressure in healthy individuals*. J Hypertens, 2015. **33**(2): p. 294-303.
77. Hooper, L., et al., *Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(3): p. 740-51.
78. Flammer, A.J., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2262-9.
79. Anderson, T.J., et al., *Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study)*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(1): p. 60-6.
80. Sunil Kumar, K., et al., *Carotid intima-media thickness in patients with end-stage renal disease*. Indian J Nephrol, 2009. **19**(1): p. 13-4.
81. Costanzo, P., et al., *Does carotid intima-media thickness regression predict reduction of cardiovascular events? A meta-analysis of 41 randomized trials*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(24): p. 2006-20.
82. Guerin, A.P., et al., *Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure*. Circulation, 2001. **103**(7): p. 987-92.
83. Lantelme, P., et al., *Heart rate: an important confounder of pulse wave velocity assessment*. Hypertension, 2002. **39**(6): p. 1083-7.
84. Luksha, N., et al., *Impaired resistance artery function in patients with end-stage renal disease*. Clin Sci (Lond), 2011. **120**(12): p. 525-36.
85. Fraga, C.G., et al., *Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players*. Clin Dev Immunol, 2005. **12**(1): p. 11-7.
86. Goodman, W.G., et al., *Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis*. N Engl J Med, 2000. **342**(20): p. 1478-83.
87. Lindner, A., et al., *Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis*. N Engl J Med, 1974. **290**(13): p. 697-701.
88. Franklin, S.S., et al., *Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study*. Circulation, 1997. **96**(1): p. 308-15.
89. Leikert, J.F., et al., *Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells*. Circulation, 2002. **106**(13): p. 1614-7.
90. Ramirez-Sanchez, I., et al., *(-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways*. Hypertension, 2010. **55**(6): p. 1398-405.

91. Benito, S., et al., *A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(4): p. 910-6.
92. Balzer, J., et al., *Flavanols and cardiovascular health: effects on the circulating NO pool in humans*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 2**: p. S122-7; discussion S172-6.
93. Janero, D.R., et al., *Differential nitros(yl)ation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16958-63.
94. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
95. Kielstein, J.T., et al., *Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(3): p. 594-600.
96. Mackenzie, G.G., et al., *Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells*. FASEB J, 2004. **18**(1): p. 167-9.
97. Mackenzie, G.G. and P.I. Oteiza, *Modulation of transcription factor NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cell lines: effect of (-)-epicatechin*. Free Radic Res, 2006. **40**(10): p. 1086-94.
98. Mao, T.K., et al., *Modulation of TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells by cocoa flavanols and procyanidins*. Dev Immunol, 2002. **9**(3): p. 135-41.
99. Ramiro-Puig, E., et al., *Spleen lymphocyte function modulated by a cocoa-enriched diet*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(3): p. 535-42.
100. Ottaviani, J.I., et al., *The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(2): p. 237-44.
101. Rhee, E.P., et al., *Metabolite profiling identifies markers of uremia*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 1041-1051.
102. Actis-Goretta, L., et al., *Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique*. Am J Clin Nutr, 2013. **98**(4): p. 924-33.
103. Mink, P.J., et al., *Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(3): p. 895-909.

6. Danksagung

Während der Anfertigung dieser Doktorarbeit habe ich wertvolle Hilfe und Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Ich bedanke mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm für die Ermöglichung der Forschungsarbeiten in seiner Abteilung.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerd R. Hetzel, Herrn Prof. Dr. med. Werner Kleophas und Herrn Prof. Dr. med. Frank Dellanna für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner wissenschaftlichen Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich auch bei all ihren Patienten aus dem Medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) DaVita Karlstraße GmbH in Düsseldorf bedanken, da die Arbeit ohne sie niemals möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Tienush Rassaf für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das Vertrauen, das er damit in mich gesetzt hat. Deine enorme Begeisterung für die Forschung und deine beeindruckend motivierenden Worte für das wissenschaftliche Arbeiten haben mir immer sehr imponiert und werden mir stets ein außergewöhnliches Vorbild sein.

Frau Dr. rer. nat. Ulrike Hendgen-Cotta danke ich herzlichst für ihre ausnahmslose Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft im Labor. Vielen Dank für all deine wertvollen Ratschläge während meiner gesamten Arbeit im kardiologischen Labor und ganz besonders für deine Unterstützung bei der Vorbereitung meiner Vorträge. Ich habe sehr viel von dir gelernt.

Herzlicher Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. Christos Rammos für die gute Zusammenarbeit während der Studien und die große Unterstützung beim Schreiben meiner Doktorarbeit. Über all die Jahre hast du mir immer sehr geholfen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Frau Pia Stock und Herrn Dominik Semmler für ihre enorme Hilfe bei den biochemischen Analysen bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors und besonders bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre zahlreichen und wertvollen Hilfestellungen.

Niemals möglich gewesen wäre die Arbeit ohne die liebevolle Unterstützung meiner Familie und ganz besonders meiner Eltern, die immer hinter mir stehen – die mich meine eigenen Entscheidungen treffen und mich mit ihnen dennoch niemals alleine stehen lassen, sondern mir helfen, meine Ziele und Wünsche zu verwirklichen. Ihr seid die Besten.

Eidesstattliche Versicherung

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

18.08.2016, Sarah Adamczyk