

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und  
Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkungen von Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) auf die  
Endothelfunktion von Patienten mit Multipler Sklerose  
und in-vitro Untersuchungen der  
EGCG-vermittelten Vasodilatation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Charlotte Klinkner

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 5. Dezember 2014

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Zusammenfassung/ Abstract</b>	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1 Endotheliale Dysfunktion	7
2.1.1 Rolle der reaktiven Sauerstoff-Spezies	8
2.2 Mechanismen der eNOS-Aktivierung	10
2.3 Evaluation der Endothelfunktion	11
2.3.1 FMD (Flow-mediated Dilation)	11
2.3.2 Andere Methoden der Endothelfunktionsmessung	12
2.4 Möglichkeiten der Verbesserung der Endothelfunktion	14
2.5 Auswirkungen von Teekonsum auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen	14
2.5.1 Epidemiologische Datenlage	14
2.5.2 Daten aus klinischen Studien	15
2.5.3 Effekte von grünem Tee auf den Lipidstatus	16
2.5.4 EGCG aus grünem Tee	16
2.6 Mechanismen der EGCG-vermittelten Vasodilatation	18
2.7 Endotheliale Funktion bei chronisch entzündlichen Erkrankungen	19
2.8 Multiple Sklerose und mögliche Auswirkungen auf die Endothelfunktion	20
2.9 Zielsetzungen der Arbeit	23
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Patientenkollektiv	24
3.2 Prüfsubstanz	26
3.3 Messung der Endothelfunktion	26
3.3.1 Studiendesign	26
3.3.2 Ablauf der Endothelfunktionsmessung	28
3.3.3 Analyse des Durchmessers der Arteria brachialis	30
3.4 Blutuntersuchungen	32
3.4.1 Blutabnahme	32
3.4.2 Probengewinnung	32
3.4.3 Bestimmung der Routineparameter	32
3.4.4 Bestimmung der EGCG-Plasmakonzentration	32
3.5 Vasodilatation an isolierten Aortenringen der Maus	33
3.5.1 Tiere	33
3.5.2 Präparation der Gefäßringe	33
3.5.3 Versuchsanordnung zur Testung der Vasoreaktivität der Gefäßringe	34

Inhaltsverzeichnis	
3.6 Statistische Auswertung	36
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1 Charakterisierung der Studienpopulation	38
4.2 EGCG-Aufnahme der Probanden	41
4.3 EGCG-Gehalt im Plasma	41
4.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren	42
4.5 Endothelfunktionsmessung	45
4.5.1 Maximale endothelabhängige Vasodilatation, FMDmax (%)	45
4.5.2 Maximale endothelunabhängige Vasodilatation, NMDmax (%)	47
4.6 Korrelation der EGCG-Plasmaspiegel mit der FMD (%)	48
4.7 Endothelfunktion bei Multipler Sklerose im Vergleich zu Gesunden	50
4.8 Ex-vivo Vasodilatation von EGCG an isolierten Gefäßringen	51
<b>5 Diskussion</b>	<b>55</b>
5.1 Die Endothelfunktion bei MS	55
5.2 Effekte von EGCG auf die Endothelfunktion	56
5.3 Methode der FMD	59
5.4 Vasodilatation durch EGCG in vitro	60
5.5 Beeinflussung der LDL-Werte durch EGCG	63
5.6 Limitationen der Arbeit	63
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>84</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>

## 1 Zusammenfassung/ Abstract

Epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass hoher Teekonsum protektive Eigenschaften in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen besitzt. Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG), ein in grünem Tee enthaltenes Catechin, wird nach aktueller Studienlage für diese positiven Eigenschaften des grünen Tees verantwortlich gemacht. Die Mechanismen dieser Wirkung sind bisher wenig bekannt. Gesichert ist, dass EGCG *in vitro* antioxidative, antiproliferative, vasodilatatorische und in der Summe antiatherogene Eigenschaften besitzt.

In dieser vorliegenden Studie wurde evaluiert, wie sich 200 mg bzw. 400 mg EGCG akut auf die Endothelfunktion von Patienten mit multipler Sklerose (MS) auswirken und ob es nach einer täglichen Einnahme von 400 mg EGCG über drei Monate zu Langzeitverbesserungen kommt. Desweiteren wurde bei einer Subgruppe des MS-Patientenkollektivs untersucht, ob sich Unterschiede in der basalen Endothelfunktion im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle ergeben.

An 37 Probanden mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose wurde in einem doppel-blinden randomisierten Studiendesign die Endothelfunktion mittels Flow mediated Dilation (FMD) vor und unter Einnahme von EGCG (n=14) bzw. Placebo (n=23) zu vier Zeitpunkten evaluiert. Dabei wurde die Zunahme des Gefäßdurchmessers nach Scherkrafteinwirkung gemessen. Analog wurde für einen Vergleich zwischen MS und gesunden Probanden die Endothelfunktion einer gesunden Kontrollgruppe (n=18) ohne Interventionsmaßnahme evaluiert.

Bei MS-Patienten zeigten sich akut keine eindeutigen Verbesserungen der FMD durch EGCG-Gabe bei signifikant erhöhten EGCG-Plasmawerten. Nach 3-monatiger täglicher EGCG-Einnahme fand sich ebenfalls keine signifikante Verbesserung der FMD. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen basaler FMD von MS-Patienten und einer altersgematchten gesunden Kontrollgruppe gefunden werden.

In einem zweiten tierexperimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer kumulativen EGCG-Gabe (5  $\mu$ M - 15  $\mu$ M) auf isolierte vorkontrahierte Aorten von eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass EGCG zu einer signifikanten Vasodilatation beim Wildtyp führt, wohingegen eine Vasodilatation bei eNOS-defizienten Mäusen ausbleibt, p=0,001.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse keine eindeutige Verbesserung der Endothelfunktion bei MS-Patienten durch EGCG-Gabe und keine Unterschiede zwischen der basalen Endothelfunktion von MS-Patienten und einer gesunden Vergleichsgruppe (beide Ergebnisse jedoch limitiert durch eine geringe Fallzahl). Was wir eindeutig aufzeigen konnten ist eine durch EGCG-induzierte Vasodilatation im Aorten-Ringexperiment, die wesentlich von einer intakten NO-Synthase in den Endothelzellen abhängig ist.

### Abstract

Epidemiological studies indicate that high consumption of tea has protective properties in relation to cardiovascular disease. In current studies, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a catechin contained in green tea, is made responsible for these beneficial properties of green tea. The mechanisms of these positive effects are poorly understood. There is solid data that EGCG has in vitro antioxidant, antiproliferative, vasodilatory and anti-atherogenic features.

The present study evaluated if 200 mg or 400 mg of EGCG acutely improve endothelial function in patients with multiple sclerosis (MS) and whether there are long-term improvements after a daily intake of 400 mg of EGCG over three months. Furthermore, in a subgroup of MS patients vs. healthy controls, differences in the basal endothelial function were compared.

At 37 subjects with relapsing-remitting multiple sclerosis we evaluated the endothelial function by FMD in a randomised controlled trial after intake of EGCG (n=14) or placebo (n=23) at four time points. We measured the increase in vessel diameter brought about by shear stress. Similarly, the endothelial function of a healthy control group (n=18) was evaluated for comparison between MS and healthy volunteers.

We failed to show acute improvements in MS patients by EGCG intake despite significant increased plasma levels of EGCG. After 3 months of daily EGCG ingestion there was also no significant improvement in FMD. In addition, no significant differences between basal FMD of MS patients (n=13) and an age-matched healthy control group (n=18) could be found.

In a second part of the present work, we studied the effect of a cumulative dose of EGCG (5  $\mu$ M - 15  $\mu$ M) on isolated precontracted aortic rings of eNOS<sup>-/-</sup>-mice compared to wild type mice. We could demonstrate that EGCG leads to a significant vasodilation in wild type mice, while vasodilation was absent in eNOS deficient mice,  $p = 0.001$ .

Overall, our results show no significant improvement of endothelial function by EGCG in MS patients, no difference in basal FMD between MS patients and healthy volunteers (both limited value by a small number of cases) and a statistically significant EGCG - induced vasodilation in aortic ring experiment, which essentially depends on an intact NO synthase in endothelial cells.

## 2 Einleitung

### 2.1 Endotheliale Dysfunktion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen weltweit die Haupttodesursache dar. Aktuell sterben jährlich 17,3 Millionen Menschen an Krankheiten des kardiovaskulären Systems, das entspricht 30 % aller Todesfälle weltweit (WHO, factsheet N°317). In Deutschland ist der Anteil mit 40,2 % aller Todesursachen noch größer (Datenreport 2013, Statistisches Bundesamt, Kapitel Gesundheit). Gemeinsames Merkmal der Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind atherosklerotisch veränderte Gefäße. In der Atherogenese gilt die endotheliale Dysfunktion als eine erste funktionelle Manifestation der Gefäßschädigung. Eine endotheliale Dysfunktion liegt bei pathologischen Konstellationen vor, die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen (Marti et al., 2012).

Allgemein bezieht sich der Begriff der endothelialen Dysfunktion auf eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). Sie ist aus diesem Grund oft mit einer eingeschränkten Fähigkeit zur endothelialen Vasodilatation verbunden. Insgesamt existiert bei der endothelialen Dysfunktion ein Missverhältnis zwischen Produktion und Bioverfügbarkeit von vasodilatatorisch und vasokonstriktiv wirkenden Faktoren zugunsten einer Vasokonstriktion. Die endotheliale Dysfunktion beinhaltet jedoch auch ein Defizit anderer Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase nötig sind. Insgesamt führt diese pathologische Konstellation zur Initiierung bzw. zur Beschleunigung des atherosklerotischen Prozesses (Madden, 2012).

NO aus Endothelzellen ist ein bedeutender Mediator der vaskulären Homöostase. Gefäßtonus, Thrombozytenaggregation und die Proliferation glatter Muskelzellen werden durch NO reguliert (Widlansky et al., 2003, Deanfield et al., 2007). NO wird vom Enzym NO-Synthase (NOS) produziert, indem L-Arginin und molekularer Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgewandelt werden (Alderton et al., 2001). Co-Faktoren dieser Reaktion sind Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) (Thomas et al., 2008). Die Aktivität der NOS wird durch die Verfügbarkeit von Substrat (L-Arginin) und Co-Faktoren sowie durch die Elektronentransferrate bestimmt. Die Verfügbarkeit von Substrat und Co-Faktoren wird von Sauerstoffverbindungen beeinflusst und kann auf

diese Weise die NO-Produktion durch NOS vermindern (Beveris et al., 2006). L-Arginin stellt das Substrat sowohl für die NO-Synthase als auch für das Enzym Arginase dar (Tousoulis et al., 2002). Bei der arteriellen Hypertonie beispielsweise ist in Endothelzellen die Aktivität der Arginase zugunsten einer verminderten NO-abhängigen Vasodilatation durch Mangel an Substrat für die NOS erhöht. Dieser Umstand resultiert in einer verminderten NO-abhängigen Vasodilatation (Zhang et al., 2004). Ein ähnlicher Mechanismus entsteht durch Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Beide Moleküle führen zu vermehrter Arginaseaktivität bzw. -expression in Endothelzellen (Chandra et al., 2012). Eine erhöhte Arginaseaktivität vermindert die L-Arginin-Verfügbarkeit für NOS mit folglich reduzierter NO-Bioverfügbarkeit.

Eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit wird hauptsächlich durch einen beschleunigten NO-Abbau durch so genannte reaktive Sauerstoff-Spezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) verursacht (Hare and Stamler, 2005). Des Weiteren tragen eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), ein Mangel an Substrat oder an Co-Faktoren für die eNOS sowie Veränderungen im G-Proteingekoppelten Signalweg der Endothelzellen zur Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit bei (Popolo et al., 2013).

### **2.1.1 Rolle der reaktiven Sauerstoff-Spezies**

Als reaktive Sauerstoff-Spezies bezeichnet man schädliche Sauerstoffverbindungen. Dies sind freie Radikale mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen. Zu dieser Gruppe gehören u. a. Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxyl-Radikal ( $\text{HO}^\cdot$ ), Hypochlorid-Anion ( $\text{OCl}^-$ ) und Lipidradikale. Diese Moleküle entstehen im Zusammenspiel mit Sauerstoff und reagieren sehr schnell und aggressiv mit anderen Verbindungen in ihrer Umgebung. Unter physiologischen Bedingungen wird ihrer Entstehung durch ein System von Antioxidantien entgegengewirkt. Bei Konstellationen, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergehen, entsteht jedoch ein Überschuss an ROS, der sich nachteilig auf die Zellfunktion auswirkt. Die hochreaktiven Moleküle der ROS neutralisieren das vasodilatatorisch wirksame NO und führen so zu einer verminderten vaskulären NO-Bioverfügbarkeit. Insbesondere bei der Reaktion von Superoxid-Anion mit NO entsteht das hoch reaktive oxidative Zwischenprodukt Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das die NO-Synthase entkoppeln kann und zu einer Veränderung

von einem NO-produzierenden zu einem Superoxid-produzierenden Enzym führt (Munzel et al., 2005, Schulz et al., 2008). Die Oxygenase-Funktion der eNOS wird dabei durch seine Reduktase-Funktion ersetzt und anstelle von NO wird Superoxid produziert. Auch ein Mangel an Co-Faktoren führt bei der eNOS zur Entkopplung mit o.g. Mechanismus. Daher stellt unter diesen Bedingungen die eNOS selbst eine Quelle für die ROS-Bildung dar (Forstermann and Munzel, 2006).

In Endothelzellen und glatten Muskelzellen sind weitere Enzymsysteme als Quellen eines erhöhten oxidativen Stresses bekannt. Dies sind die NADPH-Oxidase, die mitochondrialen Atmungskettenenzyme, die Xanthinoxidase und die Myeloperoxidase (Brieger et al., 2012). Diese Enzyme führen alle zu einem direkten oder indirekten NO-Katabolismus (via Interaktion mit Superoxid) unter der Bildung von Peroxynitrit (Eiserich et al., 2002).

In Tiermodellen zur Untersuchung von arterieller Hypertonie, Diabetes und Herzinsuffizienz wurde die verminderte endothelabhängige Vasodilatation mit dem verstärkten NO-Abbau durch ROS in kausale Verbindung gebracht. Die ursächliche Rolle der ROS bei der endothelialen Dysfunktion wurde durch die Akutgabe eines Antioxidans (hoch dosiertes Vitamin C) in vivo mit einer Verbesserung der Endothelfunktion gezeigt (Ting et al., 1996, Taddei et al., 1998, Timimi et al., 1998). Eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO durch den erhöhten Abbau durch ROS führt zu einer erhöhten Endothelinproduktion, was einen weiteren Beitrag zur endothelialen Dysfunktion darstellt (Rossi et al., 2001). Oxidativer Stress fördert darüber hinaus weitere vasokonstriktorische Mechanismen und führt u. a. zur Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) (Kameda et al., 2003). MMPs sind endogene Enzyme, die zum Fortschreiten der Atherosklerose und zur Plaqueruptur beitragen (Galis et al., 1995, Inokubo et al., 2001).

Reaktive Sauerstoff-Spezies können zudem zu toxischen Schädigungen führen. Wegen ihrer Reaktionsfreudigkeit reagieren die ROS mit allen Arten biologischer Moleküle. Längere Exposition kann zu Schädigungen an vielen zellulären und extrazellulären Strukturen führen. Es kommt zur Lipidperoxidation und zu DNS-Strangbrüchen mit Veränderung der zellulären Genexpression, u. a. durch Modifikation des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors Nuclear-Faktor Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Droge, 2002, Kaliora et al., 2006). Unter physiologischen Bedingungen inhibiert NO NF- $\kappa$ B (Siomek, 2012). Bei verminderter NO-Bioverfügbarkeit führt NF- $\kappa$ B jedoch vermehrt zur

Expression endothelialer Entzündungsmediatoren und Adhäsionsmolekülen, wie z.B. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule - 1*) (Valen et al., 2001). Im Zuge dessen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer endothelialen Dysfunktion mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusentstehung (Yoshida and Kisugi, 2010).

In Anwesenheit von ROS wird das low density lipoprotein (LDL)-Cholesterin oxidiert und stellt als oxidiertes LDL (ox-LDL) einen wichtigen Faktor in der Atheroskleroseentstehung durch seine proatherogenen Eigenschaften dar (Ross, 1999, Libby et al., 2002). Oxidiertes LDL-Cholesterin kann Endothelzellen aktivieren und damit zur Produktion endothelialer Adhäsionsmoleküle führen, die die Monozytenadhäsion und -Migration in den subendothelialen Raum fördern. Oxidiertes LDL-Cholesterin führt zur Umwandlung von Monozyten in Makrophagen, die LDL-Cholesterin konzentrationsunabhängig phagozytieren und sich dabei zu Schaumzellen umbilden, welche dann wiederum zur Plaquebildung beitragen (Mitra et al., 2011). Ergänzend zu diesem Schädigungsmechanismus wirkt das oxidativ modifizierte LDL-Cholesterin zytotoxisch auf Gefäßzellen und bewirkt wiederum durch eine herabgesetzte NO-Verfügbarkeit eine endotheliale Dysfunktion (Cathcart et al., 1985, Libby et al., 2002).

## **2.2 Mechanismen der eNOS-Aktivierung**

Die endotheliale NO-Produktion kann sowohl durch pharmakologische als auch physiologische Stimuli beeinflusst werden. Eine invasive Möglichkeit zur Aktivierung der eNOS besteht in einer intraarteriellen Injektion von Acetylcholin (ACh) (Celermajer, 1997). Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung der eNOS durch auf das Endothel wirkende Scherkräfte (Pohl et al., 1986). Scherkräfte führen zur Öffnung von Kaliumkanälen mit einer Membranpotentialveränderung und vermehrtem Kalziumeinstrom in die Zellen (Olesen et al., 1988). Kalzium bewirkt innerhalb von Sekunden eine eNOS-Aktivierung und NO-Produktion, was zur lokalen Vasodilatation des zuführenden Gefäßes im Sinne eines Autoregulationsmechanismus führt (Cooke et al., 1991). Die Rolle der scherkraftvermittelten Produktion von NO ist besonders bedeutend, da im Rahmen der Atherosklerose durch Plaqueentstehung Verwirbelungen und ein Verlust des laminaren Blutflusses entstehen und es so zu unphysiologischem

Scherstress kommt (Malek et al., 1999), auf das dysfunktionale Gefäße nicht mehr adäquat reagieren können.

Bekannte Risikofaktoren einer endothelialen Dysfunktion sind Hypercholesterinämie (Boger et al., 1998), Hyperglykämie, arterielle Hypertonie (Tang and Vanhoutte, 2010), Diabetes mellitus (Potenza et al., 2009), Alter (Herrera et al., 2010), Rauchen und passiv Rauchen (Puranik and Celermajer, 2003, Barnoya and Glantz, 2005). Seit einigen Jahren werden auch Adipositas (Steinberg et al., 1996), erhöhte CRP (C-reaktives Protein)-Werte (Fichtlscherer et al., 2000) und chronische virale Infektionen (Prasad et al., 2002) als Risikofaktoren bzw. Risikomarker diskutiert.

## **2.3 Evaluation der Endothelfunktion**

### **2.3.1 FMD (Flow-mediated Dilatation)**

Um die Endothelfunktion beim Menschen zu messen, wurde eine Methode entwickelt, die auf dem zuvor beschriebenen Prinzip der eNOS-Aktivierung durch Scherkräfte basiert. Es handelt sich um die nicht-invasive sonographische Bestimmung der flussvermittelten und endothelabhängigen Vasodilatation (FMD = engl. *flow mediated dilatation*). Mit hochauflösendem Ultraschall werden Veränderungen im Durchmesser der Arteria brachialis während eines gesteigerten Blutvolumenflusses bestimmt. Zur Induktion der Scherkraftwirkung wird eine Blutdruckmanschette auf suprasystolische Werte aufgepumpt. Nach Lösen der Manschette kommt es zu einem vermehrten Bluteinstrom und zur Scherkraftwirkung am Endothel mit entsprechender Vasodilatation. Diese nicht-invasive Methode wurde erstmals 1992 angewandt (Celermajer et al., 1992) und ist ein indirektes Maß für die Bioverfügbarkeit von NO im Gefäßsystem, da die erzeugte Vasodilatation weitgehend durch lokale endotheliale NO-Freisetzung vermittelt wird (Joannides et al., 1995). Wegen des nicht-invasiven Charakters der Methode stellt die Messung der FMD eine weit verbreitete Technik zur Evaluation der Endothelfunktion dar. Prinzipiell kann einer verminderten FMD entweder eine gestörte NO-Synthese durch das Endothel, ein beschleunigter NO-Abbau oder ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO zugrunde liegen. Daher wird als Kontrolle bei jeder FMD-Messung die endothelunabhängige Vasodilatation nach Gabe von exogenem zugeführtem NO getestet (NMD = engl. *nitro-mediated dilatation*).

Die Messung der Endothelfunktion stellt eine Möglichkeit zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos neben der klassischen Risikofaktoranalyse dar (Gokce et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die peripher bestimmte FMD mit der Endothelfunktion der Koronarzirkulation korreliert (Anderson et al., 1995, Takase et al., 1998). Studien belegten, dass die Evaluation der FMD ein geeignetes Mittel darstellt, um unter anderem die Progression der koronaren Herzerkrankung (KHK) und die Eventrate in einem frühen Stadium der Atherosklerose bei asymptomatischen Patienten vorhersagen zu können (Yeboah et al., 2007, Shechter et al., 2009, Yeboah et al., 2009). Analog dazu besitzt sie auch prognostische Bedeutung für die kardiovaskuläre Ereignisrate bei Patienten mit Myokardinfarkt (Guazzi et al., 2009) und mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Gokce et al., 2003). Diese Bedeutung der FMD-Messung konnte kürzlich in einer Metaanalyse bestätigt werden (Inaba et al., 2010). Nachteile der Methode sind unter anderem die Untersucherabhängigkeit, der hohe Zeitaufwand, die Empfindlichkeit der Methode gegenüber Umwelteinflüssen (wie beispielsweise Ernährung und physische Aktivität) und die flache Lernkurve beim Erlernen der anspruchsvollen Technik.

### **2.3.2 Andere Methoden der Endothelfunktionsmessung**

#### **a) Invasiv**

Im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung kann die NO-abhängige Vasodilatation in der Koronarzirkulation nach intraarterieller Infusion von Acetylcholin untersucht werden. Dabei werden Diameteränderungen und Änderungen im koronaren Blutfluss mittels qualitativer Koronarangiographie und intrakoronarer Doppleruntersuchung gemessen (Vita, 2002). Diese Methode besitzt zwar eine hohe Aussagekraft über das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion, ist aber sehr invasiv und deshalb nicht geeignet für wiederholte Messungen oder für die Untersuchung von Populationen mit niedrigem kardiovaskulärem Risiko. Trotz der Limitationen stellt diese Methode den Goldstandard dar. Einschränkungen der so ermittelten Endothelfunktion sind assoziiert mit der kardiovaskulären Event-Rate (Suwaidi et al., 2000, Halcox et al., 2002).

Analog zur intrakoronaren Applikation kann auch im peripheren Gefäßbett die NO-abhängige Stimulation nach intraarterieller Injektion von ACh mittels Ultraschall oder Venenverschlussplethysmographie gemessen werden (Lieberman et al., 1996). Ein

Vorteil ist der leichtere Zugang zum untersuchten Gefäßabschnitt. Einen Nachteil stellt die Notwendigkeit eines intraarteriellen Zugangs dar. Auch diese Methode korreliert mit dem kardiovaskulären Risiko (Perticone et al., 2001).

### **b) Nichtinvasiv**

Ein weniger invasiver Ansatz zur Evaluation der koronaren endothelabhängigen Vasodilatation besteht in der Bestimmung der Koronarreserve in der linken Koronararterie mittels transthorakalem Doppler. Bei dieser Methode werden Flusssignale in der linken Koronararterie basal und nach intravenöser Gabe von Adenosintriphosphat (ATP, 140  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ ) gemessen. Veränderungen des Flusses werden als Verhältnis basal zu ATP-induziert angegeben (Otsuka et al., 2001). Eine größere so ermittelte Koronarreserve konnte bei Maßnahmen gefunden werden, die nachweislich Verbesserungen der endothelabhängigen Vasodilatation bewirken (Hirata et al., 2004). Die Methode ist in ihrer Aussage limitiert, da die ATP-Antwort nur teilweise NO-abhängig ist. Außerdem ist sie sehr stark untersucherabhängig und es gibt noch kein validiertes standardisiertes Untersuchungsprotokoll (McMackin and Vita 2001).

Es existieren weitere nicht-invasive Methoden zur Evaluation der Endothelfunktion. Die Finger-Plethysmographie (=PAT, peripher arteriell Tonometrie) registriert kontinuierliche Änderungen des pulsatischen arteriellen Volumens in kleinen peripheren arteriellen Gefäßen mithilfe von pneumatischen plethysmographischen Cuffs, welche auf beiden Zeige- oder Mittelfingern platziert werden. Zur Messung der peripheren Endothelfunktion werden über einen Zeitraum von fünf Minuten kontinuierlich Baseline-Messungen an den Zeigefingern beider Hände simultan durchgeführt. Der arterielle Tonus wird während des Aufpumpens einer Blutdruckmanschette („Ischämiephase“) und anschließend während der „Hyperämiephase“ registriert. Das Ausmaß der hyperämischen Reaktion ergibt sich aus dem Quotienten der PAT-Signal-Amplitude und der Baselinephase (PAT Index). Die gemessene Hyperämie nach Lösen des Cuffs ist auch zum Großteil NO-vermittelt (Nohria et al., 2006). Es konnte eine Korrelation mit der FMD-Methode nachgewiesen werden (Kuvin et al., 2007). Vorteil dieser Methode ist die schnelle automatische Auswertbarkeit und damit ist sie weniger untersucherabhängig. Der PAT-Index scheint, genau wie die FMD, mit den klassischen

kardiovaskulären Risikofaktoren (Hamburg et al., 2008) zu korrelieren, jedoch fehlen Daten über die klinische Relevanz dieser Messung (Lekakis et al., 2011).

Es können ebenfalls zirkulierende endotheliale Progenitorzellen zur Evaluation der Endothelfunktion herangezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen eine Rolle bei Reparaturmechanismen nach einer Endothelschädigung und bei der Angiogenese spielen. Die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen korrelierte mit der Fähigkeit zur endothelialen Vasodilatation. Es liegt eine verminderte Anzahl dieser Progenitorzellen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren vor (Hill et al., 2003). Schnelle Veränderungen nach Interventionsmaßnahmen können durch diese Zellen jedoch nicht evaluiert werden.

## **2.4 Möglichkeiten der Verbesserung der Endothelfunktion**

Es ist bekannt, dass Medikamente wie Statine, ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten, die in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen etabliert sind, mit einer Verbesserung der Endothelfunktion einhergehen (Osto et al., 2007). Aber auch die individuelle Ernährung spielt bei vielen chronischen Krankheiten wie Tumorerkrankungen, Myokardinfarkt, Apoplex und Diabetes mellitus eine bedeutende Rolle in der primären und sekundären Prävention. Klinische Studien haben gezeigt, dass der Konsum von Weintrauben und bestimmten Beeren mit einem hohen Gehalt an Flavonolen zur Verminderung des kardiovaskulären Risikos führt (Streppel et al., 2014). Es konnten Effekte auf Blutdruck, Thrombozytenaggregation sowie Verbesserungen der Endothelfunktion nachgewiesen werden (Chong et al., 2010). Auch für dunkle Schokolade konnten positive Effekte auf die Endothelfunktion bei Gesunden (Vlachopoulos et al., 2005, Hermann et al., 2006) sowie bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen gezeigt werden (Heiss et al., 2010).

## **2.5 Auswirkungen von Teekonsum auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

### **2.5.1 Epidemiologische Datenlage**

Nach Wasser stellt Tee in seinen verschiedenen Darreichungsformen weltweit das am zweithäufigsten konsumierte Getränk dar (Weisburger, 1997). Einige epidemiologische

Daten legen nahe, dass regelmäßiger Genuss von grünem und auch schwarzem Tee mit einem geringeren Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert ist (Peters et al., 2001, Vita, 2003, Arab et al., 2009). Jedoch sind die Daten aus epidemiologischen Studien nicht alle konsistent. Eine Metaanalyse untersuchte den Zusammenhang von Flavonoiden mit dem Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung und konnte dabei keine Assoziation herstellen (Wang et al., 2012). Um diese teilweise kontroversen Ergebnisse auf eine breitere wissenschaftliche Basis zu stellen, sind klinische Studien nötig.

### **2.5.2 Daten aus klinischen Studien**

Die Verbesserung der Endothelfunktion durch Tee konnte in klinischen Interventionsstudien sowohl bei Patientenkollektiven als auch bei gesunden Probanden gezeigt werden. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigte schwarzer Tee sowohl Akuteffekte nach zwei Stunden als auch Langzeiteffekte nach 28 Tagen durch Zunahme der FMD der Arteria brachialis proportional zu einer steigenden Catechin-Konzentration im Plasma (Duffy et al., 2001). Weitere prospektive klinische Interventionsstudien konnten eine Verbesserung der Endothelfunktion bei verschiedenen Patientengruppen zeigen, darunter eine akute Zunahme der FMD für grünen Tee bei chronischer Niereninsuffizienz (Park et al., 2010) und für schwarzen Tee bei Nierentransplantierten (Hodgson et al., 2005, Ardalan et al., 2007). Auch bei Gesunden waren Verbesserungen der Endothelfunktion durch Zunahme der FMD durch Teekonsum zu erreichen. Unsere Arbeitsgruppe zeigte dies für schwarzen und grünen Tee bei gesunden Frauen (Jochmann et al., 2008). Des Weiteren zeigte sich bei gesunden Rauchern eine Verbesserung der Endothelfunktion durch Zunahme der FMD akut nach Genuss von 400 ml grünem Tee (Nagaya et al., 2004) sowie langfristig nach täglicher Einnahme von 8 g Instant-Grüntee über vier Wochen (Kim et al., 2006). Weitere Studien mit gesunden Probandenkollektiven unterstützen diese Ergebnisse (Lorenz et al., 2007, Alexopoulos et al., 2008, Grassi et al., 2009). Jedoch sind auch hier nicht alle Studien konsistent. Ryu et al. konnten keine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus finden. In dieser Studie wurde die Endothelfunktion bei 52 Patienten nach 28 Tagen und täglicher Einnahme von 9 g

(in 900 ml Wasser) grünem Tee mit der Pulswellengeschwindigkeit gemessen (Ryu et al., 2006).

### **2.5.3 Effekte von grünem Tee auf den Lipidstatus**

Experimentelle Daten zeigen einen Zusammenhang zwischen Teekonsum und positiven Effekten auf das Lipidprofil (Miura et al., 2001). EGCG scheint ein wirksamer Inhibitor der Lipidabsorption zu sein. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass es zur Lipid-Komplexbildung führt und die Lipidabsorption teilweise verhindert (Koo and Noh, 2007). Im Hypercholesterinämie-Tiermodell zeigte sich nach Fütterung mit grünem Tee eine Reduktion der Cholesterin- und LDL-Spiegel um 28 % bzw. 48 % und einem Anstieg des HDL (high density Lipoprotein) um 88 % (Vinson and Dabbagh, 1998). Vor einiger Zeit konnte ein weiterer lipidsenkender Mechanismus identifiziert werden. In gesunden Ratten führte EGCG zur Senkung des Total- und VLDL (very low density lipoprotein) -Cholesteringehalts mit vermehrter biliärer Sekretion von Cholesterin und Phospholipiden durch EGCG (Hirsova et al., 2012). Die Ergebnisse aus klinischen Studien am Menschen sind diesbezüglich nicht einheitlich. Es konnte zum Einen eine Reduktion des postprandialen Anstiegs der Blutfette durch Catechine (Unno et al., 2005) und eine signifikante Reduktion des Cholesterins um 11 % und des LDLs um 16 % bei Patienten mit leichter bis milder Hypercholesterinämie nach 12 Wochen gezeigt werden (Maron et al., 2003). 400 mg bzw. 800 mg reines EGCG täglich führten nach 2 Monaten ebenfalls zu einer signifikanten LDL-Reduktion bei postmenopausalen Frauen (Wu et al., 2012). Andererseits konnten mehrere klinische Studien diese positiven Ergebnisse nicht bestätigen (Tsubono and Tsugane, 1997, Trautwein et al., 2010).

### **2.5.4 EGCG aus grünem Tee**

Tee wird aus den Blättern von *Camellia sinensis* hergestellt. Polyphenole zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen und machen etwa 30 % der Trockensubstanz des Tees aus. Unter den Polyphenolen gibt es die Untergruppe der Flavonoide, die durch mindestens zwei aromatische Ringe gekennzeichnet ist. Jeder Ring trägt mindestens eine Hydroxylgruppe (Beecher, 2003). Sowohl im grünen als auch im schwarzen Tee stellen Flavanole die größte Gruppe der Flavonoide dar, darunter Catechin, Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin-Gallat (ECG) und Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG).

Tee wird hauptsächlich auf zwei verschiedene Arten zubereitet. Grüner Tee entsteht durch langsames Trocknen und schwarzer Tee durch Fermentation der Teeblätter. Bei der Fermentation wird ein Teil der Catechine zu Theaflavinen und zu einem größeren Teil zu Thearubigenen oxidiert (Subramanian et al., 1999, Menet et al., 2004). In grünem Tee machen die Catechine etwa 80-90 % der Flavonoide aus (Balentine et al., 1997). EGCG hat mit 48-55 % den größten Anteil und ist, zusammen mit EC (5-7 %), EGC (9-12 %) und ECG (9-12 %), für die biologischen Eigenschaften des grünen Tees verantwortlich (Shahidi, 2000). Schwarzer Tee enthält nur noch ca. 30 % der Menge an Catechinen des grünen Tees (Balentine et al., 1997). Eine Tasse grüner Tee enthält zwischen 20 und 100 mg EGCG (Stangl et al., 2006). EGCG wird für 32 % des antioxidativen Potentials von grünem Tee verantwortlich gemacht (Moore et al., 2009).

Aus Kinetikstudien ist bekannt, dass nach oraler Aufnahme in einem Bereich von 200 – 600 mg EGCG der Plasmaspiegel linear ansteigt. Es wird hauptsächlich im Jejunum und Ileum durch parazelluläre Diffusion absorbiert. Die Bioverfügbarkeit ist wegen niedriger Absorptionsrate und schnellem Metabolismus relativ schlecht. Im Mittel gelangen nur 5 % der konsumierten Catechine ins Plasma (Miyazawa, 2000). Bei Mäusen konnte eine lineare Gewebsanreicherung in Prostata und Leber gezeigt werden (Lambert et al., 2006). EGCG unterliegt dem Phase II-Metabolismus mit Glukuronidierung, Methylierung und Sulfatierung in vivo und in vitro (Lambert et al., 2003, Feng, 2006).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl positiver Eigenschaften für EGCG beschrieben. Es besitzt antioxidative Aktivität (Hertog et al., 1997, Alvarez et al., 2002), hemmt die Neoangiogenese (Fassina et al., 2004), verhindert die Proliferation glatter Muskelzellen (Zheng et al., 2004), hemmt die Thrombozytenaggregation (Deana et al., 2003) und wirkt in der Summe antiatherogen (Chyu et al., 2004).

In einer doppelblinden, placebo-kontrollierten cross-over Studie mit 42 Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte von Widlansky et al. gezeigt werden, dass 300 mg EGCG die FMD akut verbessert. Langzeiteffekte nach zwei Wochen täglicher EGCG-Einnahme (300 mg) ergaben sich jedoch nicht (Widlansky et al., 2007). Weitere klinische Studien zur EGCG-Wirkung auf die Endothelfunktion liegen bisher nicht vor.

## 2.6 Mechanismen der EGCG-vermittelten Vasodilatation

EGCG wurde bisher hauptsächlich für den gefäßerweiternden Effekt von grünem Tee verantwortlich gemacht (Chen et al., 2000). Zunächst wurde die Wirkung des grünen Tees auf die Vasodilatation mit einer Hemmung des Kalzium-Einstroms in die glatten Muskelzellen assoziiert (Huang et al., 1998). Einige Arbeitsgruppen zeigten eine endothelabhängige EGCG-induzierte Vasodilatation durch Stimulation der endothelialen NO-Synthase (Lorenz et al., 2004) oder eine vermehrte Prostazyklin-Produktion (Mizugaki et al., 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte bei vorkontrahierten Aorten von Ratten zeigen, dass der endothelabhängigen Vasodilatation durch EGCG eine schnelle posttranslationelle Aktivierung durch Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)-, Proteinkinase A (PKA)- und Akt-abhängige Phosphorylierung der eNOS zugrunde liegt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der eNOS-Proteingehalt durch EGCG nicht beeinflusst wird (Lorenz et al., 2004). Die NO-Abhängigkeit der EGCG-vermittelten Vasodilatation wurde postuliert, da sich in Rattenaorten, die zuvor mit dem selektiven NOS-Inhibitor L-NAME (L-NG-Nitroarginin-Methyl-Ester) behandelt wurden, keine Vasodilatation zeigte.

Es werden jedoch auch andere Mechanismen der EGCG-vermittelten Vasodilatation diskutiert. Eine spanische Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Effekte von EGCG auf die Vasodilatation isolierter Aortenringe zumindest teilweise endothelunabhängig durch Hemmung verschiedener Phosphodiesterase (PDE) -Isoformen vermittelt werden. Durch die PDE-Hemmung erhöht sich der Gehalt an cAMP und cGMP in den glatten Muskelzellen der Media und eine Kontraktion wird verhindert (Alvarez et al., 2006). Ein weiterer Mechanismus könnte die Wirkung von EGCG auf spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sein, da eine 10-minütige Inkubation von Rattenaortenringen mit EGCG den Kalziumeinstrom in glatte Muskelzellen verhindert (Campos-Toimil and Orallo, 2007).

Durch seine antioxidativen Eigenschaften könnte EGCG ebenfalls zu einer Vasodilatation führen (Hertog et al., 1997, Alvarez et al., 2002). Die Rolle von EGCG als Radikalfänger (u. a. von Superoxid  $O_2^{\cdot-}$ ) könnte einen endothelabhängigen Mechanismus implizieren, da  $O_2^{\cdot-}$  prinzipiell für den Abbau von NO verantwortlich ist (Furchgott, 1999). Durch die Anwesenheit von EGCG könnte sich die Bioverfügbarkeit von NO durch fehlenden Abbau durch ROS erhöhen und so eine vermehrte Vasodilatation bewirken. Jedoch reichen diese antioxidativen Eigenschaften zur

Vasodilatation möglicherweise nicht aus, da Vitamin C als noch potenteres Antioxidans keine Relaxation bei vorkontrahierten Muskelzellen mit Endothel bewirken konnte (Huang et al., 1998).

Nicht alle Daten konnten eine durch EGCG-vermittelte Vasodilatation zeigen. Einige Arbeitsgruppen fanden vielmehr eine durch EGCG ausgelöste Vasokonstriktion. Shen et al. zeigten, dass EGCG in glatten Muskelzellen von Rattenaorten über einen  $H_2O_2$ -induzierten Signalweg direkt zur Kontraktion führt (Shen et al., 2003). Die Ergebnisse von Sanae et al. sind dazu konsistent. In ihrem Experiment haben Flavanole die durch Phenylephrin induzierte endothelabhängige Kontraktion noch potenziert (Sanae et al., 2002). Es konnte außerdem eine kalziumabhängige Kontraktion durch EGCG in Rattenaorten gezeigt werden (Alvarez et al., 2006). Diese gegensätzlichen Effekte von EGCG (Kontraktion und Relaxation) könnten durch ein biphasisches Verhalten je nach Konzentration bedingt sein (Campos-Toimil and Orallo, 2007).

In vivo Studien legen jedoch eine vasodilatatorische Wirkung von EGCG nahe. Eine längerfristige EGCG-Einnahme von 200 mg/kg Körpergewicht pro Tag senkte signifikant den systolischen Blutdruck spontaner hypertensiver (Potenza et al., 2007) und normotensiver Ratten (Sheng et al., 2007).

## **2.7 Endotheliale Funktion bei chronisch entzündlichen Erkrankungen**

Für verschiedene chronisch entzündliche Erkrankungen ist aus epidemiologischen Daten bekannt, dass sie mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind (Meune et al., 2009, Pieringer and Pichler, 2011). In klinischen Studien konnte eine endotheliale Dysfunktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis und Psoriasis nachgewiesen werden (Charakida et al., 2005, Roifman et al., 2009, De Simone et al., 2011, Soltesz et al., 2011). Es finden sich übereinstimmende pathogenetische Mechanismen, wie T- und B-Zellaktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF), Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle, die auch im Rahmen der Atherogenese eine Rolle spielen (Rho et al., 2009). Bei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Multiple Sklerose) wurde eine zentrale endotheliale Dysfunktion beschrieben (Chrissobolis et al., 2011). Hierbei kommt es zur Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke durch Fehlfunktion von tight junctions und anderen Transportern. Dies

führt zu vermehrter Leukozytentransmigration und stellt einen frühen Prozess in der Pathogenese dieser zentralnervösen Erkrankungen dar. Die Einschränkung der Blut-Hirn-Schranke führt zu Neuroinflammation und oxidativem Stress, Mechanismen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Grammas et al., 2011). Man könnte vermuten, dass Patienten mit Multipler Sklerose (MS) als Beispiel einer neurodegenerativen Erkrankung mit entzündlicher Genese auch Einschränkungen der endothelialen Funktion haben. Bisher existieren jedoch keine Daten zur Endothelfunktion bei Patienten mit MS.

## **2.8 Multiple Sklerose und mögliche Auswirkungen auf die Endothelfunktion**

Die Multiple Sklerose, auch Encephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist durch fokale entzündliche Läsionen im zentralen Nervensystem (ZNS) mit Demyelinisierung und unterschiedlich ausgeprägtem Verlust an Axonen sowie begleitender Gliose charakterisiert (Hemmer et al., 2003). Die Prävalenz der MS lag in Europa in den letzten 30 Jahren bei 83 pro 100 000 und die Inzidenz bei 4,3 pro 100 000 Einwohnern (Pugliatti et al., 2006). Die MS stellt somit die häufigste neurologische Erkrankung dar, die bereits im jungen Erwachsenenalter zu bleibender Behinderung führen kann. Durch Umwelt- und genetische Faktoren kann die Erkrankungswahrscheinlichkeit beeinflusst werden.

Die Pathogenese der Erkrankung ist noch nicht vollständig bekannt. Immunologische Faktoren spielen eine wichtige Rolle, jedoch sind nicht alle Phänomene der MS durch die Autoimmunhypothese zu erklären. Das entzündliche Infiltrat der MS-Läsionen besteht im Wesentlichen aus T-Lymphozyten, wenigen B-Lymphozyten und Plasmazellen sowie aus ausgedehnten Makrophagen-Mikroglia Ansammlungen (Kieseier and Wiendl, 2006). Die Entzündungsreaktion der MS-Plaques ist mit den Zytokinen Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) assoziiert. Es gibt mehrere Verlaufsformen der MS, darunter die schubförmig-remittierende (RR-MS), die sekundär-progrediente und die chronisch-progrediente Verlaufsform. Bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform tritt die Krankheit in abgrenzbaren Schüben mit neurologischen Symptomen auf, die sich wieder vollständig oder teilweise zurückbilden.

Einige Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren die Hypothese aufgestellt, dass die inflammatorische Reaktion zumindest bei einigen Formen der Läsionen ein sekundäres Ereignis darstellen könnte (Barnett et al., 2009). Histopathologische Untersuchungen zeigten interindividuelle Unterschiede im Schädigungsmuster der MS-Plaques. So lassen sich vier verschiedene Muster (I-IV) erkennen (Charakida et al., 2005). Die ersten beiden Läsionsarten sind mit der gängigen Vorstellung der MS-Pathogenese vereinbar. Beim Läsionstyp III zeigte sich allerdings, dass die Oligodendrozytenschädigung schon vor dem Verlust des myelinassoziierten Glykoproteins auftritt und die entzündliche Reaktion als Sekundärphänomen betrachtet werden könnte (Lassmann, 2003). Die Oligodendrozytenschädigung der Typ III-Läsionen zeigt ein Schädigungsmuster, wie sie bei hypoxiebedingten Infarkten der weißen ZNS-Substanz beobachtet wird (Aboul-Enein and Lassmann, 2005).

In der Magnetresonanztomografie (MRT) finden sich zudem Perfusionsänderungen in der normal erscheinenden weißen Substanz, die normalerweise nicht sekundär aufgrund eines Axonschadens auftreten (De Keyser et al., 2008). Es wurde bei MS-Patienten ein Verlust  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren auf Astrozyten gefunden (D'Haeseleer et al., 2011). Astrozyten regulieren die zerebrale Mikrozirkulation. Sie scheinen eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung des vaskulären Durchmessers und der Regulation des zerebralen Blutflusses zu spielen (Metea and Newman, 2006). Eine Fehlregulation der Astrozyten durch einen Verlust an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren könnte eine Erklärung der in der MRT diagnostizierten Perfusionsänderungen bei der MS sein.

Ein weiterer Mechanismus, der zu reduzierter Perfusion der weißen Substanz und damit eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen könnte, ist eine systemische vaskuläre Dysregulation. Plasmawerte des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) sind in der MS erhöht (Pache et al., 2003). Im akuten MS-Schub werden zudem Veränderungen in der Thrombozytenaggregation mit veränderter Gerinnungskaskade beobachtet (D'Haeseleer et al., 2011).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es möglicherweise Gemeinsamkeiten in der Entstehung der MS und der endothelialen Dysfunktion als inflammatorische Krankheiten gibt bzw. eine endotheliale Dysfunktion das Fortschreiten der MS durch einen weiteren Verlust der vaskulären Homöostase beeinflussen kann.

Aus epidemiologischen Daten ist bekannt, dass MS-Patienten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben (Christiansen et al., 2010). Ursächlich wurden mit der Krankheit einhergehende Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose wie eine eingeschränkte körperliche Aktivität (Paltamaa et al., 2006), hohe Harnsäurespiegel (Amorini et al., 2009), und der Einsatz von hoch dosiertem Kortison im akuten Schub angenommen (Wei et al., 2004). Bisher gibt es mehrere Kohortenstudien zur Untersuchung der Epidemiologie von MS und kardiovaskulären Erkrankungen. Zwei dänische Studien konnten beispielsweise ein um 30 % höheres Mortalitätsrisiko durch kardiovaskuläre Erkrankungen (inklusive Apoplex) und 6 % (exklusive Apoplex) (Bronnum-Hansen et al., 2004, Hirst et al., 2008) bei MS-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung feststellen.

Aufgrund von therapeutischen Fortschritten bei der MS hat sich die Lebenserwartung wesentlich verbessert (Bronnum-Hansen et al., 2004). Daher sind gezielte Präventionsmaßnahmen bei MS-Patienten sowohl auf individueller als auch auf Public Health-Ebene wichtig. Die Frage einer reduzierten Endothelfunktion bei MS stellt daher eine wichtige Frage dar, die bisher noch nicht untersucht wurde.

## 2.9 Zielsetzungen der Arbeit

1) In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Epigallocatechin-3-Gallat bei Patienten mit Multipler Sklerose und schubförmig-remittierender Verlaufsform zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass EGCG antiatherogen wirkt und *in vitro* zur Vasodilatation führt. Wir untersuchten in dieser Arbeit die Wirkung einer akuten und chronischen EGCG-Einnahme auf die Endothelfunktion bei MS-Patienten im Vergleich zu Placebo.

2) Da es Hinweise für eine möglicherweise eingeschränkte Endothelfunktion bei MS gibt, soll zum ersten Mal geprüft werden, ob im Vergleich zu Gesunden Einschränkungen der basalen FMD im Sinne einer endothelialen Dysfunktion festzustellen sind. Wir verglichen deshalb die Endothelfunktion von männlichen MS-Patienten mit einer gesunden altersgematchten Kontrollgruppe.

3) Nach aktueller Studienlage konkurrieren mehrere Hypothesen zur Vasodilatation durch EGCG. Neben der NO-vermittelten Wirkung wurde gezeigt, dass auch eine PDE-Hemmung eine Rolle spielen könnte. Indem wir den Effekt von EGCG auf die Vasodilatation von Wildtyp-Mäusen (mit intakter endothelialer NO-Synthase) und NO-defizienten Mäusen verglichen haben, wollten wir eine hauptsächlich NO-abhängige Kaskade der Vasodilatation durch EGCG beweisen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientenkollektiv

Die Studie ist im Rahmen einer Kooperation mit der Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie, CCM, als kardiologische Substudie einer monozentrischen, prospektiven, doppelblinden, randomisierten, plazebo-kontrollierten zweiarmigen Pilot Studie mit dem Titel „Sunphenon (Epigallocatechin-3-Gallat) in schubförmig-remittierender Multipler Sklerose“ (SuniMS-Studie) geplant worden. Das neurologisch motivierte Ziel der Studie war es herauszufinden, ob sich EGCG (Handelsname Sunphenon®) auf die kumulative Zahl neuer T2-Läsionen in der cerebralen Magnetresonanztomographie (MRT) in einem einjährigen Behandlungszeitraum bei Patienten mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose auswirkt.

Diejenigen Studienteilnehmer, die mit der Durchführung der Endothelfunktionsmessung an zwei von den insgesamt 12 Studienvisits einverstanden waren, wurden in die kardiologische Substudie eingeschlossen. Die Rekrutierung und Randomisierung erfolgte durch die Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie mit den unten aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien.

37 Patienten entschlossen sich zur Teilnahme an der Substudie. Davon wurden 14 Patienten in den EGCG-Arm und 23 Patienten in den Placeboarm randomisiert. 42,9 % der Teilnehmer der EGCG-Gruppe waren männlich, entsprechend waren es 39,1 % der Placebogruppe. Zu Studienbeginn lag das mittlere Alter der EGCG-Gruppe bei 36,3 (+/- 10,9) Jahren und das der Placebogruppe bei 41,6 (+/- 8,1) Jahren.

Um die basale Endothelfunktion bei MS zu evaluieren, wurde ein Subgruppe von männlichen Nichtraucher unter den eingeschlossenen Patienten gebildet und für eine größere Gruppenstärke noch weitere MS-Patienten aus dem Patientenstamm der Klinik für Neurologie rekrutiert, die alle Ein – und Ausschlusskriterien, welche für die SuniMS-Studie genannt sind, erfüllten. Als Vergleichsgruppe wurden gesunde männliche Nichtraucher durch eine Suche per Zettelaushang in der Charité rekrutiert, deren basale Endothelfunktion gemessen wurde. Insgesamt konnte die Endothelfunktion von 13 MS-Patienten (mittleres Alter  $33,2 \pm 7,3$ ) mit der Endothelfunktion von 18 altersgematchten Gesunden (mittleres Alter  $34,8 \pm 9,8$ ) (jeweils männlich und Nichtraucher) verglichen werden. Alle Beschreibungen über den Ablauf und die Durchführung der

Endothelfunktionsmessung unter Punkt 2.3 gelten auch für die Messung der Endothelfunktion bei der männlichen gesunden Kontrollgruppe.

#### Definierte Ein- und Ausschlusskriterien der SuniMS-Studie:

Selektiert wurden ambulante MS-Patienten (männlich und weiblich) mit einer stabilen Medikation mit Glatirameracetat während mindestens 6 Monaten vor Studieneinschluss.

#### **Einschlusskriterien:**

1. Lebensalter zwischen 18 und 60 Jahren bei der Rekrutierung
2. Diagnose Multiple Sklerose gemäß der McDonald-Kriterien
3. MS mit schubförmig-remittierendem Verlauf
4. EDSS (Expanded Disability Status Scale) zwischen 0-6,5
5. Konsum von maximal einer Tasse schwarzen Tee und maximal zwei Tassen Kaffee pro Tag, kein Konsums von grünem Tee und Grapefruitsaft
6. Negativer Schwangerschaftstest bei Einschluss und Verwendung hocheffektiver Methoden der Kontrazeption bei Frauen im gebärfähigen Alter

#### **Ausschlusskriterien:**

1. Primär oder sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform der MS
2. jegliche andere Erkrankung als MS, die die Symptome des Patienten besser erklären könnte
3. klinisch relevante Nebenerkrankungen anderer Organsysteme bzw. Nachweis systemischer Infektionen
4. bekannte Allergie gegen Bestandteile von Sunphenon EGCG oder die Zusatzstoffe der Prüfmedikation bzw. der Placebokapseln
5. Einnahme lebertoxischer Medikamente
6. Schwangerschaft oder Stillzeit
7. Teilnahme an jeglicher klinischen Studie innerhalb der letzten 6 Monate oder während der gesamten Studiendauer
8. Medizinische, psychiatrische oder andere Konditionen, die zu Verständigungsproblemen bzw. Nichteinhalten der Studienregeln führen können
9. Karenz von grünem Tee 30 Tage vor Einschluss sowie während der gesamten Studie

### **3.2 Prüfsubstanz**

Sunphenon® EGCG-Kapseln enthalten nach Herstellerangaben je 200 mg Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG). Sunphenon® EGCG ist ein Produkt von Taiyo International ([www.taiyointernational.com](http://www.taiyointernational.com)) mit Sitz in Japan und einer Niederlassung in Deutschland. Unter dem Namen „Epinerve“ ist in Italien ein Taiyo-Produkt mit EGCG in Kapselform zur Behandlung von Glaukom zugelassen.

### **3.3 Messung der Endothelfunktion**

#### **3.3.1 Studiendesign**

Alle Messungen wurden in der Charité Campus Mitte in der Klinik für Kardiologie und Angiologie in einem klimatisierten (21 +/- 1°C) und abgedunkelten Raum durchgeführt. Nach einer Nahrungskarenz von mindestens acht Stunden kamen die Studienteilnehmer morgens nüchtern zur Endothelfunktionsmessung. Alle Medikamente wurden am Morgen der Messung pausiert. Die Patienten wurden gebeten möglichst ohne körperliche Anstrengung zur Untersuchung zu kommen.

Um die Effekte zu evaluieren, die EGCG auf die Endothelfunktion ausübt, wurde ein doppelblindes, placebo-kontrolliertes Studiendesign gewählt. Am ersten Messtag wurde die Endothelfunktion nichtinvasiv zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durch Messung der „Flow-mediated-Dilation“ (FMD) vor und nach einmaliger EGCG-Einnahme (200 mg) gemessen. Die erste Messung vor Intervention entspricht der basalen Endothelfunktion jedes Probanden. Diese Messung wird im Folgenden „V1 t1“ genannt. Zwei Stunden nach EGCG- bzw. Placeboeinnahme wurde die Messung wiederholt. Diese Messung wurde „V1 t2“ genannt. „V“ steht für Visit, das heißt für den Studientermin und „t“ für time, d.h. für den Zeitpunkt der Messung innerhalb des Visits. Die Zeitpunkte der Endothelfunktionsmessung wurden in Anlehnung an Kinetik-Studien gewählt, da sich höchste Plasmakonzentrationen ca. 1,5 - 2 Stunden nach Einnahme von EGCG nachweisen lassen (Lee et al., 2002). Zu Beginn sowie ca. 1,5 Stunden nach Kapseleinnahme fanden außerdem EGCG-Plasmabestimmungen statt.

In den darauf folgenden drei Monaten nahmen die Studienteilnehmer täglich je 200 mg EGCG bzw. Placebo morgens und abends zur gleichen Zeit ein (insgesamt täglich 400 mg). Nach drei Monaten wurden an einem weiteren Messtag (V2) die Langzeiteffekte

der täglichen EGCG-Einnahme auf die Endothelfunktion mittels FMD evaluiert (diese Messung wurde „V2 t1“ genannt). Zwei Stunden später fand eine zweite Messung zur Quantifizierung eines Akuteffekts nach Einnahme von 400 mg EGCG als add on statt. Diese Messung wird im Folgenden „V2 t2“ genannt. Zu Beginn dieses Messtags sowie ca. 1,5 Stunden nach Einnahme von 400 mg EGCG fanden ebenfalls EGCG-Plasmabestimmungen statt.

Zwischen den Messungen hielten sich die Studienteilnehmer in einem Ruheraum der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Charité auf, um körperliche Anstrengungen auf ein Mindestmaß zu reduzieren und vergleichbare Bedingungen unter den Teilnehmern zu schaffen. Jeder Studienteilnehmer erhielt zwischen den Messungen ein standardisiertes Frühstück (Croissant). Das Studiendesign ist in Abbildung 1 dargestellt.

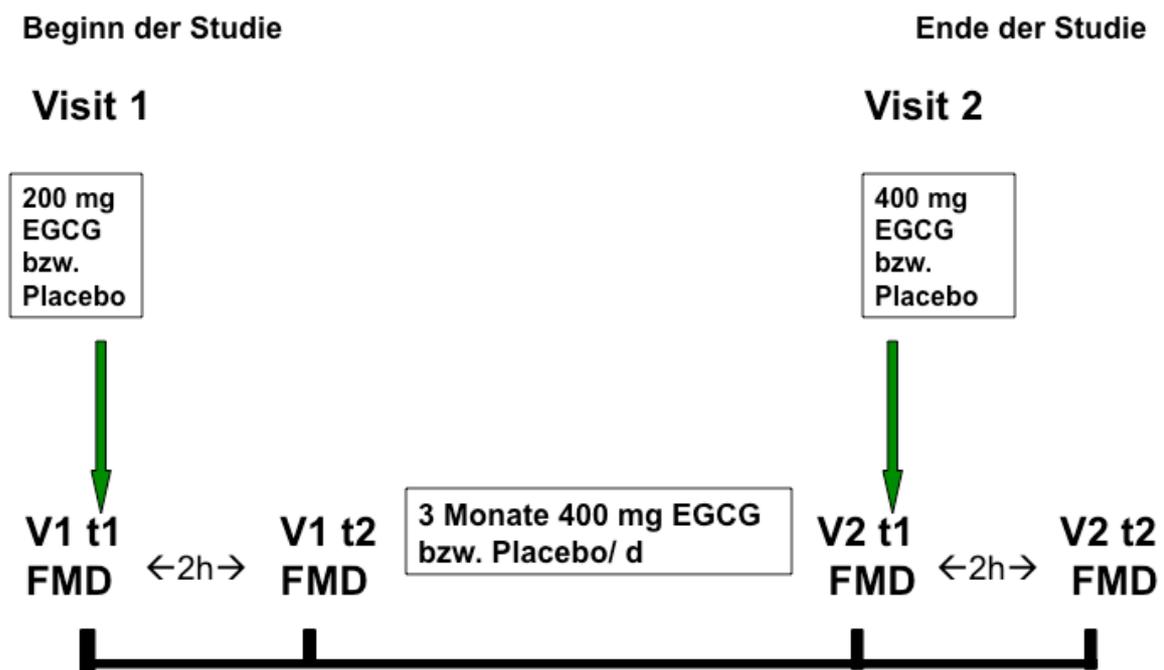
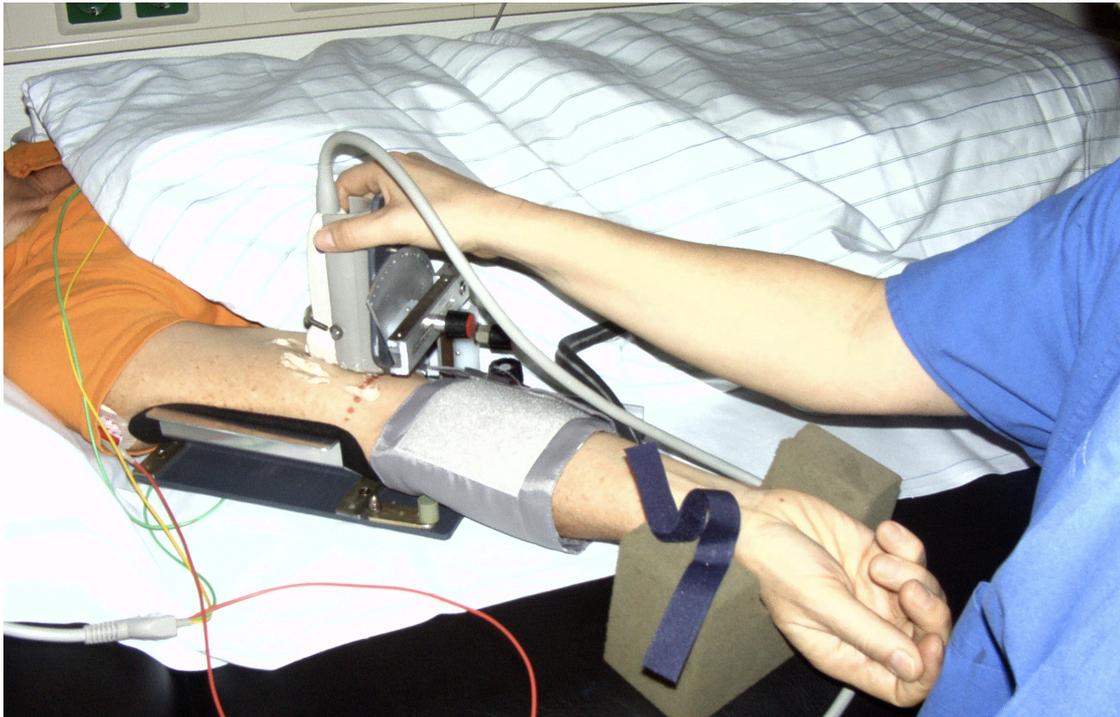


Abb. 1: Protokoll der Versuchsserie zur Überprüfung des Effekts von EGCG auf die Endothelfunktion von MS-Patienten, FMD = flow mediated dilation.

### 3.3.2 Ablauf der Endothelfunktionsmessung

Nach einer 20 - minütigen Ruhephase im Liegen wurde am linken Oberarm der Probanden eine Blutdruckmanschette angebracht, um ein Blutdruckmonitoring während der Messung zu gewährleisten. Für eine spätere R-Zacken getriggerte Auswertung wurde ein 3-Kanal-EKG abgeleitet, wobei die Ableitungen am Monitor des Ultraschallgeräts sichtbar waren. Somit konnten Lumenschwankungen der Arterie in Bezug zum Herzzyklus gesetzt werden. Es wurde eine erste Blutdruckmessung vorgenommen und parallel dazu die Herzfrequenz der Probanden ausgezählt und notiert. Zudem wurde am rechten Arm eine Staumanschette distal der Fossa cubitalis angelegt, die später auf suprasystolische Druckwerte aufgepumpt wurde.

Mit einem 13 MHz Schallkopf (Siemens Sonoline Antares) wurde die Art. brachialis im B-Mode zunächst im Querschnitt aufgesucht und dann der Schallkopf so eingestellt, dass die Arterie im Längsschnitt möglichst im gesamten Bildausschnitt dargestellt werden konnte. Circa drei Zentimeter proximal der Fossa cubitalis wurde eine Stelle bestimmt, wo sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand klar vom Lumen abgrenzbar waren und es keine größeren Kalibersprünge in direkter Umgebung dieser Stelle gab. Anschließend wurde der Bereich direkt um das Gefäß mit der Zoomfunktion maximal vergrößert und der Kontrast zwischen Arterienwand und Arterienlumen optimiert. Weder die Schallkopfposition noch die Geräteeinstellung wurden während der gesamten Untersuchung verändert. Um die Position über die Dauer der Messung zu halten, wurden der Unterarm der Probanden und der Schallkopf mittels einer Vorrichtung so fixiert, dass ein stabiles Bild während der gesamten Messphase gehalten werden konnte. Unsere Arbeitsgruppe konstruierte eine für diese Messung geeignete Schiene für den Unterarm der Probanden und mit einer Halterung für den Ultraschallkopf. Diese Apparatur ist in vier Ebenen verstellbar und fixiert den Schallkopf an exakt demselben Punkt über der Art. brachialis. Diese Versuchsanordnung ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2: Versuchsanordnung mit Schallkopf in der Halterung in Position über der Art. brachialis.**

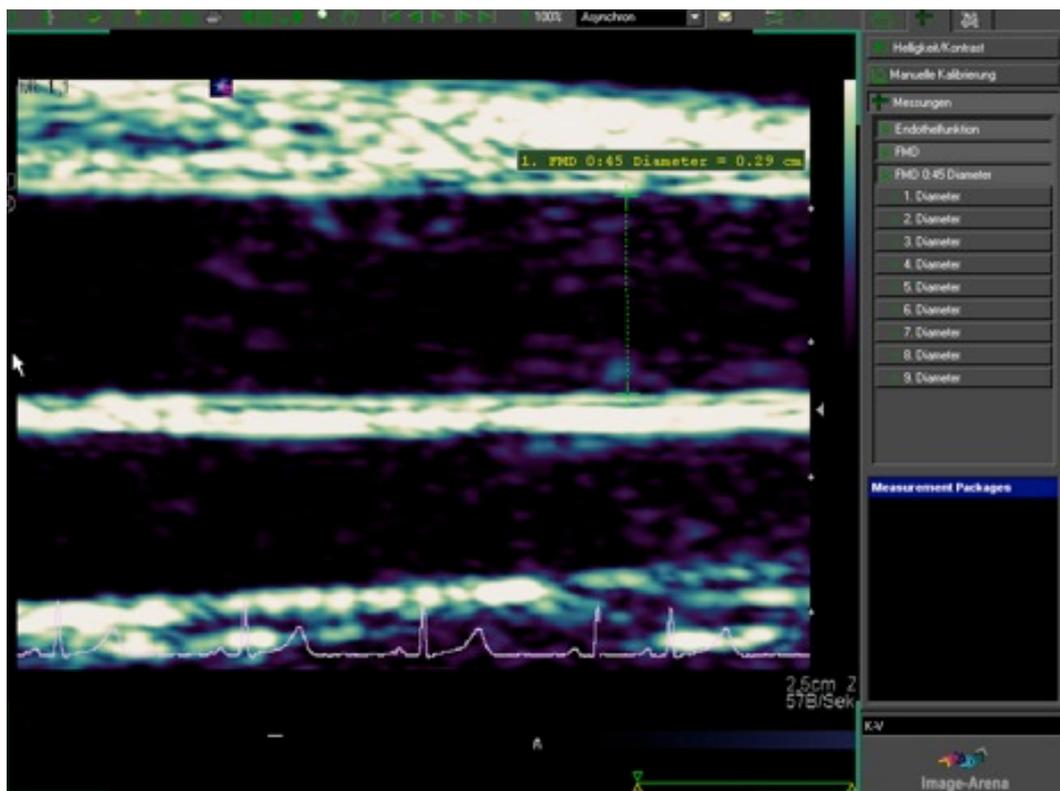
Die folgenden Schritte wurden bei jeder FMD-Untersuchung durchgeführt. Nach der Ruhephase erfolgten zunächst die Bestimmung des Ruhediameters und der Flussgeschwindigkeit mittels PW (pulsed wave) - Dopplers.

Anschließend wurde die endotheliale Funktion mittels scherkraftabhängiger Vasodilatation (FMD) der Art. brachialis nach reaktiver Hyperämie bestimmt. Dafür wurde die am proximalen rechten Unterarm lokalisierte Staumanschette für fünf Minuten auf suprasystolische (240 mmHg) Druckwerte aufgepumpt. Unmittelbar nach Ablassen der Manschette wurde dopplersonographisch die maximale Fließgeschwindigkeit und damit die induzierte Strömungszunahme während der reaktiven Hyperämie bestimmt sowie alle 15 Sekunden nach Ablassen der Durchmesser der Art. brachialis über die Dauer von drei Minuten aufgenommen, entsprechend den anerkannten Richtlinien für diese Methode (Corretti et al., 2002, Thijssen et al., 2011). Nach jeder FMD - Messung erfolgte eine erneute 10-minütige Ruhephase mit anschließender Bestimmung der Fließgeschwindigkeit und des Durchmessers der Art. brachialis. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der „Nitro-mediated Dilation“ (NMD). Es wurden 400 µg Glyceroltrinitrol (Nitrolingual N-Spray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG) per Aerosol sublingual appliziert und anschließend wurde der Durchmesser der Art. brachialis über

die Dauer von weiteren fünf Minuten alle 15 Sekunden aufgenommen. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden Blutdruck und Herzfrequenz gemessen und notiert.

### 3.3.3 Analyse des Durchmessers der Arteria brachialis

Die Durchmesserbestimmung der Art. brachialis erfolgte verblindet anhand von Längsschnitten des Gefäßlumens. Die bei der FMD-Untersuchung aufgenommenen Bildschleifen wurden digital gespeichert und der Transfer der Daten vom Ultraschallgerät auf den Computer erfolgte mit Hilfe einer CD-Rom. Die Bildschleifen wurden anschließend in das Auswertungsprogramm Tom Tec Imaging Systems importiert und damit analysiert. Ein Beispiel einer Diameterbestimmung ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Darstellung der A. brachialis mittels eines 13 MHz Linearschallkopfs. Diameterbestimmung zum Zeitpunkt 45 s nach Lösen der Staumanschette.

Die Diameterbestimmung erfolgte manuell jeweils enddiastolisch koizident mit der R-Zacke des EKGs, um den Fehlereinfluss herzyklusbedingter Lumenschwankungen zu reduzieren. Jede Bildersequenz bestand aus 3-4 Herzzyklen. Es wurden je neun

Diameter zu drei verschiedenen Herzzyklen ausgemessen und zu einer Diameterbestimmung gemittelt. Als Eckpunkt der Diametermessungen diente der lumennahe Rand der Gefäßintima. Zur Diameterbestimmung wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen und der schallkopffernen Intimabegrenzung im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt. Sowohl die flussvermittelte endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Vasodilatation werden als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter (=100 %) angegeben. Die Diametermessung selbst erfolgte nach den Kriterien von Wendelhag et al. nach dem sog. leading-edge-Prinzip (Wendelhag et al., 1991) mittels der Software von Tom Tec Imaging Systems.

### **3.4 Blutuntersuchungen**

#### **3.4.1 Blutabnahme**

Bei jedem Studienbesuch erfolgten je zwei Blutentnahmen zur Bestimmung der

- EGCG-Plasmakonzentrationen
- Relevanten Routineparameter (Gesamtcholesterin, Low Density Lipoprotein (LDL), High Density Lipoprotein (HDL), Lipoprotein (a), Triglyzeride, Glykohämoglobin (HbA<sub>1c</sub>), Homocystein (Hcys) und C-reaktives Protein (CRP))

Bei jedem Studienbesuch erfolgten die Blutentnahmen nach der ersten und unmittelbar vor der zweiten Endothelfunktionsmessung. Die zweite Abnahme erfolgte ca. 1,5 Stunden nach Kapseleinnahme.

#### **3.4.2 Probengewinnung**

Die Punktion einer peripheren Vene an der kontralateralen Seite der Messseite erfolgte mittels Vacoutainer-System (Vacoutainer Blood Collecting Systems). Es wurden zwei mal 6 ml Blut in EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Monovetten für die EGCG-Bestimmung abgenommen und 2 ml EDTA- und 6 ml Heparinblut für die Bestimmung der Routineparameter.

Das EDTA-Blut für die EGCG-Bestimmung wurde anschließend bei 3500 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 2 ml EDTA-Plasma, portioniert in 1,5er Eppendorfgefäße, abpipettiert, mit 1 ml Ascorbinsäure zur Stabilisierung versehen und bei – 80°C schockgefroren.

#### **3.4.3 Bestimmung der Routineparameter**

Im Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité wurden Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Lipoprotein (a), Triglyzeride, HbA<sub>1c</sub>, Hcys und CRP unmittelbar nach der Abnahme bestimmt.

#### **3.4.4 Bestimmung der EGCG-Plasmakonzentration**

Die Bestimmung der EGCG-Plasmaspiegel erfolgte durch die Firma Pharmacelus GmbH in Saarbrücken mittels HPLC Analyse (engl. *high performance liquid chromatography*).

### 3.5 Vasodilatation an isolierten Aortenringen der Maus

#### 3.5.1 Tiere

Die Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen. Es wurden männliche, 6-8 Wochen alte Black 6 eNOS-knockout-Mäuse (eNOS<sup>-/-</sup>) vom Stamm B6.129P2-*Nos3<sup>tm1Unc</sup>/J* und als Kontrollen Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6 mit funktioneller eNOS-Expression verwendet. Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit dem europäischen und deutschen Gesetz zum Gebrauch von Labortieren unter Standardstallbedingungen gehalten und standardisiert mit Pellets und Leitungswasser ad libitum ernährt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité CCM, Tucholskystrasse 2, 10117 Berlin und die Tötung von gentechnisch veränderten Tieren zur Organentnahme wurde vom Landesamt für Soziales, Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer T0026/05).

#### 3.5.2 Präparation der Gefäßringe

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 0,3 g/kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal). Nach Desinfektion des Fells mit 70 %-igem Ethanol wurden Thorax und oberes Abdomen mit Schere und Pinzette eröffnet und die Oberbauchorgane sowie die Lungen entnommen. Die Aorta ascendens wurde proximal durchtrennt und das Herz herausgelöst. Die Aorta thoracalis wurde mit 4°C kalter, modifizierter Krebs-Henseleit Lösung (in mmol/L: NaCl 144, KCl 5.9, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucose 11.1) und Diclofenac 1 µmol/L gespült und intraluminale Blutreste entfernt. Anschließend wurde sie mittels einer feinen Präparationsschere vorsichtig herausgelöst und in eine Kulturschale mit 4°C kalter modifizierter Krebs-Henseleit Lösung gelegt.

Unter einem Präparationsmikroskop erfolgte die weitere Präparation der Aorta. Zunächst wurde die Aorta nochmals vorsichtig mit kalter modifizierter Krebs-Henseleit Lösung durchgespült um restliche Blutreste zu entfernen. Anschließend wurde das Gefäß an seinen beiden Enden auf einer silikonbeschichteten Petrischale mit feinen Insulin-Kanülen fixiert und vollständig von Bindegewebe und Fett mittels Mikrofederschere und Pinzette befreit. Dann wurde die Aorta in 1 mm breite Ringe

geschnitten, wobei nur intakte Gefäßabschnitte verwendet wurden. Aus einer Aorta thoracalis konnten durchschnittlich 14 Gefäßringe gewonnen werden.

Direkt im Anschluss wurden zunächst sechs Gefäßringe jedes Genotyps an Platinhaken in Organbäder aufgehängt, wo anschließend die Experimente stattfanden.

### 3.5.3 Versuchsanordnung zur Testung der Vasoreaktivität der Gefäßringe

Bei allen Experimenten wurden Kraftänderungen bei konstantem Gefäßdurchmesser registriert. Die Messungen an den Aortenringen wurden an zwei Messplätzen für je sechs Gefäßringe durchgeführt (siehe Abbildung 4). Mit den vorhandenen Messplätzen konnten 12 isolierte Aortenringe zeitgleich untersucht werden. Konzeption und Bau der Messanlage erfolgten durch Dipl. Ing. Thomas Düsterhöft und Johannes Hundertmark (Mitarbeiter des Kardiologischen Forschungslabors der Klinik für Kardiologie der Charité).



**Abb. 4.: Messanlage für Aortenringe im kardiologischen Forschungslabor (abgebildet sind 6 von 12 Messplätzen).**

Die einzelnen Aortenringe der präparierten Mäuse (Wildtyp und eNOS-knockout) wurden an Platinhaken in einem Organbad, gefüllt mit 10 ml modifizierter Krebs-Henseleit Lösung, vorsichtig eingehängt. Es erfolgte eine kontinuierliche Begasung der Lösung mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) um einen konstanten pH-Wert von 7,4 aufrechtzuerhalten. Ein doppelwandiges Glas (Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich) umgibt das Organbad, welches an einer Dreifingerklemme im Messplatzgerüst (Spezialanfertigung Gemmel Metalle) befestigt ist. Der untere Platinhaken ist unbeweglich am Boden des Organbads eingehängt und der obere ist mit einem Kontraktionskraftaufnehmer (FMI TIM-1020 isometrischer Transducer, Messbereich +/-30g, Föhr Medical Instruments GmbH) mit Feinpositionierelement (Vernier Control Type 850 N, Hugo Sachs Elektronik) verbunden. Über dieses Feinpositionierelement kann die Spannung des Rings exakt eingestellt werden. Die Kraftsignale an den Kontraktionsaufnehmern wurden über einen Messverstärker digitalisiert und als kontinuierliche Kurven auf einem Computerbildschirm mit Hilfe der Software Labview (National Instruments) dargestellt und aufgezeichnet. Um in den Organbädern eine konstante Temperatur von 38°C (entsprechend der Körpertemperatur einer Maus) zu gewährleisten, wurden die Organbäder zwischen den beiden Glaswänden von 38°C warmem Wasser umspült. Kunststoffschläuche sind an die Organbäder angeschlossen und verbinden die in Reihe geschalteten äußeren Hohlräume der Gefäße. So konnte ein Heizkreislauf gebildet werden, der durch einen Umwälzthermostat mit Warmwasserbad geschlossen wird. Gespeist wurden die Bäder aus einem erwärmten und mit Carbogen begasten Vorratsbehälter.

Nach Einhängen der Ringe in das Organbad wurden diese auf 1 g (entspricht der physiologischen Spannung bei Mäusen *in vivo*) vorgespannt. Nach 10-minütiger Äquilibration wurden die Ringe noch einmal auf exakt 1 g eingestellt. Anschließend wurde durch Zugabe von Kaliumchlorid (KCl, 40 mM) die Kontraktionsfähigkeit der Ringe getestet. Funktionsuntüchtige Ringe wurden gegen andere Ringe ausgetauscht. Nach 5 min wurden die Ringe zweimal mit modifizierter Krebs-Henseleit Lösung ausgewaschen. Alle Ringe wurden nochmals auf 1 g vorgespannt. Die Feineinstellung erfolgte über die an den Kraftaufnehmern befindlichen Reglern.

Nach 20 Minuten wurden die Ringe mit dem  $\alpha_1$ -Rezeptoragonisten Phenylephrin (50 nM) vorkontrahiert. Aus zuvor durchgeführten Messreihen konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration eine 80 %ige Vorkontraktion gewährleistet ist.

Es wurde nun kumulativ EGCG (Sigma Aldrich, gelöst in Wasser) in steigender Konzentration im 30-minütigen Intervall zu den Ringen gegeben. Das Konzentrationsspektrum erstreckte sich über einen Bereich von 5  $\mu$ M bis zu 15  $\mu$ M. Die Kontrolle erfolgte durch die Mitführung von Ringen ohne Substanzzugabe in das Organbad. Zusätzlich wurde die Vasoreaktion der Aortenringe durch Zugabe kumulativer Dosen (10 nM bis 5  $\mu$ M) des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin getestet. Nach einer Auswaschphase und einer erneuten Kontraktion mit Phenylephrin erfolgte die Bestimmung der endothelunabhängigen Vasodilatation und somit Überprüfung der Intaktheit der glatten Muskelzellschicht durch Zugabe von Natrium-Nitroprussid (SNP 0,1 – 100 nM). Die Vasodilatation wird angegeben als Prozent der Vorkontraktion durch Phenylephrin. Die Ergebnisse entstanden durch Verwendung von jeweils 16 Aortenringen. Für alle Experimente wurden pro Gruppe 8 verschiedene Tiere verwendet.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die probandenbezogenen Daten wurden in Excel Dateien eingegeben und anonymisiert gespeichert. Die FMDmax (%) wurde als prozentuale Zunahme im Vergleich zum Basisdiameter erfasst, wobei der Basisdurchmesser der Durchmesser der Art. brachialis vor einer Stimulation ist. Die mittlere FMDmax (%) einer Gruppe entspricht des errechneten Mittelwerts aller einzelnen FMDmax (%) -Werte. Die mittlere Veränderung der FMD pro Gruppe ist die Differenz zwischen der mittleren FMDmax (%) vor und nach der Intervention. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 21 und SigmaStat Version 3. Für die Gruppenvergleiche wurden t-Tests (bei stetigen Variablen) und Fishers exakter Test (bei nominalen Größen) verwendet. Die Unterschiede der FMDmax (%) zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurden mit dem Wilcoxon Vorzeichen-Rangtest für verbundene Stichproben auf Signifikanz getestet. Der Korrelationskoeffizient wurde nach Pearson berechnet. Auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Test geprüft. Beim in-vitro Aortenringexperiment wurde die Signifikanz mit einfaktorieller ANOVA mit anschließenden paarweisen Vergleichen

berechnet. Für paarweise Vergleiche von Medianwerten wurde der Student-Newmann-Keuls-Test verwandt und der Bonferroni t-Test beim Vergleich von Mittelwerten. Als Signifikanzniveau wurde bei allen Tests  $p \leq 0,05$  gewählt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden im Fließtext die Ergebnisse als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) und in den Abbildungen als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die flussvermittelte Vasodilatation der Arteria brachialis wurde an 37 Patienten mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose gemessen. 14 Patienten wurden durch die Cecilie-Vogt-Klinik für Molekulare Neurologie in den EGCG-Arm, 23 Patienten in den Placeboarm verblindet randomisiert. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Bildakquisition konnten insgesamt vier Messungen im Studienverlauf nicht ausgewertet werden. Sechs Patienten im Placebo- und zwei Patienten im EGCG-arm brachen die Studie vorzeitig aufgrund von Termenschwierigkeiten ab. Eine Übersicht der durchgeführten Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigt Abbildung 5.

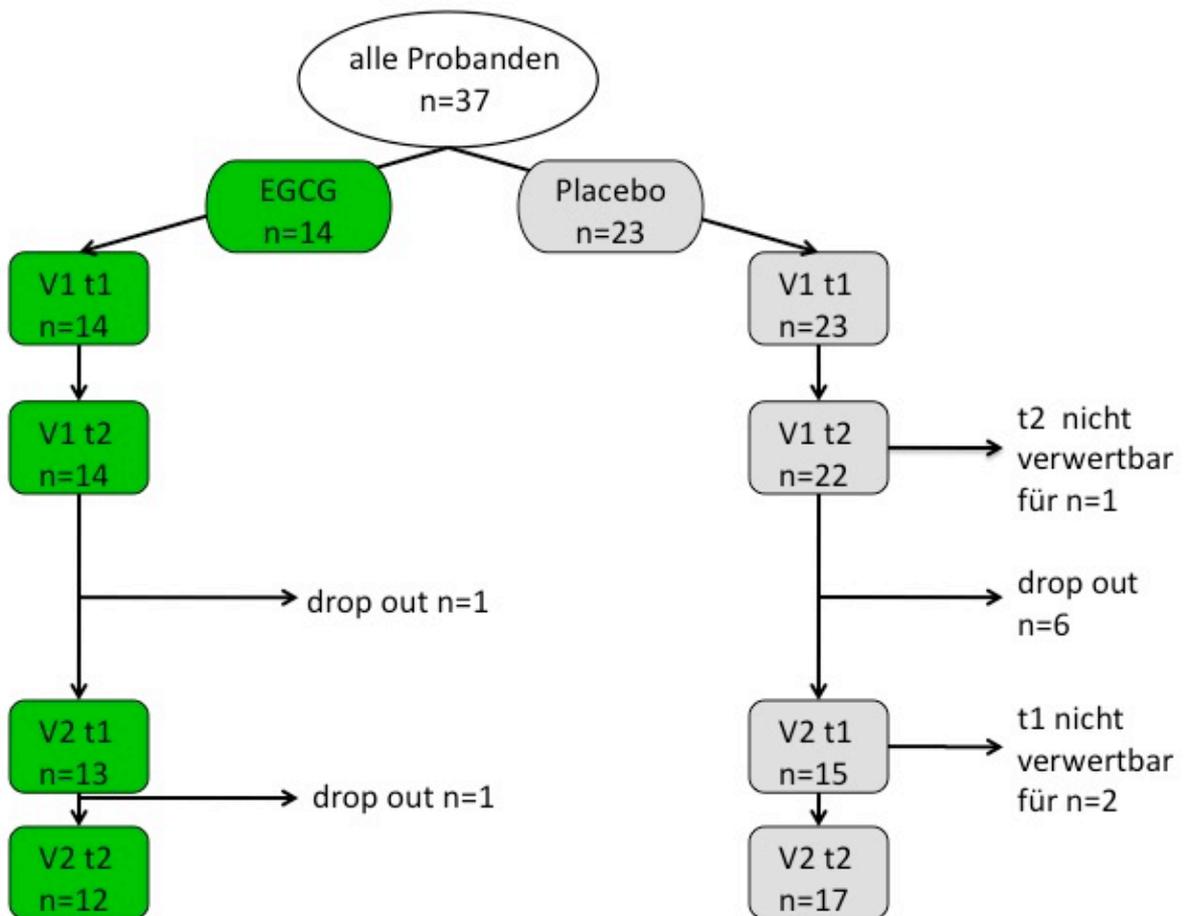


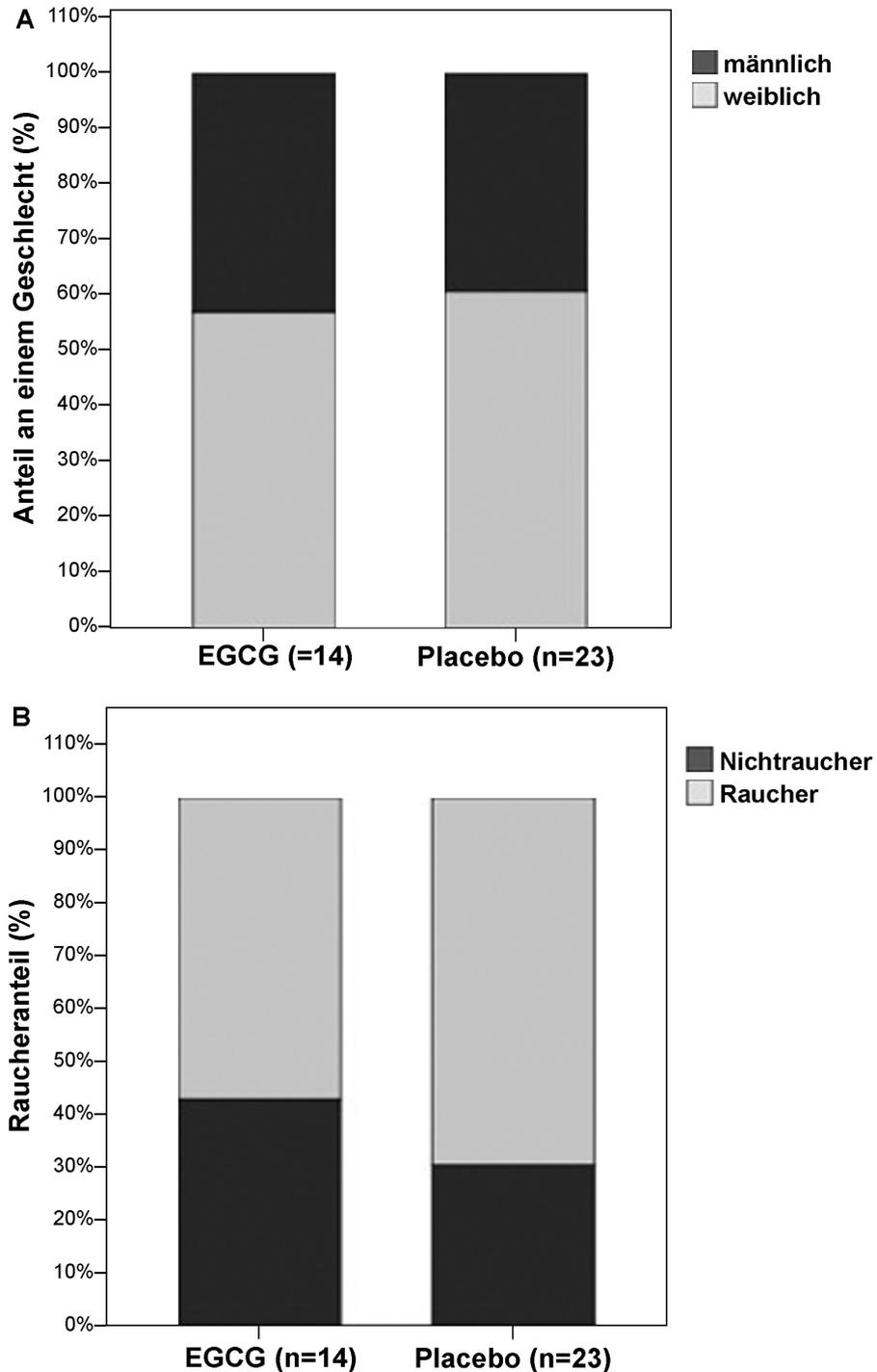
Abb. 5: Patientenverteilung in beiden Gruppen. Übersicht über vorzeitige Studienabbrüche (drop out) bzw. nicht verwertbare Messungen

Der Altersdurchschnitt lag in der Verum- bzw. Placebo-Gruppe bei 36,3 bzw. 41,6 Jahren. In der Verumgruppe waren 42,9 % der Probanden männlich und in der Placebogruppe 39,1 % (Darstellung in Abbildung 6A). 42,9 % waren in der Verumgruppe zum Zeitpunkt der Studie aktive Raucher und 30,4 % in der Placebogruppe (Darstellung in Abbildung 6B). Einen Überblick über alle erhobenen Gruppencharakteristika gibt Tabelle 1. Alle aufgeführten Gruppencharakteristika ergaben keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) zwischen den beiden Gruppen.

**Tabelle 1: Gruppencharakteristika**

	EGCG (n=14)	Placebo (n=23)	p-Wert
Alter [Jahre]	36,3 ± 10,9	41,6 ± 8,1	0,098
männlich [%]	42,9 (n=6)	39,1 (n=9)	0,999
Größe [cm]	176,3 ± 8,0	173,2 ± 9,7	0,320
Gewicht [Kg]	84,8 ± 19,9	77,6 ± 19,1	0,285
BMI [Kg/m <sup>2</sup> ]	27,3 ± 5,4	25,5 ± 4,5	0,266
RR systolisch [mmHg]	119,1 ± 14,5	119,5 ± 13,9	0,937
RR diastolisch [mmHg]	69,0 ± 9,4	72,9 ± 9,4	0,234
Raucher [%]	42,9 (n=6)	30,4 (n=7)	0,495
Packyears [Jahre]	12,8 ± 10,2	20,1 ± 11,8	0,245

dargestellt in MW ± SD



**Abb. 6: Geschlechterverteilung (A) und prozentualer Raucheranteil (B) in den Gruppen**

Bezüglich der Blutwerte zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede ( $p > 0,05$ ). Die einzelnen Parameter sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Basalwerte vor Beginn der Untersuchungen**

	EGCG (n=14)	Placebo (n=23)	p-Wert
Cholesterin [mg/dl]	190,4 ± 37,3	191,9 ± 43,6	0,919
LDL [mg/dl]	111,1 ± 34,8	116,4 ± 27,6	0,610
HDL [mg/dl]	56,6 ± 19,1	51,3 ± 15,1	0,356
TG [mg/dl]	98,9 ± 64,3	122,7 ± 101,7	0,439
Lp (a) [mg/dl]	11,9 ± 23,1	23,2 ± 31,0	0,245
HbA <sub>1c</sub> [%]	5,3 ± 0,3 (n=3*)	5,2 ± 0,3 (n=6*)	0,623
Hcys [µmol/l]	7,9 ± 1,4 (n=4*)	9,5 ± 3,9 (n=6*)	0,447
CRP [mg/dl]	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,8	0,738

dargestellt in MW ± SD

\* missing values

#### 4.2 EGCG-Aufnahme der Probanden

Nach Herstellerangaben enthält eine Kapsel Sunphenon® 200 mg EGCG. Nach der ersten Endothelfunktionsmessung wurde eine Kapsel Sunphenon® bzw. Placebo nach einer Nüchternphase von acht Stunden mit Wasser und zusammen mit einem Croissant eingenommen. In den folgenden drei Monaten wurden in der Verumgruppe täglich 400 mg EGCG (2 Kapseln Sunphenon®) zusammen mit den Mahlzeiten morgens und abends aufgenommen. Beim zweiten Studienbesuch nach drei Monaten erfolgte die EGCG-Einnahme analog zum ersten Studienbesuch nach der ersten Endothelfunktionsmessung. Es wurden entsprechend einer Dosisverdoppelung zur Evaluierung des add-on Effekts (akut auf chronisch) zwei Kapseln (=400 mg EGCG) eingenommen.

#### 4.3 EGCG-Gehalt im Plasma

Blutentnahmen für die Messung der EGCG-Konzentrationen im Plasma erfolgten zu vier Zeitpunkten. Beim ersten Studienbesuch (V1) nach der ersten FMD-Messung (=basal) und ca. 1,5 Stunden nach Einnahme von 200 mg EGCG. Analog beim zweiten Studienbesuch (V2) ebenfalls nach der ersten FMD-Messung und ein zweites Mal ca. 1,5 Stunden nach Aufnahme von 400 mg EGCG.

Insgesamt kam es durch Akutgabe von EGCG bei beiden Studienterminen zum signifikanten Anstieg der EGCG-Plasmakonzentration nach Akutgabe von 200 mg bzw. 400 mg EGCG (V1t2 vs. V1t1  $p=0,001$  und V2t2 vs. V2t1  $p=0,008$ ). In der Placebogruppe konnte kein EGCG im Plasma nachgewiesen werden. Nach chronischer Einnahme und nach einer Einnahmepause von 8 Stunden vor der Plasma-EGCG-Bestimmung konnten keine erhöhten EGCG-Plasmakonzentrationen gemessen werden. Ein einzelner erhöhter Wert ist auf eine Fehleinnahme zurückzuführen und wurde in den folgenden Analysen nicht miteinberechnet. Vor Beginn der Messserie und der ersten EGCG-Gabe konnte weder bei Verum noch bei Placebo EGCG im Plasma nachgewiesen werden. Nach 200 mg EGCG einmalig lag die mittlere EGCG-Plasmakonzentration bei  $76,0 \pm 56,4$  ng/ml. Nach Einnahme von 400 mg EGCG am Messtag zusätzlich zur chronischen Einnahme lag die EGCG-Plasmakonzentration nach 1,5 Stunden bei  $86,1 \pm 73,6$  ng/ml (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Plasma-EGCG in ng/ml**

	EGCG ng/ml	n
<b>V1 t1</b>	0	14
<b>V1 t2</b>	$76,0 \pm 59,4$	14
<b>V2 t1</b>	0	10
<b>V2 t2</b>	$86,1 \pm 73,6$	11*

dargestellt in MW  $\pm$  SD

\*1 missing value

#### 4.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

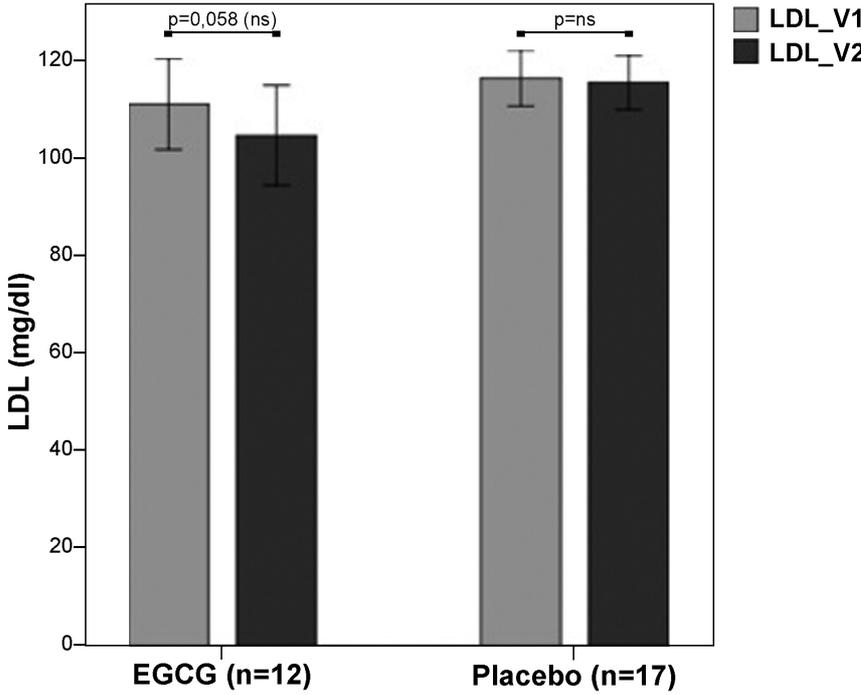
Die Messung der Blutwerte (Cholesterin, LDL, HDL, TG, Lp(a), Hcys, HbA<sub>1c</sub>, CRP) erfolgte an beiden Studienbesuchen. Die erste Messung bildet die basalen Werte vor Intervention ab und die zweite Messung die Werte nach 3 Monaten EGCG- bzw. Placeboeinnahme. Die Werte sind in Tabelle 4 dargestellt. Für die Gründe der unterschiedlichen n-Zahlen siehe Abbildung 5.

**Tabelle 4: Relevante Blutparameter zu Beginn = Visit 1 und nach 3 Monaten = Visit 2 für EGCG bzw. Placebo**

	Visit 1		Visit 2	
	EGCG (n=14)	Placebo (n=23)	EGCG (n=12)	Placebo (n=17)
Cholesterin [mg/dl]	190,4 ± 37,3	191,9 ± 43,6	186,3 ± 28,0	186,8 ± 35,8
LDL [mg/dl]	111,1 ± 34,8	116,4 ± 27,6	104,7 ± 35,5	115,5 ± 23,1
HDL [mg/dl]	56,6 ± 19,1	51,3 ± 15,1	56,4 ± 17,6	52,9 ± 17,6
TG [mg/dl]	98,9 ± 64,3	122,7 ± 101,7	108,6 ± 57,8	111,9 ± 48,2
Lp (a) [mg/dl]	11,9 ± 23,1	23,2 ± 31,0	5,8 ± 3,1	27,6 ± 44,5
HbA <sub>1c</sub> [%]	5,3 ± 0,3 (n=3*)	5,2 ± 0,3 (n=6*)	5,7 ± 0,6	5,2 ± 0,4
Hcys [µmol/l]	7,9 ± 1,4 (n=4*)	9,5 ± 3,9 (n=6*)	8,4 ± 2,4 (n=4*)	8,2 ± 3,7 (n=9*)
CRP [mg/dl]	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,8	0,4 ± 0,4	0,6 ± 1,3

\*missing values

Obwohl bei allen oben genannten Parametern keine signifikanten Unterschiede unter EGCG-Einnahme festgestellt wurden, zeigte sich ein Trend zur LDL-senkenden Wirkung durch EGCG. Nach dreimonatiger EGCG-Aufnahme von 400 mg täglich kam es zu einer Abnahme des LDL-Werts um  $6,4 \pm 12$  mg/dl (von  $111,1 \pm 34,8$  mg/dl auf  $104,7 \pm 35,5$  mg/dl),  $p=0,058$ . In der Placebogruppe blieb der LDL-Plasmawert nahezu unverändert (von  $116,4 \pm 27,6$  mg/dl auf  $115,5 \pm 23,1$  mg/dl). Abbildung 7 zeigt den Vergleich der LDL-Werte.



**Abb. 7: Veränderungen des LDL-Plasmawerts nach 3-monatiger EGCG-Einnahme (400 mg/d).** Darstellung der Mittelwerte ± SEM.

## 4.5 Endothelfunktionsmessung

### 4.5.1 Maximale endothelabhängige Vasodilatation, FMDmax (%)

Eine Übersicht der ermittelten Durchmesser und Werte der scherkraftvermittelten endothelabhängigen Vasodilatation (FMD) im Studienverlauf in der Verum- und Placebogruppe gibt Tabelle 5.

**Tabelle 5: Basale und maximale Durchmesser nach Scherkräfteinwirkung sowie FMD-Werte beider Gruppen zu den 4 Zeitpunkten**

		<b>EGCG</b>	<b>Placebo</b>
<b>Visit 1 t1</b>	Durchmesser basal [mm]	3,6 ± 0,7	3,4 ± 0,7
	Durchmesser max. [mm]	3,8 ± 0,7	3,5 ± 0,7
	FMDmax [%]	5,7 ± 2,7	6,0 ± 3,6
	n	14	23
<b>Visit 1 t2</b>	Durchmesser basal [mm]	3,7 ± 0,7	3,5 ± 0,7
	Durchmesser max. [mm]	3,9 ± 0,7	3,7 ± 0,7
	FMDmax [%]	5,9 ± 4,0	6,5 ± 4,4
	n	14	22
<b>Visit 2 t1</b>	Durchmesser basal [mm]	3,5 ± 0,7	3,5 ± 0,8
	Durchmesser max. [mm]	3,7 ± 0,6	3,7 ± 0,7
	FMDmax [%]	5,7 ± 2,5	6,9 ± 5,4
	n	13	15
<b>Visit 2 t2</b>	Durchmesser basal [mm]	3,7 ± 0,7	3,3 ± 0,8
	Durchmesser max. [mm]	3,9 ± 0,7	3,7 ± 0,8
	FMDmax [%]	6,0 ± 2,6	6,9 ± 4,5
	n	12	17

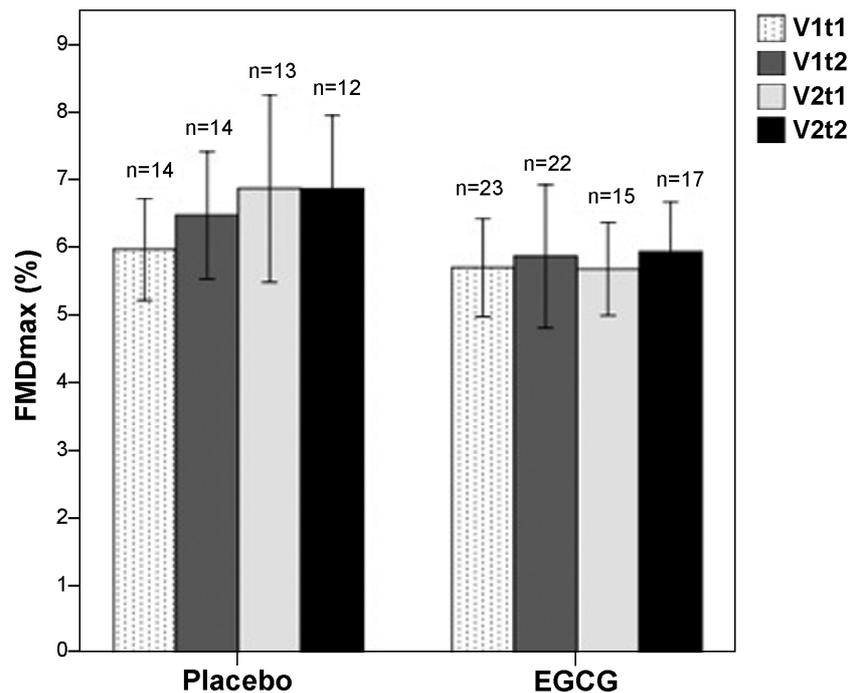
Angaben in MW ± SD

Zur Erläuterung der unterschiedlichen n-Zahlen siehe Abbildung 5

Die maximale Vasodilatation (FMDmax) bei EGCG lag in der Basismessung zu Beginn bei 5,7 %, in der Messung nach 200 mg EGCG bei 5,9 %, nach 3 Monaten (chronisch) bei 5,7 % und nach akuter Gabe von 400 mg EGCG als add on bei 6,0 %. Die entsprechenden Werte in der Placebogruppe lagen bei 6,0 % (Basismessung), 6,5 % (2 Stunden danach), 6,9 % (chronischer Effekt) und 6,9 % (akut auf chronisch).

Aufgrund unterschiedlicher Basaldurchmesser ergeben sich teilweise größere prozentuale FMDmax-Werte bei gleicher absoluter Zunahme des Gefäßdurchmessers. Durch Rundungsungenauigkeiten zeigen sich in einigen Fällen trotz scheinbar

identischem (auf eine Kommastelle) gerundetem Basaldurchmesser und identischem maximalem Durchmesser nach Shear Stress (Diameter max.) Unterschiede in der prozentualen FMD (FMDmax (%)). In Abbildung 8 sind die prozentualen Werte der FMDmax (%) zu allen vier Zeitpunkten für Verum und für Placebo dargestellt.



**Abb. 8:** Darstellung der FMDmax-Werte (%) zu den 4 gemessenen Zeitpunkten in der EGCG- und Placebogruppe, Darstellung in Mittelwerten  $\pm$  SEM,  $p=ns$

In keiner der beiden Gruppen kam es zu einer signifikanten Veränderung der FMDmax (%) im Studienverlauf (EGCG V1t2 vs. V1t1  $p=0,753$ ; V2t1 vs. V1t1  $p=0,754$ ; V2t2 vs. V2t1  $p=0,756$ ; Placebo V1t2 vs. V1t1  $p=0,463$ ; V2t1 vs. V1t1  $p=0,551$ ; V2t2 vs. V2t1  $p=0,552$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Test). Beim Vergleich der absoluten Durchmesserzunahme ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.5.2 Maximale endothelunabhängige Vasodilatation, NMDmax (%)

Nach jeder Messung der FMD erfolgte nach 10-minütiger Ruhephase eine NMD-Messung zur Evaluation der endothelunabhängigen Dilatation durch sublinguale Nitro-Gabe. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 6 dargestellt. Insgesamt zeigt sich in beiden Gruppen eine deutliche Vasodilatation durch die sublinguale Nitro-Gabe. Dies bezeugt die Fähigkeit zur NO-induzierten Vasodilatation der glatten Muskeln innerhalb der Arterienwand. Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich signifikante Unterschiede der prozentualen NMDmax-Werte im Studienverlauf ( $p > 0,05$ ). Die Unterschiede in den Anzahlen (n) in Tabelle 6 sind bedingt durch zwei nicht verwendbare NMD-Messungen zu V1 t2 und zu V2 t2, jeweils bei Placebo.

**Tabelle 6: NMD-Werte beider Gruppen zu den angegebenen 4 Zeitpunkten**

		<b>EGCG</b>	<b>Placebo</b>
<b>Visit 1 t1</b>	Durchmesser basal [mm]	3,7 ± 0,7	3,4 ± 0,7
	Durchmesser max. [mm]	4,5 ± 0,7	4,2 ± 0,7
	NMDmax [%]	23,2 ± 7,9	24,0 ± 8,1
	n	14	23
<b>Visit 1 t2</b>	Durchmesser basal [mm]	3,8 ± 0,7	3,6 ± 0,7
	Durchmesser max. [mm]	4,5 ± 0,7	4,3 ± 0,8
	NMDmax [%]	20,9 ± 4,0	21,4 ± 5,3
	n	14	21
<b>Visit 2 t1</b>	Durchmesser basal [mm]	3,5 ± 0,6	3,5 ± 0,8
	Durchmesser max. [mm]	4,4 ± 0,7	4,3 ± 0,9
	NMDmax [%]	25,6 ± 7,1	25,6 ± 5,8
	n	13	15
<b>Visit 2 t2</b>	Durchmesser basal [mm]	3,8 ± 0,7	3,4 ± 0,9
	Durchmesser max. [mm]	4,6 ± 0,7	4,2 ± 0,9
	NMDmax [%]	21,9 ± 5,8	22,1 ± 6,4
	n	12	17

Angaben in MW ± SD

Zur Erläuterung der unterschiedlichen n-Zahlen siehe Abbildung 5

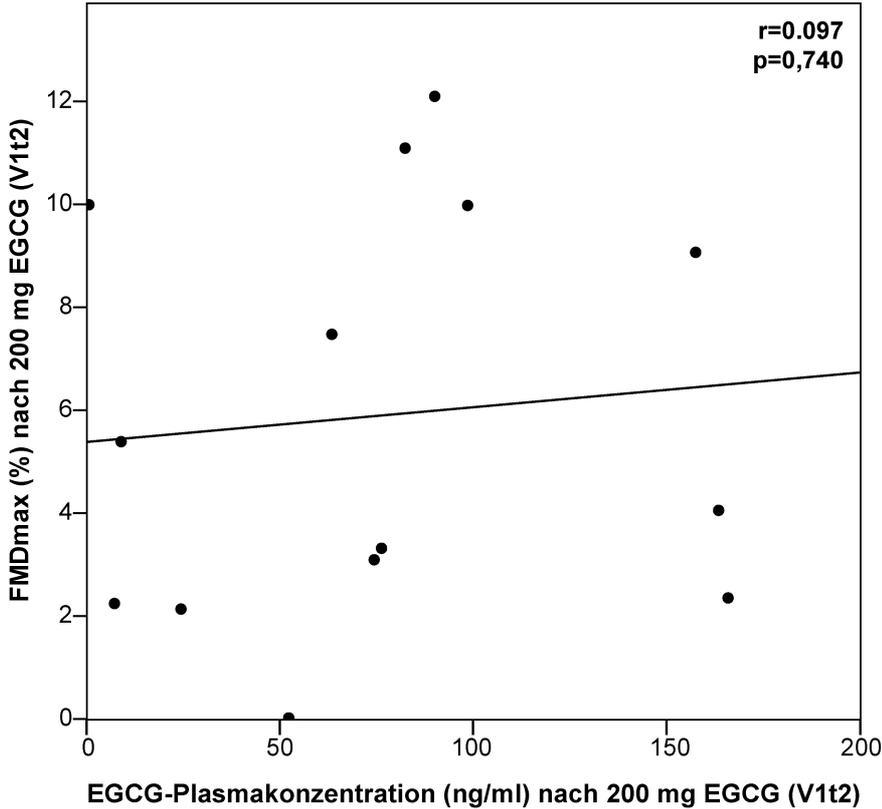
#### 4.6 Korrelation der EGCG-Plasmaspiegel mit der FMD (%)

Die EGCG-Plasmakonzentrationen korrelierten nicht signifikant mit den ermittelten Werten der FMDmax (%) nach akuter EGCG-Gabe, dargestellt in Tabelle 7 und in den Abbildungen 9 (200 mg akut) und 10 (400 mg akut). Damit ergab sich kein Zusammenhang zwischen hoher EGCG-Plasmakonzentration einiger Studienteilnehmer und gemessener FMD.

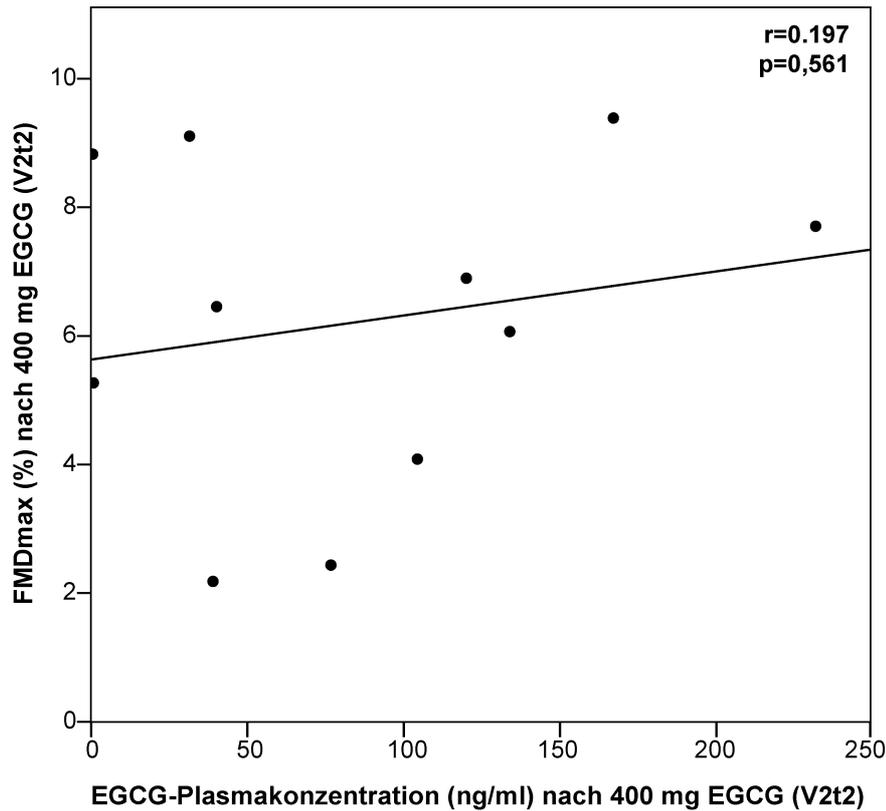
**Tabelle 7: Korrelation der FMDmax (%) und der EGCG-Plasmakonzentration an beiden Studienterminen nach akuter EGCG-Gabe**

		FMDmax (%)
EGCG V1 t2 [ng/ml]	Korrelation nach Pearson (r)	0.097
	Signifikanz 2-seitig (p)	0,740
		n=14
EGCG V2 t2 [ng/ml]	Korrelation nach Pearson (r)	0.197
	Signifikanz 2-seitig (p)	0,561
		n=11*

\*1 missing value



**Abb. 9: Korrelation von EGCG-Plasmakonzentrationen mit der Endothelfunktion (FMDmax (%) V1 t2) beim ersten Studientermin nach Akutgabe von 200 mg EGCG, (n=14)**



**Abb. 10: Korrelation von EGCG-Plasmakonzentrationen mit der Endothelfunktion (FMDmax (%) V2 t2) beim zweiten Studientermin nach 400 mg EGCG Akuteinnahme als add on, (n=11)**

#### **4.7 Endothelfunktion bei Multipler Sklerose im Vergleich zu Gesunden**

Im Rahmen des unter 2.3.1 beschriebenen Studiendesign beschreibt die erste FMD-Messung (FMDmax V1 t1) beider Gruppen (Verum und Placebo) die basale Endothelfunktion der MS-Patienten, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Interventionsmaßnahme durchgeführt wurde. Der mittlere FMD-Wert zum Zeitpunkt V1t1 der männlichen Nichtraucher unter den MS-Patienten (n=13) wurde mit der mittleren FMD von gesunden männlichen Nichtrauchern (n=18) verglichen. Bezüglich der in der Tabelle 8 aufgeführten Gruppencharakteristika ergeben sich bis auf einen niedrigeren BMI bei der gesunden Gruppe keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede. Die mittlere FMD beträgt  $4,1 \pm 3,5$  % (n=13) bei MS und in der entsprechenden gesunden Vergleichsgruppe  $4,5 \pm 1,9$  % (n=18). Wir konnten in unserer

Untersuchung keine statistisch signifikante Einschränkung der Endothelfunktion bei MS zeigen ( $p=0,67$ ).

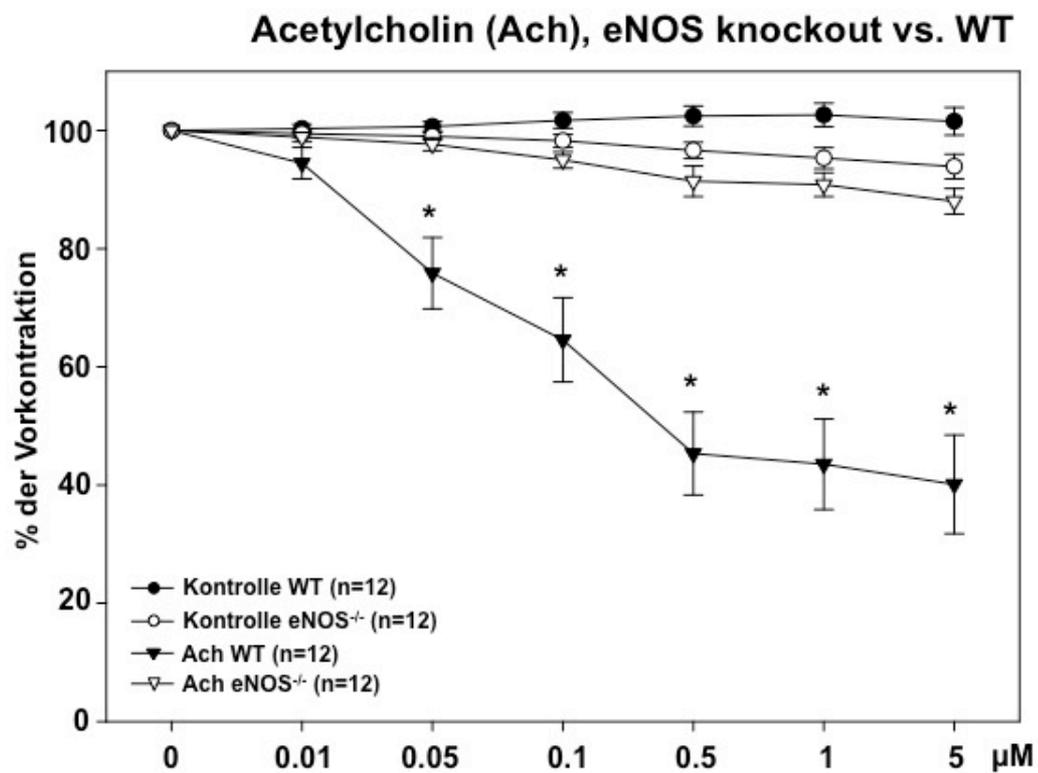
**Tabelle 8: Vergleich der Gruppencharakteristika und der FMD zwischen MS und gesund**

	<b>MS (n=13)</b>	<b>Gesund (n=18)</b>	<b>p-Wert</b>
Alter [Jahre]	33,2 ± 7,3	34,8 ± 9,8	0,62
BMI [Kg/m <sup>2</sup> ]	26,5 ± 5,4	23,1 ± 2,2	0,02*
RRsyst. [mmHg]	124,3 ± 12,6	119,6 ± 13,0	0,32
RRdiast. [mmHg]	70,5 ± 8,2	69,9 ± 5,0	0,81
Cholesterin [mg/dl]	187,2 ± 29,2	174,1 ± 24,7	0,69
LDL [mg/dl]	108,7 ± 20,8	105,0 ± 20,8	0,63
HDL [mg/dl]	45,7 ± 8,5	51,4 ± 11,2	0,14
TG [mg/dl]	107,4 ± 55,5	82,7 ± 42,3	0,18
Lp (a) [mg/dl]	24,5 ± 38,2	19,6 ± 20,9	0,66
HbA1 <sub>c</sub> [%]	5,1 ± 0,4	5,2 ± 1,0	0,21
Hcys [µmol/l]	7,3 ± 5,7	9,9 ± 2,8	0,12
CRP [mg/dl]	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,08
<b>FMDmax [%]</b>	<b>4,1 ± 3,5</b>	<b>4,5 ± 1,9</b>	<b>0,67</b>

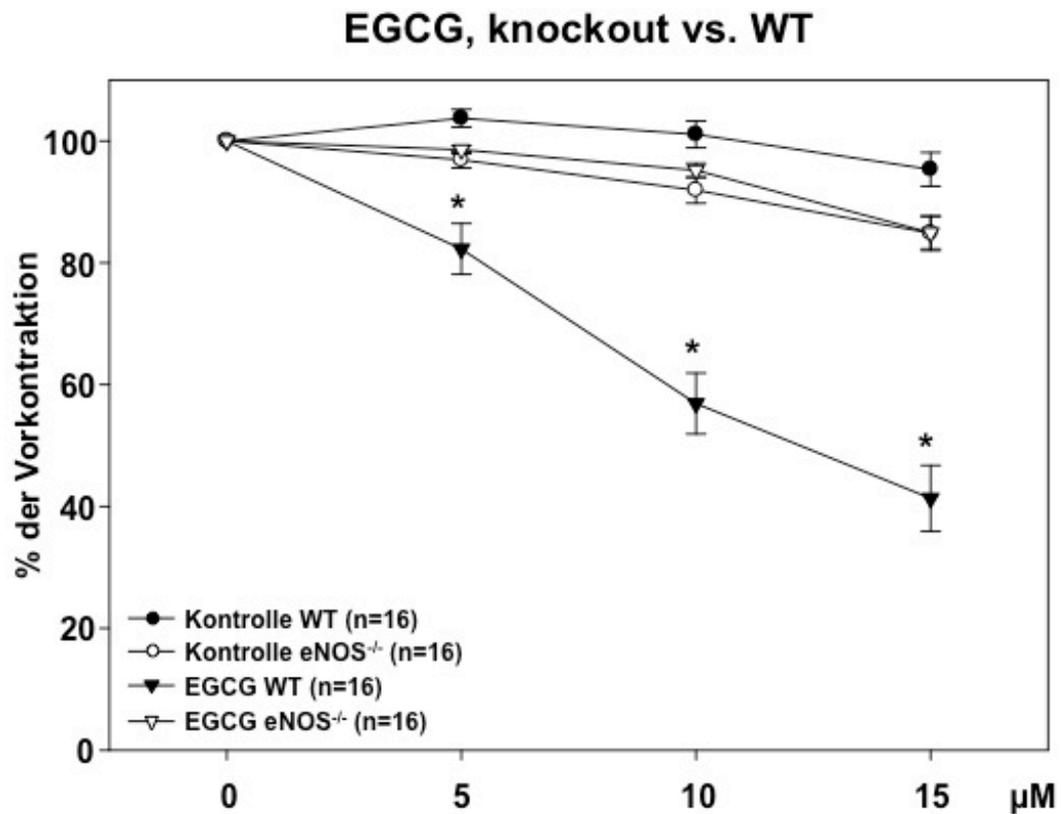
#### 4.8 Ex-vivo Vasodilatation von EGCG an isolierten Gefäßringen

Es wurden jeweils 16 Gefäßringe von 8 Tieren aus den Aorten von Wildtyp- und der eNOS-knockout-Mäuse für die Vasodilatationsexperimente verwandt. Zur Bestätigung der Versuchsanordnung untersuchten wir zunächst die Vasoreaktivität der Gefäßringe für den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin. Eine endothelabhängige Vasodilatation der eNOS<sup>-/-</sup>-Aortenringe blieb komplett aus (Abbildung 11). Als nächstes wurde EGCG in kumulativen Dosen alle 30 Minuten zu den Phenylephrin-vorkontrahierten Aortenringen gegeben. Unter kumulativer EGCG-Gabe mit einem Konzentrationsspektrum von 5 µM bis 15 µM zeigte sich eine signifikante Vasodilatation im Wildtyp ( $p<0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Substanzzugabe). Dagegen blieb eine Vasodilatation durch EGCG bei den Aortenringen der eNOS-knockout-Mäuse vollständig aus. 5 µM EGCG führte zur Vasorelaxation von 82 % gegenüber der

Vorkontraktion (=100 %), 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  bewirkten eine 57 % bzw. 41 % Vasorelaxation im Wildtyp (Abbildung 12). Die Fähigkeit zur endothelunabhängigen Vasoreaktivität der  $\text{eNOS}^{-/-}$ -Gefäßringe durch Wirkung auf die glatte Muskelschicht wurde durch Zugabe des NO-Donors SNP (Natrium-Nitroprussid) überprüft. Wir zeigten, dass es keine Einschränkungen in der NO-induzierten Vasodilatation durch SNP bei den  $\text{eNOS}^{-/-}$ -Gefäßringen im Vergleich zum Wildtyp gab und bezeugten damit die Intaktheit der Muskelschicht in den Ringen der  $\text{eNOS}^{-/-}$ -Gefäßringen (Abbildung 13).



**Abb. 11: Acetylcholin-induzierte Vasodilatation bei Wildtyp (WT)- und eNOS-knockout ( $\text{eNOS}^{-/-}$ )-Mäusen.** Die Vasodilatation ist ausgedrückt als Prozent der maximalen Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion. Kontroll-Ringe erhielten keine Substanzzugabe. Die Daten sind in  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  der angegebenen Anzahl der Experimente ausgedrückt. \*  $p \leq 0,05$  Ach WT vs Ach  $\text{eNOS}^{-/-}$



**Abb. 12: Zugabe kumulativer Dosen von EGCG bei phenylephrin-vorkontrahierten Aortenringen der eNOS<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen.** Die Vasodilatation ist ausgedrückt als Prozent der maximalen Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion. Kontroll-Ringe erhielten keine Substanzzugabe. Angaben in MW ± SEM der angegebenen Anzahl durchgeführter Experimente. \*  $p \leq 0,05$  EGCG WT vs. EGCG eNOS<sup>-/-</sup>

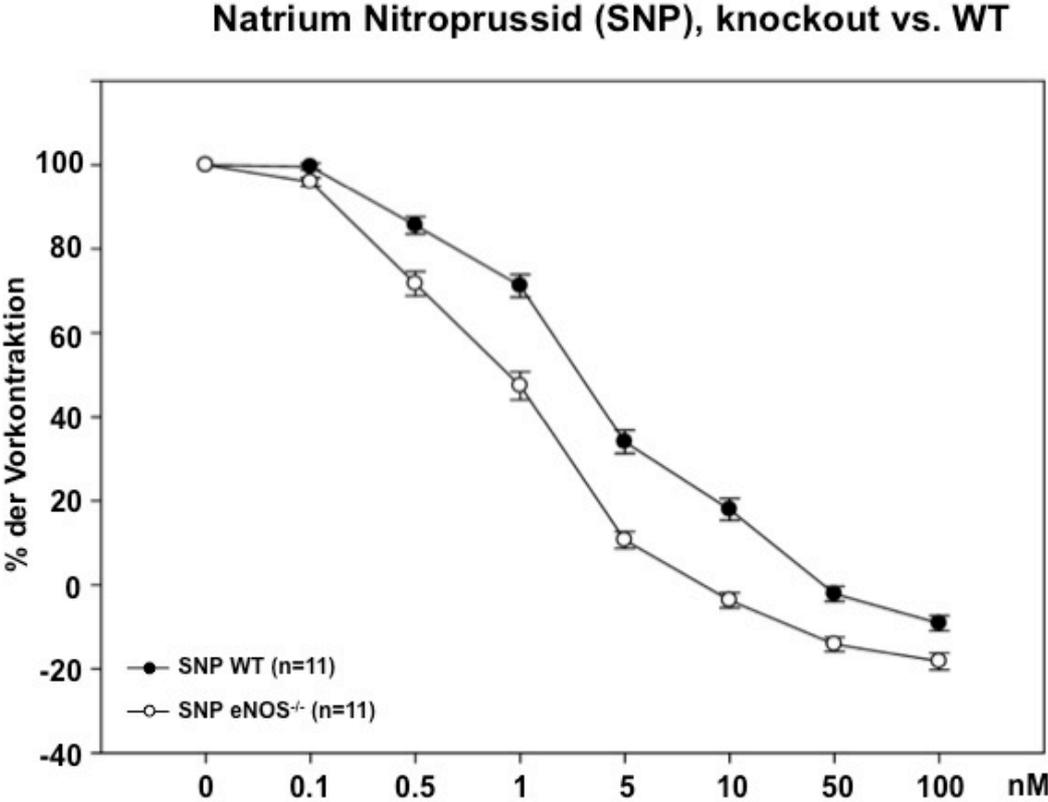


Abb. 13: Kumulative Dosen des endothelunabhängigen Vasodilatators Natrium Nitroprussid (Sodium nitroprusside)

## 5 Diskussion

Unsere Studie untersucht zum ersten Mal die Endothelfunktion bei Patienten mit Multipler Sklerose. Wir konnten keine eindeutigen Hinweise für das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion bei MS im Vergleich zu einer gematchten Kontrollgruppe finden, obwohl in der Literatur bei MS-Patienten ein leicht erhöhtes kardiovaskuläres Risiko beschrieben ist (Wens et al., 2013).

Durch die Einnahme von EGCG lassen sich in unserer Studie keine Verbesserungen der Endothelfunktion bei MS-Patienten weder akut noch chronisch erzielen.

Wir konnten im Tierversuch an isolierten Aortenringen der Maus zeigen, dass die Vasodilatation durch EGCG NO-abhängig abläuft. Aortenringe von eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten keine Vasodilatation durch EGCG.

### 5.1 Die Endothelfunktion bei MS

Der mittlere FMD-Wert der Subgruppe der männlichen MS-Patienten betrug in unserer Untersuchung 4,1 %. In der dazu gehörigen Kontrollgruppe lag der FMD-Wert bei vergleichbaren 4,5 %, sodass sich bei uns kein statistisch signifikanter Unterschied in der Endothelfunktion zwischen MS-Patienten und Gesunden zeigte ( $p=0,67$ ). Dies lässt vermuten, dass MS-Patienten keine Einschränkungen der Endothelfunktion besitzen. Eine FMD von 4-5 % ist, verglichen mit den Daten aus der Literatur, relativ niedrig. Bei größeren Kollektiven von gesunden Probanden sind im Mittel FMD-Werte von 6,5 % beschrieben (Ghiadoni et al., 2012). Eine reduzierte FMD sowohl bei MS als auch bei den Gesunden könnte bei einer geringen Gruppenstärke, wie sie bei uns vorlag, auch Zufall sein. In einem aktuellen systematischen Review wird zusammenfassend ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei MS beschrieben (Wens et al., 2013). Als kardiovaskuläre Risikofaktoren bei MS-Patienten gelten erhöhte Homocystein- und Harnsäurespiegel (Moghaddasi et al., 2013), körperliche Inaktivität und Kortisontherapie (Wei et al., 2004, Paltamaa et al., 2006) sowie im akuten MS-Schub eine veränderte endotheliale Homöostase durch vermehrte Ausschüttung von CD31+ (Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)). Man kann vermuten, dass jene Konditionen, die eventuell zu einer messbaren Einschränkung der endothelialen Vasodilatation führen, im schubfreien Intervall nicht vorhanden sind und wir deshalb keine eindeutig reduzierte Endothelfunktion in unserer Untersuchung

feststellen können (eine akuter MS-Schub führte während der Studie bei uns zum Ausschluss).

Es ist zu vermuten, dass das Kollektiv der MS-Patienten in unserer Studie nicht repräsentativ für alle MS-Patienten stehen kann. Da es sich mit einem mittleren Alter von 32 Jahren um eine relativ junge Studienpopulation handelt, könnte man argumentieren, dass sich die oben genannten Risikofaktoren erst später in funktionellen Defiziten im Sinne einer messbaren reduzierten Endothelfunktion feststellen lassen.

## **5.2 Effekte von EGCG auf die Endothelfunktion**

Ein weiteres Ziel unserer Untersuchungen war der Effekt von EGCG auf die Endothelfunktion bei MS-Patienten. Wie im Tiermodell im Vorfeld ausführlich bewiesen wurde, führt EGCG aus grünem Tee in vivo zur Verbesserung der Endothelfunktion (Potenza et al., 2007, Jang et al., 2013). Wir konnten jedoch keine eindeutig positiven Wirkungen durch EGCG auf die Endothelfunktion von MS-Patienten feststellen (weder akut noch chronisch). Die bisher einzige vergleichbare Studie von Widlansky et al., die den Effekt von EGCG auf die Endothelfunktion von Patienten mit koronarer Herzerkrankung untersuchte, konnte im Gegensatz zu unserem Ergebnis eine Verbesserung durch 300 mg EGCG zeigen. Nahezu analog zu unserer Untersuchung wurden in der Messung akut und chronische Effekte einer EGCG-Einnahme auf die Endothelfunktion mittels FMD untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Verbesserung (FMDmax von 7,1 % auf 8,6 %) durch 300 mg EGCG erzielt werden. In Übereinstimmung zu unserer Studie zeigten sich keine Langzeiteffekte der täglichen EGCG-Einnahme (Widlansky et al., 2007). Auffallend ist jedoch, dass die basale Endothelfunktion für ein Patientenkollektiv mit nachgewiesener koronarer Herzerkrankung mit einer FMDmax um 7 % relativ gut ist. Dies könnte durch die Einnahme vasoaktiver Medikamente verursacht sein, da in dieser Studie 83 % der Patienten unter Statin- und 45 % unter ACE-Hemmer-Dauertherapie standen. Da die Auswirkung dieser Medikamente auf die Endothelfunktion belegt ist (Anderson et al., 1995, Prasad et al., 1999), könnte dies das Ergebnis von Widlansky beeinflusst haben.

Für grünen Tee zeigen vorangegangene Untersuchungen günstige Effekte auf die Endothelfunktion. Park et al. konnten bei einem Patientenkollektiv mit terminaler

Niereninsuffizienz eine signifikante Verbesserung der FMD durch 5 g grünes Teepulver täglich erreichen (FMDmax (%) von 5,7 auf 8,7) (Park et al., 2010). Auch die Arbeitsgruppe um Nagaya konnte eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Rauchern durch grünen Tee nachweisen (Nagaya et al., 2004). Bei diesen Studien wurde grüner Tee in seiner natürlichen Zusammensetzung verabreicht und nicht wie in unserer Studie EGCG als Monosubstanz. Möglicherweise entstehen die endothelverbessernden Wirkungen des grünen Tees synergistisch durch Catechine und andere Teeinhaltsstoffe wie z. B. Koffein. Unter dieser Annahme wäre durch eine isolierte EGCG-Gabe keine Verbesserung der FMD zu erwarten. Beide o. g. Studien untersuchen Patientengruppen mit beträchtlichen kardiovaskulären Risikofaktoren (Rauchen und chronische Niereninsuffizienz). Eventuell sind bei derartigen Patientenkollektiven Verbesserungen durch Interventionsmaßnahmen leichter zu erzielen als bei Probanden ohne wesentliche Einschränkung der Gefäßfunktion. Ob grüner Tee einen Einfluss auf die Endothelfunktion bei MS besitzt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Auffallend diskrepant sind die Ergebnisse einer chronischen EGCG-Einnahme in klinischen Studien verglichen mit der positiven Langzeitwirkung durch Tee in epidemiologischen Studien. Trotz des positiven Akuteffekts durch EGCG in bisher einer Studie (Widlansky et al., 2007), konnte noch keine Langzeitverbesserung durch die chronische Zufuhr von isoliertem EGCG bewiesen werden. Möglicherweise verhindert das Zusammenspiel der im Tee enthaltenen Antioxidantien den vorzeitigen Abbau einzelner wirksamer Komponenten. Dies ist bei Gabe einer Monosubstanz nicht möglich und könnte zu einem schnelleren Abbau von EGCG als im „Teeverbund“ führen.

Auch für schwarzen Tee zeigen sich positive Effekte auf die Endothelfunktion nach akuter und chronischer Einnahme (Duffy et al., 2001, Schreuder et al., 2014). Wir konnten im Vorfeld zeigen, dass der Konsum von grünem und schwarzem Tee gleichermaßen zur akuten Verbesserung der FMD führt (Jochmann et al., 2008) und beide Teesorten in gleichem Maße zur Stimulation der endothelialen NO-Synthase führen (Lorenz et al., 2009b). Während Catechine in grünem Tee mit 80-90 % den Hauptanteil aller Flavonoide ausmachen, sind sie in schwarzem Tee nur mit 20-30 % aller Flavonoide vertreten (Schini-Kerth et al., 2011). Nach akuter und chronischer Einnahme von schwarzem Tee konnten erhöhte Catechin-Plasmakonzentrationen gemessen werden. Veränderungen der Catechin-Plasmakonzentrationen korrelierten

jedoch nicht mit Veränderungen der Endothelfunktion, sodass die Autoren dieser Studie anderen Flavonoiden bzw. Inhaltsstoffen des schwarzen Tees den günstigen Effekt auf die Endothelfunktion zuschreiben (Widlansky et al., 2005).

Die epidemiologische Datenlage zeigt in der Summe einen positiven Effekt durch regelmäßigen Teekonsum auf die kardiovaskuläre Gesundheit (Arab et al., 2009, Kokubo et al., 2013). Es gibt jedoch auch einige Populationsstudien, die keinen Zusammenhang zwischen Tee (Brown et al., 1993, Hertog et al., 1997, Sesso et al., 2003) oder einer flavonoidreichen Ernährung (Wang et al., 2012) und dem kardiovaskulären Risiko zeigen. Diese Kohortenstudien wurden an Populationen in Großbritannien bzw. den USA durchgeführt. Dort wird Tee im Allgemeinen mit Milch getrunken. Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, hat der Modus des Teekonsums eine entscheidende Auswirkung auf seine Bioverfügbarkeit. Unsere Arbeitsgruppe fand, dass Tee mit Milch oder Sojamilch zu keine Verbesserung der Endothelfunktion, gemessen in FMD, besitzt (Lorenz et al., 2007, Lorenz et al., 2009a). Diese Erkenntnis zum Einfluss von Milch auf Tee ist möglicherweise nur ein Beispiel für Einflussfaktoren auf die Wirkungsweise des Tees. Es ist zu vermuten, dass weitere bisher nicht untersuchte Nahrungsmittel langfristig mit den Catechinen interagieren und mitursächlich für die teilweise diskrepanten Ergebnisse einiger klinischer Studien sind.

Wir haben keine Metaboliten des EGCG bestimmt. Grund dafür sind fehlende Standards in der HPLC-Analyse. Es gibt methylierte EGCG-Formen, die auch im Plasma zirkulieren. Man könnte vermuten, dass ein Teil des EGCGs methyliert (oder anderweitig metabolisiert) im Plasma vorliegt und daher die biologische Aktivität von EGCG vermindert ist (Hashimoto et al., 2014). Es wäre interessant zu wissen, ob in unserer Studienpopulation eine erhöhte bzw. schnellere Metabolisierung des EGCG im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vorlag. Wie schwierig es ist, die Metaboliten des EGCG zu bestimmen, zeigt eine aktuelle Untersuchung aus China, wobei in Hepatozyten von Menschen, Hunden, Ratten und Affen in vitro keine Metaboliten des EGCG detektiert werden konnten (Chen et al. 2012)

Obwohl sich die Menge des akut oral aufgenommenen EGCG im Studienverlauf verdoppelte, zeigte sich in unseren Plasmabestimmungen eine nahezu vergleichbare Konzentration an EGCG. Nach 200 mg oral aufgenommenem EGCG lag sie bei 76 ng/ml und nach 400 mg bei 86 ng/ml. Wie in der Einleitung angeführt, ist aus Kinetikstudien bekannt, dass in einem Bereich von 200-600 mg oraler Aufnahme von

EGCG die Plasmakonzentration linear ansteigt. Da es bisher keine Daten zur Kinetik bei MS gibt, könnte ein anderer Metabolismus bei der MS diskutiert werden.

### **5.3 Methode der FMD**

Bei der genaueren Analyse der einzelnen klinischen Studien fällt auf, dass nicht nur die verwandten Prüfsubstanzen, sondern auch die Methoden der Endothelfunktionsmessung sehr variierten. Wir sind der Meinung, dass die FMD trotz einiger Limitationen die am besten geeignete Methode darstellt, um die Endothelfunktion in klinischen Studien zu evaluieren. Die Limitationen der Methode und der Vergleich zu anderen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

Die Messung der Endothelfunktion mittels FMD stellt aktuell die am häufigsten publizierte Methode der peripheren Endothelfunktionsmessung dar. Bei korrekter Durchführung ergibt sich für die FMD eine geringe Messvarianz (Donald et al., 2006). Sie bildet bei standardisiertem Vorgehen auch in Multizenter-Studien die Endothelfunktion reproduzierbar ab (Ghiadoni et al., 2012).

Vergleicht man Daten der Literatur, gibt es große methodische Unterschiede bei der Erfassung der Endothelfunktion (Bots et al., 2005). Trotz Leitlinien zur FMD-Messung (Corretti et al., 2002, Thijssen et al., 2011), fehlt ein wissenschaftlicher Konsens über ein standardisiertes Untersuchungsprotokoll. Unterschiede ergeben sich beispielsweise in der Positionierung der Blutdruckmanschette. Sie wird von einigen Arbeitsgruppen am Oberarm, von anderen am Unterarm platziert. Es konnte gezeigt werden, dass beim Anbringen am Oberarm vasodilatatorische Substanzen auch NO-unabhängig freigesetzt werden (Thijssen et al., 2011) und bereits minimale Unterschiede im Untersuchungsprotokoll die Ergebnisse maßgeblich beeinflussen (Doshi et al., 2001, Black et al., 2008). Unabhängig von einheitlichen Standards, bleibt die Evaluation der Endothelfunktion mittels FMD eine sehr empfindliche Methode. Neben Nahrungszufuhr können körperliche Aktivität, Alkoholkonsum und Stress entscheidend das Ergebnis der Messung beeinflussen (Woo et al., 2004). Die technischen Anforderungen an den Untersucher sind bei der FMD hoch. Zur Beherrschung der anspruchsvollen Untersuchungstechnik werden nach den Richtlinien eine minimale Untersuchungsanzahl von 100 Messungen sowie eine hohe jährliche Untersuchungsrate gefordert, um eine ausreichende Qualifikation zu gewährleisten (Corretti et al., 2002, Thijssen et al., 2011).

Dennoch bleibt die Methode stark untersucherabhängig (Brunner et al., 2005). Deshalb wurden alle FMD-Messungen in der vorliegenden Studie von einem Untersucher ausgeführt. Essentiell für eine reproduzierbare FMD-Messung ist es, dass bei einer FMD-Untersuchung der gleiche Abschnitt des Gefäßes wiedergefunden wird. Um Fehlerquellen diesbezüglich zu minimieren, wurde von unserer Arbeitsgruppe speziell eine Halterung für Unterarm und Schallkopf konstruiert. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Ausmessung der Endothelschichten bei der Auswertung. Der Durchmesser der Art. brachialis ist mit drei Millimetern sehr klein. Minimale Ungenauigkeiten des vergrößerten Nativbildes am Bildschirm können deutliche Schwankungen nach sich ziehen. Dies ist dann problematisch, wenn keine klare durchgängige Darstellung des Endothels im Ultraschallbild gelingt. Dies führt insbesondere zu Messungenauigkeiten direkt nach Ablassen der Staumanschette, wenn ein qualitativ gutes Bild innerhalb von 15 Sekunden wieder eingestellt werden muss. Um diesbezüglich die Messungenauigkeiten zu minimieren, wurden in den letzten 10-15 Jahren automatische Auswertsysteme entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inter- und Intraobservervariabilität damit verringert wird und kleinere Veränderungen der FMD besser erfasst werden können (Tomiyama et al., 2012). Durch die fehlende Invasivität halten wir diese Methode trotz der oben genannten Limitationen für eine geeignete Untersuchungsform. Strengere Guidelines mit exakten Protokollen sind jedoch für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse notwendig.

#### **5.4 Vasodilatation durch EGCG in vitro**

Im experimentellen Teil unserer Studie konnten wir zeigen, dass EGCG bei Aortenringen der Maus NO-abhängig zur Vasodilatation führt. Dieses Ergebnis ist konsistent zu früheren Ergebnissen unserer (Lorenz et al., 2009b) und anderer Arbeitsgruppen (Ajay et al., 2003, Potenza et al., 2007). Bisher wurde die NO-Abhängigkeit angenommen, da unter Zugabe eines NO-Inhibitors (L-NAME) eine Vasodilatation durch EGCG ausblieb. Letztendlich fehlte jedoch der Beweis einer wirklichen NO-Abhängigkeit des Effekts durch EGCG, da die Verwendung eines Inhibitors möglicherweise keine vollständige NO-Blockade bewirkt. Die Inhibitoren verdrängen L-Arginin kompetitiv von seiner Bindungsstelle an der eNOS und hemmen auf diesem Weg die L-Citrullin-Bildung (Salerno et al., 2002).

Es existieren konkurrierende Hypothesen zur Wirkungsweise der EGCG-vermittelten Vasodilatation. Wir zeigten bereits, dass EGCG durch schnelle Aktivierung der eNOS zu einer endothelabhängigen Vasodilatation in vorkontrahierten Rattenaorten führt. Diese Aktivierung wird posttranslational über eine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K)-, Protein kinase A (PKA)- und Akt-abhängige Phosphorylierung der eNOS vermittelt. Der eNOS-Proteingehalt wird dabei durch EGCG nicht beeinflusst (Lorenz et al., 2004). Andere experimentelle Daten sprechen dafür, dass zusätzliche endothelunabhängige Mechanismen eine Rolle spielen könnten. Die Arbeitsgruppe Alvarez et al. fand, dass die Effekte von EGCG auf die Vasodilatation isolierter Aortenringe zumindest teilweise endothelunabhängig durch nicht-selektive Hemmung verschiedener Phosphodiesterase (PDE) - Isoformen vermittelt werden. Durch PDE-Hemmung kam es durch EGCG zur Aufrechterhaltung erhöhter cAMP- und cGMP-Spiegel in den glatten Muskelzellen und eine Kontraktion blieb aus (Alvarez et al., 2006). Es könnten also mehrere Mechanismen der EGCG-vermittelten Vasodilatation zugrunde liegen. Dass davon ein wesentlicher Mechanismus NO-abhängig abläuft, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals bewiesen werden.

Die niedrige Bioverfügbarkeit von EGCG in vivo könnte eventuell die Diskrepanz der EGCG-Wirkung zwischen unserer klinischen Studie und dem Ergebnis der Ringuntersuchung erklären. Durch direkte Zugabe auf die Aortenringe wurde im Ringexperiment sichergestellt, dass EGCG direkt am Gefäß wirken kann. Bei oraler Aufnahme kann beim Menschen keine vergleichbar hohe Plasmakonzentration wie im Ringexperiment erreicht werden. In vivo wird EGCG nach oraler Aufnahme in der Leber methyliert, glukuronidiert und sulfatiert. Besonders die Methylierung erfolgt in der Leber relativ schnell durch die im Leberzytosol ansässige Catechol-O-methyltransferase (COMT) (Lu et al., 2003). Aus Kinetikstudien ist bekannt, dass höchste Plasmakonzentrationen 1-2 Stunden nach oraler Aufnahme erreicht werden bei einer Plasmahalbwertszeit von  $3,4 \pm 0,3$  Stunden (Lee et al., 2002). In der Folge kommt es zu einem graduellen Abfall, bis nach 24 Stunden keine EGCG-Spiegel mehr gefunden werden. Wir haben den FMD-Messzeitpunkt deshalb 1,5 Stunden nach oraler Aufnahme gewählt. Bei unseren gemessenen EGCG-Plasmakonzentrationen zeigte sich eine hohe intraindividuelle Variabilität trotz Einhalten einer strengen Diät. Hohe EGCG-Konzentrationen bei einigen unserer Probanden korrelierten trotzdem nicht mit höheren FMD-Werten. Im Mittel konnten in anderen Studien vergleichbare

Plasmakonzentrationen nach entsprechender EGCG-Einnahme erzielt werden (Lee et al., 2002, Widlansky et al., 2007).

Andere Catechine besitzen längere Halbwertszeiten als EGCG. Beispielsweise erreicht ECG seine höchste Plasmakonzentrationen nach 24 Stunden. In der Theorie sind durch länger wirksame Catechine Langzeiteffekte leichter zu erzielen, da diese nicht nur kurzfristig zur Endothelverbesserung führen (Warden et al., 2001). Bei Verabreichung einer Monosubstanz sollte die Einnahme in künftigen Studien mehrmals täglich in kürzeren Intervallen stattfinden. Nachteilig wäre dies möglicherweise für eine gute Compliance. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit von EGCG ein protektiver Effekt nur durch die mehrmals tägliche Einnahme erreicht werden kann, führten bei epidemiologischen Untersuchungen eine mehrmals tägliche Aufnahme von grünem Tee (mind. 3 Tassen) zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos (Peters et al., 2001).

Um alle bekannten Einflüsse auf die Bioverfügbarkeit von EGCG zu kontrollieren, müssten Probanden eine sehr strenge Diät einhalten. Bekanntermaßen bewirkt eine gleichzeitige Aufnahme mit Albumin, Vitamin C oder Fischöl eine größere Bioverfügbarkeit von EGCG, wohingegen die gemeinsame Aufnahme mit Calcium, Magnesium zur Inaktivierung führt (Mereles and Hunstein, 2011). Der zeitgleiche Konsum von Milchprodukten führt zu reduzierter antioxidativer Kapazität (Bourassa et al., 2013) und verhindert eine Steigerung der endothelialen NO-Produktion durch Tee (Lorenz et al., 2007). Desweiteren trägt Serumalbumin zum Transport und zur Stabilisierung von EGCG bei, indem es eine Oxygenierung verhindert (Ishii et al., 2005). Ein erniedrigtes Serumalbumin führt zu niedrigen EGCG-Plasmaspiegeln.

Nach Herstellerangaben sind in einer Kapsel Sunphenon® mindestens 95 % EGCG enthalten. Die Reinheit und die Konzentration weiterer Inhaltsstoffe im Sunphenon wurden in der Studie nicht untersucht. Daher konnte die gegebene Menge an Sunphenon auch nicht an die Reinheit (also die tatsächlich vorliegende EGCG-Menge in den Kapseln) angepasst werden. Man hätte sicherlich mehr als 200 mg in die Kapseln einwiegen müssen, um genau 200 mg EGCG zu verabreichen. Leider hatten wir bei der Konzeption der SuniMS-Studie keinen Einfluss darauf. Ob die Gabe von exakt 200 mg EGCG das Studienergebnis beeinflusst hätte, ist sicherlich fraglich.

### **5.5 Beeinflussung der LDL-Werte durch EGCG**

Hohe Lipidwerte zählen zu den Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Taylor et al., 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass Catechine zur LDL-Reduktion führen. Obwohl die Ergebnisse bisheriger Studien nicht konsistent sind, zeigt eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse (hauptsächlich wurde EGCG-haltiges Teepulver verwandt) eine signifikante Abnahme des Cholesterin- und LDL-Spiegels durch Catechine (Kim et al., 2011). In der bisher einzigen Untersuchung zur Wirkung von EGCG auf den LDL-Spiegel führten 400 mg bzw. 800 mg EGCG bei adipösen Frauen zur Reduktion um 7,9 % bzw. 6,6 % nach 2 Monaten (Wu et al., 2012). In unserer Arbeit fanden wir einen nicht-signifikanten Trend zu einer lipidsenkenden Wirkung durch EGCG nach 3 Monaten ( $p=0,058$ ). Entgegen unserer Ergebnisse zeigen Untersuchungen, dass der lipidsenkende Effekt des grünen Tees eventuell durch andere Inhaltsstoffe als durch Catechine vermittelt wird. So wurde im Tiermodell der Cholesterinspiegel signifikant durch eine Teelösung gesenkt, die alle Bestandteile des grünen Tees außer EGCG bzw. Catechine enthielt. Ursächlich konnten Veränderungen der hepatischen Genexpression lipogenetischer Enzyme ausgemacht werden (Yasui et al., 2012). Insofern besteht weiterer Forschungsbedarf zur Bestätigung der lipidsenkenden Teeinhaltsstoffe.

### **5.6 Limitationen der Arbeit**

- 1) Eine Hauptlimitation ist die relativ geringe Fallzahl. Sowohl bei der Untersuchung der EGCG-Wirkung auf die Endothelfunktion bei MS als auch beim Vergleich der Endothelfunktion von MS-Patienten mit Gesunden können unsere Ergebnisse nur als Hinweise interpretiert werden und müssen durch zukünftige Studien mit größeren Fallzahlen validiert werden.
- 2) In wieweit der Einfluss „MS“ auf die Effekte von EGCG einen Einfluss hatte, können wir nicht beantworten. Da Sunphenon® lediglich die Zulassung im Rahmen einer Behandlung der multiplen Sklerose (und bei Glaukom) besitzt und als Prüfsubstanz bei Gesunden Probanden nicht zugelassen ist, sehen wir diese Limitation als sehr kritisch aber unumgänglich.
- 3) Es besteht durch exogene Faktoren wie Nahrungsmittel und Medikamente ein möglicher Einfluss auf die EGCG-Wirkung, der nicht vollständig erfasst wurde. Wie im

vorangegangenen Abschnitt beschrieben, besitzen zahlreiche Nahrungsmittel Einfluss auf die EGCG-Bioverfügbarkeit, die nicht alle aus dem Diätplan der Patienten ausgeschlossen wurden. Die Einnahme von potentiell endothelfunktionsbeeinflussenden Medikamenten wurde nicht erhoben und fand keine Berücksichtigung bei der Randomisierung.

4) Unter den weiblichen Studienteilnehmern wurde der hormonelle Status nicht erfasst. Es ist bekannt, dass Hormonschwankungen wie im Menstruationszyklus oder nach der Menopause die Endothelfunktion beeinflussen können (Jochmann et al., 2009, Naka et al., 2011, Moreau et al., 2012). Dies könnte bei den weiblichen Studienteilnehmern zur Beeinflussung der Endothelfunktionsmessung geführt haben.

5) Zuletzt wurde kein automatisches Auswertungssystem verwendet. Untersucherbedingte Messungenauigkeiten bei der Auswertung der Endothelfunktion können nicht ausgeschlossen werden.

**Abkürzungsverzeichnis**

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Acetylcholin
AKT	Proteinkinase B
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
AT-1	Angiotensin-II-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body mass index
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD4	Cluster of differentiation 4
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRP	C-reaktives Protein
CYP 3A4	Cytochrom P 450 3A4
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin-Gallat
ED	Encephalomyelitis disseminata
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET	Endothelin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMD	Flow-mediated dilation
FMN	Flavin-Mononukleotid
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HbA <sub>1c</sub>	Glykohämoglobin
Hcys	Homocystein
HDL	High density lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HO·	Hydroxylradikal
HPLC	High performance liquid chromatography
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	L-NG-Nitroarginin-Methyl-Ester

Lp (a)	Lipoprotein (a)
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHz	Megahertz
min	Minutes
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NADH/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid/ Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NMD	Nitro-mediated dilation
NO	Nitric oxide
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OCl <sup>-</sup>	Hypochlorid-Anion
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
Ox-LDL	Oxidiertes low density lipoprotein
PAT	Peripher arterielle Tonometrie
PDE	Phosphodiesterase
PI 3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKA	Pulskonturanalyse
PW	Pulsed Wave
PWA	Pulswellenanalyse
ROS	Reactive oxygen species
RR	Riva Ricci
RR-MS	Relapsing remitting Multiple Sclerosis
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
T2	Querrelaxationszeit (MRT)
TBC	Tuberkulose
TG	Triglyzerid
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density lipoprotein
WBC	White Blood Count

**Literaturverzeichnis**

- Aboul-Enein F, Lassmann H (Mitochondrial damage and histotoxic hypoxia: a pathway of tissue injury in inflammatory brain disease? *Acta Neuropathol* 109:49-55.2005).
- Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR (Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 74:603-612.2003).
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.2001).
- Alexopoulos N, Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Baou K, Vasiliadou C, Pietri P, Xaplanteris P, Stefanadi E, Stefanadis C (The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15:300-305.2008).
- Alvarez E, Campos-Toimil M, Justiniano-Basaran H, Lugnier C, Orallo F (Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *Br J Pharmacol* 147:269-280.2006).
- Alvarez E, Leiro J, Orallo F (Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on respiratory burst of rat macrophages. *Int Immunopharmacol* 2:849-855.2002).
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. (Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26:1235-1241.1995).
- Arab L, Liu W, Elashoff D (Green and black tea consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *Stroke* 40:1786-1792.2009).
- Ardalan MR, Tarzamni MK, Shoja MM, Tubbs RS, Rahimi-Ardabili B, Ghabili K, Khosroshahi HT (Black tea improves endothelial function in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 39:1139-1142.2007).
- Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC (The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37:693-704.1997).
- Barnett MH, Parratt JD, Pollard JD, Prineas JW (MS: is it one disease? *Int MS J* 16:57-65.2009).
- Barnoya J, Glantz SA (Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. *Circulation* 111:2684-2698.2005).
- Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, Verhaar MC, Joles JA (Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension* 47:87-94.2006).

- Black MA, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ (Importance of measuring the time course of flow-mediated dilatation in humans. *Hypertension* 51:203-210.2008).
- Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr., Gibbons LW (Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 276:205-210.1996).
- Boger RH, Bode-Boger 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* 98:1842-1847.1998).
- Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJ (Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. *Eur Heart J* 26:363-368.2005).
- Bourassa P, Cote R, Hutchandani S, Samson G, Tajmir-Riahi HA (The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *J Photochem Photobiol B* 128C:43-49.2013).
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH (Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 142:w13659.2012).
- Bronnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E (Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 127:844-850.2004).
- Brown CA, Bolton-Smith C, Woodward M, Tunstall-Pedoe H (Coffee and tea consumption and the prevalence of coronary heart disease in men and women: results from the Scottish Heart Health Study. *J Epidemiol Community Health* 47:171-175.1993).
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ (Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23:233-246.2005).
- Campos-Toimil M, Orallo F (Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in Ca<sup>2+</sup>-permeable non-selective cation channels and voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 80:2147-2153.2007).
- Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM, 3rd (Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol* 38:341-350.1985).
- Celermajer DS (Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 30:325-333.1997).
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE (Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340:1111-1115.1992).

- Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW (Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 165:506-519.2012).
- Charakida M, Donald AE, Green H, Storry C, Clapson M, Caslake M, Dunn DT, Halcox JP, Gibb DM, Klein NJ, Deanfield JE (Early structural and functional changes of the vasculature in HIV-infected children: impact of disease and antiretroviral therapy. *Circulation* 112:103-109.2005).
- Chen WW, Qin GY, Zhang T, Feng WY (In vitro drug metabolism of green tea catechins in human, monkey, dog, rat and mouse hepatocytes. *J Drug Metab Lett* 6: 73-93.2012
- Chen ZY, Law WI, Yao XQ, Lau CW, Ho WK, Huang Y (Inhibitory effects of purified green tea epicatechins on contraction and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 21:835-840.2000).
- Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA (Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr* 104 Suppl 3:S28-39.2010).
- Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG (Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci* 16:1733-1745.2011).
- Christiansen CF, Christensen S, Farkas DK, Miret M, Sorensen HT, Pedersen L (Risk of arterial cardiovascular diseases in patients with multiple sclerosis: a population-based cohort study. *Neuroepidemiology* 35:267-274.2010).
- Chyu KY, Babbidge SM, Zhao X, Dandillaya R, Rietveld AG, Yano J, Dimayuga P, Cercek B, Shah PK (Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109:2448-2453.2004).
- Cooke JP, Rossitch E, Jr., Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ (Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88:1663-1671.1991).
- 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* 39:257-265.2002).
- D'Haeseleer M, Cambron M, Vanopdenbosch L, De Keyser J (Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 10:657-666.2011).
- De Keyser J, Steen C, Mostert JP, Koch MW (Hypoperfusion of the cerebral white matter in multiple sclerosis: possible mechanisms and pathophysiological significance. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1645-1651.2008).

- De Simone C, Di Giorgio A, Sisto T, Carbone A, Ghitti F, Tondi P, Santoliquido A (Endothelial dysfunction in psoriasis patients: cross-sectional case-control study. *Eur J Dermatol* 21:510-514.2011).
- Deana R, Turetta L, Donella-Deana A, Dona M, Brunati AM, De Michiel L, Garbisa S (Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet signalling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Thromb Haemost* 89:866-874.2003).
- Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ (Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23:7-17.2005).
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115:1285-1295.2007).
- Donald AE, Charakida M, Cole TJ, Friberg P, Chowienczyk PJ, Millasseau SC, Deanfield JE, Halcox JP (Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? *J Am Coll Cardiol* 48:1846-1850.2006).
- Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, Goodfellow J (Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond)* 101:629-635.2001).
- Droge W (Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.2002).
- 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* 104:151-156.2001).
- Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA (Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296:2391-2394.2002).
- Endemann DH, Schiffrin EL (Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15:1983-1992.2004).
- Faita F, Masi S, Loukogeorgakis S, Gemignani V, Okorie M, Bianchini E, Charakida M, Demi M, Ghiadoni L, Deanfield JE (Comparison of two automatic methods for the assessment of brachial artery flow-mediated dilation. *J Hypertens* 29:85-90.2011).
- Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albini A (Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res* 10:4865-4873.2004).
- Feng WY (Metabolism of green tea catechins: an overview. *Curr Drug Metab* 7:755-809.2006).

- Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM (Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102:1000-1006.2000).
- Forstermann U, Munzel T (Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-1714.2006).
- Furchgott RF (Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 19:235-251.1999).
- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P (Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:402-406.1995).
- Ghiadoni L, Faita F, Salvetti M, Cordiano C, Biggi A, Puato M, Di Monaco A, De Sisti L, Volpe M, Ambrosio G, Gemignani V, Muiesan ML, Taddei S, Lanza GA, Cosentino F (Assessment of flow-mediated dilation reproducibility: a nationwide multicenter study. *J Hypertens* 30:1399-1405.2012).
- Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA (Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41:1769-1775.2003).
- Grammas P, Martinez J, Miller B (Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med* 13:e19.2011).
- Grassi D, Mulder TP, Draijer R, Desideri G, Molhuizen HO, Ferri C (Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males. *J Hypertens* 27:774-781.2009).
- Guazzi M, Reina G, Gripari P, Tumminello G, Vicenzi M, Arena R (Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 132:45-50.2009).
- Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA (Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106:653-658.2002).
- Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ (Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 117:2467-2474.2008).
- Hare JM, Stamler JS (NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest* 115:509-517.2005).
- Hashimoto O, Nakamura A, Nakamura T, Iwamoto H, Hiroshi M, Inoue K, Torimura T, Ueno T, Sata M (Methylated-(3'')-epigallocatechin gallate analog suppresses tumor growth in Huh7 hepatoma cells via inhibition of angiogenesis. *Nutr Cancer* 66: 728-35. 2014)

- Heiss C, Keen CL, Kelm M (Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J* 31:2583-2592.2010).
- Hemmer B, Kieseier B, Cepok S, Hartung HP (New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3:246-255.2003).
- Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Luscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R (Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 92:119-120.2006).
- Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M (Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev* 9:142-152.2010).
- Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 65:1489-1494.1997).
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.2003).
- Hirata K, Shimada K, Watanabe H, Otsuka R, Tokai K, Yoshiyama M, Homma S, Yoshikawa J (Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *Am J Cardiol* 93:1384-1388, A1386.2004).
- Hirsova P, Kolouchova G, Dolezelova E, Cermanova J, Hyspler R, Kadova Z, Micuda S (Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *Eur J Pharmacol* 691:38-45.2012).
- Hirst C, Swingler R, Compston DA, Ben-Shlomo Y, Robertson NP (Survival and cause of death in multiple sclerosis: a prospective population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1016-1021.2008).
- Hodgson JM, Burke V, Puddey IB (Acute effects of tea on fasting and postprandial vascular function and blood pressure in humans. *J Hypertens* 23:47-54.2005).
- Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY (Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci* 63:275-283.1998).
- Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR (Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 26:631-640.2010).
- Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K (Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 141:211-217.2001).
- Ishii T, Sakurai T, Usami H, Uchida K (Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry* 44:13893-13901.2005).

- Jang HJ, Ridgeway SD, Kim JA (Effects of the Green Tea Polyphenol, Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), on High Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*2013).
- Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF (Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91:1314-1319.1995).
- Jochmann N, Lorenz M, Krosigk A, Martus P, Bohm V, Baumann G, Stangl K, Stangl V (The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr* 99:863-868.2008).
- Jochmann N, Muller S, Kuhn C, Gericke C, Baumann G, Stangl K, Stangl V (Chronic smoking prevents amelioration of endothelial function in the course of the menstrual cycle. *Circ J* 73:568-572.2009).
- Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H (Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187:1-17.2006).
- Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Hanada H, Ishizaka H, Ono H, Saitoh M, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, Okumura K (Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J* 24:2180-2185.2003).
- Kieseier BC, Wiendl H (Multiple sclerosis: advances, excitements, disenchantments. *Lancet Neurol* 5:2-3.2006).
- Kim A, Chiu A, Barone MK, Avino D, Wang F, Coleman CI, Phung OJ (Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc* 111:1720-1729.2011).
- Kim W, Jeong MH, Cho SH, Yun JH, Chae HJ, Ahn YK, Lee MC, Cheng X, Kondo T, Murohara T, Kang JC (Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ J* 70:1052-1057.2006).
- Kokubo Y, Iso H, Saito I, Yamagishi K, Yatsuya H, Ishihara J, Inoue M, Tsugane S (The impact of green tea and coffee consumption on the reduced risk of stroke incidence in Japanese population: the Japan public health center-based study cohort. *Stroke* 44:1369-1374.2013).
- Koo SI, Noh SK (Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem* 18:179-183.2007).
- Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH (Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 12:13-16.2007).
- Lambert JD, Lee MJ, Diamond L, Ju J, Hong J, Bose M, Newmark HL, Yang CS (Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug Metab Dispos* 34:8-11.2006).

- Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, Sturgill MG, Yang CS (Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr* 133:4172-4177.2003).
- Lassmann H (Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 206:187-191.2003).
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1025-1032.2002).
- Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, Cosentino F, Deanfield J, Gallino A, Ikonomidis I, Kremastinos D, Landmesser U, Protogerou A, Stefanadis C, Tousoulis D, Vassalli G, Vink H, Werner N, Wilkinson I, Vlachopoulos C (Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 18:775-789.2011).
- Libby P, Ridker PM, Maseri A (Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143.2002).
- Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA (Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 78:1210-1214.1996).
- Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, Martus P, Baumann G, Stangl K, Stangl V (Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur Heart J* 28:219-223.2007).
- Lorenz M, Stangl K, Stangl V (Vascular effects of tea are suppressed by soy milk. *Atherosclerosis* 206:31-32.2009a).
- Lorenz M, Urban J, Engelhardt U, Baumann G, Stangl K, Stangl V (Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res Cardiol* 104:100-110.2009b).
- Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Dusterhoft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V (A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* 279:6190-6195.2004).
- Lu H, Meng X, Yang CS (Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos* 31:572-579.2003).
- Madden JA (Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke. *Neurology* 79:S58-62.2012).

- Malek AM, Alper SL, Izumo S (Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282:2035-2042.1999).
- Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, Jin XJ, Wouters BC, Zhao J (Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 163:1448-1453.2003).
- Marti CN, Gheorghide M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J (Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 60:1455-1469.2012).
- Menet MC, Sang S, Yang CS, Ho CT, Rosen RT (Analysis of theaflavins and thearubigins from black tea extract by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52:2455-2461.2004).
- Mereles D, Hunstein W (Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More Pitfalls than Promises? *Int J Mol Sci* 12:5592-5603.2011).
- Meta MR, Newman EA (Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26:2862-2870.2006).
- Meune C, Touze E, Trinquart L, Allanore Y (Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)* 48:1309-1313.2009).
- Mitra S, Goyal T, Mehta JL (Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 25:419-429.2011).
- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T (Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 131:27-32.2001).
- Miyazawa T (Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *Biofactors* 13:55-59.2000).
- Mizugaki M, Ishizawa F, Yamazaki T, Hishinuma T (Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62:157-164.2000).
- Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N, Razjouyan H, Aghaei M (Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: a case control study. *Clin Neurol Neurosurg* 115:1802-1805.2013).
- Moore RJ, Jackson KG, Minihane AM (Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Br J Nutr* 102:1790-1802.2009).
- Moreau KL, Hildreth KL, Meditz AL, Deane KD, Kohrt WM (Endothelial Function Is Impaired across the Stages of the Menopause Transition in Healthy Women. *J Clin Endocrinol Metab.*2012).
- Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A (Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl

- cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1551-1557.2005).
- Nagaya N, Yamamoto H, Uematsu M, Itoh T, Nakagawa K, Miyazawa T, Kangawa K, Miyatake K (Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart* 90:1485-1486.2004).
- Naka KK, Kalantaridou SN, Bechlioulis A, Kravariti M, Kazakos N, Katsouras CS, Tsatsoulis A, Michalis LK (Effect of ethinylestradiol/cyproterone acetate on endothelial function in young non-obese women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol* 27:615-621.2011).
- Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P (Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 101:545-548.2006).
- Olesen SP, Clapham DE, Davies PF (Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature* 331:168-170.1988).
- Osto E, Coppolino G, Volpe M, Cosentino F (Restoring the dysfunctional endothelium. *Curr Pharm Des* 13:1053-1068.2007).
- Otsuka R, Watanabe H, Hirata K, Tokai K, Muro T, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J (Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. *JAMA* 286:436-441.2001).
- Pache M, Kaiser HJ, Akhmedashvili N, Lienert C, Dubler B, Kappos L, Flammer J (Extraocular blood flow and endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 49:164-168.2003).
- Paltamaa J, Sarasoja T, Wikstrom J, Malkia E (Physical functioning in multiple sclerosis: a population-based study in central Finland. *J Rehabil Med* 38:339-345.2006).
- Park CS, Kim W, Woo JS, Ha SJ, Kang WY, Hwang SH, Park YW, Kim YS, Ahn YK, Jeong MH (Green tea consumption improves endothelial function but not circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Int J Cardiol* 145:261-262.2010).
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schillaci G (Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104:191-196.2001).
- Peters U, Poole C, Arab L (Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 154:495-503.2001).
- Pieringer H, Pichler M (Cardiovascular morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis: vascular alterations and possible clinical implications. *QJM* 104:13-26.2011).
- Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E (Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8:37-44.1986).

- Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S (Oxidative stress in cardiovascular disease and chronic renal failure. *Free Radic Res.*2013).
- Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu MR, Montagnani M (Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem* 16:94-112.2009).
- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M (EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1378-1387.2007).
- Prasad A, Husain S, Quyyumi AA (Effect of enalaprilat on nitric oxide activity in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 84:1-6.1999).
- Prasad A, Zhu J, Halcox JP, Waclawiw MA, Epstein SE, Quyyumi AA (Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 106:184-190.2002).
- Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vecsei L, Milanov I (The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13:700-722.2006).
- Puranik R, Celermajer DS (Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 45:443-458.2003).
- Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Asanuma Y, Sokka T, Pincus T, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM (Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61:1580-1585.2009).
- Roifman I, Sun YC, Fedwick JP, Panaccione R, Buret AG, Liu H, Rostom A, Anderson TJ, Beck PL (Evidence of endothelial dysfunction in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7:175-182.2009).
- Ross R (Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.1999).
- Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG (Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol* 209:241-272.2001).
- Ryu OH, Lee J, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM (Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 71:356-358.2006).
- Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA (Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* 8:177-200.2002).
- Sanae F, Miyaichi Y, Kizu H, Hayashi H (Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aorta with endothelium. *Life Sci* 71:2553-2562.2002).

- Schini-Kerth VB, Etienne-Selloum N, Chataigneau T, Auger C (Vascular protection by natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence. *Planta Med* 77:1161-1167.2011).
- Schreuder TH, Eijsvogels TM, Greyling A, Draijer R, Hopman MT, Thijssen DH (Effect of black tea consumption on brachial artery flow-mediated dilation and ischaemia-reperfusion in humans. *Appl Physiol Nutr Metab* 39:145-151.2014).
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T (Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10:1115-1126.2008).
- Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., Oguma Y, Lee IM (Lack of association between tea and cardiovascular disease in college alumni. *Int J Epidemiol* 32:527-533.2003).
- Shahidi F (Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44:158-163.2000).
- Shechter M, Issachar A, Marai I, Koren-Morag N, Freinark D, Shahar Y, Shechter A, Feinberg MS (Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease. *Int J Cardiol* 134:52-58.2009).
- Shen JZ, Zheng XF, Wei EQ, Kwan CY (Green tea catechins evoke a phasic contraction in rat aorta via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated multiple-signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:88-95.2003).
- Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY (EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta Pharmacol Sin* 28:191-201.2007).
- Siomek A (NF-kappaB signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol* 59:323-331.2012).
- Soltész P, Kerekes G, Der H, Szucs G, Szanto S, Kiss E, Bodolay E, Zeher M, Timar O, Szodoray P, Szegedi G, Szekanecz Z (Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: considerations of prevention and treatment. *Autoimmun Rev* 10:416-425.2011).
- Stangl V, Lorenz M, Stangl K (The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res* 50:218-228.2006).
- Statistisches Bundesamt, Datenreport 2013, Kapitel 8, Gesundheit und soziale Sicherung, S. 234, Autor: K. Böhm, verfügbar unter: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Datenreport/Downloads/Datenreport2013.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Datenreport/Downloads/Datenreport2013.pdf?__blob=publicationFile), Abruf 23.03.2014.
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD (Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97:2601-2610.1996).

- Streppel MT, Sluik D, van Yperen JF, Geelen A, Hofman A, Franco OH, Witteman JC, Feskens EJ (Nutrient-rich foods, cardiovascular diseases and all-cause mortality: the Rotterdam study. *Eur J Clin Nutr.*2014).
- Subramanian N, Venkatesh P, Ganguli S, Sinkar VP (Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J Agric Food Chem* 47:2571-2578.1999).
- Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A (Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101:948-954.2000).
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 97:2222-2229.1998).
- Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, Satomura K, Ohsuzu F, Kurita A (Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol* 82:1535-1539, A1537-1538.1998).
- Tang EH, Vanhoutte PM (Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch* 459:995-1004.2010).
- Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, Moore TH, Burke M, Davey Smith G, Ward K, Ebrahim S (Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD004816.2013).
- Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ (Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H2-12.2011).
- Thomas SR, Witting PK, Drummond GR (Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10:1713-1765.2008).
- Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA (Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 31:552-557.1998).
- Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA (Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97:22-28.1996).
- Tomiyaama H, Kohro T, Higashi Y, Takase B, Suzuki T, Ishizu T, Ueda S, Yamazaki T, Furumoto T, Kario K, Inoue T, Koba S, Watanabe K, Takemoto Y, Hano T, Sata M, Ishibashi Y, Node K, Maemura K, Ohya Y, Furukawa T, Ito H, Yamashina A (A multicenter study design to assess the clinical usefulness of semi-automatic measurement of flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Int Heart J* 53:170-175.2012).

- Tousoulis D, Davies GJ, Crake T, Toutouzas PC (Vasomotion and nitric oxide bioactivity in diseased coronary arteries. *Heart* 87:320-321.2002).
- Trautwein EA, Du Y, Meynen E, Yan X, Wen Y, Wang H, Molhuizen HO (Purified black tea theaflavins and theaflavins/catechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *Eur J Nutr* 49:27-35.2010).
- Tsubono Y, Tsugane S (Green tea intake in relation to serum lipid levels in Middle-aged Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 7:280-284.1997).
- Unno T, Tago M, Suzuki Y, Nozawa A, Sagesaka YM, Kakuda T, Egawa K, Kondo K (Effect of tea catechins on postprandial plasma lipid responses in human subjects. *Br J Nutr* 93:543-547.2005).
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK (Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 38:307-314.2001).
- Vinson JA, Dabbagh YA (Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Lett* 433:44-46.1998).
- Vita JA (Nitric oxide-dependent vasodilation in human subjects. *Methods Enzymol* 359:186-200.2002).
- Vita JA (Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. *J Nutr* 133:3293S-3297S.2003).
- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C (Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Am J Hypertens* 18:785-791.2005).
- Wang ZM, Nie ZL, Zhou B, Lian XQ, Zhao H, Gao W, Wang YS, Jia EZ, Wang LS, Yang ZJ (Flavonols intake and the risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *Atherosclerosis* 222:270-273.2012).
- Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA (Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 131:1731-1737.2001).
- Wei L, MacDonald TM, Walker BR (Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 141:764-770.2004).
- Weisburger JH (Tea and health: a historical perspective. *Cancer Lett* 114:315-317.1997).
- Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J (Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol* 11:565-577.1991).

- Wens I, Dalgas U, Stenager E, Eijnde BO (Risk factors related to cardiovascular diseases and the metabolic syndrome in multiple sclerosis - a systematic review. *Mult Scler* 19:1556-1564.2013).
- Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA, Wiseman S, Keaney JF, Jr., Frei B, Vita JA (Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 38:499-506.2005).
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA (The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42:1149-1160.2003).
- Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, Keaney JF, Jr., Vita JA (Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Nutr* 26:95-102.2007).
- Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS (Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation* 109:1981-1986.2004).
- World Health Organization, Media center, factsheet N° 317, Cardiovascular disease, updated march 2013, verfügbar unter:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, Abruf 23.03.2014.
- Wu AH, Spicer D, Stanczyk FZ, Tseng CC, Yang CS, Pike MC (Effect of 2-month controlled green tea intervention on lipoprotein cholesterol, glucose, and hormone levels in healthy postmenopausal women. *Cancer Prev Res (Phila)* 5:393-402.2012).
- Yasui K, Paeng N, Miyoshi N, Suzuki T, Taguchi K, Ishigami Y, Fukutomi R, Imai S, Isemura M, Nakayama T (Effects of a catechin-free fraction derived from green tea on gene expression of enzymes related to lipid metabolism in the mouse liver. *Biomed Res* 33:9-13.2012).
- Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM (Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 120:502-509.2009).
- Yoshida H, Kisugi R (Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411:1875-1882.2010).
- Zhang L, Fujii S, Igarashi J, Kosaka H (Effects of thiol antioxidant on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Free Radic Biol Med* 37:1813-1820.2004).
- Zheng Y, Song HJ, Kim CH, Kim HS, Kim EG, Sachinidis A, Ahn HY (Inhibitory effect of epigallocatechin 3-O-gallate on vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:200-208.2004).

### **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Laura Charlotte Klinkner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkungen von Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) auf die Endothelfunktion von Patienten mit Multipler Sklerose und in-vitro Untersuchungen der EGCG-vermittelten Vasodilatation“ selbstständig und ohne nicht offengelegter Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 15.05.2014

---

Laura Klinkner

**Anteilserklärung an u.g.Veröffentlichung (submitted for publication)**

Frau Laura Charlotte Klinkner hatte folgenden Anteil an der folgenden Arbeit:

**Mario Lorenz M, Klinkner L, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) does not induce vasodilation in eNOS knockout (eNOS<sup>-/-</sup>) mice. [submitted for publication].**

Beitrag im Einzelnen: Planung und Konzeption des Experiments ca. 50%, Durchführung der Gefäßringtestungen 30%.

Unterschrift der Doktorandin

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

**Publikationsliste**

Mario Lorenz M, Klinkner L, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) does not induce vasodilation in eNOS knockout (eNOS<sup>-/-</sup>) mice. [submitted for publication].

## Danksagung

Ich danke herzlich Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die sehr persönliche Betreuung, die in diesem Ausmaß nicht selbstverständlich ist. Ganz besonders möchte ich mich bedanken für die guten Ratschläge, die nicht immer nur unmittelbar meine Dissertation betrafen.

Der nächste Dank geht an Dr. rer. nat. Mario Lorenz, für seine unendliche Geduld, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und in allen Phasen dieser Arbeit mit seinen kritischen Anmerkungen zu ihrem Gelingen maßgeblich beigetragen hat.

Claudia Kuhn möchte ich meinen Dank aussprechen, und dem ganzen restlichen Team der „Endothelfunktion“. Ich danke besonders Dipl. Ing. Thomas Düsterhöft für das Beibringen der Methoden, die zuverlässige Hilfe und die nützlichen Tipps.

Nicht fehlen soll der Dank an meine Freunde, besonders erwähnen will ich Rosa Rendtorff, die mich zugleich auch als langjährige Mitbewohnerin stets mit Rat und Tat begleitet hat.

Und zuletzt vielen Dank John Buckendahl und meinen Eltern Viktoria und Walter Klinkner, die mich in allen Phasen dieser Dissertation liebevoll unterstützten.