

Aus dem  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. H. Sies

**Einfluss von Kakaoflavanolen auf die endotheliale Dysfunktion bei Rauchern**

Dissertation

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

vorgelegt von

David Finis

2008

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

gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan

Referent: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. H. Sies  
Korreferent: Universitätsprofessor Dr. med. K. Schulze-Osthoff

Meinen Eltern gewidmet

*Everything is good, as long as it is out of chocolate*

(Aus dem Arztzimmer der Kardiologie  
in der Universitätsklinik Düsseldorf)

# Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADA	American Diabetes Organisation
AHA	American Heart Association
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
CaMKII	Kalzium/Calmodulin abhängige Kinase II
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz Detektion
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flow-Mediated-Dilatation (Fluss-vermittelte Dilatation)
FMN	Flavinmononukleotid
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GTN	Glyzeroltrinitrat
HbO <sub>2</sub>	oxygeniertes Hämoglobin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
JNC	Joint National Committee
MDA	Malondialdehyd
MetHb	Methämoglobin
MOD	Magneto-optische Diskette
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NOS	NO-Synthase
NR	Nitratreduktase

PKA	Proteinkinase A
PW-Doppler	Pulswellendoppler
RF	Risikofaktor
RXNO	gebundenes NO
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
WHO	World Health Organisation

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1. Metabolismus von Stickstoffmonoxid.....	10
1.2. Endotheliale Dysfunktion .....	12
1.3. Einfluss des Rauchens auf die NO-Bioverfügbarkeit .....	14
1.4. Einfluss von Flavanolen auf die Gefäßfunktion.....	15
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1. Studienprotokoll .....	18
2.1.1. Zusammensetzung der Kakaogetränke .....	18
2.1.2. Studienprotokoll ( <i>Akuteffektstudie</i> ) .....	19
2.1.3. Studienprotokoll ( <i>Wochenstudie</i> ) .....	20
2.2. Studienkollektiv .....	21
2.3. Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis .....	22
2.3.1. Untersuchungsprotokoll.....	22
2.3.2. Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers.....	24
2.3.3. Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Durchmessers der Arteria brachialis .....	25
2.4. Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit, Nitrat und gebundenem NO im Plasma .....	26
2.4.1. Blutentnahme.....	26
2.4.2. Probenaufarbeitung .....	26
2.4.3. Bestimmung der Nitrit-/RXNO-Konzentration im Plasma .....	29
2.4.4. Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma.....	31
2.5. Quantifizierung der Flavanolspiegel in Plasma .....	32
2.6. Statistische Verfahren .....	32

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
3.1. Charakterisierung der Studienpopulation .....	34
3.1.1. Charakterisierung der Studienpopulation ( <i>Akuteffektstudie</i> ).....	34
3.1.2. Charakterisierung der Studienpopulation ( <i>Wochenstudie</i> ) .....	34
3.2. Ergebnisse der <i>Akuteffekt-</i> und <i>Wochenstudie</i> .....	35
3.2.1. Vergleich der akuten Effekte des Kakaos bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren .....	36
3.2.2. Abhängigkeit der beobachteten Effekte von den Flavanol-plasmaspiegeln .....	38
3.2.3. Effekte der regelmäßigen Kakaoeinnahme .....	40
3.3. Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Durchmessers der Arteria brachialis. ....	42
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>43</b>
4.1. Methodenkritik.....	43
4.1.1. Quantifizierung der endothelabhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung.....	43
4.1.2. Quantifizierung der zirkulierenden NO Metabolite.....	47
4.2. Einfluss der Flavane auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	49
4.3. Potentielle Wirkmechanismen.....	52
4.4. Ausblick und klinische Bedeutung.....	58
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>60</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>61</b>
<b>7. DANKSAGUNG</b> .....	<b>74</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b> .....	<b>75</b>

# 1. Einleitung

Während in Entwicklungsländern immer noch Infektionskrankheiten die Haupttodesursache darstellen, sind in Europa, Nordamerika und Asien Herz-Kreislaufkrankungen an vorderster Stelle zu finden <sup>1</sup>. Im Jahre 2002 sind in Deutschland 393.778 (46,8%) Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems verstorben, 64.218 (7,6%) davon allein an akutem Myokardinfarkt und 94.166 (11,7%) an chronisch ischämischer Herzkrankheit (statistisches Bundesamt). Kardiovaskuläre Erkrankungen haben im Jahre 2002 mit insgesamt 35,4 Mrd. Euro an Kosten, das heißt mit 15,8% den größten Anteil an den Gesamtkrankheitskosten verursacht (Pressebericht Krankheitskosten 2002).

Viele epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen negativ mit der Aufnahme von Polyphenolen aus Kakao, Tee, Rotwein oder Früchten korreliert ist <sup>2-5</sup>. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass diese positiven Effekte unter anderem durch vermehrt vom Endothel freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt werden <sup>6,7</sup>. NO ist an allen wesentlichen Funktionen des Gefäßendothels beteiligt. Diese umfassen die Modulation des Gefäßtonus, der Thrombozytenaggregation, der Gefäßarchitektur sowie der Gefäßpermeabilität <sup>8-10</sup>. Lange bevor sich Herz-Kreislaufkrankungen klinisch manifestieren, zeigen sich bereits Einschränkungen dieser Endothelfunktionen bei klassischen und neuen kardiovaskulären Risikofaktoren <sup>11-13</sup>. Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren umfassen Rauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hypertonie sowie das Alter. Neuere Risikofaktoren sind Homocystein, C-reaktives Protein, Bewegungsmangel und Übergewicht. Tatsächlich stellt die eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit einen wesentlichen Aspekt der endothelialen Dysfunktion dar und trägt so zur Pathogenese der Arteriosklerose sowohl in der Entstehung als auch in der Progression bei <sup>8,9</sup>.

Eine endotheliale Dysfunktion scheint therapeutisch rückführbar zu sein <sup>14-17</sup>. Therapeutische Interventionen, welche aus kardiologischer Sicht der Primär- und Sekundärprävention von kardiovaskulären Ereignissen dienen, wie Ausdauertraining, Statine, ACE-Hemmer sowie eine ausgewogene obst- und gemüselastige Ernährung gehen mit einer Steigerung der Endothelfunktion einher. Die meisten Autoren gehen davon aus, dass die Rückführung der Endotheldysfunktion maßgeblich am positiven prognostischen Effekt dieser Interventionen beteiligt ist, auch wenn sie primär zur Cholesterin-, Blutdruck-, Zucker- oder Gewichtsreduktion eingesetzt werden. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe <sup>18</sup> und anderer <sup>19;20</sup> legen nahe, dass pflanzliche Flavonoide auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften die Endothelfunktion und NO-Bioaktivität verbessern können.

## 1.1. Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Die eingeschränkte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid stellt einen der wichtigsten Aspekte bei der endothelialen Dysfunktion dar<sup>8-10</sup>. Deshalb soll hier zunächst auf den Metabolismus und die biochemischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid eingegangen werden.

Bereits 1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki<sup>21</sup>, dass isolierte Gefäße auf Azetylcholin und Bradykinin nur in Anwesenheit eines intakten Gefäßendothels dilatieren, während nach Entfernung des Endothels eine Vasokonstriktion erfolgt. Ausgehend von diesen Arbeiten folgten in den weiteren Jahren zahlreiche Arbeiten, die belegten, dass Endothelzellen kontinuierlich und unter Stimulation mit vasoaktiven Mediatoren eine kurzlebige Substanz freisetzen, welche eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten bewirkt. Die chemische Struktur der Substanz war unbekannt, weshalb man sie zunächst rein deskriptiv als „Endothelium-Derived-Relaxing-Faktor“ (EDRF) bezeichnete<sup>22</sup>. In den Jahren 1987 und 1988 konnten Palmer et al.<sup>23</sup>, Ignarro et al.<sup>24</sup> und Kelm et al.<sup>25</sup> den Nachweis erbringen, dass der von Endothelzellen unter basalen und stimulierten Bedingungen freigesetzte EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist. In den folgenden Jahren gelang es, den Stoffwechselweg, welcher zur Bildung von NO führt, umfassend zu charakterisieren.

Im Gefäßendothel wird in einer Redoxreaktion aus L-Arginin durch die endotheliale Isoform der NO-Synthase (eNOS) NO gebildet<sup>26</sup>. Die Oxidationszahl des Stickstoffatoms im L-Arginin beträgt -3 und steigt nach Oxidation zum NO auf +2, stellt also einen Nettotransfer von 5 Elektronen dar. Als Kofaktoren dienen dabei unter anderem NADPH, FAD, FMN, BH<sub>4</sub> und molekularer Sauerstoff<sup>27;28</sup>.

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses Gas und kann als freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron und neutraler Ladung frei über die Zellmembran hinweg aus der Gefäßendothelzelle in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und in das Gefäßlumen diffundieren. In biologischen Medien ist es sehr labil und hat im Vollblut nur eine sehr kurze Halbwertszeit<sup>29</sup>. Während NO in der glatten Muskelzelle der Gefäßwand über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels vasodilatatorisch wirkt<sup>28</sup>, wird NO im Vollblut oxidativ zu Nitrit und Nitrat abgebaut<sup>27</sup>. Der größte Teil des gebildeten NOs wird dabei unmittelbar durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit abgebaut<sup>30;31</sup>. Durch die weitere Oxidation des Nitrits mit oxygeniertem Hämoglobin innerhalb der Erythrozyten entsteht Nitrat unter Bildung von Methämoglobin<sup>29</sup>. Ein weiterer

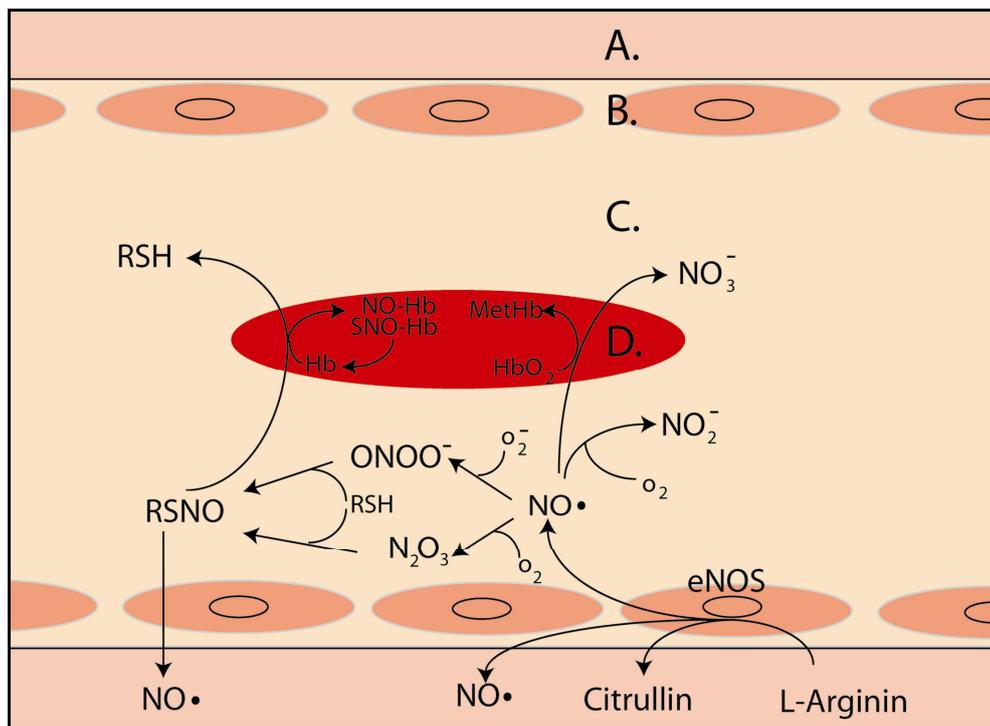
Abbauweg für NO im Vollblut ist die direkte Oxidation mit HbO<sub>2</sub> zu Nitrat, welche nach Diffusion in einen Erythrozyten unter Methämoglobinbildung stattfinden kann.

Die eNOS produziert neben NO, abhängig von der L-Arginin-Verfügbarkeit und dem Redoxzustand der Kofaktoren, alternativ auch O<sub>2</sub><sup>-</sup> Ionen. Diese Superoxidradikalanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) wie auch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Hydroxylradikale (OH<sup>·</sup>) können ebenfalls am oxidativen Abbau von NO beteiligt sein<sup>32,33</sup>. Bei vermehrter Bildung solcher reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Stress)<sup>34</sup> kommt diesem Abbauweg eine große Bedeutung zu. Bei der Reaktion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> mit NO entsteht Peroxynitrit, welches als starkes Oxidationsmittel über eine Veränderung von Biomolekülen zytotoxisch wirken kann<sup>35</sup>. Die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Nitrit zu toxischen Stickstoffspezies wird von der Myeloperoxidase katalysiert. Dies trägt vermutlich über eine vermehrte Oxidation von LDL ebenfalls zur Bildung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen bei<sup>36</sup>.

Neben dem Abbau im Vollblut zu Nitrit und Nitrat scheint es aber noch die Möglichkeit zu geben, dass NO in bioaktiver, reversibel gebundener Form im Blut zirkuliert. Zunächst wurden vor allem Thiolgruppen von Plasmaproteinen als NO-Akzeptoren beschrieben<sup>31,37,38</sup>. Der Großteil des plasmatisch gebundenen NOs scheint dabei an Albumin gebunden transportiert zu werden<sup>37</sup>, wobei auch die Möglichkeit der Bindung an niedermolekulare Verbindungen wie Cystein oder Glutathion besteht. In ihrer Gesamtheit werden die plasmatischen S-Nitrosothiole auch als RSNOs bezeichnet. Die Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen kann durch Temperatur, Licht, Ascorbat oder Übergangsmetalle beeinflusst werden<sup>39</sup>. Im Gegensatz zur kurzen Halbwertszeit von freiem NO beträgt die Halbwertszeit von S-Nitrosoalbumin im Plasma 15-40 min<sup>29,37</sup>. Nach Infusion von GSNO konnten Rassaf et al. ähnliche Effekte wie nach der Infusion einer NO-Lösung sowie einen Anstieg der RSNO-Konzentration im Plasma beobachten<sup>31</sup>. Diese Untersuchungen deuten auf S-Nitrosothiole als eine physiologische Speicherform von bioaktivem NO mit systemischer Wirkung hin.

Die Bindung von NO an Thiolgruppen von Plasmaproteinen ist die zurzeit am besten erforschte. Neben dem Transport an Thiolgruppen existieren aber noch weitere Möglichkeiten der Bindung von NO. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit der Bindung an Stickstoffatome von Proteinen, welche dann als N-Nitrosamine oder kurz RNNOs bezeichnet werden<sup>40</sup>. Außerdem existieren Eisen-Nitrosyle und Lipidverbindungen<sup>41</sup>. In diesem Zusammenhang muss auch die Möglichkeit der Bindung an die Häm-Gruppe im Hämoglobin analog zum Sauerstoff erwähnt werden<sup>42</sup>. Insgesamt kann NO mit aromatischen Verbindungen, Aminen, Alkoholen, Thiolen und Metallen reagieren um so C-, N-, O-, S- und Metall-Nitrosoverbindungen zu formen<sup>40</sup>. In der humanen Zirkulation scheinen davon

physiologisch zumindest RNNOs, RSNOs und Häm-Nitrosoverbindungen von Bedeutung zu sein<sup>42</sup>, welche in Summe im Folgenden als RXNO bezeichnet werden. Eine vasodilatierende Wirkung hingegen wurde bislang aber nur für RSNOs gezeigt<sup>31;38</sup>. Nach neuesten Erkenntnissen ist Nitrit nicht nur ein Marker der NO-Bioverfügbarkeit, sondern auch selbst vasoaktiv<sup>43</sup>.



**Abbildung 1**

Metabolismus von Stickstoffmonoxid (zur Verdeutlichung von 1.1)

Kompartimente: A.: Gefäßwand, B.: Endothel, C.: Plasma, D.: Erythrozyt

Abkürzungen:  $\text{NO}_2^-$  - Nitrit,  $\text{NO}_3^-$  - Nitrat, Hb – Hämoglobin,  $\text{HbO}_2$  – oxygeniertes

Hämoglobin, RSNO – S-Nitrosoprotein,  $\text{N}_2\text{O}_3$  – Distickstofftrioxid,  $\text{ONOO}^-$  - Peroxynitrit (Abbildung modifiziert nach Kelm et al.<sup>44</sup>)

## 1.2. Endotheliale Dysfunktion

Durch die Freisetzung von NO werden vom Gefäßendothel verschiedene Funktionen wahrgenommen, die alle antiarteriosklerotisch wirken<sup>45</sup>. Diese umfassen die Modulation des Gefäßdurchmessers<sup>46</sup>, die Hemmung der Thrombozytenaggregation<sup>47</sup>, die Hemmung der Einwanderung von Entzündungszellen<sup>48</sup> und die antiproliferative Wirkung gegenüber glatten Muskelzellen<sup>49</sup>. Störungen dieser wesentlichen Funktionen werden dabei als endotheliale Dysfunktion bezeichnet<sup>9</sup>.

Die Forschung über die Pathogenese der Arteriosklerose hat in den vergangenen Jahrzehnten entscheidende Fortschritte gemacht. Schon lange ist bekannt, dass eine ständige Schädigung der Gefäßwand in der Entwicklung der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle einnimmt

(„Response to injury“-Theorie) <sup>50;51</sup>. Nach neueren Erkenntnissen entwickelt sich die Arteriosklerose aufgrund von Störungen der Gefäßfunktion, im Sinne einer endothelialen Dysfunktion. Ein wichtiges biochemisches Korrelat stellt die eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit dar.

Als Einflussgrößen auf die Arteriosklerose wurde 1961 in der Framinghamstudie das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert. Zu diesen Risikofaktoren zählen dabei die arterielle Hypertonie, das Rauchen, der Diabetes mellitus und die Hypercholesterinämie <sup>10;52;53</sup>. Diese Risikofaktoren scheinen eben über Induktion einer endothelialen Dysfunktion die Entwicklung einer Arteriosklerose zu fördern. Neben den klassischen Risikofaktoren zeigen auch neue Risikofaktoren wie CRP- oder Homocystein-Spiegel im Plasma Auswirkung auf die NO-Bioverfügbarkeit <sup>54;55</sup>.

Der endothelialen Dysfunktion kommt eine große Bedeutung im Hinblick auf die frühe Diagnostik und rechtzeitige Therapie zu, da sie als Vorläufer der Arteriosklerose diagnostisch fassbar, aber noch reversibel ist. Zur Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dient dabei die Bestimmung der endothelabhängigen Vasodilatation <sup>9;10</sup>. Die nach intraarteriell gegebenem Azetylcholin induzierte Gefäßerweiterung gilt dabei als Goldstandard <sup>56-58</sup>. Neben diesem invasiven steht noch ein anderes etabliertes, nichtinvasives Verfahren zur Verfügung. Bei der Fluss-vermittelten Dilatation (FMD=flow-mediated dilatation) handelt es sich um eine Methode, welche die endothelabhängige Vasodilatation der Arteria brachialis nach einer Ischämie am Unterarm mittels hochauflösendem Ultraschall misst <sup>12;59;60</sup>. Beide hier genannten Verfahren werden aber bislang noch nicht zur Routinediagnostik in der Klinik eingesetzt. Als Gründe hierfür kommen vor allem der hohe Zeitaufwand und die hohen Kosten der benötigten Geräte in Betracht. Weiterhin sind beide Verfahren nur von erfahrenen und gut ausgebildeten Untersuchern durchführbar. Neuere Untersuchungen versuchen deshalb Bluttests zur biochemischen Quantifizierung von NO oder seinen Abbauprodukten im Blut zu etablieren. Die Nitritspiegel im Blut sind zu 70-90% von der Aktivität der endothelialen NO-Synthase abhängig. So werden in eNOS-knock-out-Mäusen ca. 70% niedrigere Nitritspiegel gemessen als in den Wildtyp-Tieren <sup>61</sup>. Kleinbongard et al. konnten aufbauend auf diesen Arbeiten signifikant niedrigere Nitritplasmaspiegel mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren feststellen <sup>62</sup>. Auch Nitratspiegel im Plasma wurden als Marker vorgeschlagen, scheinen hingegen maßgeblich von der Nierenfunktion und der Nahrungsaufnahme beeinflusst zu sein und sollten deshalb nicht als Indikator für die Endothelfunktion gebraucht werden <sup>30;43</sup>. Weiterhin wurde die Konzentration von gebundenem NO im Plasma (RXNO) von Heiss et al. als Marker einer endothelialen

Dysfunktion postuliert. So konnte eine signifikante, inverse Korrelation zwischen RXNO-Plasmaspiegeln und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie eine positive signifikante Korrelation gezeigt werden<sup>63</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die biochemischen Untersuchungen als auch die Sonographie zur Detektion der endothelialen Dysfunktion eingesetzt.

Die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion ist zumindest zum Teil durch oxidativen Stress bedingt, was durch verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien belegt wird<sup>17;32;34;64-67</sup>. Am bedeutendsten scheint dabei die Reaktion von NO mit O<sub>2</sub><sup>-</sup> Ionen<sup>68</sup>. Diese Reaktion läuft mit einer Geschwindigkeit von 6,7x10<sup>9</sup> M/s dreimal schneller als der Abbau von O<sub>2</sub><sup>-</sup> Ionen durch die Superoxiddismutase ab. So wird klar, dass O<sub>2</sub><sup>-</sup> Ionen sehr effektiv die physiologischen Funktionen von NO inhibieren können, zumal das Reaktionsprodukt Peroxynitrit selbst ein starkes Oxidans ist<sup>33</sup>. Eine mögliche Quelle des oxidativen Stresses ist das Rauchen.

### **1.3. Einfluss des Rauchens auf die NO-Bioverfügbarkeit**

Rauchen ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose. Schon Passivrauchen mit nur einem Prozent der Rauchexposition von aktiven Rauchern erhöht das Risiko der koronaren Herzkrankheit um 30%, während bei aktiven Rauchern das Risiko sogar um 80% ansteigt<sup>69</sup>. Hauptverantwortlich für diese Risikoerhöhung scheint eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit zu sein. So zeigten humane Koronarendothelzellen nach Inkubation mit Plasma von Rauchern signifikant niedrigere NO-Produktion als Zellen, die mit Nichtraucherplasma inkubiert wurden<sup>70</sup>. Die endothelabhängige Dilatation ist bei Rauchern ohne kardiovaskuläre Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern signifikant eingeschränkt<sup>13;71;72</sup>. Barbera et al. zeigten eine verminderte Expression der eNOS in den Pulmonalarterien von Rauchern<sup>73</sup>. Im Tierversuch konnte eine Einschränkung der endothelabhängigen Dilatation nach Infusion von Zigarettenrauchextrakt ohne Einschränkung des basalen Gefäßdurchmessers nachgewiesen werden<sup>74</sup>. Pathogenetisch wird beim Rauchen oxidativer Stress als Hauptursache für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion angesehen<sup>69;70</sup>. Rauchen verursacht im Wesentlichen über drei Wege oxidativen Stress:

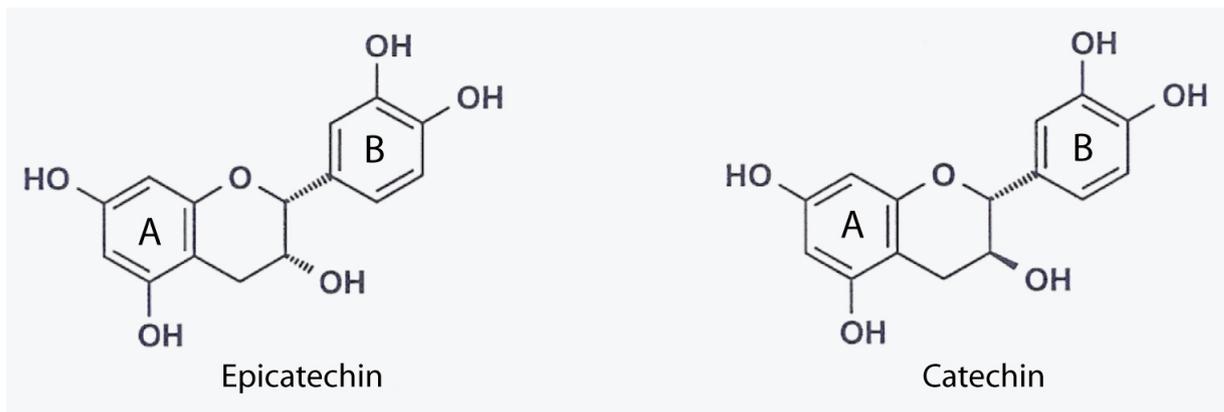
- 1.) Durch reaktive Sauerstoffspezies und andere freie Radikale direkt aus dem Zigarettenrauch<sup>75</sup>
- 2.) Durch Aktivierung endogener Radikalquellen wie der NOS selbst, der NADPH-Oxidase oder der Xanthinoxidase<sup>70;76</sup>
- 3.) Durch die entzündungsfördernde Wirkung des Zigarettenrauchs<sup>77;78</sup>

Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO wird zum einen durch die direkte Reaktion mit zum Beispiel  $O_2^-$  Ionen verursacht, zum anderen aber auch durch eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Ko-Faktoren der eNOS wie Tetrahydrobiopterin <sup>65</sup>.

Eine Möglichkeit des Schutzes vor oxidativem Stress stellen Flavanole dar. So sind Flavanole Fänger freier Radikale und reagieren mit Superoxidradikalanionen <sup>79-82</sup>. Neben dem Abfangen freier Radikale beschreiben andere Studien noch zusätzlich die Fähigkeit von Flavanolen, prooxidative und proinflammatorische Enzyme wie die Lipoxygenasen oder die Myeloperoxidase zu inhibieren <sup>36;83-85</sup>, was ebenfalls zu einer Minderung des oxidativen Stresses beiträgt. Zusätzlich scheinen Flavanole auch in der Lage zu sein, direkt die endotheliale NO-Produktion zu steigern <sup>86</sup>. Im folgenden Abschnitt soll nun näher auf die Flavanole und ihren Einfluss auf die Gefäßfunktion eingegangen werden.

#### **1.4. Einfluss von Flavanolen auf die Gefäßfunktion**

Pflanzen bilden eine Vielfalt an Stoffen, wobei einige dieser Stoffe primär keine Funktion im Metabolismus wie Biosynthese, Biotransformation oder Energiestoffwechsel für die Pflanze erfüllen. Trotzdem können diese Stoffe weitreichende biologische Wirkungen von der Toxizität bis zur hormonellen Mimikry erlangen. Dadurch sind sie in der Lage, die Pflanzen vor Herbivoren oder Krankheiten zu schützen. Zu diesen Stoffen zählen auch die Polyphenole. Polyphenole stellen eine heterogene Gruppe dar, die als Polymere ausschließlich in Pflanzen vorkommen. Die Monomere Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, Stilbene und Lignane bilden ihr Grundgerüst. In unserer Nahrung stellen dabei die Flavonoide die häufigste Grundsubstanz dar. Bei den Flavonoiden unterscheidet man wiederum Flavanole, Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyanidine und Flavanone. Die einzelnen Stoffe unterscheiden sich dabei im Oxidationszustand der Sauerstoffatome am heterozyklischen Ringsystem <sup>87</sup>. Ein Großteil der Polyphenole im Kakao setzt sich aus Flavan-3-olen zusammen, wobei es sich meistens um (-)-Epicatechin oder um (+)-Catechin handelt. Die Polymere speziell von Flavan-3-olen werden als Procyanidine bezeichnet <sup>88;89</sup>.



**Abbildung 2**  
Strukturformeln von Flavan-3-olen

Nach oraler Aufnahme von flavanolreicher Kost können nach ca. 30 min im Plasma Epicatechin, Catechin sowie Procyanidindimere nachgewiesen werden <sup>88</sup>. Die maximalen Plasmaspiegel werden ein bis zwei Stunden nach Ingestion gemessen <sup>87</sup>. Für den Stoffwechsel von Epicatechin konnte ein hepatischer Metabolismus mit Glucuronidierung, Methylierung und Sulfatierung nachgewiesen werden <sup>90</sup>. Als Quellen von Flavanolen in Nahrungsmitteln kommen vor allem Kakao, Rotwein, Tee und verschiedene Früchte wie Äpfel oder Grapefruits in Betracht <sup>91;92</sup>.

Viele Studien konnten die positiven Effekte von Polyphenolen bzw. der einzelnen Monomere auf die NO-Bioverfügbarkeit belegen. *In vitro* Studien zeigten höhere eNOS-mRNA-Level nach Inkubation von humanen Nabelschnurendothelzellen mit Resveratrol, einem Stilben aus Rotwein <sup>7</sup>. In Gegenwart eines Polyphenolextrakts konnte ebenfalls eine erhöhte eNOS-Expression und eine höhere NO-Freisetzung von Endothelzellen beobachtet werden <sup>6</sup>. Freedman et al. beobachteten eine verminderte Plättchenaggregation sowie eine verstärkte thrombozytäre NO-Freisetzung nach Inkubation mit Flavonoiden aus Grapefruitsaft. Ähnliches konnte auch im *ex vivo* Experiment nach 14-tägigem Grapefruitsaftkonsum festgestellt werden <sup>93</sup>.

Weitere *ex vivo* Studien belegen ebenfalls die positiven Effekte von Polyphenolen. Aortenringe von Ratten relaxierten in Gegenwart von Procyanidinen aus Kakao in ähnlichem Ausmaß wie in Gegenwart von Azetylcholin. Nach Entfernung des Endothels war in beiden Fällen keine Relaxation mehr möglich <sup>86</sup>. Nach Ingestion von flavanolreichem Kakao und anschließender Blutentnahme wurde eine Inhibition der Plättchenfunktion in der gleichen Größenordnung wie nach Ingestion von Aspirin beschrieben <sup>94</sup>.

Im Tiermodell zeigten Benito et al. eine gesteigerte NO-Produktion *ex vivo* in den Aorten von Ratten sowohl nach Gabe von alkoholfreiem Rotwein als auch nach Gabe von einer catechinreichen Diät <sup>95</sup>. *In vivo* Studien mit flavanolreichem Kakao wiesen nach fünftägiger

Gabe einen verbesserten Unterarmblutfluss nach <sup>20</sup>. Agewall et al. und Papamichael et al. beschrieben positive Effekte von Antioxidantien aus Rotwein auf die endothelabhängige Dilatation <sup>96;97</sup>. Grassi et al. und Engler et al. konnten durch Applikation von dunkler Schokolade ebenfalls eine Verbesserung der endothelabhängigen Dilatation erreichen <sup>98;99</sup>. Heiss et al. zeigten einen Anstieg der endothelabhängigen Vasodilatation zwei Stunden nach Einnahme von flavanolreichem Kakao <sup>18;100</sup>. Kurzzeit- und Langzeiteinnahme von schwarzem Tee war in der Lage, eine endotheliale Dysfunktion therapeutisch zurück zu Werten von gesunden Probanden zu führen <sup>19</sup>.

Basierend auf den aufgeführten Studien wurde für die vorliegende Arbeit folgende Hypothese aufgestellt:

Flavanolreicher Kakao steigert die NO-Bioverfügbarkeit und ist so in der Lage, eine endotheliale Dysfunktion sowohl akut als auch anhaltend zurückzuführen.

Im Einzelnen sollen dabei folgende Punkte geklärt werden:

- 1) Untersuchung der akuten Effekte des Kakaos bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren
- 2) Nachweis einer Abhängigkeit der beobachteten Effekte von den Flavanolplasmaspiegeln
- 3) Nachweis eines anhaltenden Effektes bei regelmäßiger Kakaoeinnahme

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studienprotokoll

Die Effekte von flavanolreichem Kakao wurden in zwei verschiedenen Studien untersucht. Eine Studie diente zur Untersuchung der unmittelbaren Effekte nach einmaliger Gabe von flavanolreichem Kakao im Verlauf über sechs Stunden. Diese Studie wird im Folgenden als *Akuteffektstudie* bezeichnet. Die zweite Studie untersuchte die Effekte von flavanolreichem Kakao während regelmäßiger Einnahme über eine Woche. Diese Studie wird im Folgenden als *Wochenstudie* bezeichnet. Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Bei beiden Studien wurden die Probanden zunächst im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Daran schlossen sich die Anamneseerhebung und eine körperliche Untersuchung an. Der genaue Ablauf der beiden Studien wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Zur Charakterisierung der Endothelfunktion dienten in beiden Studien Nitrit, RXNO und FMD-Werte als Kernparameter. Zusätzlich wurden Nitrat und Gesamtflavanole im Plasma sowie Herzfrequenz und Blutdruck bestimmt.

#### 2.1.1. Zusammensetzung der Kakaogetränke

Der Kakao wurde von Mars (Hackettstown, NJ, USA) produziert und freundlicherweise für die Experimente der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Es standen zwei verschiedene Pulver, die sich nur im Flavanolgehalt bedeutend unterschieden, zur Verfügung. Mit diesen Pulvern wurden drei verschiedene Kakaogetränke (Zusammensetzung in Tabelle 1) angerührt. Der Flavanolgehalt des Kakaos in der höchsten Dosierung (917 mg) entspricht dabei in etwa dem von

**Tabelle 1 Zusammensetzung der Kakaogetränke**

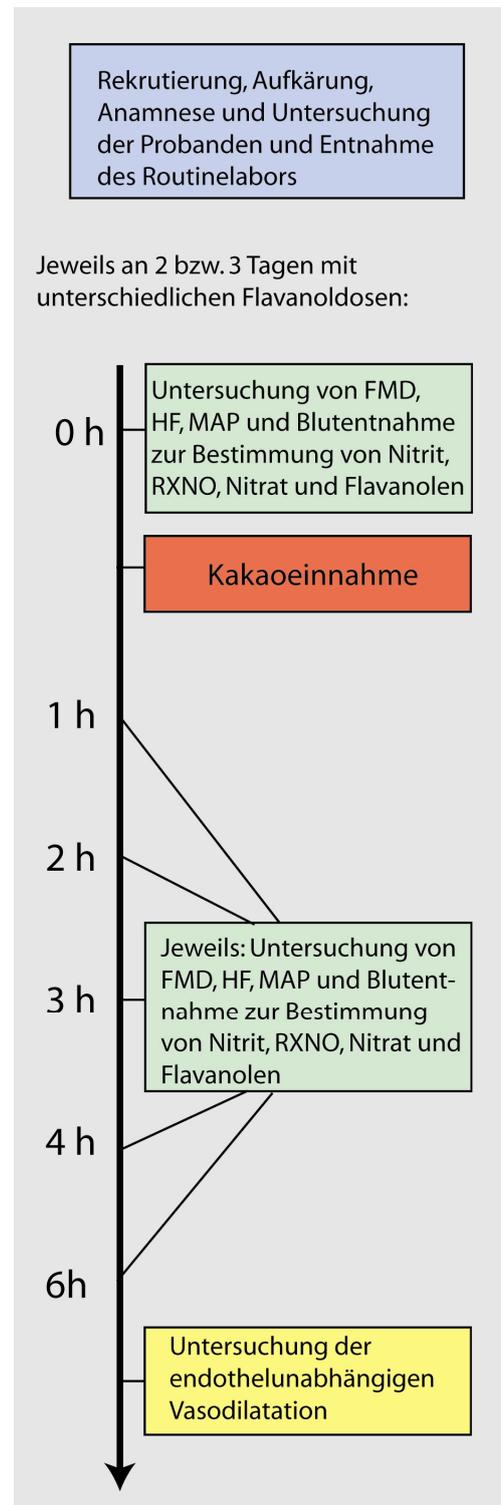
Flavanolgehalt	Pulver (angerührt in 300 ml Wasser)		
	niedrig	mittel	hoch
Gesamtflavanole [mg]	<b>37</b>	<b>330</b>	<b>917</b>
Monomere [mg]	9	80	223
(Epicatechin)	7	64	178
(Catechin)	2	16	45
Dimere [mg]	7	61	170
Trimere-Decamere [mg]	21	189	524
Theobromin [mg]	665	672	684
Koffein [mg]	43	41	37
Energie [kcal]	238	239	241
Fett [g]	3,0	2,9	2,7
Kohlehydrate [g]	33,6	34,0	34,8
Proteine [g]	19,2	19,2	19,2

211 g dunkler Schokolade, 7 l Rotwein, 6,5 l Preiselbeersaft oder 5-6 Äpfeln <sup>92</sup>.

## 2.1.2. Studienprotokoll (Akuteffektstudie)

Entsprechend einer randomisierten Cross-over Doppelblindstudie setzte sich das Studienprotokoll der *Akuteffektstudie* (Abbildung 3) wie folgt zusammen: Die Probanden erschienen an zwei bzw. drei Tagen und erhielten jeweils randomisiert einen Kakao mit einem Flavanolgehalt von 37 oder 917 mg bzw. 37, 330 oder 917 mg angerührt in 300 ml warmem Wasser. Raucher erhielten drei und Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren zwei verschiedene Dosierungen des Kakaos.

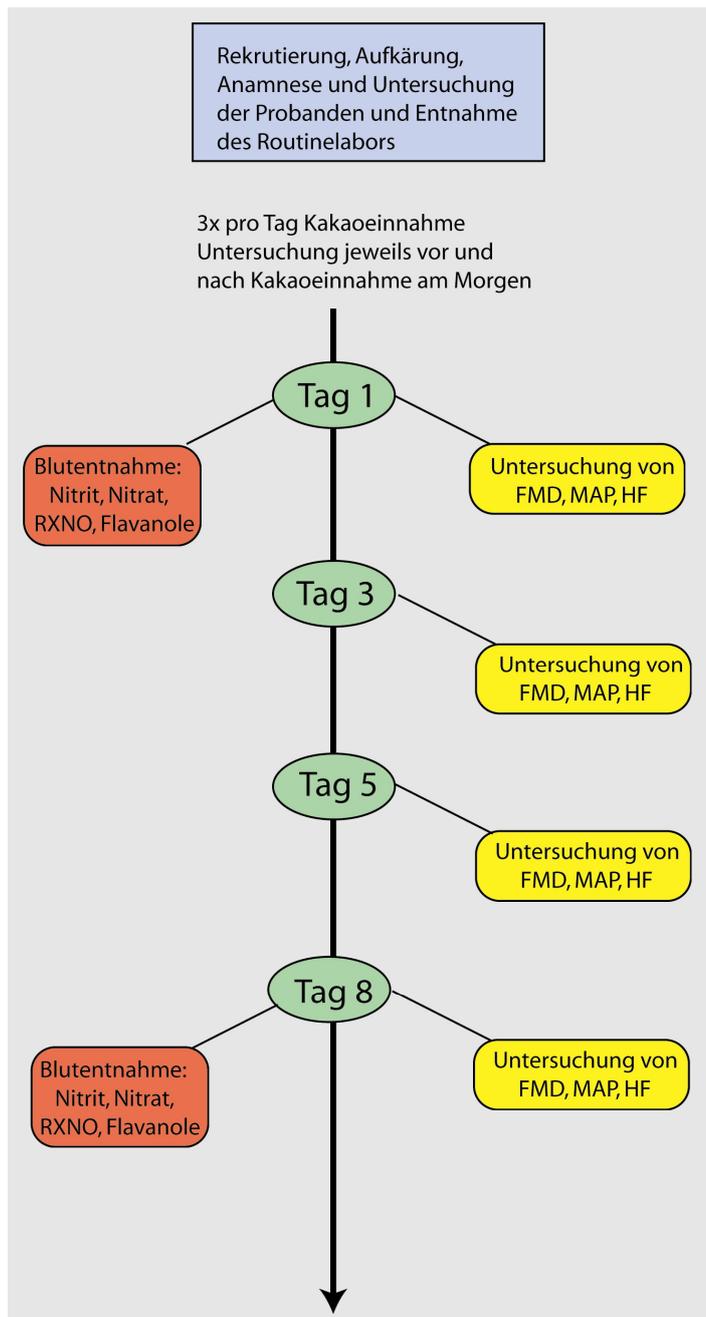
Am Morgen der ersten Untersuchung erfolgte zunächst eine Blutentnahme. Hieraus wurden das Routinelabor sowie das Nitrit, das Nitrat, die RXNOs sowie die Flavanolspiegel im Plasma bestimmt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte eine Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis, mit der die FMD quantifiziert wurde. Danach tranken die Probanden den Kakao mit unterschiedlichem Flavanolgehalt. Dann folgten 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach Kakaoingestion eine weitere Blutentnahme zur Nitrit, Nitrat, RXNO und Flavanolbestimmung sowie eine Ultraschalluntersuchung. Nach Abschluss der Untersuchungen wurde noch die endothelunabhängige Vasodilatation nach oraler Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN) mittels Ultraschall bestimmt. Die Probanden waren über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden vor und während der ganzen Untersuchung nüchtern und Rauchen wurde nicht gestattet. Zwischen zwei Untersuchungstagen bestand ein Abstand von mindestens zwei Tagen (wash-out).



**Abbildung 3**  
Flussdiagramm der *Akuteffektstudie*

### 2.1.3. Studienprotokoll (*Wochenstudie*)

Das Studienprotokoll der *Wochenstudie* (Abbildung 4) setzt sich wie folgt zusammen: Die Probanden erhielten nach Entnahme eines Routinelabors am ersten Studientag Kakao zur selbstständigen Einnahme für eine Woche. Dabei sollten die Probanden dreimal täglich jeweils einen Kakao mit einem Flavanolgehalt von 306 mg zu sich nehmen. Die Zusammensetzung entspricht einem Drittel des Getränks mit hohem Flavanolgehalt (siehe Tabelle 1). Zur Kontrolle des Verlaufs erfolgten Ultraschalluntersuchungen an den Tagen 1, 3, 5 und 8 sowie Blutentnahmen an den Tagen 1 und 8 jeweils vor und nach der Kakaoeinnahme am Morgen. 12 Stunden vor und während der Untersuchungszeit waren die Probanden nüchtern und durften nicht rauchen. Der Kakao wurde an den Untersuchungstagen in 100 ml warmem Wasser angerührt. Zu den anderen Zeitpunkten stand es den Probanden frei, den Kakao auch in anderer Form (z. B. mit Milch) zu sich zu nehmen. Außerhalb der Untersuchung konsumierten die Probanden ihre gewohnte Menge an Zigaretten. Die Probanden dienten als ihre eigene Kontrolle und so erfolgte die Untersuchung aller Parameter noch einmal eine Woche nach der letzten Kakaoeinnahme, also an Tag 15.



**Abbildung 4**  
Flussdiagramm der *Wochenstudie*

## 2.2. Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden Normalpersonen und Personen mit dem kardiovaskulären Risikofaktor Rauchen untersucht. Dabei setzte sich das Studienkollektiv der *Akuteffektstudie* aus 5 Normalpersonen (5 Männer) und 5 Rauchern (5 Männer) im Alter zwischen 20 und 30 Jahren zusammen. Das Studienkollektiv der *Wochenstudie* bestand aus 6 männlichen Rauchern im Alter zwischen 25 und 32 Jahren (Details siehe Ergebnisteil 3.1.). Sämtliche Studienteilnehmer waren freiwillige Probanden. Jeder Proband gab nach einem Aufklärungsgespräch sein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Folgende Kriterien führten zum Ausschluss von der Studie:

- Diabetes mellitus <sup>101;102</sup>, arterielle Hypertonie <sup>103;104</sup> oder Hypercholesterinämie <sup>105</sup>
- akute Entzündungen (CRP > 0,5 mg/dl)
- Nierenfunktionsstörungen oder Hämodialyse
- Herzinsuffizienz gemäß NYHA III. oder IV. Grades
- relevante Herzrhythmusstörungen wie Arrhythmia absoluta
- Body Mass Index (BMI) >30 kg/m<sup>2</sup>

Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden anamnestische Angaben sowie die klinische Untersuchung und laborchemische Parameter herangezogen. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die in der Vergangenheit täglich mindestens 20 Zigaretten über ein Jahr, also ein Packungsjahr, geraucht hatten. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien <sup>103</sup> bzw. der WHO-Richtlinien <sup>104</sup> diagnostiziert, wenn arterielle Blutdruckwerte an drei verschiedenen Tagen >140/>90 mmHg gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der WHO <sup>101</sup> und der ADA <sup>102</sup> diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen Plasmaplankosespiegel nüchtern >126 mg/dl gemessen wurden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. In Anlehnung an die Richtlinien der AHA und des NHLBI wurde eine Hypercholesterinämie definiert als Vorliegen eines Gesamtcholesterins >240 mg/dl, eines LDL-Cholesterins >160 mg/dl, eines HDL-Cholesterins <35 mg/dl oder bestehender cholesterinsenkender Therapie <sup>105</sup>.

## **2.3. Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis**

Neben den biochemischen Blutuntersuchungen zur Quantifizierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels erfolgte die funktionelle Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation mittels hochauflösenden Ultraschalls. Mit diesem Verfahren wurde die Zunahme des Durchmessers der Arteria brachialis nach Stimulation der NO-Produktion durch Schubspannung quantifiziert<sup>60</sup>. Diese Technik wird als Fluss-vermittelte Dilatation (FMD – Flow Mediated Dilatation) bezeichnet.

Hierzu wurde zunächst die Arteria brachialis unter Ruhebedingungen in der Ellenbeuge aufgesucht und mittels Pulswellendoppler als Arterie identifiziert. Nach Vergrößerung des Gefäßabschnitts erfolgte die Messung des Durchmessers im Längsschnitt. Danach wurde eine reaktive Hyperämie im Versorgungsabschnitt der Arterie induziert. Hierzu wurde unmittelbar unterhalb der Ellenbeuge eine Blutdruckmanschette platziert und auf einen Druck 250 mmHg für 5 Minuten aufgepumpt. Diese Ischämie führt zu einer Dilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet der zugehörigen Leitungsarterie. Hieraus wiederum resultiert nach Lösen der Stauung ein erhöhter Blutfluss in der Leitungsarterie, der mit einer erhöhten Schubspannung einhergeht, welche einen physiologischen Stimulus für das Gefäßendothel zur NO-Produktion darstellt. Die Zunahme des Durchmessers infolge der vermehrten NO-Freisetzung wurde 60 s nach Beendigung der Ischämie quantifiziert. Unter den beschriebenen Bedingungen ist die Dilatation nahezu vollständig NO-vermittelt<sup>106</sup>.

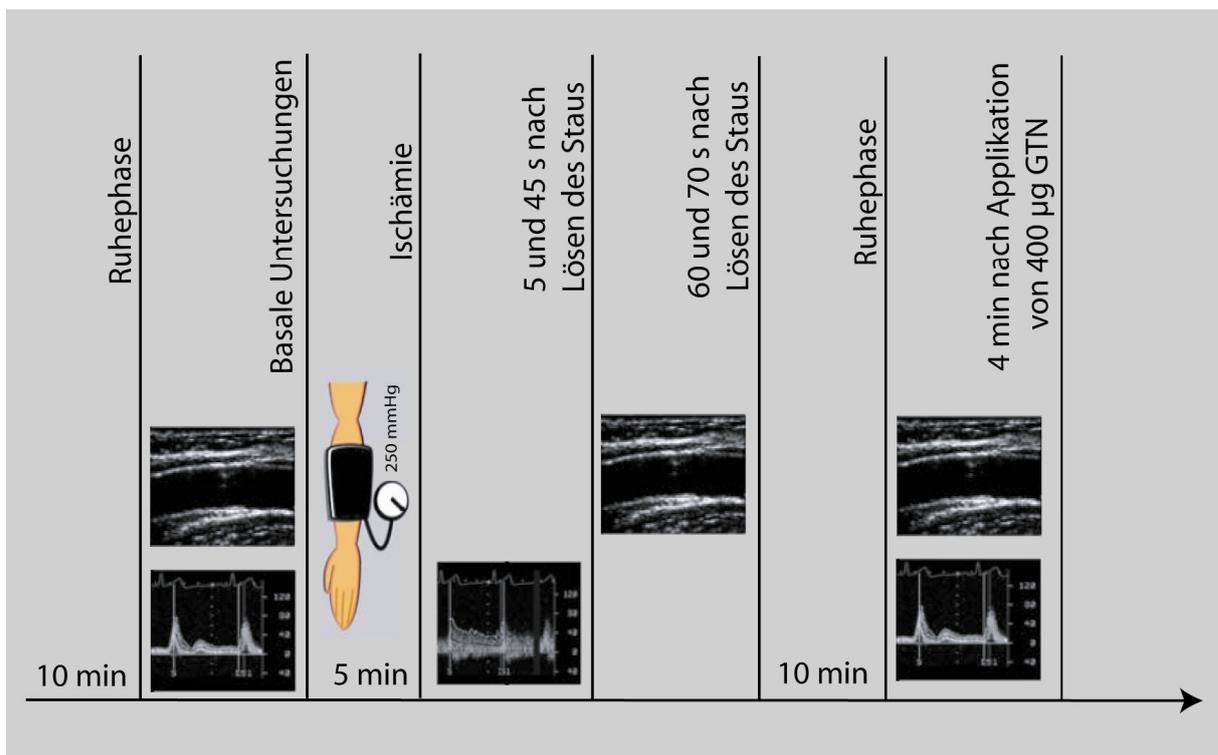
Eine eingeschränkte FMD kann durch eine verminderte NO-Produktion des Endothels, durch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder durch einen vermehrten NO-Abbau bedingt sein. Deshalb wurde am Ende der Untersuchungstage jeweils die endothelunabhängige Dilatation quantifiziert. Hierzu wurde der Durchmesser der Arteria brachialis vor sowie 4 min nach sublingualer Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual, Pohl, Deutschland) bestimmt.

### **2.3.1. Untersuchungsprotokoll**

Die Untersuchungen beider Studien wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C zu den in 2.1.1./2. angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Eindringtiefe des Ultraschalls wurde auf 3 cm festgelegt. Der Durchmesser der Arteria brachialis wurde dadurch identifiziert, dass man sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand klar vom Lumen abgrenzen konnte. Anschließend wurde der Bereich unmittelbar um das Gefäß mit der Zoomfunktion vergrößert.

Der Kontrast zwischen Arterienlumen und Arterienwand wurde durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen optimiert. Nach Markierung der Schallkopfposition am Arm wurden weder der Schallkopf noch die Geräteeinstellungen während der Untersuchung verändert.

Nach einer zehnmütigen Ruhephase in liegender Position erfolgte die Messung des arteriellen Blutdrucks (nicht-invasiv nach Riva-Rocci), sowie des RuheDurchmessers. Parallel dazu wurde mittels PW-Doppler die Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen gemessen. Anschließend wurde eine am proximalen Unterarm lokalisierte Blutdruckmanschette über 5 min auf 250 mmHg insuffliert. 5 s und 45 s nach Lösung der Stauung wurde dopplersonographisch die maximale Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie gemessen, 60 s und 70 s später wurde der Durchmesser bestimmt (FMD). Nach einer zehnmütigen Ruhephase erfolgte dann die Untersuchung der endothelunabhängigen Dilatation. Dazu wurden 400 µg Glyzeroltrinitrat als Zerbeißkapsel sublingual verabreicht. Vier Minuten später erfolgte die Quantifizierung des Durchmessers und der Fließgeschwindigkeit.

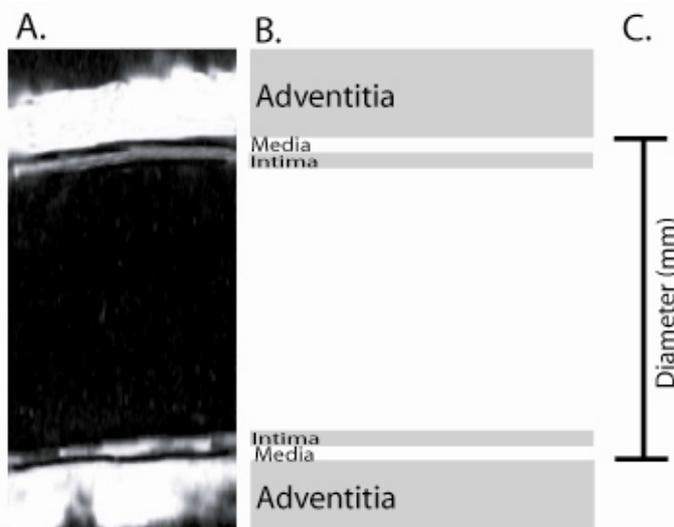


**Abbildung 5**

Zeitliche Abfolge des Ablaufs der Ultraschalluntersuchungen. Von links nach rechts: Messung der Fließgeschwindigkeit und des Durchmessers unter Ruhebedingungen, dann nach 5 min Ischämie, nach einer Ruhephase Messung der endothelunabhängigen Dilatation. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind im unteren Teil exemplarische Originalaufnahmen eingefügt (Oben: Längsschnitt der A. brachialis; Unten: Flussprofil)

### 2.3.2. Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers

Die Bestimmung des Durchmessers der Arteria brachialis im Bereich der Ellenbeuge erfolgte anhand von Längsschnitten. Diese wurden mit Hilfe eines hochauflösenden 15 MHz Linear Array Schallkopfes (Hewlett Packard, Sonos 2000, USA) aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Bildschleifen umfassten jeweils mindestens 3 Herzzyklen. Die Vermessungen des Arterienradius erfolgten computergestützt mit Hilfe einer speziell hierfür entwickelten Software (Brachial Analyzer, Medical Imaging Applications, Iowa City, IO, USA). Aufgrund der pulsatilen Schwankungen des Durchmessers während des Herzzyklus wurden alle Messungen EKG-gesteuert am Ende der Diastole (R-Zacke) durchgeführt. Als Eckpunkte der Durchmesserbestimmungen dienten die so genannten M-Linien (Abb. 9). Diese echoarmen M-Linien stellen den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media dar. Hierzu wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M-Linie bis zur schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse vermessen <sup>107;108</sup>.



**Abbildung 6**

Schematische Gegenüberstellung des Ultraschallechos der A. brachialis und des anatomischen Korrelates der wandbildenden Strukturen

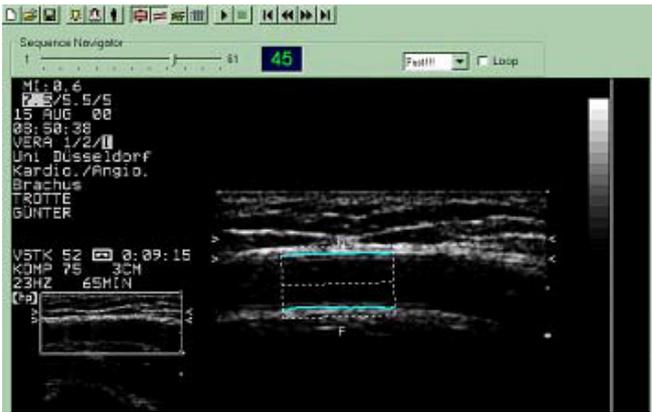
A: Sonographische Darstellung der Arteria brachialis. Die M-Linie stellt sich echoarm dar.

B: Anatomisches Korrelat der echobildenden Strukturen.

C: Den Durchmesserbestimmungen wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie zu Grunde gelegt.

(Abbildung modifiziert nach Wendelhag et al. <sup>109</sup>)

Die Bestimmung des Durchmessers erfolgt R-Zacken-synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt (Abb. 10). Mit dieser Messmethode kann mindestens eine Tag-zu-Tag-Variabilität von  $1,3 \pm 0,9\%$ , eine Intra-Observer-Differenz von  $0,8 \pm 0,6\%$  und eine Inter-Observer-Differenz von  $0,8 \pm 0,4\%$  erreicht werden <sup>108</sup>.



**Abbildung 7**  
 PC-gestützte Vermessung des Durchmessers der A. brachialis. Die Bestimmung des Durchmessers erfolgte durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten in einem zu definierenden Messabschnitt (Abbildung nach Heiss <sup>110</sup>)

### 2.3.3. Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Durchmessers der Arteria brachialis

Um diese Methode noch zusätzlich zu validieren, wurde an zwei Gummischläuchen in den Durchmessern 5,0 mm und 7,5 mm mit dem beschriebenen Verfahren eine Durchmesserbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden die Gummischläuche mit Ultraschallgel gefüllt und in ebenfalls mit Ultraschallgel gefüllte Plastikrohre eingetaucht. Der Schallkopf wurde auf die Plastikrohre aufgesetzt und der Schlauchlängsschnitt dargestellt. Die Messung wurde an zwei verschiedenen Tagen zu jeweils zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und nach dem oben beschriebenen Verfahren analog zu den an Probanden gewonnenen Schleifen ausgewertet. Statt der EKG-gekoppelten Messung wurde eine Schleife von zwei Sekunden Länge aufgezeichnet. Dies entsprach 48 Einzelbildern, die einzeln vermessen wurden. Mittelwert und Standardabweichung wurden über alle 48 Messungen errechnet. Außerdem wurde analog zur Studie von Preik et al. <sup>108</sup> die Tag-zu-Tag-Variabilität bei den zehn Probanden der *Akuteffektstudie* geprüft. Dabei wurden jeweils die Differenzen der einzelnen FMD-Werte zwischen zwei untersuchten Tagen errechnet und deren Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

## **2.4. Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit, Nitrat und gebundenem NO im Plasma**

### **2.4.1. Blutentnahme**

Die Blutentnahmen erfolgten bei den Probanden der *Wochenstudie* jeweils aus einer Kubitalvene. Zur Punktion wurden Einwegkanülen (Typ Venofix, Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Bei der *Akuteffektstudie* wurde den Probanden aufgrund der häufigen Blutentnahme (6 x pro Untersuchungstag) eine Venenverweilkanüle (Typ Vasofix, Braun, Melsungen, Deutschland) in eine epifasziale Unterarmvene gelegt. Die Entnahme des Routinelabors erfolgte mit Vakuurröhrchen (Becton Dickinson, Vacutainer Systems, Großbritannien). Die Entnahme des Blutes zur Nitrit-, RXNO- und Nitratbestimmung erfolgte in 2 bzw. 10 ml Einmalspritzen (Typ Discardit II, Becton Dickinson, Plymouth, Großbritannien). Danach wurde das Blut in 15 ml Falcontubes (Greiner, Solingen, Deutschland) gegeben. Zur Bestimmung der Nitrit- und RXNO-Konzentrationen im Plasma wurden 9 ml Vollblut mit 1 ml EDTA-Lösung, zusammengesetzt aus 0,025 M EDTA (Sigma, Steinheim, Deutschland) und 0,1 M N-Ethylmaleimid (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) gelöst in isotoner Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland), versetzt. Zur Nitratbestimmung wurden 2 ml Vollblut mit 8 ml Heparinlösung, mit einem Heparin Gehalt von 20 IE/ml (Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), gelöst in isotoner Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) versetzt.

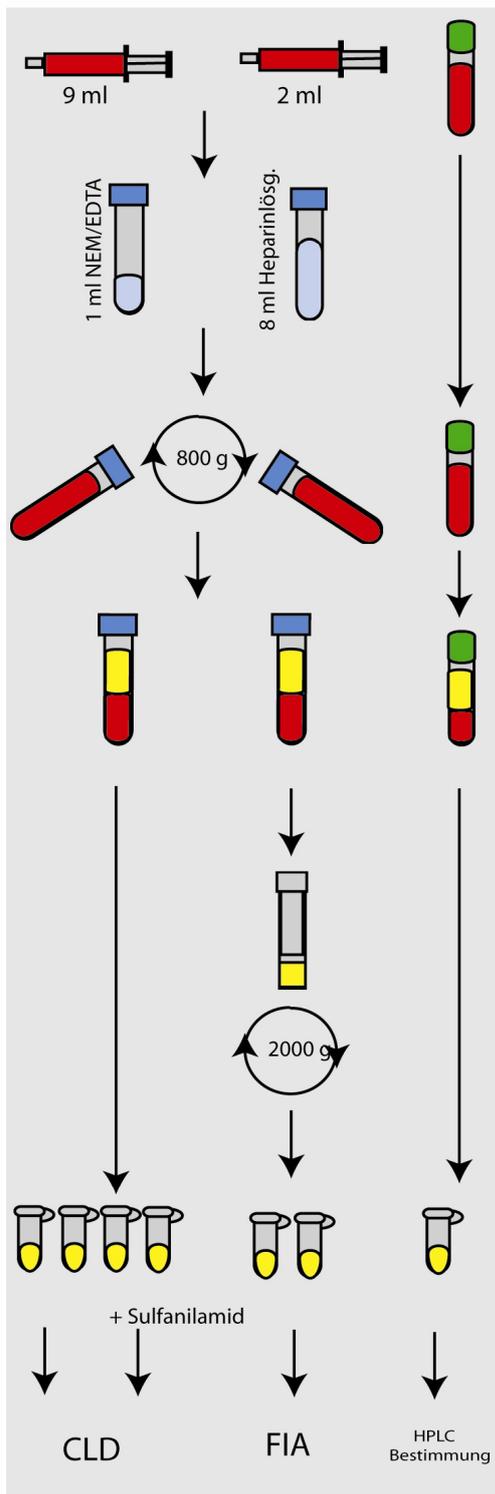
### **2.4.2. Probenaufarbeitung**

Alle vorbereiteten Lösungen sowie die Zentrifugen und Spritzen wurden bei 4°C gekühlt. Alle Proben wurden immer unmittelbar (max. 60 s) nach Entnahme 15 min. bei 800 g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Das Plasma zur Bestimmung des Nitrit- bzw. RXNO-Gehalts wurde danach bei -20°C eingefroren. Das Plasma zur Nitratbestimmung wurde nach der Zentrifugation noch einmal 60 min bei 2000 g in Ultrafiltrationsröhrchen (Typ Centrisart cut-off 20000 Da, Sartorius, Göttingen, Deutschland) zentrifugiert. Danach wurden diese Proben bei -80°C bis zur Bestimmung gelagert.

Am Tag der Messung wurde das Plasma vor Licht geschützt aufgetaut. Die Proben zur Nitrit- und Nitratbestimmung wurden unbehandelt weiterverwendet. Die Proben zur RXNO-Bestimmung wurden 15 min vor der Messung mit 0,5%igem Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M HCl bei 25°C inkubiert. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein

stabiles Diazoniumsalz, wodurch die Probe vor der Bestimmung praktisch von Nitrit befreit wird. Die durch diese Reaktion nicht beeinträchtigten RXNOs können dann unabhängig vom Nitritgehalt der Probe bestimmt werden <sup>111</sup>. Alle Proben wurden erst unmittelbar vor der Messung aufgetaut und immer in der gleichen Zeit verarbeitet.

## Probenaufarbeitung:



Entnahme von 2 ml/9 ml Blut in Spritzen und 7 ml in einen Vacutainer

Überführung in gekühlte 15 ml Falcontubes, die mit 1 ml NEM/EDTA-Lösung bzw. 8 ml Heparinlösung gefüllt waren

Zentrifugation bei 800 g

Überführung des Überstandes in Eppendorfgefäße bzw. Ultrafiltrationsröhrchen (Cut-Off 20.000 da)

Zentrifugation bei 2000 g

Einfrieren bei -20°C

Einfrieren bei -80°C

Einfrieren bei -80°C

Nitrit/RXNO-Bestimmung

Nitrat-Bestimmung

Flavanol-Bestimmung

**Abbildung 8**

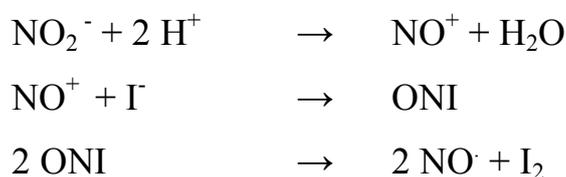
Schematische Darstellung der Blutprobenaufarbeitung

Von oben nach unten: Blutentnahme und Zusatz der jeweiligen Aufbewahrungslösungen; Zentrifugation und Plasmaentnahme, zusätzliche Ultrafiltration des Plasmas zur Nitratbestimmung, Einfrieren der Proben zur späteren Analyse mit CLD-, FIA- und HPLC; Abkürzungen: CLD – Chemilumineszenz Detektionsanlage, FIA – Fluss Injektions Analyse, HPLC – High Pressure Liquid Chromatography, NEM - N-Ethyl-Maleimid, EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure, RXNO - gebundenes NO

### 2.4.3. Bestimmung der Nitrit-/RXNO-Konzentration im Plasma

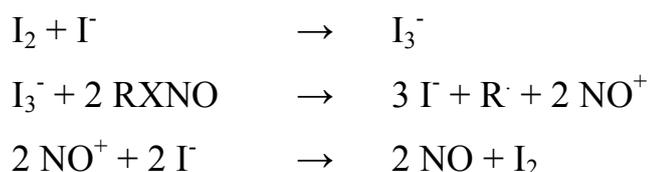
Zur Detektion des Nitritgehalts der Plasmaproben wurde die Chemielumineszenz-Detektionsanlage (CLD) eingesetzt. Die Gasphasen-Chemielumineszenz stellt eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zur Messung von Stickstoffmonoxid in flüssigen oder gasförmigen Proben dar. Die Methode beruht auf der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Ozon, bei der Lichtquanten frei werden, die stöchiometrisch detektiert werden können. Zum Einsatz kam hier eine Chemielumineszenzanlage der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO e, Eco Physics, Schweiz).

Die Proben wurden zunächst mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kunststoffmembran in die Lösungskammer (Verhees, Deutschland) der Anlage injiziert. In der Injektionskammer befanden sich 20 ml Braun'sche Lösung. Diese enthielt 3,24 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1,14 g Iod (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in 30 ml HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) und versetzt mit 405 ml konzentrierter Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland). Diese Lösung dient der reduktiven Freisetzung von NO aus der Probe. Dies läuft nach folgenden Reaktionsgleichungen ab:

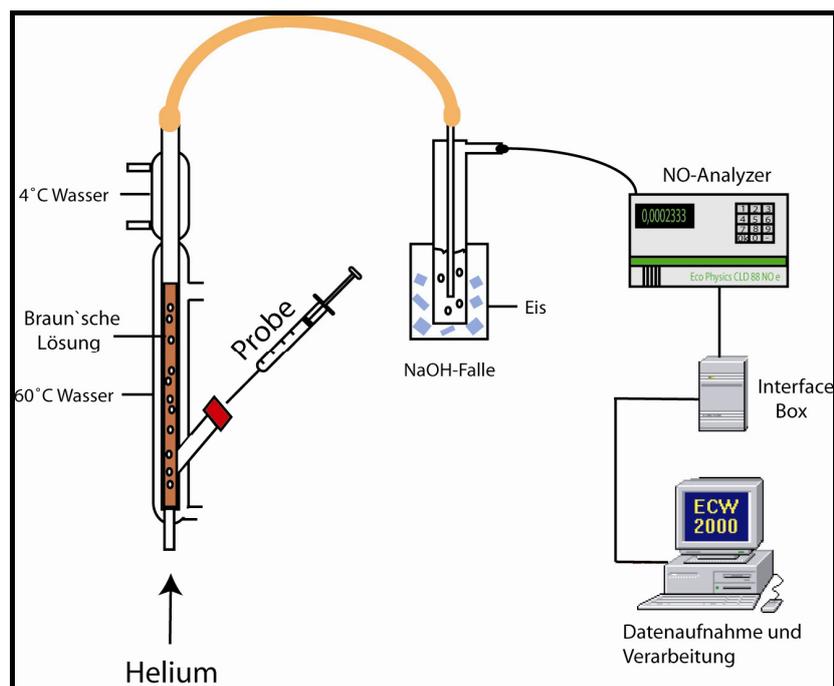


Das auf diese Weise äquimolar aus Nitrit gebildete NO kann dann mittels der oben beschriebenen Photoreaktion bestimmt werden.

Zur Vermessung von gebundenem NO im Plasma wurden die Proben wie oben (2.3.2.) beschrieben mit Sulfanilamid inkubiert. Analog zu den oben beschriebenen Reaktionen mit Nitrit wird auch aus den RXNOs durch Reaktion mit der Braun'schen Lösung NO freigesetzt. Diese Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:



Alle Proben wurden zur Messung dreifach in die Braun'sche Lösung injiziert. Das Aufgabevolumen betrug bei den Nitritmessungen je 100  $\mu\text{l}$  und bei den RXNO-Messungen je 330  $\mu\text{l}$ . Die RXNO-Werte wurden deshalb bei der Auswertung volumenkoriert. Das Reaktionsgefäß wurde von einem Wasserbad ummantelt und mit 60°C warmem Wasser umspült. Durch eine Glasfritte strömte während der gesamten Messung mit konstantem Fluss Helium. Aufgrund des hohen Löslichkeitskoeffizienten trat das gebildete NO schnell in die Gasphase über und gelangte so in die Reaktionskammer der Anlage, wo NO mit der oben beschriebenen Photoreaktion mit Ozon detektiert wurde. Ozon reagiert dabei spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid. Ein Teil des gebildeten Stickstoffdioxids befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand. Diese überschüssige Energie wird dann in Form von Lichtquanten emittiert. Zur Datenaufnahme wurde ein handelsüblicher PC mit der Software Eurochrom (Knauer, Dortmund, Deutschland) verwendet. Zur Verbindung zwischen Rechner und Anlage diente eine Interfacebox der Firma Knauer.



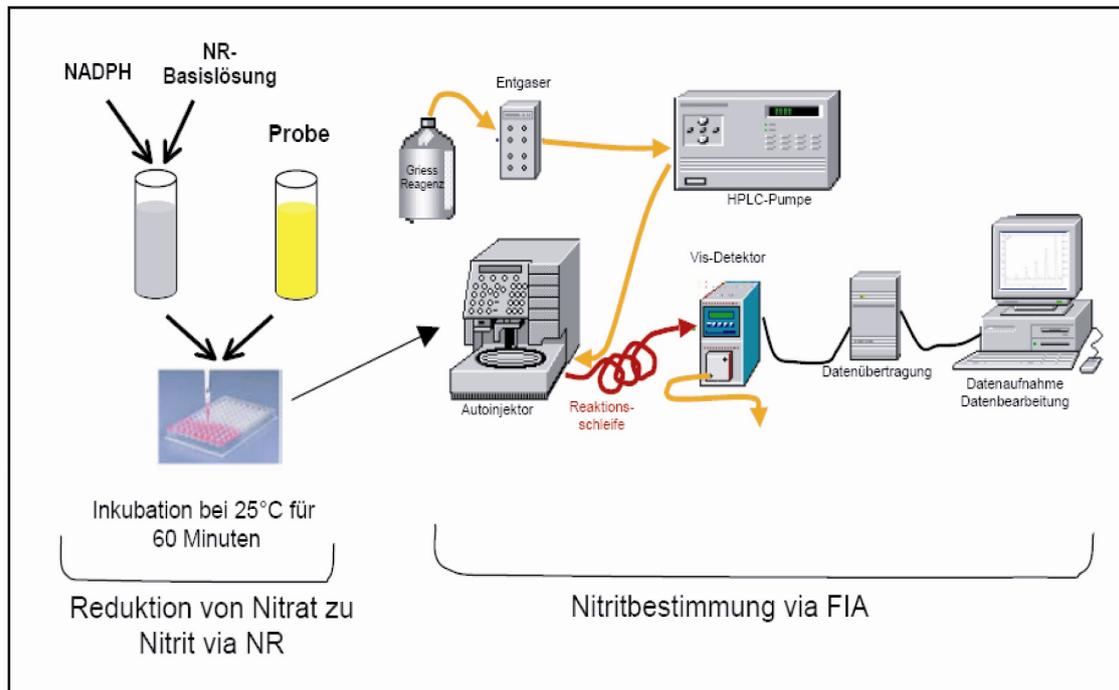
**Abbildung 9**  
Schematische Darstellung der Chemielumineszenz-Detektionsanlage (CLD) Ablauf: Injektion der Probe in die Braun'sche Lösung, dort Umwandlung von Nitrit/RXNOs in NO, durch das Trägergas Helium Transport zum NO-Analyzertyp, Detektion mittels UV-Reaktion, Datenaufnahme am PC durch die Software Eurochrom

#### 2.4.4. Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma

Nitrat wurde mittels Nitratreduktase in Nitrit überführt, welches bei der Reaktion mit Naphthylethylendiamin und Sulfanilamid (Griess-Reaktion) einen Azofarbstoff bildet, der mittels photometrischer Absorptionsmessung quantifiziert wurde. Bei diesem Nachweis wird die Summe der Nitritkonzentration und der Nitratkonzentration der Probe bestimmt. Die Nitritkonzentration der untersuchten Proben lag allerdings bei den untersuchten Proben immer unter 1 µmol/l und somit unter der Nachweisgrenze der Methode.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit NADPH (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) sowie einer weiteren Lösung, bestehend aus Nitratreduktase (Sigma, Steinheim, Deutschland), Glucose-6-Phosphat (Roche, Deutschland) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche, Deutschland) gelöst in Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) und TRIS-HCl (BioRad, Kalifornien, USA), versetzt und in einem dunklen Raum bei 25°C für 1 Stunde inkubiert. Es ergaben sich folgende Konzentrationen der jeweiligen Substanzen in der Probe: 70 mmol/l TRIS-HCl pH 7,4, 0,1 IE/ml NR, 1 mmol/l Glucose-6-Phosphat, 0,3 IE/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 2 µmol/l NADPH. Das in der Probe vorhandene Nitrat wird so durch die Nitratreduktase (NR) unter Verbrauch von NADPH zu Nitrit reduziert. Das bei der Reaktion entstehende  $\text{NADP}^+$  wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu NADPH reduziert und so wieder für die Nitratreduktasereaktion zur Verfügung gestellt.

Die Nitritkonzentrationen der Proben wurden dann mittels Fluss-Injektions-Analyse (FIA) bestimmt. Der Ablauf in der FIA-Anlage funktioniert nach folgendem Schema: Eine HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-6A, Japan) pumpt mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1,1 ml/min Griess-Reagenz durch einen Entgaser (Sunchrom, Deutschland) in die Messkammer eines Photometers (Shimadzu SPD-6AV). Dieses Reagenz setzt sich aus gleichen Teilen Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Konzentration von 10 g/l gelöst in 1% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamid (Sigma, Steinheim, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,2 g/l gelöst in HPLC- Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammen. Ein Autoinjektor (Spark Holland Triathlon, Niederlande) injiziert ein konstantes Volumen von 20 µl der untersuchten Proben in das fließende Griess-Reagenz. Die nun ablaufende Reaktion geht mit einer Absorptionsänderung bei 540 nm einher. Das nachgeschaltete Photometer misst diese Absorptionsänderung und übermittelt die Messdaten über eine Interface-Box (Knauer, Dortmund, Deutschland) an einen handelsüblichen Computer. Die Daten können dort mit der Software Chromgate 2.55 (Knauer, Dortmund, Deutschland) analysiert werden.



**Abbildung 10**

Schema der Nitratbestimmung mit Nitratreduktase (NR) und Fluss-Injektionsanalyse (FIA)

Ablauf: Umwandlung des Nitrats der Probe zu Nitrit mittels Nitratreduktase, Farbreaktion des Nitrits in der Griess-Reaktion, Detektion der Absorptionsänderung, Aufnahme der Daten am PC durch die Software Chromgate  
 Abkürzungen: NADPH - Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, HPLC – High Pressure Liquid Chromatography, Vis-Detektor – Photometer  
 (Abbildung nach Gharini <sup>112</sup>)

## 2.5. Quantifizierung der Flavanolspiegel in Plasma

Die Plasmaproben zur Bestimmung der Flavanolspiegel wurden freundlicherweise durch Mars (Hackettstown, NJ, USA) analysiert. Dies geschah unter Verwendung eines HPLC Systems (Hewlett Packard 1100 Series, HPLC Säule: Phenomenex C18(2) 150x4,8 mm, 3 micron). Bestimmt wurden dabei die Flavanolmonomere Epicatechin und Catechin sowie deren Metabolite Epicatechin-7- $\beta$ -D-glucuronide, 4-O-methyl-Epicatechin und 4-O-methyl-Epicatechin-7- $\beta$ -D-glucuronide. In der vorliegenden Arbeit wird stets die Summenangabe dieser Einzelsubstanzen verwendet.

## 2.6. Statistische Verfahren

Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert $\pm$ SE angegeben. Zur Prüfung dosis- und zeitabhängiger Effekte auf Signifikanz kam bei beiden Studien ein „allgemeines lineares Modell“ mit Messwiederholungen (Repeated Measurements ANOVA) zum Einsatz. Signifikante Änderungen der Gesamteffekte (z.B. Dosisabhängigkeit)

werden im Text angegeben. Korrelationen zwischen der Flavanolplasmakonzentration und den beobachteten Effekten wurden mittels linearer Korrelation nach Pearson berechnet. Die Flavanolplasmaspiegel wurden abzüglich der Ausgangswerte des betrachteten Tages angegeben. Die statistische Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe des SPSS-Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, release 12, SPSS Inc., Chicago, III, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

##### 3.1.1. Charakterisierung der Studienpopulation (*Akuteffektstudie*)

In der *Akuteffektstudie* wurden zehn männliche Probanden untersucht, von denen fünf Raucher und fünf Nichtraucher waren. Zwischen dem Raucher- und dem Nichtraucherkollektiv bestanden keine signifikanten Unterschiede bzgl. Alter, Body-Mass-Index und dem mittleren arteriellen Blutdruck. Dies galt auch für die bestimmten Laborparameter. Die einzelnen Messwerte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2**  
Studienkollektiv *Akuteffektstudie*

	Raucher		Nichtraucher	
	MW	SE	MW	SE
n	5		5	
Alter [a]	26	1	23	1
Geschlecht	5m		5m	
Gewicht [kg]	74,6	6,3	79,6	4,2
Größe [cm]	186,4	4,6	186,6	1,9
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	21,3	1,0	22,8	0,8
RR sys [mmHg]	116	4	120	4
RR dia [mmHg]	76	2	79	3
MAP [mmHg]	89	3	93	3
Nikotinkonsum [pack-years]	9	2	0	0
<hr/>				
Harnsäure [mg/dl]	5,54	0,73	6,03	0,66
Gesamtcholesterin [mg/dl]	171	10	174	9
Triglyzeride [mg/dl]	80	13	94	5
Gesamteiweiß [g/dl]	7,29	0,26	7,63	0,15
CRP [mg/dl]	<0,3		<0,3	
Glukose [mg/dl]	78	3	80	4
Leukozyten [*1000/ $\mu$ l]	5,56	0,42	5,86	0,34
<hr/>				
Nitrit [nM]	67	8,1	72	8,4
RXNO [nM]	3,5	0,3	8,0	1,7
FMD [%]	3,6	0,2	5,5	1,0
GTN [%]	13,6	0,9	12,8	0,8

##### 3.1.2. Charakterisierung der Studienpopulation (*Wochenstudie*)

In der *Wochenstudie* wurden die sechs männlichen Probanden während regelmäßiger Kakaoeinnahme über eine Woche untersucht. Die im Vorfeld ermittelten Daten aus der Anamnese,

der Untersuchung und der Labordiagnostik sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Alle Parameter lagen in den entsprechenden Normbereichen.

**Tabelle 3**  
Studienkollektiv *Wochenstudie*

	<b>MW</b>	<b>SE</b>
Alter [a]	28	1
Geschlecht	m	
Gewicht [kg]	71	4
Größe [cm]	183	4
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	21	1
RR sys [mmHg]	114	2
RR dia [mmHg]	73	2
MAP [mmHg]	87	2
Nikotinkonsum [Packungsjahre]	9	2
Harnsäure [mg/dl]	5,2	0,4
Gesamtcholesterin [mg/dl]	170	6
Triglyceride [mg/dl]	91	19
Gesamteiweiß [g/dl]	7	0,4
CRP [mg/dl]	<0,3	
Glukose [mg/dl]	81	2
Leukozyten [*1000/ $\mu$ l]	6,2	0,5
Nitrit [nM]	59,4	3,9
RXNO [nM]	6,2	0,8
FMD [%]	3,7	0,4
GTN [%]	13,1	1,1

### 3.2. Ergebnisse der *Akuteffekt-* und *Wochenstudie*

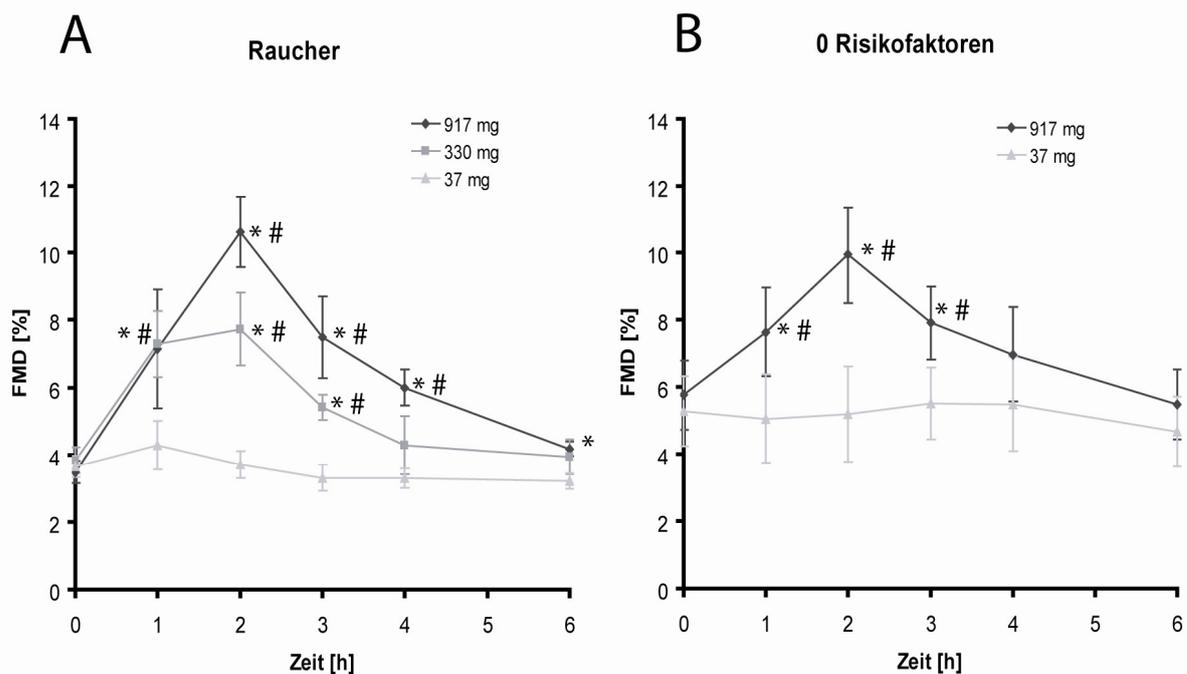
Mit der *Akuteffekt-* und der *Wochenstudie* sollten im Einzelnen folgende Punkte geklärt werden:

1. Untersuchung der akuten Effekte des Kakaos bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren
2. Nachweis einer Abhängigkeit der beobachteten Effekte von den Flavanolplasmaspiegeln
3. Nachweis eines anhaltenden Effektes bei regelmäßiger Kakaoeinnahme

Im Folgenden sind nun die Ergebnisse bzgl. der Punkte 1. – 3. aufgelistet.

### 3.2.1. Vergleich der akuten Effekte des Kakaos bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren

Bei der endothelabhängigen Dilatation zeigte sich nach der akuten Kakaоеinnahme eine deutliche Zunahme bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren. Dabei fiel eine signifikante Dosisabhängigkeit der Effekte auf. Die maximale Zunahme konnte jeweils nach zwei Stunden beobachtet werden. Obwohl die basalen FMD-Messungen bei Rauchern niedrigere Werte zeigten (Raucher:  $3,6 \pm 0,2\%$ ; Nichtraucher:  $5,5 \pm 1,0\%$ ), erreichten die Werte nach Einnahme von flavanolreichem Kakao ein vergleichbares Niveau wie Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren. Während bei Rauchern die FMD auf das 3,5-fache ihres Ausgangswertes anstieg, wurde bei Nichtrauchern nur ein 1,8-facher Anstieg beobachtet. Die endothelunabhängige Dilatation hingegen zeigte keine Unterschiede im Hinblick auf Rauchen oder Nichtrauchen. Die einzelnen Daten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



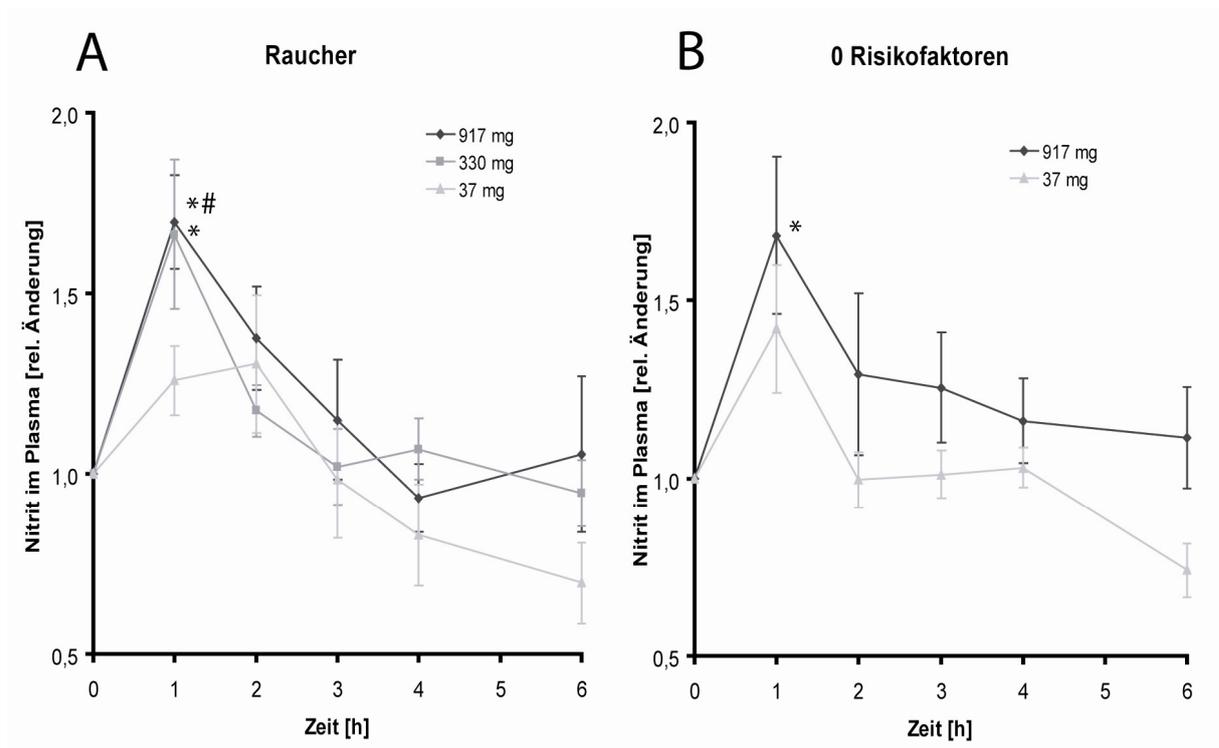
**Abbildung 11**

FMD bei (A) Rauchern und (B) Nichtrauchern,

\*  $p < 0,05$  vs 0 h desselben Tages; #  $p < 0,05$  vs entsprechender Zeitpunkt des 37 mg Tages (Kontrolle), alle Daten als MW  $\pm$  SE angegeben

Auch die Nitrit-Konzentrationen im Plasma zeigten nach der akuten Kakaоеinnahme deutliche Änderungen. Es konnte aber keine Dosisabhängigkeit der Effekte festgestellt werden. Ebenfalls ergaben sich bei den Effekten keine Unterschiede bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern. Das Maximum der Effekte war in beiden Fällen eine 1,7-fache Steigerung des

Ausgangswertes und wurde jeweils nach einer Stunde erreicht. Die akuten Änderungen der Nitritplasmakonzentration sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

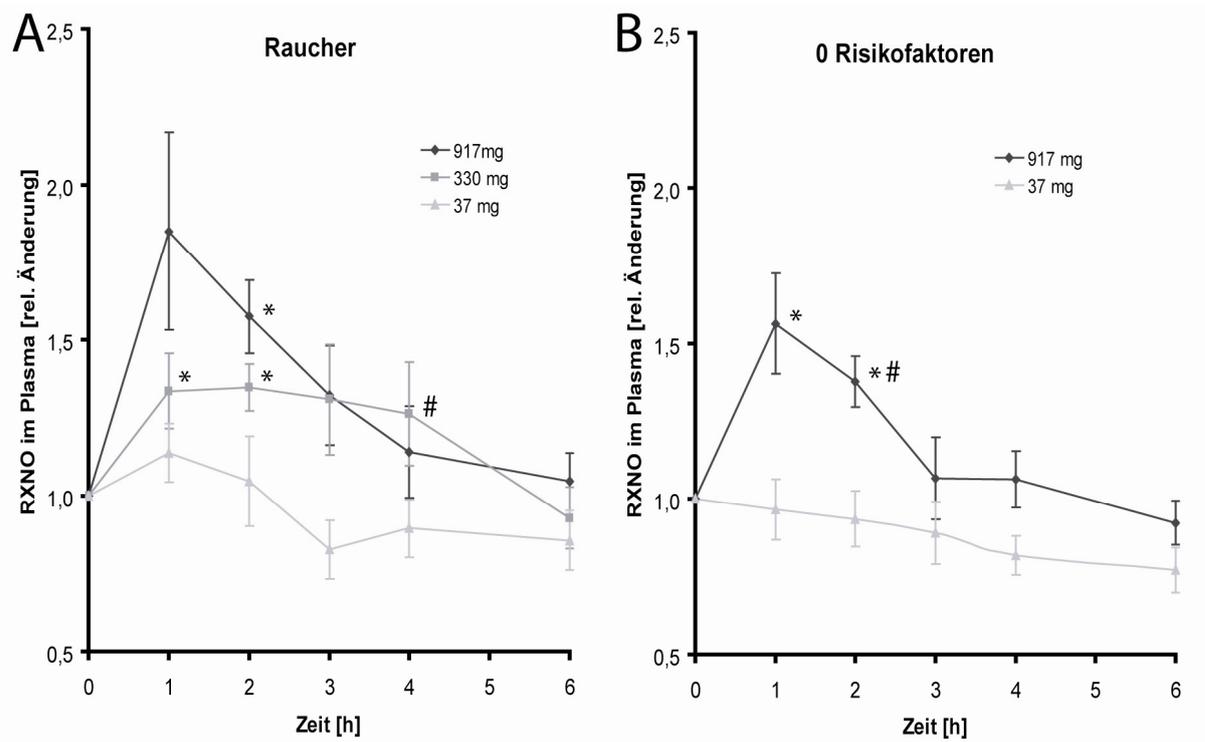


**Abbildung 12**

Relative Änderung der Nitrit-Plasmaspiegel bei (A) Rauchern und (B) Nichtrauchern

\*  $p < 0,05$  vs 0 h desselben Tages; #  $p < 0,05$  vs entsprechender Zeitpunkt des 37 mg Tages (Kontrolle), alle Daten als MW  $\pm$  SE angegeben

Die Nitratspiegel zeigten nach der akuten Kakaoeinnahme keine signifikante Änderung. Die durchschnittliche Nitratkonzentration betrug dabei  $20 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$ . Bei den RXNO-Konzentrationen im Plasma hingegen konnte eine signifikante Zunahme beobachtet werden. Der Effekt der hohen Dosierung (917 mg) unterschied sich im Gesamtverlauf signifikant von dem der niedrigen (37 mg). Die Maximalwerte wurden analog zu den Nitritwerten nach einer Stunde erreicht. Raucher zeigten signifikant niedrigere basale RXNO-Werte als Nichtraucher. Die Plasmakonzentrationen stiegen bei Rauchern von  $3 \pm 0,3$  auf  $6 \pm 1,4 \text{ nmol/l}$  und bei Nichtrauchern von  $8 \pm 1,2$  auf  $12 \pm 2,2 \text{ nmol/l}$  an. Raucher erreichten also auch nach Kakaoeinnahme nicht die Basalwerte von Nichtrauchern. Die relativen Änderungen der RXNO-Plasmaspiegel im Zeitverlauf sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

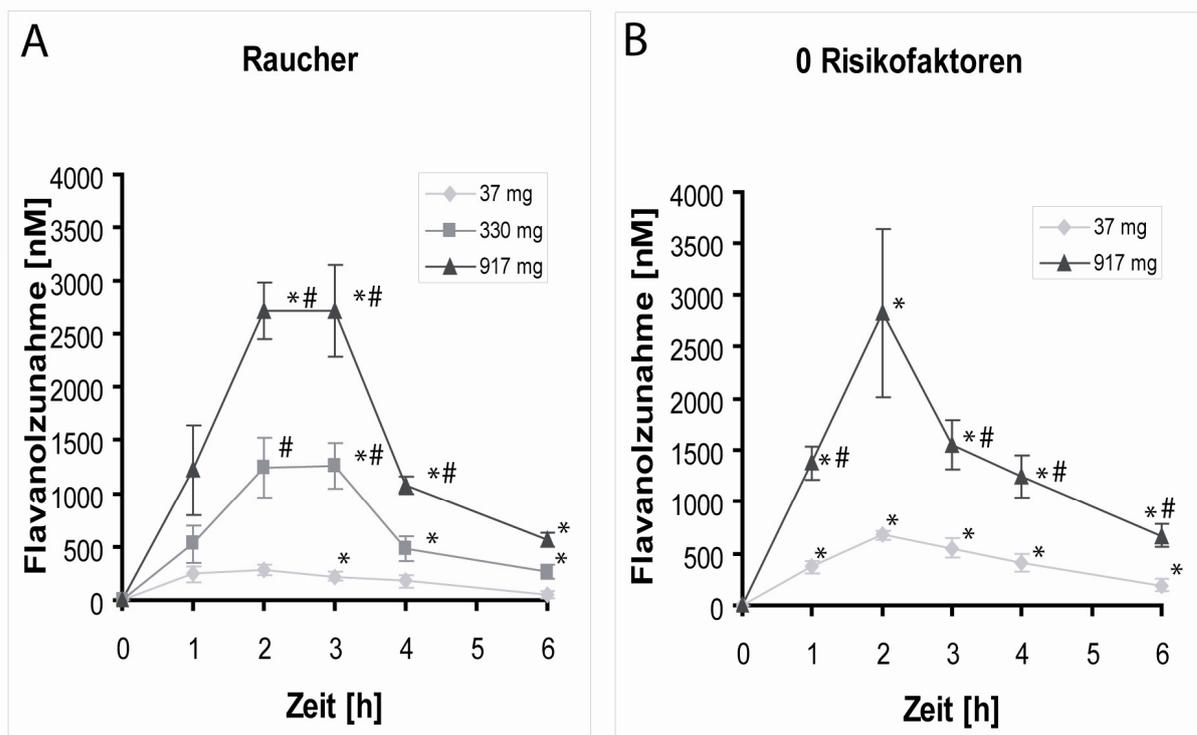


**Abbildung 13**

Relative Änderung der RXNO-Plasmaspiegel bei (A) Rauchern und (B) Nichtrauchern, \*  $p < 0,05$  vs 0 h Wert desselben Tages, #  $p < 0,05$  vs entsprechender Zeitpunkt des 37 mg Tages (Kontrolle), alle Daten als MW  $\pm$  SE

### 3.2.2. Abhängigkeit der beobachteten Effekte von den Flavanolplasmaspiegeln

Nach der akuten Kakaoeinnahme zeigte sich eine deutliche Zunahme der Flavanolplasmaspiegel. Dabei fiel eine signifikante Abhängigkeit von der applizierten Dosis auf. Die maximale Plasmakonzentration wurde im Mittel nach zwei Stunden beobachtet. Bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren stiegen die Werte in ähnlichem Ausmaß an. So wurde bei Rauchern ein Anstieg der Plasmakonzentration um ca.  $2700 \pm 290$  nmol/l und bei Nichtrauchern um ca.  $2800 \pm 890$  nmol/l beobachtet. Die einzelnen Daten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



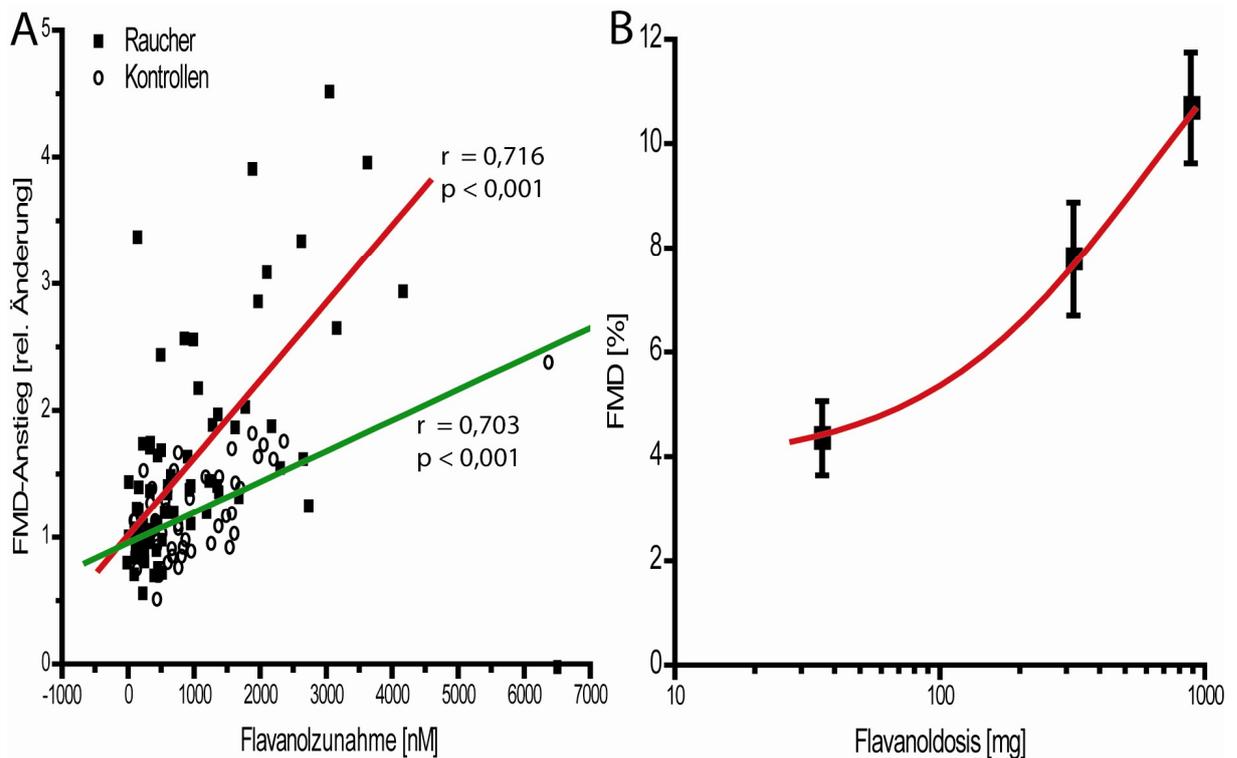
**Abbildung 14**

Zunahme der Flavanolspiegel im Plasma bei (A) Rauchern und (B) Nichtrauchern

\*  $p < 0,05$  vs 0 h Wert desselben Tages, #  $p < 0,05$  vs entsprechender Zeitpunkt des 37 mg Tages (Kontrolle), alle Daten als MW  $\pm$  SE

Das Maximum der Zunahme bei der FMD und bei den Flavanol im Plasma wurde jeweils nach zwei Stunden erreicht. Dies traf sowohl für Raucher als auch für Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren zu. Um die Abhängigkeit des FMD-Anstiegs von der Menge der applizierten Flavanole zu verdeutlichen, wurden die beiden Größen in Beziehung gesetzt. Dabei wurden gemischte Daten von Rauchern und Nichtrauchern verwendet. Die in der folgenden Abbildung dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt die kontinuierliche Zunahme der FMD bei steigender Dosis.

Um die Abhängigkeit des Effektes von der Zunahme der Flavanolplasmakonzentration zu bestätigen, wurden die einzelnen relativen FMD-Änderungen mit der zugehörigen Zunahme der Flavanolplasmakonzentration korreliert. Dies wurde getrennt für Raucher und Nichtraucher dargestellt. Es ergab sich eine hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Korrelation von 0,716 (Raucher) und von 0,703 (Nichtraucher). Eine Erhöhung der Flavanolplasmakonzentration um 1000 nmol/l verursachte dabei einen Anstieg der FMD um 61,1% (Raucher) bzw. 24,2%(Nichtraucher).



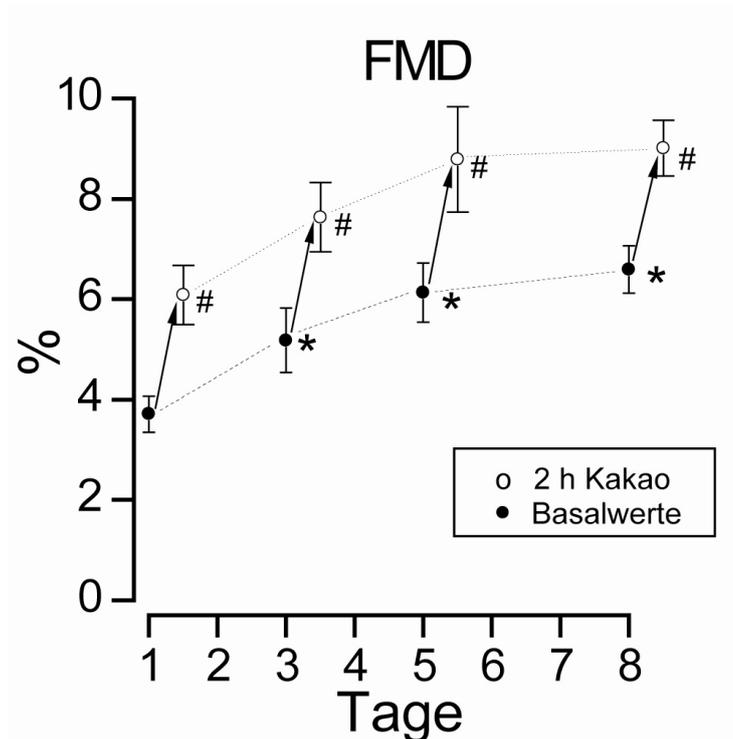
**Abbildung 15**

A: Korrelation zwischen dem FMD-Anstieg und der Zunahme der Flavanolplasmakonzentration ( $r$  – Korrelationskoeffizient nach Pearson); Daten von Probanden mit dem kardiovaskulären Risikofaktor Rauchen (rote Gerade, schwarze Quadrate) und Nichtrauchern (grüne Gerade, weiße Kreise)

B: Dosis-Wirkungs-Beziehung der maximal erreichten FMD (2 h Wert); verwendet wurden gemischte Daten von Rauchern und Nichtrauchern; alle Werte als MW  $\pm$  SE angegeben

### 3.2.3. Effekte der regelmäßigen Kakaoeinnahme

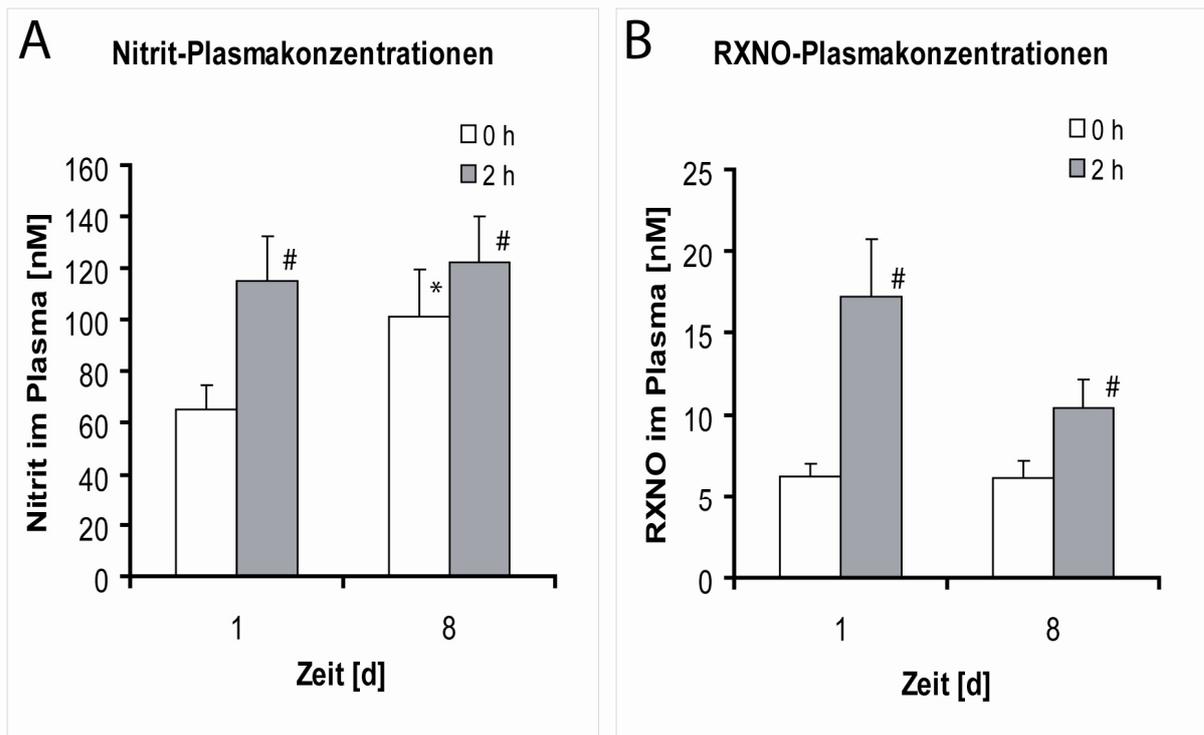
Während der Kakaoeinnahme über eine Woche konnte eine anhaltende Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation beobachtet werden. Die basale FMD stieg kontinuierlich an und erreichte an Tag 5 ein Plateau, was auf eine Sättigung des beobachteten Effekts schließen lässt. Der erreichte Wert ( $6,6 \pm 0,5\%$ ) unterschied sich dabei nicht signifikant ( $p = 0,35$ ) von dem in der *Akuteffektstudie* ermittelten Wert für Nichtraucher ( $5,5 \pm 1,0\%$ ). Neben der beschriebenen Veränderung der Basalwerte blieb aber der kurzfristige Effekt des Kakaos erhalten und so zeigte sich zu den untersuchten Zeitpunkten zwei Stunden nach Kakaoeinnahme jeweils eine zusätzliche Steigerung. In dieser Studie wurde also ein akuter und ein anhaltender Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation durch Konsum von flavanolreichem Kakao erreicht, wobei die akuten Effekte auch bei den gesteigerten Basalwerten erhalten blieben. Eine Woche nach Aussetzen der Kakaoeinnahme kehrten die FMD-Werte auf ihr Ausgangsniveau zurück. Die geschilderten Beobachtungen sind in der folgenden Grafik dargestellt.



**Abbildung 16**

FMD im Zeitverlauf über eine Woche, \*  $p < 0,05$  vs 0 h Messung an Tag 1, #  $p < 0,05$  vs basale Messung des jeweiligen Tages; alle Werte als  $MW \pm SE$  angegeben

Auch bei den Nitrit-Konzentrationen im Plasma zeigten sich nach einer Woche Kakaoeinnahme signifikante Änderungen. Bei den Basalwerten wurde eine Steigerung der Plasmakonzentration von  $65 \pm 9$  auf  $101 \pm 18$  nmol/l erreicht. Die Nitritspiegel konnten analog zu der oben dargestellten FMD auch durch die akute Kakaoeinnahme noch gesteigert werden. So stieg jeweils nach zwei Stunden die Plasmakonzentration signifikant an. Nach einer Woche ohne Kakaoeinnahme (Tag 15) waren keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu Tag 1 mehr nachweisbar. Die Nitratspiegel zeigten analog zur akuten Kakaoeinnahme keine signifikante Änderung. Die durchschnittliche Nitratkonzentration betrug dabei  $21 \pm 1,5$   $\mu$ mol/l. Die RXNO-Konzentrationen im Plasma verhielten sich anders als die Nitrit- und FMD-Werte. Hier zeigte sich nach einer Woche Kakaoeinnahme keine signifikante Zunahme. Auch nach Aussetzen der Kakaoeinnahme (Tag 15) wurde keine Änderung beobachtet. Die Ergebnisse aus der *Akuteffektstudie* konnten aber reproduziert werden. So wurde an Tag 1 und an Tag 8 jeweils eine signifikante Erhöhung der Plasmakonzentration der RXNOs nach der akuten Kakaoeinnahme beobachtet. Es fällt aber auf, dass die Steigerung an Tag 8 ( $6,2 \pm 1$  nmol/l auf  $10,4 \pm 1,7$  nmol/l) offenbar geringer ausgeprägt war als an Tag 1 ( $6,3 \pm 1$  nmol/l auf  $17,2 \pm 3,6$  nmol/l). Die einzelnen Daten sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 17**

NO-Metabolite im Plasma während einwöchiger Kakaoeinnahme A: Nitrit-Konzentrationen B: RXNO-Konzentrationen; #  $p < 0,05$  vs basale Messung des jeweiligen Tages; \*  $p < 0,05$  vs 0 h Messung an Tag 1; alle Werte als MW  $\pm$  SE angegeben

### 3.3. Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Durchmessers der Arteria brachialis

Die an den Gummischläuchen durchgeführten Messungen stimmten mit den vorgegebenen Durchmessern bis zur zweiten Nachkommastelle überein. Die Messung des 5 mm Schlauches ergab einen Durchmesser von 5,004 mm und die Messung des 7,5 mm Schlauches einen Durchmesser von 7,504 mm. Der Standardfehler betrug dabei nur 0,02 bzw. 0,03 mm. Es ergab sich ein Variationskoeffizient von weniger als 1% (0,83 und 0,74).

Die Tag-zu-Tag-Variabilität bei den Probanden der *Akuteffektstudie* betrug im Mittel 0,8% bei einer Standardabweichung von 0,6%.

## 4. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1 Die akute Einnahme von flavanolreichem Kakao führte bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer Steigerung der Parameter FMD, Nitrit und RXNO.
- 2 Die Fluss-vermittelte Dilatation zeigte dabei eine Abhängigkeit von der applizierten Flavanoldosis und vom Anstieg der Flavanolplasmaspiegel.
- 3 Regelmäßige Kakaoeinnahme führte bei Rauchern zu einer anhaltenden Steigerung der Parameter FMD und Nitrit, wobei die akuten Effekte erhalten blieben.

Im Folgenden soll zunächst auf die Bestimmung der Endothelfunktion mittels Ultraschall (4.1.1.) und die biochemischen Quantifizierungsmethoden (4.1.2.) eingegangen werden. Danach werden die eigenen Untersuchungsergebnisse im Kontext der gängigen Literatur diskutiert (4.2.). Im nächsten Abschnitt werden dann die potentiellen Wirkmechanismen und die Pathogenese einer endothelialen Dysfunktion, verursacht durch das Rauchen (4.3.) erläutert. Im letzten Abschnitt soll die klinische Bedeutung und der Ausblick erörtert werden (4.4.).

### 4.1. Methodenkritik

#### 4.1.1. Quantifizierung der endothelabhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung

In der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige Dilatation nicht-invasiv durch einen physikalischen Stimulus induziert. Für fünf Minuten wurde durch Aufpumpen einer Blutdruckmanschette am Unterarm auf suprasystolische Werte im Versorgungsgebiet der Arteria brachialis die Sauerstoffversorgung abgeschnitten und damit eine Ischämie produziert. Dies führte zu einer Dilatation der Widerstandsgefäße, was nach Lösen der Stauung zu einem gesteigerten Blutfluss im zuführenden Leitungsgefäß führte. Man geht davon aus, dass mit der daraus resultierenden Steigerung der auf die Endothelzellen einwirkenden Schubspannung es zu einem vermehrten Kalziumeinstrom und es damit durch Phosphorylierung zu einer Aktivitätssteigerung der eNOS kommt<sup>28;113-115</sup>. Dies würde wiederum zu einer vermehrten NO-Synthese und somit zur Dilatation der Arteria brachialis führen<sup>46;60;115</sup>, welche dann

nicht-invasiv sonographisch quantifiziert werden kann. Der Nachweis, dass die Messung der FMD peripherer Leitungsgefäße zumindest NO-abhängig ist, wurde durch Untersuchungen erbracht, in denen durch die intraarterielle Gabe von L-NMMA, einem kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase, die FMD vollkommen unterdrückt werden konnte <sup>116</sup>.

Die Bestimmung der FMD stellt seit Jahren ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion dar. Celermajer et al. konnte bei Kindern und Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren 1992 erstmals eine Reduktion der Fluss-vermittelten Dilatation an der Arteria femoralis und brachialis nachweisen <sup>12</sup>. Bei Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie zeigte sich eine signifikant geringere FMD als bei gesunden Kindern. Bei erwachsenen Rauchern und Personen mit bekannter koronarer Herzkrankheit war die Fluss-vermittelte Dilatation ebenfalls signifikant vermindert. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass nahezu alle bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren <sup>53</sup> und deren Anzahl <sup>117</sup> mit einer Reduktion der FMD einhergehen. Dies konnte in den letzten Jahren nochmals an einem großen Kollektiv in einer prospektiven Kohortenstudie gezeigt werden. In der 7. Untersuchungsserie (1998-2001) der „Framingham Heart Study“ wurden nochmals die bekanntesten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit betrachtet und eine Einschränkung der FMD bei steigendem Risikoprofil festgestellt <sup>118</sup>. So besteht beim Zigarettenrauchen, dem in der vorliegenden Arbeit besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde, eine inverse Korrelation der FMD mit dem Ausprägungsgrad, also den Packungsjahren <sup>13;118</sup>.

Neben kardiovaskulären Risikofaktoren einschließlich des Alters <sup>119</sup> sind weitere biologische Einflussfaktoren des Gefäßtonus bekannt, die die Höhe der FMD beeinflussen können. So besteht eine negative Korrelation zwischen dem Ruhedurchmesser der Arteria brachialis und der FMD <sup>12;60;120</sup>. Weiterhin ist eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum am späten Nachmittag <sup>121</sup> und eine Abhängigkeit von der Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron im Menstruationszyklus <sup>122</sup> bekannt. Außerdem kann die Nahrungsaufnahme die FMD beeinflussen. So kommt es bei akuter Hyperglykämie <sup>123</sup> und nach fettreicher Nahrung <sup>124</sup> zu einer signifikanten Reduktion. Hier scheint vor allem der postprandiale oxidative Stress eine Rolle zu spielen <sup>125</sup>. Akuter psychischer Stress <sup>126</sup> und das Rauchen einer einzigen Zigarette <sup>127</sup> führen ebenfalls zu einer akuten Verminderung der FMD. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die FMD möglichst konstant zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zur gleichen Tageszeit, beginnend um 7:00 Uhr morgens, an nüchternen Probanden durchgeführt. Außerdem erfolgten alle Untersuchungen in einem, vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens zehnminütigen Ruhephase. Rauchen wurde den Probanden zwischen den

einzelnen Untersuchungen nicht gestattet. Zwischen den Gruppen der *Akuteffektstudie* bestanden keine signifikanten Altersunterschiede. Bei der *Akuteffektstudie* und der *Wochenstudie* wurden nur Männer untersucht, um einen zyklusabhängigen Einfluss von Östrogen zu vermeiden.

Neben den biologischen Einflussfaktoren der FMD kommen folgende Faktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht:

1. Die Größe des ischämischen Gebietes
2. Die Ischämiezeit
3. Die der Durchmessermessung zugrunde gelegten Eckpunkte
4. Der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie
5. Der Zeitpunkt der Messung innerhalb des Herzzyklus

So wurde in der vorliegenden Arbeit die Blutdruckmanschette zur Erzeugung der Ischämie distal zur Ellenbeuge angelegt, die Ischämiezeit betrug 5min und die FMD wurde 60 s und 70 s nach Lösung der Stauung gemessen. In vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Position der Blutdruckmanschette und somit der Größe des ischämischen Bereichs zeigte sich in manchen Untersuchungen eine größere FMD, wenn die Blutdruckmanschette proximal zur Ellenbeuge am Oberarm angelegt wurde<sup>128;129</sup>. In einer anderen Untersuchung war die FMD bei Unterarmokklusion größer<sup>130</sup>. Momentan herrscht kein Konsens darüber, welche Methode besser und zu bevorzugen ist<sup>60;129</sup>. Um die potentiellen Einflüsse einer direkten Kompression und Ischämie auf den untersuchten Bereich der Arteria brachialis zu vermeiden, wurde die Manschette in den eigenen Untersuchungen distal angelegt (→1.). Die Höhe der FMD hängt weiterhin von der Dauer der Ischämie ab. Erst eine 4,5-minütige Ischämie führt zu einer maximalen Dilatation, welche auch durch längere Ischämiezeiten nicht signifikant gesteigert werden kann<sup>60</sup>. Aus diesem Grunde wurde die besser tolerierbare Dauer von 5 Minuten gewählt (→2.). Entsprechend den meisten anderen Arbeitsgruppen<sup>60;131</sup> wurden die Durchmessermessungen von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie, welche dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang entspricht, durchgeführt (→3.). Die maximale Dilatation der Arteria brachialis wurde 60 s nach Beendigung der Ischämie bestimmt. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Zeitpunkt, an dem die maximale Dilatation erreicht wird, sowohl bei Kindern<sup>132</sup> als auch bei Erwachsenen<sup>131</sup> individuell erheblich voneinander abweichen kann. Die Messungen wurden deshalb auch noch zusätzlich 70 Sekunden nach Lösen der Stauung durchgeführt. So wurde eine exaktere Bestimmung der maximalen Dilatation erreicht. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass in einigen Fällen die gemessene FMD den wahren maximalen Wert unterschätzt (→4.). Da der Durchmesser der

Arteria brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatilen Veränderungen unterworfen ist, wurden alle Messungen EKG-gekoppelt enddiastolisch durchgeführt. Zusammenfassend entsprach das verwendete Untersuchungsprotokoll den in den aktuellen Leitlinien<sup>60</sup> empfohlenen Standards (→5.).

Die Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität von Ultraschalluntersuchungen repräsentieren drei Variablen:

1. Die technische Ausrüstung
2. Der Untersucher
3. Die Auswertung

Sowohl die Ausrüstung, als auch die Erfahrung des Untersuchers am Ultraschallgerät sind wichtige Determinanten der Genauigkeit von sonographischen Vermessungen von Gefäßen. Als technische Voraussetzung für nicht-invasive Untersuchungen der Endothelfunktion galten zum Zeitpunkt der Untersuchungen lineare Schallköpfe mit Ultraschallfrequenzen von 7-12 MHz als gegenwärtiger Standard<sup>60</sup>. Bei den eigenen Untersuchungen wurde sogar ein 15 MHz Schallkopf verwendet. Die physikalische Auflösung mit einem 15 MHz Schallkopf und einer angenommenen mittleren Schallausbreitungsgeschwindigkeit von 1500 m/s im Gewebe beträgt rechnerisch 0,1 mm, bei einem 7,5 MHz Schallkopf hingegen nur 0,2 mm. Die Auflösung konnte also durch den Gebrauch der höheren Frequenz verdoppelt werden (→1.). Nur ein gut geschulter Untersucher<sup>60;133</sup> ist in der Lage, Durchmesseränderungen von 0,1 mm zu erkennen und damit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Da die technische Auflösung sehr nahe an dem zu bestimmenden biologischen Bereich ist, hängt die Qualität von duplexsonographischen Untersuchungen der Gefäßfunktion umso stärker von der Erfahrung des Untersuchers ab. Die Durchmesseränderungen der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Dilatation einer Arterie mit einem Ruhedurchmesser von 3,8 mm liegen im Bereich von 0,1 - 0,6 mm (2,7% - 16,7%). Sorensen et al.<sup>134</sup> haben die Genauigkeit von Ultraschallmessungen an Hand von „Phantomarterien“ mit bekanntem Durchmesser bestimmt. Diese „Phantomarterien“ bestanden aus in Agar gegossenen Metallzylindern. Dabei konnte gezeigt werden, dass Durchmesseränderungen von 0,1 - 0,2 mm korrekt bestimmt werden können. „Wahre“ Unterschiede von 0,2 mm konnten zu 67% und Unterschiede von 0,1 mm zu 52% korrekt bestimmt werden. Keine der Abweichung vom bekannten Phantomdurchmesser war größer als 0,1 mm. In eigenen Untersuchungen wurde der Durchmesser zweier Gummischläuche an zwei verschiedenen Tagen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten mit einem Variationskoeffizienten von unter 1% bestimmt (→2.). Neben der Genauigkeit des Ultraschallgerätes und der Untersuchung selbst, hängt die Variabilität der

Bestimmung von peripheren Gefäßdurchmessern weiterhin von der Art der Bilddatenanalyse ab. Diese setzt sich zusammen aus den Unterschieden, die vom Auswerter ausgehen (Intra-Observer-Differenz), bei Auswertung durch zwei unterschiedliche Personen (Inter-Observer-Differenz) und bei Untersuchungen an unterschiedlichen Tagen (Tag-zu-Tag-Differenz) entstehen. Die Tag-zu-Tag-Differenz hängt wiederum von der biologischen Variation der Gefäßfunktion und der untersucherseitigen Variabilität ab. In den meisten publizierten Studien<sup>13;117;130</sup> ist der Variationskoeffizient für die Messung der FMD zwischen 1 und 3% für die Intra- und Interobservervariabilität angegeben. Um die Fehlerquellen bei der Auswertung minimal zu halten, wurde ein von Preik et al. entwickeltes PC-unterstütztes Analysesystem zur Durchmesserermessung verwendet<sup>108</sup>. Bei diesem Verfahren betrug die Intra-Observer-Differenz  $0,8 \pm 0,6\%$ , die Inter-Observer-Differenz  $0,8 \pm 0,4\%$  und die Tag-zu-Tag-Differenz  $1,3 \pm 0,9\%$ . Bei der erneuten Prüfung ergab die eigene Analyse der Tag-zu-Tag-Differenz einen mittleren Wert von  $0,8\%$  bei einer Standardabweichung von  $0,6\%$ . Die Variabilität konnte im Vergleich zu den Ergebnissen von Preik et al.<sup>108</sup> also sogar noch mehr reduziert werden. Ein Grund dafür könnte die Verwendung eines 15 MHz Schallkopfes im Gegensatz zu dem von Preik et al. verwendeten 7,5 MHz Schallkopf sein ( $\rightarrow 3$ ).

#### **4.1.2. Quantifizierung der zirkulierenden NO Metabolite**

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht direkt Stickstoffmonoxid im Blut erfasst. Stattdessen wurden Nitrit und RXNOs als Metabolite von NO quantifiziert. Dies geschah aus folgenden Gründen: Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit gestaltet sich die direkte Untersuchung von NO im menschlichen Blut als sehr schwierig<sup>30</sup>. In wässriger Lösung ist für NO eine konzentrationsabhängige Halbwertszeit von 9-900 s beschrieben<sup>29</sup>. Im Vollblut wird die Halbwertszeit auf  $0,05-1,8$  ms geschätzt<sup>46</sup>, einige gehen von einer Halbwertszeit von  $1 \mu\text{s}$  aus<sup>135</sup>. Die viel kürzere Halbwertszeit erklärt sich aus der hohen Reaktivität von NO mit oxygeniertem Hämoglobin. Bestätigt wurde dies in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe<sup>38</sup>. Bei Zugabe von  $5 \mu\text{mol/l}$  NO zu Plasma wurde eine Halbwertszeit von 68 s bestimmt. Im Vollblut erfolgte der Abbau so schnell, dass mit der verwendeten NO-Elektrode kein NO messbar war. Somit scheidet NO selbst als biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion aus, da es aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit noch während einer Blutentnahme vollständig abgebaut wird.

Die Bestimmung der Nitrit- und der RXNO-Konzentration im Plasma erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektions-Anlage (CLD). Dabei stützt sich das verwendete Verfahren

auf die Arbeit von Feelisch et al.<sup>42</sup>. Die verwendeten Konzentrationen der Reaktionslösungen sowie die Messtemperatur entsprachen denen, die in dieser Arbeit als optimal vorgeschlagen wurden. Das Verfahren nutzt eine Jod- und Jodid-haltige Redoxlösung, um aus Nitrit und RXNOs wieder NO freizusetzen. Das freigesetzte NO wird dann mittels einer Photoreaktion mit Ozon detektiert<sup>111</sup> (siehe auch 2.3.2.). Die Sensitivität dieser Methode beträgt bei einem Probenvolumen von 100 µl 5 nmol/l. Um die Veränderungen der niedrigen RXNO-Konzentrationen noch besser auflösen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das dreifache Probenvolumen injiziert. Über einen Bereich von 10 - 100000 nmol/l liefert das Verfahren lineare Messungen. Die Tag-zu-Tag-Variabilität bei identischen Proben hat einen Variationskoeffizienten von 4,7%. Ein alternatives Verfahren zur Nitrit-/RXNO-Bestimmung stellt lediglich die Fluss-Injektionsanalyse dar. Die CLD ist der FIA aber vor allem bei Verwendung eines größeren Probenvolumens in puncto Sensitivität überlegen, weshalb in der vorliegenden Arbeit die CLD zur Detektion von Nitrit und RXNOs verwendet wurde.

Zur RXNO-Messung in biologischen Proben wird derzeit ein weites Spektrum an Techniken verwendet, von denen keine frei von Artefakten ist<sup>136</sup>. Die Angaben zur RSNO-Konzentration beispielsweise weichen in der Literatur erheblich voneinander ab<sup>37;111;137</sup>. Bislang ist ungeklärt, mit welcher Methode die „wahren“ Konzentrationen bestimmt werden können, obschon sich eine deutliche Tendenz zum unteren nanomolaren Bereich abzuzeichnen scheint<sup>136</sup>. Für die vorliegende Arbeit waren die relativen Veränderungen und nicht die Absolutwerte von entscheidender Bedeutung. Hier soll aber trotzdem erwähnt werden, dass die beobachteten Werte in einem Bereich lagen, der bei anderen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe mit derselben Bestimmungsmethode ebenfalls beschrieben wurde. RXNOs sind eine sehr heterogene Stoffklasse, da NO auf verschiedenste Art und Weise an Plasmaproteine oder auch zelluläre Proteine gebunden werden kann. So reagiert NO mit freien Thiolgruppen, Stickstoffatomen oder anderen Aminosäureresten (z. B. Tryptophan) von Plasmaproteinen. Weiterhin existieren O- und C-Nitrosoverbindungen sowie Metallionenaddukte<sup>31;40-42;138</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden die plasmatischen Verbindungen als RXNO gemessen. Es erfolgte dabei keine Differenzierung in die einzelnen Komponenten wie RNNOs oder RSNOs.

Störgrößen bei der Nitrit und RXNO-Bestimmung mit CLD sind vor allem folgende Dinge:

- (1.) Schwankungen des pH-Wertes
- (2.) Übergangsmetallionen
- (3.) UV-Licht
- (4.) Ein gestörtes Redoxpotential in der Reaktionslösung

(5.) Eine zu lange Standzeit der Blutprobe vor der Weiterverarbeitung

Schon bei physiologischen pH-Werten, aber insbesondere unter Ansäuerung, bilden sich RSNOs aus Nitrit und freien SH-Gruppen<sup>139</sup> und Übergangsmetalle bewirken einen vorzeitigen Zerfall der RSNOs. Um Verfälschungen der Messergebnisse zu vermeiden, wurden die Blutproben deshalb mit NEM/EDTA Lösung versetzt. NEM blockiert freie SH-Gruppen durch Alkylierung (→1) und EDTA bildet mit Übergangsmetallen Komplexe<sup>42</sup> (→2). UV-Licht spaltet nicht nur S-Nitrosothiole, sondern kann auch aus Nitrit<sup>140</sup>, Nitrosaminen und Nitrosyl-Eisen-Komplexen NO freisetzen<sup>111;141</sup>. Die Proben wurden stets licht-geschützt aufbewahrt und die Reaktionsgefäße wurden mit Aluminiumfolie umhüllt, um Lichtkontakt zu vermeiden (→3). Ein gestörtes Redoxpotential in der Reaktionslösung wird in der Praxis vor allem durch hohe Proteinkonzentrationen<sup>42</sup> in Folge zu häufiger Injektionen von Plasmaproben in die Reaktionslösung erreicht. Deshalb wurde die Reaktionslösung spätestens nach Injektion von 1 ml Plasma gewechselt (→4). In Gegenwart von Erythrozyten reagiert Nitrit mit einer Halbwertszeit von 110 s weiter zu Nitrat<sup>29;142</sup>. Auch Versuche der eigenen Arbeitsgruppe deuten auf eine rasche Abnahme der Nitrit- und RSNO-Konzentrationen im Vollblut, die schon in den ersten fünf Minuten nach Entnahme relevante Größen erreicht, hin. Die venösen Blutproben wurden deshalb direkt nach der Entnahme in 4°C kalte NEM/EDTA Lösung (in NaCl) gegeben und von da an stets unter dieser Temperatur gehalten. In unmittelbarer Nähe zum Ultraschallgerät (Ort der Blutentnahme) wurde eine Zentrifuge aufgestellt, wodurch sich eine maximale Standzeit des Blutes von 60 Sekunden ergab. Dadurch wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen, insbesondere Erythrozyten, befreit (→5).

Zur Bestimmung des Nitratgehalts der Plasmaproben kam die Fluss-Injektions-Analyse (FIA) zum Einsatz. Nitrat stellt das stabile Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechsels dar. Es wird in der FIA nach Umwandlung zu Nitrit durch die Nitratreduktase gemessen. Aufgrund der aktuellen Literatur wurden Werte im mikromolaren Bereich (19-60 µmol/l)<sup>29;30;143</sup> erwartet. Die bestimmten Nitratkonzentrationen stehen im Einklang mit den erwähnten Werten aus der Literatur.

## **4.2. Einfluss der Flavanole auf die endothelabhängige Vasodilatation**

In den eigenen Untersuchungen führte die Einnahme von flavanolhaltigem Kakao zu einem akuten Anstieg der FMD bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre

Risikofaktoren. Dabei profitierten Probanden mit einer niedrigen Ausgangs-FMD deutlich mehr als Probanden mit einer hohen Ausgangs-FMD. Der maximal erreichte FMD-Wert nach der Einnahme der höchsten Flavanoldosis (917 mg) hingegen unterschied sich nicht. Dies führt zu der Annahme, dass eine durch Rauchen eingeschränkte Gefäßfunktion durch Abstinenz potentiell rückführbar ist. Dies wird durch die Ergebnisse der *Wochenstudie* untermauert, in der die FMD bei Rauchern durch regelmäßige Kakaoeinnahme auf das Niveau von Nichtrauchern gesteigert werden konnte. Die FMD der Arteria brachialis ist NO-vermittelt <sup>116</sup>, weshalb eine gesteigerte FMD als erhöhte NO-Bioverfügbarkeit interpretiert werden kann.

Parallel zur FMD wurden die NO-Metabolite im Plasma gemessen. Auch die RXNO-Werte bei Rauchern waren im Vergleich zu Nichtrauchern erniedrigt. Durch akute Einnahme von flavanolreichem Kakao konnten auch diese Werte gesteigert werden. Hier wurde allerdings nicht das Niveau der Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren erreicht. Dies wird durch die Ergebnisse der *Wochenstudie* noch deutlicher. Hier wurden die RXNO-Werte durch einwöchige Kakaoeinnahme nicht gesteigert. Dies könnte im Gegensatz zur FMD darauf hindeuten, dass die eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit bei Rauchern nicht komplett reversibel ist. Die in der *Akuteffektstudie* gemessenen Nitritwerte stiegen ähnlich wie die RXNO- und FMD-Werte an. Auch bei der *Wochenstudie* ist ein deutlicher Anstieg der Nitritkonzentration im Plasma feststellbar.

Die beobachteten Ergebnisse der beiden Studien stehen im Einklang mit der gängigen Literatur. Zunächst einmal konnten in der *Akuteffektstudie* die Ergebnisse von Heiss et al. reproduziert werden <sup>18</sup>. Diese Studie konnte durch einmalige Applikation von flavanolreichem Kakao einen Anstieg der Parameter FMD und RXNO erreichen. Zusätzlich dazu konnte die *Akuteffektstudie* einen parallelen Anstieg von Nitrit zeigen. Duffy et al. berichteten über ähnliche Ergebnisse wie die der *Wochenstudie* bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Diese Studie zeigte eine akute, eine chronische und eine akute auf den chronischen Effekt aufbauende Steigerung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Konsum von schwarzem Tee <sup>19</sup>. Fisher et al. zeigten, dass die regelmäßige Einnahme von flavanolreichem Kakao über vier Tage zu einer peripheren Vasodilatation führt. Dies wurde über die periphere arterielle Tonometrie quantifiziert, eine recht neue Methode, die sowohl die NO-abhängige als auch die NO-unabhängige Vasodilatation in der Fingerkuppe misst <sup>20</sup>. Agewall et al. untersuchten die akuten Effekte von entalkoholisierendem Rotwein bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren und beschrieben einen signifikanten Anstieg der FMD <sup>97</sup>. Papamichael et al. beschrieben ebenfalls positive Effekte von Antioxidantien aus Rotwein auf die

endothelabhängige Dilatation. Durch Rauchen einer Zigarette konnte in dieser Studie ein signifikanter Abfall der FMD erreicht werden. Die simultane Einnahme von entalkoholisierendem Rotwein verhinderte diesen FMD-Abfall<sup>96</sup>. Diese Ergebnisse untermauern die Beobachtungen der eigenen Studien. Eine durch Rauchen verursachte Einschränkung der endothelialen NO-Produktion ist durch Flavonoide wieder zu steigern. Engler et al. konnten durch Einnahme von dunkler Schokolade über zwei Wochen einen signifikanten Anstieg der FMD erzielen. Die täglich applizierte Flavanol-dosis in dieser Studie betrug 259 mg (213 mg Procyanidine und 46 mg Epicatechin). Dadurch wurde ein FMD-Anstieg von 1,3% nach zwei Wochen erreicht<sup>98</sup>. Bei der *Wochenstudie* konnte im Vergleich dazu ein Anstieg von 2,9% bei einer täglichen Flavanol-dosis von 917 mg erreicht werden. Grassi et al. untersuchten die Auswirkungen von dunkler Schokolade bei Hypertonikern. Durch Applikation von Schokoladenriegeln mit einem Flavanolgehalt von 88 mg über eine Woche konnte eine Verbesserung der FMD um 1,5% (7,4 auf 8,9%) im Hypertonikerkollektiv und um 1,9% (9,9 auf 11,8%) im Kontrollkollektiv erreicht werden<sup>99</sup>. Die Ergebnisse der *Wochenstudie* und der Studie von Engler et al. sind im Punkt der FMD-Änderung konform. Bei der *Wochenstudie* wurden stärkere Effekte erzielt, aber es wurde auch eine höhere Flavanol-dosis eingesetzt. In der Studie von Grassi et al. hingegen wurde mit einer geringeren Flavanol-dosis über einen kürzeren Applikationszeitraum eine höhere FMD-Änderung erreicht als in der Studie von Engler et al. Dies lässt die Daten von Grassi et al. im Vergleich zu den beiden anderen Studien unplausibel wirken. Ein klarer Vorteil der *Wochenstudie* wird an dieser Stelle ebenfalls deutlich. In den anderen Studien wurde lediglich eine Messung vor und eine Messung nach dem Zeitraum der Flavonoleinnahme durchgeführt. Durch die regelmäßigen Untersuchungen der FMD während der Woche der Kakaoeinnahme konnte bei der *Wochenstudie* der Nachweis erbracht werden, dass der Effekt ein Plateau erreicht. Dies lässt auf eine Sättigung schließen, weshalb die Wahl einer Dosis von 917 mg als gerechtfertigt erscheint. In einer weiteren Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurden von Heiss et al. ebenfalls die Effekte von flavanolreichem Kakao getestet. In dieser Studie wurde ein bereits fertig angerührtes Kakaogetränk verwendet. Es zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt auf die FMD. Außerdem gelang es in dieser Studie, die Steigerung der FMD durch Gabe von L-NMMA zu unterbinden. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die Effekte des Kakaos zumindest teilweise durch NO bedingt sind<sup>100</sup>.

Neben der Steigerung der FMD stellt die gesteigerte Nitritkonzentration nach einwöchiger Kakaoeinnahme ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit dar. In neueren Untersuchungen von Kleinbongard et al. konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen

kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie und Hyperlipidämie und den Nitritplasmaspiegeln beschrieben werden<sup>62</sup>. Lauer et al. zeigten einen parallelen Anstieg der Nitritplasmakonzentration und des Unterarmblutflusses nach eNOS Stimulation, während bei Gabe eines eNOS unabhängigen Vasodilatators die Nitritwerte keine Veränderung aufwiesen. Durch Infusion von L-NMMA wurde ein simultaner Abfall des Unterarmblutflusses und der Nitritplasmakonzentration beobachtet<sup>30</sup>. Zusätzlich zeigten Untersuchungen bei eNOS-knock-out-Mäusen eine 70% niedrigere Plasmakonzentration von Nitrit als bei den Wildtyp-Tieren<sup>61</sup>. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Nitrit einen geeigneten Marker der NO-Bioverfügbarkeit darstellt. So kann man also den Anstieg der Nitritplasmakonzentration als Steigerung der Bioverfügbarkeit von NO und als Rückführung der endothelialen Dysfunktion interpretieren. Neuere Untersuchungen legen aber die Vermutung nahe, dass Nitrit nicht bloß ein Abbauprodukt von NO darstellt, sondern selbst vasoaktiv sein kann. So kann durch Reaktion von Nitrit mit desoxygeniertem Hämoglobin oder anderen Hämoproteinen wieder NO freigesetzt werden<sup>43</sup>. Cosby et al. konnten durch Infusion von Nitrit bei gesunden Probanden eine Vasodilatation erzielen. Tsuchiya et al. gelang es durch parallele Gabe von Nitrit den durch den spezifischen NOS-Inhibitor L-NAME verursachten Blutdruckanstieg zu vermindern. Letztlich postulieren Suschek et al., dass oxidativer Stress die Reduktion von Nitrit zu NO inhibieren und stattdessen die Oxidation zu Nitrat fördern könnte<sup>144</sup>.

### 4.3. Potentielle Wirkmechanismen

Um einen potentiellen biochemischen Mechanismus zu belegen, muss man zunächst die Einflussgrößen auf die NO-Bioverfügbarkeit betrachten. Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO kann folgende Gründe haben:

1. Eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase<sup>145</sup>
2. Einen Substrat- oder Ko-Faktorenmangel der eNOS<sup>146</sup>
3. Eine Abnahme der Aktivität der eNOS<sup>28</sup>
4. Einen beschleunigten NO-Abbau<sup>32</sup>

Die Expression der eNOS wird durch Beeinflussung des eNOS-Promotors oder der eNOS-mRNA-Stabilität reguliert. Der Promotor der eNOS besitzt unter anderem eine Bindungsstelle für das Östrogen-responsive-Element, wobei verschiedene Arbeitsgruppen sowohl steigernde als auch senkende Einflüsse auf die mRNA-Level berichten<sup>147;148</sup>. Die Halbwertszeit der eNOS-mRNA kann durch Zytokine wie TNF $\alpha$  von 48 h auf 3 h herunterreguliert werden<sup>149</sup>.

TNF $\alpha$  könnte so als Entzündungsmediator bei der Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand für eine verminderte NO-Produktion verantwortlich sein ( $\rightarrow$ 1).

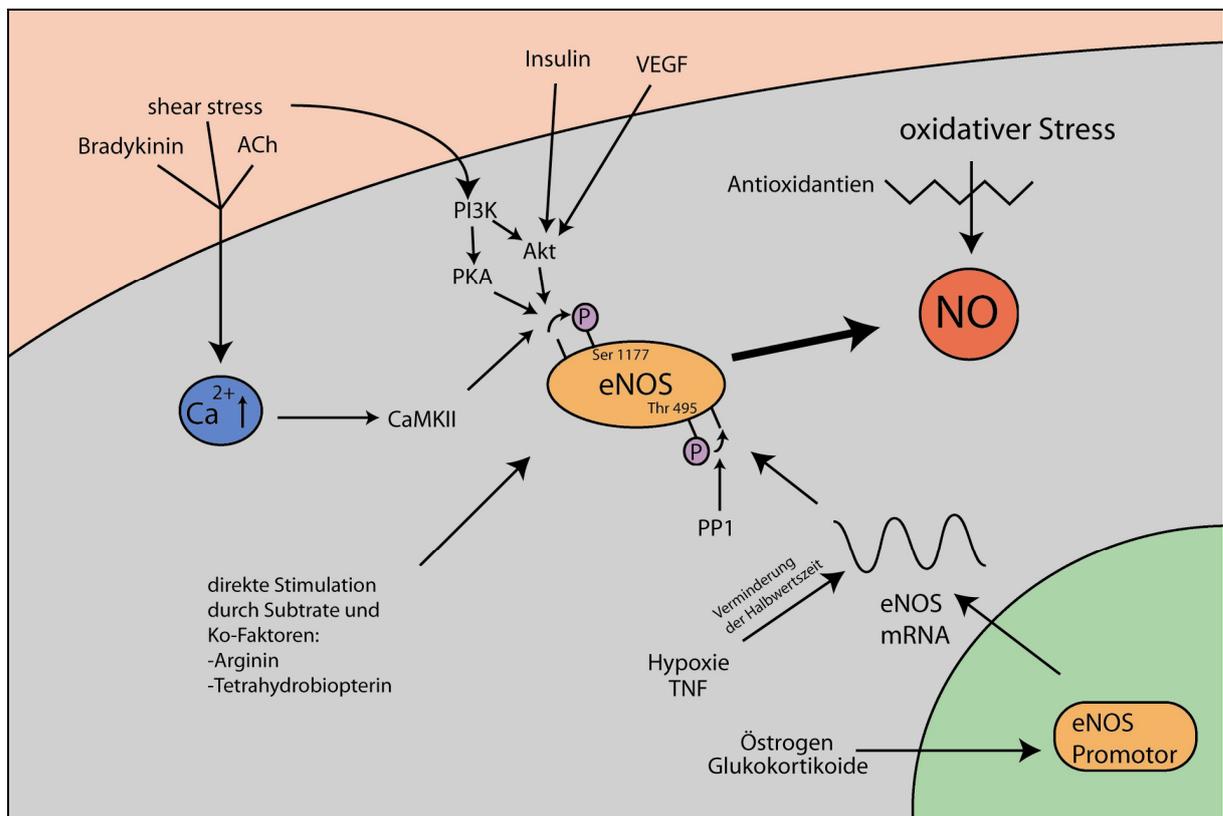
Ein Substratüberschuss an L-Arginin zur Stimulation der NO-Produktion findet in neueren klinischen Studien Anwendung. So konnten verschiedene Studien mit oraler Arginin-substitution eine Rückführung der endothelialen Dysfunktion bewirken<sup>15;150</sup>. Bei einem Mangel des Ko-Faktors BH<sub>4</sub> produziert die eNOS statt NO Superoxidradikalanionen<sup>33;146</sup>. Die Biosynthese von BH<sub>4</sub> geht von dem Enzym GTP-Zyklohydrolase aus. Die verminderte NO-Produktion bei GTP-CH-knock-out-Mäusen konnte nach BH<sub>4</sub>-Gabe korrigiert werden<sup>151</sup>. Die endothelabhängige Vasodilatation in der Vena saphena magna von chronischen Rauchern wurde in einem *in vitro* Experiment durch BH<sub>4</sub>-Gabe verbessert<sup>152</sup>. Neben der physiologischen Verstoffwechslung von L-Arginin und Tetrahydrobiopterin scheint aber auch der kompetitiven Inhibition durch asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) eine Bedeutung in der Regulation der eNOS und der endothelialen Dysfunktion zuzukommen<sup>153;154</sup> ( $\rightarrow$ 2).

Für die kurzfristige Regulation der eNOS ist die Phosphorylierung des interkonvertierbaren Enzyms bedeutend. Am besten untersucht sind in diesem Zusammenhang zwei Aminosäurereste des Proteins. Eine Phosphorylierung des Serinrests 1177 erhöht die Aktivität des Enzyms, während eine Phosphorylierung des Threoninrests 495 die Aktivität vermindert<sup>28</sup>. In unstimulierten kultivierten Endothelzellen ist der Serinrest 1177 unphosphoryliert. Durch Schubspannung wird über den Akt-<sup>155;156</sup> sowie den PKA-Weg<sup>157</sup> dieser Serinrest phosphoryliert und die Aktivität des Enzyms erhöht. Dies scheint bei langfristigen Adaptation des Gefäßendothels eine Rolle zu spielen<sup>133</sup>. Azetylcholin und Bradykinin sowie auch Schubspannung erhöhen den intrazellulären Kalziumspiegel und können so über den CaMKII-Weg ebenfalls eine Phosphorylierung an Serin 1177 bewirken<sup>28</sup>. Diese Mechanismen werden bei Detektion einer endothelialen Dysfunktion mittels intraarterieller Gabe von Azetylcholin oder Bradykinin genutzt<sup>8</sup> ( $\rightarrow$ 3).

Ein beschleunigter Abbau von NO ist vor allem durch vermehrten oxidativen Stress bedingt. Die Quellen solcher reaktiver Sauerstoffspezies im Gefäßsystem sind dabei die mitochondrialen Enzyme der Atmungskette, die Lipoxygenasen und die Zyklooxygenasen beim Arachidonsäurestoffwechsel, das Zytochrom P450 System, die Xanthinoxidase, die NADPH/NADH-Oxidasen, verschiedene Peroxidasen und andere Hämoproteine sowie letztendlich die NO-Synthase selbst<sup>32</sup>. Eine besondere Bedeutung scheint hierbei den Superoxidanionen zuzukommen, welche NO unter Peroxynitritbildung deaktivieren können. Peroxynitrit wiederum kann die NO-Synthase inhibieren und zu einer Einschränkung der NO-Bildung führen<sup>158</sup>. An diesem Punkt greifen antioxidative Therapiekonzepte ein, wie zum

Beispiel Vitamin C-Substitution<sup>159</sup> oder Therapiekonzepte, die gezielt gegen die genannten prooxidativen Enzyme wirken, wie die Suizidhemmung der Xanthinoxidase mit Allopurinol<sup>160</sup> (→4).

Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen Einflussgrößen auf die NO-Bioverfügbarkeit in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 18**

Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf die NO-Bioverfügbarkeit

Extrazellulärraum rosa, Zytoplasma grau, Karyoplasma grün

(Abkürzungen: ACh – Azetylcholin, VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor, PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKA – Proteinkinase A, CaMKII – Kalzium/Calmodulin Kinase II, PP1 – Proteinphosphatase 1, eNOS – endotheliale NO Synthase, TNF – Tumornekrosefaktor)

Auch Rauchen scheint vor allem über eine Erhöhung des oxidativen Stresses an der Entwicklung und dem Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt zu sein. Dies geschieht im Wesentlichen über drei Wege:

- 1.) Durch reaktive Sauerstoffspezies und andere freie Radikale direkt aus dem Zigarettenrauch<sup>75</sup>
- 2.) Durch Aktivierung endogener Radikalquellen wie der NOS selbst, der NADPH-Oxidase oder der Xanthinoxidase<sup>70;76</sup>
- 3.) Durch die entzündungsfördernde Wirkung des Zigarettenrauchs<sup>77;78</sup>

Oxidativer Stress kann zum einen durch die direkte Reaktion von  $O_2^-$  Ionen mit NO die NO-Bioverfügbarkeit einschränken, zum anderen besteht aber die Möglichkeit, dass durch Oxidation des eNOS-Ko-Faktors Tetrahydrobiopterin indirekt die NO-Produktion gehemmt wird <sup>32;65;67;146;151;152;161</sup>. Auch die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Nitrit zu toxischen Stickstoffspezies, katalysiert durch die Myeloperoxidase, trägt vermutlich über eine vermehrte Oxidation von LDL zur Bildung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen bei <sup>36</sup>.

Flavanole sind nun in der Lage, die NO-Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Bis heute sind drei verschiedene Wege untersucht, über welche Polyphenole, bzw. ihre Monomere die NO-Bioverfügbarkeit erhöhen und die Progression der Arteriosklerose verlangsamen könnten:

1. Einen antioxidativen Effekt <sup>19;79-82;162</sup>
2. Einen stimulierenden Effekt auf die endotheliale NO-Synthase (prätranskriptional, posttranskriptional oder posttranslational) <sup>6;7</sup>
3. Einen inhibierenden Effekt auf proinflammatorische oder prooxidative Enzyme wie die Lipoxygenasen und Zyklooxygenasen <sup>83-85</sup> oder die Myeloperoxidase <sup>36</sup>

Wie man hier sieht, ist die Minderung des oxidativen Stresses ein wesentlicher Faktor bei der Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit durch Flavanole und zugleich der angenommene Pathomechanismus der Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit durch das Rauchen.

Die Grundvoraussetzung dafür, dass Flavanole eine antioxidative Wirkung in der Gefäßwand entfalten können, ist die Aufnahme aus dem Verdauungstrakt in die Blutbahn. Ein Nachweis von Flavanolen und deren Metaboliten in der systemischen Zirkulation nach oraler Aufnahme wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt <sup>89;163</sup>. Dies wird durch die eigenen Ergebnisse bestätigt. In der *Akuteffektstudie* konnte nach Ingestion von flavanolreichem Kakao auch ein Anstieg der Flavanolplasmakonzentration beobachtet werden. Die Größe des Anstiegs korrelierte dabei mit der applizierten Dosis. Außerdem wurden die maximalen Effekte bei FMD- und RXNO-Änderung zeitgleich mit den maximalen Flavanolkonzentrationen im Plasma beobachtet. Insgesamt korrelierte die FMD-Änderung in hohem Maße ( $r = 0,716/0,703$ ) mit dem Anstieg der Flavanolkonzentration im Plasma. Dies deutet darauf hin, dass die beschriebenen Veränderungen bei FMD, RXNOs und Nitrit tatsächlich auf die Flavanole als Inhaltsstoffe des Kakaos zurückzuführen sind.

Die Fähigkeit von Flavanolen, freie Radikale abzufangen und mit Superoxidradikalanionen zu reagieren, wurde bereits hinreichend beschrieben <sup>79-82</sup>. Zusätzlich dazu existieren Studien, die eine Erniedrigung des oxidativen Stresses, gemessen über plasmatische Marker, nach Flavanolaufnahme zeigen konnten <sup>19;162</sup>. So beschrieben Duffy et al. einen Anstieg der ORAC

(Oxygen Radical Absorbance Capacity) und der FRAP (Ferric-Reducing Ability of Plasma) durch Konsum schwarzen Tees über vier Wochen<sup>19</sup>. Dies wird unterstützt durch die von Rein et al. ermittelten Daten. Durch Applikation von procyanidinreicher Halbbitterschokolade konnte in dieser Studie ein Abfall der TBARS (2-ThioBarbituric Acid Reactive Substances) um 40% nach zwei Stunden gemessen werden. Sechs Stunden nach Einnahme der Schokolade war noch immer eine Erniedrigung der TBARS um 30% nachweisbar. Außerdem wurde eine 36% höhere plasmatische antioxidative Kapazität zwei Stunden nach der Schokoladeneinnahme festgestellt<sup>162</sup>. Der entscheidende Mechanismus könnte hier die Inhibition der Reaktion von NO mit  $O_2^-$  Ionen<sup>68</sup> und somit die Verminderung der Bildung von Peroxynitrit<sup>33</sup> sein. So könnte der Anstieg der Nitritkonzentration in der *Wochenstudie* eine Umverteilung von Nitrat zu Nitrit darstellen, da Nitrat ein Isomerisierungsprodukt von Peroxynitrit ist<sup>29</sup>. Die gemessenen Nitratwerte zeigten zwar keine Veränderung, aber ein Abfall der Nitratkonzentration um 36 nmol/l (Anstieg des Nitrits in der *Wochenstudie*) entspricht bei einer durchschnittlichen Nitratkonzentration von 21  $\mu$ mol/l lediglich einem Abfall von 0,2%, was mit den derzeitigen Methoden nicht detektiert werden kann.

Zusätzlich zu einem antioxidativen Effekt gibt es aber auch Anhaltspunkte, die darauf hindeuten, dass Flavanole einen stimulierenden Effekt auf die eNOS haben könnten. So beschrieben Leikert et al. und Wallerath et al. die Effekte von Polyphenolen bzw. Resveratrol auf die eNOS. Dies äußerte sich in erhöhten mRNA-Spiegeln und erhöhter mRNA-Stabilität, aber auch in unmittelbarer Erhöhung der NO-Produktion<sup>6,7</sup>. Zum Vergleich eignen sich hier auch Studien mit Vitamin C als reinem Antioxidans. Gerade bei Rauchern ist ja der oxidative Stress erhöht<sup>69-71</sup>. Fennessy et al. konnten nun eben bei Rauchern eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, charakterisiert durch die FMD, durch Vitamin C Gabe erreichen. Dabei wurde den Probanden fünf Tage lang 2 g Vitamin C oral zugeführt. Interessanterweise resultierte daraus zwar eine Verbesserung, aber, im Gegensatz zu den in der *Wochenstudie* ermittelten Daten, wurde keine vollständige Rückführung der endothelabhängigen Dilatation auf das Niveau von Nichtrauchern<sup>164</sup> erreicht. Die positiven Effekte von Vitamin C erklärten Heller et al. durch Stabilisierung von Tetrahydrobiopterin<sup>161</sup>. Heitzer et al. untersuchten nun die Effekte von Tetrahydrobiopterin-Gabe bei Rauchern. Die endothelabhängige Dilatation wurde in dieser Studie durch die Steigerung des Unterarmblutflusses durch Azetylcholin-Applikation quantifiziert. Durch BH<sub>4</sub>-Infusion konnte bei Rauchern eine signifikante Steigerung des Unterarmblutflusses bei paralleler ACh-Infusion erreicht werden. Im Gegensatz zur *Akuteffektstudie* wurde in dieser Studie kein Effekt bei den gesunden Kontrollen (Nichtrauchern) beobachtet. Des Weiteren konnte in dieser Studie nachgewiesen

werden, dass Tetrahydrobiopterin keinen zusätzlichen Effekt nach vorausgegangener Ascorbinsäure-Gabe produziert<sup>67</sup>. Die Effekte von Vitamin C als reinem Antioxidans waren also insgesamt geringer ausgeprägt als bei den in dieser Arbeit verwendeten Kakaoflavanolen. Es gelang keine vollständige Rückführung der endothelialen Dysfunktion und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden keine Effekte beobachtet. Diese Sachverhalte können wiederum so interpretiert werden, dass Flavanole neben einer unspezifischen antioxidativen Wirkung noch weitere spezifische Effekte in der Gefäßwand verursachen.

Ein weiterer mechanistisch zu klärender Punkt ist, dass sich die RXNOs bei der Wochenstudie nicht so verhalten, wie es die Daten von Heiss et al. und der *Akuteffektstudie* suggerieren ließen. Obwohl in der *Akuteffektstudie* nach akuter Kakaoeinnahme RXNOs und FMD gleichermaßen anstiegen, blieben die basalen RXNO-Spiegel nach einwöchiger Kakaoeinnahme nahezu unverändert. Viele Untersuchungen der letzten Jahre gehen davon aus, dass eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO mit einer Erhöhung der RXNOs im Plasma einhergeht, welche dann später das aufgenommene NO wieder freisetzen können und so als physiologischer NO-Speicher dienen. Offenbar gibt es aber im Gegensatz zum Nitrit hier Einschränkungen. Mehrere Studien belegen die Existenz von an Plasmaproteine gebundenem NO<sup>40-42</sup>, wobei zumindest das an Thiolgruppen gebundene NO als biologisch aktiv gilt<sup>31</sup>. Rassaf und Kleinbongard et al. konnten durch Infusion von NO-Lösung in eine Vene am Handrücken eine signifikante Erhöhung der RSNO-Konzentration in der Kubital-vene des gleichen Armes feststellen. Mit einer gewissen Zeitdifferenz konnten auch am anderen Arm signifikante Änderungen der RSNO-Plasmakonzentrationen sowie eine Erniedrigung des mittleren arteriellen Blutdrucks beobachtet werden. Auch der Unterarmblutfluss am kontralateralen Arm stieg signifikant an<sup>38</sup>. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO im Plasma kann man diese Änderungen nicht auf direkte Wirkung von freiem NO zurückführen. Untersuchungen von Heiss et al. konnten in einer Querschnittsstudie eine inverse Korrelation der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren mit den RXNO-Plasmaspiegeln zeigen<sup>63</sup>. Insgesamt deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass eine gesteigerte NO-Abgabe durch das Endothel auch zu einer erhöhten Konzentration von RXNOs im Plasma führt.

Es stellt sich hier die Frage, ob die RXNOs tatsächlich als Speicher von bioaktivem NO dienen, welches dem physiologischen Rezeptor in den glatten Muskelzellen (Guanylatzyklase) wieder zur Verfügung gestellt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die RXNO-Bildung im Plasma Ausdruck eines Verlustes an bioverfügbarem NO ist, das vom Endothel an das Plasma abgegeben und damit dem physiologischen Rezeptor in der Gefäßwand entzogen wird. Die Ergebnisse der *Wochenstudie* zeigen neben den

unveränderten basalen Plasmaspiegeln auch einen zumindest tendenziell geringeren Anstieg der RXNOs zwei Stunden nach Kakaoeinnahme. Insgesamt könnten die Daten so interpretiert werden, dass Flavanole einen dualen, biphasischen Effekt auf die RXNO ausüben, indem sie zum einen über den Anstieg des bioverfügbaren NO einen sekundären Anstieg der RXNO nach sich ziehen, zugleich aber dem dadurch bedingten Verlust an bioverfügbarem NO entgegenwirken. Der letztere Effekt ist anscheinend adaptiver Natur und erfordert eine kontinuierliche Flavanolzufuhr. Insgesamt sind diese Erklärungen aber bis jetzt nicht eindeutig durch Studien belegt. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass wir trotz der vielen Studien der letzten Jahre noch nicht sicher sagen können, welche Faktoren auf die Nitroso-Verbindungen neben einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit Einfluss nehmen und ob sie tatsächlich als physiologischer NO-Speicher dienen.

#### **4.4. Ausblick und klinische Bedeutung**

In den letzten Jahren konnte durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass eine endotheliale Dysfunktion die entscheidende Größe bei der Entwicklung und dem Fortschreiten der Arteriosklerose ist <sup>9;10;118</sup>. Infolgedessen wurden durch zahlreiche Arbeitsgruppen Therapien entwickelt, um eine endotheliale Dysfunktion zurückzuführen. Zuerst konnte gezeigt werden, dass einfache Maßnahmen wie körperliches Training <sup>165</sup> oder Nikotinkarenz <sup>13</sup> eine endotheliale Dysfunktion zumindest in Teilen rückführen können. Danach entstanden die Möglichkeiten einer Argininsubstitution <sup>15</sup>, der Vitamin C Gabe <sup>17</sup> und auch der Applikation von Flavanolen <sup>18-20</sup>. Gemeinsam ist allen diesen Therapieansätzen, dass sie darauf abzielen, die NO-Bioverfügbarkeit zu erhöhen.

In diese Reihe von Studien soll sich auch die vorliegende Arbeit einfügen. Der Großteil der in dieser Arbeit beobachteten vaskulären Effekte ist mit den Effekten vergleichbar, die durch pharmakologische Langzeitapplikation von ACE-Hemmern oder Statinen erreicht werden. Bei diesen Pharmaka hat sich gezeigt, dass sie neben ihren bekannten Wirkungen noch zusätzlich die NO-Bioverfügbarkeit erhöhen und damit gezielt Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion nehmen können <sup>166-169</sup>. Der Vorteil einer Therapie in Form einer Nahrungsergänzung gegenüber einer pharmakologischen Therapie liegt klar auf der Hand. Der Kakao ist weitgehend frei von schädlichen Nebenwirkungen, die bei einer Therapie mit ACE-Hemmern oder Statinen beobachtet werden können. Eine kombinierte Therapie der koronaren Herzkrankheit mit den zur Zeit aufgrund von großen klinischen Studien

eingesetzten Medikamenten und flavanolreichem Kakao könnte die Überlebenszeiten von vielen Patienten entscheidend verlängern ohne dabei deren Lebensqualität einzuschränken. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind aber nur der Grundstein für weitere Experimente und Studien, die vor einem routinemäßigen klinischen Einsatz noch ausstehen. So erscheint zum einen der Einsatz einer isolierten Substanz aus dem Kakao als Pharmakon plausibel. In diesem Zusammenhang testeten Schröter et al. bereits die orale Gabe von purem Epicatechin und beobachteten ähnliche Effekte wie nach Kakaoeinnahme<sup>170</sup>. Auf der anderen Seite wäre auch eine weitere Prüfung des getesteten Kakaos sinnvoll. Hier wäre sicherlich eine Prüfung mit Verum und Placebogabe an einem größeren Patientenkollektiv anzustreben. Auch sollte der Kakao über einen längeren Zeitraum von zum Beispiel einem Jahr eingenommen werden, um dann harte Endpunkte wie beispielsweise die Restenoserate nach perkutaner transluminaler Corangioplastie (PTCA) zu betrachten. Nur so ist ein langfristiger und nachhaltiger Effekt von flavanolreichem Kakao zweifellos nachweisbar.

## 5. Zusammenfassung

Lange bevor sich Herzkreislaufkrankungen klinisch manifestieren, zeigen sich bereits Einschränkungen der wesentlichen Endothelfunktionen wie der Modulation des Gefäßtonus, der Thrombozytenaggregation, der Gefäßarchitektur und der Gefäßpermeabilität. Eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) scheint dabei der wichtigste pathogenetische Faktor dieser endothelialen Dysfunktion zu sein. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Aufnahme von Polyphenolen aus Kakao, Tee, Rotwein oder Früchten das Risiko, eine Herzkreislaufkrankung zu erleiden, senkt. Experimentelle Daten legen dabei nahe, dass diese positiven Effekte durch eine verbesserte NO-Bioverfügbarkeit bedingt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, durch Applikation von flavanolreichem Kakao sowohl eine akute als auch eine nachhaltige Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit zu erreichen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die einmalige Einnahme von flavanolreichem Kakao führte bei Rauchern und bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren nicht nur zu einem Anstieg der Flussvermittelten Dilatation (FMD), sondern auch des Plasmanitrits, und des proteingebundenen NO (RXNO). Dabei profitierten Raucher deutlich stärker und erreichten trotz niedrigerer Ausgangswerte ähnliche Spitzenwerte wie Nichtraucher. Die beobachteten Effekte zeigten eine Abhängigkeit von der applizierten Dosis und gingen mit einem Anstieg der Flavankonzentration im Plasma einher.
2. Regelmäßige Kakaoeinnahme über eine Woche führte bei Rauchern zu einer anhaltenden Steigerung des Plasmanitrits und der FMD. Die Basalwerte erreichten dabei das Niveau von Nichtrauchern. Durch akute Kakaoeinnahme konnte noch eine zusätzliche Steigerung erzielt werden. Nach einer weiteren Woche ohne Kakaoeinnahme kehrten die Werte wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

Die anhaltende Steigerung des Plasmanitrits nach Flavankgabe parallel zur FMD stellt eine neue Erkenntnis dar und steht im Einklang mit neueren Literaturauffassungen, wonach der Nitritspiegel im Plasma ein Marker für die Funktionstüchtigkeit des Gefäßendothels ist. Diese Effekte der regelmäßigen Kakaoeinnahme lassen einen therapeutischen Einsatz sinnvoll erscheinen, insbesondere aufgrund der in jüngster Zeit diskutierten Rolle des Nitrits als Vorläufermolekül von NO. Ausgehend von den vorliegenden Untersuchungen sind deshalb größere klinische Studien zu fordern, um die positive nachhaltige Wirkung von flavanolreichem Kakao zu untermauern.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
2. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2001;134:1106-1114.
3. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342:1007-1011.
4. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaanen M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:560-568.
5. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med.* 1999;159:2170-2174.
6. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation.* 2002;106:1614-1617.
7. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;106:1652-1658.
8. Widlansky M, Gokce N, Keaney J, Vita J. The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1149-1160.
9. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion; Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist.* 1999;40:1300-1307.
10. Kelm M, Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginin-NO pathway. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:107-127.
11. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337:408-416.
12. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111-1115.
13. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette Smoking Is Associated With Dose-Related and Potentially Reversible Impairment of Endothelium-Dependent Dilatation in Healthy Young Adults. *Circulation.* 1993;88 (part 1):2149-2155.

14. Celermajer DS. Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(2):325-333.
15. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, et al. Oral L-arginin improve enthelium-depent dilatation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest.* 1996;97:1994.
16. Campisi R, Czernin J, Schröder H, Sayre J, Schelbert H. L-arginine normalizes coronary vasomotion long-term smokers. *Circulation.* 99 A.D.;99:491-497.
17. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996;94:6-9.
18. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA.* 2003;290:1030-1031.
19. Duffy SJ, Keaney JF, Jr., Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:151-156.
20. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens.* 2003;21:2281-2286.
21. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
22. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3:2007-2018.
23. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
24. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 1987;61:866-879.
25. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:236-244.
26. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.
27. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem.* 1991;266:23790-23795.
28. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:R1-12.
29. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.

30. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *PNAS*. 2001.
31. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioaktive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest*. 2002;109:1241-1248.
32. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844.
33. Kojda G, Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43:562-571.
34. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91:31S-38S.
35. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*. 1996;271:C1424-C1437.
36. Steffen Y, Schewe T, Sies H. Myeloperoxidase mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL; attenuation by (-)-epicatechin. *Free Radic Res*. 2006;40:1076-1085.
37. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7674-7677.
38. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood. *Circ Res*. 2002;91:470-477.
39. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-gluthatione in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:633-642.
40. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1590-1596.
41. Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004.
42. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdeuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J*. 2002;16:1775-1785.
43. Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:423-429.

44. Kelm M, Yoshida K. Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler J, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
45. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:295-314.
46. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res.* 1990;66:1561-1575.
47. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol.* 1991;80 (Suppl. 5):3-6.
48. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96:60-68.
49. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation.* 1998;97:1274-1281.
50. Ross R, Glomset J. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332-1339.
51. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977;86:675-684.
52. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease -Six-Year Follow-up Experience- The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961;55:33-50.
53. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson PA, Reed J, Washington R, Smith SC. Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Guidance From Framingham. *Circulation.* 1998;97:1876-1887.
54. Weiss N, Heydrick S, Postea O, Keller C, Keaney jr JF, Loscalzo J. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox status - impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:1455-1461.
55. Teragawa H, Fukuda Y, Matsuda K, Ueda K, Higashi Y, Oshima T, Yoshizumi M, Chayama K. Relation between C-reactive protein concentrations and coronary microvascular endothelial function. *Heart.* 2004;90:750-754.
56. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-1051.

57. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
58. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes jr DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
59. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolfl G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;86:207-210.
60. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow- mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-265.
61. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub G, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:790-796.
62. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:295-302.
63. Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, Hamada S, Rassaf T, Matern S, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:573-579.
64. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:2673-2678.
65. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997;100:2153-2157.
66. Nedeljkovic S, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J*. 2003;79:195-200.
67. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Münzel T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000;86:E36-E41.
68. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitiv oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys*. 1995;319:491-497.
69. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1731-1737.

70. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2003;107:2342-2347.
71. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2001;104:1905-1910.
72. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passiv Smoking And Impaired Endothelium-Dependent Arterial Dilatation In Healthy Young Adults. *N Engl J Med*. 1996;334:150-154.
73. Barbera JA, Peinado VI, Santos S, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:709-713.
74. Mayhan W, Sharpe G. Effect of cigarette smoke extract on arteriolar dilatation in vivo. *J Appl Physiol*. 1996;81:1996-2003.
75. Pryor W, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radikals, hydrogenperoxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;686:12-28.
76. Svrivastava S, Barua RS, Saha DC, Eales-Reynolds L-J, DeVoe MC. Endogenous free radical generating sources are involved in smoking-mediated dysfunction of nitric oxide biosynthesis in human coronary artery endothelial cells: an in vitro demonstration. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:306.
77. Kalra V, Ying Y, Demmer K, Natarajan R, Nadler J, Coates T. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1994;160:154-162.
78. Adams MR, Jessup W, Celermajer D. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-Arginin but not vitamin c. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:491-497.
79. Bors W, Michael C, Saran M. Flavanoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radikals. *Methods Enzymol*. 1994;234:420-429.
80. Bors W, Michael C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:1426.
81. Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki T, Toyoda M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radikal oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1999;362:79-86.
82. Girard P, Sercombe R, Sercombe C, Le Lem G, Seylaz J, Potier P. A new systemic flavanoid protects endothelium-derived relaxing factor-induced relaxation in rabbit arteries: evidence for superoxide scavenging. *Biochem Pharmacol*. 1995;49:1533-1539.

83. Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:36-40.
84. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem.* 2001;382:1687-1696.
85. Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:304S-312S.
86. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr.* 2000;130:2105S-2108S.
87. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130:2073S-2085S.
88. Holt RR, Lazarus SA, Sullards M, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidindimer B2 in human Plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:798-804.
89. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord E. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:22-26.
90. Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J. Structures of epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion epicatechin: differences between rat and human. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:840-849.
91. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 1999;47:490-496.
92. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr.* 2000;130:2086S-2092S.
93. Freedman JE, Parker III C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select Flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation.* 2001;103:2792-2798.
94. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res.* 2002;106:191-197.
95. Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2002;135:910-916.
96. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M. Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. *Am Heart J.* 2004;147:E5.

97. Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *Eur Heart J.* 2000;21:74-78.
98. Engler M, Engler M, Chen C, Malloy M, Browne A, Chiu E, Kwak H, Milbury P, Paul S, Blumberg J, Mietus-Snyder M. Flavanol-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr.* 2004;23:197-204.
99. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Groce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg J, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilatation in hypertensives. *Hypertension.* 2005;46:398-405.
100. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1276-1283.
101. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications - Report of a WHO Consultation -Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO Offset Publ.* 1999.
102. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183-1197.
103. Joint National Committee on Detection EaToHBP. Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med.* 1997;157:2413-2446.
104. Chalmers J. WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 World Health Organization- International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:151-185.
105. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-2497.
106. Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1-H5.
107. Celermajer DS. Testing Endothelial Function Using Ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
108. Preik M, Lauer T, Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated Ultrasonic Measurement of Human Arteries for the Determination of Endothelial Function. *Ultraschall Med.* 2000;21:195-198.
109. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurküla M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wallthickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol.* 1991;11:565-577.
110. Heiss C. S-Nitrosothiole als biochemische Marker der endothelialen Dysfunktion. *Dissertation.* 2002.

111. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A Chemiluminescence-based Assay for S-Nitrosoalbumin and Other Plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med.* 2000;32:1-9.
112. Gharini P. Etablierung einer sensitiven Nitratanalyse zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels in vitro und in vivo. *Dissertation.* 2004.
113. Busse R, Fleming A, Heckler M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J.* 1993;14:12-19.
114. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:682-685.
115. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996;79:984-991.
116. Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries in Vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-1319.
117. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-Dependent Dilation in the Systemic Arteries of Asymptomatic Subjects Relates to Coronary Risk Factors and Their Interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24 (No. 6):1468-1474.
118. Benjamin EJ, Larson M, Keyes M, Mitchell G, Vasani R, Keaney jr JF, Lehman B, Fan S, Ouyupuk E, Vita J. Clinical Correlates and Heritability of Flow-mediated Dilatation in the Community. *Circulation.* 2004;109:613-619.
119. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. The Effects of Age and Gender on Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasoactivity Are Stimulus-Dependent. *Clin Cardiol.* 2000;18:471-476.
120. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth Muscle Dysfunction Occurs Independently of Impaired Endothelium-Dependent Dilation in Adults at Risk of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:123-127.
121. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, Kurita A, Ohsuzu F. Morning Attenuation of Endothelium-Dependent, Flow-Mediated Dilation in Healthy Young Men: Possible Connection to Morning Peak of Cardiac Events? *Clin Cardiol.* 1999;22:417-421.
122. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation.* 1995;92:3431-3435.
123. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:146-154.

124. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1997;79:350-354.
125. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005;135:969-972.
126. Ghiadoni L, Donald AE, Copley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2000;102:2473-2478.
127. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of Acute Cigarette Smoking on Endothelium-Dependent Brachial Artery Dilatation in Healthy Individuals. *Am J Cardiol.* 1997;79:529-531.
128. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. A Comparison of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation Using Upper and Lower Arm Arterial Occlusion in Subjects with and without Coronary Risk Factors. *Clin Cardiol.* 2000;23:571-575.
129. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond).* 2000;99:261-267.
130. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical Aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995.
131. Bressler B, Chan S, Mancini GB. Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol.* 2000;85:396-400, A10.
132. Jarvisalo MJ, Ronnema T, Volanen I, Kaitosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, Irjala K, Viikari JS, Simell O, Raitakari OT. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H87-H92.
133. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Häring HU. Indikatoren einer beginnenden Artherosklerose: Erfassung der endothelialen Dysfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall Med.* 2003;24:153-161.
134. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelthaler DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J.* 1995;74:247-253.
135. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8757-8761.
136. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Di Simplicio P. Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res.* 2001;89:E47.
137. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *PNAS.* 2000;97:11482-11487.

138. Yang B, Vivas E, Reiter CD, Gladwin MT. Methodologies for the Sensitive and Specific Measurement of S-Nitrosothiols, Iron-nitrosyls, and Nitrite in Biological Samples. *Free Radic Res.* 2003;37:1-10.
139. Feelisch M, Stamler JS. *Methods in nitric oxide research.* 1996.
140. Matsunaga K, Furchgott RF. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248:687-695.
141. Alpert C, Ramdev N, George D, Loscalzo J. Detection of S-Nitrosothiols and Other Nitric Oxide Derivatives by Photolysis-Chemiluminescence Spectrometry. *Anal Biochem.* 1997;245:1-7.
142. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: *The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects.* Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
143. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:590-596.
144. Suschek CV, Schewe T, Sies H, Kroncke KD. Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a prodrug. *Biol Chem.* 2006;387:499-506.
145. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2479-2488.
146. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters B, Karoui H, Tordo P, Pritchard KAJr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of co-factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9220-9225.
147. Kleinert H. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension.* 1998;31:582-588.
148. Macritchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res.* 1997;81:355-362.
149. Yoshizumi M, Perrella M, Burnett JCJr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res.* 1993;73:205-209.
150. Rector T, Bank AJ, Mullen K, Tschumperlin L, Sih R, Pillai K, Kubo S. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation.* 1996;93:2135-2141.
151. Canevari L, Land J, Clark J, Heales S. Stimulation of the brain NO/cyclic GMP pathway by peripheral administration of tetrahydrobiopterin in the hph-1 mouse. *J Neurochem.* 1999;73:2563-2568.

152. Higman D, Strachan A, Buttery L, Hicks R, Springall D, Grennhalgh R, Powell J. Smoking impaires the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:546-552.
153. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99:1141-1146.
154. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;98:1842-1847.
155. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.
156. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand.* 2000;168:81-88.
157. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Joannides R. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase. *J Biol Chem.* 2002;277:3388-3396.
158. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001;103:1282-1288.
159. May JM. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1421-1429.
160. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon III RO, Quyyumi A, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* 1997;30:57-63.
161. Heller R, Unbehauen A, Schellenberg B, Mayer B, Werner-Felmayer G, Werner ER. L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 2001;276:40-47.
162. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* 2000;130:2109S-2114S.
163. Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res.* 2000;33:635-641.
164. Fennessy F, Moneley D, Wang J, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Taurine and Vitamin C Modify Monocyte and Endothelial Dysfunction in Young Smokers. *Circulation.* 2003;107:410-415.

165. Horning B, Maier V, Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1996;93:210-214.
166. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:III27-III32.
167. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry J-P, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of Endothelial function by Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Heart Failure; Role of Nitric Oxide, Prostanoids, Oxidant Stress, and Bradykinin. *Circulation*. 2000;102:351-356.
168. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1129-1135.
169. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation*. 1998;98:211-216.
170. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1024-1029.

## 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Sies und Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm möchte ich für die Überlassung des Themas und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten danken. Diese Arbeit entstand in Kooperation der Biochemie und Kardiologie und so konnte ich während dieser Arbeit sowohl die vorklinische als auch die klinische Forschung kennen lernen. In beiden Bereichen wurde ich herzlich aufgenommen und tatkräftig unterstützt.

Herrn Dr. med. C. Heiss möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Er ist nicht nur wissenschaftlich kompetent sondern auch stets in der Lage jemanden zu neuen Taten zu motivieren. Außerdem war er sich nie zu schade in entscheidenden Situationen auch selbst mit anzupacken um die Arbeit voranzubringen.

Frau Dr. rer. nat. P. Kleinbongard, Frau Dr. med. P. Gharini, Herrn Dr. med. I. Kumara und Frau MTA G. Schoder möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im kardiologischen Labor danken. Sie waren immer hilfsbereit und ihr Einsatz hat zur Lösung so mancher Probleme beigetragen.

Herrn Prof. Dr. sc. nat. T. Schewe und Herrn Dr. rer. nat. O. Schnorr danke ich ganz besonders für die konstruktive Kritik aus biochemischer Sicht.

Frau MTA S. Matern danke ich vor allem für ihre Hilfe bei der Arbeit im Sonographieraum. Außerdem erklärte sie sich bereit, eine zweite Auswertung der Ultraschallbilder als Qualitätskontrolle durchzuführen, was mit enormem zeitlichem Aufwand verbunden war.

Ebenfalls möchte ich allen Probanden für ihre freiwillige Teilnahme an den beiden Studien und den damit verbundenen Unannehmlichkeiten danken.

Den größten Dank bin ich meinen Eltern schuldig, die mich während meiner gesamten Ausbildung immer unterstützt haben. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

David Finis  
Krieler Str. 87  
50935 Köln  
Tel.: 0177/8221619  
e-Mail: DFinis@web.de  
Geboren am 10. August 1981 in Düsseldorf  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung:

- August 1987 bis Juli 1991: Bonifatius Grundschule Düsseldorf
- August 1991 bis Juni 2000: Geschw.-Scholl-Gymnasium Düsseldorf
- Abschluss: Bilinguales Abitur, Schwerpunkte: Mathematik und Russisch
- Abschlussnote: 1,2

### Wehrdienst:

- Juli 2000: Eintritt als Wehrpflichtiger in die Bundeswehr
- Januar 2001: Ernennung zum Sanitätsoffizieranwärter

### Studium:

- Oktober 2001: Beginn des Studiums der Humanmedizin als Sanitäts-offizieranwärter an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- September 2003: Physikum (Note: 1,66)
- Oktober 2003: Beginn des klinischen Studiums, Famulaturen in den Fächern: Chirurgie, Kardiologie, HNO, Gynäkologie, Augenheilkunde, Allgemeinmedizin
- November 2003: Beginn der Promotionsarbeit über den  
*„Einfluss von Kakaoflavanolen auf die endotheliale Dysfunktion bei Rauchern“*
- August 2006 bis Juli 2007 Praktisches Jahr:
  1. Terial Augenheilkunde, Uniklinik Düsseldorf
  2. Terial Innere Medizin, KH Brixen, Autonome Provinz Bozen, Italien
  3. Terial Chirurgie, Uniklinik Düsseldorf
- Dezember 2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Abschlussnote: 1,0)