

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

DISSERTATION

Einfluss von Tee-Polyphenolen auf die Endothelfunktion beim  
Menschen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christine Hofer

aus Cottbus

Datum der Promotion: 25.06.2017

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Funktionen des Endothels.....	10
1.2 FMD als prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen.....	12
1.3 Flow-mediated dilation als Methode der Endothelfunktionsmessung.....	14
1.4 Kardiovaskuläre Risikoreduktion durch Polyphenole.....	15
1.5 Endothelfunktionsstudien zu polyphenolhaltigen Nahrungsmitteln.....	17
1.6 Endothelfunktionsstudien zu Schwarzem und Grünem Tee.....	18
1.7 Die Inhaltsstoffe des Grünen Tees.....	19
1.8 <i>In-vitro</i> -Studien zur Wirkung von Tee-Catechinen auf das Endothel.....	23
1.9 Fragestellung.....	24
<b>2. Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Probandenrekrutierung.....	26
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	27
2.3 Studiendesign.....	28
2.4 Zubereitung der Interventionen.....	29
2.5 Durchführung der FMD- und GTN-Messung.....	30
2.6 Versuchsaufbau zur FMD-Messung.....	33
2.7 Computergestützte Auswertung.....	35
2.7.1 Grundkalibrierung der Software <i>Cardiovascular Suite</i> .....	35
2.7.2 Software <i>Cardiovascular Suite</i> .....	38
2.7.3 Ablauf der Software-gestützten FMD- und GTN-Messung.....	41
2.8 Blutabnahmeprotokoll und Weiterverarbeitung der Proben.....	45
2.9 Statistische Auswertung.....	47
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1 Vergleich der Inhaltsstoffe in den Interventionen	
Grüner Tee und Grüntee-Extrakt.....	49
3.2 Probandenrekrutierung und Basischarakteristika der Studienpopulation.....	49
3.3 Vergleich der FMD-Messungen.....	52
3.4 Vergleich der GTN-Messungen.....	56
3.5 Plasmakonzentrationen von Catechinen und Korrelation mit FMD.....	58

---

3.6 Bestimmung von Theophyllin, Theobromin, Koffein und Korrelationen mit FMD.....	62
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1 FMD-Veränderung nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	67
4.2 Korrelationen von Catechin-Plasmakonzentrationen mit der FMD-Veränderung nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	72
4.3 Korrelation von Theophyllin, Theobromin und Koffein mit dem Anstieg der FMD nach Grünem Tee .....	75
4.4 Ausblick .....	80
Literaturverzeichnis.....	81
Eidesstattliche Versicherung .....	93
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	94
Lebenslauf .....	95
Danksagung .....	97

---

## Zusammenfassung

Die Schädigung des Endothels steht häufig am Anfang in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und führt zu einer endothelialen Dysfunktion. Diese ist unter anderem durch eine verminderte NO-Produktion in Endothelzellen gekennzeichnet und kann schon sehr früh im Verlauf von kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet werden. Sie kann mit Hilfe von Endothelfunktionsmessungen quantifiziert werden, wobei sich die Messung der Fluss-abhängigen Vasodilatation (Flow-mediated dilation; FMD) als Messmethode etabliert hat. Geringe FMD-Werte korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt und Schlaganfall und gelten als frühprognostischer Faktor zur Bestimmung des individuellen kardiovaskulären Risikos.

Der Verzehr von sekundären Pflanzenstoffen geht mit einem verminderten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einher und zeigte in einigen Interventionsstudien positive Effekte auf die FMD. Grüner Tee, der reich an Polyphenolen und insbesondere an Catechinen ist, führte in einer Reihe von Studien zu einem Anstieg der FMD.

Unklar bleibt jedoch, ob dieser positive Effekt überwiegend auf die Wirkung der enthaltenen Catechine zurückzuführen ist. EGCG (Epigallocatechingallat) erwies sich dabei *in vitro* als das kardio- und vasoprotektiv wirkungsvollste der Tee-Catechine. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch darüberhinaus andere Stoffe im Grünen Tee für den FMD-Anstieg verantwortlich sind.

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine prospektive Cross-over-Studie an 50 gesunden Probanden durchgeführt, die in randomisierter Reihenfolge an unterschiedlichen Messtagen eine identische Menge von 200 mg EGCG als Grünen Tee, Grüntee-Extrakt, reines EGCG oder Wasser als Kontrolle zu sich nahmen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte nach der Verabreichung von Grünem Tee, Grüntee-Extrakt und Wasser als Teil der Studienergebnisse ausgewertet und beschrieben.

Dabei wurde die FMD jeweils vor und zwei Stunden nach Substanzeinnahme gemessen. Zusätzlich wurden die Plasmakonzentrationen der Tee-Inhaltsstoffe vor und nach Substanzeinnahme bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang mit der Veränderung der FMD-Werte herstellen zu können. Zwei Stunden nach Grünem Tee konnte eine signifikante Steigerung der FMD von 4,49% auf 5,85% um 1,36% beobachtet werden. Die Einnahme von reinen Catechinen in Form von Tee-Extrakt hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die FMD. Es gab bei beiden Interventionen keine signifikante Korrelation zwischen Catechin-Plasmaspiegeln und der Veränderung der FMD-Werte.

Veränderungen in den Plasmakonzentrationen von Koffein, Theophyllin und Theobromin als weitere Inhaltsstoffe des Grünen Tees korrelierten ebenfalls nicht signifikant mit dem Anstieg der FMD nach Grünem Tee.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Catechine allem Anschein nach nicht für eine Verbesserung der Endothelfunktion durch Grünen Tee verantwortlich sind. Vielmehr scheint das Zusammenwirken mehrerer im Tee enthaltener Stoffe eine Rolle zu spielen.

## Abstract

Damaging of the endothelium often stands at the beginning of the pathogenesis of cardiovascular disease and causes endothelial dysfunction. This is characterized by low nitric oxide production in endothelial cells and can be found in the early onset of cardiovascular disease. By assessing the endothelial function with flow-mediated dilation (FMD) as an established method of measurement, it is possible to quantify the loss of endothelial function. A low FMD correlates with a higher risk for myocardial infarction and stroke and is a prognostic marker for the individual cardiovascular risk profile.

The consumption of secondary plant-based substances is associated with a decreased risk for developing cardiovascular diseases and interventional studies indicate a positive effect on FMD. Drinking green tea, that is rich in polyphenols and especially in catechins, showed an increase in FMD in previous studies.

However, it remains unknown whether the positive effect of green tea consumption is predominantly mediated by the catechins. *In vitro* EGCG (epigallocatechingallate) proved most effective of all green tea catechins in terms of cardio- and vasoprotection. But the role of other substances in green tea in the increase of FMD in humans is unresolved.

To elucidate this question, a prospective cross over study with 50 healthy subjects was performed. Participants ingested an equivalent amount of 200 mg EGCG in form of green tea, green tea extract or pure EGCG in a randomized order and FMD measurements were performed on different days. Water served as a control. The present work describes the results for green tea, green tea extract and water as part of the study results.

FMD was measured before and two hours after the ingestion of each intervention. In addition, plasma concentrations of tea polyphenols, caffeine, theobromin and theophylline before and after ingestion were measured for a potential correlation with changes in FMD. Two hours after green tea, a significant increase of 1.36% in FMD from 4.49% to 5.85% was observed. The intake of catechins as green tea extract had no significant effect on endothelial function. There was no significant correlation between catechin plasma levels and changes in FMD in both interventions.

Changes in the plasma levels of caffeine, theophylline and theobromine as additional substances in green tea, did not correlate significantly with the increase of FMD after green tea consumption.

The results of this study show that catechins alone are apparently not responsible for the improvement of FMD caused by green tea. In addition, the findings suggest that the combination of tea substances and their synergistic effects could explain the positive effect of green tea on the cardiovascular system.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Der dreischichtige Wandaufbau einer menschlichen Arterie .....	10
Abbildung 2. Allgemeine Strukturformel eines Flavonoids .....	20
Abbildung 3. Allgemeine Strukturformel eines Catechins .....	21
Abbildung 4. Strukturformeln der vier Haupt-Catechine im Grünen Tee .....	22
Abbildung 5. Versuchsaufbau und Lagerung des Untersuchungsarms .....	34
Abbildung 6. Settings .....	36
Abbildung 7. Doppler Flow Analysis Configuration .....	37
Abbildung 8. FMD-Studio .....	39
Abbildung 9. Mean Diameter Chart nach einer abgeschlossenen FMD-Messung .....	41
Abbildung 10. GTN-Studio .....	43
Abbildung 11. Mean Diameter Chart nach einer abgeschlossenen GTN-Messung .....	44
Abbildung 12. Flow-Diagramm der Studie .....	50
Abbildung 13. Vergleich der Ausgangsdurchmesser (A) und der FMD-Messungen (B) vor Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	52
Abbildung 14. Gegenüberstellung der FMD-Messungen vor und zwei Stunden nach Substanzeinnahme .....	53
Abbildung 15. Vergleich der FMD-Messungen zwei Stunden nach der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	54
Abbildung 16. Vergleich der FMD-Werte zum Zeitpunkt t0 und t2 in den Studienarmen Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt .....	55
Abbildung 17. Vergleich der FMD-Change von Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt .....	56
Abbildung 18. Vergleich der GTN-Messungen vor und zwei Stunden nach der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	57
Abbildung 19. Plasmakonzentrationen der einzelnen sowie der Summe der Catechine zwei Stunden nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt .....	59
Abbildung 20. Korrelation der Catechin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse und der FMD-Change zwei Stunden nach Grünem Tee .....	60
Abbildung 21. Korrelation der Catechin-Konzentrationen nach Hydrolyse und FMD-Change zwei Stunden nach Grüntee-Extrakt .....	61
Abbildung 22. Plasmaspiegel von Theophyllin, Theobromin und Koffein vor und zwei Stunden nach 442 ml Grünem Tee .....	63
Abbildung 23. Korrelation der Plasma-Konzentrationsveränderung von Theophyllin, Theobromin und Koffein sowie die absolute Koffeinkonzentration mit der FMD-Change zwei Stunden nach Grünem Tee .....	64



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Biochemisch aktive Stoffe in Grünem Tee .....	20
Tabelle 2.	Einschlusskriterien. ....	27
Tabelle 3.	Materialien zur Zubereitung der Interventionen .....	29
Tabelle 4.	Interventionen.....	29
Tabelle 5.	Zeitlicher Ablauf der FMD- und GTN-Messungen .....	31
Tabelle 6.	Materialien zur FMD-Messung und Erfassung der Daten. ....	33
Tabelle 7.	Materialien für die Blutabnahme.....	45
Tabelle 8.	Materialien für die Weiterverarbeitung der Proben .....	45
Tabelle 9.	Zeitpunkt der Parameter-Bestimmung im Studienablauf und die dazugehörigen Vakuumröhrchen .....	45
Tabelle 10.	Ascorbinsäure-Puffer zur Catechin-Stabilisierung.....	46
Tabelle 11.	Vergleich der Inhaltsstoffe im Grünen Tee und Grüntee-Extrakt.....	49
Tabelle 12.	Basischarakteristika der 50 Teilnehmer .....	51
Tabelle 13.	Übersichtstabelle der FMD- und GTN-Messungen sowie der Plasmakonzentrationen der Tee-Inhaltsstoffe .....	66

---

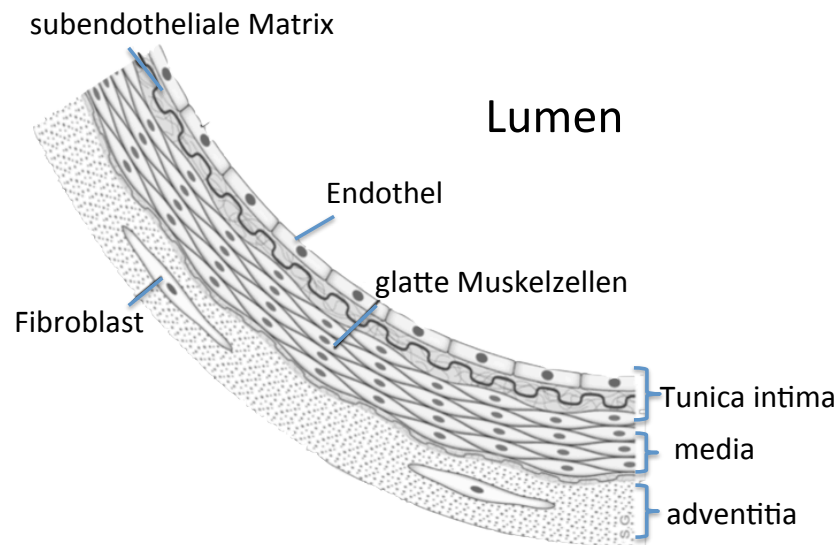
## Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass-Index
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FMD	Flow-mediated Dilation
GTE	Grüntee-Extrakt
GTN	Glyceryl trinitrate, Glyceryl trinitrate-induced Vasodilatation
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin, ein NO-Synthase-Hemmer
MS	Multiple Sklerose
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

# 1. Einleitung

## 1.1 Funktionen des Endothels

Die großen Gefäße im menschlichen Körper besitzen typischerweise einen dreischichtigen Wandaufbau (Abbildung 1).



**Abbildung 1. Der dreischichtige Wandaufbau einer menschlichen Arterie**

Die drei Schichten der Gefäßwand von innen nach außen.

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Ghesquiere<sup>1</sup>.

Die äußerste Schicht, Adventitia (*Tunica adventitia*), besteht vorwiegend aus kollagenem Bindegewebe in variabler Stärke. Nach Innen in Richtung Lumen, grenzt die Adventitia an die Media (*Tunica media*). Diese mittlere Schicht wird durch spiralig angeordnete, glatte Muskelzellen gebildet, die in einer extrazellulären Matrix aus Proteoglykanen, Kollagen und Elastin verankert sind. Die Muskelzellen der *Tunica media* sind untereinander durch porenbildende Proteine (*Gap Junctions/Connexone*) verbunden. Diese Gap Junctions liegen sich in der jeweiligen Muskelzellmembran gegenüber und ermöglichen einen schnellen Austausch von Ionen und kleinen Molekülen. Auf diese Weise kann die Depolarisation von einer Zelle an die sie umgebenden Zellen weitergeleitet werden. Die *Tunica media* agiert damit als mehrkernige Zelleinheit (*Synzytium*). Bei einer Kontraktion üben die Muskelzellen aufgrund ihrer Ausrichtung einen Zug in alle Richtungen aus, was zur Vasokonstriktion und damit zu einer Verkleinerung des Gefäßlumens führt.

Das Innere der Gefäße ist mit der schmalen Intima (*Tunica intima*), bestehend aus dem einschichtigem Endothel und der darunterliegenden subendothelialen Matrix, ausgekleidet.<sup>2,3</sup>

Das Endothel ist für die Gefäßgesundheit und die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen von zentraler Bedeutung. Die Zellen der innersten Gefäßschicht übernehmen eine Vielzahl wichtiger Regulierungsprozesse und üben durch ihre hohe Stoffwechselaktivität eine Barriere Funktion zwischen den im Blut zirkulierenden Stoffen und dem Organismus aus.<sup>4</sup> Das Endothel ist für die Bildung verschiedener Substanzen, wie beispielsweise vasokonstriktorisch wirkendes Endothelin-1 und Thromboxan oder vasodilatatorisch wirkende Mediatoren (Stickstoffmonoxid [NO] oder Prostaglandine, v.a. PGI<sub>2</sub>), verantwortlich und kann damit den Gefäßtonus regulieren.<sup>4,5</sup>

NO vermittelt insbesondere die Weitstellung größerer arterieller Gefäße.<sup>4</sup> Dieser endogene Dilatator wird in Endothelzellen mithilfe der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus L-Arginin abgespalten und diffundiert frei in die darunterliegende Media.<sup>6</sup> In den glatten Muskelzellen der *Tunica media* bindet NO an die lösliche Guanylatcylase, die daraufhin aktiviert wird und aus Guanosintriphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) generiert.<sup>7</sup> Der steigende cGMP-Spiegel führt über die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen (u.a. Proteinkinase B) zu einer Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion und damit zu einer Vasodilatation.<sup>4</sup>

Arterien des menschlichen Körpers können auf physikalische Beanspruchung mit einer Modulation des Gefäßdurchmessers reagieren. Durch einen erhöhten intraluminalen Blutfluss wirken Schub- oder Scherkräfte (*Shear Stress*) auf Endothelzellen ein. Dadurch öffnen mechanosensible Calcium-Kanäle in der Zellmembran und es gelangt vermehrt Ca<sup>2+</sup> in das Cytosol.<sup>8,9</sup> Induziert durch *Shear Stress* öffnen spezielle Kalium-Kanäle, was eine Negativierung des Membranpotentials nach sich zieht und den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom weiter begünstigt.<sup>10</sup> Das zytosolische Ca<sup>2+</sup> steigert in einem Calcium-Calmodulin-Komplex die eNOS-Aktivität, sodass mehr NO in den Endothelzellen produziert wird.<sup>11</sup> Acetylcholin und Bradykinin bewirken rezeptorvermittelt ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> und damit eine vermehrte NO-Produktion.<sup>4</sup>

Neben der Funktion als endogener Gefäßdilator besitzt NO ein breites vasoprotektives Wirkungsspektrum und ist von großer Bedeutung für die Funktionstüchtigkeit der Endothelzellschicht.<sup>12</sup> Es kann unter anderem antithrombotisch<sup>13,14</sup>, antiinflammatorisch<sup>15,16</sup> sowie antihypertensiv<sup>17-21</sup> wirksam werden. NO vermindert die Oxidierung von LDL<sup>22</sup> und wirkt antiproliferativ auf glatte Muskelzellen<sup>23</sup>. Darüber hinaus verhindert es die Leukozytenadhäsion, indem es die Expression entsprechender Oberflächenmoleküle hemmt.<sup>23</sup> Dadurch können schädliche Prozesse in der Gefäßwand und die Entstehung arteriosklerotischer Plaques durch NO aufgehoben oder verlangsamt werden. Durch eine verminderte NO-Produktion in geschädigten Endothelzellen ist keine adäquate Gefäßreaktion auf Beanspruchung möglich. Dieses Stadium wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und tritt sehr früh in der Genese kardiovaskulärer Erkrankungen auf.<sup>3,24</sup>

Aus der abnehmenden Gefäßreagibilität resultieren höhere intravasale Drücke und eine erhöhte Flussgeschwindigkeit des Blutes. Diese Beanspruchung führt über einen längeren Zeitraum zu einer ausgedehnten Schädigung der Intima. Es entsteht ein sich selbst verstärkender Kreislauf, der zu einer fortschreitenden Zerstörung der Endothelintegrität führt.<sup>3</sup> Bei einer eingeschränkten Funktion der eNOS und einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit in Endothelzellen fällt auch die Gefäßdilataion als Antwort auf *Shear Stress* geringer aus. Dies kann mittels Endothelfunktionsmessungen quantifiziert werden. Die Messung der Flow-mediated dilation (FMD) als eine mögliche Messmethode für Endothelfunktion bietet sich zur Einschätzung des individuellen kardiovaskulären Erkrankungsrisikos an und kann als sensitiver frühprognostischer Faktor genutzt werden.<sup>24,25</sup>

## 1.2 FMD als prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen

Als Ursachen für die Entstehung von Arteriosklerose wurden neben Hypertonus, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Nikotinkonsum auch riskantes Essverhalten, ein hoher BMI und mangelnde körperliche Aktivität als Risikofaktoren identifiziert.<sup>26</sup> Erkrankungen des vaskulären Systems gehen in den meisten Fällen Schädigungen des Endothels voraus, die zu einer endothelialen Dysfunktion führen. Dies ist vor allem durch eine verminderte NO-Produktion in Endothelzellen gekennzeichnet<sup>27</sup> und kann mithilfe von Endothelfunktionsmessungen wie der FMD-Bestimmung nachgewiesen werden.

Ein frühzeitiges Eingreifen in die Krankheitsentstehung und eine Abschätzung des individuellen kardiovaskulären Risikoprofils wird so möglich.<sup>24,25,27,28</sup>

Maruhashi et al. zeigten in einer FMD-Studie an Teilnehmern aller Altersgruppen (17-86 Jahre), dass entsprechend des individuellen kardiovaskulären Risikos, signifikant unterschiedliche FMD-Werte gemessen werden konnten (ohne Risikofaktor FMD:  $6,7 \pm 3,6$  %; ein Risikofaktor FMD:  $5,5 \pm 3,0$  %; kardiovaskuläre Vorerkrankung FMD:  $4,9 \pm 3,0$  %,  $p < 0,001$ ).<sup>29</sup> Das Probandenalter, BMI- und Blutdruckwerte, Nikotinabusus sowie Diabetes mellitus besaßen einen Einfluss auf die FMD.<sup>29</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass niedrige an der Brachialarterie gemessene FMD-Werte, mit der endothelialen Dysfunktion in Koronargefäßen korrelierten.<sup>30</sup> Patienten mit einer normalen Endothelfunktion der Koronarien hatten eine signifikant höhere FMD der Brachialarterie, als Individuen bei denen in den Herzkranzgefäßen eine verminderte Reaktion auf eine Acetylcholin-Perfundierung nachgewiesen werden konnte. Der prognostische Wert der FMD-Messung wurde in einem längerfristigen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren bestätigt. Patienten mit einer FMD von  $\leq 1,9$  % hatten ein deutlich erhöhtes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis.<sup>31</sup> Diese Ergebnisse unterstreichen den Aussagewert der FMD als unabhängigen prognostischen Faktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. In der Metaanalyse von Ras et al. in die insgesamt 23 Studien mit 14.753 Teilnehmern eingingen, wurden die FMD-Werte mit dem kardiovaskulären Risiko korreliert.<sup>32</sup> Die Auswertung der Studien zeigte, dass mit einer Verminderung der FMD um 1 % das absolute Risiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen um 0,92 stieg. Dieser Zusammenhang war bei Vorerkrankten deutlich stärker ausgeprägt als bei Gesunden.<sup>32</sup>

Die Messung der FMD ist eine schnell durchführbare, kostengünstige und nicht-invasive Methode, die diagnostische Hinweise auf eine eingeschränkte Endothelfunktion gibt. Darüber hinaus kann eine verminderte FMD sehr früh in der Arteriosklerose-Entstehung festgestellt werden.<sup>33</sup> Auf diese Weise entsteht ein Behandlungsspielraum, der es ermöglicht das individuelle kardiovaskuläre Risiko zu beeinflussen, noch bevor makroskopisch erkennbare Gefäßläsionen auftreten. Neben der Reduktion von Risikofaktoren, wie mangelnde Bewegung, erhöhte Blutfettwerte, erhöhter Blutzuckerspiegel und Rauchen, kann auch die Ernährung einen wichtigen Beitrag zur Gefäßgesundheit leisten.

### 1.3 Flow-mediated dilation als Methode der Endothelfunktionsmessung

Die komplexen und vielfältigen Aufgaben des Endothels machen es schwierig, seine Funktion mit einer Messgröße zusammenzufassen. Celermajer et al.<sup>24</sup> versuchten eine adäquate und aussagekräftige Messmethode zu etablieren und beschrieben 1992 erstmals einen Versuchsaufbau, indem die sogenannte flussvermittelte Vasodilatation (Flow-mediated dilation, FMD) gemessen wurde.

Der Ablauf der ultraschallgestützten Endothelfunktionsbestimmung bildet bis heute die Grundlage der FMD-Messung. Durch das Aufpumpen einer Blutdruckmanschette am Unterarm wird eine Unterversorgung weiter distal induziert. Durch das zügige Ablassen und die reaktive Hyperämie entsteht temporär ein erhöhter arterieller Blutfluss, der als *Shear Stress* auf die Gefäßwände einwirkt. Diese erhöhte Wandspannung ist der physiologische Stimulus, auf den das Endothel mit einer erhöhten NO-Produktion reagiert. Dies bewirkt eine Vasodilatation, die mittels Gefäßultraschall erfasst wird.<sup>34</sup> Die Fähigkeit des Endothels ausreichend NO zu synthetisieren bildet, wie bereits beschrieben, einen wichtigen Indikator für die Gefäßgesundheit.<sup>34</sup> *In vitro* wurde gezeigt, dass es durch die Zugabe eines NO-Synthase-Hemmers (N-Monomethyl-L-Arginin, L-NMMA) zu einer signifikanten Verminderung der flussvermittelten Vasodilatation kommt.<sup>35</sup> Dies verdeutlicht die NO-Abhängigkeit dieser Gefäßreaktion. Pohl et al. zeigten am Tiermodell, dass Gefäße auf einen erhöhten intraluminalen Blutfluss mit einer Weitstellung reagieren, vorausgesetzt sie besitzen eine intakte Endothelzellschicht. Nach Entfernung des Endothels konnte die Zunahme des Gefäßdurchmessers als Reaktion auf den Stimulus nicht mehr beobachtet werden.<sup>36</sup> Dies konnte von Green et al. durch Studien am Menschen bestätigt werden. Auch hier war die FMD von gesunden Probanden nach einer L-NMMA-haltige Infusion stark vermindert.<sup>28,37</sup>

Der zugrundeliegende Mechanismus der Vasodilatation bei der FMD ist bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt. Neben NO scheinen, abhängig vom Stromgebiet, andere Botenstoffe wie PGI<sub>2</sub> und der Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) eine Rolle zu spielen.<sup>38</sup> An Arteriolen eNOS-negativer Mäuse, dessen Endothel durch das fehlende Gen nicht in der Lage war NO zu synthetisieren, konnte ebenfalls eine Gefäßerweiterung als Antwort auf *Shear Stress* gemessen werden. Verabreichte man diesen Tieren einen Cyclooxygenase-Hemmer

(Indometacin), der die Produktion von Prostaglandin inhibiert, blieb die Vasodilatation aus. Daraufhin postulierten die Autoren dieser Studie, dass Prostaglandine in einigen Stromgebieten zur FMD beitragen und insbesondere bei einem verminderten NO-Angebot eine geringfügige Erweiterung des Gefäßdurchmessers hervorrufen.<sup>39</sup>

Nach der FMD-Bestimmung wird im Rahmen von Studien auch die endothelunabhängige Vasodilatation gemessen, die durch die Verabreichung von Nitroglycerin (*GTN*, Glyceryl trinitrate, GTN-induced Vasodilatation) bewirkt wird. Durch das im Überschuss zugeführte NO erreicht das Gefäß seinen maximalen Durchmesser unabhängig von der endothelialen NO-Produktion. Durch die GTN-Messungen können Rückschlüsse auf die Funktionstüchtigkeit der Media gezogen werden, da das zugeführte NO eine direkte Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand hat. Eine verminderte GTN kann auf einen Elastizitätsverlust der Arterienwände hinweisen, was wiederum zu einer Verfälschung der Messwerte bei der FMD-Bestimmung führen kann.<sup>40</sup> Insbesondere bei FMD-Untersuchungen im Rahmen von Interventionsstudien bietet die anschließende GTN-Messung die Möglichkeit zur Unterscheidung einer endothelabhängigen von einer endothelunabhängigen Vasodilatation.<sup>41</sup>

## 1.4 Kardiovaskuläre Risikoreduktion durch Polyphenole

Einen günstigen Einfluss auf die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen scheint der Verzehr von sekundären Pflanzenstoffen zu besitzen. Einige Autoren berichteten von der Assoziation eines regelmäßigen und hohen Konsums dieser Stoffe mit einem verminderten kardiovaskulären Risiko. Beispielsweise wies die epidemiologische „Zutphen Elderly Study“<sup>42</sup> an 805 männlichen Probanden eine Korrelation zwischen einem hohen Polyphenolgehalt in der Nahrung und der verminderten Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach. Die Teilnehmer dieser Studie wurden mittels Interview zu ihren Ess- und Trinkgewohnheiten befragt, wobei sich zeigte, dass Probanden mit einem hohen Flavonoid-Konsum weniger oder später Myokardinfarkte erlitten. Selbst in der von hohem BMI, Rauchen, erhöhtem Gesamtcholesterin, niedrigem HDL und hohem Bluthochdruck bereinigten Statistik blieb der positive Effekt der Flavonoide statistisch signifikant.<sup>42</sup> Ähnliche Ergebnisse ergab eine finnische Langzeitstudie in einem Follow-up von mehr als 20 Jahren.



Hier zeigte sich ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen hoher Flavonoid-Aufnahme und der Mortalität für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.<sup>43</sup> Andere Studien belegten, dass die unterschiedlichen Inzidenzen kardiovaskulärer Erkrankungen in verschiedenen Ländern unter anderem auf die Essgewohnheiten der Bevölkerung und den Verzehr von Flavonoiden zurückzuführen ist.<sup>44</sup>

In asiatischen Ländern, wie beispielsweise Japan, in denen hauptsächlich durch den Verzehr von Grünem Tee täglich sehr viel Flavonoide (ca. 70 mg/d) aufgenommen werden, erlitten deutlich weniger Menschen einen Herzinfarkt und auch das durchschnittliche Erkrankungsalter lag signifikant höher.<sup>44,45</sup> Bei Herzkatheter Untersuchungen zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Stenosegrad der Herzkranzgefäße und dem zuvor erfassten Teekonsum der Studienteilnehmer. In den Gefäßen von Patienten, die täglich mehr als vier Tassen Grünen Tee zu sich zu nahmen, wurden wesentlich weniger relevante Stenosen festgestellt als in einer Vergleichsgruppe von Probanden, die angaben keinen Tee zu trinken.<sup>46,47</sup> Hinzukommt, dass auch das Langzeitüberleben nach einem Myokardinfarkt durch den regelmäßigen Genuss von Grünem oder Schwarzem Tee verbessert werden konnte.<sup>48</sup>

Flavonoide können unter anderem durch die Senkung der Serumlipide der Entstehung und dem Fortschreiten einer Arteriosklerose entgegenwirken. Imai et al. wie auch Stensvold et al. zeigten, dass eine hohe Flavonoid-Aufnahme mit einem signifikant geringerem Cholesterin- und Triglyceridspiegel sowie einem niedrigerem Arteriosklerose-Index (LDL/HDL-Quotient) einherging.<sup>49,50</sup> Der oxidative Status der Lipide konnte durch die regelmäßige Aufnahme von Flavonoiden zusätzlich verbessert werden. Der Spiegel an oxidiertem LDL (oxLDL) sank, wenn über den Tag verteilt zehn oder mehr Tassen Grüner Tee verzehrt wurden.<sup>49</sup> Auch der negative Effekt von Zigarettenrauchen, einer der Hauptursachen für erhöhten oxidativen Stress, konnte durch Teekonsum vermindert werden.<sup>49,51</sup> Zahlreiche Studien zeigten, dass ein hoher Flavonoid-Verzehr primär und sekundär präventiv gegen die Entstehung von Arteriosklerose und den damit verbundenen Komplikationen wirksam sein kann. Zum vielfältigen Wirkungsspektrum dieser Stoffgruppe gehört auch die positive Beeinflussung der Endothelfunktion, was im Rahmen einiger FMD-Studien in Kurz- und Langzeitinterventionen untersucht wurde.<sup>52-55</sup>

## 1.5 Endothelfunktionsstudien zu polyphenolhaltigen Nahrungsmitteln

Sekundäre Pflanzenstoffe sind Substanzen, die in farbigen Blatt- und Fruchtanteilen vorkommen und der Pflanze unter anderem zur Abwehr von Schädlingen dienen.<sup>56</sup> Ein Teil dieser Stoffe sind phenolische Verbindungen und werden als Xanthone, Glycoside, Phenole oder Polyphenole bezeichnet. Die Polyphenole werden abhängig von ihren funktionellen Gruppen in eine Vielzahl von Unterklassen unterteilt. Flavonoide gehören zu den Polyphenolen und kommen vermehrt in der Schale von Obst- und Gemüsesorten vor. Flavonoide können wiederum in andere Substanzgruppen wie Catechine, Isoflavone, Anthocyane unterteilt werden.<sup>56</sup> Die Effekte, die mit dem Verzehr dieser und anderer Flavonoide aus verschiedenen Lebensmitteln (Obst, Gemüse, Tee, Rotwein und Kakao) in Zusammenhang gebracht werden, untersucht man seit einigen Jahren sehr intensiv.<sup>51,57-59</sup> Im Zuge dessen wurden diverse Wirkmechanismen beschrieben, die den positiven Einfluss der Polyphenole auf die Endothelfunktion erklären könnten.

Anthocyane sind die Haupt-Flavonoide in Beeren und finden sich vor allem in dunkel gefärbten Pflanzenteilen.<sup>60</sup> In Endothelfunktionsstudien vermochte eine Supplementation mit reinen Anthocyanen eine signifikante Steigerung der FMD im Vergleich zu Placebo zu bewirken.<sup>55</sup> Diese FMD-Steigerung korrelierte mit dem Anstieg von cGMP, das als Indikator für Vasorelaxation herangezogen wurde. Davon leiteten die Autoren dieser Studie ab, dass eine verbesserte Vasodilatation durch Anthocyane am ehesten auf einer Aktivitätszunahme der NO-Synthase beruhte. Diese Annahme wurde gestützt durch einen weiteren Studienansatz, bei dem durch die Hemmung der eNOS (durch die Zugabe von L-NMMA) keine FMD-Verbesserung durch Anthocyane gezeigt werden konnte.<sup>55</sup>

Weintrauben enthalten neben Anthocyanen noch weitere biochemisch aktive Substanzen, wie Resveratrol, Delphinidin oder Quercetin.<sup>54</sup> Diese Stoffe bleiben auch in der Weiterverarbeitung der Trauben zu Wein enthalten. Der Genuss von Rotwein wird als einer der Gründe diskutiert, weshalb die Inzidenz von Myokardinfarkten in Ländern wie Frankreich, trotz des hohen Verzehrs von gesättigten Fettsäuren, wesentlich niedriger ist als in anderen europäischen Ländern („Französisches Paradoxon“).<sup>61</sup>

In FMD-Studien zeigte sich vor allem die positive Akutwirkung von alkoholfreiem Rotwein, der in einer Interventionsstudie einen höheren Anstieg der FMD bewirkt als das Kontrollgetränk mit normalem Alkoholgehalt.<sup>62-64</sup> Die Verbesserung der Endothelfunktion schien durch die Wirkung der enthaltenen Flavonoide begründet zu sein, da sich auch die Einnahme von Rotwein-Extrakt, bestehend aus Epicatechin, Catechin und trans-Resveratrol, positiv auf die FMD auswirkte.<sup>54</sup> Darüber hinaus konnte für Resveratrol eine erhöhte Promotoraktivität am codierenden Abschnitt der NO-Synthase nachgewiesen werden, was eine verstärkte Expression dieses Schlüssel-Enzyms zur Folge hatte.<sup>65</sup>

Ein weiteres flavonoidhaltiges Genussmittel mit FMD-verbessernder Wirkung ist Kakao. Dunkle Schokolade enthält, je nach Fertigungsprozess, viele freie Flavonoide, vor allem Catechine und Epicatechine.<sup>56,58</sup> Der Verzehr von Kakao als Schokolade oder Getränk konnte nachweislich eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirken. Dabei profitierten kardiovaskulär gesunde Individuen<sup>52</sup> und Patienten mit einer bereits bestehenden, durch Rauchen<sup>66</sup> oder Diabetes mellitus<sup>67</sup> verursachten endothelialen Dysfunktion, gleichermaßen. In einer Langzeitintervention über eine Woche wurde nach täglich dreimaligem Genuss eines Kakaogetränks eine schrittweise Verbesserung der FMD-Werte beobachtet.<sup>66</sup> *In vitro* bewirkten Epicatechine, die hochkonzentriert in Kakaobohnen zu finden sind, eine gesteigerte Enzymaktivität der eNOS.<sup>68</sup> Passend dazu konnte an Probanden zwei Stunden nach dem Genuss von Kakao neben einem FMD-Anstieg eine Erhöhung der NO-Metabolite im Blut nachgewiesen werden.<sup>67</sup> Andere experimentelle Studien zeigten, dass die antioxidativen Eigenschaften der Catechine eine NO-Oxidation verhindern und es so länger in seiner protektiv wirksamen Form erhalten blieb.<sup>69</sup>

## 1.6 Endothelfunktionsstudien zu Schwarzem und Grünem Tee

In Grünem und Schwarzem Tee findet sich eine besonders hohe Konzentration von Flavonoiden. FMD-Studien an unterschiedlichen Probandenkollektiven bestätigten einen positiven Einfluss dieser Teesorten auf die Endothelfunktion. Schreuder et al. zeigten an 20 gesunden Studienteilnehmern, die über sieben Tage täglich drei Tassen Schwarzen Tee tranken, eine durchschnittliche FMD-Steigerung von 5,8 auf 7,2 %.<sup>53</sup> Dieser Effekt konnte ebenfalls für geringe Dosen von täglich 100 mg Tee-Flavonoiden gezeigt werden, was weniger als einer Tasse Schwarzen Tee entspricht.<sup>70</sup>

An niereninsuffizienten Patienten mit eingeschränkter Endothelfunktion konnte Schwarzer Tee signifikant die FMD verbessern.<sup>71</sup> Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie an KHK-Patienten.<sup>72</sup>

Grüner und Schwarzer Tee zeigten sich dabei gleichermaßen wirksam auf die Endothelfunktion von gesunden Probanden. Jochmann et al. zeigten, dass der FMD-Anstieg zwei Stunden nach Grünem oder Schwarzem Tee in etwa gleich war und eine Steigerung von 5,0 % nach Grünem und 4,4 % nach Schwarzem Tee bewirkt werden konnte.<sup>73</sup> Kim et al. beobachteten 30, 90 und 120 Minuten nach Grünem Tee einen Anstieg der FMD-Werte bei gesunden männlichen Rauchern.<sup>74</sup> Bei einem anderen Probandenkollektiv konnte durch einen täglichen Verzehr von 5 g Grünem Tee über zwei Wochen ein mittlerer Anstieg der FMD-Werte von 7,2 auf 9,3 % gezeigt werden.<sup>74</sup> Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich der Tee-Konsum auch in der Langzeitanwendung positiv auf die Endothelfunktion beim Menschen auszuwirken scheint.

## 1.7 Die Inhaltsstoffe des Grünen Tees

Tee als Heißgetränk wird durch einen Aufguss mit heißem Wasser und den getrockneten Blättern der Teepflanze *Camellia sinensis* gewonnen. Es existieren unterschiedliche Arten von Tee, die in Geschmack, Geruch und Aussehen differieren können. Gründe für diese Variabilität sind neben der Verarbeitung der Blätter und der Teezubereitung auch der Erntezeitpunkt und das Anbaugebiet mit den jeweils vorherrschenden klimatischen Bedingungen.<sup>75</sup>

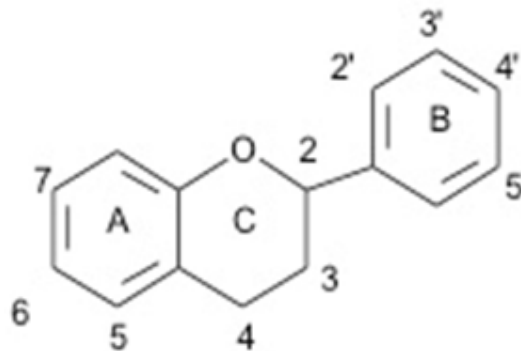
Die Blätter der Teepflanze werden bei der Ernte entweder von Hand oder maschinell geschnitten und direkt im Anschluss zur jeweiligen Tee Sorte weiterverarbeitet. Für die Produktion von Grünem Tee werden die Teeblätter unmittelbar nach dem Schneiden erhitzt. Dies führt zur Inaktivierung der Polyphenoloxidase, die den Fermentationsprozess katalysiert. Diese Enzym oxidiert die im Teeblatt enthaltenen Catechine und komplexiert sie zu höheren Polymerstrukturen, wie Theaflavine und Thearubine, die insbesondere in Schwarzem Tee zu finden sind.<sup>75</sup> Teezubereitungen, bei denen die Blätter erst einige Zeit nach dem Schneiden erhitzt werden, gehören zu den halbfermentierten Sorten; diese werden als Oolong-Tee bezeichnet. Schwarzer, vollfermentierter Tee bleibt drei bis sechs Stunden unbehandelt, bevor er erhitzt und getrocknet wird.<sup>76</sup> 76-78 % des global produzierten Tees aus *Camellia sinensis* wird als Schwarzer Tee, 20-22 % als Grüner und 2 % als Oolong-Tee vertrieben.<sup>77</sup>

Nach Schätzungen der „Food and Agriculture Organisation of the United Nations“ (FAO) wurden im Jahre 2012 weltweit insgesamt ca. 4,7 Millionen Tonnen getrockneter Teeblätter der Sorte *Camellia sinensis* produziert.<sup>78</sup> Grüner Tee aus der *Camellia-sinensis*-Pflanze (nachfolgend kurz Tee genannt) enthält eine Vielzahl an biochemisch aktiven Stoffen (Tabelle 1).

**Tabelle 1. Biochemisch aktive Stoffe in Grünem Tee**

Catechine <sup>79</sup>	30-42 %
Catechin	0,3-0,6%
EC	5-7%
ECG	9-12%
EGC	9-12%
EGCG	48-55%
Weitere Flavonoide <sup>80</sup>	5-10 %
Koffein <sup>80</sup>	3-5 %
Theogallin <sup>80</sup>	2-3 %
Theophyllin <sup>80</sup>	0,03 %
Theobromin <sup>80</sup>	0,1 %
Mineralstoffe <sup>80</sup>	6-8 %

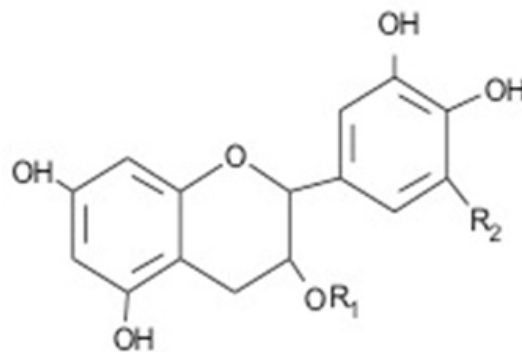
Tee ist unabhängig vom Grad der Fermentation reich an Polyphenolen. Diese sekundären Pflanzenstoffe sind hauptsächlich Kohlenstoffverbindungen aus mehreren Phenolringen. Flavonoide machen dabei mit etwas 30-40 % des Trockengewichts, den größten Anteil der Polyphenole des Tees aus.<sup>75</sup> Flavonoide bestehen aus zwei aromatischen Ringen und einem oxygenierten, heterocyclischen Kohlenstoffring (Abbildung 2).



**Abbildung 2. Allgemeine Strukturformel eines Flavonoids**

Zwei aromatische (A und B) und ein oxygenierter, heterocyclischer Kohlenstoffring (C). Stoffeigenschaften werden hauptsächlich durch die funktionellen Gruppen am C-Ring (2) bestimmt. Darstellung nach Balentine<sup>75</sup>, mit freundlicher Genehmigung des Taylor & Francis-Verlags.

Die Stoffeigenschaften der einzelnen Flavonoid-Verbindungen werden durch die Anzahl gebundener OH-Gruppen und funktioneller Gruppen am C-Ring bestimmt.<sup>81</sup> Beim Erhitzen der Teeblätter wird durch die Inaktivierung der Polyphenoloxidase die Entstehung von Di-, Tri- oder Polymeren verhindert, sodass im Grünen Tee fast ausschließlich einfache Flavonoid-Moleküle zu finden sind. Catechine besitzen eine solche Monomer-Struktur (Abbildung 3) und machen etwa 80-90 % der Flavonoide im Grünen Tee aus.<sup>77</sup>



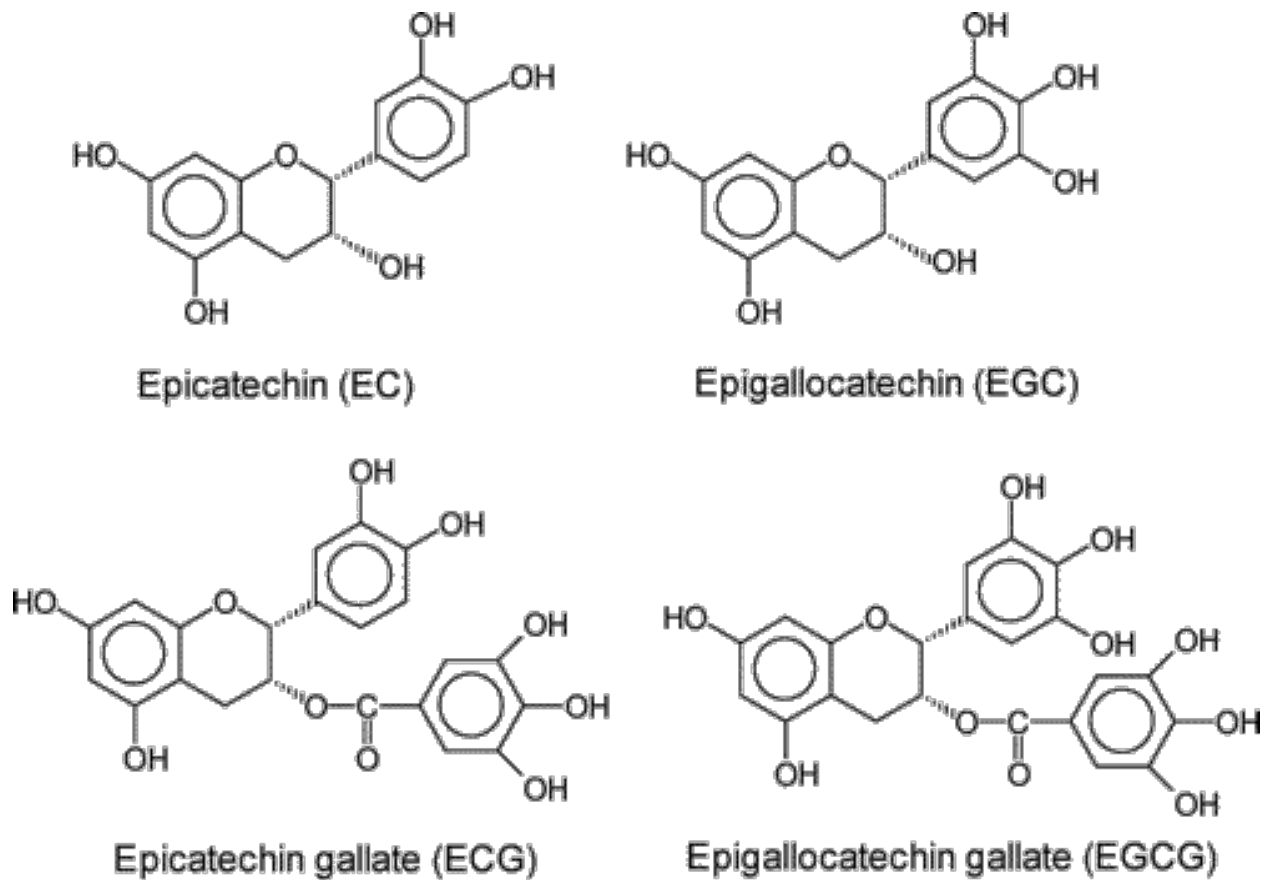
**Abbildung 3. Allgemeine Strukturformel eines Catechins**

Abhängig von ihrem gebundenen Rest (R1 oder R2) unterscheiden sich Catechine in ihren Stoffeigenschaften.

Darstellung nach Balentine<sup>75</sup>, mit freundlicher Genehmigung des Taylor & Francis-Verlags.

Catechine sind wasserlösliche, geruch- und farblose Bestandteile des Tees, die unter anderem zu seiner Bitterkeit beitragen und eine stark antioxidative Wirkung aufweisen.<sup>75,82</sup> Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und das Epigallocatechingallat (EGCG) sind die vier Hauptvertreter der Catechine im Grünen Tee.<sup>77</sup> Ihre antioxidative Wirkstärke ist abhängig von der Anzahl an gebundenen Hydroxylgruppen. EGCG ist das wirkungsvollste Antioxidans und in absteigender Potenz folgen EGC, ECG, EC und Catechin.<sup>79,83</sup> EGCG wurde in vorherigen *in vitro* Studien mit seinen antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften als das wirksamste aller Tee-Catechine beschrieben.<sup>83-85</sup>

Abbildung 4 zeigt die Strukturformeln der vier Haupt-Catechine, die in Grünem Tee enthalten sind.



**Abbildung 4. Strukturformeln der vier Haupt-Catechine im Grünen Tee**  
 Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechingallat (EGCG).  
 Darstellung nach Roginsky<sup>86</sup>, mit freundlicher Genehmigung von American Chemical Society.

EGCG bildet etwa 4 % des Trockengewichts der Teeblätter.<sup>87</sup> In jungen Teeblättern und unfermentierten Teesorten ist die höchste Konzentration an EGCG zu finden.<sup>88,89</sup> Catechine, die mit dem Tee oral aufgenommen werden, gelangen zum größten Teil im Jejunum und Ileum durch Diffusion in die intestinale Schleimhaut. Durch die natürliche Abschilferung der Darmzellen wird ein Teil der Catechine ungenutzt wieder ausgeschieden. Der andere Teil gelangt durch Diffusion ins Plasma und auf diesem Wege weiter zu Leber und Niere, wo Catechine enzymatisch sulfatiert, glucuronidiert oder methyliert werden. Dies führt dazu, dass die Bioverfügbarkeit dieser Stoffklasse sehr gering ist.<sup>89,90</sup> Die biologisch wirksamste Form der Catechine stellt die freie, unkonjugierte und nicht proteingebundene Form dar.<sup>90</sup> Etwa 60 Minuten nach dem Genuss von Grünem Tee sind Catechine im Plasma nachweisbar. Sie

erreichen nach etwa 1,5-2 Stunden ihr Maximum und fallen nach 12 Stunden unter die Nachweisgrenze.<sup>90</sup> Der Koffeingehalt der Teeblätter wird auf etwa 2,5-5,5 % in der Trockenmasse geschätzt.<sup>91</sup> Eine Tasse Tee mit 180 ml enthält abhängig von der Art des Aufbrühens, durchschnittlich etwa 60-80 mg Koffein, eine Tasse frisch gebrühter Kaffee enthält zum Vergleich etwa 100 mg. Grüner, Oolong und Schwarzer Tee haben etwa den selben Koffeingehalt, wobei dieser von der Brühzeit, der Menge der verwendeten Teeblätter, der Blattgröße sowie der Wassertemperatur, mit der die Teeblätter übergossen werden, abhängig ist.<sup>75</sup>

## 1.8 *In-vitro*-Studien zur Wirkung von Tee-Catechinen auf das Endothel

Die Catechine des Grünen Tees besitzen eine hohe antioxidative Wirkung. Die Lipidperoxidation der Zellmembran sowie die oxidative Schädigung der DNA konnten durch ihre Wirkung als Radikalfänger vermindert werden. Terao et al. zeigten die membranschützenden Effekte dieser Stoffgruppe in einem einfachen Modell an unilamellären Liposomen, die unter oxidativen Stress gesetzt wurden.<sup>92</sup> Die Applikation des Grünen Tees verminderte die Anzahl der DNA-Strangbrüche und die Zellmembranoxidation verglichen mit unbehandelten Zellen.<sup>93,94</sup> Oxidativer Stress, der auf Endothelzellen einwirkt, kann exogen beispielsweise durch Tabakkonsum entstehen. Er kann jedoch auch endogen durch erhöhte Aktivität der NADPH-Oxidase im Rahmen der physiologischen Zellatmung anfallen. Eine hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Superoxidanionen ( $\text{O}^{2-}$ ) führen zu einer Verminderung der NO-Verfügbarkeit in den Endothelzellen.<sup>95</sup> Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das durch die Reaktion von NO und ROS entsteht, bewirkt ebenfalls eine Oxidation von Zellstrukturen und lässt den NO-Spiegel weiter absinken. Fallen zu viele reaktive Sauerstoffspezies an, wird ein NO-Mangel durch eine sinkende Expression und Aktivität von eNOS zusätzlich verstärkt.<sup>95</sup> Catechine können freie Radikale direkt binden und damit ihre schädliche Wirkung neutralisieren. Zudem konnte eine Abnahme der NADPH-Oxydase-Aktivität durch die Wirkung von Epicatechin-Metaboliten beobachtet werden.<sup>96,97</sup> Folglich entstanden weniger schädliche freie Radikale und das NO-Angebot in den Endothelzellen konnte verbessert werden.<sup>85,96,97</sup> Zusätzlich scheinen Catechine auch direkt eine Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase zu bewirken.



So zeigte die Inkubation boviner Endothelzellen mit reinem EGCG eine Steigerung der eNOS-Syntheseleistung um das Vierfache.<sup>84</sup> Dies wurde über die Aktivierung einiger Proteinkinasen des PI3K-Akt-Signaltransduktionswegs und einer Phosphorylierung des eNOS-Enzyms erreicht.<sup>84</sup>

Studien an vorkontrahierten Aortenringen zeigten durch die Zugabe von Catechinen eine Steigerung der NO-vermittelten Relaxation. Bei vorheriger Behandlung der Gefäß-Präparate mit L-NMMA wurde die Relaxation abhängig von der EGCG-Konzentration verhindert. Bis zu einer Konzentration von 25  $\mu$ M EGCG blieb die Relaxation vollständig aus, während EGCG-Konzentrationen > 50  $\mu$ M trotz der Zugabe von L-NMMA relaxierten.<sup>84</sup> In Gefäßabschnitten mit einer intakten Endothelzellschicht konnte durch die Wirkung der Catechine eine verbesserte Vasodilatation erreicht und ein signifikanter Anstieg von cGMP beobachtet werden. EGCG besaß dabei im Vergleich zu den anderen getesteten Catechinen (EC, ECG, EGC) die höchste Wirksamkeit.<sup>98</sup>

## 1.9 Fragestellung

Der Genuss von Grünem Tee hat einen positiven Einfluss auf die Endothelfunktion und zeigte in verschiedenen Lang- und Kurzzeitstudien einen Anstieg der FMD. Grüner Tee enthält eine hohe Konzentration an Flavonoiden, insbesondere den monomeren Catechinen EC, ECG, EGC und EGCG. Letzteres erwies sich *in vitro* als das kardio- und vasoprotektiv wirkungsvollste Tee-Catechin. Bislang konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Verbesserung der Endothelfunktion beim Menschen auf die Wirkung der Catechine zurückzuführen ist oder ob andere Inhaltsstoffe involviert sind. Mit der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Können die beschriebenen Effekte des Grünen Tees allein auf die Wirkung der Catechine zurückgeführt werden oder tragen auch andere Stoffe zu einer Verbesserung der Endothelfunktion bei?
- Gibt es einen Unterschied in der Bioverfügbarkeit der Catechine nach verschiedenen Darreichungsformen?
- Welche Stoffe im Grünen Tee bewirken einen Anstieg der FMD?

Dazu wurden in der vorliegenden Studie in einem Cross-over-Studiendesign verschiedene Darreichungsformen der Catechine in ihrer Wirkung auf die Endothelfunktion an 50 gesunden Probanden getestet. Die Studienteilnehmer nahmen in randomisierter Abfolge Grünen Tee, Grüntee-Extrakt oder isoliertes EGCG zu sich. Mit jeder Intervention wurde jeweils 200 mg EGCG verabreicht. Als Kontrolle diente eine konstante Menge heißes Wasser. Die Endothelfunktion der Probanden wurde jeweils vor der Einnahme und zwei Stunden danach mittels FMD gemessen. Zusätzlich wurden die Catechin-, Koffein-, Theobromin- und Theophyllin-Konzentrationen im Plasma der Probanden bestimmt. Die erhobenen Daten wurden statistisch auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Änderung der Plasmakonzentration dieser Substanzen und der FMD-Veränderung geprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Teil der Ergebnisse der FMD-Studie ausgewertet. Dabei werden die Effekte nach der Verabreichung von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt beschrieben.

## 2. Methoden

### 2.1 Probandenrekrutierung

Im Zeitraum von August 2012 bis August 2013 wurden insgesamt 207 Männer im Alter von 20-50 Jahren als Probanden in die FMD-Studie aufgenommen. Die Rekrutierung erfolgte über Probandengesuche im Intranet der Charité oder durch Aushänge im Raum Berlin. Potentielle Probanden erhielten zunächst eine E-Mail mit allen notwendigen Informationen und in den folgenden Tagen wurde telefonisch Kontakt aufgenommen, um eine mündliche Vorauswahl anhand festgelegter Kriterien zu treffen. Ein erstes Telefongespräch mit potentiellen Studienteilnehmern diente dazu, Ein- und Ausschlusskriterien zu besprechen sowie die zeitliche Verfügbarkeit der Probanden zu ermitteln. Mögliche Einflussfaktoren auf die Endothelfunktion, wie Medikamenteneinnahme, Alkoholkonsum, Tätigkeiten in Schichtarbeit und Ernährung wurden abgefragt. Der Tee- (Schwarzer und Grüner Tee) und Kaffeekonsum der Probanden wurde ebenfalls erfasst, um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen und die Menge an täglich verzehrtem Koffein abschätzen zu können. Das Probandenkollektiv wurde so gewählt, dass keine kardiovaskulären Risikofaktoren vorlagen und eine Einschränkung der Endothelfunktion soweit wie möglich ausgeschlossen werden konnte. Da Schwankungen des Östrogenspiegels im Rahmen des weiblichen Zyklus zu veränderten FMD-Werten führen<sup>99</sup> wurden ausschließlich männliche Studienteilnehmer rekrutiert. Die im Studienprotokoll festgelegten Einschlusskriterien sowie die Blutparameter (siehe Einschlusskriterien) wurden beim ersten Messtermin überprüft. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin unter der Nummer EA1/277/09 genehmigt. Zudem wurde die Studie unter ClinicalTrials.gov registriert (Identifier:NCT01662232;URL:<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01662232?term=EGCG%2C+Green+tea&rank=4>).

## 2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Eine Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war, dass die aufgelisteten Laborparameter in Tabelle 2 in den vorgegebenen Messbereichen lagen.

**Tabelle 2. Einschlusskriterien.**

Triglyceride ( <i>TG</i> )	≤	180 mg/dl
High Density Lipoprotein ( <i>HDL</i> )	≥	35 mg/dl
Low Density Lipoprotein ( <i>LDL</i> )	≤	160 mg/dl
Gesamtcholesterin	≤	240 mg/dl
Lipoprotein (a) [ <i>Lp(a)</i> ]	≤	300 mg/dl
Homocystein		6-12 µmol/l
Hämoglobin A1 <sub>c</sub> ( <i>HbA1c</i> )	≤	5,6 %
C-reaktives Protein ( <i>C-rP</i> )	≤	5 mg/dl

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie sind im Folgenden aufgelistet:

- chronische oder schwerwiegende Erkrankungen (z.B. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, onkologische oder autoimmune Vorerkrankungen)
- Diabetes mellitus
- Hypertonus (systolisch ≥ 140 mmHg und diastolisch ≥ 90 mmHg)
- BMI > 27 kg/m<sup>2</sup>
- Rauchen
- Alkoholabusus
- regelmäßige Medikamenteneinnahme
- regelmäßiger Konsum von Grünem oder Schwarzem Tee
- Teilnahme an weiteren Studien

## 2.3 Studiendesign

In einem prospektiven randomisierten Cross-over-Studiendesign nahmen alle Probanden entweder Grünen Tee als Heißgetränk, Tee-Extrakt, reines EGCG oder heißes Wasser zu sich. Die Reihenfolge der Substanzeinnahme wurde vor Beginn der Studie mit einer Randomisierungsnummer elektronisch festgelegt. Mit jeder Intervention, außer dem Kontrollgetränk Wasser, wurde jeweils die gleiche Menge an 200 mg EGCG verabreicht. Die Wassermengen für die Einnahme von Grünem Tee, Grüntee-Extrakt und EGCG wurden mit 442 ml immer gleich bemessen. Vor der Substanzeinnahme war eine Unterscheidung zwischen den Interventionen möglich. Die willkürliche Einflussnahme der Probanden auf die Endothelfunktion wurde jedoch als sehr gering eingeschätzt. Die FMD-Messungen fanden jeweils vor der Intervention und 120 Minuten danach statt. Untersucht wurden die Veränderung der FMD und GTN von t<sub>0</sub> zu t<sub>2</sub> nach Einnahme von Tee, Extrakt und Wasser sowie Konzentrationen der Tee-Polyphenole im Plasma der Probanden. Die FMD-Auswertung verlief computergestützt, sodass eine Beeinflussung der Messergebnisse durch den Untersucher ausgeschlossen werden konnte. Die Termine der FMD-Messungen wurden so gewählt, dass eine Wash-out-Phase von mindestens drei messfreien Tagen eingehalten wurde. Die Probanden sollten mindestens acht Stunden vor der FMD-Messung nüchtern bleiben und sich keiner übermäßigen körperlichen Aktivität aussetzen, wie zum Beispiel schnelles Gehen oder Fahrradfahren. Zusätzlich wurden die Probanden darauf hingewiesen, am Tag vor der Messung auf Alkohol, Kaffee und Tee zu verzichten sowie die Einnahme von Vitamin- und Mineralstofftabletten auszusetzen.

## 2.4 Zubereitung der Interventionen

In Tabelle 3 und 4 sind die Materialien für die Zubereitung und die Interventionen aufgelistet.

**Tabelle 3. Materialien zur Zubereitung der Interventionen**

Artikel	Zweck
Präzisionswaage	Abwiegen des Tees
Waage „Siena“	Abwiegen des Wassers
Stoppuhr	Stoppen der Zeit für die Tee-Zubereitung
elektrischer Wasserkocher	Erhitzen des Wassers zur Tee-Zubereitung
Permanent Teefilter, Größe L	Filtern des Aufgusses
Glasteekanne	Auffangen der Grün-Tee-Zubereitung
Tassen mit Fassungsvermögen von mindestens 500 ml	Einnahme von 442 ml Wasser oder Tee durch den Probanden

**Tabelle 4. Interventionen**

Grüner Darjeeling Tee <i>PussimbingBio</i> Second Flush	Kings Teagarden, Berlin; Mindesthaltbarkeit 16.01.2014
Kapsel mit Grüntee-Extrakt	Firma: Nutri-Fit GmbH & Co. KG Mindesthaltbarkeit: Feb. 2014
Kapsel mit 200 mg EGCG	Firma: Nutri-Fit GmbH & Co. KG Mindesthaltbarkeit: Nov. 2013

Die Probanden nahmen an vier verschiedenen Messtagen, jeweils nach der ersten FMD-Messung heißes Wasser, Grünen Tee, Grüntee-Extrakt oder 200 mg reines EGCG entsprechend der randomisierten Abfolge zu sich.

Für die Intervention Wasser wurden 500 ml Leitungswasser mit einem elektrischen Wasserkocher auf 100°C erhitzt und die Flüssigkeitsmenge von 442 g mit einer Waage abgemessen (entsprach 442 ml).

Zur Zubereitung des Grünen Tees wurden mithilfe der Präzisionswaage 6,75 g Teeblätter abgewogen und in eine Glaskanne gegeben. Die Teekanne mit den Teeblättern wurde auf die zweite Waage für die Flüssigkeitsbestimmung gestellt und tariert.

Anschließend wurden 1 l Wasser auf 100°C erhitzt und die Teeblätter damit bis zu einem Nettowassergewicht von 550 g übergossen. Zu Beginn wurde die Stoppuhr gestartet um bei Minute 1.00, 2.00 und 2.30 den Aufguss kräftig zu schwenken.

Bei Minute 3.00 wurde der Tee rasch in einen Glasbehälter filtriert, um die flüssige und feste Phase zügig voneinander zu trennen. Beim Abgießen musste darauf geachtet werden möglichst wenige Teeblätter in den Teefilter gelangen zu lassen, damit der Ziehprozess die Zeit von drei Minuten nicht überschritt. Die Teetasse wurde auf die Waage gestellt, tariert und anschließend bis exakt 442 g Nettogewicht mit Tee gefüllt (entspricht 442 ml). 5 ml des Teerestes wurden mit dem Datum sowie der Randomisierungsnummer des Probanden beschriftet und bei -80°C eingefroren. Die EGCG-Konzentration der beschriebenen Teezubereitung betrug  $452 \pm 8,6$  mg/L (MW  $\pm$  SD) (n=6).

Alle Probanden erhielten 442 ml Grünen Tee und nahmen damit 200 mg EGCG zu sich. Der EGCG-Gehalt des Extrakts, der mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography; HPLC) vor Studienbeginn bestimmt wurde, lag bei  $492,3 \pm 1,4$  mg/g (MW  $\pm$  SD) (n=3). Für die Einnahme von 200 mg EGCG wurden mit der Kapsel 406,3 mg Grüntee-Extrakt verabreicht. Der Grüntee-Extrakt und das reine EGCG wurde den Probanden mit 442 ml heißem Wasser (äquivalent zu 442 ml Grünem Tee) verabreicht. Mit dem ersten Schluck Wasser sollte die Kapsel heruntergeschluckt und anschließend zügig die restliche Flüssigkeit in der Tasse ausgetrunken werden. Beginn und Ende der Einnahme wurden dokumentiert.

## 2.5 Durchführung der FMD- und GTN-Messung

Die FMD-Messungen fanden in einem eigenen Raum mit konstanter Raumtemperatur (22-24°C) und in ruhiger Umgebung statt. Am ersten Untersuchungstag wurden die Probanden über die Risiken der Blutabnahme und der Verabreichung von Nitroglycerin zur Bestimmung der endothelunabhängigen Vasodilatation aufgeklärt.

In Tabelle 5 wird der zeitliche Ablauf der Messungen detailliert dargestellt.

**Tabelle 5. Zeitlicher Ablauf der FMD- und GTN-Messungen**

	7.00 Uhr	Begrüßung des Probanden 1. Visit: Einweisung, Aufklärungsgespräch, Beantwortung letzter Fragen und Unterschreiben der Aufklärungs- und Einwilligungsbögen; 2.,3.,4. Visit: Messvoraussetzungen werden abgefragt
	7.15 Uhr	Blutabnahme nicht-dominanter Arm Versendung der Blutproben zur Laboruntersuchung; dunkle Lagerung der 6 ml EDTA-Röhrchen für die Catechin-Bestimmung
	7.20 Uhr	Lagerung des Probanden auf der Liege, Blutdruckmanschette und EKG-Elektroden werden angebracht, Initial einmalige Blutdruckmessung, danach alle 10 Minuten 10 Min. Ruhephase
t <sub>0</sub>	7.35 Uhr	Lagerung des Untersuchungsarms in die Halterung der Ultraschallsonde Bildeinstellung am Ultraschallgerät, Starten des Computerprogramms (Einloggen + FMD-Studio starten), Zentrifugation der EDTA-Röhrchen zur Catechin-Bestimmung
	7.45 Uhr	Durchführung der FMD-Messung
	7.55 Uhr	10 Min. Messpause Auf Blutdruckkontrolle ist zu achten, um die Wirkung des Nitroglycerins abzuschätzen Untersuchungsarm verbleibt in der Halterung; Weiterverarbeitung des Probandenplasmas
	8.05 Uhr	Durchführung der GTN-Messung
	8.15 Uhr	10 Min. Ruhepause nach Nitroglycerinapplikation Blutdruckkontrolle, Markierung der Position der Ultraschallsonde am Oberarm Vorbereitung der jeweiligen Intervention (Kapsel, Tee oder Wasser)
	8.25 Uhr	Beginn der Substanzeinnahme Ende der Einnahme wird dokumentiert; Beginn der Wartezeit
	1,5 h Wartezeit	Probanden begeben sich in den Aufenthaltsraum, körperliche Aktivität wird vermieden
t <sub>2</sub>	Zeitpunkt abhängig vom Ende der Substanzeinnahme	Blutabnahme nicht-dominanter Arm; Lagerung des Probanden auf der Liege, Blutdruckmanschette und EKG-Elektroden werden angebracht; Lagerung des Untersuchungsarms in die Halterung der Ultraschallsonde, Ablauf wie für t <sub>0</sub> beschrieben
		Durchführung der FMD-Messung
		10 Min. Messpause
		Durchführung der GTN-Messung
		10 Min. Ruhepause nach Nitroglycerinapplikation, Blutdruckkontrolle

Die zu untersuchende Person wurde zunächst zehn Minuten ruhig gelagert, um anschließend eine Ultraschall-Untersuchung an der *Arteria brachialis* des dominanten Arms durchzuführen. Hierfür wurde ein Linearschallkopf verwendet, um die Armarterie longitudinal im B-Mode-Bild darzustellen. Der Diameter des Gefäßes wurde zunächst unter Ruhebedingungen durch den



Abstand zwischen der anterioren und posterioren Gefäßwand an der Grenzfläche von Intima zu Gefäßlumen erfasst. Zur Untersuchung der Reaktion des Gefäßes auf *Shear Stress* wurde eine aufblasbare Blutdruckmanschette am Untersuchungsarm unterhalb des Ellenbogens in etwa 10-14 cm Entfernung zum Schallkopf angebracht. Die Manschette wurde nach Vermessung des Ausgangsdurchmessers auf einen suprasystolischen Druck von 250-260 mmHg aufgepumpt und nach einer Stauungszeit von fünf Minuten zügig abgelassen. Durch das rasche Ablassen der Manschette entstand ein deutlich erhöhter Blutfluss innerhalb des Gefäßes, der einen erhöhten *Shear Stress* auf die Arterienwände ausübte. Das Gefäß reagierte auf diese Gefäßwanddehnung mit einer Dilatation. Diese Vasodilatation der Brachialarterie als Antwort auf erhöhte Wandspannung ist reproduzierbar und an anderen größeren Gefäßen (Femoral-<sup>100</sup> und Radialarterie<sup>101</sup>) gleichermaßen zu beobachten. Der maximale Durchmesser wird durchschnittlich etwa 90 Sekunden nach der Stauung erreicht und zieht sich dann auf Basalwerte zurück.<sup>102</sup> Mit den beiden Werten „Ausgangsdurchmesser“ und „Maximale Dilatation bei reaktiver Hyperämie“ wurde die FMD in Prozent mit folgender Formel berechnet:

$$\text{FMD in \%} = \frac{\text{Max. Dilatation bei reaktiver Hyperämie} - \text{Ausgangsdurchmesser}}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

Jeder endothelabhängigen FMD-Messung folgte nach zehninütiger Pause eine endothelunabhängige Messung. Dafür wurde den Probanden 0,4 mg Nitroglycerin (*Englisch: glyceryl trinitrate, GTN*) sublingual als Spray verabreicht. Die Nitroglycerin-Applikation zeigt im Durchschnitt nach drei bis vier Minuten ihre maximale Wirkung.<sup>103</sup>

Zur Erfassung des Maximaldiameters geben einige Guidelines vor den Gefäßdurchmesser so lange aufzuzeichnen, bis die NO-Wirkung ein Plateau erreicht oder der Diameter sich wieder eindeutig verkleinert.<sup>103,104</sup>

In dieser Studie wurde der Durchmesser kontinuierlich über zehn Minuten erfasst. Die endothelunabhängige Vasodilatation wurde, angelehnt an die FMD-Berechnung mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{GTN in \%} = \frac{\text{Max. Dilatation nach Nitroglycerin} - \text{Ausgangsdurchmesser}}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

## 2.6 Versuchsaufbau zur FMD-Messung

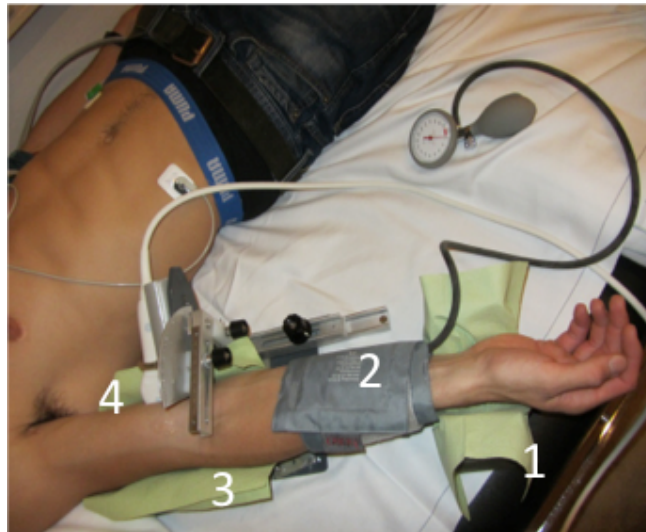
In Tabelle 6 sind die Materialien für die Durchführung der FMD-Messungen aufgelistet.

**Tabelle 6. Materialien zur FMD-Messung und Erfassung der Daten.**

Artikel	Bezeichnung
Ultraschallgerät	<i>Vivid 7</i> GE Healthcare
Ultraschallsonde	Linearschallkopf 12 MHz
Videokonverter	<i>Canopus AVDC-55</i>
Großbildschirm	Firma <i>ViewSonic</i>
Laptop	<i>MacBook Pro</i> 13 Zoll
Software	<i>Cardiovascular Suite 2.0</i> , Firma Quipu, Pisa, Italien
Automatisches Blutdruckmessgerät und 5-Kanal EKG	<i>Dash 3000</i> , Firma <i>Marquette</i>
EKG-Klebeelektroden	
Halterung der Ultraschallsonde	Anfertigung der Medizintechnik des Charité Campus Mitte
Blutdruckmanschette 14 cm	Firma <i>ERKA Kallmeyer Medizintechnik</i> , Bad Tölz, Deutschland
Handauflage aus Schaumstoff	

Vor der FMD-Messung wurden alle verwendeten Geräte angeordnet und angeschlossen. Das Ultraschallgerät wurde zunächst an den Videokonverter und dieser an den Laptop angeschlossen um ihn anschließend mit dem Großbildschirm zu verbinden. Der Bildschirm war an der Wand über dem Kopfteil der Liege befestigt und diente der besseren Bildauflösung. Beim Starten der elektronischen Geräte war auf die Reihenfolge zu achten: Als erstes wurde das Ultraschallgerät eingeschaltet und anschließend die Software *Cardiovascular Suite 2.0* am Laptop gestartet. Nach vollständigem Hochfahren des Ultraschallgerätes wurden folgende Einstellungen getroffen: Mit der Taste *Sonde* wurde der Schallkopf (*ML12*) gewählt, um die gewünschte Bildeinstellung einzustellen. Zur Überwachung während des Messdurchlaufs wurden eine Blutdruckmanschette am nicht-dominanten Arm und EKG-Elektroden am Oberkörper des Probanden befestigt. Der Untersuchungs-Arm des Probanden musste für die FMD-Bestimmung korrekt und stets auf die gleiche Weise gelagert werden. Der rechte Arm wurde dafür um ca. 50° abduziert und in die Halterung der Ultraschallsonde eingelegt. Das Handgelenk musste auf der Schaumstoffunterlage abgelegt werden, sodass die Palmarseite der Hand nach oben zeigte und der Unterarm nicht auflag. Als letztes wurde die Blutdruckmanschette zur Induktion des *Shear Stress* immer im

gleichen Abstand von 10-14 cm zur Ultraschallsonde an den Unterarm angebracht. Die optimale Lagerung des Untersuchungsarms sowie der Versuchsaufbau sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5. Versuchsaufbau und Lagerung des Untersuchungsarms**

1) Schaumstoffauflage für die Hand; 2) Blutdruckmanschette zur Induktion des *Shear Stress*; 3) Halterung für die Ultraschallsonde; 4) Linearschallkopf zur Darstellung eines Abschnitts der *Arteria brachialis*.

Nach korrekter Lagerung konnte mit der Einstellung des Ultraschallbildes begonnen werden. Zunächst wurde mit dem Linearschallkopf ein Abschnitt der *Arteria brachialis* aufgesucht und im longitudinalen Anschnitt dargestellt. Wichtig dabei war es einen geraden Arterienverlauf ohne Verzweigungen aufzusuchen. Das Endothel sollte ausreichend gut dargestellt sein, damit die Software die gegenüberliegenden Gefäßwände über den gesamten Zeitraum der Messung erkennen und vermessen konnte (automatische *Edgedetection*). Nach zufriedenstellender Adjustierung der sonographischen Gefäßdarstellung wurde die Ultraschallsonde in der entsprechenden Position mittels Halterung fixiert. Bei der Befestigung der Sonde war darauf zu achten, sie möglichst ohne zu viel Druck auf den zu untersuchenden Arterienabschnitt zu befestigen und dennoch eine konstante Bildeinstellung sicherzustellen. Der Proband wurde gebeten, Bewegungen oder Sprechen während des Messdurchlaufs zu vermeiden.

## 2.7 Computergestützte Auswertung

Für die Endothelfunktionsmessungen wurde eine optimale Bildeinstellung am Ultraschallgerät vorgespeichert. Darin wurde unter anderem die Eindringtiefe des B-Mode-Bildes festgelegt, um das Endothel in einem kleinen Bildausschnitt besonders kontrastreich darzustellen. Die gewählten Bildeinstellungen wurden über den gesamten Zeitraum der Studie beibehalten und unter *FMD-Superficial* auf dem Ultraschallgerät gespeichert. Vom Hersteller des Programms *Cardiovascular Suite* wurde empfohlen 100 FMD-Messungen mit dem Programm durchzuführen, bevor die Software als Messmethode im Rahmen einer klinischen Studie genutzt werden kann. Die Probemessungen sollten dazu dienen, die Qualität des B-Mode-Bildes einzuschätzen und ein Gefühl dafür zu entwickeln, ob eine sichere *Edgedetection* mit der gewählten Bildeinstellung möglich ist. Zudem musste der Ablauf der GTN- und FMD-Messungen trainiert werden, da das Programm die zeitliche Messabfolge mit einem akustischen Signal vorgab (Aufpumpen/Ablassen Blutdruckmanschette, Verabreichung des Nitroglycerinsprays). Im Juni und Juli 2012 wurden zur Vorbereitung der vorliegenden Studie insgesamt 100 Probemessungen an Freiwilligen durchgeführt. Es wurden Screenshots zur Begutachtung der Bildqualität angefertigt und die Ultraschalleinstellungen in enger Zusammenarbeit mit dem Hersteller des Programms optimiert. Nach diesem Training wurde im August 2012 mit den FMD-Messungen für diese Studie begonnen.

### 2.7.1 Grundkalibrierung der Software *Cardiovascular Suite*

Zuerst wird initial eine Grundkalibrierung durchgeführt, damit das Programm das B-Mode-Bild des Ultraschallgerätes im richtigen Maßstab vermessen kann. Die Grundkalibrierung und Bildeinstellung *FMD-Superficial* werden während der gesamten Studiendauer ohne Veränderungen beibehalten. Für die Kalibrierung des Programms *Cardiovascular Suite* wird folgendermaßen vorgegangen:

- Einloggen in *Cardiovascular Suite* mittels Benutzername (*User Name*) und Passwort (*Password*)
- Unter *Settings* wird der Button *FMD-Studio* gewählt (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Settings**

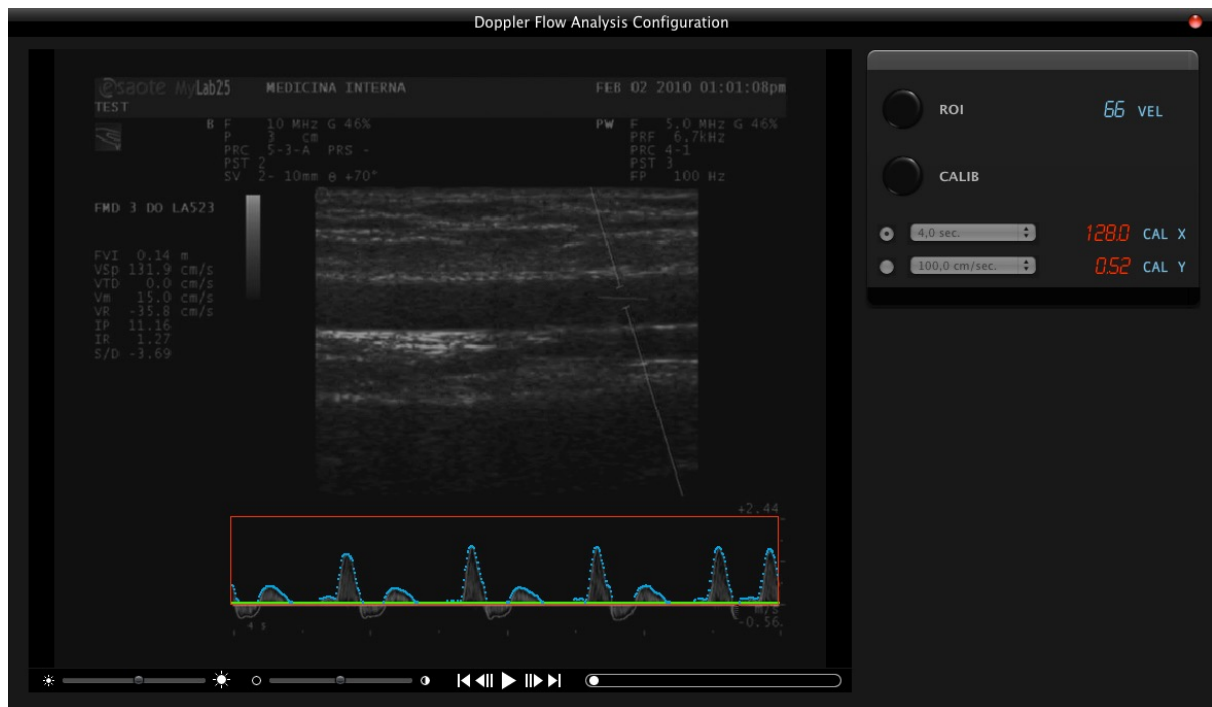
Unter Settings kann die Grundkalibrierung des Computerprogramms vorgenommen werden. Die gewählten Einstellungen werden im gesamten Studienzeitraum nicht verändert.

Im oberen Feld *Flow Mediated Dilation* kann die *Recording Time* ausgewählt werden. Diese wird auf zehn Minuten festgelegt; 60 Sekunden zur Ermittlung des Ausgangsdurchmessers (*Baseline*), 300 Sekunden für die Okklusion der Blutdruckmanschette (*Ischemia*) und 240 Sekunden für die Ermittlung des Gefäßdurchmessers bei reaktiver Hyperämie (*Vasodilatation*).

Im darunterliegenden Feld muss der Button *Shear Rate Detection* aktiviert werden, damit das Programm die Dopplerfunktion des Ultraschallgerätes miterfasst. Die Software registriert auf diese Weise den Blutfluss und berechnet daraus den auf die Gefäßwände einwirkenden *Shear Stress* (als *Shear rate* angegeben).

Unter *Shear Rate Detection* wird die Option *Detection by Image Analysis* gewählt, damit das Programm direkt das B-Mode-Bild für die *Shear-rate*-Berechnung verwendet.

Wird der kleine Stift rechts im Bild angewählt, erscheint das B-Mode-Bild auf dem Computerbildschirm (Abbildung 7) und es kann die Dopplerfunktion kalibriert werden.



**Abbildung 7. Doppler Flow Analysis Configuration**

In diesem Fenster wird die Dopplerfunktion des Ultraschallgerätes für die *Shear Rate Detection* kalibriert.

### Kalibrierung der X-Achse:

Zunächst wird am Ultraschallgerät die Taste *Messung* betätigt und der Messmodus *Zeit* gewählt. Anschließend wird mit dem Cursor im Dopplerfeld auf der X-Achse eine Zeitspanne festgelegt. In dieser Studie werden 3001 ms verwendet. Um diese Einstellung zu sichern, wird im Programm *Calib* aktiviert und für die X-Achse die entsprechende Zeiteinheit (drei Sekunden) gewählt. Mit dem Cursor des Computers wird die zuvor festgelegte Zeitspanne im Video-Fenster der Software exakt nachgezogen und bei korrektem Vorgehen automatisch übernommen. Erfolgreich kalibriert ist die X-Achse, wenn die gewählte Zeitspanne als weiße Zahl neben *CAL X* angezeigt wird.

### Kalibrierung der Y-Achse:

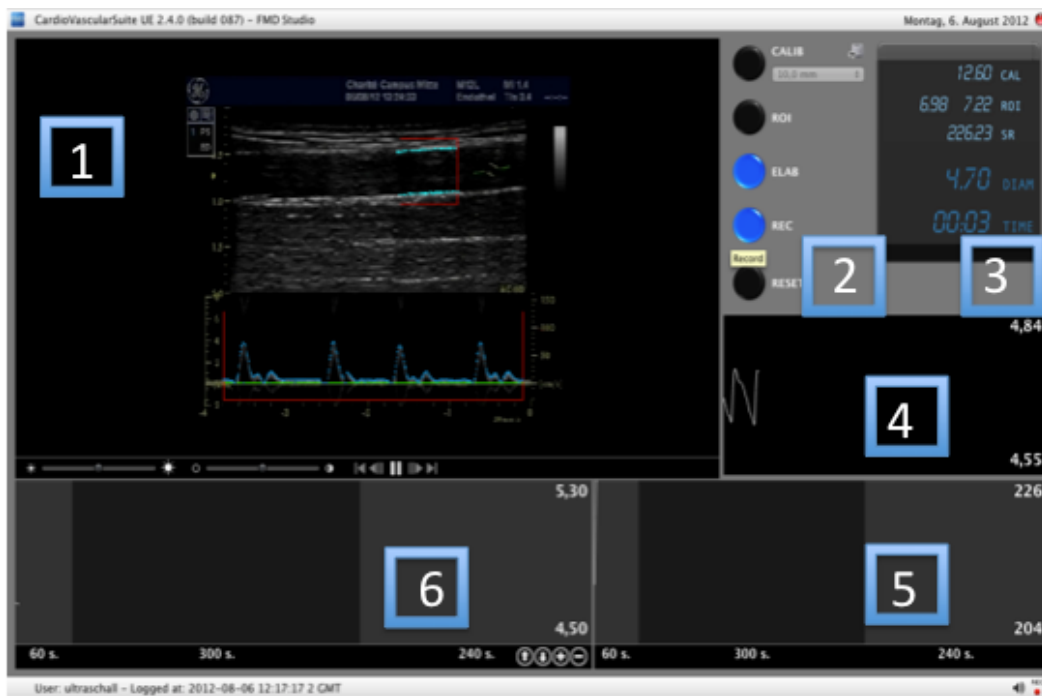
Zunächst wird am Ultraschallgerät die Taste *Messung* betätigt und der Messmodus *Distanz* ausgewählt. Anschließend wird mit dem Cursor im Dopplerfeld auf der Y-Achse ein Abstand festgelegt. In dieser Studie wird 1 cm verwendet. Um diese Einstellung zu sichern, wird im Programm *Calib* aktiviert und für die Y-Achse die entsprechende Distanz (1 cm) gewählt. Mit dem Cursor des Computers wird die zuvor festgelegte Distanz im Videofenster der Software exakt nachgezogen und bei korrektem Vorgehen automatisch vom Programm übernommen. Erfolgreich kalibriert ist die Y-Achse, wenn die gewählte Distanz als weiße Zahl neben *CAL Y* angezeigt wird.

In *Settings FMD Studio* im unteren Feld (Abbildung 6) wird die Aufnahmedauer der *GTN Induced Dilation* eingestellt; Unter *Recording Time* wird die Aufnahmedauer von insgesamt zehn Minuten festgelegt; 60 Sekunden zur Ermittlung des Ausgangsdurchmessers (*Baseline*) und 540 Sekunden für die Erfassung des maximalen Durchmessers nach Nitroglycerin (*Vasodilatation*).

### 2.7.2 Software *Cardiovascular Suite*

Zur Durchführung einer FMD-Messung wird zunächst das Programm *Cardiovascular Suite* geöffnet und durch die Eingabe von *User Name* und *Password* gestartet. Es erscheint das Hauptmenü mit den Unterpunkten von links nach rechts angeordnet: *User, Setting, Archive, New Studies, Manuals, Quit*. Um eine neue FMD-Analyse zu starten, wird *New Studies* gewählt. Daraufhin erscheint eine Eingabemaske für die Probandendaten, in der Name, Geschlecht und Alter angegeben werden. Das Programm generiert eine neue Probandenakte und hinterlegt in dieser das zum Probanden gehörige Messungsvideo im Archiv. Unter *Modality* kann gewählt werden, ob eine FMD- oder GTN-Messung durchgeführt werden soll. In diesem Schritt wird die *Modality* FMD gewählt. Als letzter Punkt muss unter *Video Source* der Button *Video Device* angewählt werden, damit das Programm das eingespeiste B-Mode-Bild als Grundlage für die FMD-Auswertung verwendet.

Mit dem Button *New Study* wird die Messung gestartet und es erscheint das *FMD-Studio* (Abbildung 8).



**Abbildung 8. FMD-Studio**

1) *Video-Fenster*; 2) *Controls panel*; 3) *DataDisplay* (*CAL*- festgelegter Kalibrierungsmaßstab; *ROI*- Abmessung Länge x Breite der *Region of Interest*; *SR*- momentane Shear Rate die mittels Dopplerfunktion erfasst wird; *DIAM*- Gefäßdurchmesser in Millimetern; *TIME*- Länge des Videos); 4) *Instantaneous Diameter Chart*; 5) *Shear Rate Chart*; 6) *Mean Diameter Chart*.

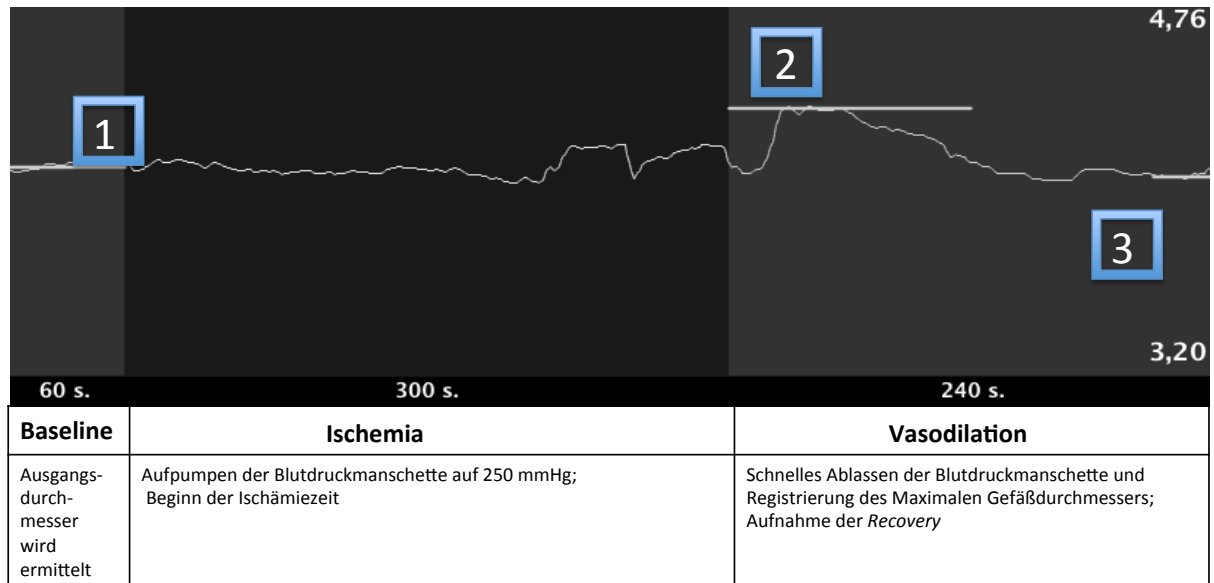
Das größte Fenster des *FMD-Studios*, mittig im Bildschirm, ist das *Video-Fenster*. Darin werden das B-Mode-Bild sowie die Pulse-Wave-Kurve des Ultraschallgerätes übertragen. Rechts daneben befindet sich das so genannte *Controls panel*, in dem *CALIB*, *ROI*, *ELAB*, *REC* und *RESET* untereinander angeordnet sind. Neben dem *Controls panel* befindet sich rechts das *DataDisplay* und darunter das Fenster *Instantaneous Diameter Chart*, welches über den gesamten Zeitraum den momentanen Gefäßdurchmesser anzeigt, sobald die *Region of Interest* im Video-Fenster festgelegt wird (*Region of Interest*, wird unter „Ablauf der FMD-Messung“ näher erläutert).



Die Werte rechts oben und unten im *Instantaneous Diameter Chart*-Fenster geben den Maßstab in Millimetern an, in dem der Gefäßdurchmesser angezeigt wird. Ganz unten rechts im Bildschirm wird im Fenster *Shear Rate Chart* die auf die Gefäßwand wirkende *Shear rate* angezeigt. Unten links im Bildschirm ist das Fenster *Mean Diameter Chart*, welches den Gefäßdurchmesser anzeigt, sobald eine neue FMD-Messung mit dem *REC*-Button gestartet wird.

Im *Mean Diameter Chart* wird durch das Starten der Messung der Gefäßdurchmesser angezeigt. In der unteren Leiste finden sich die Zeitvorgaben, die zuvor unter *Settings* und *Recording Time* für *Baseline* (60 Sekunden), *Ischemia* (300 Sekunden) und *Vasodilatation* (240 Sekunden) festgelegt wurden. Das Programm ermittelt in den ersten 60 Sekunden nach Betätigen des *REC*-Buttons den durchschnittlichen Ausgangsdurchmesser (*Baseline*). Nach 60 Sekunden wird die Blutdruckmanschette aufgepumpt und es beginnt die Ischämiezeit von 300 Sekunden, wobei der Durchmesser durchgängig aufgezeichnet wird. Nach 360 Sekunden gibt das Programm ein akustisches Signal und die Blutdruckmanschette wird zügig abgelassen. Die Software registriert danach für 90 Sekunden den maximal erreichten Durchmesser, der durch die Gefäßdilatation als Antwort auf die vorherige Okklusion erreicht wird. Die FMD in Prozent wird aus dem durchschnittlichen Ausgangsdurchmesser, der über 60 Sekunden gemittelt wird und dem maximalen Wert der Dilatation errechnet (Siehe Formel 2.3. Durchführung der FMD- und GTN-Messungen). Das Video läuft weitere 150 Sekunden, um in den letzten 30 Sekunden die *Recovery* aufzunehmen. Die *Recovery* sollte unter optimalen Untersuchungsbedingungen zeigen, dass das Gefäß nach der Vasodilatation ungefähr seinen ursprünglichen Ausgangsdurchmesser annimmt.

Das *Mean Diameter Chart* nach einer abgeschlossenen FMD-Messung ist in Abbildung 9 dargestellt; die Messzeitpunkte *Baseline*, *Ischemia*, *Vasodilatation* und *Recovery* sind markiert.



**Abbildung 9. Mean Diameter Chart nach einer abgeschlossenen FMD-Messung.**

Im unteren Zeitstrahl sind die Angaben für Baseline (60 sek.), Ischemia (300 sek.) und Vasodilatation (240 sek.) zu erkennen. Das Programm mittelt den Wert für den Ausgangsdurchmesser des Gefäßes über 60 Sekunden (Strich 1) und verwendet den größten Durchmesser, der innerhalb von 90 Sekunden (Strich 2) nach Ablassen der Manschette erreicht wird, für die Berechnung der FMD in Prozent. In den letzten 30 Sekunden wird die Recovery gemittelt (Strich 3). Rechts im Bild ist der Maßstab der Abbildung in Millimetern angegeben (max: 4,76 mm; min: 3,20 mm).

### 2.7.3 Ablauf der Software-gestützten FMD- und GTN-Messung

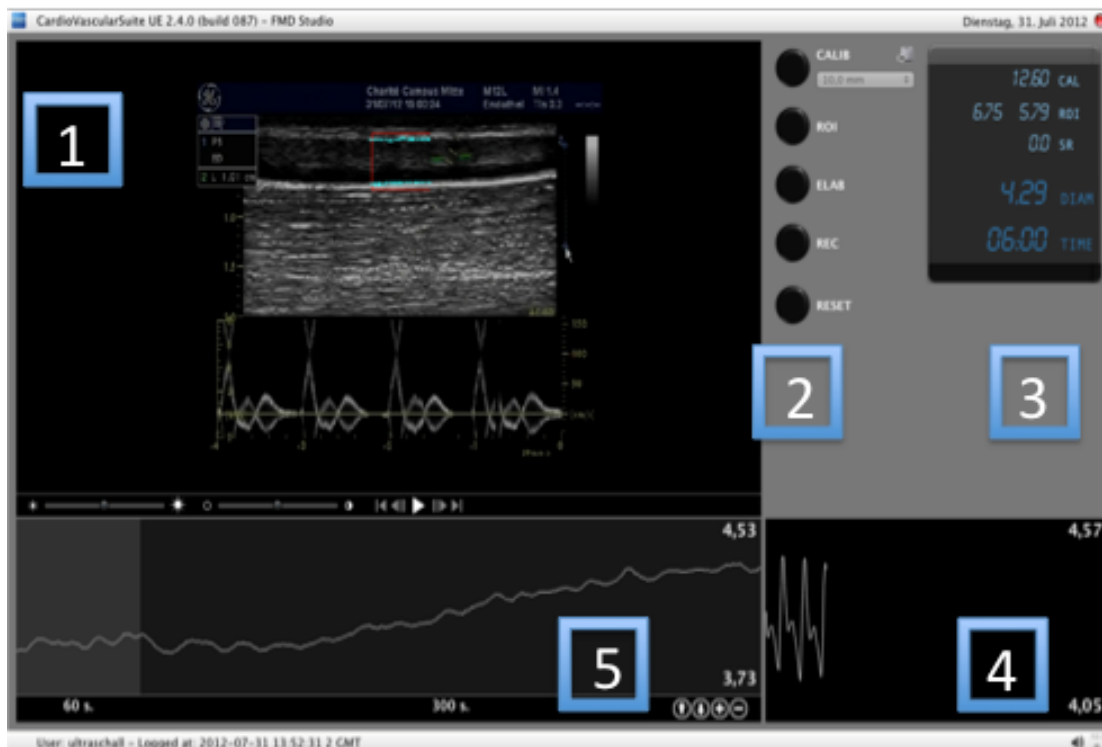
Zu Beginn einer FMD-Messung wird die Region of Interest (ROI) festgelegt und die Erkennung der Pulse Wave Kurve (*PW*) eingestellt. Die ROI ist der Bereich des abgebildeten Gefäßabschnitts, der zur Vermessung des Gefäßdurchmessers und letztlich zur Berechnung der FMD ausgewertet wird. Die ROI wird als farbig umrandeter Bereich manuell vom Untersucher im *Video-Fenster* festgelegt. Die Abmessungen dieses Kästchens werden unter ROI im *Controls panel* angezeigt. Die optimale Position die ROI ist in einem Bereich des Gefäßes, in dem das Endothel und der dreischichtige Wandaufbau des Gefäßes gut zu erkennen sind. Als Voraussetzung für eine FMD-Auswertung mittels Software sollten die gegenüberliegenden Wandabschnitte der Brachialarterie gut zu erkennen sein.

Die ROI wird zu Beginn der Messung festgelegt und darf nach Bedienen des *REC*-Buttons nicht mehr bewegt oder verändert werden. Ist die ROI definiert, beginnt das Programm in diesem festgelegten Bereich mit der automatischen *Edgedetection*. Im *DataDisplay* wird daraufhin unter *DIAM* der Gefäßdurchmesser in Millimetern angezeigt. Auch die Erfassung der *Shear Rate* beginnt automatisch mit dem Festlegen der ROI.

Es erscheint ein roter Kasten um die Dopplerkurve. Die Pulse Wave wird bei erfolgreicher Erkennung mit einer blauen Linie nachgezeichnet und die X-Achse mit einem grünen Strich markiert. Im *DataDisplay* erscheint unter *SR* der Wert der gemessenen Shear Rate (Abbildung 7). Danach wird durch den *REC*-Button die FMD-Messung gestartet und der Gefäßdurchmesser ab diesem Zeitpunkt auch im Fenster *Mean diameter chart* abgebildet (Abbildung 8). In der ersten Minute der begonnenen FMD-Messung ist es möglich, die Messung noch einmal zu stoppen und von Neuem starten zu lassen. Hierfür ist der *RESET*-Button vorgesehen. Die Videoaufzeichnung darf lediglich am Anfang der FMD-Messung abgebrochen werden, wenn noch keine Stauung erfolgt ist, da bereits die kurze Okklusion durch die Manschette Sheare Stress induziert und das Endothel in folgenden Messungen nicht physiologisch reagiert. Nach Abschluss einer FMD-Messung sollte daher auch eine Wartezeit von mindestens 90 Minuten eingehalten werden, bevor erneut eine Endothelfunktionsmessung durchgeführt wird.<sup>104</sup>

Jeder FMD-Messung folgt nach einer zehnminütigen Pause eine GTN-Messung. Dabei wurde auf Kopfschmerzen, Schwindel und Blutdruckabfall hingewiesen, die als mögliche Nebenwirkungen der Nitroglycerin-Applikation auftreten können. Zusätzlich wurde der Proband erneut nach möglichen Kontraindikationen, wie Erkrankungen am Herzen, Migräneleiden oder Allergien befragt. Zur Überwachung der Nitroglycerin-Wirkung wurde besonders auf die Puls- und Blutdruckkontrolle vor und nach Verabreichung geachtet.

Der Ablauf mit den Zeitvorgaben der GTN-Messung ist in Abbildung 10 dargestellt. Nach den ersten 60 Sekunden der GTN-Messung gibt die Software ein Signal, woraufhin ein Hub (entspricht 0,4 mg Nitroglycerin) des Nitroglycerin-Sprays sublingual verabreicht wird. Das Starten der Messung gestaltet sich analog zur FMD-Messung. Die einzige Abweichung besteht darin, dass gleich zu Beginn unter *Modality* GTN ausgewählt wird. Bei der GTN-Messung entfällt die Erfassung der *Shear Rate*. Der Bildschirm teilt sich dementsprechend in fünf Fenster mit gleicher Funktion wie im *FMD-Studio*. Das Fenster *Shear Rate Chart* bleibt ausgespart.

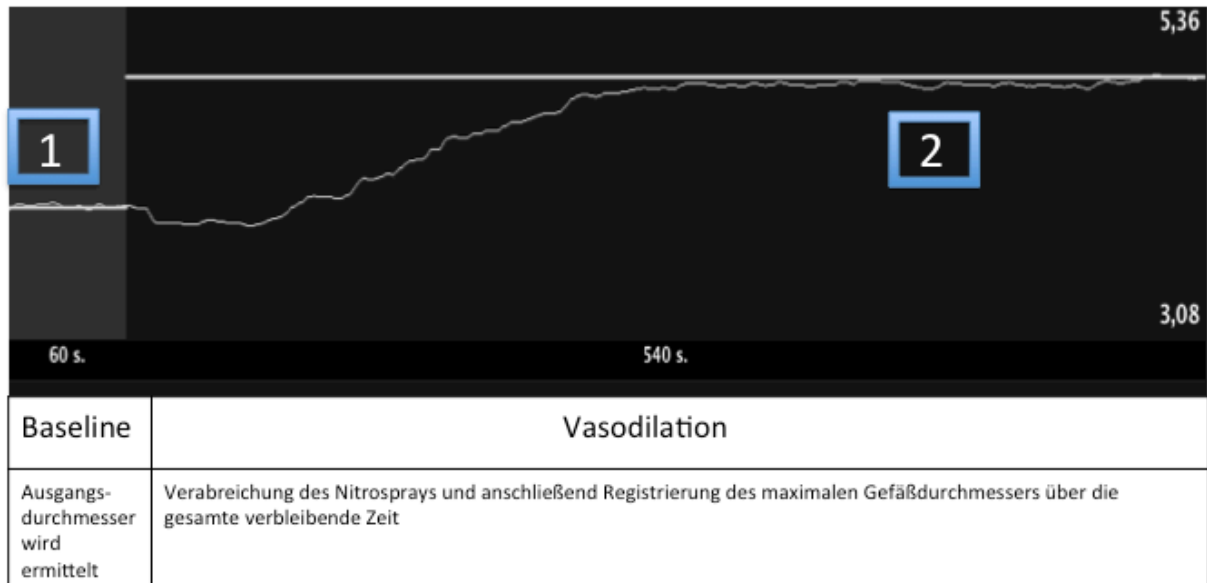


**Abbildung 10. GTN-Studio**

1) Video-Fenster; 2) Controls panel; 3) DataDisplay; 4) Instantaneous diameter chart; 5) Mean Diameter Chart. Das GTN-Studio folgt der Bildschirmaufteilung des FMD-Studios.

Das Fenster *Mean diameter chart* hat einen anderen Aufbau, da das Aufpumpen der Manschette (*Ischemia*) und die *Recovery* am Ende entfallen. Stattdessen erfolgt nach der Erfassung des Ausgangsdurchmessers die Applikation des Nitroglycerins zur Aufzeichnung der maximalen Vasodilatation.

Im Zeitstrahl im unteren Teil des *Mean diameter chart* finden sich die zuvor unter *Settings* und *Recording Time* gewählten Zeitvorgaben (Abbildung 11).



**Abbildung 11. Mean Diameter Chart nach einer abgeschlossenen GTN-Messung**

Im unteren Zeitstrahl sind die Angaben für Baseline (60 Sek.) und Vasodilatation (540 Sek.) zu erkennen. Das Programm mittelt den Wert für den Ausgangsdurchmesser des Gefäßes über 60 Sekunden (Strich 1) und verwendet den größten Durchmesser innerhalb der nächsten 540 Sekunden (Strich 2) nach Nitroglycerinapplikation für die Berechnung der GTN in Prozent. Rechts im Bild ist der Maßstab der Abbildung in Millimeter angegeben (max: 5,36 mm; min: 3,08 mm).

## 2.8 Blutabnahmeprotokoll und Weiterverarbeitung der Proben

In Tabelle 7 und 8 sind die verwendeten Materialien für die Blutentnahmen und die Weiterverarbeitung des Probandenplasmas für die Catechinbestimmung aufgeführt.

**Tabelle 7. Materialien für die Blutabnahme**

Artikel	Firma	Artikelnummer
Vacutainer®-Safety-Lok™-Sicherheits-Blutabnahmeset 21 G	Becton Dickinson GmbH, Germany	367281
BD Vacutainer® One Use Holder	Becton Dickinson GmbH, Germany	364815
BD Vacutainer® Heparin- Röhrchen (3 ml)	Becton Dickinson GmbH, Germany	367374
EDTA-Röhrchen (4 ml)	Becton Dickinson GmbH, Germany	367864
Serum-Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson GmbH, Germany	367955

**Tabelle 8. Materialien für die Weiterverarbeitung der Proben**

Artikel	Firma	Artikelnummer
BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen (6 ml)	Becton Dickinson GmbH, Germany	368861
1,5 ml Eppendorfgefäße		
20 µl Ascorbinsäurepuffer		
1000 µl Eppendorfpipette		
Folienstift zur Beschriftung		
Zentrifuge: Megafuge 1.0	<i>Heraeus</i>	

Vor der ersten und zweiten FMD-Messung wurde eine Blutentnahme am nicht-dominanten Arm des Probanden zur Bestimmung der festgelegten Blutparameter durchgeführt. Die verwendeten Materialien sind zusammen mit dem jeweiligen Zeitpunkt der Bestimmung in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9. Zeitpunkt der Parameter-Bestimmung im Studienablauf und die dazugehörigen Vakuumröhrchen**

Röhrchen	Blutparameter	Abnahmezeitpunkt
Heparin 3 ml (hellgrün)	C-rP, TG, Gesamtcholesterin, HDL, LDL	zu jeder Blutabnahme
EDTA 4 ml (lila) gekühlt	Homocystein	1. Visit t0
EDTA 4 ml (lila)	HbA <sub>1c</sub>	1. Visit t0
Serum 5 ml (goldgelb)	Lp(a)	1. Visit t0
EDTA 6 ml (lila)	Catechin-Plasmakonzentrationen	zu jeder Blutabnahme

Es wurden zwei EDTA-Röhrchen (6 ml) für die spätere Bestimmung der Catechin-Konzentration abgenommen. Unmittelbar nach der Abnahme wurden die Proben zunächst 20 Minuten bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Zur Weiterverarbeitung des Blutes wurden beide Röhrchen zehn Minuten bei 4°C und 3500 rpm zentrifugiert und jeweils 1 ml des Überstands in vier Eppendorfgefäße (1,5 ml) gegeben. Da Catechine instabile, oxidationsanfällige Verbindungen sind, wurden zwei der vier Plasma-Proben mit Ascorbinsäure-Puffer versetzt. Zur Catechin-Stabilisierung wurde zu 1 ml des EDTA- Plasmas je 20 µl Pufferlösung gegeben. (Endkonzentration in der Probe: 18 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 22 mM Ascorbinsäure, 68 µM EDTA) und bei -80°C tiefgefroren. Die Zusammensetzung des Ascorbinsäure-Puffers ist in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10. Ascorbinsäure-Puffer zur Catechin-Stabilisierung**

Substanz	Menge
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1 g
Ascorbinsäure	2,0 g
EDTA (0,5 M)	68,45 µl
ddH <sub>2</sub> O	10 ml

Die Bestimmung der Catechin-Konzentrationen in den mit Puffer konservierten Proben wurde nach der Methode von Zimmermann et al. am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.<sup>105</sup> Bei dieser Methode werden zunächst Proteine mittels Dimethylformamid (DMF) und Trichloressigsäure ausgefällt, da die meisten Catechine proteingebunden vorliegen und zur Bestimmung in die freie Form überführt werden müssen. Anschließend werden die Proben zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Mithilfe der HPLC wird der Überstand aufgetrennt und quantifiziert. Die Catechine im Plasma der Probanden nach Genuss von Grünem Tee und Grüntee-Extrakt wurden jeweils vor und nach Hydrolyse (Abspaltung der Glucuronidierung und Sulfatierung) bestimmt.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die Daten für die FMD- und die GTN-Messungen wurden mit dem Computerprogramm *Cardiovascular Suite* gemessen und nach jedem Studientag zur Datenerfassung in *Excel 2007* übertragen. Zur Dokumentation wurde nach jeder Messung ein Screenshot angefertigt und auf einem externen Speichermedium gesichert. Die Ergebnisse der Blutproben für die Blutwerte und die Catechin-Bestimmungen wurden in die Ergebnistabelle eingefügt und so in die Gesamtauswertung einbezogen. Am Ende der Studie wurde dieser Datensatz in das Statistik-Programm *SPSS Statistics* (Release 2013; IBM SPSS Statistics for Macintosh; Version 22.0) importiert und ausgewertet. Zunächst wurden die Daten auf ihre Verteilung geprüft. Die Analysen erfolgten mittels des Shapiro-Wilk-Tests mit einem Signifikanzniveau von 95 %. Für die FMD- und GTN-Werte konnte die Normalverteilung angenommen werden.

Die Catechinkonzentrationen im Plasma der Probanden, die vor jeder FMD-Messung bestimmt wurden, waren dagegen überwiegend nicht-parametrisch verteilt. Alle Berechnungen bezüglich der Catechine erfolgten daher mit nicht-parametrischen Rang-Tests. Ähnlich verhielt es sich mit den drei Substanzen Koffein, Theobromin und Theophyllin. Die nachgewiesenen Konzentrationen waren nicht normalverteilt, folglich wurde auch hier mit nicht-parametrischen Rang-Tests gearbeitet. Die Analysen für die FMD- und GTN-Werte wurden mittels Varianzanalyse für Messwiederholungen (Analysis of Variance, ANOVA) durchgeführt. Es wurde für alle Testungen ein Signifikanzniveau von 95 % bestimmt. Im *Post-hoc*-Testing wurde ein paarweiser Vergleich der drei Studienarme durchgeführt und zur Alpha-Adjustierung die Bonferroni-Korrektur verwendet. Die FMD-Messungen zum Zeitpunkt t0 und t2 für Wasser, Grünen Tee und Grüntee-Extrakt wurden verglichen und die Mittelwerte der Messreihen mittels T-Test für verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht.

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem beobachteten FMD-Anstieg und dem Catechin-Anstieg im Plasma der Probanden nachzuweisen, wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient für parameterfreie Daten errechnet und die Nullhypothese ( $H_0$ : es liegt keine signifikante Korrelation vor) anschließend in einem Permutationstest überprüft. Gleichmaßen wurde bei den Konzentrationen für Koffein, Theobromin und Theophyllin vorgegangen: Auch hier wurden die Spearman-Korrelation und ein Permutationstest für die Signifikanzüberprüfung



---

verwendet. Zuvor wurde geprüft, ob ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von t0 zu t2 vorliegt. Die Signifikanz des Anstiegs in den Stoffkonzentrationen von t0 zu t2 wurde mithilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für zwei verbundene Stichproben getestet (Signifikanzniveau von 95 %). Alle Angaben entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen (MW  $\pm$  SD) der Werte von 50 Probanden. In die Auswertung der Plasmakonzentrationen für Grüntee-Extrakt gingen aufgrund einer hämolytischen Probe nur 49 Werte ein.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der Inhaltsstoffe in den Interventionen Grüner Tee und Grüntee-Extrakt

Um die Wirkung der verschiedenen Darreichungsformen der Catechine auf die Endothelfunktion testen zu können, wurde den Probanden 442 ml Grüner Tee und Grüntee-Extrakt mit 442 ml Wasser verabreicht. Mit beiden Interventionen nahmen Probanden jeweils 200 mg EGCG zu sich. Der Grüntee-Extrakt enthielt alle Catechine, die im Grünen Tee als Heißgetränk zu finden waren. Die Inhaltsstoffe des Tees und des Extrakts sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11. Vergleich der Inhaltsstoffe im Grünen Tee und Grüntee-Extrakt**

	TB	GA	Koffein	GC	Catechin	GCG	EC	EGC	ECG	EGCG
<i>Grüner Tee (mg/l)</i>	15,0	35,4	265	113	10,8	7,8	51,6	141	89,1	452,5
<i>GTE (mg/g)</i>	<0,01	13,2	7,1	<0,01	6,5	16,5	69,5	145	70,5	492,3

*TB*-Theobromin, *GA*- Gallussäure, *GC*-Galocatechin, *GCG*-Galocatechingallat, *EC*-Epicatechin, *EGC*-Epigallocatechin, *ECG*-Epicatechingallat, *EGCG*- Epigallocatechingallat, *GTE*- Grüntee-Extrakt

#### 3.2 Probandenrekrutierung und Basischarakteristika der Studienpopulation

Im Zeitraum von August 2012 bis August 2013 wurden 207 Männer für die Studie rekrutiert. Nach E-Mail-Kontakt und einem Telefongespräch zur Klärung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden 56 Probanden in die Studie aufgenommen. Insgesamt folgten sechs Dropouts. Gründe für den Abbruch der Studienteilnahme waren Serumlipidwerte außerhalb des vorgegebenen Bereiches und auf Probandenseite das als unangenehm empfundene Aufpumpen der Blutdruckmanschette, die Blutabnahme oder die lange Nüchternheitsphase am Vormittag. Zwei Probanden brachen aus diesen Gründen die Teilnahme an der Studie vorzeitig ab. 50 Männer im Alter von 20 - 50 Jahren durchliefen erfolgreich alle vier Arme der Studie.

Abbildung 12 visualisiert den Probandeneinschluss in die Studie.

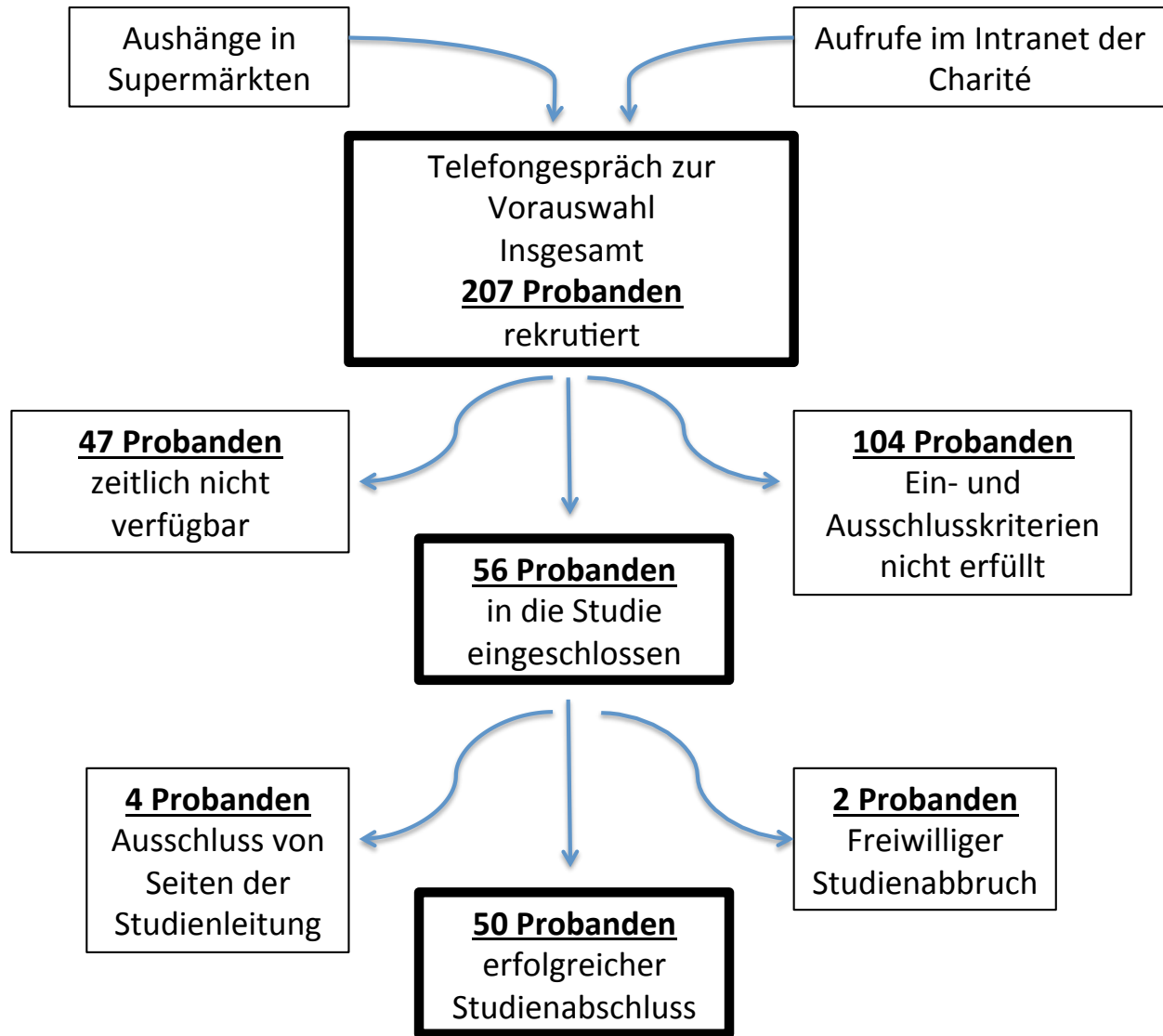


Abbildung 12. Flow-Diagramm der Studie

Tabelle 12 zeigt die Basischarakteristika der Studienpopulation mit den Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen der im Studienprotokoll festgelegten Einschlussparameter.

**Tabelle 12. Basischarakteristika der 50 Teilnehmer**

	MW	SD
Alter bei Einschluss	33,9	7,6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,7	2,5
Sys BD (mmHg)	122	9,4
Dia BD (mmHg)	69,7	7,6
Lp(a) (mg/l)	153,2	277,7
Homocystein (µmol/l)	11,3	4,7
HbA <sub>1c</sub> (%)	5,2	0,3
HDL (mg/dl)	54,3	11,4
LDL (mg/dl)	112,2	34,2
Gesamtcholesterin (mg/dl)	178,7	34,2
TG (mg/dl)	93,2	51,1
C-rP (mg/l)	1,2	2,1

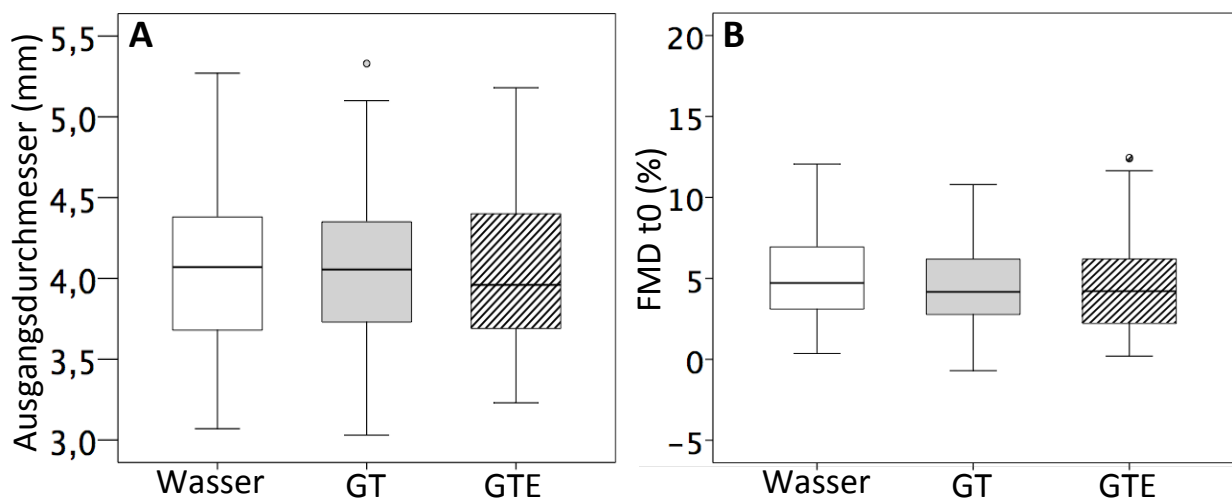
*MW*- Mittelwert, *SD*- Standardabweichung, *BMI*- Body mass index, *Sys BD*- systolischer Blutdruck, *Dia BD*- Diastolischer Blutdruck, *Lp(a)*- Lipoprotein (a), *HbA<sub>1c</sub>*- Glykiertes Hämoglobin, *HDL*- High Density Lipoprotein, *LDL*- Low Density Lipoprotein, *TG*- Triglyceride, *C-rP*- C-reaktives Protein.

Die Blutfettwerte (Gesamtcholesterin, Triglyceride, HDL, LDL) im Plasma der Probanden wurden bestimmt um kardiovaskuläre Risikofaktoren weitgehend auszuschließen. Das atherogene Potential hoher Blutfettwerte ist durch eine Vielzahl von randomisiert kontrollierten Studien belegt und die Bestimmung diente daher als Parameter zur Bewertung der kardiovaskulären Gesundheit.<sup>106</sup> Der Anteil der Triglyceride bot darüber hinaus einen Indikator für den Grad der Nüchternheit der Probanden. Zum vollständigen Ausschluss einer Dyslipidämie wurde Lipoprotein (a) [Lp(a)] bestimmt. Lp(a) gehört zur Gruppe der Low-density Lipoproteine und ist dem LDL in seinem Aufbau sehr ähnlich. Hohe Lp(a)-Werte korrelieren mit einem erhöhten Risiko für ein frühes Auftreten von Myokardinfarkten und Schlaganfällen.<sup>107</sup> Patienten mit einer Lp(a)-Erhöhung zeigen häufig eine positive Familienanamnese, da diese Art der Fettstoffwechselstörung eine erbliche Komponente besitzt. Konzentrationen über 300 mg/dl im Blut werden als eigenständige Risikofaktoren für die Entstehung eines kardiovaskulären Ereignisses gewertet.<sup>107</sup> Durch Homocystein-Erhöhungen im Blut können Endothelzellen geschädigt werden und das Risiko für die Entstehung einer Thrombose steigt. Durch hohen Kaffee-, Tabak- und Alkoholkonsum kann dieser Wert ebenfalls ansteigen. Aus diesem Grund

wurde die Homocystein-Konzentration als Parameter für die Gefäßgesundheit in das Studienprotokoll aufgenommen. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Ausschlusskriterien Hämoglobin A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) und C-reaktives Protein (C-rP) bestimmt, um eine Glukosetoleranzstörung sowie eine akut- oder chronisch-entzündliche Erkrankung auszuschließen.

### 3.3 Vergleich der FMD-Messungen

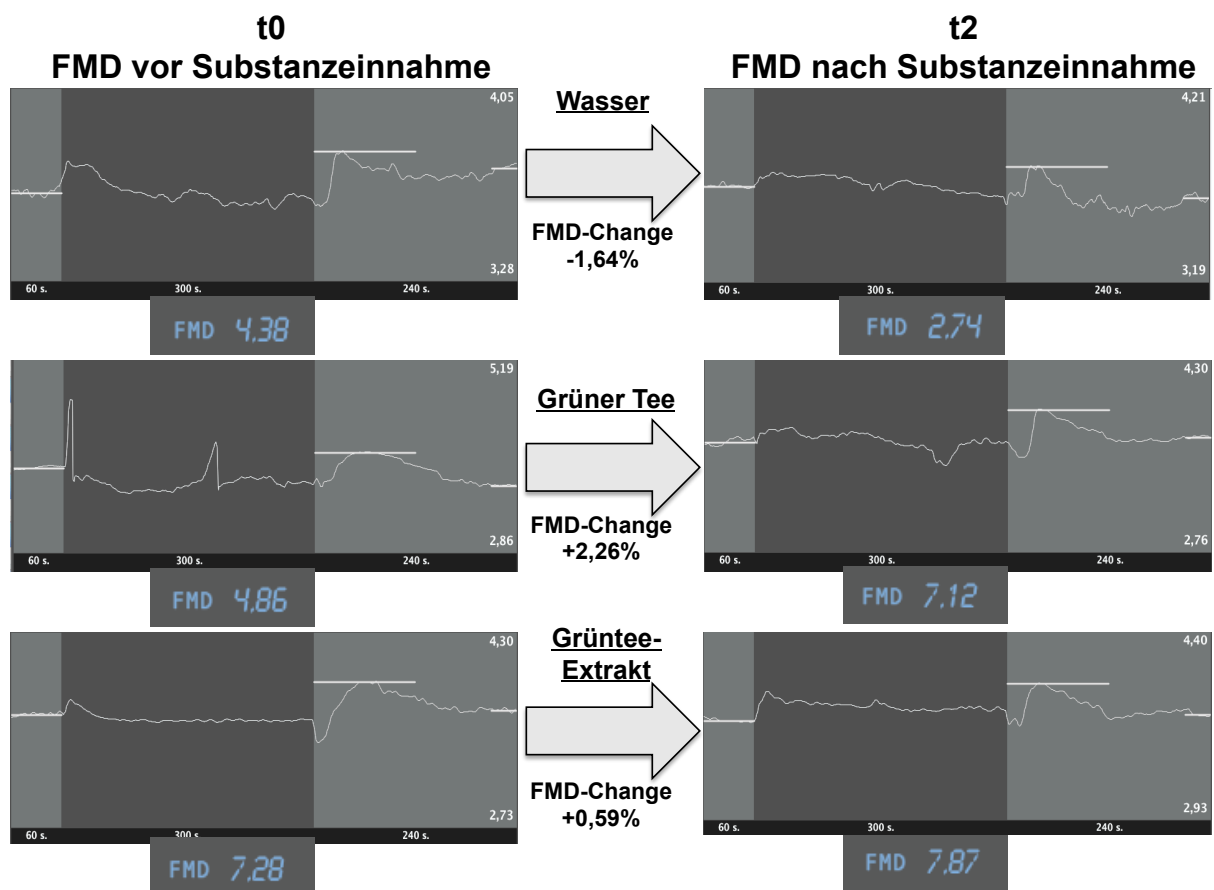
Die FMD-Werte der drei Interventionen Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> wurden miteinander verglichen und mittels ANOVA auf signifikante Unterschiede untersucht. Dieser Schritt ist notwendig, um vergleichbare Ausgangsbedingungen für jeden Studienarm vor der Intervention zu verdeutlichen sowie die Validität des Designs der Crossover-Studie sicherzustellen. Die Boxplots der Abbildung 13 zeigen den Ausgangsdurchmesser des Gefäßes und die FMD zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> vor Einnahme der jeweiligen Substanz.



**Abbildung 13. Vergleich der Ausgangsdurchmesser (A) und der FMD-Messungen (B) vor Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt**

(A) Vergleich der Ausgangsdurchmesser der Arteria brachialis; (B) Vergleich der FMD t<sub>0</sub>. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten des Ausgangsdurchmessers und der FMD vor der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet, GT- Grüner Tee, GTE- Grüntee-Extrakt. Dargestellt sind Median und Spannweite von n=50 Probanden.

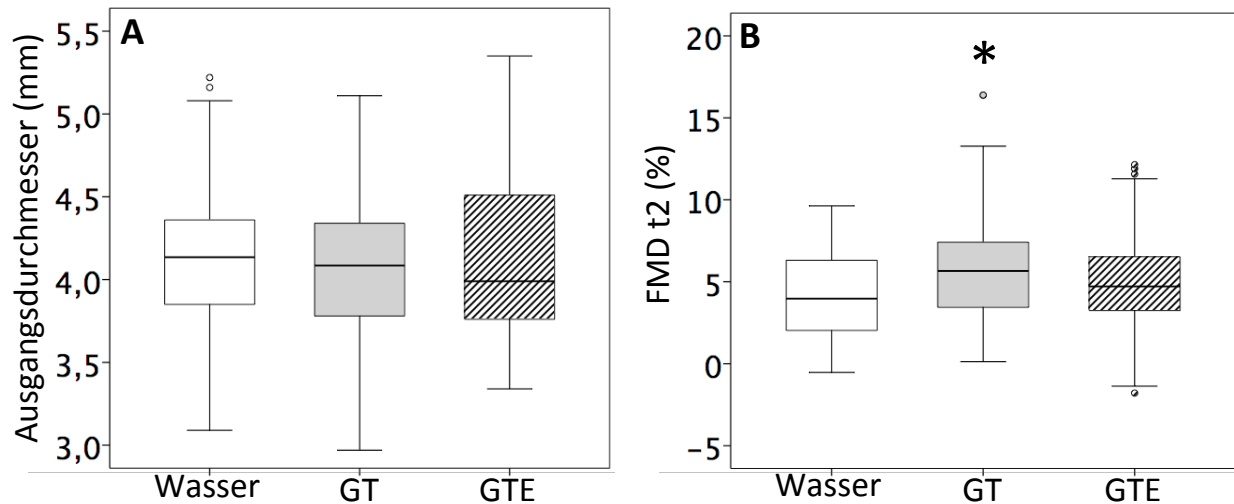
Der Ausgangsdurchmesser des untersuchten Gefäßes zum Zeitpunkt  $t_0$  lag vor Wasser bei  $4,07 \pm 0,49$  mm, vor Grünem Tee bei  $4,11 \pm 0,51$  mm und vor Grüntee-Extrakt bei  $4,05 \pm 0,48$  mm. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Absolutwerten der Gefäßdurchmesser vor Wasser, Tee oder Extrakt. Die FMD betrug vor Wasser  $5,05 \pm 2,65$  %, vor Grünem Tee  $4,49 \pm 2,77$  % und vor Grüntee-Extrakt  $4,72 \pm 3,16$  %. Signifikante Unterschiede zwischen der FMD vor Wasser, Tee oder Extrakt gab es nicht. Für jeden Probanden wurde die FMD vor und zwei Stunden nach Substanzeinnahme gemessen und die Veränderung der Werte (*FMD-Change*;  $\Delta\text{FMD \%} = \text{FMD } t_2 \text{ in \%} - \text{FMD } t_0 \text{ in \%}$ ) berechnet. In Abbildung 14 sind beispielhaft die FMD-Messungen zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_2$  für die verschiedenen Interventionen gezeigt. Es handelt sich um die vom Computerprogramm angezeigten Messverläufe der FMD-Bestimmungen und die daraus errechneten Change-Werte.



**Abbildung 14. Gegenüberstellung der FMD-Messungen vor und zwei Stunden nach Substanzeinnahme**

Die berechneten Change-Werte in % für Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt sind angegeben. Die dargestellten Messkurven sind exemplarisch ausgewählt.

Abbildung 15 zeigt den Gefäßdurchmesser und die FMD zwei Stunden nach Wasser, Tee oder Extrakt in Form von Boxplots.



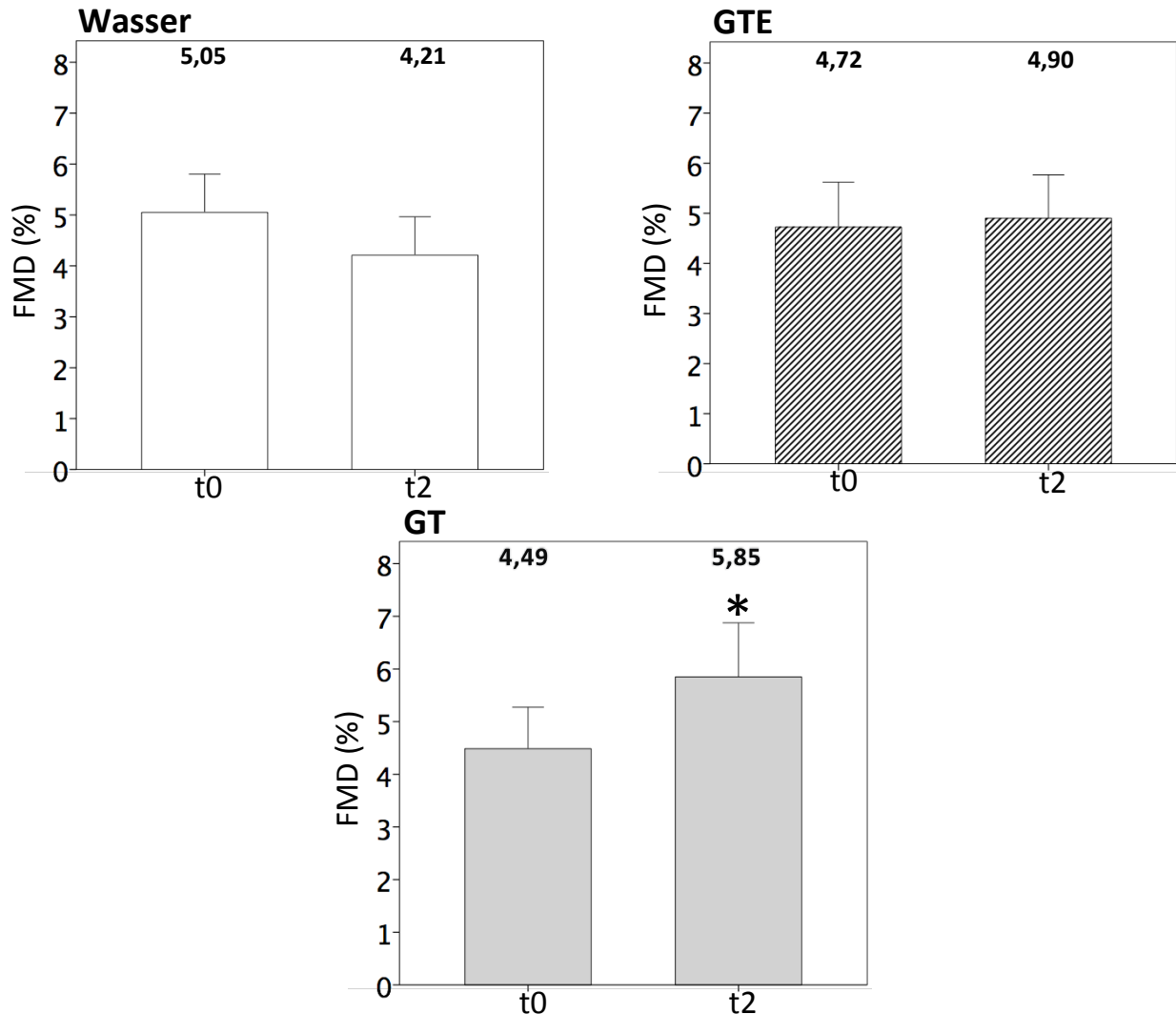
**Abbildung 15. Vergleich der FMD-Messungen zwei Stunden nach der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt**

(A) Vergleich der Ausgangsdurchmesser; (B) Vergleich der FMD t2. Zwei Stunden nach Grünem Tee war im Vergleich zu Wasser ein signifikanter Unterschied in der FMD zu sehen. Signifikanz ist mit \* markiert, Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet. GT-Grüner Tee, GTE-Grüntee-Extrakt. Dargestellt sind Median und Spannweite von n=50 Probanden.

Zwei Stunden nach der Intervention (t2) gab es zwischen den Absolutwerten der Ausgangsdurchmesser vor der Stauung keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten (Wasser  $4,14 \pm 0,52$  mm; Grüner Tee  $4,10 \pm 0,48$  mm; Grüntee-Extrakt  $4,14 \pm 0,49$  mm). Die Mittelwerte der FMD zwei Stunden nach Substanzeinnahme unterschieden sich hingegen signifikant. Im anschließenden Post-hoc-Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der FMD nach Wasser und Grünem Tee ( $p = 0,009$ ), nicht jedoch beim Vergleich „Wasser zu Grüntee-Extrakt“ ( $p = 0,5$ ) und „Grüner Tee zu Grüntee-Extrakt“ ( $p = 0,3$ ).

Im Folgenden wurde die Veränderung der Werte von t0 zu t2 innerhalb der Interventionen untersucht. Die Mittelwerte der FMD für t0 und t2 im jeweiligen Studienarm wurden mittels T-Test für verbundene Stichproben auf einen signifikanten Unterschied getestet.

Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der FMD zum Zeitpunkt t0 und t2 für Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt.



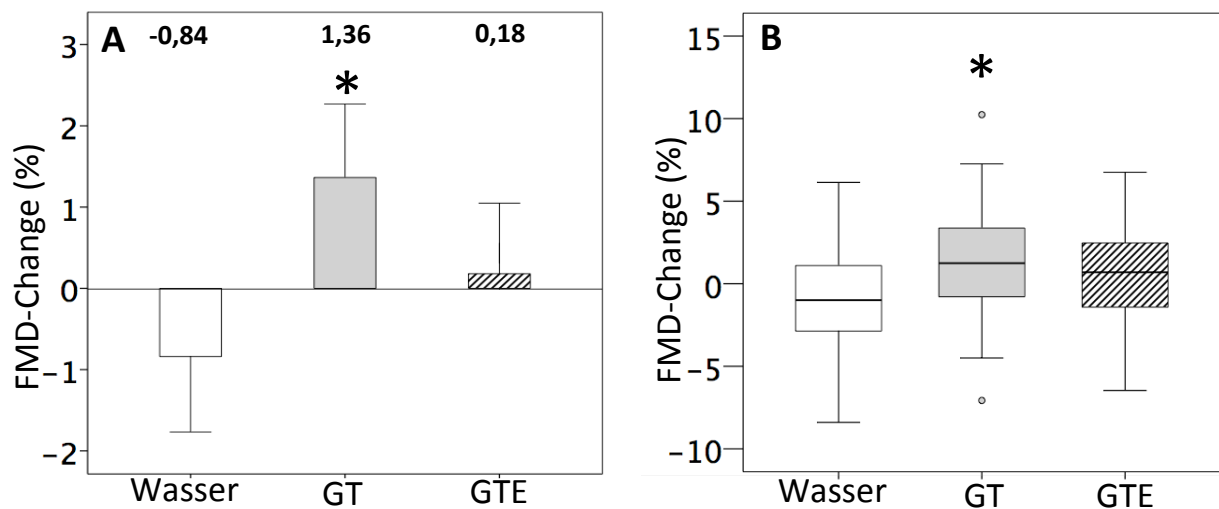
**Abbildung 16. Vergleich der FMD-Werte zum Zeitpunkt t0 und t2 in den Studienarmen Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt**

Signifikanz ist mit \* markiert. Für Wasser und Grüntee-Extrakt war keine signifikante Veränderung der FMD zu beobachten. GT - Grüner Tee, GTE - Grüntee-Extrakt, t0 - vor Substanzeinnahme, t2 - zwei Stunden nach Substanzeinnahme. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler von n=50 Probanden.

Die FMD stieg zwei Stunden nach Einnahme des Grünen Tees von  $4,49 \pm 2,77$  % auf  $5,85 \pm 3,61$  % signifikant um 1,36 % an ( $p = 0,004$ ). Bei den anderen Interventionen gab es keine signifikante Veränderung von t0 zu t2. Nach Einnahme von heißem Wasser verringerte sich die FMD vom Zeitpunkt t0 ( $5,05 \pm 2,65$  %) zu t2 ( $4,21 \pm 2,65$  %) um 0,84 % ( $p = 0,8$ ). Nach Grüntee-Extrakt stieg die FMD von t0 ( $4,72 \pm 3,16$  %) auf t2 ( $4,90 \pm 3,04$  %) nicht signifikant um 0,18 % ( $p = 0,7$ ).



In Abbildung 17 wurde die FMD-Change von Wasser, Tee und Extrakt verglichen.



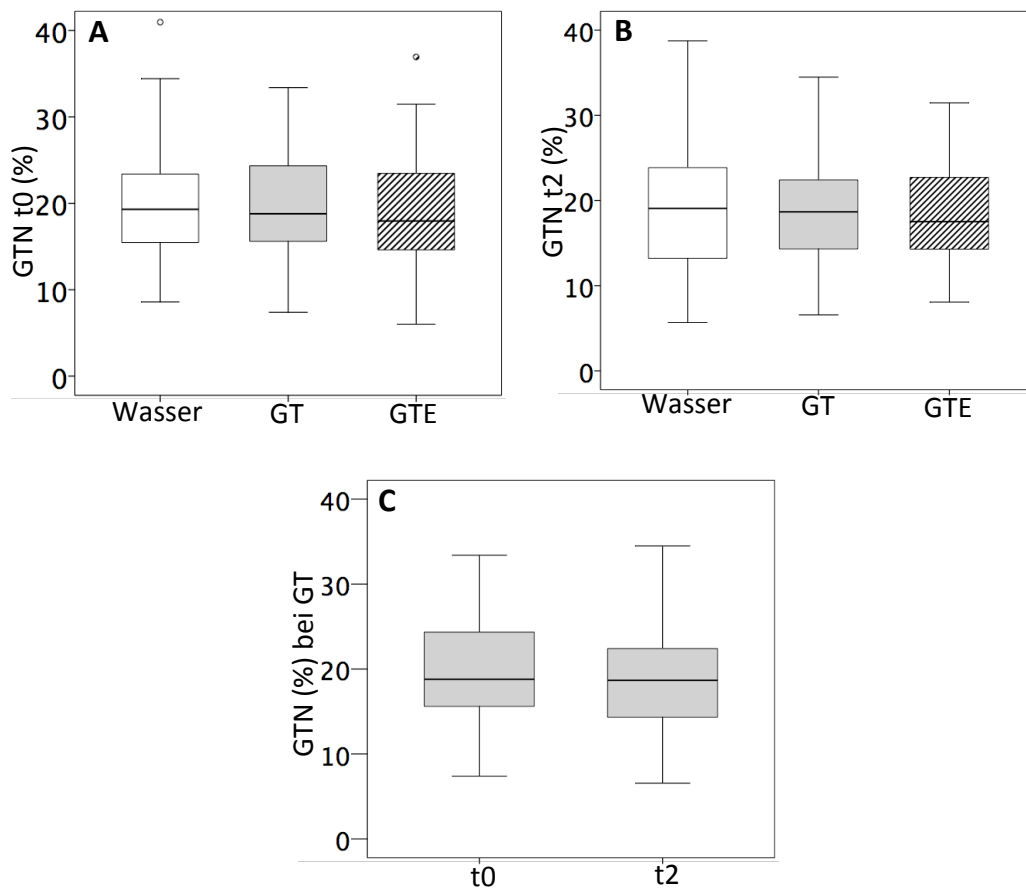
**Abbildung 17. Vergleich der FMD-Change von Wasser, Grüner Tee und Grüntee-Extrakt**  
 (A) Balkendiagramm; (B) Boxplot. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der FMD-Change von Wasser und Grünem Tee. Die Unterschiede zwischen Wasser und Grüntee-Extrakt sowie Grüner Tee und Grüntee-Extrakt waren nicht signifikant. Signifikanzen sind mit \* markiert, Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet, GT-Grüner Tee, GTE-Grüntee-Extrakt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler (A) bzw. Median und Spannweite (B) von n=50 Probanden.

Die Change-Werte in % von Wasser und Grünem Tee unterschieden sich signifikant ( $p = 0,03$ ). Der Grüntee-Extrakt zeigte einen tendenziell positiven Einfluss auf die FMD (+ 0,18 %), der sich jedoch nicht signifikant von Wasser unterschied ( $p = 0,5$ ). Beim Vergleich der Interventionen Grüner Tee und Grüntee-Extrakt ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen ( $p = 0,1$ ).

### 3.4 Vergleich der GTN-Messungen

Sowohl Grüner Tee als auch der Grüntee-Extrakt besaßen keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Vasodilatation (Vasodilatation nach Verabreichung von Nitroglycerin). Zwischen den Werten der Nitroglycerin-induzierten Vasodilatation (GTN) vor und zwei Stunden nach den Interventionen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

In Abbildung 18 sind die GTN-Werte vor und nach der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt sowie die GTN in % vor und nach Grünem Tee als Boxplots dargestellt.



**Abbildung 18. Vergleich der GTN-Messungen vor und zwei Stunden nach der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt**

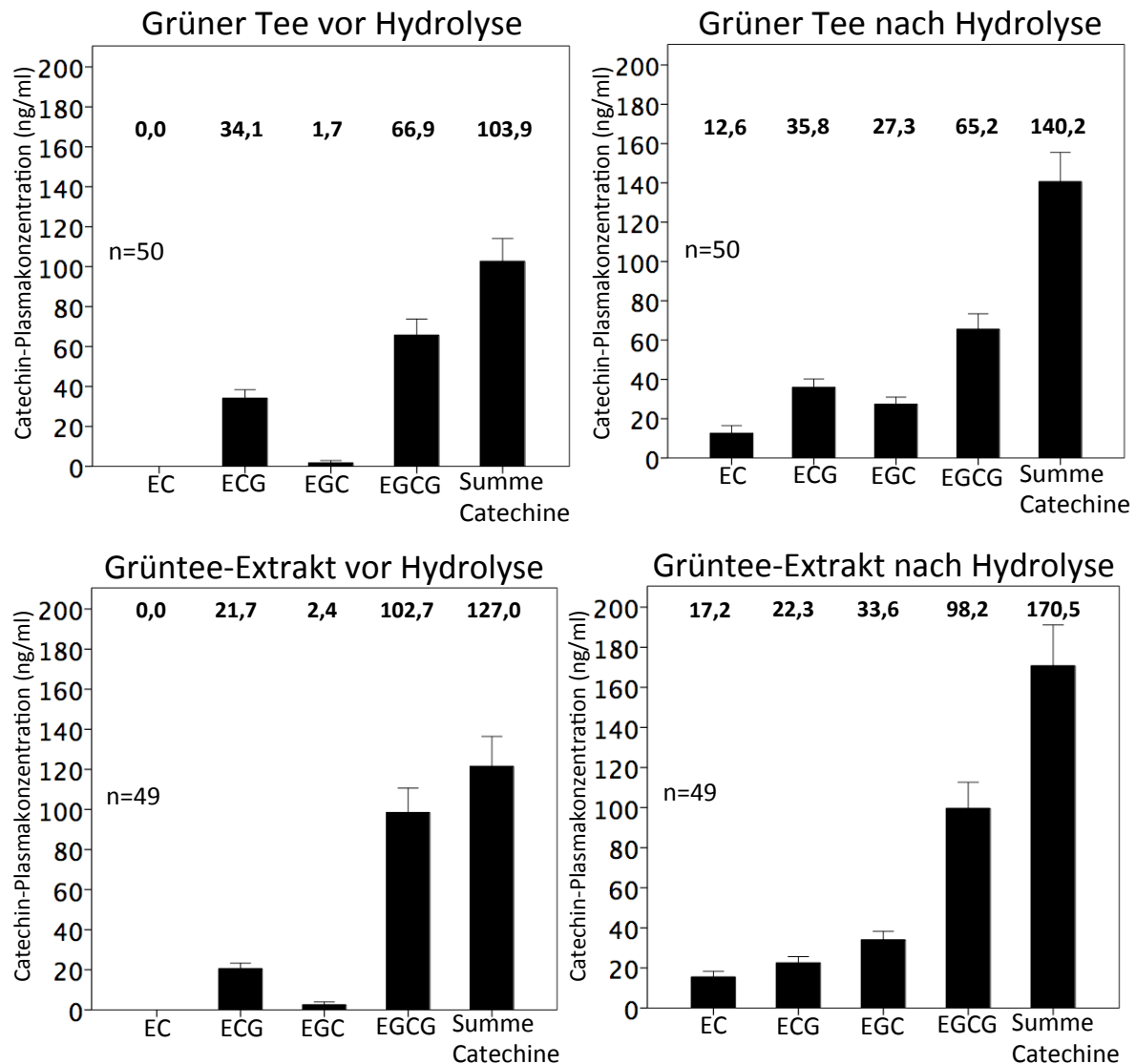
(A) Vergleich der GTN-Messungen vor Einnahme der jeweiligen Substanz, (B) Vergleich der GTN-Messungen zwei Stunden nach Einnahme der jeweiligen Substanz, (C) Vergleich der GTN vor und zwei Stunden nach Grünem Tee. Zwischen den jeweiligen Werten gab es keine signifikanten Unterschiede. Ausreißer sind durch Punkte gekennzeichnet, GT-Grüner Tee, GTE-Grüntee-Extrakt. Dargestellt sind Median und Spannweite von n=50 Probanden.

Vor der Einnahme von Wasser betrug die GTN  $19,57 \pm 6,40$  %, vor Grünem Tee  $19,70 \pm 6,14$  % und vor Grüntee-Extrakt  $18,82 \pm 6,07$  %. Zwei Stunden nach der Einnahme von Wasser lag die GTN bei  $19,25 \pm 7,42$  %, von Grünem Tee bei  $18,91 \pm 6,24$  % und von Grüntee-Extrakt bei  $18,46 \pm 5,62$  %. Grüner Tee zeigte keinen Einfluss auf die endothel-unabhängige Gefäßdilatation. Zwischen den Werten der Gefäßdilatation vor ( $19,70 \pm 6,14$  %) und nach ( $18,91 \pm 6,24$  %) Tee bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,3$ ).

### 3.5 Plasmakonzentrationen von Catechinen und Korrelation mit FMD

Zur Untersuchung der Wirkstoffe im Grünen Tee, die für einen positiven Einfluss auf die FMD verantwortlich sein könnten, wurden in allen Studienarmen vor jeder FMD-Messung die Catechin-Konzentrationen im Plasma der Probanden bestimmt. Zum Zeitpunkt  $t_0$  und zwei Stunden nach Applikation von heißem Wasser konnten bei allen Probanden in allen Studienarmen keine Catechine nachgewiesen werden. Nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt zeigte sich zwei Stunden nach Einnahme in den Blutproben ein signifikanter Anstieg der Catechine. Nach Grüntee-Extrakt konnten nach der Hydrolyse im Vergleich zum Grünem Tee signifikant höhere Plasmaspiegel sowohl für einzelne als auch für die Summe der Catechine festgestellt werden (EC  $p = 0,005$ ; EGC  $p < 0,001$ ; EGCG  $p < 0,001$ ; Summe der Catechine  $p = 0,002$ ). Eine Ausnahme bildet das ECG, das nach Grünem Tee höher konzentriert im Plasma vorlag als nach Grüntee-Extrakt ( $p < 0,001$ ). Im nächsten Schritt wurden die Catechin-Konzentrationen im Plasma der Probanden mit dem Anstieg der FMD zwei Stunden nach Einnahme des Grünen Tees oder Grüntee-Extrakts verglichen.

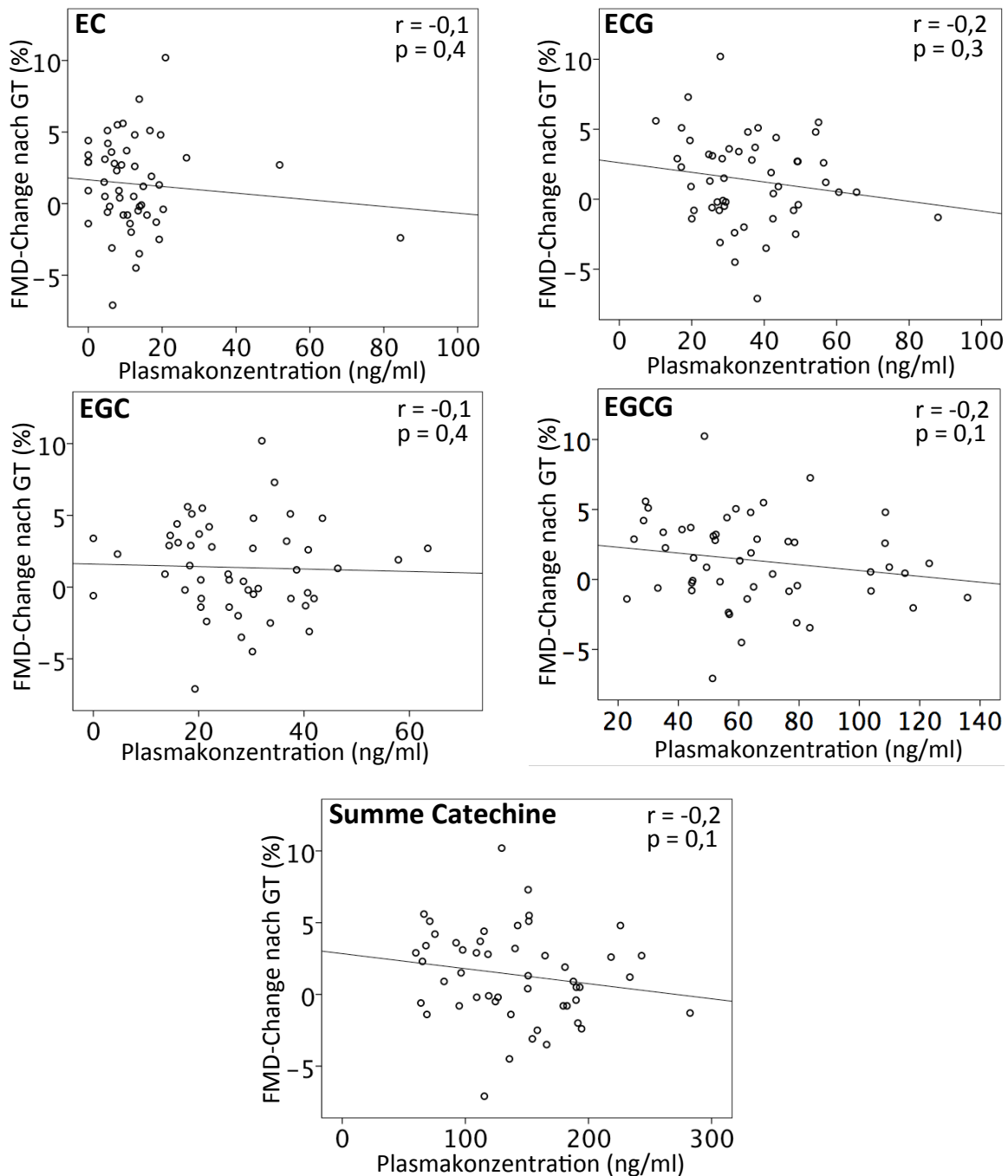
Abbildung 19 zeigt die Plasmakonzentrationen der Catechine zwei Stunden nach der Einnahme von Grünem Tee und Grüntee-Extrakt jeweils vor und nach Hydrolyse.



**Abbildung 19. Plasmakonzentrationen der einzelnen sowie der Summe der Catechine zwei Stunden nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt**

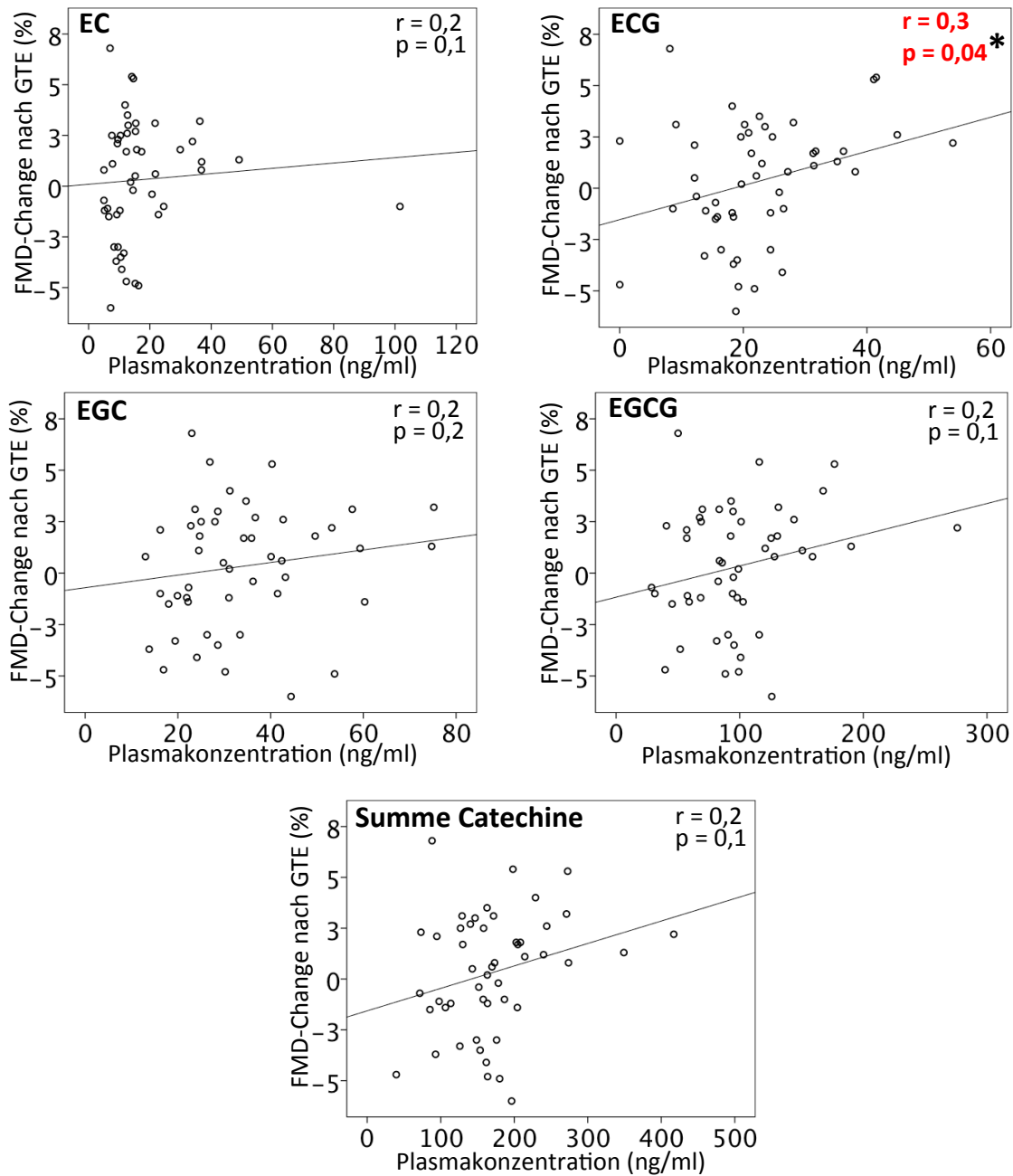
Mittelwerte und Standardfehler der Catechin-Konzentrationen im Plasma der Probanden sind vor und nach Hydrolyse dargestellt.

Es wurde der Korrelationskoeffizient zwischen den Catechin-Plasmakonzentrationen in der Probe t2 und der FMD-Change mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrisch verteilte Daten berechnet und auf Signifikanz geprüft (Dotplots in Abbildung 20 und Abbildung 21).



**Abbildung 20. Korrelation der Catechin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse und der FMD-Change zwei Stunden nach Grünem Tee**

Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der Plasmakonzentrationen und der Veränderung der FMD nach Grünem Tee festgestellt. Der Korrelationskoeffizient und die dazugehörige Signifikanz sind mit r und p angegeben, GT-Grüner Tee. In die Auswertung gingen die Plasmakonzentrationen und FMD-Werte von n=50 Probanden ein.



**Abbildung 21. Korrelation der Catechin-Konzentrationen nach Hydrolyse und FMD-Change zwei Stunden nach Grüntee-Extrakt**

Der Anstieg der Plasmakonzentration von ECG und die Veränderung der FMD nach Grüntee-Extrakt korrelieren signifikant. Für alle anderen Catechine wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt. Signifikanz ist mit \* gekennzeichnet. Der Korrelationskoeffizient und die dazugehörige Signifikanz sind mit r und p angegeben, GTE- Grüntee-Extrakt. In die Auswertung gingen die Plasmakonzentrationen und FMD-Werte von n=49 Probanden ein.

Zwischen den Catechin-Konzentrationen im Plasma und dem FMD-Anstieg nach Grünem Tee konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Dies galt für alle vier Catechine EC ( $r = -0,1$ ;  $p = 0,4$ ), ECG ( $r = -0,2$ ;  $p = 0,3$ ), EGC ( $r = -0,1$ ;  $p = 0,4$ ), EGCG ( $r = -0,2$ ;  $p = 0,1$ ) sowie die Summe aller Catechine ( $r = -0,2$ ;  $p = 0,1$ ).

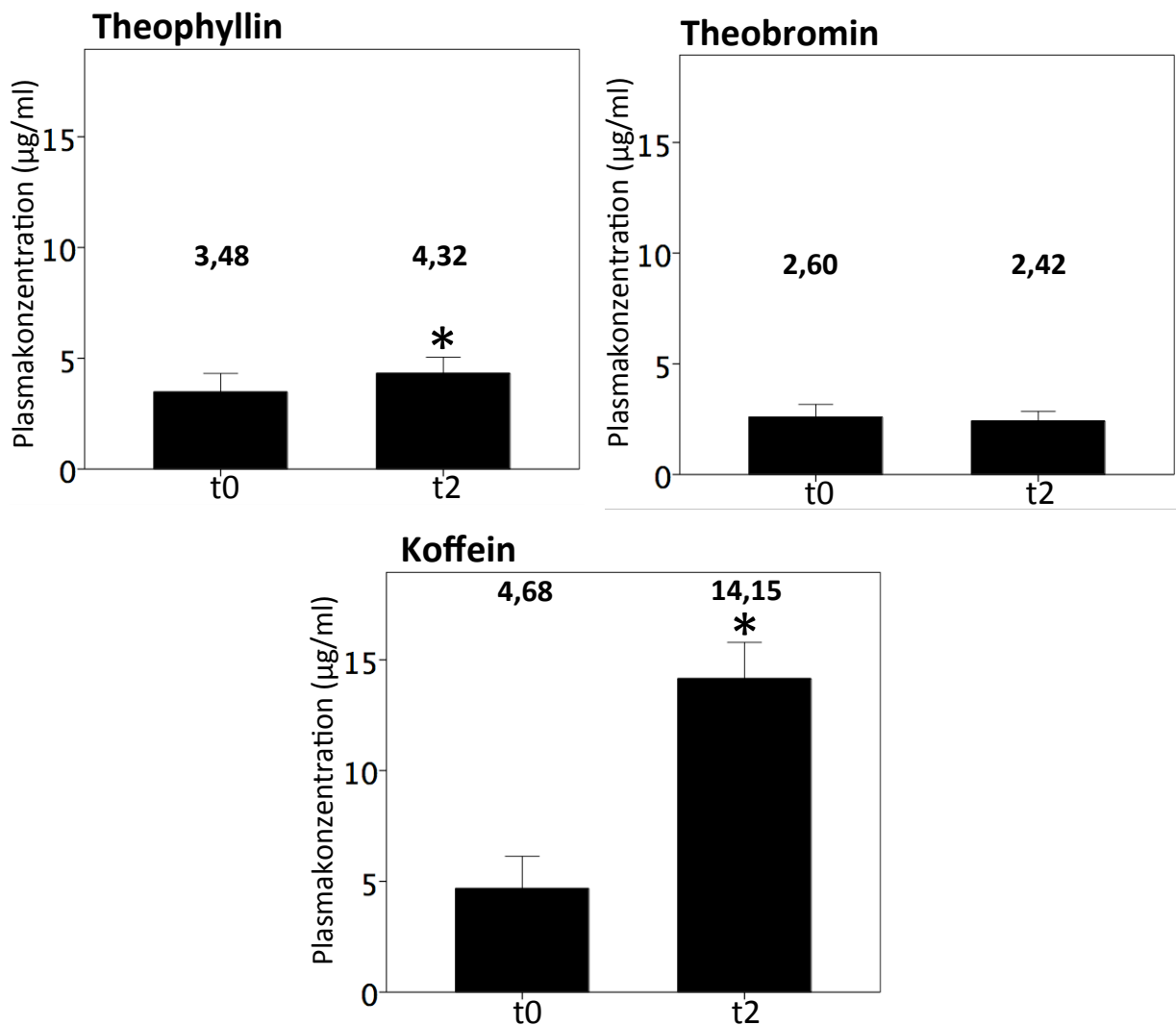
Beim Grüntee-Extrakt zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg von ECG und der Veränderung der FMD von  $t_0$  zu  $t_2$  ( $r = 0,3$ ;  $p = 0,04$ ). Allerdings hat der Grüntee-Extrakt gegenüber Wasser zu keiner signifikanten Verbesserung der FMD geführt. Für alle anderen gemessenen Catechine (EC  $r = 0,2$   $p = 0,1$ ; EGC  $r = 0,2$ ,  $p = 0,2$ ; EGCG  $r = 0,2$ ,  $p = 0,1$ ) und die Summe der Catechine ( $r = 0,2$ ;  $p = 0,1$ ) bestehen, wie beim Grünen Tee, keine signifikanten Zusammenhänge.

### 3.6 Bestimmung von Theophyllin, Theobromin, Koffein und Korrelationen mit FMD

Für die Catechine konnte lediglich für ECG eine signifikante Korrelation zwischen Plasmaanstieg und FMD-Veränderung nach Extrakt gezeigt werden. Die biologische Relevanz ist jedoch eingeschränkt, da durch die Einnahme des Grüntee-Extrakts kein signifikanter FMD-Anstieg bewirkt wurde. Daraufhin wurden weitere Inhaltsstoffe des Grünen Tees untersucht. Grüner Tee hat einen hohen Koffein-Gehalt. Theobromin und Theophyllin sind Abbauprodukte des Koffeins, wobei letzteres die Eigenschaft eines Phosphodiesterase-Inhibitors besitzt<sup>108</sup>, der in den Abbau von cGMP eingreifen kann. Da diese drei Stoffe also potentiell Einfluss auf die Endothelfunktion nehmen können, wurden sie zusätzlich zu den Catechinen bestimmt und in die Auswertung einbezogen. Koffein, Theobromin und Theophyllin wurden vor und nach dem Genuss von Grünem Tee bestimmt und ein möglicher Zusammenhang zwischen der Konzentrationsveränderung dieser Stoffe im Plasma und dem FMD-Anstieg untersucht.

Bereits vor der Einnahme von Wasser, Grünem Tee und Grüntee-Extrakt wurden Koffein, Theobromin und Theophyllin im Plasma der Probanden nachgewiesen. Sie wurden allerdings zusätzlich nur mit dem Grünen Tee aufgenommen, da der Grüntee-Extrakt frei von diesen Stoffen war. Alle Plasma-Konzentrationsbestimmungen und Korrelationen mit der FMD wurden daher nur mit den Werten vor und nach Grünem Tee durchgeführt. Für Theophyllin wurde ein

signifikanter, wenn auch sehr geringfügiger Anstieg von  $3,48 \pm 2,93 \mu\text{g/ml}$  auf  $4,32 \pm 2,53 \mu\text{g/ml}$  um  $0,84 \pm 1,40 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,001$ ) gezeigt. Die Theobromin-Konzentration im Plasma der Probanden sank von  $2,60 \pm 1,99 \mu\text{g/ml}$  auf  $2,42 \pm 1,52 \mu\text{g/ml}$  nicht signifikant um  $0,18 \pm 0,82 \mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,4$ ). Die Koffein-Plasmakonzentration stieg von  $4,68 \pm 5,10 \mu\text{g/ml}$  vor der Tee-Einnahme auf  $14,15 \pm 5,74 \mu\text{g/ml}$  zwei Stunden danach. Es konnte ein signifikanter Konzentrationsanstieg um  $9,47 \pm 4,24 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,001$ ) beobachtet werden. Abbildung 22 zeigt die Konzentrationen der drei Substanzen vor und nach der Einnahme von Grünem Tee.



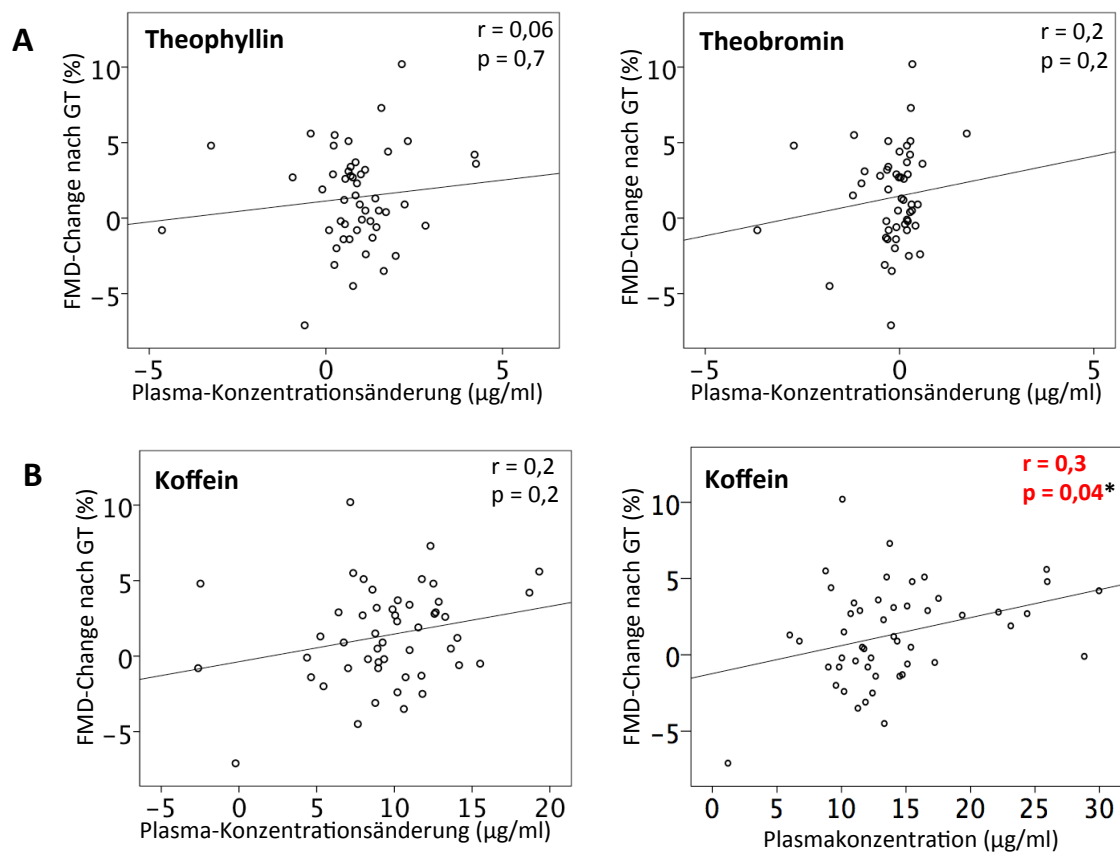
**Abbildung 22. Plasmaspiegel von Theophyllin, Theobromin und Koffein vor und zwei Stunden nach 442 ml Grünem Tee**

Die Plasmaspiegel von Koffein und Theophyllin stiegen signifikant an. Die Theobromin-Konzentration veränderte sich nicht signifikant. Signifikanzen sind mit \* gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler von  $n=50$  Probanden.



Anschließend wurde geprüft, ob zwischen dem Anstieg der FMD und der Konzentrationsveränderung von Theophyllin, Theobromin und Koffein im Plasma der Probanden eine signifikante Korrelation besteht. Außerdem wurde die absolute Plasmakonzentration von Koffein zwei Stunden nach Tee bestimmt und ein möglicher Zusammenhang mit dem Anstieg der FMD untersucht.

Abbildung 23 zeigt die FMD-Change und die Veränderung der Konzentrationen von Theophyllin, Theobromin und Koffein sowie die absolute Konzentration von Koffein zwei Stunden nach Grünem Tee in Form von Dotplots.



**Abbildung 23. Korrelation der Plasma-Konzentrationsveränderung von Theophyllin, Theobromin und Koffein sowie die absolute Koffeinkonzentration mit der FMD-Change zwei Stunden nach Grünem Tee.**

A. Für Theophyllin und Theobromin konnte kein signifikanter Korrelationskoeffizient zwischen der Konzentrationsveränderung und dem FMD-Anstieg nach Tee gezeigt werden.

B. Der Anstieg der Koffeinkonzentration und die FMD-Change korrelierten ebenfalls nicht signifikant. Nur die absolute Koffeinkonzentration und der FMD-Anstieg zwei Stunden nach Tee korrelierten signifikant. Der Korrelationskoeffizient und die dazugehörige Signifikanz sind mit  $r$  und  $p$  angegeben; GT- Grüner Tee; In die Auswertung gehen die Plasmakonzentrationen und FMD-Werte von  $n=50$  Probanden ein.

Für die Veränderung der Konzentrationen im Plasma der Probanden, konnte weder für Theophyllin noch für Theobromin eine signifikante Korrelation mit der FMD-Change zwei Stunden nach dem Genuss von Grünem Tee berechnet werden (Theophyllin ( $r = 0,06$ ;  $p = 0,70$ ), Theobromin ( $r = 0,18$ ;  $p = 0,22$ )). Darüber hinaus war auch die Korrelation zwischen dem Anstieg der Koffeinkonzentration im Blut und dem FMD-Anstieg nicht signifikant (Koffein ( $r = 0,19$ ;  $p = 0,18$ )). Für die absolute Konzentration von Koffein zwei Stunden nach der Einnahme von Grünem Tee konnte jedoch eine signifikante Korrelation mit dem FMD-Anstieg gezeigt werden ( $r = 0,3$ ;  $p = 0,04$ ).

Tabelle 13 zeigt zusammenfassend alle erhobenen FMD- und GTN-Werte sowie die Plasmakonzentrationen der Catechine, des Koffeins, Theobromins und Theophyllins.

**Tabelle 13. Übersichtstabelle der FMD- und GTN-Messungen sowie der Plasmakonzentrationen der Tee-Inhaltsstoffe**

	Wasser		Grüner Tee		Grüntee-Extrakt		
	t0	t2	t0	t2	t0	t2	
<b>FMD-Messungen:</b>							
Basisdurchmesser (mm)	4,07 (0,49)	4,14 (0,52)	4,11 (0,51)	4,10 (0,48)	4,05 (0,48)	4,14 (0,49)	
FMD (mm)	4,28 (0,56)	4,32 (0,55)	4,29 (0,54)	4,34 (0,54)	4,24 (0,49)	4,34 (0,51)	
FMD (%)	5,05 (2,65)	4,21 (2,65)	4,49 (2,77)	5,85 (3,61)	4,72 (3,16)	4,90 (3,04)	
$\Delta$ FMD (%)	-0,84 (3,27)		1,36 (3,18)		0,18 (3,06)		
<b>GTN-Messungen:</b>							
Basisdurchmesser (mm)	4,06 (0,50)	4,11 (0,52)	4,08 (0,50)	4,10 (0,49)	4,08 (0,48)	4,12 (0,48)	
GTN (mm)	4,38 (0,52)	4,88 (0,50)	4,87 (0,53)	4,85 (0,46)	4,83 (0,43)	4,87 (0,45)	
GTN (%)	19,57 (6,40)	19,25 (7,42)	19,70 (6,41)	18,91 (6,24)	18,82 (6,07)	18,46 (5,62)	
$\Delta$ GTN (%)	-0,32 (5,41)		-0,79 (5,00)		-0,36 (4,71)		
<b>Catechin-Plasmakonzentrationen (ng/ml):</b>							
vor Hydrolyse	EC	n.d.	n.d.	n.d.	0 (0,00)	n.d.	0 (0,00)
	ECG	n.d.	n.d.	n.d.	34,11 (15,00)	n.d.	21,68 (10,94)
	EGC	n.d.	n.d.	n.d.	1,67 (4,32)	n.d.	2,41 (4,89)
	EGCG	n.d.	n.d.	n.d.	66,88 (27,01)	n.d.	102,72 (47,16)
	Summe Catechine	n.d.	n.d.	n.d.	103,91 (41,88)	n.d.	127,02 (58,01)
nach Hydrolyse	EC	n.d.	n.d.	n.d.	12,61 (13,47)	n.d.	17,23 (15,62)
	ECG	n.d.	n.d.	n.d.	35,83 (15,10)	n.d.	22,27 (10,71)
	EGC	n.d.	n.d.	n.d.	27,33 (12,77)	n.d.	33,64 (14,84)
	EGCG	n.d.	n.d.	n.d.	65,16 (27,99)	n.d.	98,19 (45,65)
	Summe Catechine	n.d.	n.d.	n.d.	140,19 (52,91)	n.d.	170,47 (69,55)
<b>Plasmakonzentrationen (<math>\mu</math>g/ml):</b>							
Koffein	3,82 (4,01)	2,85 (3,21)	4,68 (5,10)	14,15 (5,74)	5,02 (6,04)	4,58 (5,63)	
Theobromin	2,36 (1,68)	1,94 (1,42)	2,6 (1,99)	2,42 (1,52)	2,78 (2,24)	2,32 (1,76)	
Theophyllin	3,15 (2,73)	2,49 (2,23)	3,48 (2,93)	4,32 (2,53)	3,43 (3,32)	2,93 (2,90)	
$\Delta$ Koffein	-0,96 (1,10)		9,47 (4,24)		-0,54 (2,32)		
$\Delta$ Theobromin	-0,42 (0,50)		-0,18 (0,82)		-0,47 (0,75)		
$\Delta$ Theophyllin	-0,66 (0,72)		0,84 (1,40)		-0,57 (1,01)		

Angaben entsprechen den Mittelwerten und Standardabweichungen von n=50 Probanden, für die Plasmakonzentrationen des Grüntee-Extrakts sind es aufgrund einer hämolytischen Probe n=49. Basisdurchmesser (mm): Ausgangsdurchmesser zu Beginn der FMD- oder GTN-Bestimmung in mm, FMD (mm): Maximale Dilatation des Gefäßes bei reaktiver Hyperämie in mm, FMD (%): FMD in %, GTN (mm): Maximale Dilatation des Gefäßes nach Applikation des Nitroglycerin-Sprays in mm, GTN (%): GTN in %,  $\Delta$  FMD (%): FMD-Change, Veränderung von FMD t0 % zu FMD t2 %;  $\Delta$  GTN (%): GTN-Change, Veränderung von GTN t0 % zu GTN t2 %, EC: Epicatechin, ECG: Epicatechingallat, EGC: Epigallocatechin, EGCG: Epigallocatechingallat, Summe Catechine: Summe aller Catechine, n.d.: nicht detektierbar,  $\Delta$ : Veränderung der Plasmakonzentrationen von t0 zu t2.

## 4. Diskussion

In einer prospektiven Cross-over-Studie wurde der Effekt von Catechinen in verschiedenen Darreichungsformen auf die FMD als Parameter der Endothelfunktion von 50 gesunden männlichen Probanden getestet. Alle Probanden nahmen 200 mg EGCG entweder durch Grünen Tee als Getränk oder durch einen Grüntee-Extrakt zu sich. Als Negativkontrolle diente heißes Wasser. Die FMD wurde vor und zwei Stunden nach Substanzeinnahme gemessen, um den Einfluss der Catechine auf die Endothelfunktion zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass Grüntee-Extrakt und Grüner Tee in aufgebrühter Form die Endothelfunktion unterschiedlich stark beeinflussen. Der Grüntee-Extrakt bewirkte nur eine geringe Steigerung der FMD-Werte von 0,18 %, ohne gegenüber der Wirkung von heißem Wasser ein signifikantes Niveau zu erreichen. Nach Grünem Tee hingegen zeigte sich ein signifikanter FMD-Anstieg von 1,36 %. Die Catechinkonzentrationen im Plasma der Probanden korrelierten nicht mit der Veränderung der FMD nach Tee und Extrakt. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Interventionsstudie lassen vermuten, dass Catechine beim Menschen lediglich zu einem geringen Teil einen Anstieg der FMD bewirken und dafür andere Stoffe des Grünen Tees involviert sind. Es scheint, dass mit der steigenden Anzahl enthaltener Substanzen in den Interventionen (Wasser: ohne Inhaltsstoffe, Grüntee-Extrakt: Catechine, Grüner Tee: Catechine und weitere Inhaltsstoffe) die positiven Effekte auf die FMD zunehmen.

### 4.1 FMD-Veränderung nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt

In der durchgeführten FMD-Studie bewirkte Grüner Tee mit einem EGCG-Gehalt von 200 mg an 50 gesunden männlichen Probanden eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion um 1,36 % gegenüber der Kontrolle. Grüner Tee zeigte keinen Einfluss auf den Basaldurchmesser oder die endothelunabhängige, durch Nitroglycerin induzierte Vasodilatation. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Interventionsstudien mit Grünem Tee.<sup>71,73,74,109</sup> In der Studie von Alexopoulos et al. führte der Genuss von Grünem Tee bei einem kleinen Probandenkollektiv (n = 14), bestehend aus gesunden Männern und Frauen, zu einer signifikanten FMD-Steigerung von 3,69 %.<sup>109</sup> Die Studie von Kim et al. zeigte als Langzeiteffekt ebenfalls einen signifikanten FMD-Anstieg an gesunden Rauchern, die täglich über zwei Wochen 8 g Grünen Tee zu sich nahmen.<sup>74</sup>

Ergebnisse der Studie von Nagaya et al. weisen darauf hin, dass eine durch Rauchen verursachte Einschränkung der Endothelfunktion durch Grünen Tee partiell rückgängig gemacht werden kann.<sup>110</sup> Regelmäßiger Tabakkonsum erhöht das Risiko für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und spiegelt sich in niedrigeren FMD-Werten wider.<sup>111</sup> Raucher profitieren möglicherweise zusätzlich von den Effekten des Grünen Tees, insbesondere von seinen antioxidativen Eigenschaften. Bei gesunden Probanden mit regelmäßigem Tabakkonsum konnte durch die Einnahme von Grünem Tee der oxidative Status der Serumlipide so verbessert werden, dass sich signifikant weniger oxLDL im Plasma nachweisen ließ.<sup>85,112</sup> Endotheliale Progenitorzellen (EPC), die über eine Entdifferenzierung geschädigtes Endothel ersetzen können, sind im Blut von Rauchern in der Regel vermindert. Durch den Genuss von Grünem Tee stieg die Anzahl der EPC an, was mit dem beobachteten FMD-Anstieg korrelierte.<sup>74</sup> In der vorliegenden Studie war Tabakkonsum ein Ausschlusskriterium und somit kann kein Vergleich mit der Höhe des FMD-Anstiegs vorgenommen werden.

Jochmann et al. fanden in einer Studie an 21 postmenopausalen Frauen 120 Minuten nach Einnahme von Grünem beziehungsweise Schwarzem Tee einen Anstieg der FMD.<sup>73</sup> Der Schwarze Tee enthielt nur die Hälfte der Catechine des Grünen Tees. Beide Teesorten zeigten jedoch einen etwa gleich hohen signifikanten Anstieg der FMD gegenüber Wasser. Die Autoren schlossen daraus auf eine Beteiligung anderer oder weiterer Tee-Inhaltsstoffe an der Verbesserung der Endothelfunktion.<sup>73</sup> Diese Ansicht wird von den Ergebnissen der vorliegenden Studie gestützt, da die Verabreichung des Grüntee-Extrakts, der neben 200 mg EGCG nur Catechine enthielt, keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Endothelfunktion besaß. Die vorliegenden Studienergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass ein EGCG-haltiger, koffeinfreier Grüntee-Extrakt keine signifikanten Kurzzeiteffekte auf die Endothelfunktion in gesunden Individuen ausübt und nicht im selben Maße wirksam ist wie Grüner Tee als Getränk. Die beiden Catechin-Darreichungsformen (Tee und Extrakt) haben somit keine äquivalente Wirkpotenz. Der Extrakt ist in seiner Wirkung zwischen Grünem Tee und Wasser einzuordnen. Dies deutet darauf hin, dass Grüner Tee als Heißgetränk neben den Catechinen weitere Substanzen enthält, die zu einer Verbesserung der Endothelfunktion beitragen.

Bislang wurden nur wenige Studien zur Wirkung von Grüntee-Catechinen in Form von Extrakten veröffentlicht. Dabei wurden entweder die Langzeiteffekte eines Tee-Extrakts oder isoliertes EGCG analysiert. Tinahones et al. verwendeten einen Extrakt, der nach fünfwöchiger Einnahme eine FMD-Steigerung von 5,68 auf 11,98 % gegenüber Placebo bewirkte.<sup>112</sup> Die Tagesdosis in Form von Kapseln enthielt 375 mg Catechine und 150 mg Koffein, was dem Gehalt in 8,43 g Grünem Tee entsprach. Neben EC, ECG, EGC bestand das verwendete Präparat zu 72 % aus EGCG (ca. 270 mg). Die Studienteilnehmerinnen waren gesunde prämenopausale Frauen. Aussagen zum Hormonstatus der Frauen und dem jeweiligen Messzeitpunkt innerhalb des Hormonzyklus wurden dabei nicht getroffen. Dies scheint jedoch keine unerhebliche Rolle bei der Bewertung der Studienergebnisse zu spielen, da beispielsweise Hashimoto et al. zeigten, dass Östrogene die Endothelfunktion in relevantem Maße beeinflussen.<sup>99</sup> Abhängig von der Zyklusphase und dem korrespondierenden Hormonspiegel wurden signifikant unterschiedliche FMD-Werte bei Frauen gemessen. Dies galt sowohl für natürliche Östrogenschwankungen im Rahmen des weiblichen Zyklus als auch für exogen zugeführte Hormonpräparate.<sup>113</sup> In der vorliegenden Studie wurden daher nur männliche Probanden für die Studie rekrutiert, um den Einfluss von Östrogen sicher auszuschließen. Hinzukommt, dass bei Tinahones et al. nur die mehrwöchige Einnahme des Grüntee-Extrakts untersucht wurde.<sup>112</sup> Somit können keine Rückschlüsse auf die Akutwirkung des Präparates vorgenommen werden.

Schroeter et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung von Polyphenolen auf die FMD und sind bisher die Einzigen, die an einer sehr kleinen Probandenzahl von n=3 eine positive und signifikante Korrelation zwischen Plasmawerten und Veränderung der Endothelfunktion zeigen konnten.<sup>52</sup> Es wurden dabei Catechin und Epicatechin sowie einige Metabolite dieser Stoffe im Blut untersucht. Epicatechin in einer Dosis von 1 und 2 mg/kg Körpergewicht, das mit einem Kakao-Getränk verabreicht wurde, verbesserte die FMD signifikant. Der Plasma-Konzentrationsanstieg eines Epicatechin-Metaboliten (Epicatechin-7-O-Glucoronid) korrelierte dabei signifikant mit dem FMD-Anstieg. Für Catechin hingegen konnten keine positiven Effekte gezeigt werden. Daraufhin postulierten die Autoren eine zumindest partielle Beteiligung des Epicatechin am Anstieg der FMD.<sup>52</sup> Die Wirksamkeit von Epicatechin erscheint jedoch angesichts dieser geringen Probandenzahl nicht ausreichend belegt und eine Verallgemeinerung dieser Studienergebnisse ist schwierig.

Darüber hinaus zeigte eine aktuelle Studie an einem größeren Probandenkollektiv (37 Männer und Frauen), dass die tägliche Einnahme von 100 mg Epicatechin über einen Zeitraum von vier Wochen keinen signifikanten Anstieg der FMD bewirkte. Auch zwei Stunden nach der letzten EC-Einnahme wurde kein signifikanter FMD-Anstieg gemessen.<sup>114</sup> Diese Ergebnisse wurden in der hier vorliegenden Studie indirekt bestätigt. Die Einnahme eines EC-haltigen Grüntee-Extraktes zeigte keinen relevanten Effekt auf die FMD und die EC-Konzentration im Plasma der Probanden korrelierte nicht mit der FMD-Veränderung nach Tee.

In einer FMD-Studie von Widlansky et al. wurden die Kurzzeiteffekte von reinem EGCG beschrieben. 300 mg EGCG bewirkte bei Patienten mit einer bestehenden KHK 120 Minuten nach Einnahme eine signifikante Steigerung der FMD von 1,5 %.<sup>115</sup> Allerdings unterschieden sich die Prozentwerte der FMD zwei Stunden nach der Einnahme von Placebo und EGCG nicht (sowohl nach Placebo als auch nach EGCG: FMD  $t_2 = 8,6\%$ ). Darüber hinaus wurden vor EGCG niedrigere Werte für die Ausgangs-FMD gemessen als vor Placebo. Auf diese Weise konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den FMD-Werten von  $t_0$  zu  $t_2$  für EGCG, nicht jedoch für Placebo gezeigt werden. Der beobachtete Effekt des EGCGs könnte daher auch als Folge der höheren Ausgangs-FMD in der Placebo-Intervention bewertet werden. Bei der Untersuchung der Langzeiteffekte in dieser Studie konnte nach zweiwöchiger Einnahme von täglich 300 mg EGCG keine signifikante Veränderung der FMD festgestellt werden. Der positive Einfluss von EGCG wurde damit in dieser Studie eher nicht bestätigt.<sup>115</sup> Hinzu kommen einige Unterschiede im Studiendesign, die einen direkten Vergleich der vorliegenden Studie mit den Studienergebnissen von Widlansky et al. einschränkt. Die Interventionen bei Widlansky et al. wurden Placebo-kontrolliert mit KHK-Patienten durchgeführt, die regelmäßig ACE-Inhibitoren und Statine einnahmen. Eine Beeinflussung der FMD durch die Medikation kann also nicht vollständig ausgeschlossen werden. Pharmakologische Studien zeigten, dass die Einnahme von blutdruck-<sup>116</sup> und serumlipidsenkenden<sup>117</sup> Medikamenten über zwei bis vier Wochen zu einem Anstieg der FMD-Werte führen kann. Bei der Beobachtung der Kurzzeiteffekte kann sicherlich von einer geringen Beeinflussung der FMD-Werte durch die Medikation ausgegangen werden.

Da die Probanden beide Studienarme (Placebo und EGCG) zeitlich hintereinander durchliefen, könnte jedoch der längere Einnahmezeitraum des jeweiligen Medikaments einen Einfluss auf die Endothelfunktion gehabt haben. Außerdem spielt die regelmäßige Medikamenteneinnahme insofern eine Rolle, als dass sich die gewählten Studienpopulationen (erkrankt und gesund) maßgeblich unterschieden. Bei Widlansky et al. wurde 300 mg reines EGCG verwendet, der Grüntee-Extrakt der vorliegenden Studie dagegen enthielt 200 mg EGCG in Kombination mit weiteren Catechinen. Möglicherweise wurde in dieser Studie zu wenig EGCG verabreicht und eine höhere Dosis könnte einen Effekt auf die FMD besitzen. Dagegen spricht, dass die Dosissteigerung in einer Studie an MS-Patienten keine statistisch signifikante Verbesserung der Endothelfunktion zeigte.<sup>118</sup> Hohe Dosen von 400 mg EGCG täglich hatten über einen dreimonatigen Einnahmezeitraum keinen Effekt auf die FMD. Sogar die Verabreichung von zusätzlichen 400 mg am jeweiligen Messtag konnte keinen signifikanten FMD-Anstieg bewirken.<sup>118</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass auch höhere Mengen EGCG keinen relevanten Effekt auf die Endothelfunktion haben. Ein weiterer Unterschied im Studienablauf war, dass EGCG bei Widlansky et al. in Verbindung mit einer standardisierten Mahlzeit eingenommen wurde. Es gibt eine Reihe von Studien, die den Einfluss der Nahrungsaufnahme und -zusammensetzung auf die FMD untersuchten. Um die metabolischen Effekte sowie die Einflüsse auf die Resorption und Absorption von EGCG bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme zu vermeiden, erfolgten die Endothelfunktionsmessungen in der durchgeführten Studie nach einer mindestens achtstündigen Nüchternheitsphase. Der Genuss fettreicher Nahrungsmittel zeigte in unterschiedlichen Interventionsstudien entweder keine signifikanten Effekte<sup>119</sup> oder eine Verminderung der FMD<sup>120</sup>. Dies wurde unter anderem damit begründet, dass die Resorption und Aufnahme der Catechine bei gleichzeitiger Aufnahme von Fett limitiert sind.<sup>81</sup> Darüber hinaus scheinen die postprandiale Hyperglykämie sowie der Insulinspiegel eine Veränderung der Endothelfunktion zu bewirken.<sup>121</sup> Die Autoren der Studie von Widlansky et al. diskutierten den vermeintlichen FMD-Anstieg nach EGCG als möglicherweise zu gering, da die enterale Resorption des Tee-Polyphenols durch die Mahlzeit vermindert sei. Man vermutete, dass der EGCG-Effekt durch die geringere Bioverfügbarkeit abgeschwächt worden sei.<sup>115</sup> Im Rahmen der durchgeführten Studie konnte auch im nüchternen Zustand kein signifikanter Effekt der Catechine auf die Endothelfunktion von gesunden Probanden gezeigt werden, was den Studienergebnissen von Widlansky et al. maßgeblich widerspricht.



Die Studie von Widlansky et al. wurde doppelt verblindet durchgeführt. Dies war in der durchgeführten Studie nicht der Fall und stellt eine Schwäche des hier gewählten Studiendesigns dar. Ein weiterer Nachteil der vorliegenden Studie bildet das Fehlen eines entsprechenden Placebos. Es konnte kein Getränk hergestellt werden, das optisch und geschmacklich dem Grünen Tee gleicht und gleichzeitig frei von Wirkstoffen ist. Den Probanden war daher eine Unterscheidung zwischen Wasser, Tee oder Extrakt bei der Einnahme möglich.

#### 4.2 Korrelationen von Catechin-Plasmakonzentrationen mit der FMD-Veränderung nach Grünem Tee und Grüntee-Extrakt

Verglichen mit Grünem Tee wurden nach Grüntee-Extrakt grundsätzlich höhere Konzentrationen an Catechinen im Plasma gefunden. Eine Ausnahme bildete ECG, das nach Konsum von Tee leicht höher konzentriert vorlag (ECG-Plasmaspiegel nach Hydrolyse: Grüner Tee: 35,8 ng/ml vs. Grüntee-Extrakt: 22,3 ng/ml;  $p < 0,001$ ). Tee wies im Vergleich zu Extrakt eine signifikant niedrigere EGCG-Konzentration im Plasma der Probanden auf (EGCG-Plasmaspiegel nach Hydrolyse: Grüner Tee: 65,5 ng/ml vs. Grüntee-Extrakt: 98,2 ng/ml;  $p < 0,001$ ). Damit konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass oral in unterschiedlicher Form appliziertes EGCG nicht die gleichen Konzentrationen im Plasma erreicht. Der FMD-Anstieg nach Grünem Tee war jedoch trotz geringerer Catechin-Plasmakonzentrationen höher. Es zeigte sich eine leicht negative Korrelation zwischen Anstieg der FMD und der im Blut gemessenen Catechin-Plasmakonzentrationen nach Tee, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Für die Veränderung der FMD nach Grüntee-Extrakt und den Catechin-Konzentrationen im Plasma ergaben sich dagegen positive Korrelationskoeffizienten. Bis auf ECG konnte jedoch auch hier keine statistische Signifikanz gezeigt werden. Nur für ECG wurde eine wenn auch schwach signifikante ( $p = 0,04$ ) Korrelation von  $r = 0,3$  beobachtet. Da jedoch nach der Einnahme des Grüntee-Extrakts kein signifikanter Anstieg der FMD beobachtet wurde, scheint dieses Ergebnis eher ein statistischer Zufallsbefund zu sein.

Damit wird deutlich, dass EGCG, obwohl als potentiell wirkungsvollstes Grüntee-Polyphenol beschrieben, keine Rolle bei der Veränderung der FMD beim Menschen zu spielen scheint. Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass höhere Catechin-Konzentrationen im Blut nicht zwingend mit einer höheren FMD einhergehen und wahrscheinlich auch nicht für den FMD-Anstieg nach Grünem Tee verantwortlich sind. Bislang sind nur wenige Studien veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen der FMD und dem Anstieg der Catechin-Plasmakonzentration untersucht haben. Viele Studien mit Grünem und Schwarzem Tee zeigten einen Anstieg der FMD-Werte, dabei wurden jedoch nur selten Korrelationsanalysen zwischen Plasmakonzentrationen der Tee-Inhaltsstoffe und der korrespondierenden FMD-Werte durchgeführt. Bei der Studie von Widlansky et al. folgten die Zeitkurven des EGCG-Anstiegs im Blut und der gemessenen FMD einem ähnlichen Verlauf. Dabei wurde jedoch keine statistische Signifikanz gefunden.<sup>115</sup> Eine Studie der selben Arbeitsgruppe, bei der Schwarzer Tee zu einem signifikanten Anstieg der FMD führte, zeigte ebenfalls keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der im Blut gemessenen Catechin-Konzentrationen und der Veränderung der FMD zwei Stunden nach Tee-Konsum.<sup>122</sup> Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Eine Arbeit von Grassi et al. zeigte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen aufgenommener Flavonoid-Menge und den korrespondierenden FMD-Werten, was wiederum eine Mitbeteiligung der Catechine am FMD-Anstieg möglich macht.<sup>70</sup> Die Flavonoid-Dosen (100, 200, 400, 800 mg), die in einem Tee-Getränk an gesunde Probanden verabreicht wurden, führten nach einer Woche dosisabhängig zu einer höheren FMD. Allerdings wurde dabei keine Flavonoid-Bestimmung im Blut vorgenommen und somit fehlen die Korrelationsanalysen der Plasmakonzentrationen mit den FMD-Werten. Eine weitere wichtige Limitation dieser Studie ist das Fehlen einer Baseline-FMD zu Beginn der Studie. Die gemessenen FMD-Werte wurden lediglich mit der FMD nach einer Woche Placebo (FMD 7,8 %) verglichen und können somit nicht unabhängig voneinander bewertet werden.

*In vitro* wurden eine Reihe von Wirkmechanismen beschrieben, über die Catechine zu einer Verbesserung der Endothelfunktion beitragen können. Beispielsweise verbesserte EGCG die Enzymaktivität der eNOS und damit die NO-Bioverfügbarkeit in Endothelzellen. Dies wurde am Modell mit vorkontrahierten Aortenringe bestätigt, die nach Inkubation mit EGCG NO-

vermittelt relaxierten.<sup>84</sup> Weitere Wirkungen der Catechine, wie eine Senkung der Serumlipide und des Blutdrucks sowie antioxidative Eigenschaften, können ebenfalls zu einer Verbesserung der FMD beitragen<sup>20,123,124</sup> und sprechen für die Polyphenole als endothelfunktions-verbessernde Inhaltsstoffe des Tees.

Bei *in-vitro*-Studien sollte jedoch beachtet werden, dass es sich um experimentelle Studien handelt, die Catechine als Reinstoffe testeten. In diesen Versuchen wurden in der Regel Flavonoide in unkonjugierter Form verwendet, wie sie *in vivo* oftmals nicht vorliegen. Nach der oralen Aufnahme und der anschließenden Darmpassage werden Polyphenole methyliert, sulfatiert und glucuronidiert<sup>125</sup>, sodass nur ein kleiner Teil ungebunden und in freier Form auf das Endothel einwirken kann.<sup>126</sup> Die einzelnen Catechine unterscheiden sich zudem in ihrer Pharmakokinetik und in ihrer Aufnahme ins Plasma.<sup>126</sup> So werden einige Effekte der Catechine *in vitro* gezeigt, die *in vivo* nach Konsum von Grünem Tee durch den Menschen nicht reproduzierbar sind. Einige Metabolite von EGCG<sup>127</sup> und EGC<sup>128</sup>, die nach dem Genuss von Grünem Tee im Plasma ansteigen, wurden in vorherigen Studien identifiziert und benannt. Allerdings bleibt unklar, ob und wie sie sich in ihrer Wirksamkeit auf die Endothelfunktion unterscheiden. Für EC und Catechin konnten Harada et al. beispielsweise zeigen, dass sich die antioxidative Wirksamkeit durch Methylierung verringerte und sich so die jeweiligen Abbauprodukte dieser Catechine in ihrer Wirkung unterschieden.<sup>129</sup> Am Tiermodell konnten darüber hinaus Unterschiede in der Resorption, Verteilung und Eliminierung von Catechinen nach Konsum von Tee, im Gegensatz zu isolierten Catechinen gezeigt werden.<sup>130</sup>

Möglicherweise sind die beobachtenden Effekte auf die Endothelfunktion nach der jeweiligen Intervention (Tee oder Extrakt) durch Unterschiede in der Catechin-Metabolisierung zu erklären. Nach der Aufnahme von Tee und Extrakt entstehen vermutlich in unterschiedlicher Geschwindigkeit und Zusammensetzung Catechin-Metabolite, die nicht die gleiche Wirkung auf das Endothel besitzen. Hierin könnte eventuell der Unterschied der gemessenen FMD-Werte zwischen den Interventionen Tee und Extrakt begründet sein. Darüber hinaus könnte dies auch erklären, warum die Korrelationsanalysen der Catechin-Plasmaspiegel und der FMD so gegensätzliche Tendenzen zeigten. Nach Tee waren die berechneten Korrelationskoeffizienten durchweg negativ, nach Grüntee-Extrakt hingegen lagen alle im positiven Bereich.

In der hier durchgeführten Studie erfolgte die Messung der Catechin-Plasmakonzentrationen vor und nach Hydrolyse, ohne eine qualitative Bestimmung der jeweils entstandenen Metabolite. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit sich spezifische Metabolite von Grünem Tee und Grüntee-Extrakt unterscheiden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration potentiell wirksamer Abbauprodukte der Catechine und einem Anstieg der FMD kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.3 Korrelation von Theophyllin, Theobromin und Koffein mit dem Anstieg der FMD nach Grünem Tee

Neben den Catechinen enthielt der Grüne Tee eine Reihe weiterer Stoffe, die im Grüntee-Extrakt nicht oder nur in geringer Konzentration vorhanden waren. Um zu überprüfen, ob der FMD-Anstieg auf die Wirkung dieser Substanzen zurückzuführen sein könnte, wurden Theobromin, Theophyllin und Koffein im Plasma der Probanden bestimmt. Die Theobromin-Konzentration sank nach der Intervention leicht ab, sodass dessen Wirkung auf die FMD mit hoher Wahrscheinlichkeit als irrelevant einzuschätzen ist. Zudem existieren bislang keine Studien, die einen Einfluss von Theobromin auf die Endothelfunktion beschreiben.

Die Theophyllin-Konzentration im Plasma stieg nach Grünem Tee geringfügig, jedoch statistisch signifikant an. Theophyllin wirkt als unspezifischer Phosphodiesterase-Inhibitor und verhindert damit den Abbau von cAMP zu biologisch unwirksamen AMP. Eine der Wirkungsweisen des Theophyllins ist dadurch die Bronchodilatation beziehungsweise Bronchospasmyolyse.<sup>131</sup> Über die Hemmung von Phosphodiesterase III und V kann Theophyllin zudem eine Weitstellung von Gefäßen bewirken.<sup>108,132,133</sup> Es greift in den Abbau von cGMP ein und vermittelt über die Erhöhung dieses Second Messengers eine Vasodilatation.<sup>134</sup> *In vitro* bewirkte die Zugabe von Theophyllin an präkontrahierten Aortenringen mit intakter Endothelzellschicht eine Relaxation. Weitere Abbauprodukte des Theophyllins führten im Mausmodell über eine verstärkte Expression der NO-Synthase zu einem intrazellulären NO-Anstieg.<sup>134</sup> Diese Versuche lassen vermuten, dass Theophyllin über ähnliche Mechanismen wie Flavonoide (Steigerung der NO-Produktion in Endothelzellen) endothelvermittelt eine verbesserte Reagibilität des Gefäßes bewirkt. Hierbei wurden allerdings synthetisch hergestellte Derivate des Theophyllins getestet, die nach dem Verzehr von Grünem Tee im Plasma vermutlich nicht vorhanden sind.

Es wurden bislang keine *in vivo* Studien veröffentlicht, die die Kurzzeiteffekte von Theophyllin auf die FMD untersuchen. In der vorliegenden Studie wurde ein sehr geringfügiger Anstieg im Plasma gefunden (+0,84 µg/ml), der in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Anstieg der FMD nach Grünem Tee stand. Ein Effekt von Theophyllin auf die Endothelfunktion erscheint beim getesteten Probandenkollektiv daher nicht relevant.

Die Koffein-Konzentration im Blut der Probanden stieg nach Grünem Tee deutlich und signifikant an. Koffein wird bei oraler Aufnahme fast vollständig enteral resorbiert und erreicht damit eine hohe Bioverfügbarkeit. Die maximale Koffein-Plasmakonzentration wird nach 30 - 45 Minuten erreicht<sup>135-137</sup>, wobei starke interindividuelle Unterschiede beschrieben wurden (15 - 60 Minuten).<sup>138</sup> Die Halbwertszeit beträgt beim Menschen 2,5 - 4,5 Stunden<sup>139</sup> und die Metabolisierung findet fast vollständig hepatisch, über mehrere Methylierungs-Schritte statt. Bei der Abbaugeschwindigkeit wurde eine Dosisabhängigkeit beschrieben, was zur Akkumulation von Koffein in hohen Dosen führen kann.<sup>140</sup> Koffein ist eine Substanz mit einem sehr großen Wirkspektrum im menschlichen Körper. Es wirkt unter anderem auf das zentrale Nervensystem, den Gastrointestinal Trakt, den Respirationstrakt sowie das vaskuläre System. Koffein zeigt eine direkte Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur der Tunica media und ist damit in der Lage eine Vasodilatation hervorzurufen. Dies geschieht über eine Reihe komplexer Mechanismen und Enzym-Phosphorylierungen.<sup>141</sup> Einer davon läuft über das Absinken des Calcium-Spiegels in der Muskelzelle: Koffein hemmt den IP3-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum und einige spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Zellmembran.<sup>142,143</sup> Darüber hinaus verhindert Koffein, als Phosphodiesterase-Hemmer, den Abbau von cAMP, was eine Relaxation der Gefäßmuskelzellen begünstigt.<sup>144</sup> *In vitro* wurde eine Hemmung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLKK) und der Aktin-Myosin-Interaktion nachgewiesen, was ebenfalls eine Vasodilatation bewirkt.<sup>145</sup> *In vivo* konnte mit der hier durchgeführten Studie allerdings gezeigt werden, dass die GTN nach Grünem Tee von der Koffeinwirkung unbeeinflusst blieb. Es konnte keine signifikante Differenz zwischen den GTN-Werten vom Zeitpunkt t0 zu t2 gefunden werden, sodass eine direkte Koffein-Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen und damit eine Beeinflussung der endothelunabhängigen Vasodilatation unwahrscheinlich ist.

Am Endothel hemmt Koffein den cGMP-Abbau indem es über eine Aktivierung der eNOS zu einem verbesserten NO-Angebot kommt. Dies konnte ebenfalls in Experimenten mit vorkontrahierten Aortenringen beobachtet werden.<sup>146</sup> In einigen FMD-Studien konnte eine Verbesserung der Endothelfunktion durch Koffein gezeigt werden. Der arterielle Blutfluss in Widerstandsgefäßen (Forearm blood flow; FBF) wurde eine Stunde nach der Einnahme von 300 mg Koffein signifikant verbessert.<sup>147</sup> Dabei war die Reaktivität der Gefäße auf Acetylcholin nach Koffein höher als bei Placebo. Diese Koffein-vermittelte Flusszunahme innerhalb der Arterie konnte durch L-NMMA (NO-Synthase-Inhibitor) aufgehoben werden, was die NO-Abhängigkeit dieses Effekts unterstreicht.<sup>147</sup> Shechter et al. zeigten an 40 KHK-Patienten und 40 gesunden Probanden einen signifikanten FMD-Anstieg eine Stunde nach der Verabreichung von 200 mg reinen Koffeins.<sup>148</sup> In der FMD-Studie von Tinahones et al. wurde ein koffeinhaltiger Grüntee-Extrakt (150 mg Koffein) verabreicht, der nach einer einwöchigen Einnahme zu einem Anstieg der FMD-Werte führte.<sup>112</sup>

Andere Endothelfunktions-Studien, in denen Koffein-Dosierungen von 125-200 mg verwendet wurden, zeigten jedoch keine Effekte auf die FMD.<sup>72,109</sup> Es wurden auch negative Auswirkungen von Koffein beschrieben, wie zum Beispiel ein Anstieg des Blutdrucks<sup>149</sup>, der Homocysteinwerte<sup>150</sup> sowie eine Verringerung der Gefäßelastizität<sup>151</sup>. Koffeinhaltiger Espresso oder Kaffee (80-130 mg Koffein) verringerte die FMD signifikant, wohingegen das entkoffeinierte Kontrollgetränk mit steigender Menge eine positive Wirkung auf die Endothelfunktion aufwies.<sup>152-154</sup>

Beim Vergleich der verschiedenen Studien zur Koffein-Wirkung auf die Gefäße scheint der Zeitpunkt der FMD-Messung nach der Einnahme des Koffeins eine wichtige Rolle zu spielen. Wann die FMD nach dem Konsum gemessen werden sollte, ist aufgrund verschiedener Ergebnisse von Studien in denen entweder pures Koffein oder Kaffee untersucht wurden, nicht eindeutig. Alexopoulos et al. konnten in den Messungen 30 Minuten nach Einnahme von 125 mg Koffein keinen signifikanten Effekt auf die FMD feststellen.<sup>109</sup> Eine positive Korrelation zwischen FMD-Anstieg und der Einnahme von reinem Koffein konnte jedoch 60 Minuten nach dem Verzehr gezeigt werden.<sup>148</sup> Andere FMD-Studien, die keinen oder einen negativen Effekt von Kaffee auf die FMD zeigten, führten die Messungen im Zeitraum 30 - 60 Minuten nach der Einnahme durch.<sup>72,154</sup>

Obwohl in diesen Studien die FMD-Bestimmungen zum Zeitpunkt des zu erwartenden Koffein-Plasmapeaks stattfanden, konnte keine signifikante Korrelation von Kaffeegenuss und einer veränderten Endothelfunktion gefunden werden.

Weltweit wird Koffein vor allem durch den Genuss von Bohnenkaffee aufgenommen. Da dieser je nach Brühzeit und Art der Herstellung, unterschiedliche Anteile an Koffein, Chlorogensäure, Flavonoiden und vieler weiterer Stoffe enthält<sup>155</sup>, sind FMD-Studien zu Kaffee nur bedingt zur Beurteilung der isolierten Wirkung des Koffeins geeignet. Die unterschiedlichen Koffein-Dosierungen, die Verabreichung von reinem Koffein oder koffeinhaltigen Kaffegetränken sowie die uneinheitlichen Zeitpunkte der FMD-Bestimmung erklären möglicherweise die bislang heterogene Studienlage zur Koffein- oder Kaffee-Wirkung auf die Endothelfunktion, die auch in der vorliegenden Studie nicht abschließend und eindeutig geklärt werden kann.

In der vorliegenden Studie erfolgten die FMD-Messungen und Blutabnahmen zwei Stunden nach der Intervention. Die maximale Plasmakonzentration des Koffeins wurde demnach nicht erfasst. Dennoch konnte zum Messzeitpunkt ein deutlicher Koffein-Anstieg im Plasma der Probanden nachgewiesen werden (+ 9,47 µg/ml) und nach koffeinhaltigem Grünen Tee stieg die FMD signifikant an. Die Einnahme von Grüntee-Extrakt, mit einem kleinen Restanteil an Koffein (0,7 % Koffein, ca. 3 mg), zeigte keinen Effekt auf die FMD. Es scheint daher naheliegend, dass der beobachtete FMD-Anstieg mit der Erhöhung der Koffein-Plasmaspiegel in Verbindung gebracht werden kann. So konnte für die absolute Koffein-Plasmakonzentration und der FMD-Veränderung zwei Stunden nach Grünem Tee eine signifikante Korrelation gezeigt werden. Eine zumindest partielle Beteiligung des Koffeins am FMD-Anstieg kann daher nicht ausgeschlossen werden. Der Konzentrationsanstieg des Koffeins im Blut und der FMD-Anstieg korrelierten dagegen nicht signifikant. Anhand der hier erhobenen Daten lässt sich demnach nicht eindeutig und abschließend klären, welchen Beitrag Koffein zum FMD-Anstieg durch Grünen Tee leistet.

Bei der Interpretation der gezeigten Ergebnisse zur Koffein-Wirkung auf Gefäße sollte auch der Gewöhnungseffekt durch den regelmäßigen Verzehr koffeinhaltiger Lebensmittel einbezogen werden. Eine Studie an einem Probandenkollektiv mit überdurchschnittlich hoher Lebenserwartung zeigte, dass Probanden mit starkem Kaffeekonsum (>450 ml/d) höhere FMD-Werte aufwiesen als eine Vergleichsgruppe mit geringem Verzehr (<200 ml/d).

Die Autoren beobachteten eine lineare Beziehung zwischen Kaffeekonsum und Höhe der FMD.<sup>156</sup> Weitere Studien zeigten, dass bei regelmäßigem Kaffee-Konsum negative hämodynamische Auswirkungen des Koffeins (Anstieg von Blutdruck und Puls sowie der Katecholamin-Ausschüttung) ausblieben und es zu einer Toleranzentwicklung gegenüber der Substanz kam.<sup>157,158</sup> In der vorliegenden Studie wurde der „Koffein-Status“ der Probanden nicht detailliert erfasst. Das Erstgespräch dokumentierte zwar allgemein den Kaffee-Konsum der Probanden, um Personen mit einem sehr hohem Verzehr auszuschließen. Dennoch wurde der tägliche Koffein-Konsum damit nicht numerisch quantifiziert. Es kann somit keine Aussage über die Koffein-Gewöhnung der einzelnen Studienteilnehmer getroffen werden. Die Probanden waren angehalten am Tag vor der FMD-Messung auf Koffein zu verzichten. Allerdings konnte es in allen Blutproben vor den Interventionen nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass Koffein bei hohem Konsum akkumuliert, beziehungsweise noch nicht vollständig aus dem Körper eliminiert war. Daher fällt es im Rahmen dieser Studie schwer, eine allgemeingültige Aussage zur Koffeinwirkung auf die Endothelfunktion beim Menschen zu treffen.



## 4.4 Ausblick

Um die Wirkung des im Grünen Tee enthaltenen Koffeins auf die Endothelfunktion zweifelsfrei beurteilen zu können, sollte eine Interventionsstudie mit koffeinfreiem Grünen Tee durchgeführt werden. Dabei erscheint es sinnvoll, die Endothelfunktion auch 30 - 45 Minuten nach der Einnahme zu messen, um zeitlich den Peak der Koffein-Plasmakonzentration zu erfassen. Der Koffein-Status der Teilnehmer sollte vor und während der Messungen exakt bestimmt werden. Außerdem sollte eine gezielte Anamnese zu Dauer, Häufigkeit und Zubereitungsart des Koffeins erfolgen, um den Gewöhnungseffekt abschätzen zu können. Dies würde es möglich machen, eine Aussage darüber zu treffen, ob der habituelle Koffein-Konsum einen Einfluss auf den FMD-Anstieg nach Grünem Tee besitzt.

Ein potentieller Einfluss der Catechine auf die Endothelfunktion sollte durch weitere Studien unter Einbeziehung der Catechin-Kinetik und Metabolisierung besser untersucht werden. *In-vitro*-Studien mit reinen Catechinen sind schwierig zu bewerten, da die meisten Catechine (ausgenommen EGCG) *in vivo* kaum in freier Form im Plasma vorliegen. Die Fokussierung auf die Wirkung der entstehenden Catechin-Metabolite im Plasma erscheint daher vielversprechender. Darüber hinaus könnte man bei Endothelfunktionsmessungen sowohl die Wirkung einzelner Catechine als auch Kombinationen aus zwei und mehr Catechinen testen. Dieser Versuchsansatz könnte so erweitert werden, dass zusammen mit den Catechinen auch Koffein verabreicht wird, um eine mögliche Interaktion oder synergistische Wirkung auf die FMD zu untersuchen.

Grüner Tee enthält eine Vielzahl sekundärer Pflanzenstoffe. Diese werden vom menschlichen Körper in eine unbekannte Zahl anderer, chemisch verwandter Stoffe umgesetzt. Zur Klärung der Wirkung des Grünen Tees auf die FMD wäre daher die Untersuchung aller pflanzlicher Sekundärstoffe und ihrer Metabolite wünschenswert. Jedoch ist dies in der Praxis nicht zu realisieren. Zur Einordnung der Kinetik und Wirksamkeit dieser Substanzen ist das Verständnis der Metabolisierung im Körper unerlässlich. Daher sollten umfangreiche Untersuchungen zur Catechin-Metabolisierung im Menschen erfolgen, wofür eine Verfeinerung und Weiterentwicklung der Messmethoden für die Catechin-Bestimmungen im Blut notwendig ist.

## Literaturverzeichnis

1. Ghesquiere S. Overview of an human artery. University of Maastricht 2006:Figure obtained from PhD on "The role of phospholipases in atherosclerosis".
2. Greif DM, Kumar M, Lighthouse JK, et al. Radial construction of an arterial wall. *Developmental Cell* 2012;23:482-93.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
4. Klinker R, Pape H-C, Silbernagel S. *Physiologie*. Stuttgart: Elsevier; 2005.
5. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Molecular Nutrition & Food Research* 2006;50:218-28.
6. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
7. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1988;12 Suppl 5:S115-8.
8. Naruse K, Sokabe M. Involvement of stretch-activated ion channels in Ca<sup>2+</sup> mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *The American Journal of Physiology* 1993;264:C1037-44.
9. 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. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2011;300:H2-12.
10. Olesen SP, Clapham DE, Davies PF. Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988;331:168-70.
11. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:682-5.
12. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2005;26:33-65.
13. Cao Y, Wang D, Wang X, Zhang J, Shan Z, Teng W. (-)-Epigallocatechingallate inhibits TNF-alpha-induced PAI-1 production in vascular endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2013.
14. Minatti J, Wazlawik E, Hort MA, Zaleski FL, Ribeiro-do-Valle RM, Maraschin M, da Silva EL. Green tea extract reverses endothelial dysfunction and reduces atherosclerosis progression in homozygous knockout low-density lipoprotein receptor mice. *Nutrition Research* 2012;32:684-93.

15. Yamakuchi M, Bao C, Ferlito M, Lowenstein CJ. Epigallocatechin gallate inhibits endothelial exocytosis. *Biological Chemistry* 2008;389:935-41.
16. Koga T, Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001;73:941-8.
17. Dong J, Xu X, Liang Y, Head R, Bennett L. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by polyphenols from tea (*Camellia sinensis*) and links to processing method. *Food & Function* 2011;2:310-9.
18. Kurita I, Maeda-Yamamoto M, Tachibana H, Kamei M. Antihypertensive effect of Benifuuki tea containing O-methylated EGCG. *J Agric Food Chem* 2010;58:1903-8.
19. Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 2006;54:229-34.
20. Persson IA, Josefsson M, Persson K, Andersson RG. Tea flavanols inhibit angiotensin-converting enzyme activity and increase nitric oxide production in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006;58:1139-44.
21. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:13176-81.
22. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:26066-75.
23. Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC. Inhibition of proliferation, but not of Ca<sup>2+</sup> mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *The Biochemical Journal* 1992;288 ( Pt 2):527-32.
24. 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* 1992;340:1111-5.
25. 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* 2009;120:502-9.
26. GBD Profile: Germany. 2010. (Accessed 25.09.2013, 2013, at [http://www.healthmetricsandevaluation.org/sites/default/files/country-profiles/GBD Country Report - Germany.pdf](http://www.healthmetricsandevaluation.org/sites/default/files/country-profiles/GBD%20Country%20Report%20-%20Germany.pdf).)
27. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and Cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? *Hypertension* 2011;57:363-9.

28. Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension* 2014;63:376-82.
29. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, Matsumoto T, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Goto C, Tomiyama H, Takase B, Yamashina A, Higashi Y. Relationship between flow-mediated vasodilation and cardiovascular risk factors in a large community-based study. *Heart* 2013;99:1837-42.
30. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology* 1995;26:1235-41.
31. Karatzis EN, Ikonomidis I, Vamvakou GD, Papaioannou TG, Protogerou AD, Andreadou I, Voidonikola PT, Karatzi KN, Papamichael CM, Lekakis JP. Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation. *The American Journal of Cardiology* 2006;98:1424-8.
32. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *International Journal of Cardiology* 2013;168:344-51.
33. Zizek B, Poredos P, Videcnik V. Endothelial dysfunction in hypertensive patients and in normotensive offspring of subjects with essential hypertension. *Heart* 2001;85:215-7.
34. Markos F, Ruane O'Hora T, Noble MI. What is the mechanism of flow-mediated arterial dilatation. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 2013;40:489-94.
35. Cooke JP, Stamler J, Andon N, Davies PF, McKinley G, Loscalzo J. Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *The American Journal of Physiology* 1990;259:H804-12.
36. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 1986;8:37-44.
37. Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, Burke V, Taylor RR, O'Driscoll JG. Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training. *Journal of Applied Physiology* 2004;97:749-55; discussion 8.
38. Stoner L, Erickson ML, Young JM, Fryer S, Sabatier MJ, Faulkner J, Lambrick DM, McCully KK. There's more to flow-mediated dilation than nitric oxide. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2012;19:589-600.
39. Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circulation Research* 1999;85:288-93.
40. 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. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;39:257-65.

41. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997;78:22-7.
42. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary Heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
43. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996;312:478-81.
44. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary Heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* 1995;155:381-6.
45. Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *The New England Journal of Medicine* 2013;369:448-57.
46. Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K, Liu Y, Washio M, Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Arai H, Doi Y, Kawano T, Nakagaki O, Takada K, Koyanagi S, Hiyamuta K, Nii T, Shirai K, Ideishi M, Arakawa K, Mohri M, Takeshita A. Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Annals of Epidemiology* 2000;10:401-8.
47. Sano J, Inami S, Seimiya K, Ohba T, Sakai S, Takano T, Mizuno K. Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circulation Journal : official Journal of the Japanese Circulation Society* 2004;68:665-70.
48. Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;105:2476-81.
49. Imai KNK. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver disease. *BMJ* 1995;310:636-6.
50. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Preventive Medicine* 1992;21:546-53.
51. Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and Cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* 2000;13:49-54.
52. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:1024-9.
53. 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. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme* 2014;39:145-51.

54. Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kremastinos DT. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary Heart disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation : official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2005;12:596-600.
55. Zhu Y, Xia M, Yang Y, Liu F, Li Z, Hao Y, Mi M, Jin T, Ling W. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. *Clinical Chemistry* 2011;57:1524-33.
56. Watzl B. RG. Basiswissen aktualisiert-Flavonoide. *Ernährungsumschau* 2001;48:498-502.
57. Karatzi K, Karatzis E, Papamichael C, Lekakis J, Zampelas A. Effects of red wine on endothelial function: postprandial studies vs clinical trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases : NMCD* 2009;19:744-50.
58. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009;119:1433-41.
59. Landberg R, Naidoo N, van Dam RM. Diet and endothelial function: from individual components to dietary patterns. *Current Opinion in Lipidology* 2012;23:147-55.
60. Jurikova T, Balla S, Sochor J, Pohanka M, Mlcek J, Baron M. Flavonoid profile of Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and their health promoting effects. *Molecules* 2013;18:12571-86.
61. Pechanova O, Rezzani R, Babal P, Bernatova I, Andriantsitohaina R. Beneficial effects of provinols: cardiovascular system and kidney. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2006;55 Suppl 1:S17-30.
62. Karatzi K, Papamichael C, Aznaouridis K, Karatzis E, Lekakis J, Matsouka C, Boskou G, Chiou A, Sitara M, Feliou G, Kontoyiannis D, Zampelas A, Mavrikakis M. Constituents of red wine other than alcohol improve endothelial function in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* 2004;15:485-90.
63. Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N. Does a glass of red wine improve endothelial function? *European Heart Journal* 2000;21:74-8.
64. Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Itakura H, Hosoda K, Toba K, Ouchi Y. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *The American Journal of Cardiology* 2001;88:1457-60, A9.
65. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002;106:1614-7.
66. Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007;49:74-80.

67. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2003;290:1030-1.
68. Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 2010;55:1398-405.
69. Monahan KD. Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012;527:90-4.
70. Grassi D, Mulder TP, Draijer R, Desideri G, Molhuizen HO, Ferri C. Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males. *Journal of Hypertension* 2009;27:774-81.
71. Park CS, Kim W, Woo JS, Ha SJ, Kang WY, Hwang SH, Park YW, Kim YS, Ahn YK, Jeong MH, Kim W. Green tea consumption improves endothelial function but not circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *International Journal of Cardiology* 2010;145:261-2.
72. Duffy SJ, Keaney JF, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:151-6.
73. 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. *The British Journal of Nutrition* 2008;99:863-8.
74. 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. *Circulation Journal : official Journal of the Japanese Circulation Society* 2006;70:1052-7.
75. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The Chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1997;37:693-704.
76. Weisburger JH. Tea and health: a historical perspective. *Cancer Lett* 1997;114:315-7.
77. Basu A, Lucas EA. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutrition Reviews* 2007;65:361-75.
78. Top-Production Tea 2012. FAO- Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2012. (Accessed 20.11.2014, 2014, at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.)
79. Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Die Nahrung* 2000;44:158-63.
80. Shitandi AA, Ngure FM, Mahangut SM. Tea processing and its impact on catechins, theaflavins and thearubigin formation. In: Victor Preedy KsCLSoB, Health Sciences LUK, eds. *Tea in Health and Disease Prevention*: Elsevier; 2012:193-205.

81. Erdman JW, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. Flavonoids and Heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition* 2007;137:718S-37S.
82. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol Chemistry. *Preventive Medicine* 1992;21:334-50.
83. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology & Medicine* 1996;20:933-56.
84. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:6190-5.
85. Ou HC, Song TY, Yeh YC, Huang CY, Yang SF, Chiu TH, Tsai KL, Chen KL, Wu YJ, Tsai CS, Chang LY, Kuo WW, Lee SD. EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signaling. *Journal of Applied Physiology* 2010;108:1745-56.
86. Roginsky V, Alegria AE. Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *J Agric Food Chem* 2005;53:4529-35.
87. Mukhtar H, Wang ZY, Katiyar SK, Agarwal R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive Medicine* 1992;21:351-60.
88. Chiu FL, Lin JK. HPLC analysis of naturally occurring methylated catechins, 3'- and 4'-methyl-epigallocatechin gallate, in various fresh tea leaves and commercial teas and their potent inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Agric Food Chem* 2005;53:7035-42.
89. Moore RJ, Jackson KG, Minihane AM. Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *The British Journal of Nutrition* 2009;102:1790-802.
90. Miyazawa T. Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *BioFactors* 2000;13:55-9.
91. Belitz H.-D. GW, Schieberle P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2008.
92. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994;308:278-84.
93. Bordoni A, Hrelia S, Angeloni C, Giordano E, Guarnieri C, Calderera CM, Biagi PL. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:103-11.



94. Erba D, Riso P, Colombo A, Testolin G. Supplementation of Jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. *The Journal of Nutrition* 1999;129:2130-4.
95. Tousoulis D, Briasoulis A, Papageorgiou N, Tsioufis C, Tsiamis E, Toutouzas K, Stefanadis C. Oxidative stress and endothelial function: therapeutic interventions. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 2011;6:103-14.
96. Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H. Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;469:209-19.
97. Schewe T, Steffen Y, Sies H. How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008;476:102-6.
98. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sciences* 1998;63:275-83.
99. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995;92:3431-5.
100. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *Journal of the American College of Cardiology* 1994;24:1468-74.
101. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Conduit artery constriction mediated by low flow a novel noninvasive method for the assessment of vascular function. *Journal of the American College of Cardiology* 2008;51:1953-8.
102. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clinical Science* 2000;99:261-7.
103. Ducharme A, Dupuis J, McNicoll S, Harel F, Tardif JC. Comparison of nitroglycerin lingual spray and sublingual tablet on time of onset and duration of brachial artery vasodilation in normal subjects. *The American Journal of Cardiology* 1999;84:952-4, A8.
104. Frick M. NT, Schwarzacher S.P., Wascher th.C., Weidinger F. Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert. *Journal für Kardiologen* 2002;9:439-44.
105. Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Brachmann S, Lorenz M, Stangl V, Galensa R. A shortcut from plasma to chromatographic analysis: straightforward and fast sample preparation for analysis of green tea catechins in human plasma. *Journal of chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009;877:823-6.
106. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs RH, Kjekshus J K, Perrone Filardi P, Riccardi G, Storey RF, David W. [ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias]. *Revista Espanola de Cardiologia* 2011;64:1168 e1- e60.

107. Thomas L. Labor und Diagnose Indikation und Bewertung von Laborbefunden für medizinische Diagnostik. D-60489 Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2012; 2012.
108. Rabe KF, Magnussen H, Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. *The European Respiratory Journal* 1995;8:637-42.
109. 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. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2008;15:300-5.
110. 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* 2004;90:1485-6.
111. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Cable NT. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-55.
112. Tinahones FJ, Rubio MA, Garrido-Sanchez L, Ruiz C, Gordillo E, Cabrerizo L, Cardona F. Green tea reduces LDL oxidability and improves vascular function. *Journal of the American College of Nutrition* 2008;27:209-13.
113. Herrington DM, Espeland MA, Crouse JR, Robertson J, Riley WA, McBurnie MA, Burke GL. Estrogen replacement and brachial artery flow-mediated vasodilation in older women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001;21:1955-61.
114. Dower JI, Geleijnse JM, Gijssbers L, Zock PL, Kromhout D, Hollman PC. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015;101:914-21.
115. Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, Keaney JF, Vita JA. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26:95-102.
116. Yazici D, Yavuz DG, Unsalan S, Toprak A, Yuksel M, Deyneli O, Aydin H, Tezcan H, Rollas S, Akalin S. Temporal effects of low-dose ACE inhibition on endothelial function in Type 1 diabetic patients. *Journal of Endocrinological Investigation* 2007;30:726-33.
117. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Changes in flow-mediated brachial artery vasoactivity with lowering of desirable cholesterol levels in healthy middle-aged men. *The American journal of cardiology* 1996;77:37-40.
118. Klinkner LC. Wirkungen von Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) auf die Endothelfunktion von Patienten mit Multipler Sklerose und in-vitro Untersuchungen der EGCG-vermittelten Vasodilatation. Berlin: Charité-Universitätsmedizin Berlin; 2014 URL: [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS\\_derivate\\_000000015698/diss\\_l.klinkner.pdf](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000015698/diss_l.klinkner.pdf).

119. Raitakari OT, Lai N, Griffiths K, McCredie R, Sullivan D, Celermajer DS. Enhanced peripheral vasodilation in humans after a fatty meal. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;36:417-22.
120. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *The American Journal of Cardiology* 1997;79:350-4.
121. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;34:146-54.
122. Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA, Wiseman S, Keaney JF, 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 Radical Biology & Medicine* 2005;38:499-506.
123. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutrition* 2004;134:38-42.
124. Inami S, Takano M, Yamamoto M, Murakami D, Tajika K, Yodogawa K, Yokoyama S, Ohno N, Ohba T, Sano J, Ibuki C, Seino Y, Mizuno K. Tea catechin consumption reduces circulating oxidized low-density lipoprotein. *International Heart Journal* 2007;48:725-32.
125. Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Remesy C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *The Journal of Nutrition* 2001;131:1753-7.
126. Van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A, Tijburg LB. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica; the Fate of foreign compounds in Biological Systems* 2001;31:891-901.
127. Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ, Ho CT, Yang CS. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chemical Research in Toxicology* 2002;15:1042-50.
128. Meng X, Lee MJ, Li C, Sheng S, Zhu N, Sang S, Ho CT, Yang CS. Formation and identification of 4'-O-methyl(-)-epigallocatechin in humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 2001;29:789-93.
129. Harada M, Kan Y, Naoki H, Fukui Y, Kageyama N, Nakai M, Miki W, Kiso Y. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1999;63:973-7.
130. Chen L, Lee MJ, Li H, Yang CS. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 1997;25:1045-50.
131. Fischer TA, Erbel R, Treese N. Current status of phosphodiesterase inhibitors in the treatment of congestive Heart failure. *Drugs* 1992;44:928-45.
132. Werko L, Lagerlof H. Studies on the circulation of blood in man. VII. The effect of a single intravenous dose of theophylline diethanolamine on cardiac output, pulmonary blood

volume and systemic and pulmonary blood pressures in hypertensive cardiovascular disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1950;2:181-97.

133. Karsten AJ, Derouet H, Ziegler M, Eckert RE. Involvement of cyclic nucleotides in renal artery smooth muscle relaxation. *Urological Research* 2003;30:367-73.

134. Lo YC, Tsou HH, Lin RJ, Wu DC, Wu BN, Lin YT, Chen IJ. Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. *Life Sciences* 2005;76:931-44.

135. Axelrod J, Reichenenthal J. The fate of caffeine in man and a method for its estimation in biological material. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1953;107:519-23.

136. Blanchard J, Sawers SJ. Comparative pharmacokinetics of caffeine in young and elderly men. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1983;11:109-26.

137. Blanchard J, Sawers SJ. The absolute bioavailability of caffeine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1983;24:93-8.

138. Robertson D, Wade D, Workman R, Woosley RL, Oates JA. Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. *The Journal of Clinical Investigation* 1981;67:1111-7.

139. Arnaud MJ. The Pharmacology of caffeine. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 1987;31:273-313.

140. Denaro CP, Brown CR, Wilson M, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1990;48:277-85.

141. Echeverri D, Montes FR, Cabrera M, Galan A, Prieto A. Caffeine's vascular mechanisms of action. *International Journal of Vascular Medicine* 2010;2010:834060.

142. Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Himpens B, Casteels R. Inhibition of inositol trisphosphate-induced calcium release by caffeine is prevented by ATP. *The Biochemical Journal* 1994;300 ( Pt 1):81-4.

143. Martin C, Dacquet C, Mironneau C, Mironneau J. Caffeine-induced inhibition of calcium channel current in cultured smooth cells from pregnant rat myometrium. *British Journal of Pharmacology* 1989;98:493-8.

144. Ahn HY, Karaki H, Urakawa N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 1988;93:267-74.

145. Ozaki H, Kasai H, Hori M, Sato K, Ishihara H, Karaki H. Direct inhibition of chicken gizzard smooth muscle contractile apparatus by caffeine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of Pharmacology* 1990;341:262-7.

146. Hatano Y, Mizumoto K, Yoshiyama T, Yamamoto M, Iranami H. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of isolated rat aorta induced by caffeine. *The American Journal of Physiology* 1995;269:H1679-84.
147. Umemura T, Ueda K, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Soga J, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *The American Journal of Cardiology* 2006;98:1538-41.
148. Shechter M, Shalmon G, Scheinowitz M, Koren-Morag N, Feinberg MS, Harats D, Sela BA, Sharabi Y, Chouraqui P. Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 2011;107:1255-61.
149. Hartley TR, Lovallo WR, Whitsett TL. Cardiovascular effects of caffeine in men and women. *The American Journal of Cardiology* 2004;93:1022-6.
150. Verhoef P, Pasma WJ, Van Vliet T, Urgert R, Katan MB. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:1244-8.
151. Vlachopoulos C, Panagiotakos D, Ioakeimidis N, Dima I, Stefanadis C. Chronic coffee consumption has a detrimental effect on aortic stiffness and wave reflections. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:1307-12.
152. Buscemi S, Batsis JA, Arcoletto G, Verga S. Coffee and endothelial function: a battle between caffeine and antioxidants? *European Journal of Clinical Nutrition* 2010;64:1242-3.
153. Buscemi S, Verga S, Batsis JA, Arcoletto G, Verga S. Acute effects of coffee on endothelial function in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 2010;64:483-9.
154. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, Karatzi KN, Stamatielopoulou KS, Vamvakou G, Lekakis JP, Mavrikakis ME. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clinical Science* 2005;109:55-60.
155. Cornelis MC, El-Sohemy A. Coffee, caffeine, and coronary Heart disease. *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2007;10:745-51.
156. Siasos G, Oikonomou E, Chrysohoou C, Tousoulis D, Panagiotakos D, Zaromitidou M, Zisimos K, Kokkou E, Marinos G, Papavassiliou AG, Pitsavos C, Stefanadis C. Consumption of a boiled Greek type of coffee is associated with improved endothelial function: the Ikaria study. *Vascular Medicine* 2013;18:55-62.
157. Denaro CP, Brown CR, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Effects of caffeine with repeated dosing. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1991;40:273-8.
158. Ammon HP, Bieck PR, Mandalaz D, Verspohl EJ. Adaptation of blood pressure to continuous heavy coffee drinking in young volunteers. A double-blind crossover study. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1983;15:701-6.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Christine Hofer versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Tee-Polyphenolen auf die Endothelfunktion beim Menschen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christine Hofer hatte Anteil an der folgenden Publikation:

Mario Lorenz, Franziska Rauhut, Christine Hofer, Stefanie Gwosc, Eda Müller, Damaris Praeger, Benno F. Zimmermann, Klaus-Dieter Wernecke, Gert Baumann, Karl Stangl, Verena Stangl: „Tea-induced improvement of endothelial function in humans: No role for epigallocatechin gallate (EGCG)“

Angenommen bei Scientific Reports am 11.04.2017

Beitrag im Einzelnen:

- Probandenrekrutierung
- eigenständige Durchführung der Endothelfunktionsmessungen
- Datenerfassung und statistische Auswertung der Primärdaten

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## Lebenslauf

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





## Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Stangl für die ausgezeichnete und unkomplizierte Betreuung bedanken.

Größten Dank schulde ich außerdem:

Meinem Betreuer Herrn Dr. Mario Lorenz für die intensive Zusammenarbeit, die fachliche Beratung und die konstruktiven Anregungen. Die Umsetzung der Studie und die Fertigstellung dieser Dissertation wären ohne seine guten Ratschläge, die ständige Erreichbarkeit und sein Engagement nicht möglich gewesen.

Meiner Kollegin Franziska Rauhut für die kollegiale Zusammenarbeit, die ein Großteil zum Gelingen der Studie beigetragen hat.

Den Pflegekräften der kardiologischen Funktionsdiagnostik für die Mithilfe der Studiendurchführung und das gute Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt außerdem all meinen Freunden die mich auf diesem Weg tatkräftig unterstützt und begleitet haben.

Schlussendlich möchte ich mich ausdrücklich bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung bedanken, auf die ich mich immer hundertprozentig verlassen konnte.