

Aus der Klinik für Allgemein- Viszeral- Thorax- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf NO und
O₂- im Ischämie- und Reperfusionsschaden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Lohöfener

aus Bielefeld

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Büttemeyer
2. Prof. Dr. med. I. Schimke
3. Prof. Dr. med. B. D. Krapohl

Datum der Promotion: 18.09.2009

Diese Arbeit widme ich meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.6-15
1.1 Klinische Bedeutung des Ischämie und Reperfusionsschaden	S. 6-7
1.2 Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion	S. 8-13
1.3 Antioxidative Therapie	S.14
1.4 Epigallocatechin-3-gallat	S.15
2. Zielstellung	S.16
3. Material und Methoden	S. 17-29
3.1 O ₂ Sensor	S.17-18
3.2 Temperatursensor	S.19
3.3 NO Sensor	S.20-21
3.4 Messapparatur und Reagenzien	S.22-23
3.5 Tierversuchsmodell und Tierversuchsaufbau	S.24-29
4. Kalibrierung	S.30-37
4.1 O ₂ Sensor	S.30-31
4.2 NO Sensor	S.32-33
4.3 Temperatur und Temperaturkorrektur	S.34-37
5. Ergebnisse	S.38-45
5.1 O ₂	S.38-39
5.2 NO	S. 40-41
5.3 Temperatur	S. 42
5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	S.43-45
6. Diskussion	S.46-54

7. Zusammenfassung **S.55**

8. Literaturverzeichnis **S.56-64**

9. Abkürzungen **S.65-66**

10. Danksagung **S. 67**

11. Anhang **S.68**

Erklärung an Eides Statt **S.69**

1. EINLEITUNG

1.1 Klinische Bedeutung des Ischämie- und Reperfusionsschadens

Für über 100 Erkrankungen beim Menschen ist eine ursächliche Beteiligung freier Sauerstoffradikale beschrieben. (1)

Mögliche Erkrankungen sind die Verbrennungskrankheit, das Elektrotrauma, Strahlenschäden, Wundinfektionen, akute arterielle Embolie oder Thrombose, Transplantationen, akute Myokardischämie, Apoplex, Lungenarterienembolie, intraoperativer Tourniquetstress bei mikrovasculären Lappenplastiken, gefäßchirurgische Eingriffe, traumatologische Eingriffe oder Kardiochirurgie. (2), (3),(4).

Bei vielen dieser Erkrankungen kommt es vorübergehend zu einer Störung oder kompletten Unterbrechung der arteriellen Durchblutung mit anschließender Reperfusion.

Die dabei auftretenden Zellschäden verlaufen in zwei Phasen, der Ischämie und der Reperfusion.

Die Ischämie ist ein klassischer Auslöser des nekrotischen Zelltods aufgrund eines Mangels an Sauerstoff- und Energieträgern. Die Folge ist ein Gewebeuntergang, der zur Organinsuffizienz führen und in Abhängigkeit von der Größe den Tod des Organismus zur Folge haben kann.

Während der Reperfusion kommt es zu einer weiteren Schädigung der Zellen. Diese geschieht durch Anhäufung und Einschwemmung von toxischen Metaboliten, insbesondere von freien Radikalen. Dies führt zu einem zusätzlichen Gewebeuntergang.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass ein Großteil der während des Ischämie- und Reperfusionsschadens entstehenden Läsionen durch Sauerstoffradikale bedingt ist.

Freie Radikale fallen in einer gewissen Konzentration auch physiologisch an. Dies geschieht vor allem in der mitochondrialen Atmungskette und im Rahmen des *oxydative burst* der Makrophagen.

Dies erfolgt jedoch unter physiologischen Bedingungen in fein enzymatisch geregelten Systemen und in lokalisierten zellulären Räumen.

Dementsprechend besteht physiologischerweise eine Homöostase zwischen anfallenden Radikalen (O_2^- , NO, ONNO-) und einem Abwehrmechanismus aus enzymatischen Systemen (Superoxiddismutase, Catalase, Glutathion-Peroxidase), Antioxidantien (Vitamin A, E, C) und aus Reparatur-Systemen (CD95- Expression, Phagozytose), welche eine zytotoxische Akkumulation verhindern.

Freie Radikale und andere reaktive Spezies verursachen die Oxidation von Biomolekülen wie Proteinen, Aminosäuren, Lipiden und DNA, welche dann zu Zellschäden bis hin zum Zelltod führen. Sie tragen somit zum einem, in normaler Konzentration, zur physiologischen Signaltransduktion und Regulation von Stoffwechselprozessen bei. Zum anderen, in pathologischer Konzentration, zu Zellschäden und pathophysiologischen Stoffwechselprozessen. (5)

Der genaue Wirkmechanismus freier Radikale ist noch ungenügend bekannt, jedoch wurde schon oft der Erfolg einer antioxidativen Therapie beschrieben (6).

1.2 Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion

Während der ischämischen Phase kommt es zu einer akuten oder chronischen Gewebeanoxie. Die Gewebeschädigung fällt im Falle einer begrenzten Ischämie vor allem in die Phase der Reperfusion und ist abhängig von der Dauer der Ischämie.

Dies zeigten Parks und Granger bereits 1986 anhand einer Studie in einem Ischämie- und Reperusionsmodell an Darmschleimhäuten. Hier zeigte sich, dass nach einer dreistündigen Ischämie gefolgt von einer einstündigen Reperfusion der Zellschaden weitaus höher ist als nach einer alleinigen vierstündigen Ischämie. (7)

Während der Ischämie sinkt im minder perfundiertem oder nicht perfundiertem Gewebe die Temperatur, und die Sauerstoffkonzentration nimmt ab. Somit kommt es aufgrund des intrazellulären Sauerstoffmangels zu einer anaeroben Stoffwechsellage mit konsekutiver intrazellulärer Azidose durch den Anfall von sauren Metaboliten wie Laktat, bei Persistenz zu einer metabolischen Laktatazidose.

Zusätzlich wird die Energiezufuhr in das Gewebe gestoppt, es kommt zu einer Verminderung der Glykolyse zur Lieferung von ATP und zu einem vermehrten Abbau des Energieträgers ATP. Dieser wird in Hypoxanthin (HX) umgewandelt. Die NAD⁺ abhängige Xanthindehydrogenase (XD) wiederum konvertiert im hypoxämischen Milieu zur Xanthinoxidase (XOD), welche nun das anfallende Hypoxanthin zu Harnsäure abbaut (8). Xanthinoxidase benötigt jedoch Sauerstoff statt NAD⁺. Aus dieser Reaktion entstehen Superoxidanionen O₂⁻, welche die Zellmembran zerstören und die schädigende Freisetzung intrazellulärer Makromoleküle herbeiführen. (9)

Da das Immunsystem unter physiologischen Bedingungen intrazellulären Makromolekülen nicht ausgesetzt ist, kommt es zur Aktivierung des Immunsystems und zur klassischen Entzündungsreaktion mit weiterer Zellschädigung.

Superoxidanionen, in physiologischer Konzentration und physiologischer Stoffwechsellage, haben eine zytotoxische Wirkung und sind zudem Ausgangssubstanz aggressiver und zytotoxischer Folgeprodukte, wie Hydroxylradikal (OH) oder Peroxinitrit (ONOO-). (10).

Der in der Reaktion benötigte molekulare Sauerstoff wird erst in der Phase der Reperfusion in das hypoxämische Gebiet geliefert. (11)

Die Bildung von NO, einem weiteren relevanten Radikal, geschieht hauptsächlich in intaktem Endothel. Gebildet wird NO aus der Reaktion der Aminosäure L-Argin zu L-Citrulin und NO durch die NO-Synthase, die NADPH- und Sauerstoffabhängig ist.

NO wird von drei verschiedenen NO-Synthasen produziert. Hierzu gehören eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase), iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase) und nNOS (neuronaler Stickstoffmonoxidsynthase). Zum Beispiel kann ein Anstieg von intrazellulärem Calcium und obigen Cofaktoren zu einer Aktivierung von eNOS und nNOS führen.

nNOS und iNOS befinden sich hauptsächlich im Zytosol während eNOS an die Plasmamembran gebunden ist. eNos und nNOS sind im menschlichen Organismus ständig exprimiert, während es zu einer Aktivierung von iNOS durch Transkriptionsfaktoren, Zytokine sowie Endotoxine kommt. Damit werden im Falle einer pathophysiologischen Reaktion, z.B. einer Immunabwehr durch Freisetzung aus Makropagen, überschießend NO aus iNOS mit zytotoxischer Folgereaktion freigesetzt.

Die Aktivität von iNOS und die Menge an produziertem NO ist weitaus höher als von eNOS und nNOS.

iNOS kann im Gegensatz zu eNOS und nNos durch Bindung an Calmodulin bei sehr niedriger Calcium-Konzentration aktiviert werden, benötigt aber auch obige Reaktionsprodukte. NO führt zu einer lokalen endothelialen Relaxation der glatten Muskulatur, einer lokalen Hemmung der Thrombozytenaggregation, einer Regulation der Endothelproliferation, sowie einer Regulation des cerebralen Blutflusses und der intracerebralen Stoffwechsellage.

NO ist frei permeabel über die Plasmamembran. Der Wirkmechanismus von NO und seiner Metabolite erfolgt über cGMP als *second messenger*. Dieser cGMP-Anstieg führt wiederum zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und somit zu einer Vasodilatation.

Es ist weiterhin bekannt, dass NO einen Einfluss auf die Signaltransduktion, die Plättchenaggregation, die Immunantwort hat (Induktion von Endotoxinen und Cytotoxinen z.B. Interleukin 1 und 2, Interferon-gamma und TNF alpha) und in viele andere pathophysiologische Vorgänge involviert ist.

Diese Aktivierung kann z. B. durch antiinflammatorische Medikation (Dexamethason) oder inhibitorische Zytokine (Interleukin 4 und 10 oder Prostaglandine) supprimiert oder sogar geblockt werden.

Bei exzessiven und unkontrollierten Anfall wird NO als wichtiger Mediator von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Multiple Sklerose diskutiert. (12)

NO wurde in vaskulären Systemen als endogener Inhibitor gegen Leukozytenakkumulation und als Inaktivator von Superoxid beschrieben.

NO wird nur aus ungeschädigtem Endothel freigesetzt. (13; 14)

Somit wirkt NO nicht nur protektiv auf den Organismus, sondern kann auch durch obige Reaktion mit O₂⁻ in das zytotoxische Reaktionsprodukt ONOO⁻ übergehen. Es kann somit durch Bildung freier Radikale direkt Zellwand- oder DNA-Schäden verursachen. (15)

Diese Erkenntnisse zeigten sich an Ischämie- und Reperfusionmodellen am Skelettmuskel. (56)

Abbildung 1:

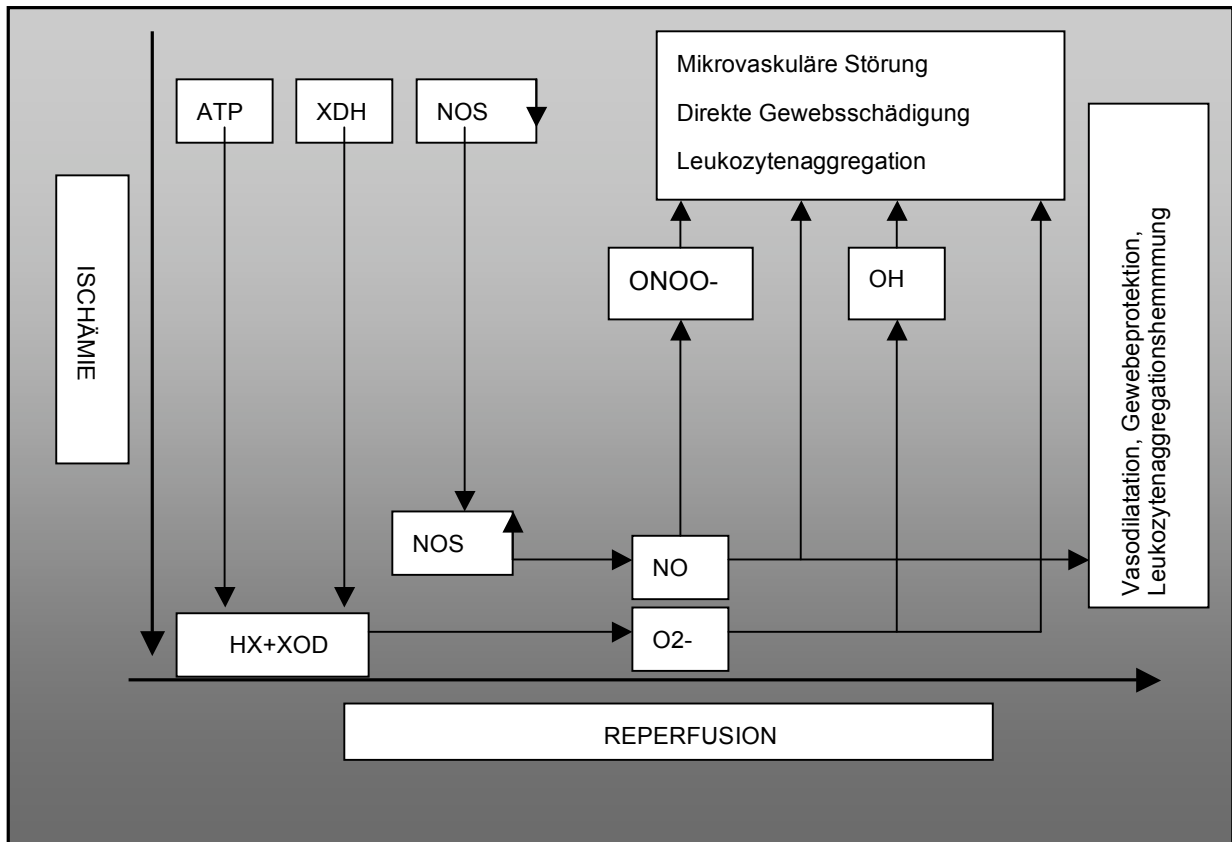


Abbildung 1:

Während der Ischämie kommt es zum Abbau von Adenosintriphosphat (ATP) zu Hypoxanthin (HX), zur Umwandlung von Xanthindehydrogenase (XDH) zu Xanthinoxidase (XOD) sowie zur Induktion von Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS). Dies führt zur Bildung von Superoxid (O₂⁻) und Stickstoffmonoxid (NO), die zu Peroxynitrit (ONOO⁻), bzw. Hydroxyradikal (OH) weiterreagieren.

Ein weiterer bedeutender Mechanismus der Sauerstoffradikale in Folge des Reperfusionsschadens liegt in der Akkumulation aktivierter Makrophagen.

Freie Radikale triggern die Entzündungsreaktion, die eine weitere Zellschädigung nach sich zieht (16). Folge dieser pathophysiologischen Zustände ist eine direkte Schädigung der Zelle mit konsekutivem Zellschaden bis hin zum apoptotischen oder nekrotischem Zelluntergang.

Das heißt, wenn eine Imbalance zwischen freien Radikalen und Antioxidantien besteht, kommt es zum oxidativen Stress mit Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden, die zum Schutz der Zellfunktion bestehen. (17)

Grundlegende Arbeiten im Bereich der mikrovaskulären Chirurgie lieferte Steinau. Er beschreibt eine Schädigung der Gewebe mit Ödembildung im Muskelgewebe bei der Replantation und der mikrovaskulären Transplantation, die ihre Ursache mit aller Wahrscheinlichkeit in der übermäßigen Bildung freier Radikale hat. (18)

Oxidativer Stress verursacht die Expression antioxidativer Enzyme (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Catalase) und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF κ B (nuclear factor-kappa B). Dieser wiederum ist ein Aktivator von Genen zur Protektion vor Inflammation, Krebs, Immunabwehr und einer Reaktion auf virale Infektionen.

Durch eine Imbalance von antioxidativen und oxidativen Stoffen kann es zu einer Gewebsschädigung kommen in Form von Lipidperoxidation, Proteindenaturierung bis hin zur Zerstörung von Nukleinsäuren und DNA-Schäden. (19) Freie Sauerstoffradikale sind aber auch bei der physiologischen Abwehrreaktion mit kontrollierter Produktion aus Leukozyten beteiligt. (20)

In vielen Bereichen der Chirurgie (Verbrennungschirurgie, Traumatologie, Gefäßchirurgie, Transplantationsschirurgie, Plastische Chirurgie, Herzchirurgie, Tumorprozesse, Ernährungsdefizite) und weiteren Fachbereichen wie der interventionellen Radiologie, der interventionellen Coronarangiographie und Lysetherapie, der Strahlentherapie und das SIRS sowie das ARDS wird weiterhin eine Schädigung der Gewebe durch den übermäßigen Anfall freier Radikale diskutiert (21-36).

Eine therapeutische Beeinflussung des Radikalstoffwechsels und der Rheologie der Mikrozirkulation durch verschiedene Pharmaka, aber auch Antioxidantien, wird seit Jahren diskutiert.

1.3 Antioxidative Therapie

Definition:

Jede Substanz, die in geringer Konzentration, verglichen mit dem oxidierbaren Substrat, vorliegt und die Oxidation des Substrats signifikant verringert oder verhindert. (37)

Antioxidantien lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

1. enzymatisch

- In dieser Gruppe finden sich jene Antioxidantien, die direkt freie Radikale angreifen oder die Bildung von freien Radikalen inhibieren oder gar supprimieren. Dazu gehören Superoxiddismutase, Catalase oder Allopurinol als Inhibitor der Xanthinoxidase.

2. nicht enzymatisch

- In dieser Gruppe finden sich Antioxidantien die auf direktem Weg mit freien Radikalen zu abgeschwächten Produkten reagieren. Dazu gehören Epigallocatechin-3-gallat, Vitamin E, C, A, N-Actylcystein und Albumin. (38, 39, 40, 41 ,42)

In vielen Veröffentlichungen wird der Einsatz von Antioxidantien kontrovers diskutiert. Ferner befindet sich der optimale Zeitpunkt zur Applikation des Antioxidants ebenfalls in kontroversen Diskussionen. (43, 44, 45)

1.4 Epigallocatechin-3-gallat

Abbildung 3:

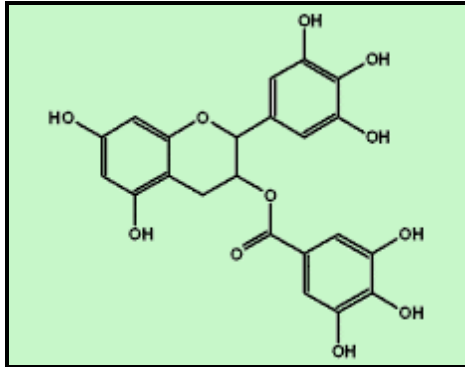


Abbildung 3 zeigt die chemische Struktur von Epigallocatechin-3-gallat.

Catechine gehören innerhalb der Phytamine zur Gruppe der Polyphenole und darunter zu den Flavonoiden. Sie werden manchmal auch als Tee-Polyphenole bezeichnet. Catechine kommen besonders reichlich im grünen Tee vor (*camilla sinensis*), der vier Arten von Catechinen enthält: Epicatechin, Epicatechin-gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat. Epigallocatechin-3-gallat wird als Hauptbestandteil gewonnen. Es hat eine niedrige orale Bioverfügbarkeit und wird nach Glucuronidierung in der Leber über die Niere ausgeschieden. (48)

Seine hohe antioxidative Potenz und seine Wirksamkeit als Radikalfänger wurden in in-vitro-Versuchen, in Zellkulturen und in klinischen Studien mehrfach nachgewiesen. (46, 47, 48, 52)

Zusätzlich wird eine protektive Wirkung gegenüber Tumorentstehung und Minderung von kardiovaskulärer Erkrankungen postuliert. (49, 50)

Negative Einflüsse auf den menschlichen Organismus wurden noch nicht beschrieben. (51)

2. Zielstellung

Zielstellung dieser Arbeit war, einen direkten Einfluss des Antioxidants Epigallocatechin-3-gallat auf die Produktion und somit Konzentration der freien Radikale O₂- und NO in einem etablierten Ischämie- und Reperfusionsmodell nachzuweisen.

Dazu wurden ein Cytochrom-c-Biosensor zur Messung der Konzentration an anfallenden O₂- und ein ISO- NOP-Sensor zur Messung der Konzentration an anfallenden NO temperaturabhängig in der Ischämie- und Reperfusionsphase im Skelettmuskel von Wistarratten implantiert.

Die Spezifität der Biosensoren wurde in vorherigen Versuchen untersucht. (53)
Die Wirkung des Antioxidants Epigallocatechin-3-gallat ist ebenfalls aus Versuchsreihen bekannt. (46,47,48,52,54)

Die Versuchshypothese war, den direkten Einfluss des Antioxidants Epigallocatechin-3-gallat auf die freien Radikale NO und O₂-, deren Interaktionsprodukte und die Verminderung des Ischämie- und Reperfusionsschadens durch direkte Messung der Radikale und anschließender histologischer Aufarbeitung der Präparate, sowie den Einfluss von Störgrößen nachzuweisen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 O₂-Sensor

Die O₂- Messung erfolgte über eine mit Cytochrom-c beschichtete Goldelektrode der Firma Elbau GmbH, D. Eine Ag/ AgCl-Elektrode bildete die Gegenelektrode (Firma WPI-Europe). Als Arbeitselektrode diente ein 0,5 mm im Querschnitt messender Golddraht, der in eine Stahlkanüle eingepasst ist und durch eine Kunststoffummantelung von dieser elektrisch isoliert ist. Die Daten wurden mittels eines Potentiostaten bei 150 mV erfasst, am PC mit einem entsprechenden Programm verarbeitet und jederzeit online aufgezeichnet.

Funktionsweise des O₂-Sensors:

An der Oberfläche des modifizierten Cytochrom-c Sensors wird Cytochrom-c III durch die Superoxidanionen in Cytochrom-c II reduziert. Der dabei auftretende anodische Stromfluss wurde dabei registriert.

Abbildung 4

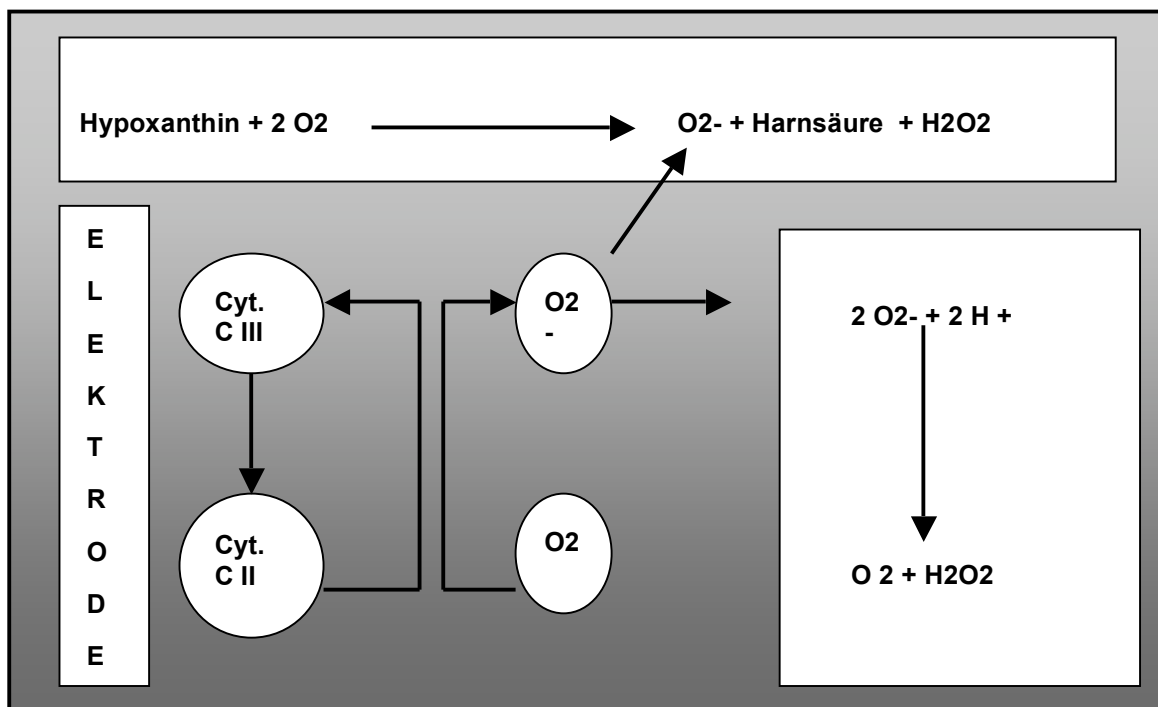


Abbildung 4 veranschaulicht die Grundlage für die Funktionsweise des O₂-Sensors zur in vivo und in vitro Messung von Superoxidanionen.

Präparation des O₂-Sensors:

Die Spitze des Golddrahtes wurde mit einem Al₂O₃- (Aluminiumoxid) Polierpulver zunächst mit 5 µm Putzkörpergröße absteigend auf 0,02 µm unter Wasserzusatz und intermittierender Reinigung in einem Ultraschallbad (5 Minuten, 1 Minute) poliert.

Anschließend erfolgte die Reinigung der Sensoren mit reinem Alkohol.

Dann eine Feinreinigung durch 50 Zyklen in einem Cyclovoltameter zwischen -0,35V und +1,7 V in H₂S₀₄.

Nach erneutem gründlichen Spülen mit Acqua destillat wurde die Elektrode für 2 Stunden in einer 5 millimolaren alkalischen Lösung aus Mercaptoundecanol und Mercaptoundecanolsäure für 48 Stunden inkubiert.

Nach erneuter gründlicher Spülung wurde die Elektrode für 2 Stunden in einer 30 µM Cytochrom-c Lösung belassen und anschließend mit 1-Ethyl-3 Carbodiimid fixiert. (53)

3.2 Thermosensor

Zur Temperaturmessung wurde ein Thermosensor aus drei in Reihe geschalteten Platinwiderständen (Pt 100 und Pt1000) der Firma Conrad, Deutschland benutzt.

Die Kalibration erfolgte mit einem Thermomixer der Firma Eppendorf, Deutschland.

Die Kalibration erfolgte in einem Temperaturbereich von 20 und 65 Grad Celsius. Die Daten wurden jederzeit online aufgezeichnet.

3.3 NO-Sensor

Es wurde der ISO-NOP NO-Sensor der Firma WPI-Europe verwendet.

Als Potentiostat diente der ISO-N0 Mk II derselben Firma.

Zur Aufzeichnung der Daten wurde das Programm Duo 18 der Firma WPI-Europe verwendet.

Funktionsweise des NO- Sensors:

Der ISO-NOP ist von einer 2 mm rostfreien Edelhülle umgebener Sensor.

Das Ende der Hülle ist von einer NO permeablen Membran bedeckt.

Er eignet sich zur signifikanten Messung von NO. (55, 56)

Abbildung 5:

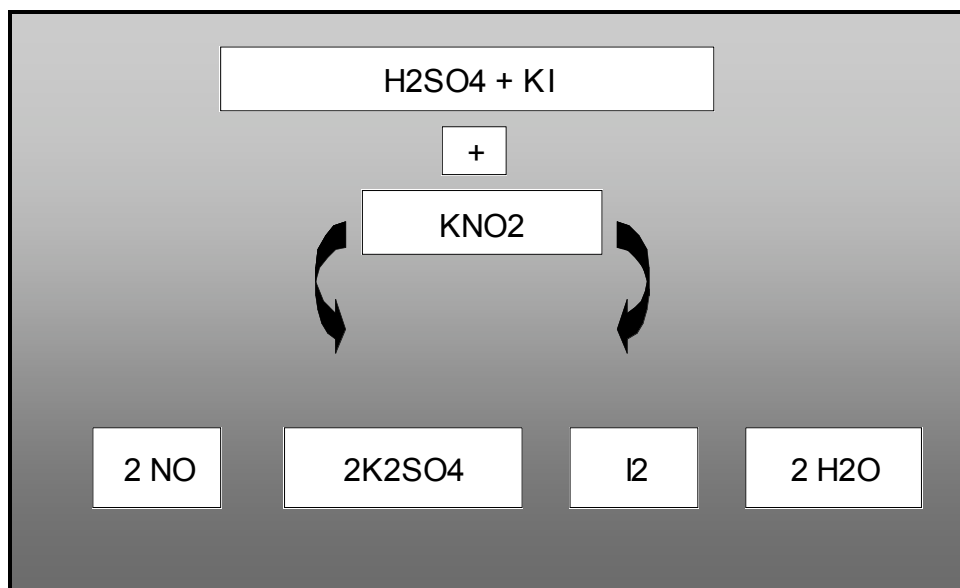


Abbildung 5 veranschaulicht die chemische Grundlage zur Funktionsweise des NO-Sensors zur in vivo und in vitro Messung von NO.

Basierend auf der Reaktionsgleichung aus Abbildung 5 wurde eine Kalibrationskurve erstellt, bei der eine bekannte Menge von KNO_2 hinzugegeben wurde, um eine entsprechende Menge an NO zu produzieren.

So kann man von der Quantität der NO -Produktion in Pikampere auf die Konzentration von NO bei bekannten Konzentrationen der Reagenzien schließen.

3.4 Messapparatur und Reagenzien

Die in- vitro- Versuche wurden in einer elektrochemischen Rührzelle mit dem Volumen von 1 ml durchgeführt.

Die Meßsignale des anodischen Stromflusses des O₂- Sensors wurden via Potentiostat bei 150 mV erfasst und über eine geeignete Software der Firma EKF Diagnostics, Deutschland verarbeitet und aufgezeichnet.

Der Stromfluss des ISO-NOP N0 Sensors wurde via Potentiostat ISO-Mk II erfasst und über eine geeignete Software DUO 18 der Firma WPI-Europe verarbeitet und aufgezeichnet.

Die Temperaturmessung erfolgte mit einem Thermomixer der Firma Eppendorf. Für die in- vivo- Versuche wurde prinzipiell dieselbe Datenerfassungsapparatur verwendet. Alle Aufzeichnungen erfolgten jederzeit online und waren so für den Versuchsdurchführenden jederzeit einsehbar.

Abbildung 6 :



Abbildung 6 zeigt den typischen Versuchsaufbau zur in- vitro- Messung. Hier dargestellt am Versuchsaufbau zur in- vitro- Messung von NO.

Reagenzien:

Mercaptoudecanolsäure	Fa. Sigma-Aldrich, USA
Mercaptoudecanol	Fa. Sigma-Aldrich, USA
1- ethyl-3-Carbodiimid	Fa. Sigma-Aldrich, D
Cytochrom-c	Fa. Sigma-Aldrich, D
Hypoxanthin	Fa. Sigma, D
Xanthinoxidase	Fa. Sigma, D
Superoxiddismutase	Fa. Sigma, D
Schwefelsäure	Fa. Sigma, D
KNO ₂	Fa. Sigma, D
Platinwiderstände	Fa. Conrad, D
Epigallocatechint-3-gallat	Fa. Sigma, D
Potentiostat	Fa. EKF-Diagnostics, D

3.5 Tierversuchsmodell und Tierversuchsaufbau

Die Registrierung der aufgezeichneten Daten erfolgte jederzeit online.

Im Tierversuch an der Wistarratte wurde nach temporärer zweistündiger Ischämie durch mikrochirurgische Unterbindung der Femoralgefäße und deren Kollateralen die Konzentrationsänderung in der Reperfusionphase an anfallendem NO, der Temperatur und O₂- in einer Versuchsreihe mit n=7 Versuchstieren gemessen.

Im Anschluss wurde eine Versuchsreihe mit n=7 Versuchstieren unter intravenöser Applikation von 1,5 µMol Epigallocatechin-3-gallat/ kg KG durchgeführt. Die intravenöse Applikation erfolgte über die zuvor präparierte Jugularvene fünf Minuten vor Reperfusionbeginn.

Die Muskelpräparate der Vergleichsgruppen gingen zur histologischen Aufarbeitung.

Die Anforderungen an das Versuchstier wurden hierbei am besten von männlichen Wistarratten erfüllt.

Anatomie und Physiologie dieses Versuchs- und Labortieres sind bekannt.

In den Versuchstierställen der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Charite Campus Mitte wurden die Versuchstiere bis zum Versuchsbeginn in Gemeinschaftskäfigen mit Futter und Wasser ad libidum gehalten.

Die Versuche fanden nach einer Eingewöhnungszeit der Tiere von 14 Tagen statt. Alle Versuche fanden in den Operationsräumlichkeiten dieser Einrichtung statt.

Eine Tierversuchsgenehmigung erfolgte durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit unter der Nummer G 0124/04.

Das Gewicht der Tiere lag zwischen 400 Gramm und 600 Gramm Lebendgewicht.

Alle Tiere wurden durch die intraperitoneale Applikation von Pentobarbitalnatrium in einer Dosierung von 35 mg/ kg KG narkotisiert. Die Lagerung zur Operation erfolgte in Rückenlage auf einer Wärmematte, um eine Auskühlung der Tiere während des Versuchs zu vermeiden.

Alle vier Extremitäten wurden in Gummischlaufen fixiert, um eine eventuelle Dislokation oder Manipulation an den Sensoren oder den eingebrachten Kathetern vorzubeugen.

Präparation:

Nach Desinfektion der Leistenregion bis zum Fuß der Versuchsextremität erfolgte ein längsverlaufender Hautschnitt von der Leiste bis zum Calcaneus. Es erfolgte nun die sorgfältige mikrochirurgische Darstellung der Arteria, Vena und des Nervus femoralis, sowie der Fascie des M. gastrocnemius.

Anschließend wurden die Seitenäste der Arteria und Vena femoralis zum Muskel gracilis und zum Fettpolster unter dem Mikroskop mit Fadenmaterial der Stärke 5,0 ligiert um Kollateralkreisläufe zu unterbinden und eine ausschließliche Blutversorgung via Arteria und Vena femoralis sicherzustellen. Dies erfolgte jederzeit unter Schonung und Separation von Arteria, Vena und Nervus femoralis.

Durch mikrochirurgisch gesonderte Inzision und Dissektion der Faszie des M. gastrocnemius an der Versuchsextremität wurden nun die Sensoren direkt in das Muskelgewebe der Versuchsextremität unter Sicht eingebracht und anschließend konnektiert.

Nach 60-minütiger Registrierung des Meßsignals begann nach Platzierung der Mikroclips auf Arteria und Vena femoralis, direkt unterhalb des Leistenbandes zur Unterbindung des Blutflusses, die Ischämiephase.

Der Nervus femoralis wurde jederzeit durch mikroskopische Kontrolle geschont. Eine sichere Unterbindung des Blutflusses zur regelrechten Ischämiephase erfolgte ebenfalls visuell durch mikroskopische Kontrolle.

Zur Injektion von Epigallocatechin-3-gallat wurde bei der entsprechenden Tierversuchsgruppe die Vena jugularis interna dargestellt.

Dies erfolgte über einen Hautschnitt vom Sternoclaviculargelenk zum Cricoid. Die Präparation der Vena jugularis interna erfolgte dann im Subcutangewebe unter mikroskopischer Kontrolle.

Ihr distales Ende wurde mit Fadenmaterial der Stärke 5,0 ligiert und nach proximal mit Fadenmaterial der Stärke 5,0 angezügelt.

Nach Dissektion des Gefäßes wurde ein Katheter mikroskopisch in das eröffnete Lumen eingeführt und anschließend über den proximalen Zügel fixiert. Über diesen intravasalen Katheter konnte Epigallocatechin-3-gallat bei der entsprechenden Versuchsgruppe intravenös appliziert werden.

Dies erfolgte in der entsprechenden Gruppe 5 Minuten vor Beginn der Reperfusion.

Nach 2-stündiger Ischämiephase erfolgte die Reperfusionsphase über einen Zeitraum von 2 Stunden.

Hierzu wurden die eingebrachten Mikroclips unter visueller Kontrolle wieder entfernt.

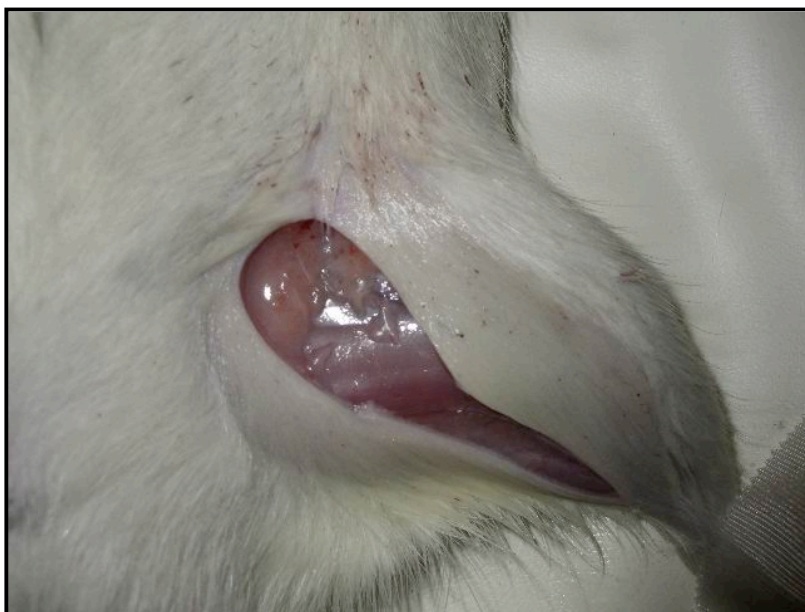
Eine einwandfreie Reperfusion war jederzeit durch visuell mikroskopische Kontrolle gewährleistet, um eventuelle Re-Ischämien durch Thromben/ Embolien oder traumatische Verschlüsse zu vermeiden.

Die Tiere wurden während der ganzen Versuchszeit durch regelmäßige Gabe von Pentobarbital-Natrium in Narkose gehalten und nach Abschluss des Versuches mit einem Bolus Kaliumchlorid durch den eingebrachten Katheter getötet.

Das operative Vorgehen veranschaulichen die Abbildungen 7, 8, 9 in verschiedenen Schritten:

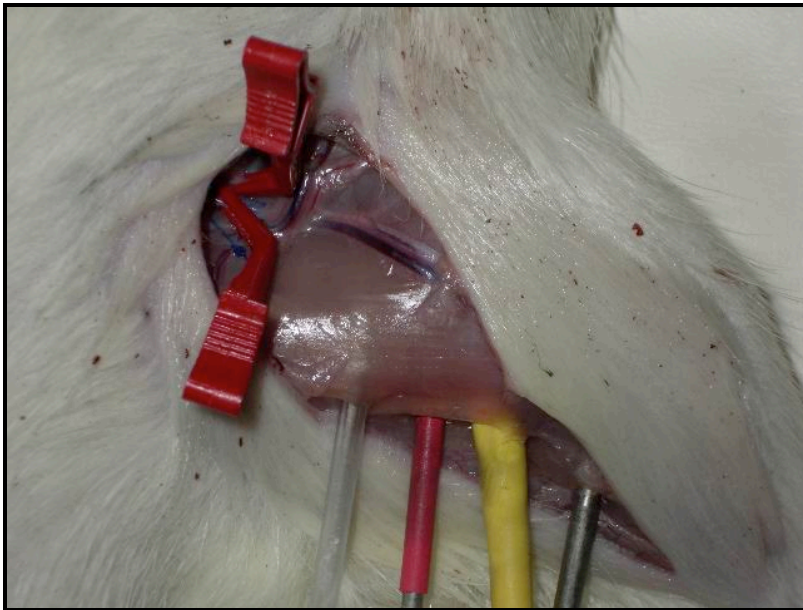
7)

Zunächst erfolgte der Hautschnitt mit dem Skalpell als Zugangsweg zur Leiste und des Muskels.



8)

Nun teils stumpfe, teils scharfe Präparation der Leiste mit Freilegung der Gefäß- und Nervenstraße der Leiste und Freilegung des Muskelus gastrocnemius zur späteren sicheren und visuell unter dem Mikroskop gezielten Clipapplikation (2 mal rot) und Implantation der Sensoren. (von links nach rechts: NO-Sensor, Gegenelektrode, Temperatursensor, Superoxidsensor).



9)

Zuvor, bei Applikation von Epigallocatechin-3-gallat, Freilegung der V. jugularis und Ligatur (Fadenmaterial 5,0). Dissektion des Gefäßes und Implantation des Katheters zur intravenösen Injektion und Fixation desselben (Fadenmaterial 5,0).



Die Aufzeichnungen des Versuchs wurden während der gesamten Versuchsdauer online aufgezeichnet und waren so für den Versuchsdurchführenden jederzeit sichtbar.

Mit Vorbereitung und Präparation der Tiere ergab sich eine Versuchsdauer von ca. 6 Stunden pro Versuch.

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsserien mit jeweils sieben Versuchstieren bei insgesamt 14 Versuchstieren durchgeführt.

Vor Beginn und nach Beendigung der in-vivo- Messung wurde eine in-vitro- Kalibrierung aller dreier Sensoren durchgeführt.

Hierzu wurde nach der beschriebenen in-vitro- Versuchsanleitung vorgegangen.

4 Kalibrierung

4.1.

02-Sensor

Die Rührmessa zelle (Volumen: 1ml) wurde mit 1ml PBS-Puffer 0,1 M (pH 7,5) unter ständigem Rühren befüllt.

Nun Zugabe von 5 Mykroliter 10 mM Hypoxanthin. Nun Zugabe von 2,5 Mykroliter Xanthinoxidase.

Der Signalausschlag wurde registriert, und nachdem sich ein stationäres Signal eingestellt hatte, wurde der Signalausschlag mit 1 Mykroliter Superoxiddismutase spezifisch supprimiert.

Das so gewonnen Kalibrationssignal in Pikoampere diene zur Berechnung der Konzentrationsverlauf des im Tierexperiment registrierten Signals für Superoxidanionen.

Tabelle 1 zeigt die ermittelten Kalibrationswerte für Superoxid in Pikoampere ohne und mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat.

Tabelle 1:

Ohne Zusatz von Epigallocatechin-3-gallat in Pikoampere

Kal a	Kal b	n
87,0	43,0	1
30,0	21,0	2
34,0	47,0	3
34,0	47,0	4
29,0	35,0	5
43,0	29,0	6
21,0	19,0	7
39,7	34,4	MW
21,9	11,8	SAW

Mit Zusatz von Epigallocatechin-3-gallat in Pikoampere

Kal a	Kal b	n
49,0	29,0	1
32,0	17,0	2
22,0	20,0	3
61,0	18,0	4
29,0	34,0	5
37,0	28,0	6
34,0	7,0	7
40,3	22,2	MW
12,3	9,9	SAW

Kal a: Kalibration vor Versuch

Kal b: Kalibration nach Versuch

EGCG: Epigallocatechin-3-gallat

1-7: Tierversuchsnummer

MW: Mittelwert

SAW: Standardabweichung

4.2.

NO-Sensor

Die Rührmehrzelle (Volumen 1 ml) wurde mit 1ml einer Lösung aus 0,1M H₂SO₄ und 0,1M KI unter ständigem Rühren gefüllt. Dieser Lösung wurden nun jeweils nach Stabilisierung der Signalausschläge 5 Mykroliter, 3 Mykroliter und 1 Mykroliter einer 50 mM KNO₂- Lösung zugesetzt.

Das so gewonnene Kalibrationssignal in Pikoampere diente zur Berechnung des Konzentrationsverlaufs des im Tierexperiment registrierten Signals für die Produktion von NO.

Die Kalibration mit 5µl, 3µl und 1 µl Lösung ist in der Messkurve der Abbildung 10 beispielhaft dargestellt.

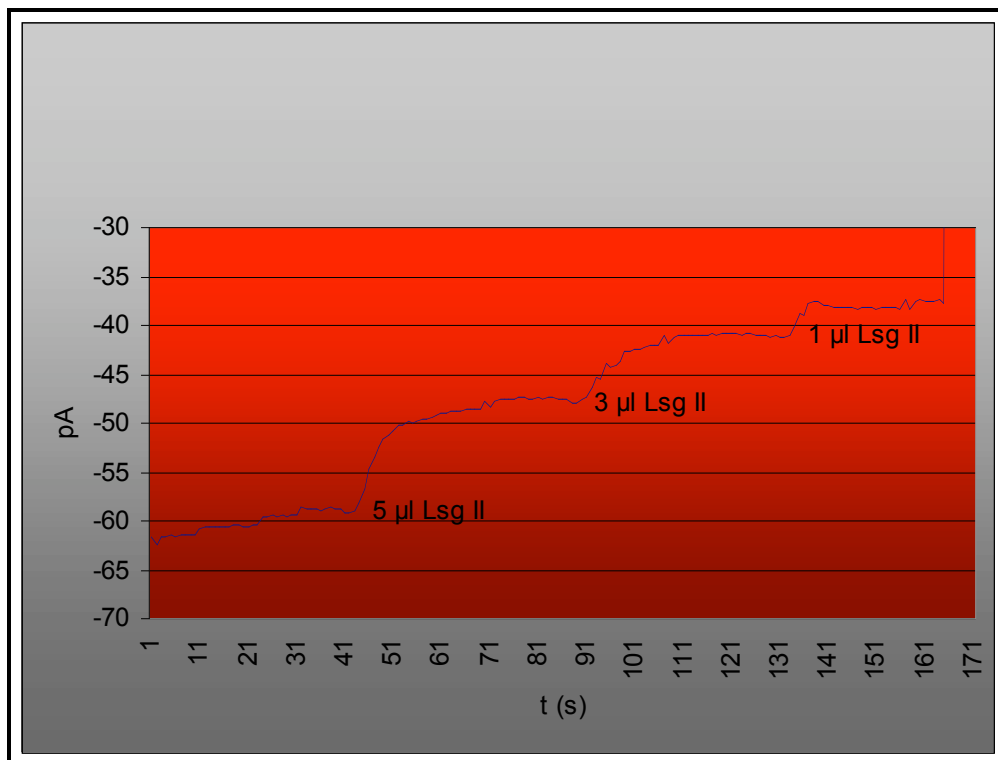


Abbildung 10:

Die Abbildung zeigt eine typische Kalibrationskurve zur Messung von NO in Pikoampere nach Zusatz von 5 µl, 3µl und 1µl Lösung.

Da zwischen der Kalibration vor und nach dem Versuch meist eine geringe Differenz besteht, wurde eine Regressionsgerade der Mittelwerte der Kalibrationen vor und nach dem Versuch erstellt.

Dabei ergab sich mathematisch kein Unterschied.

Dies ist am Beispiel einer Kalibration in Abbildung 11 nachfolgend dargestellt.

Abbildung 11:

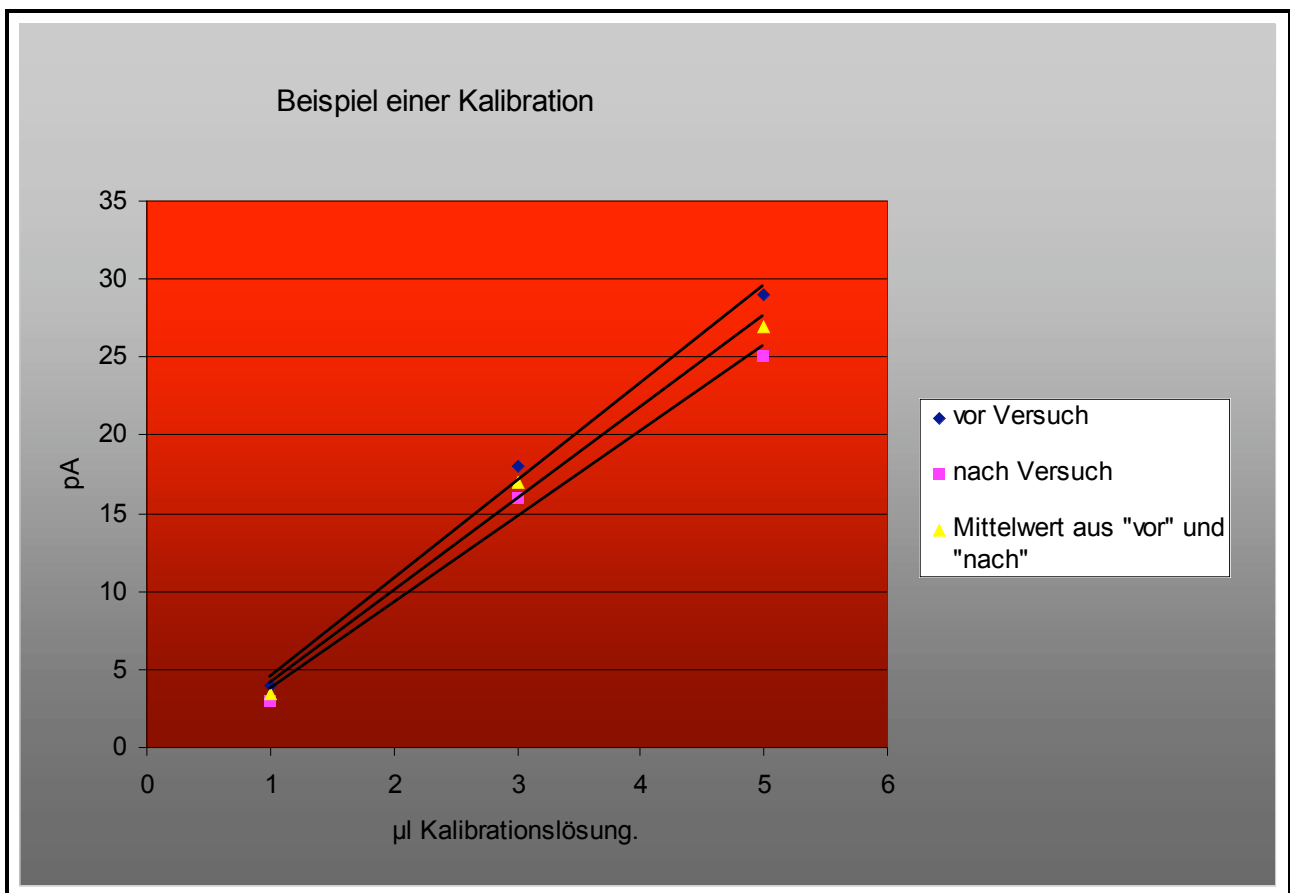


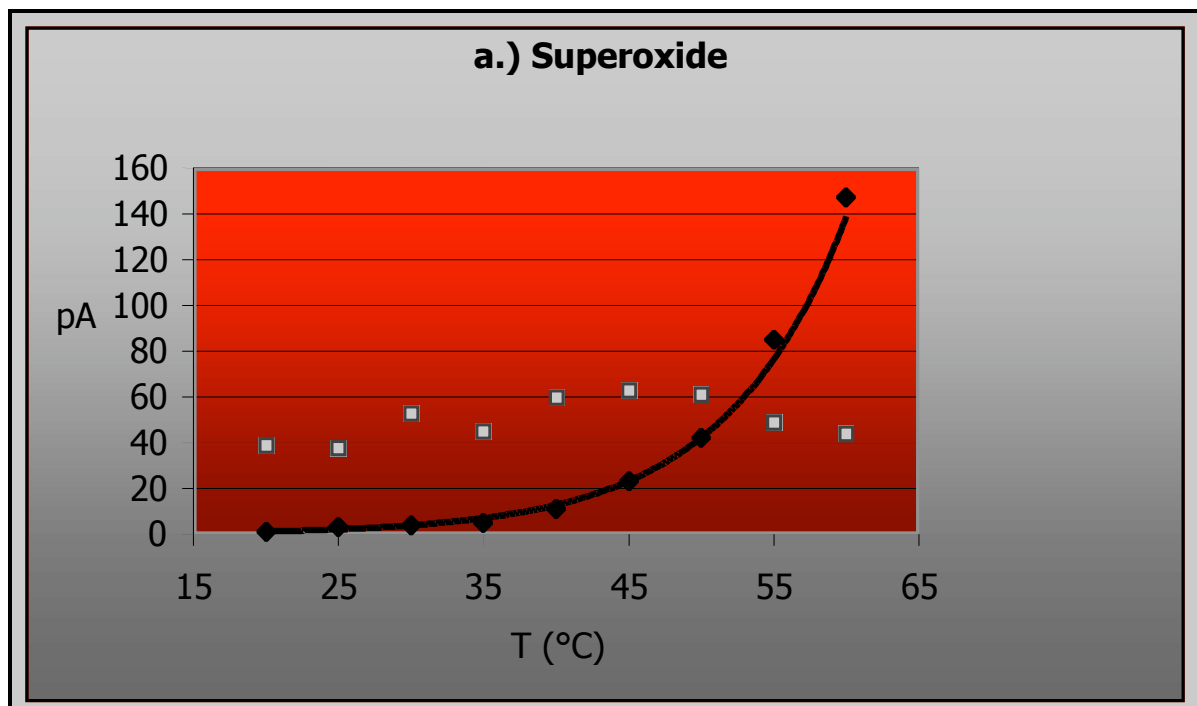
Abbildung 11 zeigt am Beispiel einer Kalibration keinen Unterschied der Mittelwertbildung.

4.3 Temperatur und Temperaturkorrektur

Aufgrund konstruktionsbedingter Temperatursensibilität der beiden Sensoren (O₂- und NO) wurde zunächst eine Kalibration beider Sensoren gegen die Temperatur durchgeführt, um eventuell die Messergebnisse zu korrigieren.

Es zeigte sich hier eine exponentielle Abhängigkeit des Grundstroms von der Umgebungstemperatur bei beiden Sensoren wie in Abbildung 12 dargestellt.

Abbildung 12:



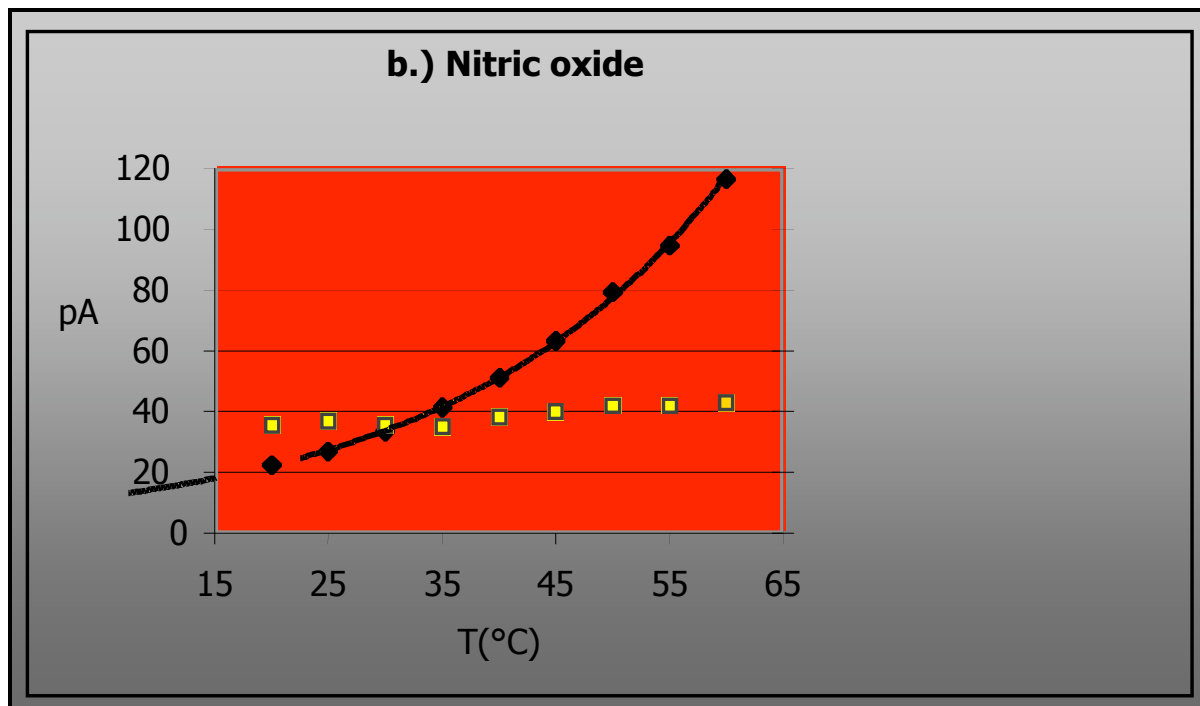


Abbildung 12 zeigt die Temperaturabhängigkeit beider Sensoren. Der Grundstrom ist exponentiell von der Temperatur abhängig.

Das Signal selbst wurde durch die Temperatur nur äußerst gering beeinflusst. Der O₂-Sensor zeigte erst ab einer ansteigenden Temperatur von 55 Grad Celsius einen Signalabfall. Bei tieferen Temperaturen zeigte sich keine Abhängigkeit. Da in dem hier durchgeführten Versuchsablauf in-vivo keine derartig hohen Temperaturen erreicht wurden ist diese Beeinflussung in unserem in-vivo- Versuchsmodell irrelevant.

Jedoch mussten die Messwerte entsprechend temperaturkorrigiert werden (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Die folgende Tabelle 2 gibt die temperaturkorrigierten Daten für die Kalibrationsmessung von Superoxid ohne und mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat jeweils vor und nach der Kalibration in Pikoampere wieder.

Tabelle 2: Superoxid ohne Epigallocatechin-3-gallat:

1	14,8	122,8
2	16,0	132,7
3	34,0	282,0
4	20,8	172,5
5	31,8	263,8
6	20,3	168,4
7	12,3	102,0
n	Kal a	Kal b

Superoxid mit Epigallocatechin-3-gallat:

1	8,3	68,8
2	10,0	82,9
3	4,0	33,2
4	15,0	124,4
5	8,7	72,2
6	9,3	77,1
7	5,7	47,3
n	Kal a	Kal b

n: Tierversuchsnummer, Kal a: Kalibration vor Versuch,
 Kal b: Kalibration nach Versuch

Tabelle 3 gibt die temperaturkorrigierten Daten für die Kalbrationsmessung von NO ohne und mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat in μmol wieder.

Tabelle 3: NO ohne Epigallocatechin-3-gallat :

n	Kal a	Kal b
1	1,1	0,4
2	0,7	0,3
3	0,4	0,1
4	0,9	-0,4
5	1,6	-0,6
6	1,4	-0,2
7	1,4	-0,2

NO mit Epigallocatechin-3-gallat:

n	Kal a	Kal b
1	0,8	-0,2
2	0,9	-0,2
3	0,6	0,1
4	1,3	-0,8
5	0,9	-0,3
6	1,3	-0,5
7	0,6	0,6

n:Tierversuchsnummer , Kal a : Kalibration vor Versuch

Kal b : Kalibration nach Versuch

5. Ergebnisse

5.1

O₂- Messung

Nach Adaptierung des O₂- Sensors und konstantem Ausgangssignal erfolgte eine zweistündige Phase der Ischämie gefolgt von einer zweistündigen Phase der Reperfusion.

Während der Ischämiephase zeigte sich keine Signaländerung.

In unserem in-vivo- Versuchsmodell zeigte sich ein direkter Anstieg der Konzentration von Superoxid fünf Minuten nach Beginn der Reperfusion, mit einem Maximum nach dreißigminütiger Phase der Reperfusion.

Nach diesem Maximum fiel das Signal nach und nach kontinuierlich ab.

Es war aber in jeder Messung zwei Stunden nach Reperfusion nachweisbar.

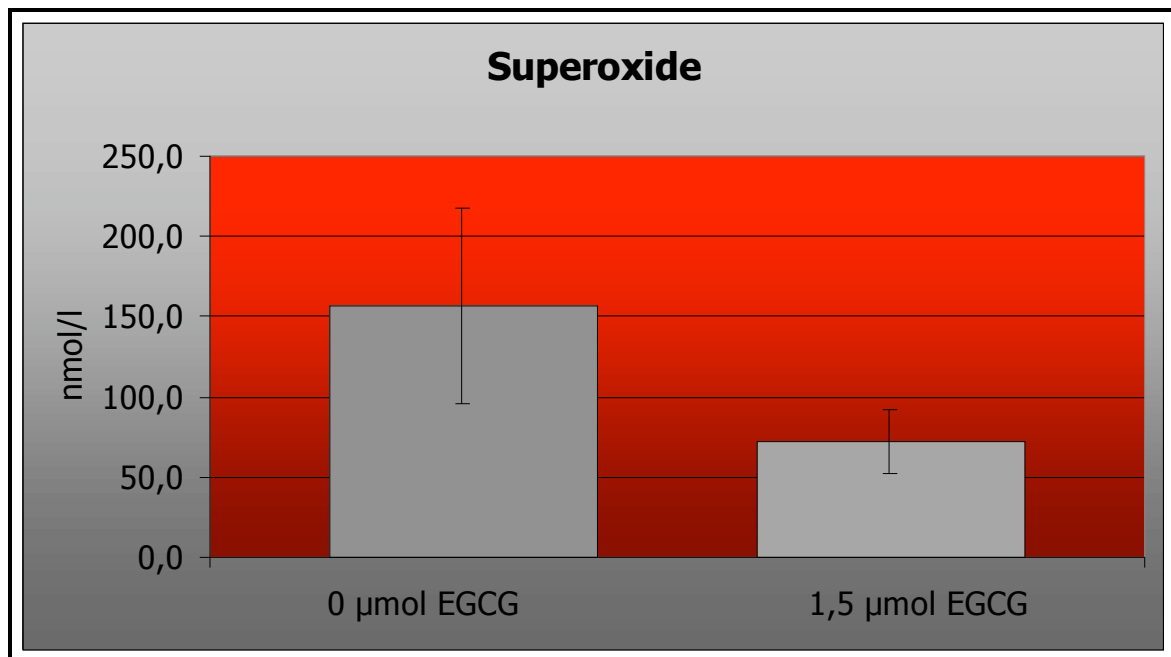
In den in-vivo- Vergleichsgruppen (mit und ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat) zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Die Gruppe mit Zusatz von Epigallocatechin-3-gallat zeigte deutlich niedrigere Konzentrationen an Superoxid.

Das Signal wurde um 54% supprimiert.

Dies ist in der Abbildung 13 schematisch dargestellt.

Abbildung 13:



Die Abbildung 13 veranschaulicht die Ergebnisse nach Temperaturkorrektur für die Vergleichsgruppen (n=7) mit und ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat in nmol/l. Die Konzentration von Superoxid war um 54% reduziert.

5.2

NO- Messung

Nach Adaptierung des NO-Sensors und konstantem Ausgangssignal erfolgte eine zweistündige Phase der Ischämie gefolgt von einer zweistündigen Phase der Reperfusion.

In unserem in- vivo- Versuchsmodell zeigte sich, dass es während der Ischämie in allen Fällen kontinuierlich zu einem Abfall der NO- Konzentration kam.

In unserem in- vivo- Versuchsmodell kam es mit Beginn der Reperfusion zu einem erneuten Abfall der Konzentration an NO für zehn Minuten.

Nach weiteren 30 bis 90 Minuten kam es dann zu einer Normalisierung bis auf die Ausgangswerte .

In der in-vivo- Vergleichsgruppe (n=7) mit und ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Beide Gruppen zeigten annähernd gleich hohe Konzentrationen an NO.

Dies ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14:

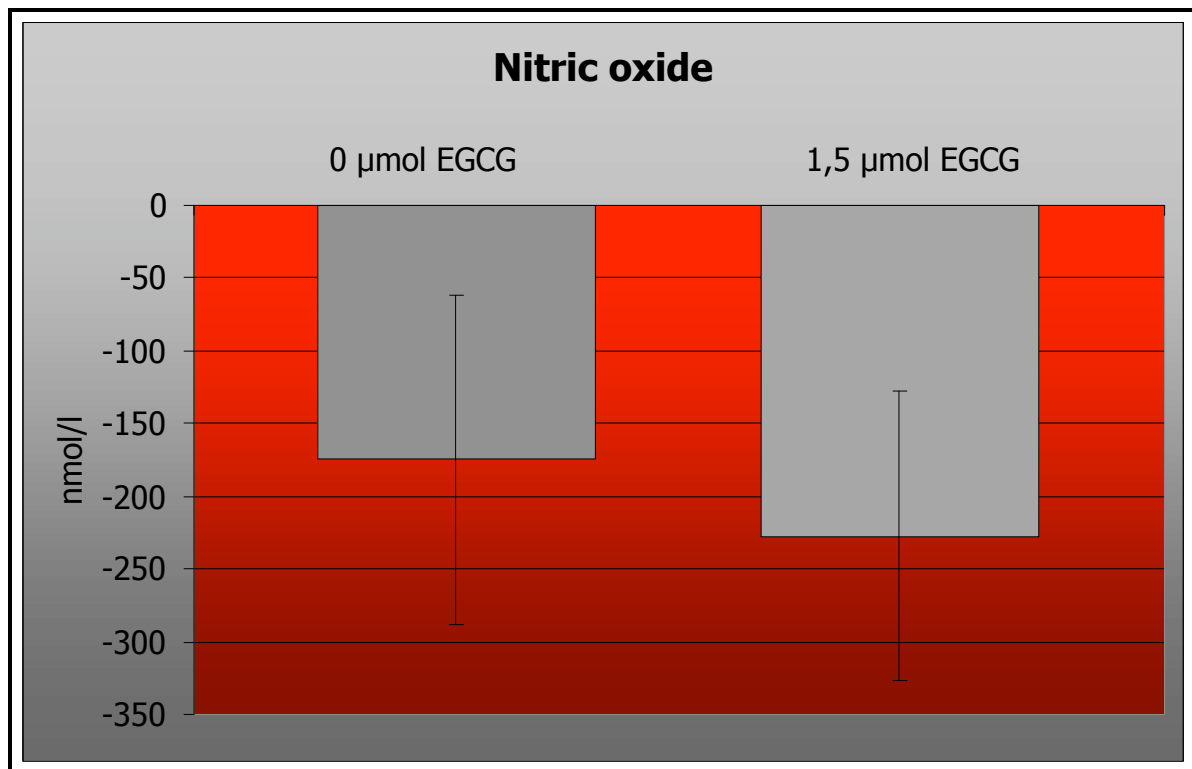


Abbildung 14 veranschaulicht die Ergebnisse für NO nach Temperaturkorrektur für die Versuchsgruppen (n=7) mit und ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat in nmol/l. Die Konzentration von NO wird nicht signifikant supprimiert.

5.3 Temperatur

Die online gemessene Temperatur fiel während der ischämischen Phase in unserem in-vivo- Versuchsmodell erwartungsgemäß ab.

Die Temperatur fiel während der Ischämie von initial 31,8 Grad Celsius auf 27,8 Grad Celsius.

Die Temperatur stieg stetig in der Phase der Reperfusion nach fünf Minuten bis auf 30,5 Grad Celsius erneut an, um dann während der weiteren Phase der Reperfusion stabil zu bleiben.

In den beiden durchgeführten Versuchsgruppen zeigte sich kein Unterschied bezüglich des Temperaturverlaufs.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Wilcoxon Test.

Zusammengefasst zeigt sich ein signifikanter Unterschied der in- vivo- Versuchsreihe von Superoxid zwischen der Gruppe ohne Applikation und der Gruppe mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat ($p= 0,01$).

Es zeigt sich in der Gruppe ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat eine Konzentration von Superoxid von 156,5 nmol/l im Median bei einer Standardabweichung $\pm 60,9$.

In der Gruppe mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat zeigt sich eine Konzentration an Superoxid von 72,6 nmol/l im Median bei einer Standardabweichung von $\pm 20,0$.

In der in- vivo- Versuchsreihe zeigt sich in Gruppe der Versuchreihe von NO zwischen der Gruppe ohne Applikation und der Gruppe mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat kein signifikanter Unterschied ($p=0,33$).

Es zeigt sich in der Gruppe ohne Applikation von Epigallocatechin-3-gallat eine Konzentration an NO von -174,929 nmol/l im Median bei einer Standardabweichung von $\pm 113,306$.

Die Versuchsgruppe mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat zeigt eine Konzentration an NO von -227,385 nmol/l im Median bei einer Standardabweichung von $\pm 99,863$.

Histologisch zeigten sich in den Präparaten ohne Epigallocatechin-3-gallat vermehrt Zelluntergänge und Leukozyteninfiltration im Vergleich zu den Versuchstieren mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat.

Tabelle 4 gibt die Versuchsergebnisse der Vergleichsgruppen ohne und mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallat wieder.

Tabelle 4:

n	NO	O2-
1	-229,547	56,9
2	-303,162	156,9
3	-164,785	209,9
4	-322,513	128,4
5	-66,795	248,4
6	-41,282	141,0
7	-96,420	153,8
MW	-174,929	156,5
SD	-113,306	60,9

n	NO	O2-
1	-231,03	53,2
2	-307,11	102,0
3	-340,02	47,6
4	-64,08	94,9
5	-310,05	69,0
6	-187,36	71,5
7	-152,04	69,5
MW	-227,385	72,6
SD	-99,863	20,0

Tabelle 4 zeigt die Versuchsergebnisse temperaturkorrigiert für NO in nmol/l und für Superoxid in nmol/l ohne und mit Applikation von Epigallocatechin-3-gallate.

n: Tierversuchsnummer, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Abbildung 15:

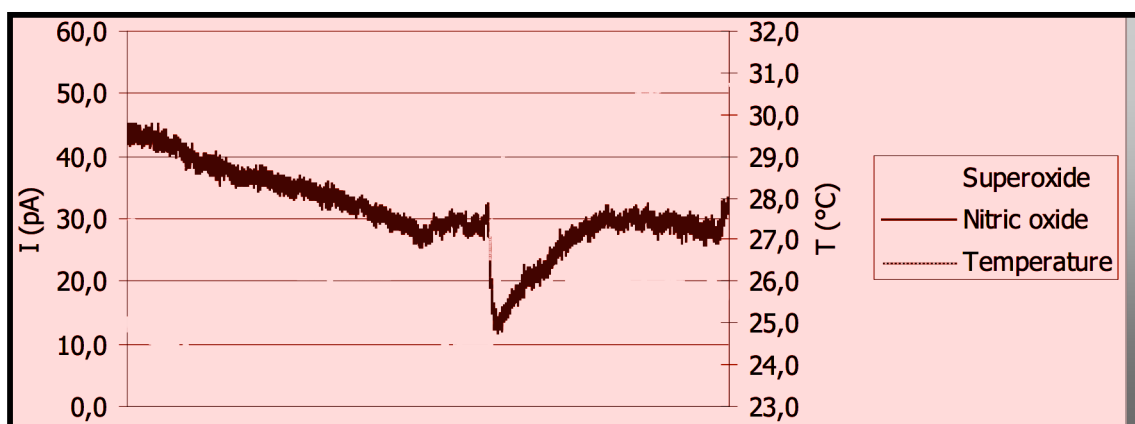


Abbildung 15 zeigt den typischen Verlauf einer Versuchskurve gemessen in Pikoampere (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) und die Temperatur (y-Achse).

6. Diskussion:

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits etablierte Methode zur online-Messung der Konzentration von Superoxidanionen im in-vivo- und in-vitro-Versuch verwendet. Dies geschah an einem tierexperimentell etablierten Ischämie- und Reperfusionsversuchsmodell.

Ergänzt wurde dies durch online Messung von Temperatur und der Messung an anfallender Konzentration von NO.

Untersucht wurde der mögliche Einfluss des starken Antioxidants Epigallocatechin-3-gallat auf die Bildung von Superoxidanionen und NO.

Als Vergleich und zur Kontrolle der Sensorstabilität über den Versuchsablauf mit zweistündiger Ischämie und zweistündiger Reperfusion, diente jeweils die Kalibration der Sensoren vor Beginn und nach Ende des Versuchsablaufes.

Alle Versuchstiere erlebten das Versuchsende und wurden durch eine intravenöse Injektion von Kaliumchlorid getötet.

Es erfolgten jeweils zwei Versuchsreihen mit n=7 Tieren.

Die eine Gruppe erhielt das Antioxidant Epigallocatechin-3-gallat in einer Konzentration von (c=1,5µmol/kg KG) fünf Minuten vor Reperfusionsbeginn intravenös durch einen zuvor in die Vena jugularis implantierten Katheter.

Die Kontrollgruppe erhielt keinen Wirkstoff.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Epigallocatechin-3-gallat ($c=1,5 \mu\text{mol/kg KG}$) das Signal von Superoxid nach zweistündiger Ischämie im in- vivo- reperfundierten Muskelgewebe deutlich und damit signifikant supprimiert wurde. Superoxid wurde in diesem Versuchsmodell nach zweistündiger Ischämie durch die zuvor intravenöse Injektion von $1,5 \mu\text{mol/kg KG}$ Epigallocatechin-3-gallat um 54% gesenkt.

Die Konzentration von NO wurde nach zweistündiger Ischämie im in- vivo- reperfundierten Muskelgewebe nicht beeinflusst.

Ferner zeigte sich ein Temperaturabfall im ischämischen Muskelgewebe mit Anstieg auf die Ausgangswerte nach Reperfusion.

Dieser Arbeit wurde das Modell des oxidativen Stresses zugrunde gelegt.

Nach der Ischämiephase kam es, über einen definierten Zeitraum (fünf Minuten nach Reperfusion mit Maximum nach 30 Minuten), zu einem Anstieg der Konzentration von Superoxid, und das Signal blieb über die gesamte Reperfusionsphase nachweisbar.

Dies bedeutet, dass auch lange nach Beseitigung der zur Ischämie führenden Erkrankung der pathophysiologische Prozess des Ischämie- und Reperfusionsschadens andauert und in die Phase der Reperfusion fällt, da während der ischämischen Phase keine Konzentrationsänderung registriert wurde.

Superoxid, in unphysiologischer Konzentration, hat eine zytotoxische Wirkung und ist Ausgangsprodukt zytotoxischer Folgeprodukte, wie OH- oder ONOO-.

Durch die intravenöse Applikation des Radikalfängers Epigallocatechin-3-gallat wurde eine Minderung des Superoxidlevel nachgewiesen und damit ein möglicher Ansatz zur Minderung des Schadens bei Ischämie und Reperfusion gezeigt.

Mit diesem Versuch wurde die aus vorigen Studien bekannte hohe antioxidative Wirkung, (bis zu 170fach höhere antioxidative Wirkung gegenüber anderen Antioxidantien wie Vitamin C, das sich in klinischen Therapiestrategien bewährt hat) als freier Radikalfänger, mit Supprimierung des zytotoxischen O₂-bewiesen. (68) (69) (70)

Epigallocatechin-3-gallat wird als intravenöser Radikalfänger, aber andererseits auch durch die mögliche intraperitoneale oder perorale Applikation, seiner Wirkung als Antioxidants gegenüber Superoxid gerecht. (65, 66, 67)

Itoh Y et al zeigten zusätzlich eine spezifische Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat auf die Expression von Enzymen zur Bildung von Superoxiddismutase. (72)

Dieses Enzym supprimiert die Bildung von Superoxidanionen und trägt so zu einer Verringerung der schädigenden Wirkung von Superoxid bei.

Epigallocatechin-3-gallat hat somit einen direkten und indirekten Einfluss auf die Konzentration von Superoxid und verringert den Schaden bei Ischämie und Reperfusion.

Büttemeyer et al zeigten 2003 eine ca. 50 % Suppression von Superoxid an einem Ischämie- und Reperfusionsmodell mit der intravenösen Applikation von Epigallocatechin-3-gallat in einer Konzentration von 4 mg/kg KG. Hier erfolgte die Applikation mit Beginn der Reperfusion. Es wurden Ischämiezeiten von 60 und 120 Minuten registriert. Die histologischen Aufarbeitungen der ischämischen Muskelgewebe konnten den protektiven Effekt von Epigallocatechin-3-gallat bestätigen. (58)

Dies konnte in unserem Versuchsmodell (Ischämiezeit 120 Minuten; c= 1,5µmol/kg KG) bestätigt werden.

Da der peak von Superoxid direkt mit der Reperfusion einsetzt, erscheint es sinnvoll das Antioxidants kurz vor Reperfusionbeginn zu applizieren, wie es in unserem Versuchsmodell erfolgt. Jedoch könnte eine kontinuierliche Applikation über die gesamte Reperfusionphase mit Beginn kurz vor Reperfusion den Reperfusionsschaden ggf. weiter vermindern.

Über eine kontinuierliche Applikation (intravenös versus intraperitoneal) bei chirurgischen Eingriffen mit Ischämie- und Reperfusionssyndrom kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

NO wurde in dem vorliegenden Versuchsaufbau in der Konzentration von Epigallocatechin-3-gallat nicht beeinflusst.

Es zeigte sich aber eine über den Verlauf der Ischämie kontinuierlich abfallende Konzentration an NO, mit in der Reperfusion zusätzlich abfallender Konzentration, die über den Verlauf der Reperfusion kontinuierlich wieder auf das Ausgangsniveau anstieg.

Als Ursache kann die Reaktion des instabilen NO mit O₂- zu dem stabileren Produkt ONOO- (Peroxynitrit) angesehen werden.

Daraus kann geschlossen werden, dass es während der Ischämie zu einem Anstieg von NO als Vasodilatator kommt, deren Menge dann in der Reperfusion abfällt. (59)

ONOO- selbst wird eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben.

Damit werden NO und seinem Reaktionsprodukt ONNO- sowohl antioxidative, als auch oxidative Wirkung und zytotoxische Effekte zugeschrieben.

NO und seine Reaktionsprodukte spielen erwiesenermaßen eine entscheidende Rolle in der Ischämie und der Reperfusion.

Eine entscheidende Pathogenese selbst wird NO im Zusammenhang mit der Entwicklung bei ARDS zugeschrieben. (60)

Einen direkten Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat als Antioxidants auf NO konnten wir nicht nachweisen. Es besteht somit keine direkte protektive Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat auf die Bildung von NO.

Da jedoch Epigallocatechin die Konzentration von O₂- supprimiert, müsste es zu einer Reduktion von ONNO- kommen. Somit hätte das Antioxidants hätte ebenfalls eine zytoprotektive und antiinflammatorische Wirkung.

Hierzu wäre jedoch die qualitative Messung von ONNO- notwendig.

Da aber die Supprimierung von O₂- nicht zu einer Erhöhung von NO in unserem Versuch führte, spielt die Reaktion zu ONOO- keine eher untergeordnete Rolle im Ischämie- und Reperfusionmodell .

Peng PH et al zeigten anhand eines Ischämie- und Reperfusionmodells der Retina an Wistar-Ratten, dass Epigallocatechin-3-gallat neuronale NO-Synthasen und seine Folgeprodukte signifikant supprimiert.

In dieser Studie wurde das Antioxidans intraperitoneal und 30 Minuten vor Versuchsbeginn appliziert. Ferner erfolgte die Auswertung an histologischen Präparaten, und Epigallocatechin-3-gallat wurde in einer Konzentration von 50 mg/kg appliziert. (61).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass Epigallocatechin-3-gallat in einem Ischämie- und Reperfusionmodell am Gehirn einen protektiven Effekt als Antioxidans aufweist. Hier wurde die protektive Wirkung zur Reduktion an totalen NO-Synthasen, iNOS und nNOS sowie der Verminderung des gesamten Infarkt Volumens an histologischen Präparaten nachgewiesen. (62)

Die neuroprotektiven Effekte von Epigallocatechin-3-gallat scheinen durch die Modulation der NO-Isoformen, durch Eingreifen in die komplexe Signaltransduktionskette und Modulation von Transkriptionsfaktoren und nicht nur durch seine direkte Wirkung als Antioxidans zustande zu kommen.

Dies wurde mehrfach in vielen anderen Studien verifiziert, so dass eine protektive Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat in den komplexen physiologischen und pathophysiologischen Prozess um NO eine wichtige Rolle zu spielen scheint. (63)

Epigallocatechin-3-gallat scheint somit den zellulären Schaden durch Inhibierung der inflammatorischen Antwort über Leukozyten, Inhibierung der proinflammatorischen Zytokine wie NF-kappa-B, Minderung der Lipidoxidation und Verminderung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthasen zu verringern. (64)

Es muss somit ein komplexes Ischämie- und Reperfusionsmodell angenommen werden.

Diese Arbeit zeigt diesbezüglich neue Ansatzwege, aber auch noch unklare Reaktionen bezüglich der komplexen Vorgänge bei Ischämie und Reperfusion und der antioxidativen Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat.

Ferner scheint die bestmögliche zu applizierende Menge (Konzentration an Epigallocatechin-3-gallat), der bestmögliche Applikationsort von Epigallocatechin-3-gallat (intravenös, versus per oral, versus intraperitoneal) und der Applikationszeitpunkt (mit Beginn der Ischämie, während oder vor Reperfusion) noch ungeklärt.

Eine alleinige zytotoxische Wirkung von Superoxid scheint im Ischämie- und Reperfusionsmodell nicht vorzuliegen. Es muss eine komplexe Reaktion von O₂⁻, NO, ONNO- und der weiteren Transkription angenommen werden. (71)

Eine spezifische Wirkung von Epigallocatechin-3-gallat auf die Expression von Enzymen zur Bildung von Superoxiddismutase ist nachgewiesen. (72)

Dieser Nachweis beweist den richtigen Versuchsansatz zur Bildung und Suppression von Superoxid in- vitro und kann auf die antioxidative Wirkung in- vivo angewandt werden. Es zeigt sich erneut das komplexe Zusammenspiel von Superoxid und NO.

Ausgehend von unseren Ergebnissen, zeigen sich ein Abfall der Konzentration von NO und ein Anstieg der Konzentration von Superoxid in der unmittelbaren Phase der Reperfusion. In der weiteren Reaktion reagiert Superoxid mit NO, was ebenfalls zu einem späteren Abfall der Superoxid- und der NO-Konzentration führen kann. Dies ist aus anderen Studien bekannt. Hier wird ebenfalls eine Reaktion zu Peroxynitriten mit folgenden zytotoxischen Folgen und Folgereaktionen postuliert. (73)

Es kann somit nicht ausschließlich auf eine direkte Supprimierung von Superoxid durch Epigallocatechin-3-gallat ausgegangen werden, obwohl dies in-vitro-Studien belegen.

Gracia-Sancho J et al veröffentlichten, dass in zirrhatischen Leberzellen ein Abfall der Konzentration von NO zur Erhöhung des intrahepatischen Drucks führt. Dieser Annahme liegt das Modell des oxidativen Stresses zugrunde. Es wird davon ausgegangen, dass die Verminderung von NO durch die Reaktion von Superoxid und NO zu Peroxynitrit einen großen Anteil hat. (74) Das heißt, dass Epigallocatechin-3-gallat einen Einfluss auf das Modell des oxidativen Stresses hat und antioxidative Potenz besitzt.

Epigallocatechin-3-gallat kann ab einer Konzentration von über 10 µmol/l selbst zytotoxische Eigenschaften entwickeln bis hin zur Apoptose. Dies zeigt sich vor allem ab einer Konzentration von 30 µmol/l bis zu 100 µmol/l und wird auf die beim Abbau von Epigallocatechin-3-gallat durch Oxidation anfallende Produktion von H₂O₂ zurückgeführt.

Derartig hohe Konzentrationen können nicht durch körperliche Zufuhr erzielt werden. Dies konnte nur in Zellversuchen untersucht und nachgewiesen werden. Es wurde hier außerdem die Überexpression von Genen, Verringerung von Wachstumsfaktoren und Hemmung von Proteinkinasen durch Epigallocatechin-3-gallat postuliert. (75)

Diese Ergebnisse müssen vorsichtig interpretiert werden, da solch hohe Konzentration nur in-vitro erreicht werden kann.

In unserer Arbeit wurden derart hohen Konzentrationen nicht verwendet und sind auch physiologisch irrelevant.

Epigallocatechin-3-gallat kann direkt die Konzentration von Superoxid und damit auch seiner toxischen Folgeprodukte supprimieren und eignet sich als potentes Antioxidans. Dies konnte durch die histologischen Aufarbeitungen bestätigt werden, in denen eine verminderte Leukozyteninfiltration und verminderte Zelluntergänge nachgewiesen wurden.

Die Temperaturabhängigkeit beider Sensoren wurde in dieser Arbeit berücksichtigt. Dies muss für zukünftige Versuche immer gewährleistet sein, damit falsche, nicht temperaturkorrigierte Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Epigallocatechin-3-gallat kann somit zu einem potentiellen Radikalfänger in der klinischen Therapie des Ischämie- und Reperfusionssyndroms werden.

7. Zusammenfassung

In der Reperfusion ischämischen Muskelgewebes kommt es zu einer Änderung der Konzentrationen an O₂⁻ und NO. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des bekannten Radikalfängers Epigallocatechin-3-gallat auf die Änderung der Konzentrationen an O₂⁻ und NO in einem tierexperimentellen Modell zur Ischämie und Reperfusion an männlichen Wistar-Ratten untersucht und online registriert. Die Versuchsextremität von 14 Tieren wurde einer Ischämiezeit von zwei Stunden ausgesetzt mit anschließender Reperfusion für zwei Stunden. Sieben Tiere erhielten 1,5 µmol/kg KG Epigallocatechin-3-gallat fünf Minuten vor Reperfusion intravenös verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt keinen Wirkstoff. O₂⁻, NO und die Temperatur wurden jederzeit online während Ischämie und Reperfusion gemessen. Die Konzentration an O₂⁻ fiel von 156,5 nmol/l auf 72,6 nmol/l unter der Applikation von Epigallocatechin-3-gallat. Die Konzentration von NO wurde durch Epigallocatechin-3-gallat nicht signifikant beeinflusst, fiel aber von -175 nmol/l auf -227 nmol/l.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass Epigallocatechin-3-gallat einen signifikanten direkten Einfluss auf die Bildung von Superoxidanionen hat. Es hat einen starken antioxidativen Effekt und kann zur erheblichen Reduktion des Schadens der Ischämie und Reperfusion als potenter Radikalfänger beitragen.

8. Literaturverzeichnis

1. Winnefeldt K. Antioxidantien und Radikale. Analytik und klinische Bedeutung. J Lab Med 1996; 20:199-204
2. Jivegard L, Windgren U. Management of acute limb ischaemia over two decades: the swedish experience. Eur J Vasc Endovasc Surg. 1999;18; 93-95.
3. Hearse DJ. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: success and failures in the journey from molecule to man. Eur Heart J Supp, 3 Supplement 2001:C, C11-C21.
4. Buckley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. In: Surgery, 5, 479-83, 1993.
5. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. In: Nutrition. 2002 Oct;18(10):872-9.
6. Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. Analysis of Free radicals in Biological Systems. Favier et al. ed. Basel/ Switzerland. Birkhäuser; 1995; 83-98.
7. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am: J Physiol.; 1986 Jun.: 250(6 Pt 1):G749-53.
8. Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. Arch Biochem Biophys.;1976:172(2):354-64
9. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med.; 1998 Sep.: 25(4-5):434-56.
10. Petkau Ae. Introduction: free radical involvement in physiological and biochemical processes. Can j Physiol Pharmacol;1982: 1327-1329.
11. Fridovich I. Getting along with Oxygen. In: Oxygen Free Radiclas in Tissue Damage. Boston; Birkhäuser;1993:1-11.

12. Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.*; 2000 Oct;25(9-10):1315-41.
13. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.*; 1996 Oct;32(4):743-51.
14. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.*; 2002 Jun 15; 105(2):248-58.
15. Beckmann JS, Chen JC, Ischiropoulos H, Zu L, Conger KA, Halsey Jr. H. Nitric oxide as a mediator of cerebral blood flow, synaptic plasticity, and superoxide-mediated brain injury. *Oxygen free radicals in tissue damage.* Boston; Birkhäuser; 1993: 174-195.
16. Harris Nr, Zimmermann BJ, Granger DN. Oxygen radicals mediate ischemia-reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell adhesive interactions. *Oxygen free radicals in tissue damage.* Birkhäuser; 1993:132-146.
17. Babior BM. The enzymatic basis for O₂-production by human neutrophils. *Physiol. Pharmakologie*; 1982:1353-1358.
18. Steinau Hu. Major limb replantation and postischaemia syndrome. Berlin: Heidelberg; Springer Verlag; 1988.
19. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.*; 1997 Mar;82(2): 291-5.
20. Johnston RB Jr, Keele BB Jr, Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV. The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J Clin Invest*; 1975 Jun;55(6): 1357-72.

21. Tortolani AJ, Powell SR, Misik V, Weglicki WB, Pogo GJ, Kramer JH. Detection of alkoxyl and carbon-centered free radicals in coronary sinus blood from patients undergoing elective cardioplegia. *Free Radic. Biol Med.*; 1993 Apr;14(4):421-6.
22. Korkina LG, Afanas'ef IB, Diplock AT. Antioxidant therapy in children affected by irradiation from the Chernobyl nuclear accident. *Biochem Soc Trans.*; 1993 Aug;21.
23. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol.*; 1993 Oct;34(4): 609-16.
24. Chiu D, Lubin B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia: evidence for increased susceptibility to lipid peroxidation in vivo. *J Lab Clin Med.*; 1979 Oct;94(4): 542-8.
24. Frey KF, Brubacher GB, Stählin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr.*; 1987: 1368-1377
26. Sandre C, Agay D, Ducros V, Faure H, Cruz C, Alonso A, Chancerelle Y, Roussel AmM. Kinetic changes of oxidative stress and selenium status in plasma and tissues following burn injury in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Trauma*; 2006 Mar;60(3): 627-34.
27. Janero DR. Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.*; 1991;11(1): 129-44.
28. Clark IA, Hunt NH. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun.*; 1983 Jan;39(1): 1-6.
29. Fuchs J, Mehlhorn RJ, Packer L. Free radical reduction mechanisms in mouse epidermis skin homogenates. *J Invest Dermatol.*; 1989 Nov;93(5): 633-40.

30. Coghlan JG, Flitter WD, Holley AE, Norell M, Mitchell AG, Ilesley CD, Slater TF. Detection of free radicals and cholesterol hydroperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Free Radic. Res. Commun*; 1991;14(5-6): 409-17.
31. Pincemail J, Detry O, Philippart C, Defraigne JO, Franssen C, Burhop K, Deby C, Meurisse M, Lamy M. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): absence of increased free radical generation following administration in a rabbit model of renal ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.*; 1995 Jul;19(1): 1-9.
32. Illingworth DR. The potential role of antioxidants in the prevention of atherosclerosis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*; 1993;39 Suppl: S43-7.
33. Malvy JM, Lebranchu Y, Richard MJ, Arnaud J, Favier A. Oxidative metabolism and severe asthma in children. *Clin. Chim. Acta.*;1993 Sep 17;218(1): 117-20.
34. Scott P, Bruce C, Schofield D, Shiel N, Braganza JM, McCloy RF. Vitamin C status in patients with acute pancreatitis. *Br J. Surg.*; 1993 Jun;80(6): 750-4.
35. Mancuso C, Scapagini G, Curro D, Giuffrida Stella AM, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci.*; 2007 Jan 1;12: 1107-23.
36. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med. Bull.*; 1999;55(1): 49-75.
37. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.*;1994 Jun;91(2-3): 133-40.
38. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol. Rev.*; 2002 Jun;54(2): 271-84.

39. Uden S, Bilton D, Nathan L, Hunt LP, Main C, Braganza JM. Antioxidant therapy for recurrent pancreatitis: placebo-controlled trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*; 1990 Aug;4(4): 357-71.
40. Clemens MR, Waladkhani AR, Bublitz K, Ehninger G, Gey KF. Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation. *Wien Klin. Wochenschr.*; 1997 Oct 17;109(19): 771-6.
41. Hearse DJ. Stunning: a radical re-view. *Cardiovasc. Drugs Ther.*; 1991 Oct;5(5): 853-76.
42. Ibrahim W, Chow CK. Dietary vitamin E reduces labile iron in rat tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*; 2005;19(5): 298-303.
43. Herbert V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins. *J. Nutr.*; 1996 Apr;126(4 Suppl): 1197S-200S.
44. Vertuani S, Angusti A, Manfredini. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Pharm. Des.*; 2004;10(14): 1677-94.
45. Herbert V. The antioxidant supplement myth. *J. Clin Nutr.*; 1994 Aug;60(2): 157-8.
46. Jang YH, Lee YC, Park NH, Shin HY, Mun KC, Choi MS, Lee MY, Kim AR, Kim JM, Lee SR, Park HR. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate protection from ischemia/ reperfusion-induced renal injury in normotensive and hypertensive rats. *Transplant Proc.*; 2006 Sep;38(7): 2190-4.
47. Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*; 2006 Sep;67(17): 1849-55.
48. Yang C. S., Landau J. M. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J. Nutr.*; 2000: 130: 2409-2412.
49. Norwood AA, Tan M, May M, Tucci M, Benghuzzi H. Comparison of potential chemotherapeutic agents, 5-fluoruracil, green tea, and thymoquinone on colon cancer cells. *Biomed. Sci. Instrum.*; 2006; 42: 350-6.

50. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch. Intern. Med.*; 1999 Oct 11;159(18): 2170.
51. Bun SS, Bun H, Guedon D, Rosier C, Ollivier E. Effect of green tea extracts on liver functions in Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.*; 2006 Jul;44(7): 1108-13.
52. Buttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant. Proc.*; 2003 Dec;35(8): 3116-20.
53. Buttemeyer R, Philipp AW, Mall JW, Ge B, Scheller FW, Lisdat F. In vivo measurement of oxygen-derived free radicals during reperfusion injury. *Microsurgery*; 2002;22(3):108-13.
54. Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, Milliken CE, Markowitz JS, Campbell C, Haines JK, Schmidt MG, Chavin KD. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/ reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl.*; 2005 Mar;11(3): 298-308.
55. Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 1993 Jun 15;193(2): 722-9.
56. Clough GF, Bennett AR, Church MK. Measurement of nitric oxide concentration in human skin in vivo using dermal microdialysis. *Exp. Physiol.*; 1998 May;83(3): 431-4.
57. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C, Punz A, Mueller M, Afkhampour K, Mittlboeck M, Losert U, Polterauer P, Roth E, Patton S, Malinski T. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/ reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation*; 1997 Jul 15;96(2): 667-75.

58. Büttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant Proc.*; 2003 Dec;35(8): 3116-20.
59. Dobrucki LW, Kalinowski L, Uracz W, Malinski T. The protective role of nitric oxide in the brain ischemia. *J. Physiol. Pharmacol.*; 2000 Dec;51(4 Pt 1): 695-703.
60. Muzaffar S, Jeremy JY, Angelini GD, Stuart-Smith K, Shukla N. Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries Thorax. 2003 Jul;58(7):598-604.
61. Peng PH, Ko ML, Chen CF. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/ reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity. *Exp. Eye. Res.*: 2008 Jan 12.
62. Sutherland BA, Shaw OM, Clarkson AN, Jackson DN, Sammut IA, Appleton I. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate following hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *FASEB J.*; 2005 Feb;19(2): 258-60.
63. Lin YL, Lin JK. Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol. Pharmacol.*; 1997 Sep;52(3).
64. Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets.*; 2007 Jun;7(2):135-44.

65. Bani D, Giannini L, Ciampa A, Masini E, Suzuki Y, Menegazzi M, Nistri S, Suzuki H. Epigallocatechin-3-gallate reduces allergen-induced asthma-like reaction in sensitized guinea pigs . *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 2006 Jun;317(3): 1002-11.
66. Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY . EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta. Pharmacol. Sin.*; 2007 Feb.;28(2): 191-201.
67. Srividhya R, Jyothilakshmi V, Arulmathi K, Senthilkumaran V, Kalaiselvi P. Attenuation of senescence-induced oxidative exacerbations in aged rat brain by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Dev. Neurosci.*; 2008 Apr;26(2) :217-23.
68. Ignatov S, Shishniashvili D, Ge B, Scheller FW, Lisdat F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosens. Bioelectron.*; 2002 Mar;17(3):191-9.
69. Büttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant. Proc.*; 2003 Dec.35(8): 3116-20.
70. Potapovich AI, Kostyuk VA. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry. (Mosc.)*; 2003 May;68(5): 514-9.
71. Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Antioxid. Redox. Signal.*; 2005 Nov-Dec;7(11-12): 1704-14.

72. Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Examination of the anti-oxidative effect in renal tubular cells and apoptosis by oxidative stress. *Urol. Res.*; 2005 Aug;33(4): 261-6.
73. Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp. Physiol.*; 2005 Jul;90(4): 457-62.
74. Gracia-Sancho J, Laviña B, Rodríguez-Vilarrupla A, García-Calderó H, Fernández M, Bosch J, García-Pagán JC. Increased oxidative stress in cirrhotic rat livers: A potential mechanism contributing to reduced nitric oxide bioavailability. *Hepatology*; 2007 Dec.:10.
75. Yang CS, Hong J, Hou Z, Sang S. Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *J. Nutr.*; 2004 Nov;134(11): 3181S.

9. Abkürzungen

EGCG	- Epigallocatechin
EGCG-3-gallat	- Epigallocatechin-3-gallat
O ₂ -	- Superoxid
HX	- Hypoxanthin
XOD	- Xanthinoxidase
NAD +	-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
OH-	-Hydroxylradikal
NADPH	- Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
cGMP	-zyklisches Guanosinmonophosphat
ARDS	- Acute Respiratory Distress Syndrom
SIRS	-Systemic Inflammatory Response Syndrom
KG	- Körpergewicht
Ag	- Silber
AgCl	- Silberchlorid
H ₂ SO ₄	- Schwefelsäure
KNO ₂	- Kaliumnitrit
KI	- Kaliumiodid
NO	- Stickstoffmonoxid
MW	-Mittelwert
SAW	-Standardabweichung
T	-Temperatur in Grad Celcius
Lsg.	-Lösung
PBS-Puffer	-Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
H ₂ O ₂	-Wasserstoffperoxid
kg	-Kilogramm
NFκB	-nuclear factor- kappa B
TNF alpha	-Tumor Nekrose Factor alpha
nNOS	-neuronal nitrit oxid synthase
iNOS	-induzierbare nitrit oxid synthase

eNOS	-endotheliale nitrit oxid synthase
ATP	-Adenosine-Tri-Phosphat
DNA	-DesoxyriboNucleinSäure (Acid)
ONNO-	-Peroxinitrit
n	-Tierversuchsnummer

10. Danksagung

Hiermit danke ich der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie Herrn Chefarzt Professor Dr. med. J. M. Müller, ausdrücklich Herrn Professor Dr. med. R. Büttemeyer, der mir die Möglichkeit zur Promotion gab, mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglichte, jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand und meine Arbeit einer konstruktiven kritischen Diskussion unterzog.

Weiterhin danke ich Herrn Felix Stoffels, damals Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung von Herrn Professor Dr. med. J. M. Müller, ohne dessen Hilfe, Betreuung und Anleitung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. F. Lisdat und Herrn Moritz Beisenhirtz vom Institut für Biochemie und Molekulare Physiologie der Universität Potsdam für ihre engagierte Unterstützung bei der Sensoraufbereitung und Durchführung der Experimente.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Firma WPI Europe in Berlin für die technischen Hilfsmittel zur Durchführung der Experimente.

Ich danke allen Mitarbeitern des Versuchslabors und der Tierställe für ihre Hilfe.

11. Anhang

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Felix Lohöfener, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Einfluss von Epigallocatechin-3-gallat auf NO und O₂- im Ischämie- und Reperfusionsschaden“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Felix Lohöfener

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