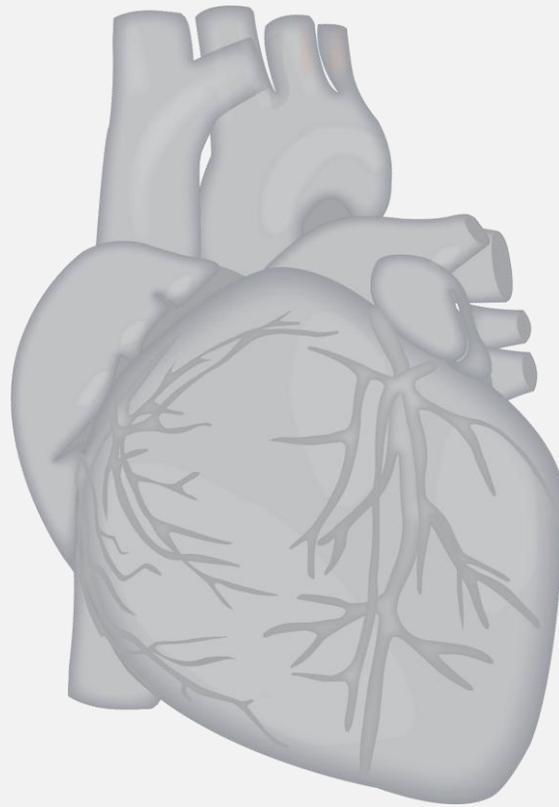


UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS DER PROCYANIDIN-INDUZIERTEN VASORELAXATION AN ISOLIERTEN ARTERIEN VOM SCHWEIN



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie Chemie Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

AURICA-MARIA KAUFELD

aus Hanau

2014

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Herbert Kolodziej und **Herrn Prof. Dr. Heinz Pertz**
am Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie angefertigt.

1. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Kolodziej, Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

2. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Pertz, Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Disputation am: 17.12.2014

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Anregung und Leitung von Prof. Dr. H. Kolodziej und Prof. Dr. H. Pertz vom April 2010 bis zum April 2014 am Institut für Pharmazie der FU Berlin angefertigt. Einige praktischen Arbeiten wurden in einer Kooperation mit dem Robert Koch-Institut, Berlin, durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt gleichermaßen meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. H. Kolodziej und Herrn Prof. Dr. H. Pertz, denen ich für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas herzlich danken möchte.

Beiden danke ich für die hervorragende, wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Kritik und vielen anregenden Diskussionen während meiner gesamten Promotionszeit. Jede Phase dieser Arbeit wurde intensiv und warmherzig von meinen beiden Doktorvätern begleitet.

Herr Prof. Dr. Kolodziej gewährte mir jederzeit außerordentliche, sachkundige und erfahrene Unterstützung. Mit seinem umfassenden Fachwissen half er mir Sachverhalte aus anderen Blickrichtungen zu betrachten und kritisch zu hinterfragen. Ich danke Ihm für sein nicht selbstverständliches persönliches Engagement und die aufgebrauchte Zeit wann immer es nötig war.

Herr. Prof. Dr. H. Pertz danke ich für sein Engagement und seine Einsatzbereitschaft, die er mir, wann immer nötig, entgegenbrachte. Während meinen gesamten Arbeiten war er stets und immerzu ansprechbar und stand mit Rat und Tat zur Seite. Seine langjährige Erfahrung im pharmakologischen Bereich und seine stets beratende und unterstützende Art und Weise halfen mir neue Ideen und Inspirationen zu finden.

Ich danke Dr. Albrecht Kiderlen sowie seinen Mitarbeiterinnen Elke Radam und Ulrike Laube vom Robert Koch-Institut in Berlin, die mir während meiner

dortigen Arbeiten stets als Ansprechpartner und durch Ihre Hilfsbereitschaft bereicherte.

Einen besonderen Dank geht an meinen Arbeitskreis. Mit meinen Kolleginnen Stefanie, Ina, Juliane und Madeleine habe ich interessante, fachlich-aufschlussreiche Gespräche und Diskussionen geführt und auch die ständige Hilfsbereitschaft aller Genannten ist als herausragendes Merkmal zu nennen. Unvergesslich bleibt der Konferenz-Aufenthalt in Antalya, an den ich mich heute noch mit Freude erinnere.

„Ein Freund, ein guter Freund, das ist das Schönste was es gibt auf der Welt“. Ganz nach dem Motto möchte ich besonders meinen Freunden Stefanie, Madeleine, Robert und Joschka für die vielfältige Freizeitgestaltung, Urlaube und deren Herzlichkeit während meiner gesamten Promotion danken. Ich freue mich, fernab von zu Hause, so wichtige, liebevolle und hilfsbereite Freunde an meiner Seite zu haben.

„In Gedanken bin ich immer bei dir“- ohne diese Fürsorge und „grenzenlose Liebe gegen die paar hundert Kilometer“ meines Papas und meiner Mama sowie meiner Geschwister Raimon und Tino, wäre im Leben sehr vieles anders gekommen. Durch dieses warmherzige, tolerante und soziale Miteinander konnte ich mich immerzu frei entfalten und wurde bei allen meinen Tätigkeiten jederzeit und bedingungslos unterstützt, aber nie geformt. Ich danke euch meine liebe Familie!

„Nichts ist besser als mit dir zu überwintern“ lieber Sebastian. Mit deiner Liebe und deinem Rückhalt hast du mich durch die zweite Hälfte meiner Promotion regelrecht getragen. Mit dir an meiner Seite war es ein Leichtes mich auf die praktische Arbeit zu konzentrieren und letztendlich die Disserationsschrift zu Ende zu bringen. „Ich bin froh dass du da bist“.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Polyphenole	2
1.1.1	Flavan-3-ole (Catechine) und Proanthocyanidine	2
1.2	Kardiovaskuläre Erkrankungen	3
1.2.1	Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktion.....	4
1.2.1.1	Oxidierter Form des LDL.....	5
1.2.1.2	Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies.....	5
1.3	Polyphenole und kardiovaskuläre Erkrankungen	7
1.3.1	Antiarteriosklerotische Wirkungsweise von Polyphenolen.....	9
1.4	Aufbau von Blutgefäßen	10
1.4.1	Das Endothel.....	10
1.4.2	Die Glatte Muskelzelle.....	11
1.5	Gefäßregulation	12
1.5.1	NO/cGMP-Signalweg	12
1.5.2	Endothel-vermittelte Hyperpolarisation.....	13
1.5.3	Calcium-Ionen (Ca ²⁺) und Calcium-Rezeptoren	14
1.5.4	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase-B (Akt).....	15
1.6	Einfluss der Polyphenole auf die Endothel-vermittelte Gefäßrelaxation	16
1.7	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	25
2.1	Alphabetische Auflistung der Geräte	25
2.2	Alphabetische Auflistung der Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Alphabetische Auflistung von Chemikalien und Reagenzien	27
2.4	Verwendete polyphenolische Testsubstanzen	30
2.5	Experimente an isolierten Koronararterien des Schweins (Organbadstudien)	31
2.5.1	Organe und Organpräparation	31
2.5.2	Verwendete Puffer	32
2.5.2.1	Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHS).....	32
2.5.3	Polyphenolische Testsubstanzen.....	32
2.5.4	Reagenzien	33
2.5.5	Apparatur	33
2.5.6	Versuchsdurchführung	34
2.5.6.1	Stabilisierungsphase	34

2.5.6.2	Äquilibrierungsphase 1	34
2.5.6.3	Äquilibrierungsphase 2	34
2.5.7	Prüfphase.....	35
2.5.8	Auswertung.....	35
2.6	Lipoprotein Inkubations Assay	36
2.6.1	Pufferlösungen.....	36
2.6.1.1	Inkubationsmedium.....	36
2.6.2	Organpräparation, Reagenzien und Testsubstanzen	36
2.6.3	Versuchsdurchführung	37
2.6.4	Prüfphase.....	37
2.6.5	Auswertung.....	37
2.7	Zellkultur.....	38
2.7.1	Zellen, Puffer und Kulturmedien.....	38
2.7.1.1	Wasser (H ₂ O).....	38
2.7.1.2	HUVEC-Kultivierungsmedium.....	38
2.7.1.3	Kultivierungsmedium während der Inkubation mit polyphenolischen Testsubstanzen.....	38
2.7.1.4	Phosphate Buffered Saline (PBS).....	39
2.7.1.5	Kryokonservier-Medium.....	39
2.7.1.6	Kultivierung von HUVECs	39
2.7.1.7	Auftauen von in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zellen.....	40
2.7.1.8	Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff	41
2.7.1.9	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer und Vitalitäts- prüfung mit Trypanblau-Lösung.....	41
2.8	Immunoblotting (Western-Blot).....	42
2.8.1	Pufferlösungen.....	42
2.8.1.1	Zellyse-Puffer.....	42
2.8.1.2	Detergenzienpuffer	42
2.8.1.3	Gelelektrophorese- Laufpuffer	42
2.8.1.4	Elektrophoresetransferpuffer	43
2.8.1.5	Andere Puffersysteme	43
2.8.1.6	Färbungen.....	44
2.8.2	Testsubstanzen und Inhibitoren.....	44
2.8.3	Probenherstellung	44
2.8.4	Proteinquantifizierung mittels BCA-Methode	45
2.8.5	Auftrennung und Detektion der Proteine	46

2.8.5.1	SDS-PAGE	46
2.8.5.2	Äquilibrierungsphase	46
2.8.5.3	Semi-dry Blotting	46
2.8.5.4	Blocken der Membran.....	47
2.8.5.5	Erst-Antikörper.....	47
2.8.5.6	Zweit-Antikörper und Blot-Detektion	47
2.8.5.7	Auswertung.....	48
2.9	Intrazelluläre ROS-Bestimmung.....	48
2.9.1	Testsubstanzen und Reagenzien	48
2.9.2	Versuchsdurchführung	49
2.9.3	Auswertung.....	49
2.10	MTT-Assay	50
2.10.1	Testsubstanzen und Reagenzien	50
2.10.2	Versuchsdurchführung	50
2.10.3	Auswertung.....	51
2.11	Xanthinoxidase-Assay	51
2.11.1	Testsubstanzen und Reagenzien	51
2.11.2	Versuchsdurchführung	52
2.11.3	Auswertung.....	53
2.12	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-(DPPH-) Assay.....	53
2.12.1	Testsubstanzen.....	53
2.12.2	Reagenzien	53
2.12.3	Versuchsdurchführung	54
2.12.4	Auswertung.....	54
2.13	Bestimmung des NO-Radikalfängerpotentials mittels Griess-Assay.....	55
2.13.1	Testsubstanzen und Reagenzien	55
2.13.2	Versuchsdurchführung	56
2.13.3	Auswertung.....	56
2.14	Statistik	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Inhibitionsstudien zur Untersuchung des relaxierenden Potentials der polyphenolischen Extrakte und Fraktionen.....	59
3.1.1	Dilatierende Effekte der Polyphenole	59
3.1.2	Endothelabhängigkeit.....	61
3.1.3	NO/cGMP-Signalweg	62

3.1.4	Kalium-Kanäle.....	64
3.1.4.1	ATP-sensitive Kalium-Kanäle (K_{ATP}) und Spannungs-abhängige Kalium-Kanäle (K_v).....	65
3.1.4.2	Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K_{Ca}) der glatten Muskelzelle.....	65
3.1.4.3	Calcium-abhängige Kalium (K_{Ca})-Kanäle (EDHF)	66
3.1.4.4	Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K_{Ca}) und eNOS.....	68
3.1.5	Gap-Junctions.....	69
3.1.6	Proteinkinasen	69
3.1.6.1	Proteinkinase-B (Akt).....	70
3.1.6.2	MAP-Kinase	71
3.1.6.3	VEGF-Rezeptor	72
3.1.6.1	Src-Tyrosinkinase	73
3.1.7	Gi-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	74
3.1.8	Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS).....	74
3.1.8.1	Xanthin- und NADPH-Oxidase	75
3.1.9	Estrogenrezeptor	78
3.1.10	Phosphodiesterase-3	78
3.1.11	mTOR.....	79
3.1.12	Beteiligung von Ca^{2+}	80
3.1.12.1	SOCCs und IP_3 -Rezeptoren.....	80
3.1.12.2	Ryanodin-Rezeptor und SERCA	82
3.2	Inhibitionsversuche an Arterien mit einem Lumen $\leq 0,5$ mm	83
3.2.1	Relaxation durch <i>Salix</i> -Procyanidine.....	83
3.2.2	NO/cGMP-Signalweg	84
3.2.3	Calcium-abhängige Kalium (K_{Ca})-Kanäle (EDHF) und eNOS.....	85
3.2.4	Gap-Junctions.....	86
3.2.5	Beteiligung von Ca^{2+}	87
3.2.5.1	SOCCs und IP_3 -Rezeptoren.....	87
3.2.5.2	SERCA.....	87
3.2.6	Proteinkinase B (Akt).....	88
3.3	Inhibitionsversuche an Koronararterien nach Endothel-Entfernung.....	89
3.3.1	Relaxierende Effekte von <i>Salix</i> -Procyanidinen	89
3.3.1.1	β_2 -Adrenorezeptoren	90
3.3.1.2	Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS).....	91
3.3.1.3	Gap-Junctions.....	92

3.3.1.4	Spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K _v)	93
3.3.1.5	SOCCs- und IP ₃ -Rezeptoren	94
3.4	Zytotoxizitäts-Assay (MTT-Assay)	94
3.4.1	Prinzip.....	94
3.4.2	Resultat	95
3.5	Intrazelluläre ROS-Bestimmung.....	96
3.5.1	Prinzip.....	96
3.5.2	Resultate	97
3.6	Proteinexpression mittels Western-Blot Verfahren.....	98
3.6.1	Prinzip.....	98
3.6.2	Resultate: p-Akt-Expressionslevel in Anwesenheit der Procyanidine	100
3.6.3	Resultate: p-eNOS-Expressionslevel in Anwesenheit der Procyanidine	103
3.7	Lipoprotein-Inkubations-Assay	106
3.7.1	Prinzip.....	106
3.7.2	Resultate	106
3.8	Assays zur Überprüfung der antioxidativen Eigenschaften der Procyanidin-angereicherten Extrakte.....	109
3.8.1	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)-Assay	109
3.8.1.1	Prinzip.....	109
3.8.1.2	Resultat	110
3.8.2	Griess-Assay.....	111
3.8.2.1	Prinzip.....	111
3.8.2.2	Resultate	112
3.8.3	Xanthinoxidase-Assay	115
3.8.3.1	Prinzip.....	115
3.8.3.2	Resultat	116
4	Diskussion	119
4.1	Konzentrationsabhängigkeit der relaxierenden Effekte der polyphenolischen Testsubstanzen	121
4.2	Endothelabhängigkeit und Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges.....	123
4.3	Einfluss der Kalium-Kanäle.....	126
4.3.1	Einfluss von EDHF	127
4.4	Beteiligung von Redox-sensitive Proteinkinasen	130
4.5	Einfluss von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)	133
4.6	Einfluss von Calcium-Ionen.....	136

4.7	Beteiligung der Phosphodiesterase-3	141
4.8	Beteiligung des Estrogenrezeptors.....	142
4.9	Einfluss von G _i -Protein-Rezeptoren	142
4.10	Relaxierenden Effekte von 2,3- <i>trans</i> Procyanidinen an Arterien mit entferntem Endothel	143
4.10.1	Rezeptoren der glatten Muskelzelle	145
4.10.2	Bedeutung der SOCCs und der Kv-Kanäle	145
4.10.3	ROS.....	145
4.11	Antioxidative Eigenschaften der eingesetzten Polyphenole	146
4.12	OxLDL-Inkubationsassay	149
4.13	MTT-Assay	151
4.14	Fazit und Ausblick.....	152
5	Zusammenfassung	153
6	Summary	157
7	Literaturverzeichnis	161
8	Abbildungsverzeichnis	171
9	Publikationsverzeichnis	173
9.1	Originalarbeiten	173
9.2	Poster	173
9.3	Vorträge.....	173
10	Selbstständigkeitserklärung.....	174

Abkürzungsverzeichnis

A	2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat	
	Akt	Proteinkinase-B	
	Allo	Allopurinol	
	Apa	Apamin	
	Apo	Apocynin	
B	BCA	Bicinchoninsäure	
	BK	„large/big conductance“ Kalium-Kanal	
C	BSA	Bovines Serumalbumin	
	C	Catechin	
	[Ca ²⁺] _i	Freie, intrazelluläre Calcium-Konzentration	
	Ca ²⁺	Calcium-Ionen	
	CaM	Calmodulin	
	cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	
	CRAC	Calcium release activated channel	
	CTX	Carybdotoxin	
	Cu ⁺ /Cu ²⁺	Kupfer-Ionen	
	Cyp450	Cytochrom P 450	
	D	DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
		DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat
		DETCA	Diethyldithiocarbamat
		DMSO	Dimethylsulfoxid
		DPPH	Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT		Dithiothreitol	
E		EC	Epicatechin
		EDHF	„endothelium-derived hyperpolarization factor“
	EDRF	„endothelium-derived relaxing factor“	
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
	EET	Epoxyeicosatriensäuren	
	EGCG	Epigallocatechingallat	
	eNOS	Endotheliale NO-Synthase	
	ER	Endoplasmatisches Retikulum	
	ERK	„extracellular-signal regulated kinase“	
	F	FCS	Fetales Kälberserum
H	¹ H-NMR	¹ H Kernmagnetresonanz-Spektroskopie	
	H ₂ O	Wasser	
	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
	HDL	„high density“ Lipoprotein	
	HRP	Meerrettichperoxidase	
	HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen	
I	i.D.	Innendurchmesser	
	IbTX	Iberiotoxin	
	IK	„intermediate conductance“ Kalium-Kanal	

K	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat	
	K _{ATP}	ATP-sensitive Kalium-Kanäle	
	K _{Ca}	Calcium-abhängige Kalium-Kanäle	
	KCl	Kaliumchlorid	
	KH ₂ HPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	
	KH ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Kaliumdihydrogenphosphat Dihydrat	
	KHK	koronare Herzerkrankung	
	KHS	Krebs-Henseleit-Puffer	
	K _{tr}	Kontrolle	
	K _{IR}	„inward-rectifier“ Kalium-Kanäle	
	L	LDL	„Low Density“ Lipoprotein
		L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginin-methylester
		L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginin
		LOX	Lipoxygenase
LPS		Lipopolysaccharid	
M	MAP	Mitogen-aktiviertes Protein	
	Mg ²⁺	Magnesium-Ionen	
	MnTMPyP	Mangan(III)-tetrakis-(1-methyl-4-pyridyl)-porphyrin	
	mTOR	Zielprotein des Rapamycins im Säugetier	
	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	
N	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase	
	NAC	N-Acetylcystein	
	NaCl	Natriumchlorid	
	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	
	NaH ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	
	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid	
	NfκB	“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“	
	NO	Stickstoffmonoxid	
	NOS	NO-Synthase	
	NOX	NADPH-Oxidase	
	NYHA	New York Heart Association	
	O	O ₂	Sauerstoff
		O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
		ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]Oxadiazol-[4,3- <i>a</i>]chinoxalin-1-on
ONOO ⁻		Peroxynitrit-Anion	
oxLDL		Oxidiertes low density Lipoprotein	
P		PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
	p-Akt	Phosphorylierte Proteinkinase B	
	PBS	„phosphate buffered saline“	
	PDE	Phosphodiesterase	
	PEG	Polyethylenglycol	
	p-eNOS	Phosphorylierte endotheliale NO-Synthase	
	PGI ₂	Prostaglandin I ₂	
	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	

R	PLA ₂	Phospholipase A ₂	
	PTX	Pertussis Toxin	
	RNS	Reaktive Stickstoff Spezies	
	ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies	
	RT	Raumtemperatur	
S	RWPC	Phenolische Komponenten des Rotweins	
	SDS	Natriumdodecylsulfat	
	SERCA	Sarcoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Calcium-ATPase	
	sGC	Lösliche Guanylylcyclase	
	sGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat	
	SK	„small conductance“ Kalium-Kanal	
	SNP	Nitroprussid-Natrium	
	SOCC	Speicher-aktivierender Calcium-Kanal	
	SOCE	„store-operated calcium entry“	
	SOD	Superoxid-Dismutase	
	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum	
	Src-Kinase	Sarcoma Kinase	
	T	TBS	„Tris buffered saline“
		TEA	Tetramethylammoniumchlorid
		TRAM	1-[(2-Chlorphenyl)diphenylmethyl]-1 <i>H</i> -pyrazol
Tris-HCl		Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid	
TRP-Kanal		„transient receptor potential channel“	
V	VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	
X	XO	Xanthinoxidase	

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Polyphenole

Polyphenole sind ubiquitär vorkommende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Zu ihnen gehören Phenolsäuren, Lignane, Stilbene, Flavonoide und Gerbstoffe (Manach et al., 2004). Letztere beinhalten zwei große Gruppen, die Gallotannine und die Catechingerbstoffe. Innerhalb der Catechingerbstoffe dominieren die Proanthocyanidine.

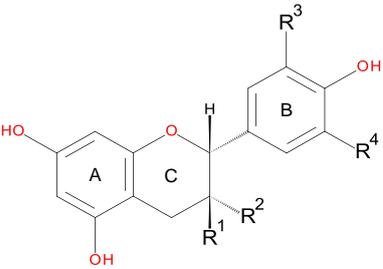
Das heterozyklische Ringsystem der Polyphenole besteht aus einer Oxidationsform des Flavans (Herrmann, 1991), welche in unterschiedlicher Weise mit weiteren Grundkörpern kondensiert sein kann und mindestens zwei phenolische Hydroxygruppen am Molekül trägt. Polyphenole sind in der Natur weit verbreitet und zumeist in hohen Mengen in Gemüse, Getreide und Obst nachweisbar. Sie geben der Pflanze einen charakteristischen Geruch, Geschmack und ihre Farbe. Des Weiteren dienen sie als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde, Bakterien, Viren und andere Schädlinge und bieten Schutz gegenüber schädlicher UV-B Strahlung (Harborne und Williams, 2000).

1.1.1 Flavan-3-ole (Catechine) und Proanthocyanidine

Flavan-3-ole sind monomere Bausteine der Proanthocyanidine und unterscheiden sich in ihrem Hydroxylierungsmuster des B-Ringes. Die Strukturvielfalt ergibt sich aus den Konfigurationsunterschieden und dem variierenden Verknüpfungsmuster der Bausteine. Eine exemplarische Auflistung zeigt Tab. 1.1-1. Proanthocyanidine sind Dimere, Oligomere oder Polymere der Flavan-3-ole, die durch chemische oder enzymatische Kondensationsreaktionen der Pflanze entstanden sind. Sie weisen aufgrund ihrer Verschiedenheit der Komponenten und Verknüpfungsmöglichkeiten eine große Vielfalt in der Natur auf (Harborne und Williams, 2000; Manach et al., 2004). Reine Catechin/Epicatechin-Kondensate

bezeichnet man als Procyanidine. Prodelphinidine sind reine Gallocatechin/Epigallocatechin-Kondensate (Harborne und Williams, 2000).

Tab. 1.1-1 Relevante Flavan-3-ole und deren Konfigurationsmuster

	Flavan-3-ol	Konfiguration	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
	Catechin	2R, 3S	OH	H	OH	H
	Epicatechin	2R, 3R	H	OH	OH	H
	Gallocatechin	2R, 3S	OH	H	OH	OH
	Epigallocatechin	2R, 3R	H	OH	OH	OH
	Epicatechin-3-O-gallat (ECG)	2R, 3R	H	O-G	OH	H
	Epigallocatechin-gallat (EGCG)	2R, 3R	H	O-G	OH	OH

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen umfassen eine Reihe von Funktionsstörungen des Gefäßsystems und/oder des Herzens und gehören heute neben Krebserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben 2008 rund 17,3 Millionen Menschen in Folge von kardiovaskulären Erkrankungen. Dies entspricht rund 30 % aller Todesursachen weltweit. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen die periphere, arterielle Verschlusskrankheit, die koronare Herzerkrankung (KHK), der akute Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz, der plötzliche Herztod und der Schlaganfall. Allein 7,3 Millionen Todesfälle werden der KHK zugeschrieben. Unter KHK wird die Manifestation einer Arteriosklerose an den Koronararterien mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust sowie Lumeneinengung verstanden (Mörl et al., 1998). Sie ist eine chronische Erkrankung, deren Fortschreiten durch Verminderung von Risikofaktoren, wie zum Beispiel der Umstellung der Lebens- und Essgewohnheiten und/oder durch medikamentöse Therapie verlangsamt oder gestoppt werden kann. Zu den wesentlichen

kardiovaskulären Risikofaktoren zählen die Hyperlipoproteinämie (Hokanson und Austin, 1996; Howard et al., 2000; Sharrett et al., 2001), gefolgt von Diabetes mellitus (Kannel und McGee, 1979; Sowers et al., 2001), Hypertonie (Sowers et al., 2001), Übergewicht, Hyperurikämie, Nikotinabusus (Benowitz, 1997), erblichen Faktoren, Alter und Geschlecht sowie unausgewogene Ernährung. In einer *in vivo*-Studie (PROCAM-Studie) konnte nachgewiesen werden, dass eine Kumulation von Risikofaktoren einen multiplikativen Effekt auf die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen hatte (Assmann et al., 1996).

1.2.1 Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktion

Der Begriff der Arteriosklerose wurde 1833 von dem Straßburger Pathologen Lobstein geprägt. Die Arteriosklerose ist die häufigste systemische, entzündliche Erkrankung, die die Intima großer bis mittelgroßer Arterien betrifft (Lemmer und Brune, 2010). In den Industrieländern stellt sie die Haupttodesursache dar. Zu Beginn des Auftretens einer Arteriosklerose steht die endotheliale Dysfunktion. Darunter werden eine allgemeine Funktionsstörung oder Schädigung bzw. Läsionen des Endothels verstanden. Durch eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation an der freigelegten subendothelialen Basalmembran kommt es zur Freisetzung von Thromboxan A₂ und verschiedenen Wachstumsfaktoren, welche zur Stimulation der glatten Muskelzellproliferation führen. Durch Infiltration von Plasmabestandteilen, z.B. Lipoproteinen, in die Intima wird eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. Bei anhaltender Entzündung erfolgt eine Akkumulation von Makrophagen sowie deren Umwandlung zu Schaumzellen durch die Aufnahme von oxidiertem Low Density Lipoproteinen (oxLDL). Dies führt zu fibrösen Plaques und somit zur Initiation und Progression der Arteriosklerose (Goldstein und Brown, 1987). Die Ausbildung einer stabilen Plaquestruktur, die im Zuge der Proliferation zur Gefäßblutung gefördert wird, führt letztendlich zu einem akuten thrombotischen Gefäßverschluss (Munro und Cotran, 1988; Mabuchi et al., 1989; Meyne, 2003). Neben den genannten Risikofaktoren fördert die chronische

Inflammation die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Dauerhaft erhöhte Cholesterol- und LDL-Plasmaspiegel, mit einem gleichzeitig erniedrigten High Density Lipoprotein (HDL)-Plasmaspiegel stellen einen zusätzlichen potenten Risikofaktor für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose dar (Holvoet et al., 2004; von Birgelen et al., 2004). Ferner begünstigt oxidativer Stress die Entzündung (Cai und Harrison, 2000; Félétou und Vanhoutte, 2006). Hierbei fördern intrazelluläre reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) die Oxidation von infiltrierten Lipoproteinen (Madamanchi et al., 2005). Hinweise hierzu liefert eine klinische Studie, deren Patientenkollektiv neben den Risikofaktoren und einer manifestierten Arteriosklerose eine erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentration aufwies (Touyz, 2004).

1.2.1.1 Oxidierte Form des LDL

Die Oxidation des LDLs stellt ein Schlüsselereignis in der Entstehung der Arteriosklerose dar (Hulthe und Fagerberg, 2002; Holvoet et al., 2003). Diskutiert werden unterschiedliche Ansatzpunkte über dessen schädigende Wirkung. Der wahrscheinlich entscheidende Effekt ist die verstärkte Makrophagen-Adhäsion an der Gefäßintima, welche, wie bereits beschrieben, zur Plaque-Entstehung und infolgedessen zur Entzündung mit abnormaler NfκB-Aktivierung beiträgt. Zusätzlich kommt es durch den oxLDL-Überschuss zu einer verminderten Transkription bzw. Verstärkung des eNOS-Abbaus und daraus resultierend zur mangelhaften NO-Produktion (Förstermann et al., 1998). Im Zuge dieses pathogenen Ungleichgewichtes werden die Thrombozytenaggregation und viele weitere Prozesse begünstigt. Auch die Proliferation und Migration der glatten Muskelzelle wird mit dem Überangebot von oxLDL in Verbindung gebracht (Ignarro et al., 1999).

1.2.1.2 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Unter oxidativen Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien. Eine Verschiebung zugunsten der

Erstgenannten führt zu einer potentiellen Schädigung des Organismus (Sies und Cadenas, 1985; Sies, 1997). ROS sind eine heterogene Gruppe aus radikalischen und nicht radikalischen Formen des Sauerstoffes (Wiseman und Halliwell, 1996; Siems, 2005). Abgesehen davon existieren Verbindungen mit Stickstoff (Reaktive Stickstoff Spezies; RNS), wie das Stickstoffmonoxid oder das Peroxynitrit (Cai und Harrison, 2000) (Tab. 1.2-1). Eine übermäßige ROS-Anhäufung korreliert stark mit dem Auftreten von Arteriosklerose, Krebserkrankungen und inflammatorischen Prozessen. Oftmals ist dies auf eine oxidative Schädigung der DNA von zellulären Strukturen wie Lipiden oder Proteinen zurückzuführen (Klotz, 2002). Aber auch neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schlaganfall oder Morbus Alzheimer, zählen dazu (Klotz, 2002).

Tab. 1.2-1 Einige relevante ROS und RNS

Reaktive Sauerstoff Spezies/ Reaktive Stickstoff Spezies			
Radikal		Nichtradikal	
Namen	Summenformel	Namen	Summenformel
Superoxid-Anion	O_2^-	Wasserstoff-Peroxid	H_2O_2
Hydroxyl-Radikal	OH^\cdot	Ozon	O_3
Hydroperoxyl-Radikal	HOO^\cdot	Peroxynitrit-Anion	$ONOO^-$
Peroxyl-Radikal	ROO^\cdot	Stickstoffmonoxid	NO

Das im Organismus primär generierte Radikal ist das Superoxid-Anion (O_2^-). Etwa 1 - 3 % des Sauerstoffumsatzes der Atmungskette wird zu O_2^- . Neben Oxidasen wie der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase), Cyclooxygenase, Cytochrom P450 oder der Xanthinoxidase sind Autooxidations-Reaktionen wie die von Catecholaminen, Hämproteinen oder Glutathion zusätzliche endogene O_2^- -Quellen (Misra und Fridovich, 1972; Misra, 1974; Chance et al., 1979). Bei einem Mangel an L-Arginin oder β -Hydroxycarbonsäure (BHA) ist auch die eNOS befähigt, O_2^- und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umzusetzen

(Vásquez-Vivar et al., 1998; Cai und Harrison, 2000) (Abb. 1-1). ROS sind daher natürlich auftretende Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels aller Lebewesen. Im physiologischen Zustand wandelt die Superoxid-Dismutase (SOD) mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit O_2^- in H_2O_2 und Sauerstoff (O_2) um. Ferner ist die Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) durch eine Reaktion von O_2^- mit NO-Molekülen möglich (Beckman et al., 1990; Turrens, 1997) (Abb. 1-1). Physiologische ROS/RNS-Spiegel dienen der Zelle zur Pathogenabwehr (Klotz, 2002).

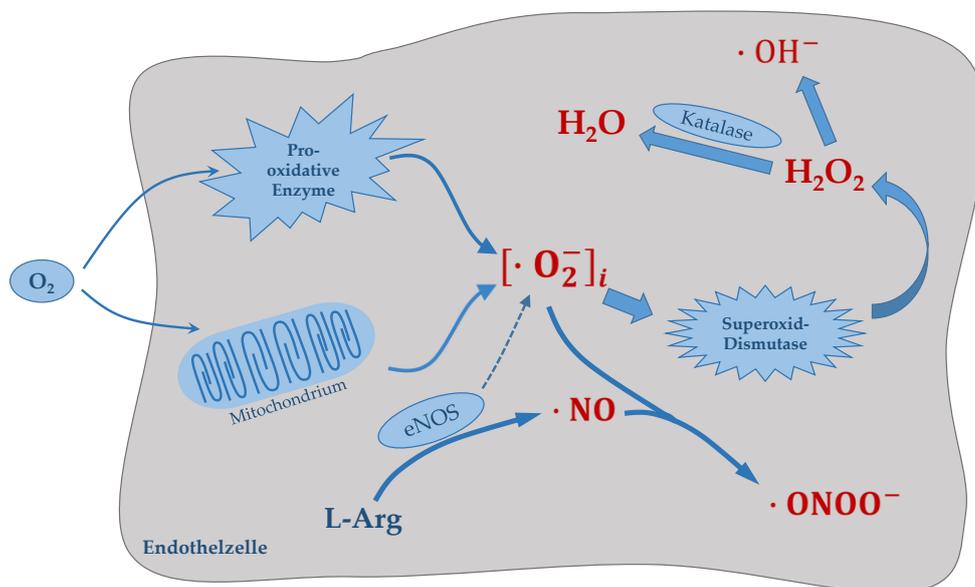


Abb. 1-1: Vereinfachtes Schema der O_2^- -Generierung

1.3 Polyphenole und kardiovaskuläre Erkrankungen

In den letzten Jahrzehnten bewiesen zahlreiche epidemiologische Studien eine Korrelation zwischen regelmäßigem Konsum von polyphenolhaltigen Nahrungsmitteln und dem verminderten Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfällen zu erkranken. Dies wird in Verbindung mit gemüse- und obstreicher Ernährung sowie durch Zufuhr von grünen Tee oder moderater Mengen an Rotwein gebracht (Hertog et al., 1993; Arts et al., 2001; He et al., 2007; Alexopoulos et al., 2008). Bereits Ende der 1980er Jahre kam die

Hypothese einer Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren durch dauerhaften Rotweinkonsum und darin enthaltenen Procyanidinen auf. Im Zuge dessen wurde der Begriff „French Paradox“ geprägt: Trotz fettreicher Ernährung trat in Frankreich eine deutlich geringere KHK-Mortalität auf als in anderen europäischen Ländern (Richard, 1987; Renaud und de Lorgeril, 1992; Frankel et al., 1993). Sukzessiv folgten weitere epidemiologische Studien, die die präventiven Eigenschaften der Polyphenole unterstützten (Arts und Hollman, 2005). So zeigten Hertog et al. in einer interkulturellen Korrelationsstudie, dass in einem Großteil der überprüften Länder die Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Ereignisse auf Grund von Flavonoid-reicher Ernährung gesenkt werden konnte (Hertog et al., 1995). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam Sesso et al. in einer randomisierten, prospektiven Studie mit über 39 000 weiblichen US-Bürgern (Women's Health Study), mit deren Hilfe eine negative Korrelation zwischen Flavonoidzufuhr und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden konnte (Sesso et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigte eine an Männern durchgeführte Kohortenstudie keine Korrelation (Rimm et al., 1996). Darüber hinaus wurde sogar ein Zusammenhang zwischen Tee-Konsum und der Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse aufgezeigt (Hertog et al., 1997; Ross und Kasum, 2002). Eine Problematik des Studiendesigns stellt sicherlich die Kontrolle von möglichen Störfaktoren dar. Beispielsweise der Vergleich von unterschiedlichen Populationen, in Bezug auf Ernährung und Lebensweise (Ross und Kasum, 2002). Daher ist verständlich, dass nach heutigem Kenntnisstand eine präventive Wirkung durch Polyphenole bei Herz-Kreislauferkrankungen sowie Schlaganfällen noch nicht eindeutig belegt ist. Eine Mehrzahl an epidemiologischen Langzeitstudien lassen jedoch Rückschlüsse über eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens von koronaren Ereignissen und einer stetigen Polyphenol- bzw. Flavonoidaufnahme ziehen (Hertog et al., 1993; Arts et al., 2001; Geleijnse et al., 2002; Arts und Hollman, 2005; He et al., 2007; Mink et al., 2007).

1.3.1 Antiarteriosklerotische Wirkungsweise von Polyphenolen

In der Literatur werden die gesundheitsfördernden Eigenschaften und biologischen Effekte der Polyphenole im kardiovaskulären Bereich vielseitig beschrieben. Diese umfassen eine vasoprotektive, antiarteriosklerotische, antiinflammatorische und vasodilatorische Wirkungsweise oder zeigen präventive und inhibitorische Effekte in Bezug auf LDL-Oxidation, Lipidperoxidation, Thrombozytenaggregation, Monozytenadhäsion sowie Zellmigration und -Proliferation (Cook und Samman, 1996; Rice-Evans et al., 1996; Zern und Fernandez, 2005; Kaliora et al., 2006; Schini-Kerth et al., 2011). Diese und weitere präventive Effekte werden hauptsächlich den antioxidativen bzw. Radikalfänger-Eigenschaften der Polyphenole zugeschrieben.

Antioxidative Effekte und Radikalfänger-Eigenschaften: Infolge komplexer, unklarer und heterogener Zusammensetzung von Polyphenolen in Nahrungsmitteln ist es unmöglich, detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzuzeigen. Die möglichen Radikalfängereigenschaften werden durch Interaktion mit O_2 und anderen Radikalen vermutet (Van Acker et al., 1996; Bors und Michel, 2002). Aufgrund der Hydroxygruppen des aromatischen Ringsystems weisen Polyphenole reduzierende Eigenschaften auf, die möglicherweise radikalische Kettenreaktionen unterbrechen können. Ein denkbares Zwischenprodukt stellt hierbei das Phenoxyradikal dar. Die Stabilität dieses delokalisierbaren Radikals nimmt durch ortho-ständige Hydroxygruppen am B-Ring des flavanolischen Grundkörpers zu. Zahlreiche *in vitro*-Studien bringen das Radikalfänger-Potential der Polyphenole in einen engen Zusammenhang mit einer verminderten LDL-Oxidation (Rice-Evans et al., 1996; Tijburg et al., 1997; Kaliora et al., 2006). Obwohl verschiedenartige *in vitro*-Untersuchungen eine allgemeine antioxidative Wirkung nachweisen konnten, ergeben sich *in vivo* erhebliche Zweifel hinsichtlich des Auftretens dieser Effekte (Nijveldt et al., 2001; Fraga, 2007).

Hemmung prooxidativer Enzyme und Transportsysteme: In vivo könnte eine direkte Hemmung von prooxidativen Enzymen oder Transportsystemen der antioxidativen Kapazität von polyphenolischen Verbindungen überlegen sein (Nijveldt et al., 2001). Literaturquellen geben unterschiedliche Nachweise für die Wechselwirkung und/oder Hemmung der Superoxid-Dismutase (Kostyuk et al., 2004), der Xanthinoxidase (Kandaswami und Middleton Jr, 1994; Cotelle et al., 1996; Selloum et al., 2001), der Gluthation-Reduktase (Elliott et al., 1992; Sies et al., 2005), der Lipoxygenase (Sadik et al., 2003) sowie der NADPH-Oxidase an (Steffen et al., 2007; Schewe et al., 2008; Steffen et al., 2008). Ferner wird eine LOX-1-Rezeptor-Inhibition verbunden mit verminderter intrazellulärer oxLDL-Aufnahme postuliert (Ou et al., 2010; Nishizuka et al., 2011).

1.4 Aufbau von Blutgefäßen

Die Intima, Media und Adventitia bilden die drei Schichten einer Gefäßwand. Die innerste Schicht, die Intima, besteht aus Endothelzellen und gewährleistet neben dem transzellulären Stofftransport auch eine Barrierefunktion zwischen Blut und Gewebe. Die glatten Muskelzellen, die zur Gefäßkontraktion und -dilatation dienen, bilden die Media. Die nach außen abgrenzende Adventitia besteht hauptsächlich aus Bindegewebe, Gefäßnerven und kleinsten Blutgefäßen zur Versorgung der Gefäßwand.

1.4.1 Das Endothel

In verschiedenen Blutgefäßen (Arterien, Venen und Kapillaren) stellt das Endothel den größten Anteil der Intima dar und ist das Bindeglied zwischen Blutkompartiment und der glatten Muskulatur. Das Endothel ist ein hochdifferenziertes und ubiquitär im Organismus vorkommendes, endokrines Organ (Busse et al., 1993). Funktionell hat es die Aufgabe der Regulation des Gefäßtonus (Guerra Jr et al., 1989), der Kontrolle des Gerinnungssystems

(Gelehrter und Sznycer-Laszuk, 1986; Radomski et al., 1987), des Wachstums und der Kontraktilität der glatten Muskulatur (Peiro et al., 1995) sowie der Beteiligung an der Immunantwort (Harlan, 1987). Endothelzellen sind eine Sonderform des Epithels und dienen als Monolayer u.a. als semipermeable Barriere zwischen Gewebe und Blut und regulieren dadurch den Stoffaustausch (Kaiser und Sparks, 1987; Garg und Hassid, 1989; Lüllmann-Rauch, 2008). Die langgestreckten, flachen Zellen sind immer parallel zur Längsachse des Gefäßes ausgerichtet und rund 50 - 70 μm lang, 10 - 30 μm breit und 0,1 - 10 μm dick (Félétou, 2011). Unter physiologischen Bedingungen bildet die Endothelzelle sogenannte Autakoide, welche vasoaktive Substanzen sind, die bei der Blutdruckregulation eine Rolle spielen. Beispiele hierfür sind: Acetylcholin, Bradykinin, Substanz P, NO, EDHF, Prostacyclin, Histamin, Thromboxan A₂, Fettsäuren, Angiotensin II, Vasopressin, Endothelin-1 und andere Prostaglandine (Busse et al., 1985; Brandes et al., 2005; Kotsovolis und Kallaras, 2010).

1.4.2 Die Glatte Muskelzelle

Die glatte Muskulatur besteht aus dünnen Muskelzellen, in denen Aktin- und Myosinfilamente zu Sarkomeren angeordnet sind. In Arterienwänden hat eine einzelne, spindelförmige, glatte Muskelzelle einen Durchmesser von 5 - 8 μm und eine Länge von 20 μm (Lüllmann-Rauch, 2008). Die glatte Muskulatur ist ubiquitär im Organismus verteilt. Exemplarisch kann das Herz-Kreislaufsystem, der Uterus oder der Magen-Darm-Trakt genannt werden. Durch interzelluläre Kanäle, wie den Gap-Junctions, können Ionenströme und Botenstoffe von Zelle zu Zelle weitergegeben werden (Huppelsberg, 2005). Im Herz-Kreislaufsystem wird der glatte Muskelzelltonus über endothelial-freigesetzte Substanzen reguliert. Im Herzen selbst bilden das Endothel und die glatte Muskulatur den Hauptteil des Endokards (Lüllmann-Rauch, 2008).

1.5 Gefäßregulation

1.5.1 NO/cGMP-Signalweg

Bereits 1980 erkannten Furchgott und Zawadzki die obligatorische Rolle des Endothels in Bezug auf die dilatorische Wirkung von Acetylcholin (Furchgott und Zawadzki, 1980). Der vom Endothel gebildete Faktor, des bis dato noch ungeklärten Signalweges, wurde als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet (Furchgott et al., 1984) und 1987 als NO identifiziert (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

Alle NO-generierenden Enzyme (NO-Synthasen; NOS) wandeln durch oxidative Spaltung L-Arginin in L-Citrullin unter Entstehung von NO um (Palmer et al., 1988). Im menschlichen Organismus existieren neben der endothelialen NOS (eNOS) zwei weitere Isoformen: die induzierbare NOS und die neuronale NOS (Piazza et al., 2012). Grundsätzlich wird die eNOS über Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) oder dessen phosphorylierte Form reguliert (Bredt und Snyder, 1994). Die Aktivierung kann beispielsweise durch Scherbeanspruchung, PI3K/Akt-Aktivierung, Hormone, lokale Autakoide oder durch Erhöhung der freien, intrazellulären Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) erfolgen (Busse und Fleming, 1995; Dimmeler et al., 1999; Fleming und Busse, 1999; Fulton et al., 1999; Mombouli und Vanhoutte, 1999). 1989 erkannten Rees und Palmer die Bedeutung des NOs in Bezug auf seine physiologische, endothelabhängige Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem. Mittels des eNOS-Inhibitors N^G -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) konnte die oxidative Spaltung des L-Arginins verhindert werden. *In vivo* führte dies auf Grund des NO-Mangels zur langanhaltenden Vasokonstriktion (Rees et al., 1989). Das im Gefäßendothel gebildete NO diffundiert in die glatte Muskelzelle und aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC). Dabei wird Guanosin triphosphat in den Second Messenger cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt, über dessen Proteinkinase G-Bildung es zur Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und folglich

zu einer Dilatation der glatten Muskelzelle kommt (Alderton et al., 2001). Weitere Funktionen von NO sind unter anderem die Verminderung der Thrombozytenaggregation (Radomski et al., 1987), der Oxidation des LDLs zu oxLDL (Hogg et al., 1993), der Muskelzellproliferation (Münzel et al., 2005) sowie der Leukozytenadhäsion (Kubes et al., 1991). Eine verringerte eNOS-Expression (Wilcox et al., 1997), ein Mangel an Substrat oder Co-Faktoren (Pou et al., 1992; Cai und Harrison, 2000), die Modulation intrazellulärer Signalwege oder eine beschleunigte NO-Degradation durch Peroxynitrit-Bildung führt zur Minimierung der NO-Bioverfügbarkeit. Im Falle eines Co-Faktoren- oder L-Arginin-Mangels sind alle NOS-Isoenzyme in der Lage, Calcium-abhängiges $O_2^{\cdot-}$ zu produzieren (Heinzel et al., 1992; Vásquez-Vivar et al., 1998; Cai und Harrison, 2000).

1.5.2 Endothel-vermittelte Hyperpolarisation

Mitte der achtziger Jahre wurde neben der NO- und der PGI₂-Bildung ein weiterer endothelabhängiger, vasorelaxierender Faktor vermutet, der mit der Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle in Verbindung gebracht wurde. Als „endothelium-derived hyperpolarization factor“ (EDHF) führt dieser zur Membranpotentialänderung und infolgedessen zur Regulation des Gefäßdurchmessers (Chen et al., 1988; Félétou und Vanhoutte, 1988). Diese Änderung und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Endothel- und Muskelzelle ist auf Calcium-abhängigen Kalium-Kanäle (K_{Ca}-Kanäle) zurückzuführen (Félétou und Vanhoutte, 2006). Mitte der neunziger Jahre belegten Inhibitions-Versuche die Beteiligung der unterschiedlichen K_{Ca}-Kanal-Subtypen an der Hyperpolarisation. Eine Aktivierung an der Endothelzelle lokalisierter K_{Ca}-Kanäle, insbesondere des SK-(small-conductance K_{Ca}) und IK-(intermediate-conductance K_{Ca}) Typs, führt zum Kalium-Ausstrom aus der Endothelzelle (Busse et al., 2002; Félétou und Vanhoutte, 2009; Garland et al., 2011). Die K_{Ca}-Öffnungswahrscheinlichkeit wird durch Spannungsänderung, zum Beispiel bei einer erhöhten intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$)

gesteigert (Calderone, 2002; Ko et al., 2008). Die BK_{Ca} (large/big-conductance K_{Ca}) der glatten Muskelzelle scheinen in Bezug auf EDHF keine Bedeutung zu haben. Die Weiterleitung der endothelialen Hyperpolarisation auf die glatte Muskelzelle und die dadurch verursachte Vasorelaxation wird kontrovers diskutiert. Eine Möglichkeit stellt die Beteiligung von Gap-Junctions dar (Busse et al., 2002; Sandow et al., 2002). Die Kanalstruktur der Gap-Junctions sorgt nachweislich für die Übertragung der im Endothel ausgelösten Hyperpolarisation auf die glatten Muskelzellen (Edwards et al., 2000; Griffith, 2004). Auch existieren die Thesen, dass Derivate der Arachidonsäure, sogenannte Epoxyeicosatriensäuren (EET) oder eine Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase, K_{IR}- oder BK_{Ca}-Kanäle, bedingt durch die Kalium-Akkumulation im interzellulären Raum zur Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle führen (Félétou und Vanhoutte, 2009; Garland et al., 2011). Die Gewichtung der EDHF-induzierten Relaxation ist abhängig von der Spezies und der Gefäßgröße. Luksha et al. fanden heraus, dass die Bedeutung von EDHF, im Vergleich zur NO-induzierten Relaxation, in kleinen Arterien ($\leq 0,5$ mm) und Arteriolen zunimmt. In Windkesselgefäßen scheint EDHF hingegen kaum eine Rolle zu spielen (Luksha et al., 2009).

1.5.3 Calcium-Ionen (Ca²⁺) und Calcium-Rezeptoren

Der vaskuläre Tonus und damit der Blutdruck wird durch den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen maßgeblich beeinflusst. Steigt die intrazelluläre freie Calcium-Ionen-Konzentration [Ca²⁺]_i der glatten Muskelzelle, führt dies zu einer resultierenden Kontraktion. Einen genau gegensätzlichen Effekt bewirkt die Erhöhung von [Ca²⁺]_i in der Endothelzelle. Bereits 1982 vermutete die Arbeitsgruppe um Singer, dass endotheliales Ca²⁺ die Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen (NO, PGI₂) regulieren kann (Singer und Peach, 1982). Diese erhöhten [Ca²⁺]_i-Konzentrationen führen zur Calmodulin-(CaM)-abhängigen eNOS- und Phospholipase A₂-Aktivierung sowie zu einer erhöhten IK_{Ca}- und SK_{Ca}-Öffnungswahrscheinlichkeit (Fleming und Busse, 2003; Griffith, 2004). Aber auch

andere Faktoren, wie endotheliales ROS, fördern die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration (Lounsbury et al., 2000). Ein Anstieg der endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration wird durch intrazelluläre Speicher oder durch extrazelluläre Einschleusung gewährleistet. Das endoplasmatische Retikulum (ER) stellt den größten endothelialen Speicherort für Ca^{2+} dar und weist eine bis zu 10000x höhere Konzentration als das Zytosol auf. Bei Bedarf regulieren ER-membranäre, Ryanodin-sensitive- und Inositol-1,4,5-trisphosphat- (IP_3) -Rezeptoren die Freigabe von gespeichertem Ca^{2+} in das Zytosol. Die Stimulation der membranären SOCCs (Speicher-aktivierende Calcium-Kanäle) oder der nicht-selektiven Kationen-Kanäle (TRP-Kanäle; engl.: transient receptor potential channels) bewirken einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulär Raum in das Zytosol (Parekh und Putney, 2005). Effekte oder Faktoren wie EETs, cGMP, Brenztraubensäure sowie ROS können die Aktivität der SOCCs fördern (Griffith, 2004; Bakowski und Parekh, 2007).

Der ATP-abhängige Membrantransporter SERCA pumpt kontinuierlich zytosolisches Ca^{2+} gegen das Konzentrationsgefälle in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der glatten Muskelzelle. Die Aktivität dieser Pumpe ist umso höher, je mehr $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol vorhanden ist (Rossi und Dirksen, 2006; Clapham, 2007; Hewawasam, 2008).

1.5.4 Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase-B (Akt)

Eine Stimulation der PI3-Kinase durch extrazelluläre Faktoren wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Scherstress bewirkt eine Aktivierung des in der Membran verankerten Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphates und damit eine Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase-B (Akt) (Fleming und Busse, 2003; Lang und Silbernagl, 2013). Die zytosolische Serin-spezifische Proteinkinase-B stellt ein Zielprotein des PI3K/Akt-Signalweges dar (Koolman und Röhm, 2009). Bereits Ende der 90er Jahre wurde aufgezeigt, dass die PI3-Kinase direkt zu einer Calcium-unabhängigen Phosphorylierung der eNOS am Serin 1179 und 1177 und

damit zu einer NO-Freisetzung führt. Die Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges bewirkt eine Dilatation des Gefäßes (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). Eine bedeutende Beteiligung an der Polyphenol-vermittelten Dilatation der Aorta wurde bereits mehrfach bewiesen (Stoclet et al., 2004; Schini-Kerth et al., 2010).

1.6 Einfluss der Polyphenole auf die Endothel-vermittelte Gefäßrelaxation

An verschiedenen Arterienmodellen im kontrahierten Zustand konnten die relaxierenden Effekte nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von polyphenolischen Naturstoffen, festgestellt werden. Diese direkt eintretende Dilatation war besonders bei Arterienringen mit funktionstüchtigem Endothel ausgeprägt, konnte jedoch vereinzelt auch in Arterien ohne Endothel nachgewiesen werden (Novakovic et al., 2006; Zhu et al., 2007; Pan et al., 2008; Belemnabaab et al., 2013). Die Tab. 1.6-1 zeigt eine Auswahl bisher untersuchter, verschiedenartiger Polyphenole auf ihr Relaxationspotential an Endothel-intakten Arterien. Im Folgenden soll der momentane Stand einer möglichen Signalkaskade der Polyphenol-abhängigen Relaxation mit funktionstüchtigem Endothel wiedergegeben werden.

Beteiligung der NO/cGMP-Signalkaskade: 1993 demonstrierte die Forschergruppe um Fitzpatrick erstmals die Endothel-abhängige vasorelaxierende Wirkung über den NO/cGMP-Signalweg unter Verwendung von im Traubensaft und Traubenschalenextrakt enthaltenden Polyphenolen (Fitzpatrick et al., 1993). Wenig später zeigten Andriambeloso et al. eine intrazelluläre Erhöhung von NO an der Rattenaorta durch phenolische Komponenten aus dem Rotwein. Interessanterweise zeigten diese Polyphenole auch relaxierende Effekte an der Aorta mit entferntem Endothel, wenn dafür auch höhere Konzentrationen notwendig waren (Andriambeloso et al., 1997; Andriambeloso et al., 1998).

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Studien an unterschiedlichen Tier- und Humanmodellen, in denen eine Beteiligung des endothelabhängigen NO/cGMP-Signalweges durch verschiedenartige Polyphenole beschrieben worden ist (Tab. 1.6-1). Unterstützend dienten Experimente zur Erfassung der Polyphenolbedingten gesteigerten NO-Bildung an verschiedenen Organsegmenten mit NO-sensitiven Mikrosensoren und -elektroden (Freedman et al., 2001; Taubert et al., 2004), aber auch mittels paramagnetischer Elektronenresonanzspektroskopie (Stoclet et al., 1999; Benito et al., 2002). Durch Quantifizierung der Umwandlung von radioaktiv markiertem L-Arginin zu L-Citrullin konnte auch die Enzymaktivität der eNOS demonstriert werden (Benito et al., 2002). Ähnliche Resultate gewann man durch den Nachweis der Expression der phosphorylierten eNOS nach vorheriger Inkubation von Endothelzellkulturen mit polyphenolischen Komponenten und anschließender Western-Blot Analyse (Andriantsitohaina et al., 2012; Alhosin et al., 2013). Des Weiteren wurden anfängliche Struktur-Wirkungsbeziehungen von eingesetzten Polyphenolen in Bezug auf die endotheliale NO-Freisetzung postuliert (Stoclet et al., 2004).

Beteiligung von Ca^{2+} : Andriambelosen et al. untersuchten im Rahmen ihrer Arbeiten (1997, 1998) die Bedeutung von Calcium im Endothel nach Inkubation mit Polyphenolen. Untersuchungen im Ca^{2+} -freien Medium oder mittels verschiedener Ca^{2+} -Kanalblocker ergaben, dass die Endothel-abhängige Relaxation, induziert durch Polyphenole, Ca^{2+} -abhängig ist (Andriambelosen et al., 1997; Andriambelosen et al., 1998). Zu vergleichbaren Ergebnissen kam auch Stoclet et al. mit Hilfe von Versuchen an Endothelzellen der Rinderaorta: Durch die Polyphenol-Zugabe kam es zu einer erhöhten endothelialen Ca^{2+} -Konzentration und folglich über die eNOS-Aktivierung zu einer Gefäßdilatation. Eine $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in der glatten Muskelzelle wurde nicht nachgewiesen (Stoclet et al., 1999). Daher führt die Polyphenol-vermittelte endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung zu einer merklichen eNOS-Aktivierung (Schini-Kerth et al., 2010).

Bedeutung von EDHF: Angeknüpft an die oben beschriebenen Forschungsergebnisse zeigten Ndiaye et al. (2003) erstmals die Beteiligung von EDHF an der RWPC-induzierten vaskulären Relaxation an isolierten Koronararterien des Schweins. Der Einsatz der K_{Ca} -Inhibitoren Charybdotoxin (CTX) und Apamin zeigten einen signifikanten Einfluss auf die RWPC-induzierte Relaxation, der durch Zusatz von L-NAME verstärkt wurde. Diese Resultate wurde in vielen weiteren Publikationen mit unterschiedlichen Arterientypen und Polyphenolen nachgewiesen (Tab. 1.6-1) (Stoclet et al., 2004; Schini-Kerth et al., 2010).

Beteiligung der PI3K/Akt: Neben der Ca^{2+} -vermittelten- nimmt auch die PI3K/Akt-vermittelte eNOS-Aktivierung eine entscheidende Rolle im relaxierenden Signalweg der Polyphenole ein. An isolierten Koronararterien des Schweins wurde mit Hilfe des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin eine ausgeprägte Reduktion der NO-vermittelten Relaxation durch RWPCs aufgezeigt (Ndiaye et al., 2004). Zugleich konnte mittels paramagnetischer Elektronen-Resonanzspektroskopie eine verminderte cGMP-Bildung nachgewiesen werden. Endothelzellen zeigten durch einige Polyphenole eine konzentrationsabhängige Expression von p-Akt, aber auch von p-eNOS, die unter Wortmannin deutlich vermindert auftrat (Stoclet et al., 2004; Schini-Kerth et al., 2010). Auch von einer der PI3K/Akt vorgeordneten Beteiligung der Src-Kinasen (Anselm et al., 2009), der ERK 1/2-Kinasen (Ndiaye et al., 2004) und der p38 MAP-Kinasen (Mann et al., 2007) ist die Rede.

Bedeutung von ROS: 2004 wurde eine Redox-sensitive PI3K/Akt-Aktivierung nachgewiesen: An Geweberingen der Koronararterien des Schweins konnte eine ROS-vermittelte Relaxation durch Polyphenole des Rotweins gezeigt werden. In Anwesenheit des SOD-Mimetikums MnTMPyP wurde die Relaxation stark gehemmt. Anschließende Untersuchungen an Endothelzellen bestätigen eine ROS-vermittelte Akt-Phosphorylierung (Ndiaye et al., 2004). Es folgten weitere

Nachweise für eine Redox-sensitive Signalkaskade der Polyphenole: Die Beteiligung prooxidativer Enzyme wie der NADPH-Oxidase konnten an isolierten Koronararterien des Schweins und durch endotheliale Enzymexpression nachgewiesen werden. Auch der ROS-Scavenger NAC (Anselm et al., 2009) und der Einsatz der PEG-Katalase beeinflussten die Polyphenol-vermittelte Relaxation (Madeira et al., 2009). Unterstützend wurde mit Hilfe von spezifischen Fluoreszenznachweisen die intrazelluläre ROS-Erhöhung der Endothelzellen demonstriert (Anselm et al., 2009; Auger et al., 2010).

Beteiligung von Estrogen-Rezeptoren: Einige Forschungsgruppen wiesen eine Beteiligung der Estrogenrezeptoren an der Polyphenol-vermittelten Relaxation nach: In Anwesenheit des Inhibitors ICI 182,780 konnten die relaxierenden Eigenschaften des Phytoalexins Resveratrol (Rush et al., 2007) und des *Crataegus* WS®1442 Spezial-Extraktes beeinflusst werden.

Tab. 1.6-1 Zusammenstellung publizierter Daten zur *in vitro* Polyphenolforschung in Bezug auf ihr Relaxationsvermögen an vorkontrahierten Gefäßen (Die Tabelle wurde teilweise übernommen und in Teilen ergänzt (Schini-Kerth et al., 2011))

Polyphenolische Testsubstanz	Modell	Nachgewiesener Effekt	Quelle
Açaibeeren Extrakt	Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Rocha et al., 2007)
<i>Crataegus</i> Extrakt WS1442®	Aorta (Ratte) und humane Arteria mammaria	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Brixius et al., 2006)
Hibiscus sabdariffa Extrakt	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Sarr et al., 2009)
Lysimachia clethroides Extrakt	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Lee et al., 2010)
Parkia biglobosa folium Extrakt	Koronararterie (Schwein)	Endothelabhängige Relaxation	(Tokoudagba et al., 2010)
Procyanidinreicher Extrakt von <i>Croton celtidifolius</i>	Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(DalBó et al., 2008)

Tab. 1.6–1 Fortsetzung

Polyphenolische Testsubstanz	Modell	Nachgewiesener Effekt	Quelle
Pycnogenol®	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Fitzpatrick et al., 1998)
Sibirischer Ginseng Extrakt	Karotis (Hund), Aorta und Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Kwan et al., 2004)
Anogeissus Leio-carpus-Fraktion	Koronararterie (Schwein)	Endothelabhängige und – unabhängige Relaxation	(Belemnabaab et al., 2013)
Trauben-Extrakte			
Violetter Traubensaft	Koronararterie (Schwein)	Endothelabhängige, NO und EDHF vermittelte Relaxation	(Anselm et al., 2007)
Traubenmark-Extrakt	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige Relaxation	(Auger et al., 2004)
Trauben-Procyanidin-Extrakt	Aorta und Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige Relaxation	(Fitzpatrick et al., 1993; Fitzpatrick et al., 2000)
Traubenschalen-extrakt	Koronararterie (Schwein)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Madeira et al., 2009)
Wein-Extrakte			
Procyanidinreiche Rotwein-Fraktion	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige Relaxation	(Andriambelosen et al., 1998)
Provinols®	Femoralarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation und NO-Bildung	(Zenebe et al., 2003)
Spanische Weine	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige Relaxation	(Padilla et al., 2005)
Rotwein	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Andriambelosen et al., 1997)
Rotwein	Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO und EDHF vermittelte Relaxation	(de Moura et al., 2004)
Rotwein-Extrakt	Mesenterialarterie (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Duarte et al., 2004)
Tee			
Grüner und schwarzer Tee	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Jochmann et al., 2008; Lorenz et al., 2009)
Beeren			
Schwarze Johannis-beer-Extrakt	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO-vermittelte Relaxation	(Nakamura et al., 2002)

Tab. 1.6–1 *Fortsetzung*

Polyphenolische Testsubstanz	Modell	Nachgewiesener Effekt	Quelle
Aroniabeer- und Heidelbeer- Anthocyanin-Extrakte	Koronararterie (Schwein)	Endothelabhängige Relaxation	(Bell und Gochenaur, 2006)
Cranberry-Saft	Aorta (Ratte)	Endothelabhängige, NO- vermittelte Relaxation	(Maher et al., 2000)
Himbeer-Extrakt und Fraktionen	Aorta (Kaninchen)	Vasorelaxierender Effekt assoziiert mit Lambertianin C und Sanguiin H-6 angereicherter Fraktion	(Mullen et al., 2002)
Erdbeer-Extrakt	Aorta (Kaninchen)	Endothelabhängige, NO- vermittelte Relaxation	(Edirisinghe et al., 2008)
Heidelbeer-Saft	Aorta (Ratte)	Kalium-Kanal abhängige Relaxation	(Horrigan et al., 2013)

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von polyphenolischen Testsubstanzen auf ihr vasorelaxierendes Potenzial an isolierten Koronararterien des Schweins, sowie die Überprüfung ihrer kardioprotektiven Eigenschaften vor allem durch antioxidative Effekte. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf die Procyanidine aus *Nelia meyeri* SCHWANT. und *Salix* spp. gelegt werden. Gegenüber den in der Literatur beschriebenen, strukturell nur wenig analysierten polyphenolischen Extrakten handelt es sich hier um aufgereinigte und chemisch definierte Fraktionen aus 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidinen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher

1. in Organbadstudien die konzentrationsabhängigen, Endothel-vermittelten, relaxierenden Effekte der polyphenolischen Testsubstanzen an Koronararterien des Schweins (i.D. 2-3 mm) überprüft werden. Der Einsatz von Inhibitoren und Aktivatoren diene zur Identifizierung einer möglichen Signalkaskade.
2. mögliche Varianzen im Wirkmechanismus bezüglich der verschiedenen Stereochemie der Procyanidine und bereits publizierter Daten überprüft werden.
3. Experimente mit Koronararterien $\leq 0,5$ mm durchgeführt werden, um zum einen die Wirkung der Procyanidine in Abhängigkeit der Gefäßgröße und zum anderen mögliche Unterschiede in der Signalkaskade zu ermitteln.
4. mit Hilfe der Western-Blot Analyse sowie eines speziellen ROS-Fluoreszenzassays in Endothelzellen (HUVECs) die gewonnenen Ergebnisse auf molekularer Ebene unterstrichen werden.
5. mögliche anderweitige Effekte der Procyanidine auf Arterien mit zuvor entferntem Endothel beider Gefäßgrößen überprüft werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten

1. die antioxidativen Effekte der eingesetzten polyphenolischen Testsubstanzen überprüft werden, mit Hilfe des Xanthinoxidase-Assay, des DPPH-Assay und des Griess-Assays unter *in vitro* Bedingungen, um mögliche Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzuzeigen.
2. die arterioprotektiven Eigenschaften der Procyanidine mit Hilfe eines Lipoprotein-Assays an Koronararterien des Schweins bestimmt werden.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Alphabetische Auflistung der Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage (A200S)	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Mettler Toledo XS205	Mettler-Toledo, Gießen
Axio Cam color (Farbe)	Carl Zeiss, Jena
Axiostar plus (Lichtmikroskop) Axiovert 25 (Lichtmikroskop)	Carl Zeiss, Jena
CO ₂ -Brutschrank: Cellstar HERAcell 150i	Nunc GmbH, Wiesbaden Thermo Scientific, Dreieich
Digitalkamera (Power Shot A95)	Canon Deutschland, Krefeld
Doppelgel-Elektrophorese (vertikal)	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Einkammer-Organbäder, 20 mL, temperierbar	TSE, Bad Homburg
Einkanalpipetten (Volumenbereich 2-5000 µl)	Abimed, Langenfeld Eppendorf, Hamburg Biohit, Helsinki, Finnland
Elektromechanischer Druckwandler, Transducer TF6V5	Fleck, Mainz
Entwicklungskassette	Kodak, München
Eppendorf Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage (MC1)	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskope BZ-8000;	Keyence, Neu-Isenburg, Germany
Freezing Container Nalge Nunc,	Rochester, New York, USA
Gas-Sicherheitsbrenner flammly S mit Fußtasterbetrieb	Schütt-Labortechnik GmbH, Göttingen
Glasgeräte (Messzylinder, Bechergläser, Glasflaschen)	Schott, Mainz bzw. VWR, Darmstadt
Heizplatte / Magnetrührer (IKA Ret basic)	IKA®-Werke, Staufen
Lichtmikroskop TMS-F	Nikon, Japan
Mikroplattenreader (Infinite M200 Pro)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Minishaker KMS1	IKA Works Werke, Staufen
Neubauer-Zählkammern	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Organhäkchen, Edelstahl	Eigenanfertigung
PeqLab Perfect Blue Mini Gel System	PeqLab, Biotechnologie, Erlangen

Gerät	Firma
PeqPower E 250 Power Supply- 230 VAC	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
pH-Meter CG 825	Schott, Hofheim
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments, Schwabach
Präzitherm Präzisions-Heizplatte	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
Reagenzglasschüttler, IKA Lab Dancer	Carl Roth, Karlsruhe
Schüttler MTS 4	IKA Works Werke, Staufen
Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus Instruments, Berlin
Sterilbank - BDk-S 1200 Type A/B3 (Klasse II)	BDK Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Sterilbank - NuAir	NuAir, Inc., Plymouth, MN, USA
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus-Christ, Hanau
Tischzentrifuge Medifuge 200 S H+P	Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AZ 04	Fleck, Mainz
Varifuge 3.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Varioklav H+P	Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vierkanal-x-t-Kompensationsschreiber	Siemens, München
Vortexer (Minishake 3 basic)	IKA®-Werke, Staufen
VWR Galaxy Ministar	VWR International, Darmstadt
Wasserbäder	Dinkelberg-Labortechnik, Ulm
Wippschüttler (Stuart® Gyro Rocker SSL3) Bibby	Staffordshire, GB Staffordshire, GB

2.2 Alphabetische Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Blotting Papier (Filterpapier)	Whatman (GE Healthcare), Freiburg
ECL-Amersham Hyperfilm	GE Healthcare, Freiburg
ECL-Detection Kit	GE Healthcare, Freiburg
Einmal-Injektionskanülen Gr. 1-4,	B. Braun, Melsungen
Endothelial cell growth medium	Promocell, Heidelberg

Material	Firma
Falconröhrchen 50 mL (steril) TPP	Biochrom, Berlin
Falconröhrchen 15 mL (steril) TPP	Biochrom, Berlin
Flüssigkeitsreservoirs steril (55 mL)	Carl Roth, Karlsruhe
Flüssigkeitsreservoirs unsteril (55 mL)	Carl Roth, Karlsruhe
Gewebekulturflaschen (T25) TPP	Biochrom GmbH, Berlin
Gewebekulturflaschen (T50) TPP	Biochrom GmbH, Berlin
Mikrotiterplatten (12-, 24- und 96-Well) TPP	Biochrom GmbH, Berlin
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Nunc-Kryoröhrchen (2 mL)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafilm	American National Can, Menasha, WI, USA
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific
PBS-Dulbecco-Puffer (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin
Spritzen (diverse Volumina)	B. Braun, Melsungen
Trypsin/EDTA 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS (w/o)	Biochrom, Berlin
Wasser (Aqua destillata)	FU-Berlin, Berlin
Western-Blot Fertiggele: Tris Glycin NN 8 % Tris Glycin NN 8-16 %	NuSep Labortechnik, Wasserburg
Zellkulturplatten (6, 12, 96 Wells), steril Zellkulturplatten (96 Wells), schwarz steril	TPP (Biochrom), Berlin

2.3 Alphabetische Auflistung von Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Firma
1 <i>H</i> -[1,2,4]Oxadiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-on (ODQ)	Tocris, Bristol, Großbritannien
2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-on (PD98059)	Tocris, Bristol, Großbritannien
2-Amino-ethoxydiphenylborat (2-APB)	Tocris, Bristol, Großbritannien
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H ₂ -DCF-DA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(3-[(3,5-Dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl) methylen]-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-on) (SU5416)	Tocris, Bristol, Großbritannien

Substanz	Firma
4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-[4(methylsulphonyl)phenyl]-1 <i>H</i> -imidazol-4-yl]pyridin hydrochlorid (SB203580)	Tocris, Bristol, Großbritannien
4-Aminopyridin (4-AP)	Tocris, Bristol, Großbritannien
7 α ,17 β -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol (ICI 182,780)	Tocris, Bristol, Großbritannien
9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostagnadin F2 α (U46619)	Upjohn, Kalamazoo, MI (USA)
Acetovanillon (Apocynin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Allopurinol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Apamin	Tocris, Bristol, Großbritannien
“Bad steril”	Neolabs, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bradykinin Triacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carbenoxolon	Tocris, Bristol, Großbritannien
Carbogen (95 % O ₂ /5 % CO ₂)	Air Liquide, Düsseldorf
Charybdotoxin	Tocris, Bristol, Großbritannien
D-Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd-Lösung 37 %	Merck, Darmstadt
Glibenclamid	Tocris, Bristol, Großbritannien
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Dreieich
Hypoxanthin	Carl Roth, Karlsruhe
Indometacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LDL	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
LPS (Samonella Friedenau)	Forschungsinstitut, Borstel

Substanz	Firma
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mangan(3)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP)	Tocris, Bristol, Großbritannien
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milrinon	Tocris, Bristol, Großbritannien
N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
N ^G -nitro-L-arginin-methylester (L-NAME)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitroprussid-Natrium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
oxLDL	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Asheville, NC, USA
Pertussis-Toxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Complete Ultra	Roche Diagnostics, Mannheim
Read-Loading-Buffer	New England Biolabs
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	Tocris, Bristol, Großbritannien
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tiron Monohydrat	TCl, Bad Soden am Taunus
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan-blau	Carl Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
Wortmannin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xanthinoxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.4 Verwendete polyphenolische Testsubstanzen

Die für die vorliegende Arbeit relevanten Procyanidin-Fractionen und polyphenolischen Extrakte sind in der Tab. 2.4-1 aufgelistet.

Tab. 2.4-1: Polyphenolische Testsubstanzen

Pflanze	Drogenteil	Familie	Procyanidine	Fraktion	Literatur
<i>Nelia meyeri</i> SCHWANT	Blätter	Mesembryan- themaceae	Überwiegend dimere bis hexamere Epicatechin- bausteine (2,3- <i>cis</i> Procyanidine)	Reine Procyanidin- Fraktion	(Kolodziej, 1984)
<i>Salix</i> spp.	Rinde	Salicaceae	Überwiegend dimere bis hexamere Catechinbausteine (2,3- <i>trans</i> Procyanidine)	Reine Procyanidin- Fraktion	(Kolodziej, 1990)
<i>Pelargonium</i> <i>sidoides</i> DC.	Wurzel	Geraniaceae	überwiegend dimere bis oligomere Prodelphinidine auch Epicatechin-Bausteine	Ethanolische Fraktion (EPs® 7630-Fraktion; Schwabe®)	(Kayser und Kolodziej, 1995; Schoetz et al., 2008)
<i>Betula</i> spp.	Rinde	Betulaceae	dimere bis oligomere (Epi-) Catechin-bausteine	Reine Procyanidin- Fraktion	(Kolodziej, 1989)
<i>Crataegus</i> <i>oxyacantha</i> L	Früchte	Rosaceae	dimere bis tetramere (Epi-) Catechin-bausteine	Reine Procyanidin- Fraktion	(Kolodziej et al., 1984)
<i>Crataegus</i> spp.	Blätter mit Blüten	Rosaceae	Oligomere Procyanidine	Ethanolische Fraktion (WS® 1442--Fraktion; Schwabe®)	(Leuchtgens, 1993; Veveris et al., 2004)

2.5 Experimente an isolierten Koronararterien des Schweins (Organbadstudien)

2.5.1 Organe und Organpräparation

Die zum Versuch benötigten Schweineherzen wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung, Teltow-Ruhlsdorf, erworben. Die weiblichen und die kastrierten männlichen Schweine waren zwischen 120 und 180 Tage alt und 100-130 kg schwer. Die Herzen wurden im eiskalten, mit Carbogen-gesättigten Krebs-Henseleit-Puffer (KHS; siehe Kapitel 2.5.2) transportiert. Anschließend wurde der absteigende Ast der linken Koronararterie (Ramus interventricularis anterior) sowie der Ramus circumflex freigelegt und entnommen. Bei Verwendung kleiner Koronararterien wurde der proximale Teil des Ramus interventricularis anterior verwendet, dessen Innendurchmesser $\leq 0,5$ mm betrug (Abb. 2-1; Abb. 2-2). Die isolierten Koronararterien wurden in KHS von angrenzenden Geweberesten und Fett befreit. Die Organe konnten bis zu vier Tage bei 4 °C im modifizierten KHS gelagert werden, wobei täglich eine viertelstündige Begasung mit CO₂/O₂ vorgenommen wurde.

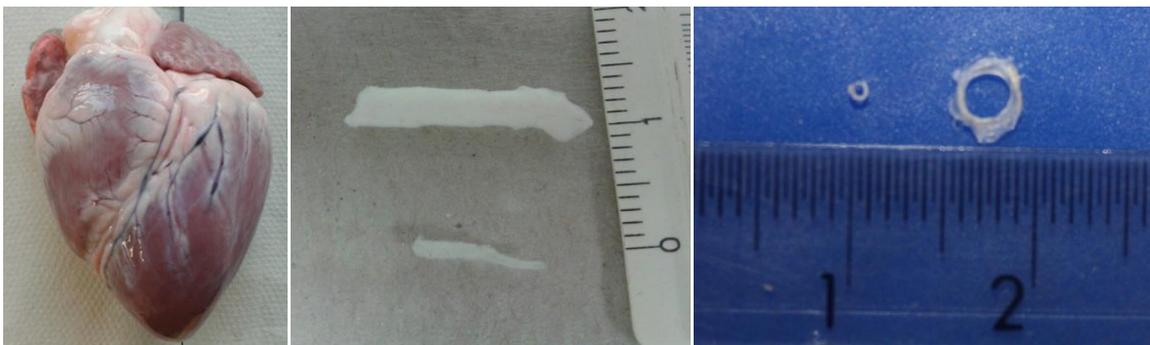


Abb. 2-1: Schweineherz und isolierte Koronararterien

Links: Schweineherz, direkt vor Entnahme der Koronararterien. **Mitte:** isolierte Koronararterien; obere: 2-3 mm Innendurchmesser, untere: 0,5 mm Innendurchmesser. **Rechts:** Querschnittansicht der beiden beschriebenen Arterien.

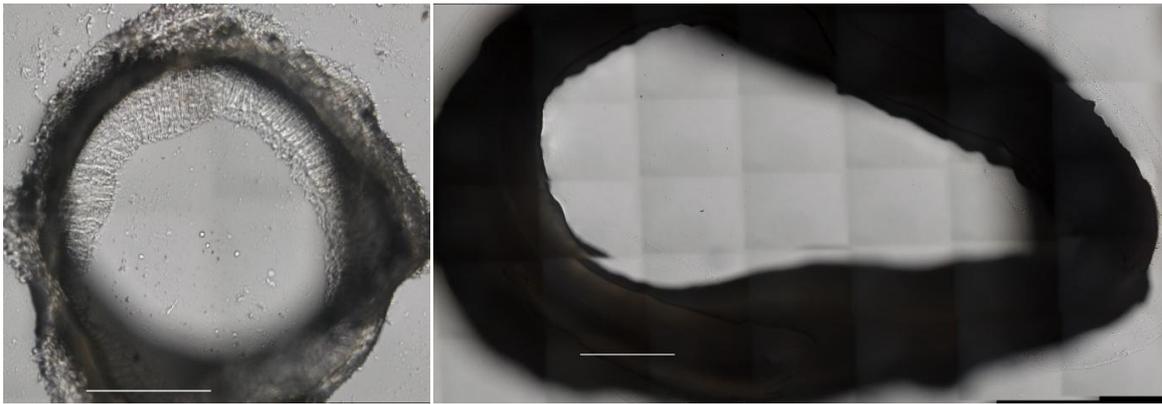


Abb. 2-2: Mikroskopische Aufnahme der beiden genutzten Koronararterien

LINKS: Querschnittansicht einer Arterie mit einem Innendurchmesser $\leq 0,5$ mm. **RECHTS:** Querschnittansicht einer Arterie mit dem Innendurchmesser ≥ 2 mm. Die Abbildungen wurden mit einem Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop aufgenommen.

2.5.2 Verwendete Puffer

2.5.2.1 Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHS)

Für die durchgeführten Organbadstudien wurde KHS (pH 7,4) der folgenden Zusammensetzung verwendet. KHS wurde üblicherweise auf 10 Liter angesetzt.

Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer	Konzentration (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,6
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
D-Glucose · H ₂ O	11

2.5.3 Polyphenolische Testsubstanzen

Die Stammlösungen der polyphenolischen Testsubstanzen (20 mg/mL) wurden in Ethanol und KHS (1:1; V/V) frisch hergestellt und mit dem gleichen Medium 1:10 verdünnt (Arbeitslösung). Aufgrund von Komplexbildung mit den Testsubstanzen wurde im KHS auf Mg²⁺- und Ca²⁺-Zusatz verzichtet. Die finale

Ethanolkonzentration lag in den Organbadstudien immer unter 0,5 %. Durch Vehikel-Überprüfung konnte ein Einfluss auf das Ergebnis durch Ethanol ausgeschlossen werden. Die Konzentrationen der polyphenolischen Testsubstanzen betragen in den Organbadstudien 1-100 µg/mL.

2.5.4 Reagenzien

Die für die Versuchsdurchführung notwendigen Reagenzien wurden als Stammlösungen hergestellt und bei -20 °C bis zu zwei Monaten gelagert. Indometacin (Stammlösung: 3,16 M) wurde in Ethanol und demineralisiertem Wasser (1:1; V/V) gelöst. Die Endkonzentration im Organbad betrug 5 µM. Des Weiteren wurde Bradykinin in demineralisiertem Wasser gelöst (Stammlösung: 1,06 mg/mL). Die Endkonzentration im Organbad betrug 10 nM. Eine Stammlösung aus U46619 (0,3504 mg/mL) wurde mit Ethanol hergestellt und erreichte eine Konzentration von 30 nM im Organbad. KCl wurde in demineralisiertem Wasser gelöst (Stammlösung: 0,2356 mg/mL) und erreichte eine Endkonzentration von 30 mM im Organbad.

2.5.5 Apparatur

Die Organbadanlage besteht aus Einkammerbädern mit einem Fassungsvermögen von je 20 mL. Jede Kammer wird durch einen äußeren Mantel mit zirkulierenden demineralisiertem Wasser auf 37 °C temperiert. Im Inneren der Badkammer befindet sich eine Fritte mit ein bis zwei Organhalterungen, deren Aufgabe es ist, den mit KHS-befüllten Innenraum stetig zu begasen. Durch einen Zu- und Ablauf des inneren Kreislaufs lässt sich die Pufferlösung auswechseln und das Organbad spülen. Die Registrierung der pharmakologischen Effekte erfolgte isometrisch über einen elektromechanischen Druckwandler (Transducer), verbunden mit einem Verstärker (Transducer Coupler) und einem Kompensographen.

2.5.6 Versuchsdurchführung

Vor Versuchsbeginn wurden alle apparativen Anlagen auf Funktionstüchtigkeit überprüft. Eine externe Kalibrierung wurde durch Anlegen eines definierten Gewichts an den Druckwandler vorgenommen. Bei Bedarf konnte der angezeigte Messwert neu justiert werden. Nach der Befüllung der vortemperierten Organbäder mit KHS sowie der Begasung mit Carbogen wurden die Arterien in Ringe geschnitten (große Arterien: 3-4 mm lang; kleine Arterien 2 mm lang). Um versuchsbedingt das Endothel der Arterienringe zu entfernen, wurde die isolierte Arterie mit einer Pinzette im Inneren sehr behutsam gerollt. Die Geweberinge wurden vorsichtig luminal auf zwei L-förmige Edelstahlhäkchen fixiert und über Fäden in das Organbad eingehängt. Die Geweberinge wurden auf eine Ruhekraft von 20 mN gespannt.

2.5.6.1 Stabilisierungsphase

Nach Einhängen der Geweberinge in das Organbad wurde das Gewebe über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer konstanten Ruhekraft stabilisiert.

2.5.6.2 Äquilibrierungsphase 1

Die Ringe wurden drei Minuten gespült und weitere 30 Minuten äquilibriert. Um die Gewebeviabilität nachzuweisen, wurde durch Zusatz von KCl-Lösung (30 mM) eine Kontraktion ausgelöst. Nach Erreichen des Maximums (nach ca. 20 Minuten) wurden die Kontraktion der Ringe durch 10minütiges Spülen aufgehoben.

2.5.6.3 Äquilibrierungsphase 2

Nach einer Ruhepause von 15 Minuten und anschließender Waschung (3 Minuten), wurden die Geweberinge weitere 30 Minuten äquilibriert, bevor durch Zugabe von U46619 (30 nM), eine erneute Kontraktion ausgelöst wurde. Nach Erreichen eines Kontraktionsplateaus (nach ca. 20 Minuten) wurde durch Zugabe von Bradykinin (10 nM) eine Relaxation ausgelöst. Dies gab Aufschluss über die

funktionelle Integrität des Endothels. Die Äquilibrierungsphase 2 wurde 2-3-mal wiederholt bis ein konstantes Kontraktionsplateau erreicht wurde.

2.5.7 Prüfphase

Zu Beginn der Prüfphase wurden die Geweberinge nach einer 15minütigen Ruhepause 10 Minuten gewaschen. Danach wurden die jeweiligen Testinhibitoren in das Organbad gegeben und die Ringe 30 - 180 Minuten vor Auslösung der Kontraktion mit U46619, inkubiert. Nach Stabilisierung des Kontraktionsplateaus fand eine kumulative Relaxation durch Zugabe der polyphenolischen Testsubstanzen statt (Abb. 2-3). Alle Experimente wurden in ständiger Gegenwart von Indometacin ($5 \mu\text{M}$) durchgeführt.

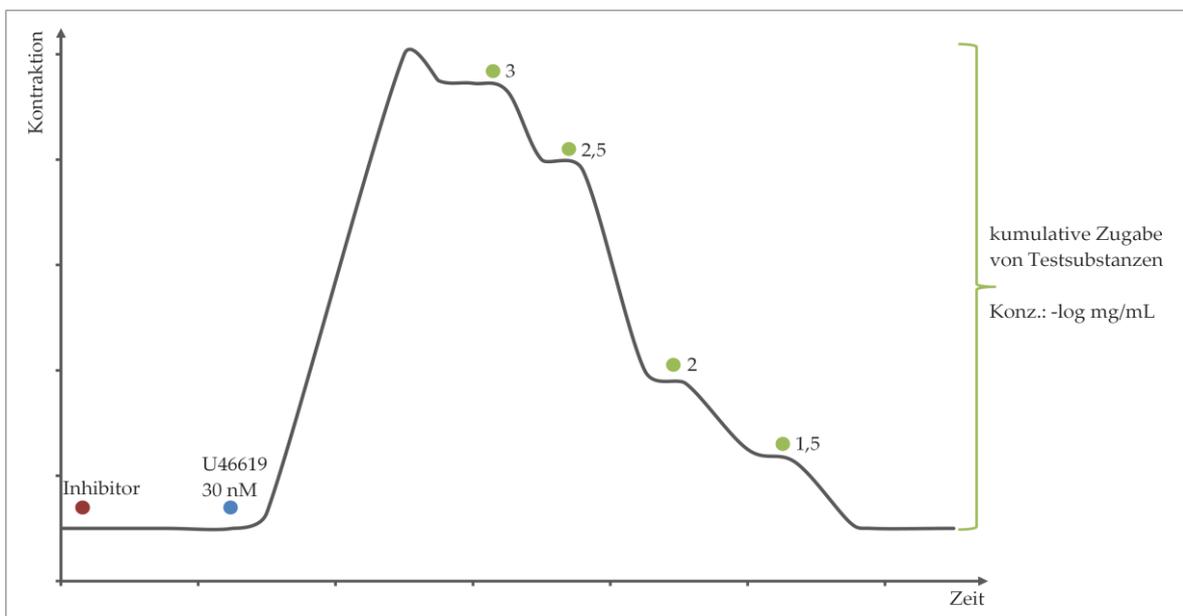


Abb. 2-3: Schema der kumulativen Testsubstanz-Zugabe

Schematische Darstellung der kumulativen Zugabe der polyphenolischen Testsubstanzen in halblogarithmisch steigenden Konzentrationen nach vorheriger Zugabe von 30 nM U46619. Ist das stabile Plateau der Kontraktion durch U46619 erreicht, wird eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen.

2.5.8 Auswertung

Die relaxierenden Effekte der Testsubstanzen wurden aus der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt und prozentual auf die letzte U46619-induzierte Kontraktion (= 100 %) bezogen. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten,

wurden 3 - 8 unabhängige Versuche durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden durch GraphPad Prism 5.0 gemittelt, ausgewertet und dargestellt.

2.6 Lipoprotein Inkubations Assay

2.6.1 Pufferlösungen

2.6.1.1 Inkubationsmedium

Modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer 2 (KHS 2)	Konzentration (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
D-Glucose · H ₂ O	11
Penicillin/Streptomycin	100 µg/mL
Ficoll-Lösung	2,5 %

2.6.2 Organpräparation, Reagenzien und Testsubstanzen

Die Organpräparation wurde zunächst wie unter 2.5.1 geschildert durchgeführt. Die Stammlösungen der Testsubstanzen (20 mg/mL) in Ethanol und KHS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ (1:1; V/V) wurden so verdünnt, dass die finalen Konzentrationen im Inkubationswell 10 µg/mL betragen. Das gelieferte LDL (5 mg/mL) wurde vor Versuchsbeginn mit KHS 2 1:10 verdünnt. oxLDL (2 mg/mL) konnte direkt eingesetzt werden. Beide Lipoproteine wurden mit einer Inkubationskonzentration von 200 µM eingesetzt. LDL und oxLDL konnten aufgrund der kurzen Haltbarkeit nach Anbruch nur vier Wochen bei 4 °C gelagert werden. Der Zusatz von Ficoll (Stammlösung 200 mg/mL) bewirkte eine Viskositätserhöhung der Inkubationslösung.

2.6.3 Versuchsdurchführung

Zunächst wurden 800 μL Gesamt-Inkubationsmedium in die entsprechenden Wells einer 24-Well Platte eingefüllt. In jedes Well wurde ein isolierter Arterienring und die Testsubstanz gegeben und eine Stunde bei 37 °C in einem Brutschrank mit CO_2 -gesättigter Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipoproteine hinzugegeben. Nach weiteren vier Stunden Inkubationszeit wurden die Ringe vorsichtig auf den Edelstahlhaken fixiert und in das vorgeheizte Organbad eingehängt. Der weitere Ablauf ist unter 2.5.6 beschrieben.

2.6.4 Prüfphase

Nach der letzten Waschung und 30minütiger Ruhephase wurden die Arterienringe mit U46619 (30 nM) kontrahiert. Nach Erreichen eines stabilen Plateaus folgte die kumulative Zugabe von Bradykinin (0,3 nM - 1 μM). Im Anschluss wurde SNP (100 μM) in alle Organbäder pipettiert. Alle entstehenden Kraftveränderungen der Organe wurden aufgezeichnet.

2.6.5 Auswertung

Die relaxierenden Effekte (4 - 5 unabhängige Versuche) wurden wie unter Kapitel 2.5.8 beschrieben ausgewertet und dargestellt.

2.7 Zellkultur

2.7.1 Zellen, Puffer und Kulturmedien

2.7.1.1 Wasser (H₂O)

Bei dem verwendeten H₂O handelt es sich um durch Umkehrosmose oder Ionenaustausch aufgereinigtes und anschließend autoklaviertes Wasser.

2.7.1.2 HUVEC-Kultivierungsmedium

Endothelial Cell Growth Medium (500 mL)	Konzentrationsangabe
Fetal Calf Serum (FCS)	0,02 mL/mL
Endothelial Cell Growth Supplement	4 µg/mL
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	0,1 ng/mL
Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human)	1 ng/mL
Heparin	90 µg/mL
Hydrocortison	1 µg/mL
Penicillin/Streptomycin	100 µg/mL

2.7.1.3 Kultivierungsmedium während der Inkubation mit polyphenolischen Testsubstanzen

Endothelial Cell Growth Medium (500 mL)	Konzentrationsangabe
Endothelial Cell Growth Supplement	0,004 mL/mL
Epidermal Growth Factor (recombinant human)	0,1 ng/mL
Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human)	1 ng/mL
Heparin	90 µg/mL
Hydrocortison	1 µg/mL
Penicillin/Streptomycin	100 µg/mL

2.7.1.4 Phosphate Buffered Saline (PBS)

Das PBS (pH 7,2; Eigenanfertigung) wurde vor Gebrauch sterilisiert. PBS wurde immer ohne Zusätze von Ca^{2+} oder Mg^{2+} verwendet. Die Salze wurden mit 500 mL Wasser nach 2.7.1.1 aufgefüllt.

1 x PBS (500 mL)	Konzentration (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
$\text{KH}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,6
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,2
KH_2PO_4	1,2

2.7.1.5 Kryokonservier-Medium

Kryokonservier-Medium (1,8 mL)	Anteil in Prozent (%)
Kultivierungsmedium	70
DMSO	10
FCS (Hitze sterilisiert)	20

2.7.1.6 Kultivierung von HUVECs

Humane umbilikalvenöse Endothelzellen (HUVEC) wurden bereits von Promocell, Heidelberg, proliferiert ausgeliefert. Hierbei handelt es sich um adhärenzte Zellen, die als Monolayer besiedeln und in 25 cm^2 - und 75 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät wurden. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Bank statt. Die Zellkulturen wurden in einem 37 °C temperierten, wasserdampfgesättigten Brutschrank (5 % CO_2) mittels Endothelial Cell Growth Medium kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz (alle 4 - 5 Tage) wurden die Zellen passagiert. Die Ablösung der adhärenzten Zellen erfolgte mit 1%iger Trypsin/EDTA-Lösung nach vorheriger, zweifacher Waschung des Zellrasens mit PBS. Die Neutralisierung des Trypsins wurde durch Zugabe von PBS und FCS-Lösung (1:1; V/V) erreicht. Die entstandene Zellsuspension

wurde in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 220 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit vorgewärmtem Medium resuspendiert. Nach Zellzählung wurden, entsprechend einer empfohlenen Aussaatdichte, die Zellen in einem neuen Kulturgefäß ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde jeden zweiten Tag vorgenommen. Die Zellen wurden bis einschließlich Passage 8 verwendet. Für Experimente war eine konfluente Besiedlung eine Voraussetzung. Die Zellen wurden immer vor Zugabe der Procyanidine für zwei Stunden mit supplementfreien Medium versetzt. Eine Reaktion von FCS mit den procyanidinhaltigen Testsubstanzen war somit auszuschließen.

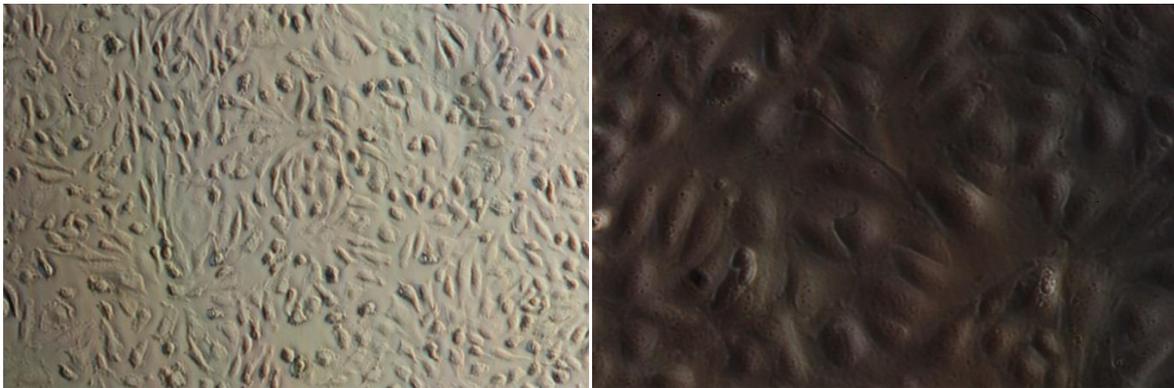


Abb. 2-4: Mikroskopische Aufnahme von HUVEC-Zellen

Mikroskopische Aufnahmen eines 80 - 90%igen konfluenten Zellrasens in der 3. Passage. LINKS: 10-fache Vergrößerung; RECHTS: 20-fache Vergrößerung

2.7.1.7 Auftauen von in flüssigem Stickstoff kryokonservierten Zellen

In einem Kryogefäß befanden sich rund 500.000 HUVECs, suspendiert in Kryokonservier-Medium. Das Vial wurde aus dem Flüssigstickstoff entnommen und sofort eine Minute in 37 °C warmes Wasser gehalten und aufgetaut. Danach wurde die Suspension in ein steriles Tube überführt, 1 mL frisches Medium hinzugegeben und bei 220 x g 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit vorgewärmtem Medium resuspendiert und nach Zellzahlbestimmung und Vitalitätstestung entsprechend der Zellzahl in Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 - 48 Stunden fand der erste Mediumwechsel statt.

2.7.1.8 Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Bei der Gefrierkonservierung wurde nach Trypsinierung, Inaktivierung, Zellzählung und Zentrifugation der Zellen das gebildete Pellet in einem speziellen Gefriermedium resuspendiert und jeweils 1,8 mL der Suspension in entsprechende Kryogefäße eingefüllt. Die Zellen wurden in den ersten 24 - 28 Stunden in einem speziellen Einfriergefäß graduell auf -80 °C kontinuierlich herunter gekühlt. Danach konnten die Zellen in den Stickstofftank (-196 °C) überführt oder bei -80 °C bis zu acht Wochen gelagert werden.

2.7.1.9 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer und Vitalitätsprüfung mit Trypanblau-Lösung

Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer und mikroskopischer Erfassung durchgeführt. Dabei lässt sich die Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Suspension durch Auszählung der Zellen bestimmen. Mit diesem Verfahren ist es möglich, immer konstante und definierte Zellmengen für eine Passagierung zu erhalten. Wurden die Zellen mittels Trypanblau angefärbt, konnte zusätzlich die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Das Tetranatriumsalz wurde in PBS gelöst und als 0,5%ige Lösung (m/V) verwendet. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff aus dem Inneren auszuschließen, akkumuliert der blaue Farbstoff in toten Zellen.

$$\text{Zelldichte} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \right) \times 2 \cdot 10^4 \text{mL}^{-1}$$

2.8 Immunoblotting (Western-Blot)

2.8.1 Pufferlösungen

2.8.1.1 Zellyse-Puffer

RIPA-Puffer (pH 7,6)	Konzentrationsangabe
Tris-HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	1 %
Sodium Deoxycholate	1 %
SDS-Pellets	0,1 %

Dem Puffer wurden vor der Verwendung 10 μ L des Halt-Phosphatase-Inhibitors (Pierce), sowie 40 μ L einer 25-fach konzentrierten Stammlösung aus Complete Ultra Tablets (Roche) hinzugefügt.

2.8.1.2 Detergenzienpuffer

3 x Red Loading Buffer (pH 6,8)	Konzentrationsangabe
Tris-HCl	187,5 mM
SDS	6 %
Glycerol	30 %
Phenolrot	0,03 %
DTT	416,6 mM

Nach Zugabe der Komponenten des Red Loading Buffers zu den jeweiligen Proben wurden diese bei 100 °C 10 Minuten erhitzt. Bis die Proben auf das Gel pipettiert wurden, erfolgte die Lagerung auf Eis.

2.8.1.3 Gelelektrophorese- Laufpuffer

1 x SDS-Laufpuffer	Mengen-/Konzentrationsangabe
Tris-Base	250 mM
Glycin	1,92 mM
SDS-Pellets	4 %
Wasser nach 2.7.1.1	ad 1 L

SDS-Laufpuffer wurde als 10-fache Stammlösung bis zu zwei Monate bei Raumtemperatur gelagert. Vor Gebrauch wurde sie 1:10 verdünnt.

2.8.1.4 Elektrophoresetransferpuffer

Towbin-Puffer (pH 8,3)	Mengen-/Konzentrationsangabe
Tris-Base	3,02 g
Glycin	14,4 g
Methanol	20 %
Wasser nach 2.7.1.1	ad 1 L

Towbin-Puffer konnte über acht Wochen bei 2 - 8 °C im Kühlschrank gelagert werden. Der pH wurde mit einem pH-Meter gemessen und gegebenenfalls mit HCl korrigiert.

2.8.1.5 Andere Puffersysteme

1 x TBS (Tris buffered saline; pH 7,6)	Mengenangabe
Tris-Base	2,42 g
NaCl	8,0 g
Wasser nach 2.7.1.1	ad 1 L

TBS wurde als 10-fache Stammlösung bis zu zwei Monate bei Raumtemperatur gelagert. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 verdünnt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter gemessen und gegebenenfalls mit HCl korrigiert.

Waschpuffer TBS-T	Mengen-/Konzentrationsangabe
Tween 20	0,1 %
1 x TBS	ad 1 L

TBS-T wurde immer frisch aus 1 x TBS hergestellt und sofort verbraucht.

Waschpuffer PBS-T	Mengen-/Konzentrationsangabe
Tween 20	0,1 %
1 x PBS	ad 1 L

PBS-T wurde immer frisch aus 1 x PBS hergestellt und sofort verbraucht.

BSA-Blockpuffer aus TBS-T	Mengen-/Konzentrationsangabe
BSA (Bovines Serumalbumin)	5 %
TBS-T	ad 200 mL

BSA-Blockpuffer wurde immer frisch aus TBS-T hergestellt und sofort verbraucht.

Milchpulver-Blockpuffer aus PBS-T	Mengen-/Konzentrationsangabe
Fettarmes Milchpulver	5 %
PBS-T	ad 200 mL

Milchpulver-Blockpuffer wurde immer frisch aus PBS-T hergestellt und sofort verbraucht.

2.8.1.6 Färbungen

Ponceau-S Färbelösung	Mengen-/Konzentrationsangabe
Ponceau S	0,3 %
Trichloressigsäure	3 %
Sulfosalicylsäure	3 %
Wasser nach 2.7.1.1	ad 100 mL

Die Färbelösung wurde bei Bedarf hergestellt und konnte für eine Mehrfachnutzung bis zu vier Monate bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.8.2 Testsubstanzen und Inhibitoren

HUVECs wurden mit *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen in den Konzentrationen 0,025 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL und 0,2 mg/mL in 25 cm² Gewebekulturflaschen 30 Minuten inkubiert. Voraussetzung für eine hohe Gesamtproteinmenge war, dass die Zellen einen Monolayer ausgebildet hatten. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Wurden Inhibitoren hinzugegeben, fand dies immer 30 Minuten vor Zugabe der Procyanidine statt.

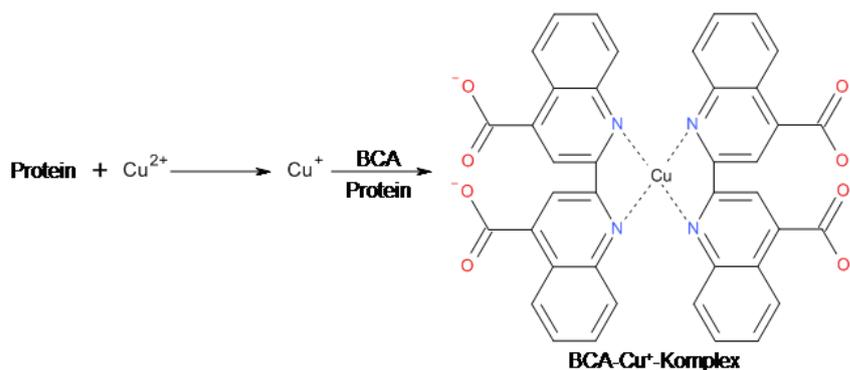
2.8.3 Probenherstellung

Der RIPA-Puffer ist einer der am häufigsten verwendeten Lyse-Puffer für adhärenzte Zellkulturen zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration. Er bewirkt eine Freisetzung von cytoplasmatischen, membrangebundenen und nuklearen Proteinen. Nach Absaugen des Kulturmediums der unbehandelten und vorbehandelten Zellen wurden die entsprechenden Gewebekulturflaschen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, 0,35 mL eiskalter RIPA-Puffer hinzugegeben und homogen verteilt. Um eine Proteasefunktion oder Phosphorylierung der Proteine zu verhindern, wurden Protease- und Phosphatasehemmstoffe dem Puffer beigefügt. Die Zellkulturflaschen wurden 5

Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem sterilen Zellschaber wurden die teils abgelösten Zellen zusammengeschoben, mit der Pipette in Mikrotubes überführt und 15 Minuten unter Kühlung bei rund 14000 x g zentrifugiert. Die gelösten Proteine befanden sich im Überstand und wurden aliquotiert bei -80 °C gelagert. Die Proteinbestimmung fand stets vor der Lagerung statt.

2.8.4 Proteinquantifizierung mittels BCA-Methode

Bei der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode zur Gesamtproteinbestimmung wird die Menge an Gesamtprotein spektralphotometrisch quantifiziert. Die zugrunde liegende chemische Reaktion beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren, welche dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden, der bei 562 nm absorbiert und somit vermessen werden kann.



Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Zur Berechnung der Proteinkonzentration der Proben, diente eine BSA-Kalibriergerade (0 - 2000 µg/mL). Je 25 µL der Zellysate wurden in einer Doppelbestimmung durch Zugabe der mit gelieferten Arbeitslösung (Pierce; Reagenz A und Reagenz B (1:20; V/V)) spektralphotometrisch gemessen.

2.8.5 Auftrennung und Detektion der Proteine

2.8.5.1 SDS-PAGE

Die nach Kap. 2.8.4 gewonnenen, quantifizierten Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Red Loading Puffer versetzt und bei 100 °C temperiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und vor dem Auftragen auf das Gel 5 Minuten bei 600 x g zentrifugiert.

Tab. 2.8-1 Einsatz der Gesamtproteinmenge zur Quantifizierung des Zielproteins

Zielproteine	Gesamtproteinmenge (µg)
p-Akt Ser473	20
p-eNOS Ser1177	48
Akt	20
eNOS	48

Für die elektrophoretische Trennung (SDS-PAGE) wurden Gradientengele (8 – 16 %iges Trenngel) oder 8%ige Trenngele verwendet. Nach dem Einklemmen des Trenngels in die Elektrophorese-Apparatur wurde das Gel mit SDS-Laufpuffer überschichtet und die Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Spannung wurde im Sammelgel zunächst konstant auf 80 V gehalten und nach Übergang ins Trenngel auf 140 V hochreguliert.

2.8.5.2 Äquibrierungsphase

Nach vorsichtigem Herauslösen des Gels aus der Apparatur schloss sich eine 15minütige Äquibrierungsphase in einem Transferpuffer (Towbin-Puffer) an, welcher das Gel von Salzen und Detergenzien befreite und es für das semi-dry Blotting-Verfahren vorbereitete.

2.8.5.3 Semi-dry Blotting

In der Elektrophoresekammer wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Trägermembran übertragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes traten die aufgetrennten Proteine in Wechselwirkung mit der Membran

und es kommt zu einem Transfer der Proteine von der Kathode hin zur Anode. Hierbei bleibt die Proteinsequenz erhalten.

2.8.5.4 Blocken der Membran

Vor der Antikörper-Zugabe, wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen blockiert, damit nach Zugabe des Erst-Antikörpers nur eine spezifische Bindung an dem nachzuweisenden Protein stattfinden kann. Beim Nachweis von phosphorylierten Proteinen musste PBS auf Grund der enthaltenen Phosphate gegen TBS als Puffergrundlage ausgetauscht werden.

2.8.5.5 Erst-Antikörper

Zur Quantifizierung von bestimmten Proteinen wurden spezifische Antikörper auf die Membran gegeben. Bei dem Erst-Antikörper für phosphorylierte Proteine (p-eNOS- und p-Akt-AK: 1:1000) wurde der Anteil von 5 % Milchpulver gegen 5 % BSA (p-eNOS- und p-Akt- AK: 1:1000) ausgetauscht. Dies war nötig, da das im Milchpulver enthaltene Phosphoprotein Casein und der Phospho-Antikörper unspezifisch binden können. Als Lösungspuffer diente hier TBS-T Blockpuffer. Die Ladekontrollen bildeten die Akt- und eNOS-Antikörper (1:1000). Diese wurden in Milchpulver-Blockpuffer aus PBS-T gelöst, auf die Membran aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 4-mal für 5 Minuten mit der entsprechenden Waschpufferlösung gewaschen.

2.8.5.6 Zweit-Antikörper und Blot-Detektion

Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (gelöst in Milchpulver-Blockpuffer aus PBS-T; 1:3000) kam es zu einer spezifischen Antikörper-Antikörper-Bindung. Anschließend wurde die Membran 4-mal für 5 Minuten mit der entsprechenden Waschpufferlösung gewaschen. Der gebundene Zweit-Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish

peroxidase) gekoppelt. Bei Zugabe des Detektionsreagenzes (ECL-Detektions-Kit, GE Healthcare) wurde das im Kit enthaltene Luminol oxidiert. Die entstehende Chemilumineszenz wurde für die Entwicklung der Röntgenfilme ausgenutzt. Dieser Entwicklungsschritt fand in einer Dunkelkammer statt.

2.8.5.7 Auswertung

Die Banden auf den entwickelten Röntgenfilmen wurden densitometrisch ausgewertet. Diese Methode beruht darauf, dass die Pixel einer Bande äquivalent zu der jeweiligen Enzymmenge sind. Durch dieses Verfahren ist es möglich, Blots mit Hilfe einer geeigneten Software (ImageJ) semiquantitativ auszuwerten und in einem Balkendiagramm darzustellen. Die gewonnenen Daten aus mindestens 3 - 4 unabhängigen Versuchen wurden gemittelt.

2.9 Intrazelluläre ROS-Bestimmung

Durch den Fluoreszenzindikator 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) ist es möglich, intrazellulär gebildetes ROS zu detektieren und einen quantitativen Zusammenhang zu erfassen.

2.9.1 Testsubstanzen und Reagenzien

Die Stammlösungen der Testsubstanzen (0,5 mg/mL, Ethanol 90%) wurden mit PBS verdünnt, so dass pro Well eine Konzentrationsreihe zwischen 0,05 und 0,25 mg/mL erreicht wurde. Vorversuche zeigten, dass sich die Ethanolkonzentration ($\leq 0,5$ %) nicht negativ auf das Ergebnis auswirkt. Die Positivkontrolle (0,01 mg/mL LPS) wurde als Überprüfung der Durchführung des Assays herangezogen. Die weitere Versuchsanordnung ist in Tab. 2.9-1 dargestellt. Für alle Schritte wurden Doppelbestimmungen angefertigt. Die Stammlösung von DCFH-DA in DMSO/PBS (3:7; V/V) wurde frisch hergestellt (0,5 mg/mL). Die Stammlösung wurde auf die Wellkonzentration von 5 μ M mit PBS verdünnt.

Tab. 2.9-1 Übersicht der Versuchsanordnung (DCFH-DA-Assay)

	Procyanidine	LM _{Procyan.}	DCFH-DA	LM _{DCFH-DA}	HUVECs
<i>Nelia</i>	•	•	•	•	•
<i>Salix</i>	•	•	•	•	•
Kontrolle	-	•	•	•	•
LM-Abgleich Kontrolle	-	•	-	•	•
Negativkontrolle* <i>Nelia</i>	•	•	-	-	•
Negativkontrolle* <i>Salix</i>	•	•	-	-	•
Nullabgleich Kontrolle*	-	•	-	-	-
Nullabgleich** <i>Nelia</i>	•	•	-	-	-
Nullabgleich** <i>Salix</i>	•	•	-	-	-

* Zur Überprüfung der Eigenabsorption im Messbereich

** Der Nullabgleich diente als Ausschluss einer Reaktion des Fluoreszenzindikators mit den Procyanidinen.

2.9.2 Versuchsdurchführung

Nach Auszählung der trypsinisierten Zellen, wurden diese in eine schwarze 96-Well Zellkulturplatte mit flachem, durchsichtigen Boden mit 10^4 Zellen je Well ausgesät. Nach Erreichen von Konfluenz (24 - 48 Stunden) wurden die Testextrakte mit supplementfreiem Medium vermischt, um die jeweilige Zielkonzentrationen (0,25 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL) zu erhalten. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das überstehende Medium abgesaugt und der adhärenente Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die HUVECs unter Lichtausschluss mit 100 μ L 5 μ M DCFH-DA-Lösung je Well versetzt und weitere 20 Minuten inkubiert. Nach zweifacher Waschung mit PBS wurden die Wells mit je 100 μ L PBS überschichtet. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzfilter bei 485/525 nm vermessen.

2.9.3 Auswertung

Die Messwerte wurden aus der Magellan-Software des Mikrotiterplattenreaders exportiert und mittels Microsoft-Excel 2010 ausgewertet. Alle doppeltbestimmten Werte wurden zunächst gemittelt. Von allen Rohdaten wurden die Floreszenzabsorptionen der Negativkontrollen (bzw. Lösungsmittelabgleich) und

der Nullabgleiche subtrahiert. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt. Die graphische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in Bezug zur Verdünnungsreihe der Testsubstanzen erfolgte in einem Balkendiagramm.

2.10 MTT-Assay

Mit dem MTT-Test lässt sich die Viabilität von Zellen nachweisen. Mit diesem Verfahren kann man toxische Einflüsse von Testsubstanzen auf Zellen durch spektralphotometrische Messung erfassen.

2.10.1 Testsubstanzen und Reagenzien

Die Stammlösungen der polyphenolischen Testsubstanzen (0,5 mg/mL, Ethanol 96 %) wurden mit Medium auf die entsprechenden finalen Konzentrationen verdünnt (0,20 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,05 mg/mL). Vorversuche schlossen eine Beteiligung des Ethanols ($\leq 0,5$ %) an der Reaktion oder einen Einfluss auf das Ergebnis aus. Eine Kontrolle und deren Lösungsmittelabgleich sowie eine Konzentrationsreihe für die Testsubstanzen mit den dazugehörigen Negativkontrollen (zur Überprüfung der Eigenabsorption im Messbereich) wurden angefertigt. Der Nullabgleich diente als Ausschluss einer Reaktion zwischen Testsubstanz und MTT-Lösung. Alle Lösungen wurden doppelt bestimmt.

Zusätzlich wurde eine Stammlösung von steril filtrierter 10%iger MTT-Lösung frisch hergestellt (5 mg/mL in PBS). DMSO wurde ebenfalls vor Gebrauch steril filtriert.

2.10.2 Versuchsdurchführung

Die angefertigte Zellsuspension der HUVECs wurde in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis der

Monolayer ausgebildet war (24 - 48 Stunden). Die Testsubstanzen wurden mit supplementarmen Medium vermischt, um die jeweiligen erforderlichen Zielkonzentrationen (0,25 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL) im Well zu erhalten. Nach 24-stündiger Einwirkungszeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen und der Zellrasen einmal mit sterilen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Wells für 4 Stunden mit einer 10 %igen steril filtrierte MTT-Lösung versetzt. Zur Solubilisierung der wasserunlöslichen violetten Kristalle wurden 100 µL steril filtrierte DMSO pro Well hinzugefügt und 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Absorptionen (Messabsorption bei 570 nm und Referenzabsorption bei 630 nm) wurden mittels Mikrotiterplattenreader (Software: Magellan) vermessen.

2.10.3 Auswertung

Die erhaltenen Daten wurden nach Microsoft Excel 2010 exportiert und ausgewertet. Alle doppeltbestimmten Werte wurden zunächst gemittelt. Um den zytotoxischen Einfluss der Testsubstanzen darzustellen, wurden die Messwerte auf die Daten der unbehandelten Zellen (100 % Viabilität) bezogen. Von allen Rohdaten wurden die Absorptionen der Negativkontrollen (bzw. Lösungsmittelabgleich), der Nullabgleiche und der Referenzen subtrahiert. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden 4 unabhängige Versuche durchgeführt. Die Resultate wurden mittels eines Balkendiagramms dargestellt.

2.11 Xanthinoxidase-Assay

Durch kinetische Messung lässt sich *in vitro* mittels des Xanthinoxidase-Assays das O₂-Abfangpotential verschiedener Testsubstanzen photometrisch bestimmen.

2.11.1 Testsubstanzen und Reagenzien

Die verwendeten Testsubstanzen wurden in Ethanol gelöst (20 mg/mL) und mittels PBS/EDTA entsprechend verdünnt. Der Endkonzentrationsbereich lag bei

0 - 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Well (immer sechs verschiedene Konzentrationspunkte). Die finale Well-Konzentration betrug $< 0,5 \%$ Ethanol und hatte keine Auswirkungen auf den Testverlauf.

Die Stammlösungen aus Allopurinol (Positiv-Kontrolle; $525 \mu\text{M}$), NBT (Indikator; $833,33 \mu\text{M}$) und Hypoxanthin (Substrat; $1,67 \text{ mM}$) wurden vor Versuchsbeginn mit PBS/EDTA ($0,1 \text{ mM EDTA}$; $\text{pH } 7$) verdünnt. Die finale Konzentration im Well von NBT und Hypoxanthin betrug je $100 \mu\text{M}$. Allopurinol hatte im Well eine Konzentration von $15,75 \mu\text{M}$. Die weitere Versuchsanordnung ist in Tab. 2.11-1 dargestellt. Für alle Schritte wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Unter sterilen Bedingungen wurde aus der Ammonium-Sulfat-Suspension der Xanthinoxidase (XO) eine Stammlösung von $0,48 \text{ U}/\text{mL}$ in PBS/EDTA hergestellt. Die Endkonzentration im Well betrug 12 mU .

Tab. 2.11-1 Übersicht der Versuchsanordnung (Xanthinoxidase-Assay)

	Procyanidine	NBT	Hypoxanthin	Xanthinoxidase
<i>Nelia</i>	•	•	•	•
<i>Salix</i>	•	•	•	•
<i>Pelargonium</i>	•	•	•	•
Kontrolle	-	•	•	•
LM-Abgleich	-	•	•	-
Negativkontrolle <i>Nelia</i> *	•	•	•	-
Negativkontrolle <i>Salix</i> *	•	•	•	-
Negativkontrolle <i>Pelarg.</i> *	•	•	•	-

* Ausgleich der Eigenabsorptionen

2.11.2 Versuchsdurchführung

Je $75 \mu\text{L}$ der unterschiedlichen Konzentrationspunkte der Verdünnungsreihe, sowie die Kontrolle, Negativ- und Positivkontrolle, wurden in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt und mit $25 \mu\text{L}$ der XO-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationsphase von 5 Minuten unter Lichtausschluss bei RT wurden $75 \mu\text{L}$ der NBT-Arbeitslösung hinzupipettiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des

Substrats (75 μ L Hypoxanthin-Lösung) gestartet und über einen Zeitraum von 15 Minuten in einem Mikroplattenreader minütlich bei 550 nm vermessen. Die Füllhöhe in allen Wells blieb konstant und wurde, falls nötig, mit den jeweiligen Pufferlösungen ergänzt.

2.11.3 Auswertung

Alle doppelt bestimmten Messwerte wurden gemittelt und graphisch gegen die Zeit dargestellt. Der linear ansteigende Bereich wurde regressiert und die entsprechenden Steigungen berechnet. Folgend wurden die erhaltenen Daten im relativen Bezug zur Kontrolle graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Die Kurvenverläufe wurden ebenfalls regressiert und aus der Geradengleichung die halb maximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) ermittelt. Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

2.12 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-(DPPH-) Assay

2.12.1 Testsubstanzen

Die Stammlösungen der Testsubstanzen (*Salix*- und *Nelia*-Procyanidine) wurden in Methanol hergestellt (0,2 mg/mL). Für den *Pelargonium*-Extrakt wurde aus Löslichkeitsgründen eine Stammlösung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) angefertigt. Alle Verdünnungsschritte wurden mit Methanol vorgenommen. Die Endkonzentrationen der Testsubstanzen im Well lagen zwischen 0 - 18 μ g/mL.

2.12.2 Reagenzien

Das DPPH-Radikal wurde in Methanol gelöst (Stammlösung: 1,07 mg/mL). Die Endkonzentration im Well betrug 80 μ g/mL. Die Stammlösung der Positivkontrolle α -Tocopherol wurde so verdünnt, dass bei 50 μ L Zugabe eine Endkonzentration von 16 μ g/mL im Well vorlag. Des Weiteren wurden eine Kontrolle (Methanol und DPPH-Lösung) und die Negativkontrollen (zum

Ausschluss der Eigenabsorptionen der unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen) vorbereitet (Abb. 2-5).

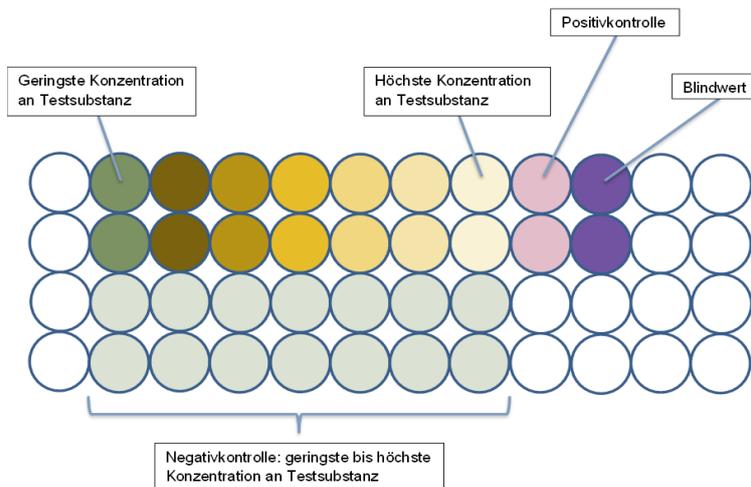


Abb. 2-5: Übersicht der Versuchsanordnung

2.12.3 Versuchsdurchführung

Nach Zugabe von 50 μL der aufgeführten Reaktionslösungen wurden 150 μL der frisch hergestellten DPPH-Lösung hinzu pipettiert. Die 96-Well Mikrotiterplatte mit flachem, schwarzen Boden wurde unter Lichtausschluss 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Absorptionen mittels Mikrotiterplattenreader bei 550 nm vermessen. Alle Messwerte wurden doppelt bestimmt.

2.12.4 Auswertung

Die Messwerte der unterschiedlichen Testkonzentrationen wurden gemittelt und relativ auf die als 100 % definierte Kontrolle bezogen. Von allen Rohdaten wurden die Absorptionen der Negativkontrollen bzw. des Lösungsmittelabgleichs subtrahiert. Durch graphische Darstellung der prozentualen DPPH-Konzentration in Bezug zu den Konzentrationen der Testsubstanzen, ergibt sich ein lineares Verhältnis zueinander. Die aus 4 - 6 unabhängigen Versuchsreihen regressierten IC_{50} -Werte wurden dargestellt.

2.13 Bestimmung des NO-Radikalfängerpotentials mittels Griess-Assay

Der Griess-Assay dient zur Bestimmung der Nitritkonzentration. Für die Untersuchung des NO-Radikalfängerpotentials der Testsubstanzen wurde ein modifizierter Griess-Assay angewendet. Durch Zugabe von Nitroprussid-Natrium und anschließender UV-Exposition kommt es zur Bildung von Nitrit. In Gegenwart von Radikalfängern ist es möglich, die Abnahme der Nitritkonzentration in Abhängigkeit der Konzentrationen der Testsubstanzen zu ermitteln.

2.13.1 Testsubstanzen und Reagenzien

Eine geometrische Verdünnungsreihe wurde aus der Stammlösung der Testsubstanzen (10 mg/mL) mit dem in Tab. 2.13-1 genannten Lösungsmitteln angefertigt. Durch Vorversuche konnte eine grobe Abschätzung der IC₅₀-Werte vorgenommen und die Verdünnungsreihe demnach angepasst werden. Nitroprussid-Natrium (SNP) wurde bei jeder Bestimmung frisch in PBS gelöst (2 mg/mL) und so verdünnt, dass die Endkonzentration im Well bei 23,95 µmol/mL lag. Die weitere Versuchsanordnung ist in Tab. 2.13-1 dargestellt. Für alle Schritte wurden Doppelbestimmungen angefertigt.

Tab. 2.13-1 Endkonzentration der Testsubstanzen zur Bestimmung des NO-Radikalfänger-Potentials (Griess-Assay)

	Höchste CTS*	Niedrigste CTS*	Lösungsmittel (V/V)	C _{SNP} * ($\mu\text{mol/mL}$)
Epicatechin	225 $\mu\text{mol/mL}$	125 $\mu\text{mol/mL}$	EtOH/PBS (50/50)	23,95
Epigallocatechingallat	175 $\mu\text{mol/mL}$	75 $\mu\text{mol/mL}$	EtOH/PBS (50/50)	23,95
Catechin	300 $\mu\text{mol/mL}$	100 $\mu\text{mol/mL}$	EtOH/PBS (50/50)	23,95
<i>Nelia</i> -Procyanidine	125 $\mu\text{g/mL}$	75 $\mu\text{g/mL}$	EtOH/PBS (50/50)	23,95
<i>Salix</i> -Procyanidine	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	EtOH/PBS (50/50)	23,95
<i>Pelargonium</i> -Extrakt	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	EtOH/PBS (30/70)	23,95
Kontrolle 1	-	-	EtOH/PBS (50/50)	23,95
Kontrolle 2	-	-	DMSO/PBS (30/70)	23,95
LM-Abgleich 1	-	-	EtOH/PBS (50/50)	-
LM-Abgleich 2	-	-	DMSO/PBS (30/70)	-

*Endkonzentration im Well

2.13.2 Versuchsdurchführung

Jeweils 50 μL der Verdünnungsreihe der Testsubstanzen und aller Abgleiche, wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Direkt nach der Zugabe von 100 μL SNP-Lösung wurde die Platte 20 Minuten reproduzierbar mit einer UV-Lampe bestrahlt. Nach der Inkubationszeit wurden 100 μL eines Gemisches der Griess-Lösung A und Griess-Lösung B (1:1) hinzugegeben und sofort bei 560 nm photometrisch vermessen.

2.13.3 Auswertung

Der Kontrollwert (nach Abzug des Lösungsmittelabgleiches) entspricht 100 % Nitritproduktion. Die doppelt bestimmten Absorptionswerte der Testsubstanzen-Konzentrationsreihen wurden jeweils, abzüglich der Absorptionen der zugehörigen Negativkontrollen, gemittelt. Durch graphische Darstellung der prozentualen Nitrit-Konzentration, in Bezug zur Konzentration der Testsubstanzen, ergibt sich ein lineares Verhältnis. Die regressierten IC₅₀-Werte wurden aus 4 - 6 unabhängigen Versuchen dargestellt.

2.14 Statistik

Alle ermittelten Rohdaten der Experimente wurden unabhängig voneinander mehrfach wiederholt. Alle Daten stellen das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) dar. Auf Unterschiede zwischen zwei Behandlungsgruppen wurde mit Hilfe des Student's-t-Test geprüft. Wurden mehr als zwei Behandlungsgruppen miteinander verglichen, kam die einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni Post-hoc-Test zur Anwendung. Unterschiede der Mittelwerte wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$ waren. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Inhibitionsstudien zur Untersuchung des relaxierenden Potentials der polyphenolischen Extrakte und Fraktionen

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Polyphenol-vermittelten Relaxation an Koronararterien des Schweins wurden die folgenden Inhibitionsstudien durchgeführt. Die Schweinekoronararterie wurde als pharmakologisches *in vitro*-Modell gewählt, da sich Mensch und Schwein in Bezug auf Anatomie, Histologie und Biochemie stark ähneln (Miller und Ullrey, 1987; Nikol et al., 2001).

Die verwendeten polyphenolischen Testsubstanzen, *Nelia meyeri* SCHWANT., *Salix* spp., *Pelargonium sidoides* DC., *Crataegus* spp., *Crataegus oxyacantha* L. und *Betula* spp. (Tab. 2.4-1-Polyphenolische Testsubstanzen) wurden an Arterien mit einem Innendurchmesser ≥ 2 mm mit funktionstüchtigem Endothel getestet. Ziel der Untersuchung war es, nähere Informationen über mögliche Signalkaskaden in Bezug auf das Relaxationsvermögen der polyphenolischen Extrakte und procyanidinhaltigen Fraktionen zu erhalten.

3.1.1 Dilatierende Effekte der Polyphenole

Die Polyphenole aus *Nelia meyeri* SCHWANT., *Salix* spp., *Pelargonium sidoides* DC., *Crataegus* spp., *Crataegus oxyacantha* L. und *Betula* spp. (Abb. 3-1) induzierten eine vollständige und spontane konzentrationsabhängige Relaxation vorkontrahierter Arterien (Abb. 3-1). Das jeweilige Relaxationsmaximum (E_{\max}), die errechneten IC_{50} -Werte und die Anzahl aller Tiere (n_{pooled}) sind in der untenstehenden Tabelle angegeben (Tab. 3.1-1 **Ermittelte Daten aller polyphenolischen Testsubstanzen**). Zur Überprüfung der Wirkung der polyphenolischen Testsubstanzen wurden zusätzlich Vehikel-Testungen durchgeführt, um mögliche dilatierende Effekte des Lösungsmittels auszuschließen (Abb. 3-2).

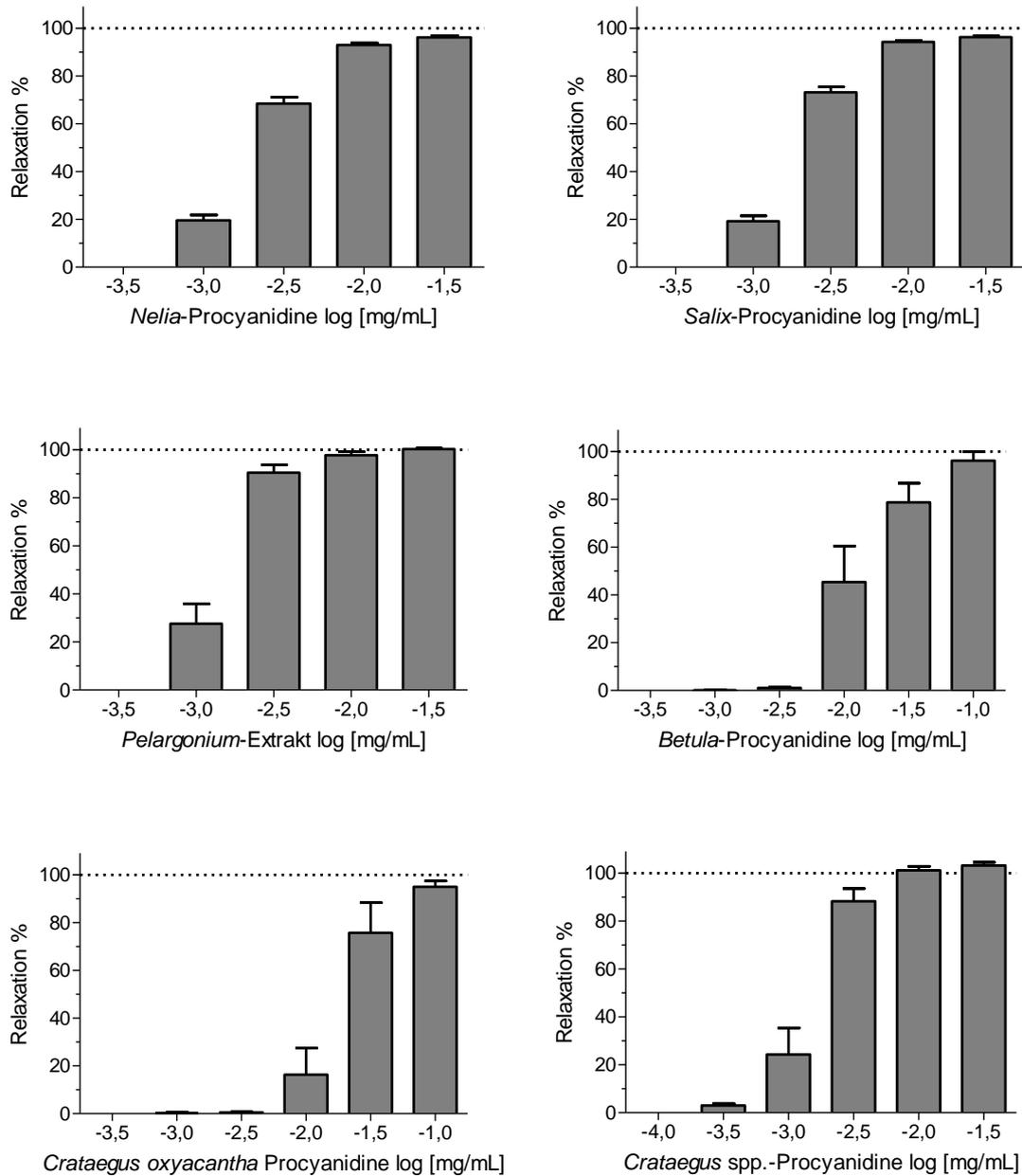


Abb. 3-1: Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaften der Testsubstanzen

Konzentrationsabhängige, relaxierende Effekte von *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine, des *Pelargonium*-Extraktes, der *Betula*-Procyanidine sowie von *Crataegus oxyacantha* L. und *Crataegus* spp.. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 6-119 Tiere).

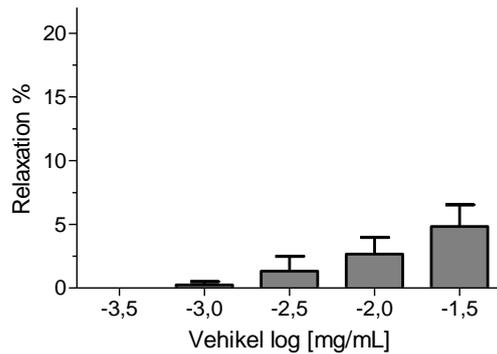


Abb. 3-2: Vehikel-Kontrolle

Effekte durch kumulative Zugabe des Lösungsmittels der Testsubstanzen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 7 Tiere).

Tab. 3.1-1 Ermittelte Daten aller polyphenolischen Testsubstanzen

Testsubstanzen	E_{max} (%)	$-\log IC_{50}$ (mg/mL)	Anzahl Tiere (n)
<i>Nelia</i> -Procyanidine	95,81 \pm 6,46	2,73 \pm 0,25	114
<i>Salix</i> -Procyanidine	95,97 \pm 7,4	2,77 \pm 0,47	119
<i>Pelargonium</i> -Extrakt	99,27 \pm 2,4	2,86 \pm 0,22	11
<i>Betula</i> -Procyanidine	96,45 \pm 10,18	1,85 \pm 0,25	6
<i>Crataegus oxycantha</i> -Procyanidine	93,97 \pm 6,25	1,07 \pm 1,37	6
<i>Crataegus</i> spp.-Procyanidine	102,30 \pm 4,1	2,81 \pm 0,21	8

3.1.2 Endothelabhängigkeit

Um die Relevanz eines funktionstüchtigen Endothels bezogen auf die relaxierenden Effekte der Testsubstanzen zu untersuchen, wurden Experimente mit mechanisch-entferntem Endothel durchgeführt. In den untersuchten Konzentrationsbereichen war das spontan-vermittelte Dilatationsvermögen der polyphenolischen Testsubstanzen fast vollständig aufgehoben (Abb. 3-3).

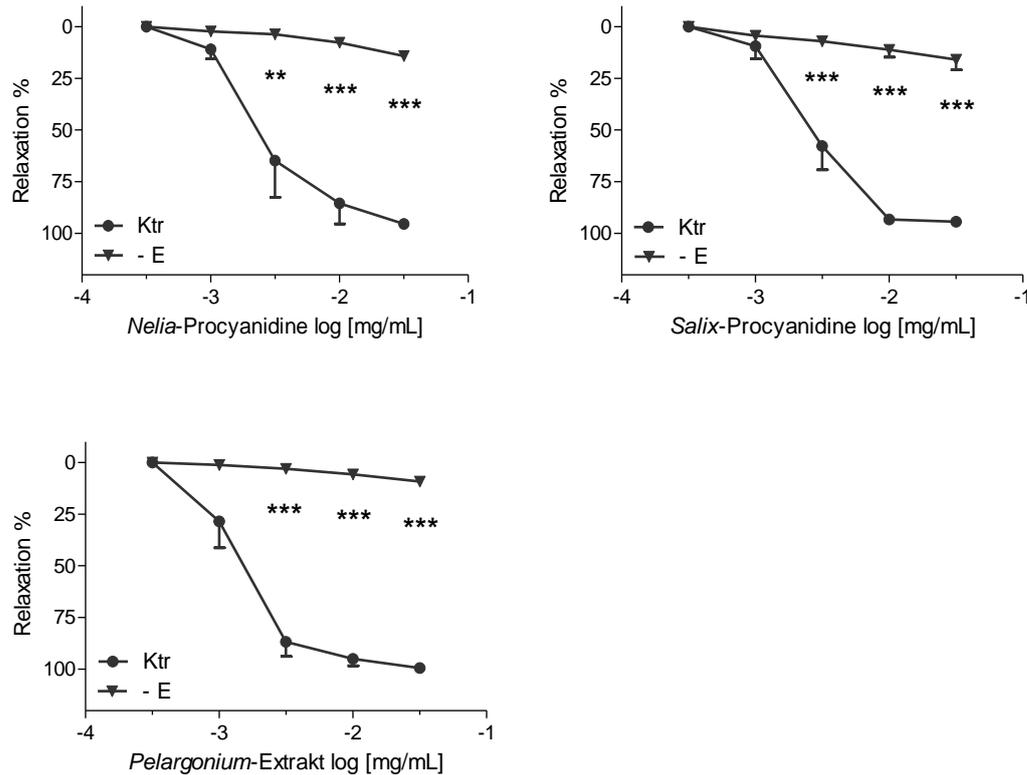


Abb. 3-3: Bedeutung des Endothels bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extraktes in An- und Abwesenheit des Endothels. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effektes in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 6 Tiere). **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$.

3.1.3 NO/cGMP-Signalweg

Eine Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade und die daran geknüpfte Relaxation des Gefäßes spielt eine bedeutende Rolle im Wirkmechanismus vieler polyphenolischer Pflanzenstoffe (Vgl. 1.6). Um genauere Informationen über die dilatierenden Eigenschaften der Procyanidine zu erhalten, wurde die Beteiligung der eNOS und der sGC untersucht.

In stetiger Gegenwart des NOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M) kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve aller getesteten polyphenolischen Substanzen. Gleichzeitig führt die Zugabe der jeweiligen Testsubstanz, mit Ausnahme von *Crataegus oxyacantha* L., zu einer signifikanten Abnahme des E_{max} -Wertes (Abb. 3-4). Die *Crataegus*-Kurve ist unter Einwirkung von L-NAME nach rechts verschoben.

In Anwesenheit des selektiven Guanylylcyclase (sGC)-Inhibitors ODQ (32 μ M) tritt eine signifikante Rechtsverschiebung der Kurve und – mit Ausnahme der *Nelia*-Procyanidine – eine Reduktion des E_{max} -Wertes auf (Abb. 3-5).

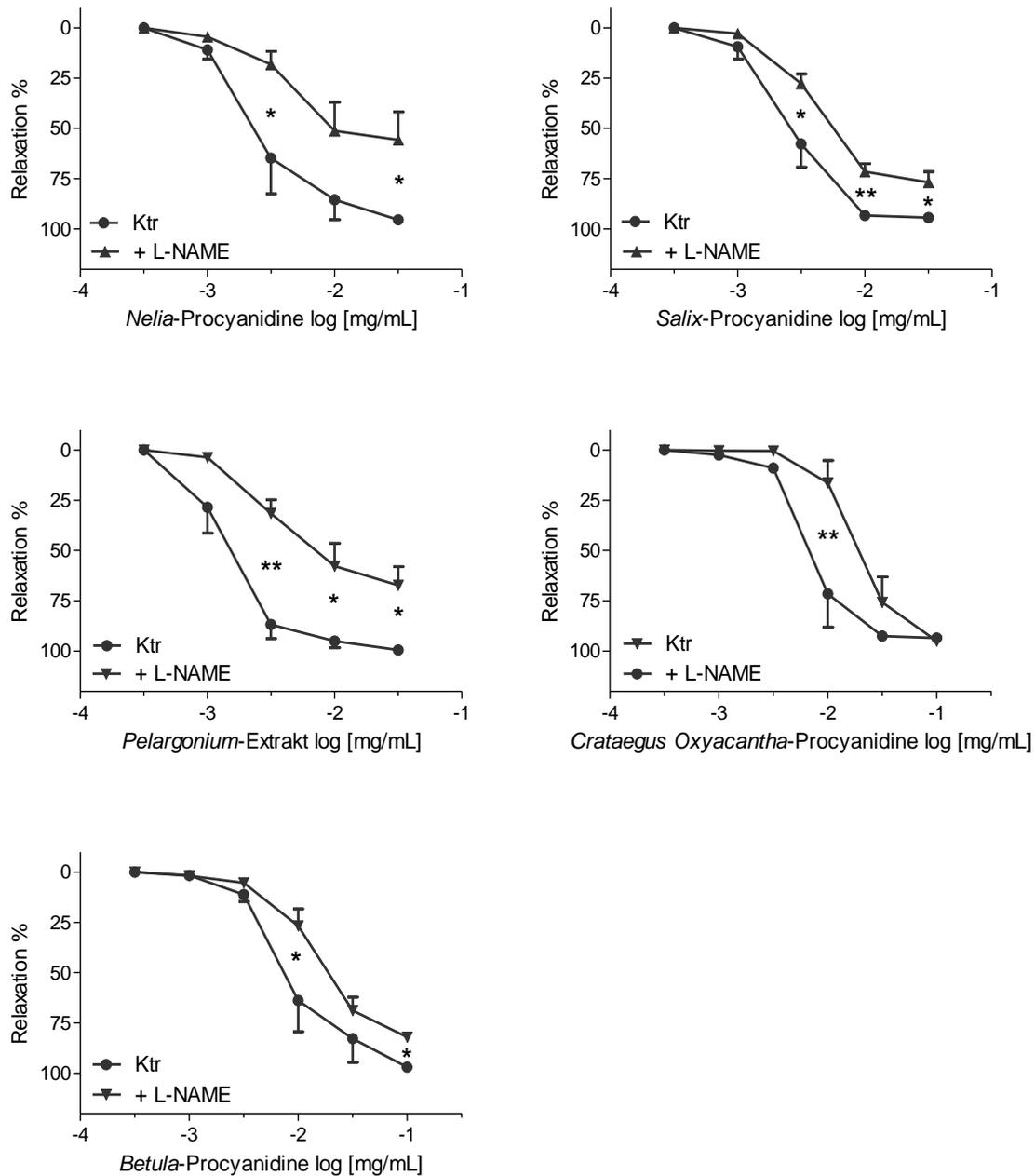


Abb. 3-4: Bedeutung der eNOS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte in An- und Abwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M) ausgelöst durch die polyphenolischen Testsubstanzen *Nelia meyeri* SCHWANT., *Salix* spp., *Pelargonium sidoides* DC, *Crataegus oxyacantha* L. und *Betula* spp.. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 7 Tiere). *, P < 0,01; **, P < 0,001.

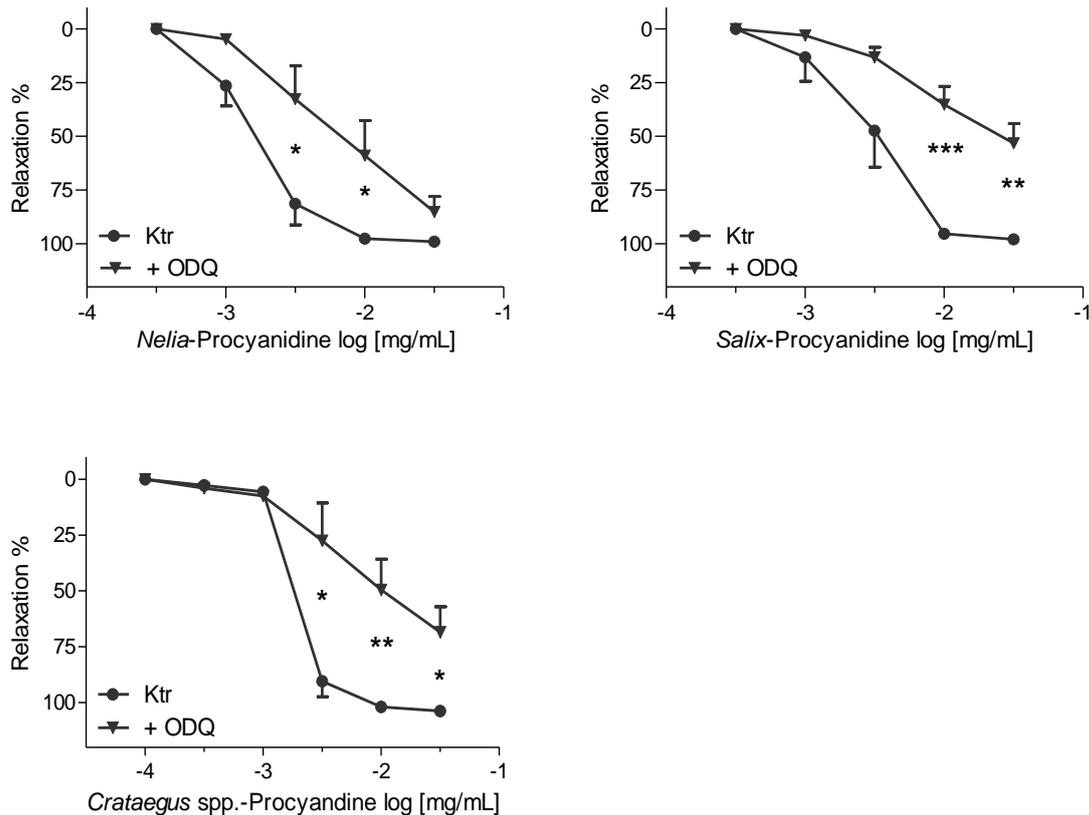


Abb. 3-5: Bedeutung der sGC bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrationsabhängige Effekte der Testsubstanzen (*Nelia*-, *Salix*- und *Crataegus* spp.-Procyanidine) in An- und Abwesenheit von dem sGC-Inhibitor ODQ (32 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 5 Tiere). *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$.

3.1.4 Kalium-Kanäle

1995 beschrieben Nelson und Quayle die Bedeutung von Kalium (K^+)-Kanälen im arteriellen Blutdruck und dessen Regulation über den Muskeltonus vor allem in kleinen Arterien und Arteriolen (Nelson und Quayle, 1995). Eine Aktivierung von K^+ -Kanälen wird einigen polyphenolischen Verbindungen und Extrakten zugeschrieben (Byun et al., 2012). Ziel dieser Untersuchungen war es, eine differenzierte Aussage über die Beteiligung von K^+ -Kanäle an der Procyanidin-vermittelten Relaxation zu erhalten.

3.1.4.1 ATP-sensitive Kalium-Kanäle (K_{ATP}) und Spannungs-abhängige Kalium-Kanäle (K_v)

Ein intrazellulärer ATP-Konzentrationsabfall bewirkt eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{ATP} (Grover und Garlid, 2000) und führt dadurch zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran (Sobey, 2001). K_v werden bei einer anhaltenden Depolarisation der glatten Muskelzelle aktiviert und bewirken eine Repolarisierung des elektrischen Membranpotentials zu einem stabilen Ruhepotential (Nelson und Quayle, 1995).

Weder die Anwesenheit des selektiven K_{ATP} -Inhibitors Glibenclamid (100 μ M) (Abb. 3-6) noch des unspezifischen K_v -Inhibitors 4-Aminopyridin (4-AP, 1 mM) (Abb. 3-7) konnte einen Einfluss auf die hervorgerufene Dilatation der Procyanidine an vorkontrahierten Gefäßen zeigen.

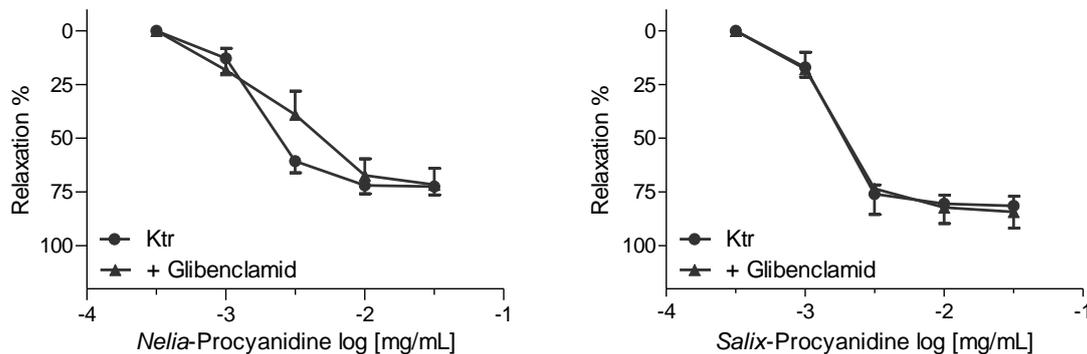


Abb. 3-6: Bedeutung der K_{ATP} -Kanälen bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des K_{ATP} -Inhibitors Glibenclamid (100 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent der KCl-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.4.2 Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K_{Ca}) der glatten Muskelzelle

In Gegenwart des unselektiven BK_{Ca} -Inhibitors Tetraethylammoniumchlorid (TEA, 1 mM) oder des selektiven BK_{Ca} -Inhibitors Iberiotoxin (IbTX, 100 nM) (Abb. nicht gezeigt) konnte keine Beeinflussung der Procyanidin-vermittelten Dilatation festgestellt werden (Abb. 3-7).

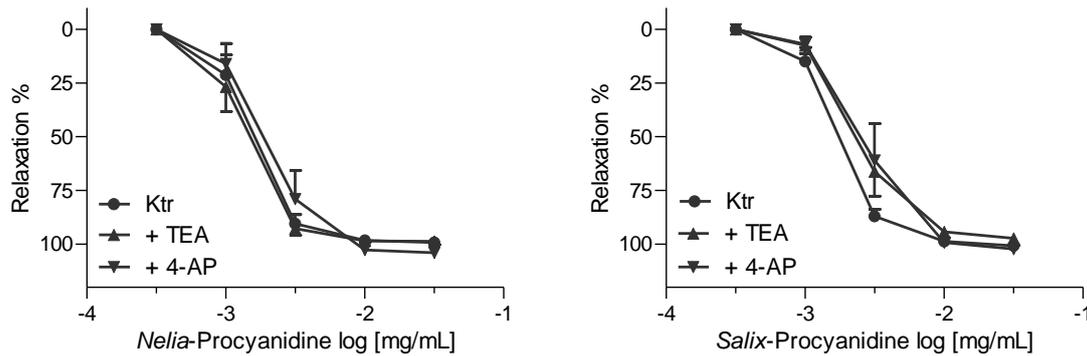


Abb. 3-7: Bedeutung von Kalium-Kanälen bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit der K^+ -Kanal-Inhibitoren 4-AP (1 mM) und TEA (1 mM). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.4.3 Calcium-abhängige Kalium (K_{Ca})-Kanäle (EDHF)

Neben der NO-vermittelten Blutgefäßdilataion trägt voraussichtlich auch der EDHF-Signalweg maßgeblich zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzelle bei (Félétou und Vanhoutte, 2009). EDHF steht vermutlich im Zusammenhang mit einer Öffnung von K_{Ca} -Kanälen und einer damit verbundenen Hyperpolarisation, die final zu einer Vasorelaxation führt. Die endotheliale K^+ -Kanalöffnung, insbesondere die des SK_{Ca} - (small-conductance K_{Ca}) und IK_{Ca} - (intermediate-conductance K_{Ca}) Typs, erfolgt durch intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in der Endothelzelle (Garland et al., 2011). Inhibitions-Experimente konnten bereits einen direkten Zusammenhang zwischen der Zugabe von Polyphenolen und der ausgelösten Hyperpolarisation durch K_{Ca} -Kanäle aufzeigen (Ndiaye et al., 2003).

Im Zuge dieser Versuchsreihe wurden die jeweiligen Einflüsse des selektiven SK_{Ca} -Kanal-Inhibitors Apamin (100 nM) oder des unselektiven BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Inhibitors Charybdotoxin (CTX; 100 nM) an Gefäßringen untersucht. Beide Inhibitoren zeigten alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungskurven der Testsubstanzen (Abb. nicht gezeigt). Auch eine Blockade der K_{Ca} -Kanäle mit der Kombination aus CTX und Apamin hatte keine Auswirkungen auf die dilatorischen Effekte der Procyanidine (Abb. 3-8).

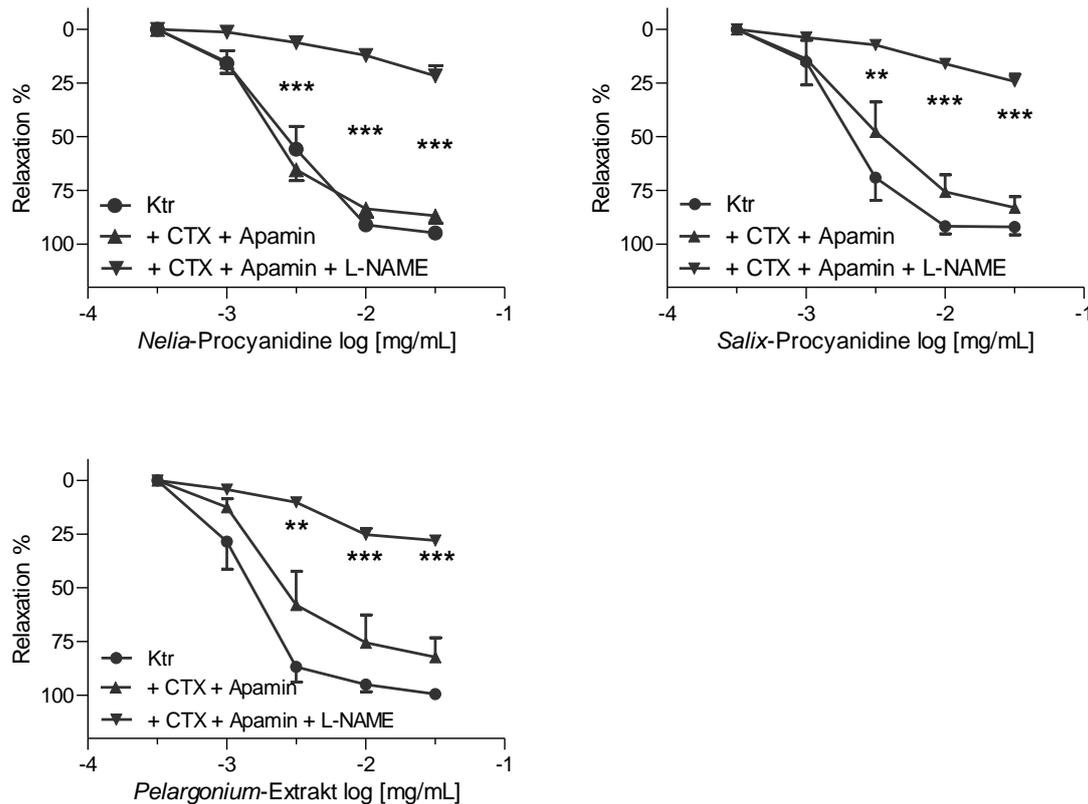


Abb. 3-8: Bedeutung der K_{Ca} -Kanäle allein sowie in Verbindung mit eNOS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*-, *Salix*- und der *Pelargonium*-Procyanidine in An- und Abwesenheit der K_{Ca} -Inhibitoren Charybdotoxin (CTX; 100 nM) und Apamin (Apa; 100 nM) sowie deren Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 5 - 6 Tiere). **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$.

Um konkrete Aussagen über eine K_{Ca} -abhängige Signalkaskade in Bezug auf die dilatatorischen Effekte der Procyanidine treffen zu können, wurde im folgenden Experiment der unspezifische K_{Ca} -Kanal-Blocker Charybdotoxin gegen den hoch selektiven IK_{Ca} -Blocker TRAM 34 ausgetauscht (Wulff et al., 2000).

In Gegenwart des Pyrazol-Analogons TRAM 34 (1 μ M) konnte kein signifikanter Effekt gegenüber dem Dilatationsvermögen der Testsubstanzen nachgewiesen werden (Abb. 3-9). Auch die Kombination TRAM 34 und Apamin zeigte keinen Einfluss auf die Endothel-abhängige Relaxation der Procyanidine (Abb. 3-9). Ergänzend wurden ebenso die Effekte durch selektive Inhibition der K_{Ca} -Kanäle

des Typs IK, SK und BK überprüft. Auch eine Co-Inkubation mit TRAM 34, Apamin und IbTX zeigte keine signifikante Beeinflussung der dilatorischen Wirkung der jeweiligen getesteten Procyanidine (Abb. 3-9).

3.1.4.4 Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K_{Ca}) und eNOS

Um mögliche Zusammenhänge des NO/cGMP Signalweges in Verbindung mit Ca^{2+} -abhängigen Kalium-Kanälen (IK_{Ca} und SK_{Ca}) zu untersuchen, wurde L-NAME (eNOS-Inhibitor; 200 μ M) sowie eine Kombination Apamin/CTX (Hemmung von K_{Ca} ; je 100 nM) gewählt. Durch Inhibition des NO/cGMP-Signalweges und der EDHF relevanten K_{Ca} -Kanäle waren die dilatorischen Effekte von *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen deutlich reduziert (Abb. 3-8). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Apamin, TRAM 34 und L-NAME gezeigt (Abb. 3-9). Der Zusatz von IbTX hatte keinen Einfluss (Abb. nicht gezeigt). Interessanterweise bewirkte der Zusatz von L-NAME zu den unterschiedlichen Kalium-Kanal-Blockern eine stärkere Inhibition der Relaxation als L-NAME alleine (Vgl. Abb. 3-8 und Abb. 3-9 mit Abb. 3-4).

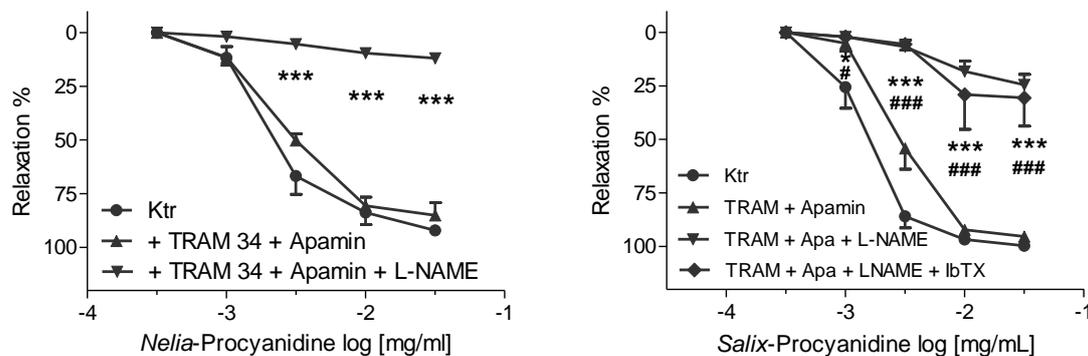


Abb. 3-9: Bedeutung der spezifischen K_{Ca} -Kanäle allein sowie in Verbindung mit eNOS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit der spezifischen K_{Ca} -Inhibitoren TRAM 34 (TRAM; 1 μ M) und Apamin (Apa; 100 nM) (■) und deren Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M)(▼), sowie in Verbindung mit IbTX (100 nM) (▲). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 5 Tiere). #, *, P < 0,01; ###, ***, P < 0,0001.

3.1.5 Gap-Junctions

Eine Gap-Junction-vermittelte Weiterleitung der durch Aktivierung der K_{Ca} -Kanäle entstandenen Hyperpolarisation wird vielfach diskutiert (Busse et al., 2002; Sandow et al., 2002). Um diesen Signalweg zu überprüfen, wurde der unspezifische Gap-Junction-Inhibitor Carbenoxolon (100 μ M) eingesetzt. Durch Hemmung der Gap-Junctions wurde die von *Nelia*- bzw. *Salix*-Procyanidinen ausgelöste Relaxation nicht beeinflusst (Abb. 3-10).

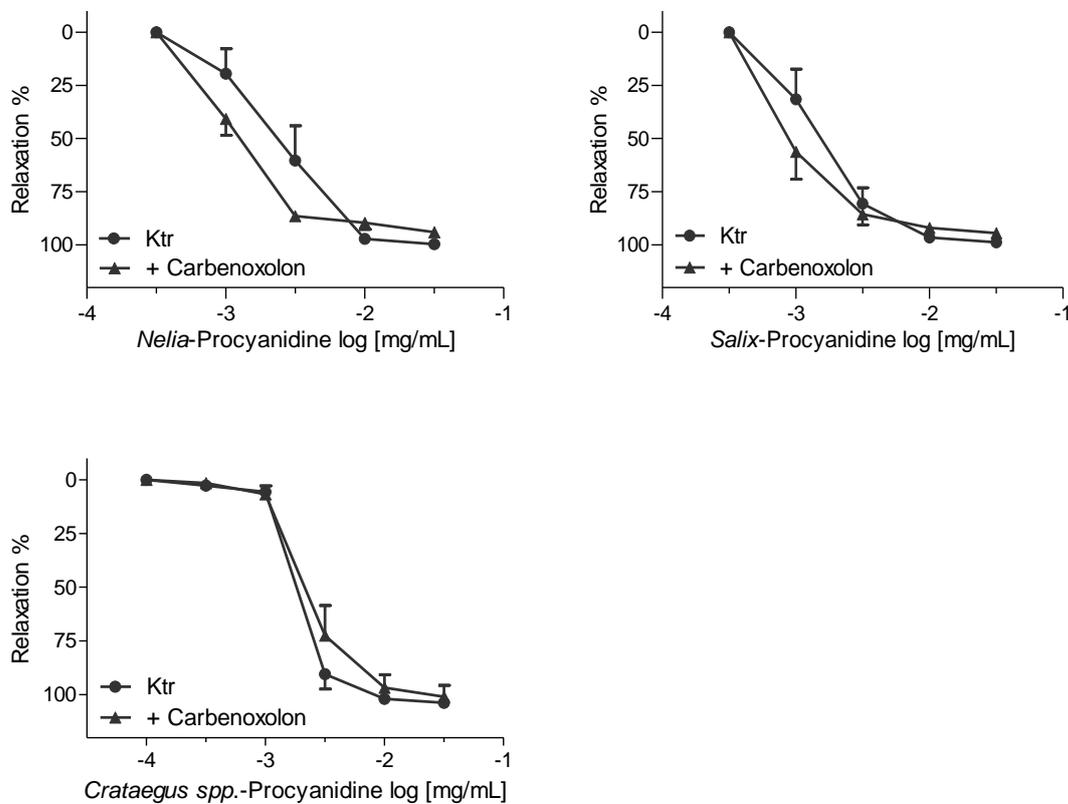


Abb. 3-10: Bedeutung der Gap-Junctions bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*-, *Salix*- und *Crataegus* spp.-Procyanidine in An- und Abwesenheit des Gap-Junctions-Inhibitors Carbenoxolon (100 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 6 Tiere).

3.1.6 Proteinkinasen

Die Beteiligung von Redox-sensitiven Proteinkinasen an der Polyphenol-vermittelten Relaxation ist schon mehrfach aufgezeigt worden (Stoclet et al., 2004; Schini-Kerth et al., 2010).

3.1.6.1 Proteinkinase-B (Akt)

Die Akt stellt in der Signalkaskade der Polyphenol-vermittelten Relaxation eines der Schlüsselproteine dar. Durch Aktivierung der Redox-sensitiven Phosphoinositid-abhängigen Akt wird diese in die phosphorylierte Form überführt (p-Akt) (Koolman und Röhm, 2009) und aktiviert anschließend die eNOS. Auch eine direkte Beeinflussung der K_{Ca} -Kanäle wird diskutiert (Stoclet et al., 2004; Schini-Kerth et al., 2010).

Durch selektive PI3K/Akt-Blockade mit dem Hemmstoff Wortmannin (30 nM) wurden die relaxierenden Effekte der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extraktes beinahe vollständig aufgehoben (Abb. 3-11).

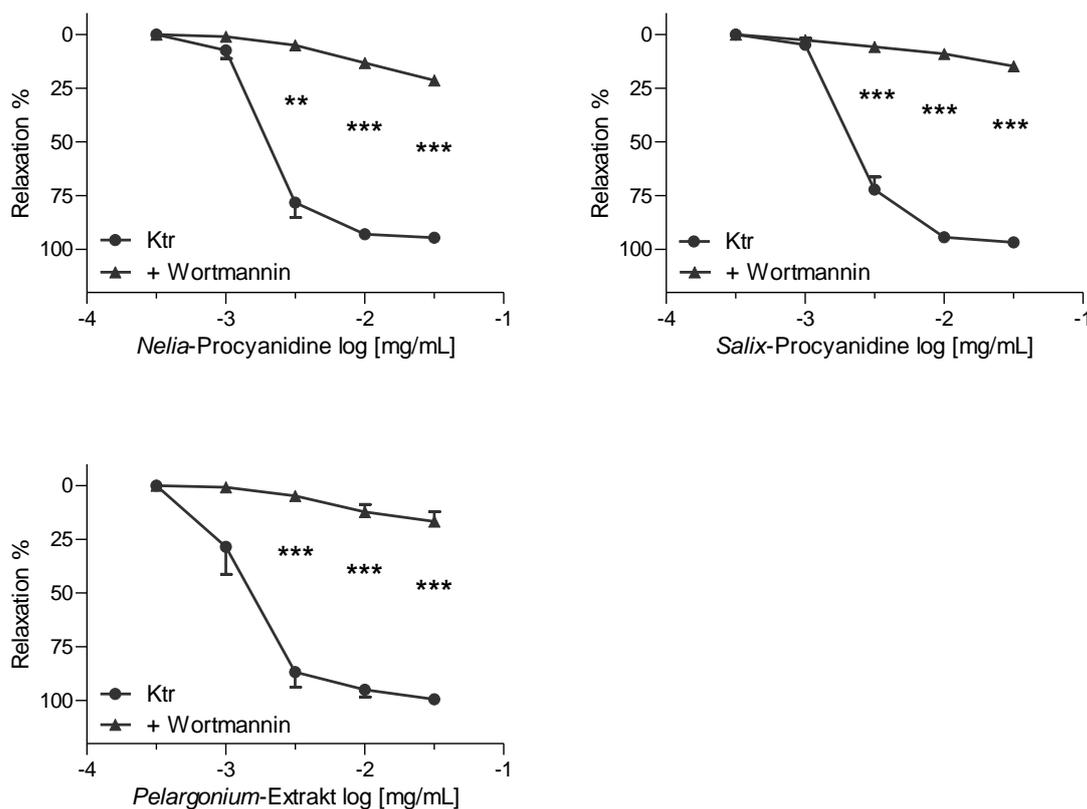


Abb. 3-11: Bedeutung der PI3K/Akt bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine und des *Pelargonium*-Extraktes in An- und Abwesenheit des PI3K/Akt-Inhibitors Wortmannin (30 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 5 Tiere). *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$.

3.1.6.2 MAP-Kinase

Zu den Mitogen-aktivierten Protein-(MAP)-Kinasen gehören die extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2) und die p38-MAP-Kinase. Sie haben die Aufgabe der Redox-sensitiven Aktivierung von Zielproteinen. Eine p38-MAP-Kinase-vermittelte Aktivierung der eNOS durch Schwarztee-Polyphenole konnte bereits nachgewiesen werden (Anter et al., 2005).

Weder in Anwesenheit des p38-MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 (10 μ M) noch des spezifische ERK1/2-Inhibitors PD98059 (50 μ M) konnten signifikante Veränderungen der Konzentrations-Wirkungskurve festgestellt werden (Abb. 3-12; Abb. 3-13).

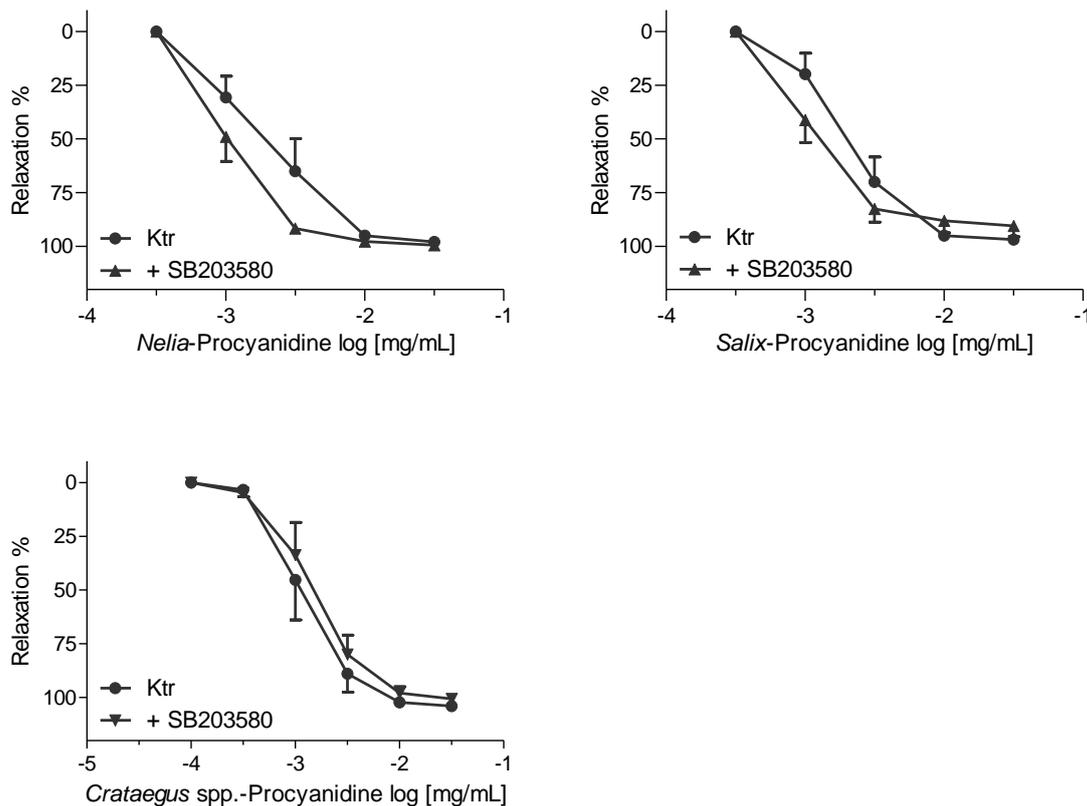


Abb. 3-12: Bedeutung der p38-MAP-Kinase bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*-, *Salix*- und *Crataegus* spp.-Procyanidine in An- und Abwesenheit des p38-MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 (10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 3 - 7 Tiere).

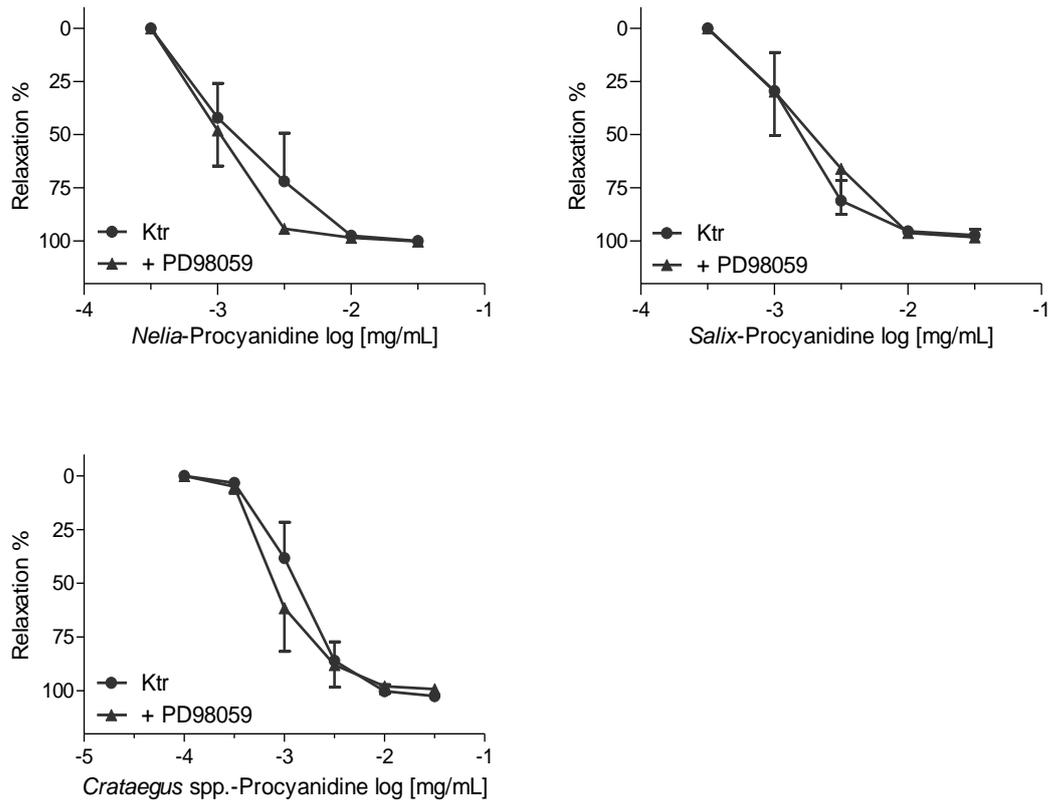


Abb. 3-13: Bedeutung der ERK1/2 bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*-, *Salix*- und *Crataegus* spp.-Procyanidine in An- und Abwesenheit des ERK1/2-Inhibitors PD98059 (50 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.6.3 VEGF-Rezeptor

Bei dem vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor handelt es sich um einen Tyrosin-Proteinkinase-Rezeptor. In der Literatur wurden bereits Flavonoide und Polyphenole als Inhibitoren des VEGF-Rezeptors beschrieben. (Lamy et al., 2002; Wen et al., 2008).

Der VEGF-Inhibitor Semaxanib (SU5416; 50 μ M) konnte die Relaxation der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine nicht beeinflussen (Abb. 3-14).

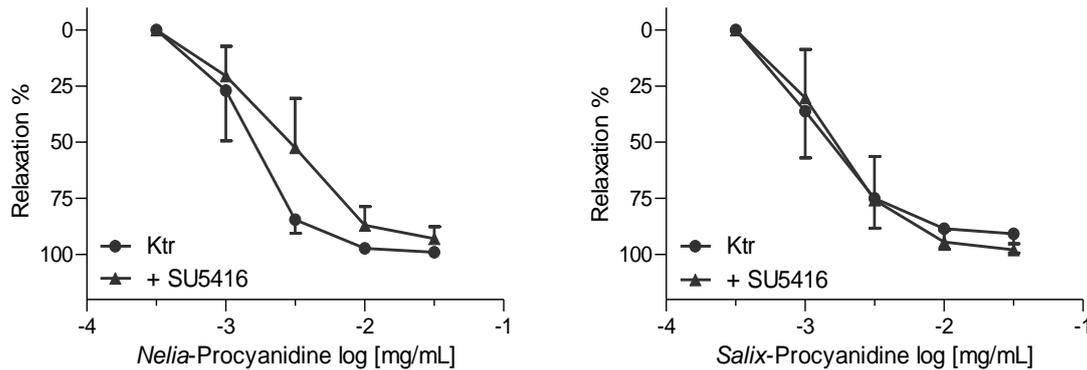


Abb. 3-14: Bedeutung der VEGF-Rezeptoren bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve von *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen in An- und Abwesenheit des VEGF-Rezeptor-Antagonisten SU5416 (50 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.6.1 Src-Tyrosinkinase

Die Beteiligung der intrazellulären Tyrosinkinase Src an der Polyphenol-vermittelten Relaxation konnte bereits durch Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Haynes et al., 2003; Anselm et al., 2009).

In Gegenwart des spezifischen Src-Kinase-Inhibitors PP2 (10 μ M) konnte keine signifikante Beeinflussung des Kurvenverlaufs der Procyanidin-vermittelten Relaxation festgestellt werden (Abb. 3-15).

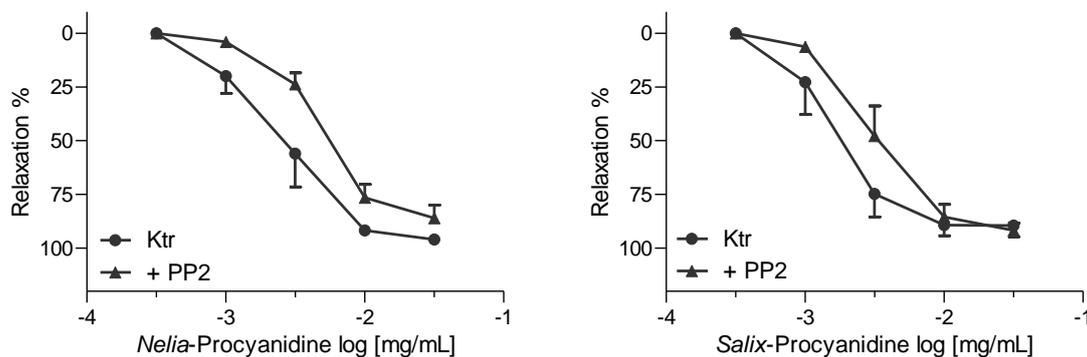


Abb. 3-15: Bedeutung der Src-Kinase bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des Src-Kinase-Inhibitors PP2 (10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.7 Gi-Protein gekoppelte Rezeptoren

Martin et al. zeigten an Endothelzellen, dass unter Polyphenol-induzierter Stimulation die Gi-Protein-abhängige Freisetzung von Calcium und die Aktivierung der Calcium-abhängigen eNOS gefördert wurden (Martin et al., 2002).

Die Geweberinge wurden 180 Minuten vor U46619-Zugabe mit dem Gi-Protein Inhibitor Pertussis Toxin (PTX; 10 ng/mL) inkubiert. Die relaxierenden Effekte der Procyanidine wurde durch Blockade des Gi-Proteins nicht beeinflusst (Abb. 3-16).

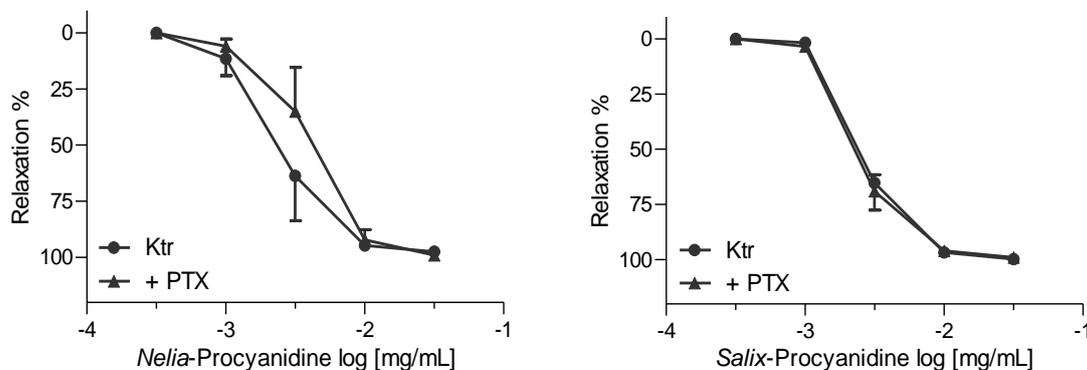


Abb. 3-16: Bedeutung der Gi-Proteine bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des Gi-Protein-Inhibitors PTX (10 ng/mL). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.1.8 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Polyphenole zu einer endothelialen ROS-Generierung führen können. Diese bewirken grundsätzlich eine redox-sensitive PI3K/Akt-Aktivierung in Verbindung mit einer eNOS-Phosphorylierung (Auger et al., 2010; Schini-Kerth et al., 2010). Auch eine endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in Folge einer O_2^- -Stimulation konnte nachgewiesen werden (Lounsbury et al., 2000). Ziel der folgenden Inhibitions-Experimente war es, die Bedeutung und einen enzymatischen oder nicht-enzymatischen Ursprung

dieser ROS-Generierung in Bezug auf die procyanidinhaltigen Testsubstanzen herauszufinden.

3.1.8.1 Xanthin- und NADPH-Oxidase

In Einzel- und Kombinations-Experimenten wurde die relaxierende Wirkung der Procyanidine in Gegenwart des Xanthinoxidase-Inhibitors Allopurinol (Allo, 10 μ M) sowie des NADPH-Inhibitors Apocynin (Apo, 100 μ M) überprüft. Relaxationsversuche in der Einzeltestung hatten keinen Einfluss auf das Dilatationsvermögen der Testsubstanzen (Abb. nicht gezeigt). Die Kombination bewirkte eine Rechtsverschiebung der *Nelia*-Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3-17). Die relaxierenden Effekte der *Salix*-Procyanidine blieben unbeeinflusst (Abb. 3-17).

Durch Hemmung der NADPH- und Xanthin-Oxidase sowie der eNOS (L-NAME; 200 μ M), konnte ein signifikanter Unterschied der konzentrationsabhängigen Effekte für beide Testsubstanzen gezeigt werden (Abb. 3-17).

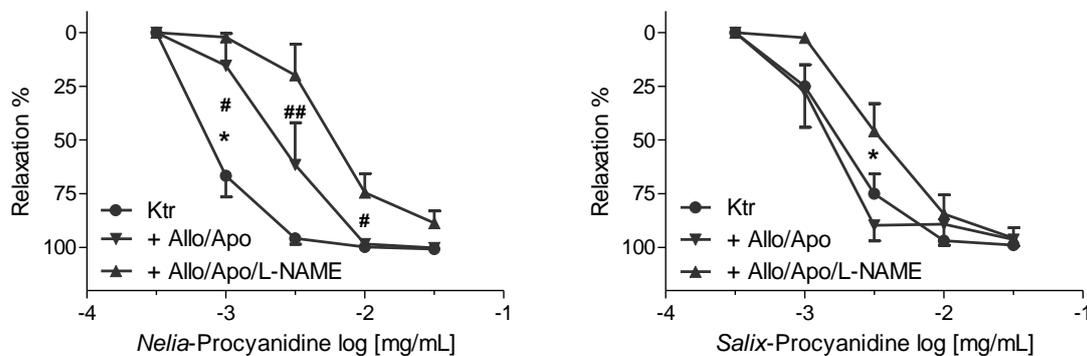


Abb. 3-17: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit der Kombination eines Xanthinoxidase- und NADPH- Hemmstoffes Allopurinol (10 μ M) und Apocynin (100 μ M) sowie deren Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 5 - 7 Tiere). #, *, P < 0,01; ##, P < 0,001.

3.1.8.1.1 Superoxid-Anion und die Superoxid-Dismutase (SOD)

Um die Rolle des O_2^- an der Redox-sensitiven Dilatation der Testsubstanzen genauer zu bestimmen, wurde im Zuge dieser Versuchsreihe der zellgängige Superoxid-Anion-Scavenger Tiron (10 mM) eingesetzt. Dieser zeigt bei beiden Testsubstanzen keinen Einfluss auf die ausgelöste Relaxation (Abb. 3-18). In Kombination mit DETCA (Natriumdiethyldithiocarbamat; 100 μ M), einem SOD-Inhibitor, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- bzw. *Salix*-Procyanidine festgestellt werden (Abb. 3-18). Wurden Tiron und DETCA mit dem eNOS-Hemmstoff L-NAME (200 μ M) kombiniert, ergab sich eine signifikante Verminderung des Maximaleffektes der Relaxation sowie eine Rechtsverschiebung der Kurve (Abb. 3-18).

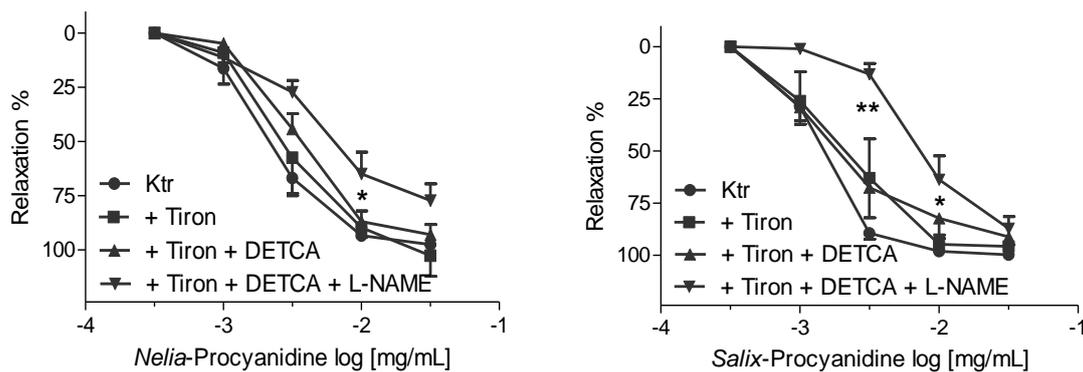


Abb. 3-18: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des O_2^- -Scavenger Tiron (10 mM) und dessen Kombination mit dem SOD-Inhibitor DETCA (100 μ M) in An- und Abwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 5 Tiere). *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$.

Um einen SOD-Einfluss an der ROS-Generierung zu untersuchen, wurden Versuche mit dem SOD-Mimetikum MnTMPyP (100 μ M) durchgeführt. Durch einen verstärkten O_2^- -Abbau zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurden die dilatierenden Eigenschaften der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine sowie den Prodelphinidine aus *Pelargonium* aufgehoben (Abb. 3-19).

3.1.8.1.2 ROS-Scavenger

Ein Beispiel für einen unspezifischen ROS-Scavenger ist das N-Acetylcystein (NAC). Die ausgelöste Dilatation der Procyanidine wurde unter Einwirkung von NAC (100 mM) nicht beeinflusst (Abb. 3-19).

3.1.8.1.3 Atmungskette

Das zellgängige Rotenon ist ein Hemmstoff des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette. Die Gegenwart von Rotenon (10 μ M) verursachte eine signifikante Rechtsverschiebung der *Salix* Konzentrations-Wirkungskurve, wogegen die konzentrationsabhängige Relaxation der *Nelia*-Procyanidine nicht beeinflusst wurde (Abb. 3-19).

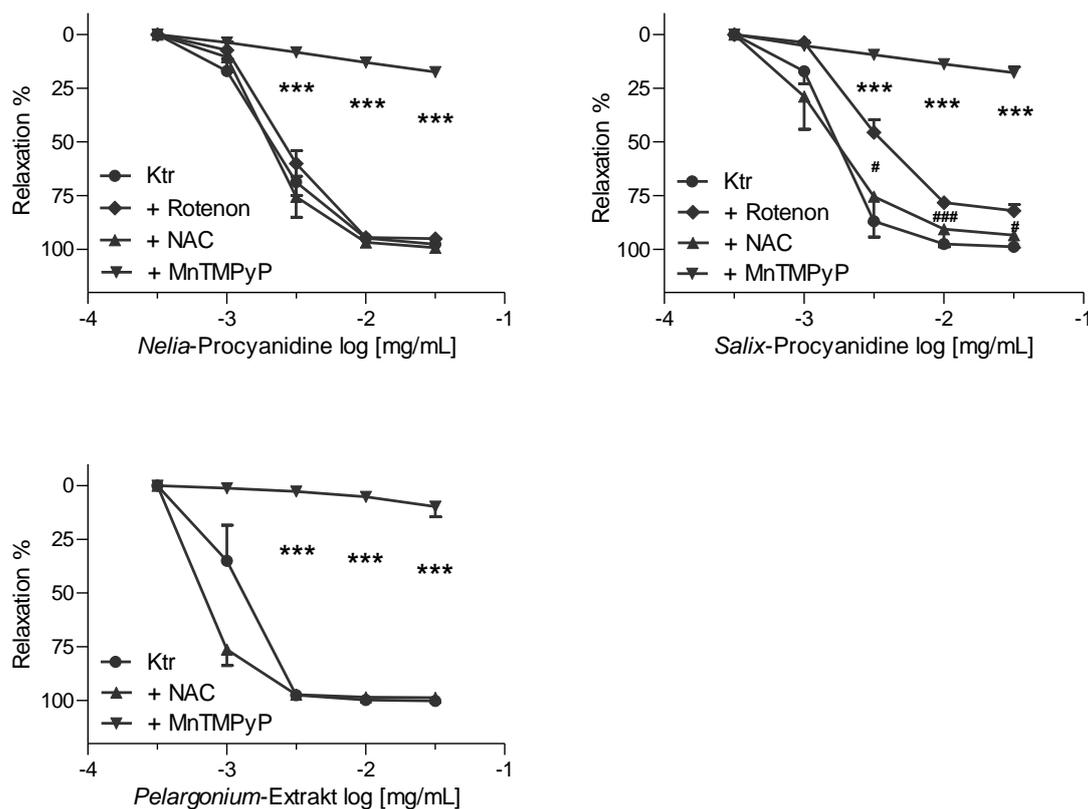


Abb. 3-19: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxierende Effekte der *Nelia*-, *Salix* und *Pelargonium*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des ROS-Scavenger NAC (100 mM), dem Hemmstoff des Komplex 1 der Atmungskette Rotenon (10 μ M) und des SOD-Mimetikums MnTMPyP (100 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4-6 Tiere). #, P < 0,01; ###,***, P < 0,0001.

3.1.9 Estrogenrezeptor

Für einige Polyphenole oder verwandte Strukturen wurde bereits die Beteiligung des membranständigen Estrogenrezeptors an der Endothel-vermittelten Relaxation nachgewiesen (Rush et al., 2007; Schini-Kerth et al., 2010). In Anwesenheit von ICI 182,780, einem spezifischen Estrogenrezeptor-Antagonisten (10 μ M), konnten die vasorelaxierenden Effekte der Testsubstanzen nicht verändert werden (Abb. 3-20).

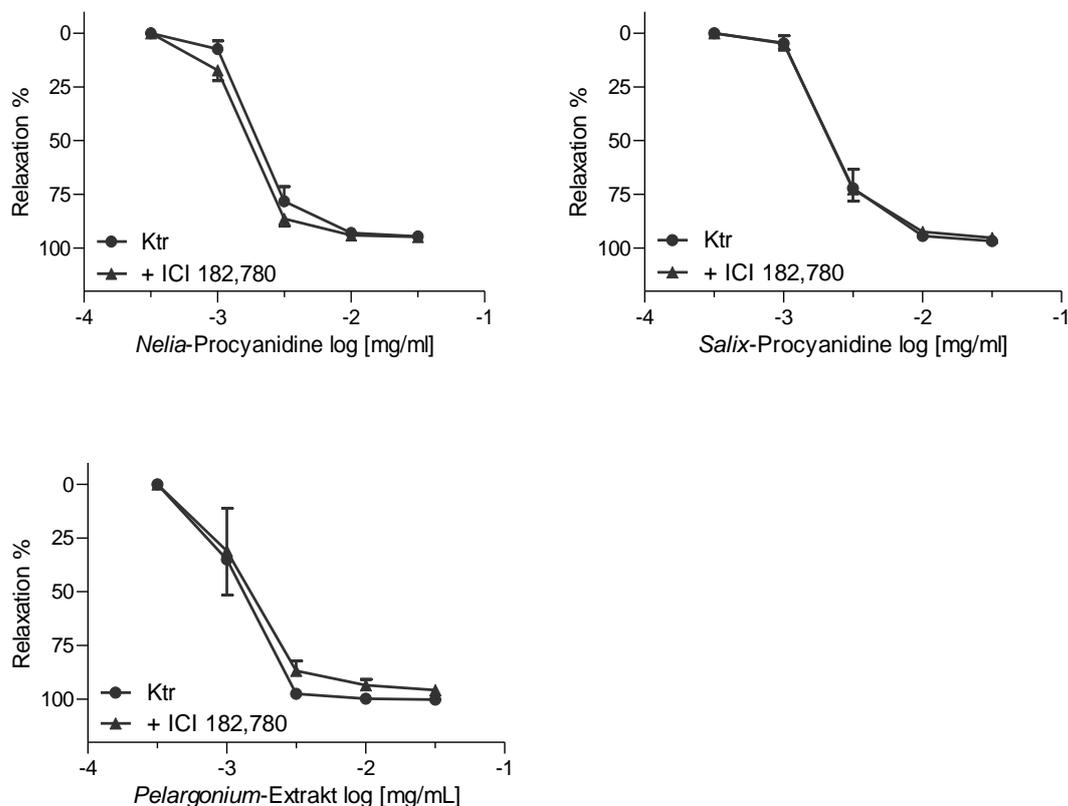


Abb. 3-20: Bedeutung der Estrogenrezeptoren bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation
Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine sowie *Pelargonium*-Prodelphinidine in An- und Abwesenheit des Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 5 Tiere).

3.1.10 Phosphodiesterase-3

Polyphenole gelten allgemein als Hemmstoffe der Phosphodiesterasen (Andriambeloson et al., 1997; Ko et al., 2004). Durch Zusatz eines selektiven PDE-

3-Hemmstoffs, ist es möglich, die Signalkaskade der Procyanidin-vermittelten Wirkung besser zu charakterisieren.

Unter Einfluss des selektiven PDE-3 Inhibitors Milrinon (100 μ M) konnten die relaxierenden Eigenschaften der *Salix*-Procyanidine nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu, kam es zu einer signifikanten Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*-Procyanidine (Abb. 3-21).

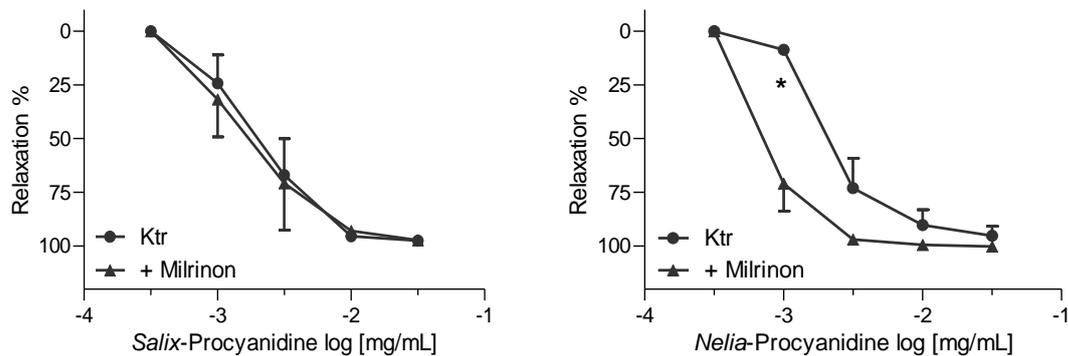


Abb. 3-21: Bedeutung der PDE-3 bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des PDE-3-Inhibitors Milrinon (100 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01.

3.1.11 mTOR

mTOR (deutsch: Zielprotein des Rapamycins im Säugetier) hat die Aufgabe, Zielproteine zu phosphorylieren. Eine enge Verbindung mit dem Enzymkomplex der PI3K/Akt wurde beschrieben (Sarbasov et al., 2005).

Vor der Kontraktion erfolgte die 60-minütige Inkubation mit dem spezifischen mTOR-Inhibitor Rapamycin (100 nM). Die Konzentrations-Wirkungskurve der Testprocyanidine wurde hierdurch nicht beeinflusst (Abb. 3-22).

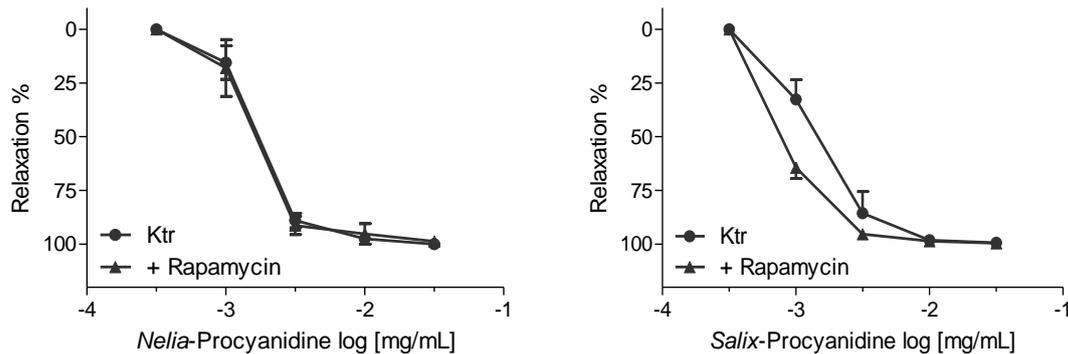


Abb. 3-22: Bedeutung von mTOR bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des mTOR-Hemmstoffs Rapamycin (100 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 - 5 Tiere).

3.1.12 Beteiligung von Ca^{2+}

Eine Erhöhung der freien, intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) im Endothel fördert die Calmodulin-abhängige eNOS-Aktivierung und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{Ca} -Kanäle und damit den K^+ -Ausstrom aus dem Endothel. Beide Signalwege führen letztendlich zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle (Fleming und Busse, 1999; Brayden und Nelson, 2006). Durch Einsatz von Polyphenolen konnte eine intrazelluläre Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration und damit eine eNOS-Aktivierung bereits nachgewiesen werden (Martin et al., 2002).

3.1.12.1 SOCCs und IP_3 -Rezeptoren

Eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie z.B. durch Aktivierung des IP_3 -Rezeptors, verstärkt wiederum den Ca^{2+} -Einstrom durch Plasmamembranständige Rezeptoren (allg. SOCCs) in die Endothelzelle. Resultat ist eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol.

In einer Konzentration von 10 μ M hemmt der unselektive Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) überwiegend den IP_3 -Rezeptor (Prakriya und Lewis, 2001; Bootman et al., 2002). In Gegenwart von 2-APB wurde eine

signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve festgestellt. Der relaxierende Maximaleffekt der *Nelia*- bzw. *Salix*-Procyanidine blieb hingegen unbeeinflusst (Abb. 3-23).

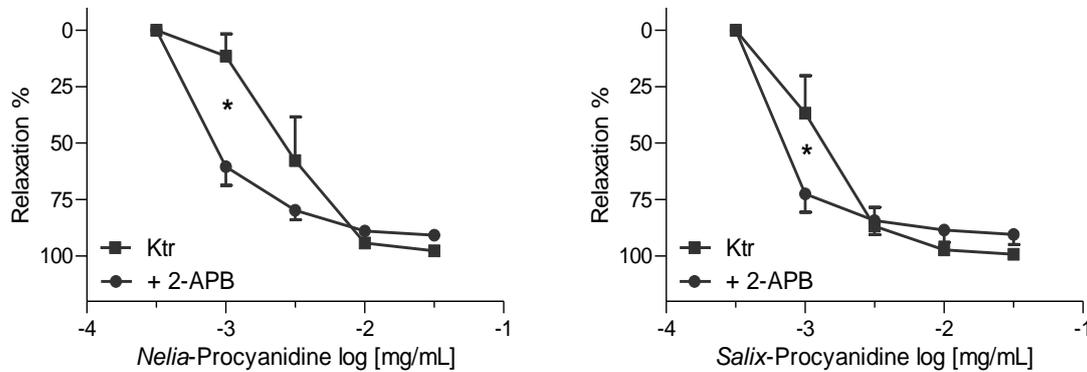


Abb. 3-23: Bedeutung der SOCCs und des IP₃-Rezeptors bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des unspezifischen Inhibitors 2-APB (10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). * $P < 0,01$.

In einer 2-APB-Konzentration von 100 μ M wird eine zusätzliche Hemmung der SOCCs beschrieben (Prakriya und Lewis, 2001; Bootman et al., 2002). Es wurde eine signifikante Verminderung des maximalen Relaxationseffektes der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine beobachtet (Abb. 3-24).

In Folgeversuchen wurde die Bedeutung von Ca²⁺ in Bezug auf K_{Ca} und eNOS untersucht. Durch eine zusätzliche, nicht-selektive Blockade der K_{Ca}-Kanäle mit CTX und Apamin (je 100 nM) wurde der Kurvenverlauf nicht beeinflusst (Abb. 3-24). Durch Zugabe der Kombination aus 2-APB und L-NAME wurden die dilatatorischen Effekte der Procyanidine nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 3-24).

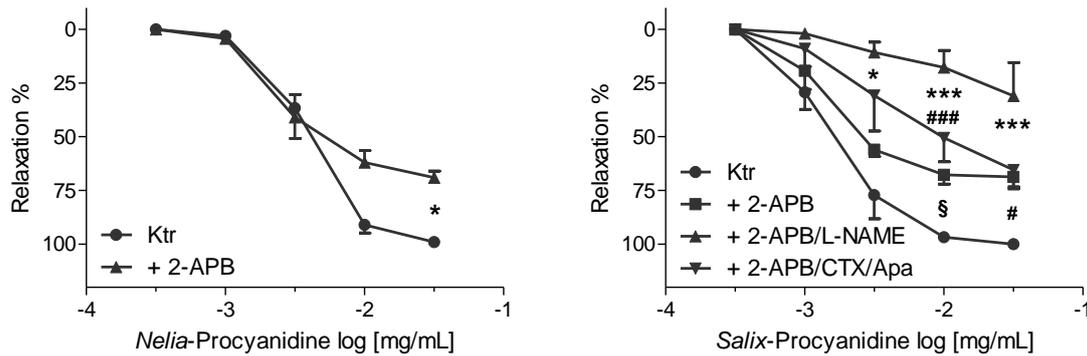


Abb. 3-24: Bedeutung des SOCE-Signalwegs bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des SOCCs-Inhibitors 2-APB (100 μ M), sowie in Kombination mit dem eNOS-Hemmstoff L-NAME (200 μ M) oder der Kombination aus den K_{Ca} -Kanal Blockern CTX und Apamin (je 100 nM). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *,*,§ $P < 0,01$; ###,***, $P < 0,0001$.

3.1.12.2 Ryanodin-Rezeptor und SERCA

Der ATP-abhängige Membrantransporter SERCA pumpt kontinuierlich gegen das Konzentrationsgefälle zytosolisches Ca^{2+} in das SR/ER des jeweiligen Zelltyps. Eine Stimulation des Liganden-gesteuerten Ryanodinrezeptors fördert die Calcium-Freisetzung in das Zytosol aus dem ER/SR.

Durch spezifische Hemmung der ATPase mit Thapsigargin (10 μ M) wurde die konzentrationsabhängige Relaxation der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine vollständig aufgehoben (Abb. 3-25). Die mit dem Ryanodin-Rezeptor Hemmstoff Ryanodin (1 μ M) inkubierten Organe wiesen hingegen keinen veränderten Kurvenverlauf in Bezug auf die Kontrolle auf (Abb. 3-25).

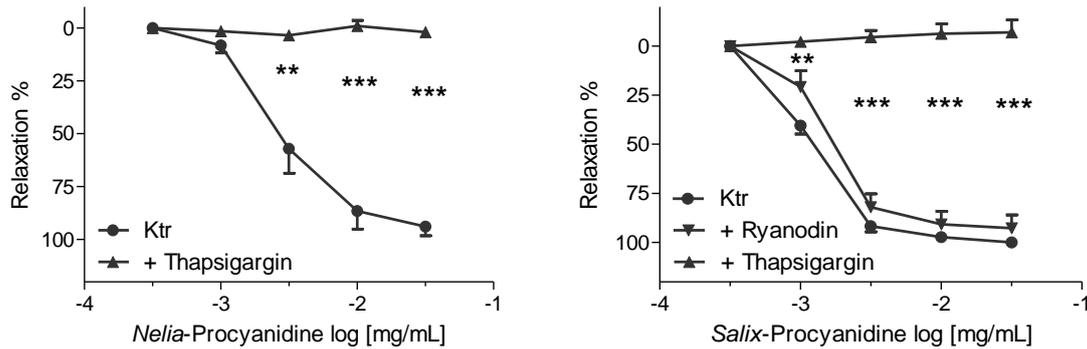


Abb. 3-25: Bedeutung von SERCA und des Ryanodin-Rezeptors bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des SERCA-Inhibitors Thapsigargin (10 μ M) und des Ryanodin-Rezeptor-Antagonisten Ryanodin (1 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,0001$.

3.2 Inhibitionsversuche an Arterien mit einem Lumen $\leq 0,5$ mm

Ein vielfach diskutiertes Thema ist die Abhängigkeit der Gefäßgröße in Bezug auf eine physiologische Gewichtung von EDHF und NO. Luksha et al. beschreiben, dass unter physiologischen Bedingungen die Dilatation von Arterien mit großem Innendurchmesser (i.D.), hauptsächlich durch NO zustande kommt. In Gefäßen mit einem Lumen von etwa 0,3 - 0,8 mm haben NO und EDHF einen vergleichbaren Stellenwert und bei einem Innendurchmesser $\leq 0,3$ mm überwiegt die über EDHF-gesteuerte Relaxation (Luksha et al., 2009).

Um das Endothel-abhängige Relaxationsvermögen der Procyanidine in Abhängigkeit zur Gefäßgröße zu überprüfen, wurden Versuche mit Arterien, deren Innendurchmesser $\leq 0,5$ mm war, durchgeführt. Der Fokus wurde auf die möglichen Unterschiede in der Relaxations-Signalkaskade der *Salix*-Procyanidine bei kleinen ($\leq 0,5$ mm i.D.) und großen (≥ 2 mm i.D.) Arterien gelegt.

3.2.1 Relaxation durch *Salix*-Procyanidine

Zur Untersuchung des Relaxationsvermögen von 2,3-*trans* Procyanidinen an Arterien ($\leq 0,5$ mm i.D.) wurde exemplarisch die hoch-aufgereinigte *Salix*-

Procyanidin-Fraktion ausgewählt. Nach Erreichen des durch U46619 hervorgerufenen Kontraktionsplateaus wurden *Salix*-Procyanidine kumulativ (1 - 100 µg/mL) in das jeweilige Organbad gegeben. Die Zugabe bewirkte eine vollständige Relaxation der Geweberinge, sodass eine Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt werden konnte [$-\log IC_{50} = 2,19 \pm 0,1$ mg/mL, $E_{max} = 94,9 \pm 6,8$ %, gepoolte Daten $n_{pooled} = 14$] (Abb. 3-26).

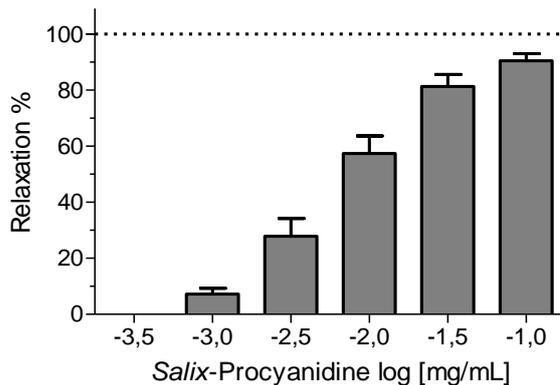


Abb. 3-26: Dilatierende Effekte der *Salix*-Procyanidine

Relaxierende, konzentrationsabhängige Effekte der *Salix*-Procyanidine in Arterien mit einem Innendurchmesser von $\leq 0,5$ mm. In dem Balkendiagramm sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion dargestellt \pm S.E.M. ($n_{pooled} = 14$ Tiere).

3.2.2 NO/cGMP-Signalweg

Um den Einfluss der eNOS und der sGC an der Endothel-abhängigen Dilatation der *Salix*-Procyanidine an kleinen Arterien zu untersuchen, wurden die Arteriensegmente einzeln mit L-NAME (200 µM) oder ODQ (32 µM) inkubiert (Vgl. Kap. 3.1.3). In Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors kam es zu einer signifikanten E_{max} -Verminderung sowie zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3-27).

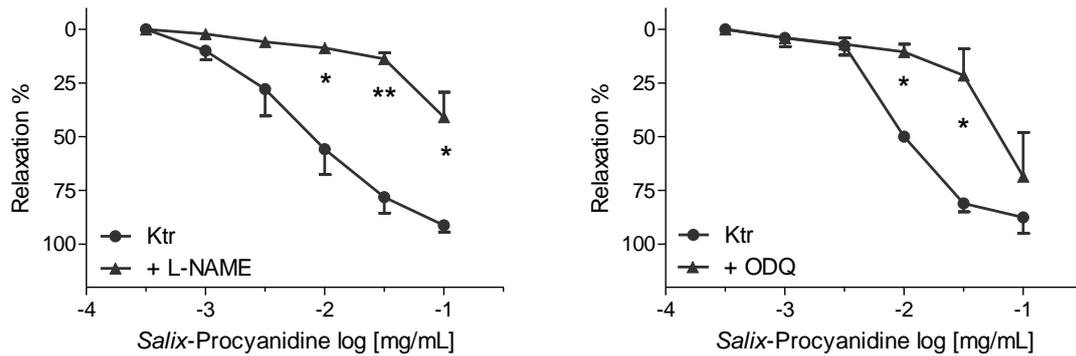


Abb. 3-27: Bedeutung der eNOS und sGC bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurven der *Salix*-Procyanidine in Endothel-intakten Arterien (i.D. $\leq 0,5$ mm) in An- und Abwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NAME (200 μ M) und des sGC-Inhibitors ODQ (32 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01; **, P < 0,001.

3.2.3 Calcium-abhängige Kalium (K_{Ca})-Kanäle (EDHF) und eNOS

Unter Einsatz des IK_{Ca}/BK_{Ca} -Inhibitors CTX (100 nM) und des SK_{Ca} -Inhibitors Apamin (100 nM) (Vgl. 3.1.4.3) an Koronararterien (i.D. $\leq 0,5$) wurde das Relaxationsvermögen der *Salix*-Procyanidine nicht beeinflusst (Abb. 3-28). Eine deutliche Reduktion der Vasodilatation erfolgte durch zusätzliche Zugabe von L-NAME (Abb. 3-28).

Im Austausch des unspezifischen Inhibitors CTX gegen den spezifischen IK_{Ca} -Hemmstoff TRAM 34 (1 μ M) (Vgl. Kap. 3.1.4.3) zeigte TRAM 34 allein und in Kombination mit Apamin keine Beeinflussung der Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine. Dagegen verminderte die Kombination aus TRAM 34, Apamin und L-NAME die relaxierenden Effekte der Testsubstanz beachtlich (Abb. 3-28).

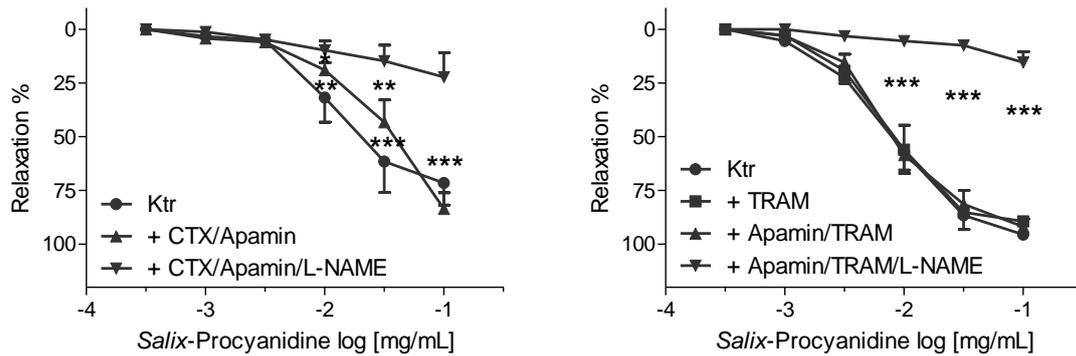


Abb. 3-28: Bedeutung des EDHF-Signalweges bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurven der *Salix*-Procyanidine in Koronararterien (i.D. $\leq 0,5$). **LINKS:** An- und Abwesenheit des unspezifischen BK_{Ca}/IK_{Ca} -Inhibitors CTX (100 nM) und des selektiven SK_{Ca} -Inhibitors Apamin (100 nM) sowie in Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M). **RECHTS:** An- und Abwesenheit des spezifischen IK_{Ca} -Inhibitors TRAM 34 (TRAM) sowie dessen Kombination mit Apamin mit und ohne L-NAME. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01; **, P < 0,001; ***, P < 0,0001.

3.2.4 Gap-Junctions

In Gegenwart von Carbenoxolon (100 μ M), einen unspezifischen Gap-Junction Inhibitor, konnte der E_{max} -Wert der ausgelösten Relaxation signifikant vermindert werden (Abb. 3-29) (Vgl. Kap. 3.1.5). Damit unterscheiden sich die Effekte in Arterien mit i.D. $\leq 0,5$ von denen mit i.D. ≥ 2 mm.

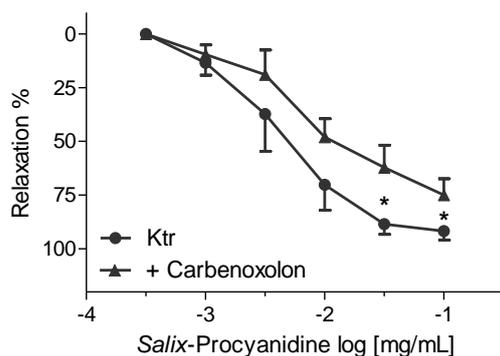


Abb. 3-29: Bedeutung der Gap-Junctions bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen in An- und Abwesenheit des Gap-Junctions-Inhibitors Carbenoxolon (100 μ M) an Arterien mit $\leq 0,5$ mm i.D.. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01.

3.2.5 Beteiligung von Ca²⁺

3.2.5.1 SOCCs und IP₃-Rezeptoren

Zur Überprüfung der Beteiligung von endothelialelem Ca²⁺ wurde in Anwesenheit von 100 µM des unspezifischen 2-APB eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen (Vgl. Kap 3.1.12.1). Eine signifikante Reduktion des relaxierenden Effektes der Testsubstanz konnte beobachtet werden (Abb. 3-30).

In Kombinations-Versuchen mit zusätzlicher Blockade der K_{Ca}-Kanäle (Apamin und CTX, je 100 nM) wurden keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der alleinigen Gabe von 2-APB erkennbar (Abb. 3-30). Auch durch die Kombination 2-APB mit dem eNOS-Hemmstoff L-NAME (200 µM) blieb der Kurvenverlauf unverändert (Abb. 3-30).

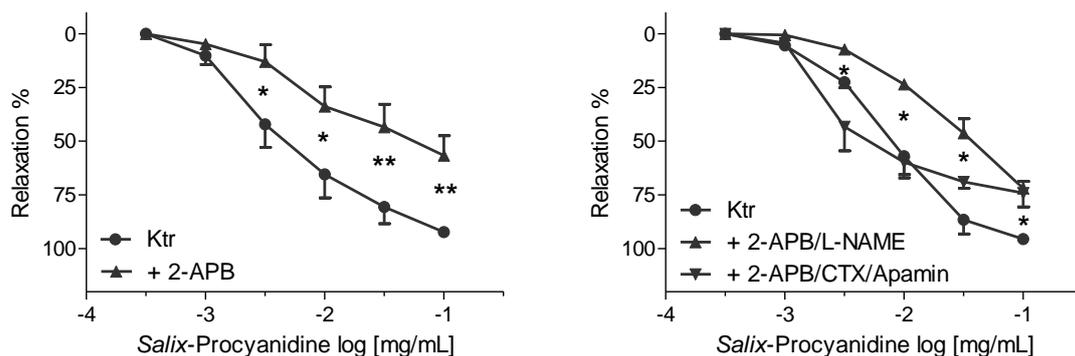


Abb. 3-30: Bedeutung des SOCE-Signalwegs und des IP₃-Rezeptors bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine. **LINKS:** in An- und Abwesenheit des unspezifischen SOCCs/IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB (100 µM) **RECHTS:** in An- und Abwesenheit von 2-APB in Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 µM) sowie die Kombination aus 2-APB und den K_{Ca}-Inhibitoren CTX und Apamin. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion ± S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01; **, P < 0,001.

3.2.5.2 SERCA

Durch Hemmung der SERCA-Aktivität mittels Thapsigargin (10 µM) (Vgl. Kap. 3.1.12.2) kam es zur Verringerung der Procyanidin-vermittelten Relaxation (i.D. ≤ 0,5 mm) (Abb. 3-31).

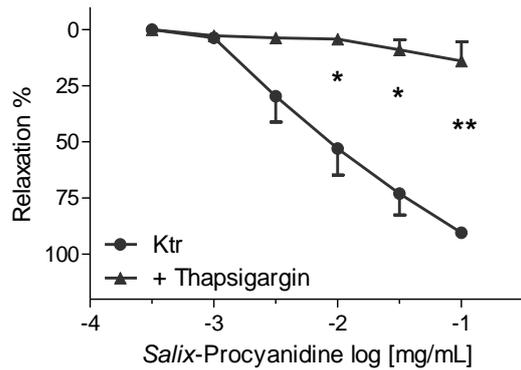


Abb. 3-31: Bedeutung der SERCA bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des SERCA-Inhibitors Thapsigargin (10 μ M) in kleinen Arterien. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). *, P < 0,01; **, P < 0,001.

3.2.6 Proteinkinase B (Akt)

Um die Bedeutung des Enzymkomplexes PI3K/Akt in Arterien (i.D. \leq 0,5 mm) zu überprüfen, wurde der Akt-Hemmstoff Wortmannin (30 μ M) eingesetzt (Vgl. 1.5.4) In reproduzierbaren Versuchen konnte bei kumulativer Zugabe der Testsubstanz der relaxierende Effekt drastisch reduziert werden (Abb. 3-32).

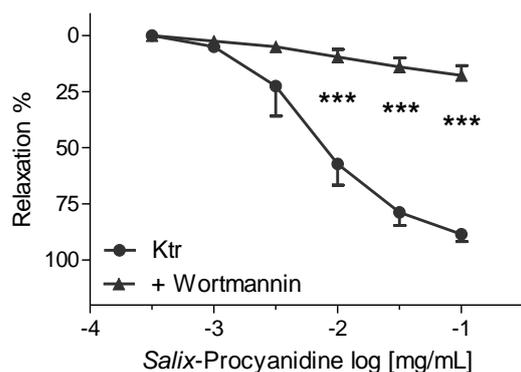


Abb. 3-32: Bedeutung der PI3K/Akt an der Procyanidin-vermittelten Relaxation

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des Akt-Inhibitors Wortmannin (30 μ M) an kleinen Arterien. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 4 Tiere). ***, P < 0,0001.

3.3 Inhibitionsversuche an Koronararterien nach Endothel-Entfernung

Die an der glatten Muskelzelle befindlichen Kanäle und Rezeptoren können einen direkten Einfluss auf die Vasorelaxation ausüben (Jiang et al., 1991; Nelson et al., 1995). Auch die Wirkung von Polyphenolen auf die glatte Gefäßmuskelzelle wurde bereits nachgewiesen (Novakovic et al., 2006).

Im Gegensatz zu der beschriebenen spontan-vermittelten Endothel-abhängigen Vasorelaxation konnte in Gegenwart von *Salix*-Procyanidinen eine langsame, aber stetige Relaxation des Gefäßringes mit entferntem Endothel festgestellt werden. In den anschließenden Versuchen wurde an Koronararterien des Schweins mit entferntem Endothel das Relaxationsvermögen der *Salix*-Procyanidine untersucht. Die überprüften Koronararterien des Schweins hatten einen Innendurchmesser von ≥ 2 mm und von $\leq 0,5$ mm. Die volle Funktionstüchtigkeit des restlichen Gewebes wurde durch Vorkontraktionen und Relaxationen überprüft.

3.3.1 Relaxierende Effekte von *Salix*-Procyanidinen

Im Folgenden sollen die Untersuchungsergebnisse zum Endothel-unabhängigen Relaxationsvermögen von *2,3-trans* Procyanidinen beschrieben werden. Exemplarisch wurde die hoch-aufgereinigte *Salix*-Procyanidin-Fraktion ausgewählt und an Arterien mit unterschiedlichem Innendurchmesser (i.D. ≥ 2 mm und $\leq 0,5$ mm) getestet. Nach mechanischer Endothelentfernung wurde die Funktionstüchtigkeit der Geweberinge überprüft, anschließend mit U46619 kontrahiert und durch kumulative *Salix*-Procyanidin-Zugabe (1-100 $\mu\text{g/mL}$) wieder relaxiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewirkte die Zugabe der Procyanidine eine vollständige Relaxation beider Gewebering-Typen.

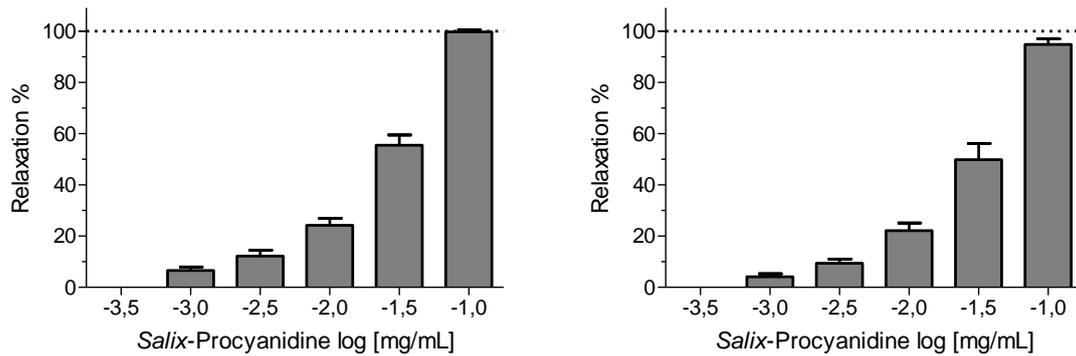


Abb. 3-33: Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaften der *Salix*-Procyanidine in Arterien unterschiedlicher Größen und entferntem Endothel

Relaxierende konzentrationsabhängige Effekte der *Salix*-Procyanidine in Arterien mit entferntem Endothel. **LINKS:** Innendurchmesser $\leq 0,5$ mm (n = 21 Tiere); **RECHTS:** ≥ 2 mm (n = 14 Tiere). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M.

3.3.1.1 β_2 -Adrenorezeptoren

Um die Bedeutung des β_2 -Adrenorezeptors an der Endothel-unabhängigen Relaxation der *Salix*-Procyanidine zu untersuchen, wurden Versuche mit dem β_2 -Symptomimetikum Salbutamol durchgeführt. In Anwesenheit des Agonisten (10 μ M) konnte kein Einfluss auf das Relaxationsvermögen der Testsubstanz beobachtet werden (Abb. 3-34).

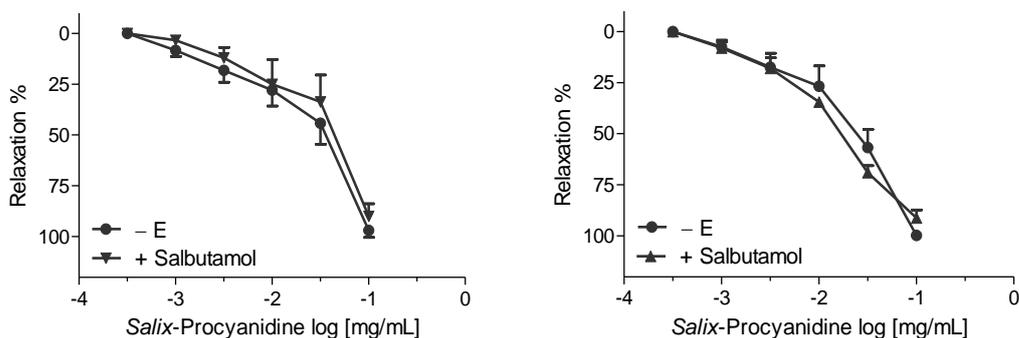


Abb. 3-34: Bedeutung der β_2 -Rezeptoren

Konzentrations-Wirkungskurven der *Salix*-Procyanidine in An- und Abwesenheit des β_2 -Rezeptor Agonisten Salbutamol (10 μ M). Verwendet wurden Arterien mit entferntem Endothel und einem Innendurchmesser von **LINKS:** $\leq 0,5$ mm und **RECHTS:** ≥ 2 mm. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 3 - 5 Tiere).

3.3.1.2 Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS)

Um die Rolle von ROS in der Endothel-unabhängigen Relaxation zu untersuchen, wurden Versuche mit dem unspezifischen ROS-Scavenger NAC (100 mM), dem O₂-Scavenger Tiron (10 mM), dem Inhibitor des Komplexes 1 der Atmungskette Rotenon (10 μM) und dem SOD-Mimetikum MnTMPyP (100 μM) durchgeführt (Vgl. Kap. 3.1.8). Durch Blockade der Atmungskette kam es in Arterien mit großem Innendurchmesser zu einer signifikanten Hemmung der Procyanidin-vermittelten Dilatation und einer zusätzlichen E_{max} -Minderung. In Arterien mit kleinem Lumen wurde ebenso ein signifikanter Hemmeffekt in Gegenwart von Rotenon nachgewiesen, welcher nach höherer *Salix*-Procyanidin-Konzentrationszugabe aufgehoben werden konnte. In Anwesenheit der Scavenger NAC oder Tiron wurde die Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine in beiden Koronararterien-Typen signifikant nach links verschoben, wobei NAC einen größeren Einfluss auf den Kurvenverlauf in Arterien mit einem Innendurchmesser von ≥ 2 mm hatte. Durch Zugabe des SOD-Mimetikums zu den Arterien (i.D. $\leq 0,5$ mm) konnte ein verminderter Effekt der Procyanidine nachgewiesen werden. Die E_{max} -Werte der Konzentrations-Wirkungskurve wurden in Gegenwart von MnTMPyP signifikant beeinflusst (Abb. 3-35).

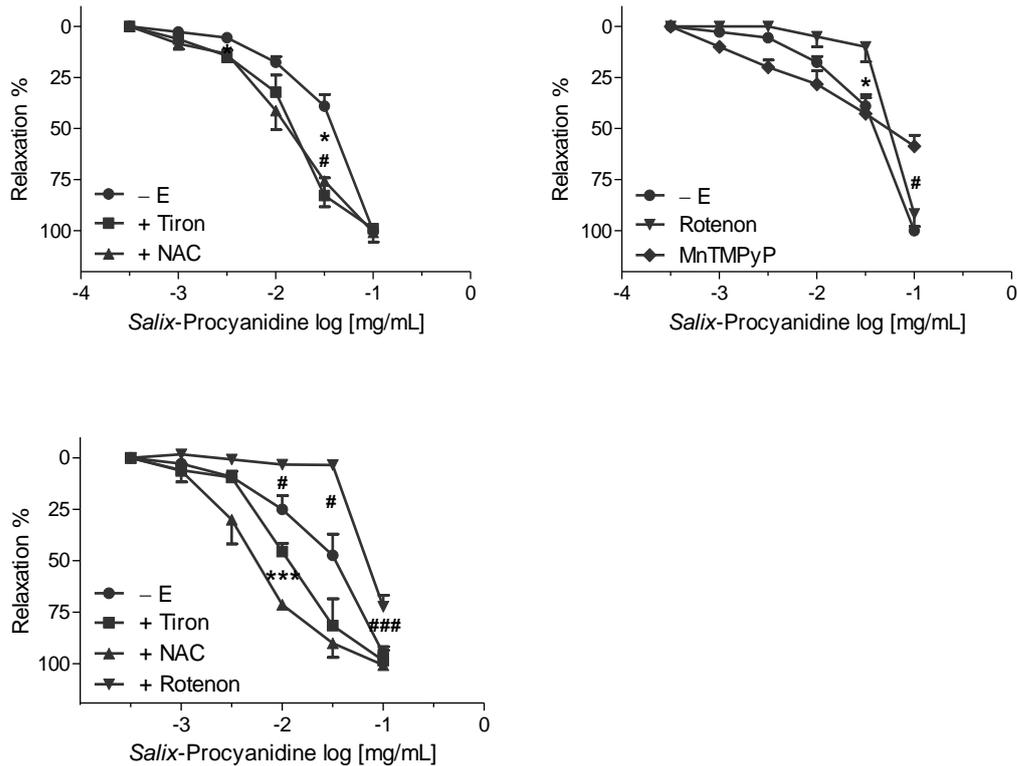


Abb. 3-35: Bedeutung von ROS

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine an Arterien mit entferntem Endothel in An- und Abwesenheit des ROS-Scavengers NAC (100 mM), des O₂-Scavengers Tiron (10 mM), des Inhibitors der Atmungskette Rotenon (10 μM) und des SOD-Mimetikums MnTMPyP (100 μM). **OBEN:** ≤ i.D. 0,5 mm und **UNTEN:** i.D. ≥ 2 mm. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion ± S.E.M. (n = 3 - 6 Tiere). #,*, P < 0,01; ###,***, P < 0,0001.

3.3.1.3 Gap-Junctions

In Anwesenheit des unspezifischen Gap-Junction-Inhibitors Carbenoxolon (100 μM) wurde zunächst nach Zugabe der Procyanidine die Kontraktionen beider Gefäßgrößen verstärkt (Vgl. Kap. 3.1.5). Erst die finale *Salix*-Procyanidin-Konzentration von 100 μg/mL relaxierte das Gewebe vollständig (Abb. 3-36).

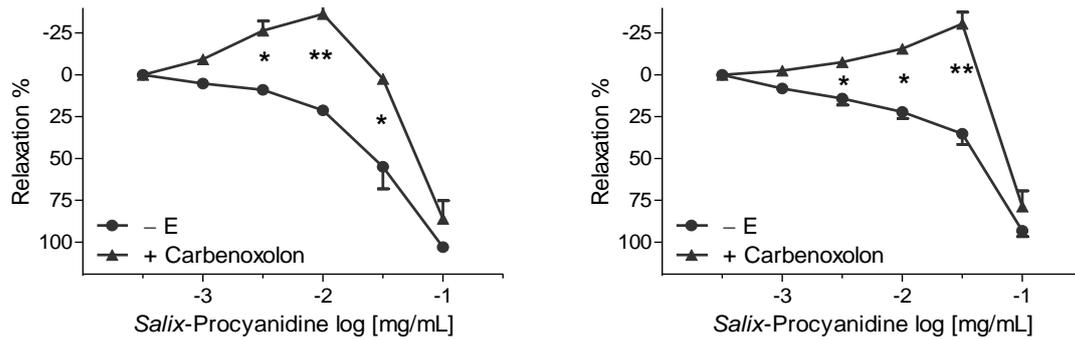
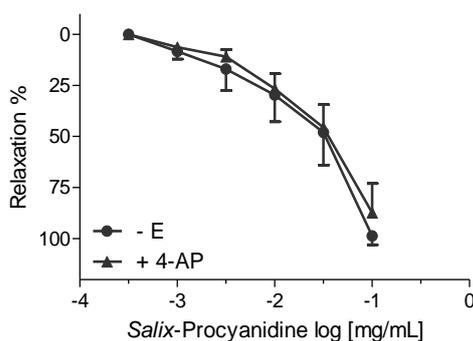


Abb. 3-36: Bedeutung der Gap-Junctions

Konzentrations-Wirkungskurven der *Salix*-Procyanidine an Arterien mit entferntem Endothel in An- und Abwesenheit des Gap-Junction-Inhibitors Carbenoxolon (100 µM). Verwendet wurden LINKS: i.D. $\leq 0,5$ mm und RECHTS: i.D. ≥ 2 mm. Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 3 - 6 Tiere). *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$.

3.3.1.4 Spannungsabhängige Kalium-Kanäle (K_v)

Um die auf der glatten Muskelzelle lokalisierten K_v -Kanäle auf das Endothel-unabhängige Relaxationsvermögen der *Salix*-Procyanidine zu untersuchen (Rogers et al., 2007), wurden Experimente in Anwesenheit des unspezifischen K_v -Inhibitors 4-Aminopyridin (4-AP, 1 mM) durchgeführt (Vgl. Kap 3.1.4.1). 4-AP hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Relaxationsvermögen der Testsubstanz in den Arterien mit kleinem Innendurchmesser (Abb. 3-37).

Abb. 3-37: Bedeutung der K_v -Kanäle

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine an Arterien mit entferntem Endothel in An- und Abwesenheit des K_v -Kanal-Inhibitors 4-AP (1 µM) (i.D. 0,5 mm). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion \pm S.E.M. (n = 3 Tiere). *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$.

3.3.1.5 SOCCs- und IP₃-Rezeptoren

Den Einfluss von Ca²⁺ in Arterien ohne Endothel wurde mit Hilfe des unspezifischen Inhibitors der SOCCs und des IP₃-Rezeptors 2-APB (100 µM), überprüft (Vgl. Kap. 3.1.12.1). Durch Blockade der Rezeptoren konnte kein Einfluss auf die relaxierenden Effekte der *Salix*-Procyanidine erkannt werden (Abb. 3-38).

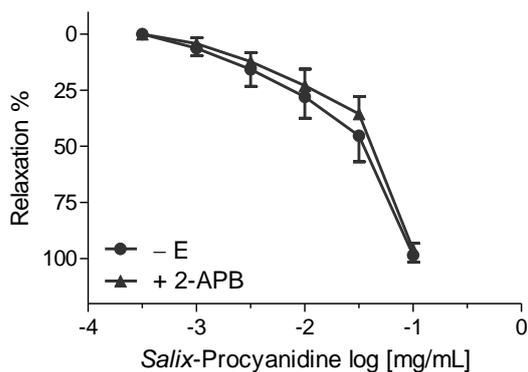


Abb. 3-38: Bedeutung des SOCC-Signalwegs und des IP₃-Rezeptors

Konzentrations-Wirkungskurve der *Salix*-Procyanidine an Arterien mit entferntem Endothel in An- und Abwesenheit des SOCC- und IP₃-Rezeptor-Antagonisten 2-APB (100 µM) (0,5 mm). Dargestellt sind die Mittelwerte der relaxierenden Effekte in Prozent (%) der U46619-induzierten Kontraktion ± S.E.M. (n = 4 Tiere).

3.4 Zytotoxizitäts-Assay (MTT-Assay)

3.4.1 Prinzip

Der Zytotoxizitäts-Assay basiert auf dem Prinzip der Reduktion des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), welcher ausschließlich lebende Zellen anfärbt (Mosmann, 1983). Das gelbe, wasserlösliche MTT-Salz passiert die Zellmembran, wird im Zytosol in das violette, wasserunlösliche Formazan umgewandelt und akkumuliert dadurch in der Zelle. Diese chemische Veränderung geschieht durch mitochondriale Reduktasen innerhalb der vitalen Zellen (

Abb. 3-39). Durch diese Methode ist es möglich, die Viabilität der HUVECs nach Inkubation der Testsubstanzen zu bestimmen und sogleich erste Rückschlüsse bezüglich ihrer Zytotoxizität zu ziehen. Mögliche Interaktionen zwischen den polyphenolischen Substanzen und dem Tetrazoliumsalz wurden in der Versuchsdurchführung berücksichtigt (Vgl. 2.10) (Bruggisser et al., 2002).

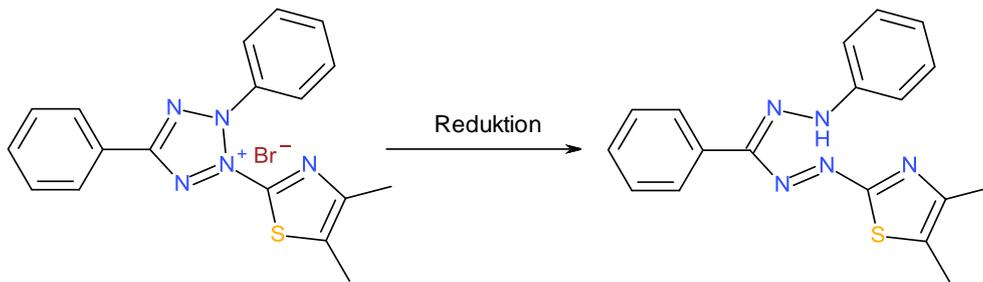


Abb. 3-39: Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes in das offenkettige, wasserunlösliche Formazan.

3.4.2 Resultat

Die steigenden Konzentrationen der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine (0,05 - 0,2 mg/mL) zeigten eine signifikante Reduktion des Zellwachstums innerhalb von 24 Stunden in vier unabhängigen, reproduzierbaren Versuchen. Die zytotoxischen Effekte nahmen mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen kontinuierlich zu.

Die Zugabe von 0,05 mg/mL *Salix*-Procyanidinen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen ($86,6 \pm 3,3$ %). *Nelia*-Procyanidine hingegen verminderten die Viabilität der HUVECs signifikant ($84,4 \pm 3,6$ %). Die Konzentration von 0,2 mg/mL *Nelia*- sowie *Salix*-Procyanidine zeigten moderate zytotoxische Effekte mit einer Zellproliferationsabnahme von rund 30 % (0,2 mg/mL *Nelia*: $E_{\max} = 67,4 \pm 2,5$ %; 0,2 mg/mL *Salix*: $E_{\max} = 70,4 \pm 3,5$ %). Eine exponentielle Abnahme der Viabilität bei steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen war feststellbar (Abb. 3-40).

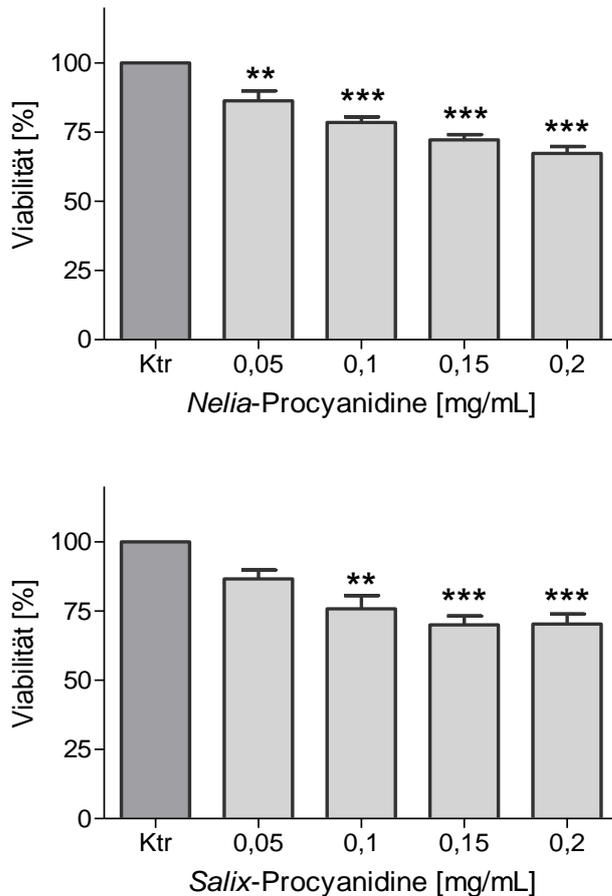


Abb. 3-40: Zellviabilitätstestung mittels MTT-Assay

Einfluss von *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen auf die HUVEC-Viabilität nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen der Procyanidine. HUVECs wurde über 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in vier unabhängigen, reproduzierbaren Versuchen ($n = 4$). Ergebnisse wurden prozentual (%) auf die Kontrolle bezogen. **: $p \leq 0,01$,***: $p \leq 0,001$.

3.5 Intrazelluläre ROS-Bestimmung

3.5.1 Prinzip

Intrazelluläre ROS lassen sich durch geeignete Fluoreszenzindikatoren quantitativ nachweisen. Voraussetzung ist neben einer guten Wasserlöslichkeit, ein geeignetes Membran-penetrierendes Potential sowie eine möglichst geringe Toxizität der Indikatoren für die Zellkultur. Ein möglicher membrangängiger Fluoreszenzindikator ist das 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA).

DCFH-DA ist ein nicht fluoreszierender Farbstoff, der durch intrazelluläre Esterasen zunächst zum Membran-impermeablen DCFH₂ verseift wird. Intrazellulär vorliegende ROS reagieren mit DCFH₂ und oxidieren dieses zu einem fluoreszierenden Farbstoff, dem 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) (Abb. 3-41). Das entstandene DCF ist proportional zur generierten Menge an ROS. Mit Hilfe eines Plattenreaders kann die Fluoreszenzintensität des DCF nach vorheriger Anregung (525 nm) bei einer Emissionswellenlänge von 485 nm vermessen werden.

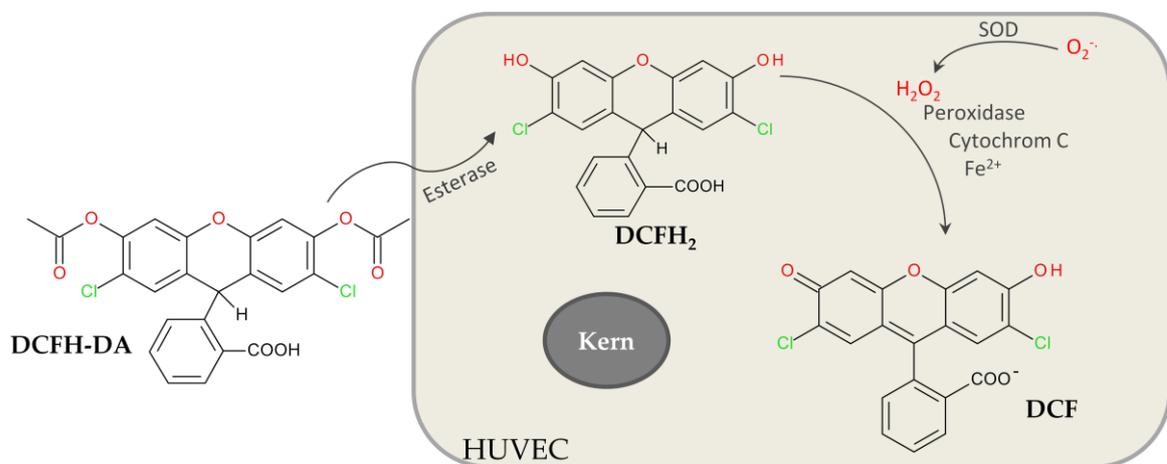


Abb. 3-41: Reduktionsstufen des Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA innerhalb der Zelle

3.5.2 Resultate

Die 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine zeigten einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Produktion in HUVECs.

Während die Konzentrationen 0,05 und 0,1 mg/mL beider Testsubstanzen keinen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre der ROS-Generierung zeigten, konnten 0,15 mg/mL der Procyanidine eine deutliche ROS-Akkumulation aufweisen. Die Zugabe von 0,2 mg/mL beider Testsubstanzen ergab ein viermal stärkeres Fluoreszenzsignal als die unbehandelten Zellen (Abb. 3-42).

Für die Darstellung wurden die gemittelten Fluoreszenzintensitäten der HUVECs (w.E.) gegen die steigenden Konzentrationen (mg/mL) der Procyanidine aufgetragen.

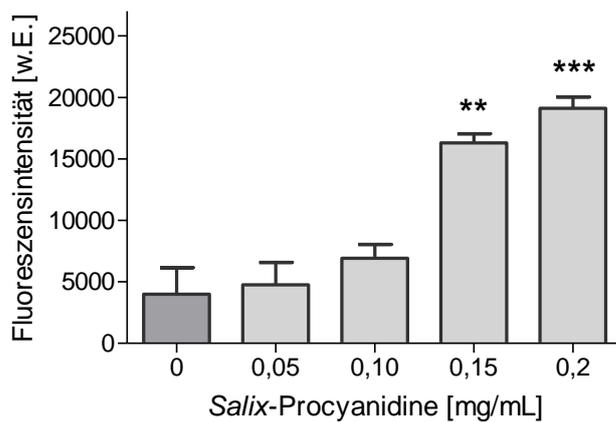
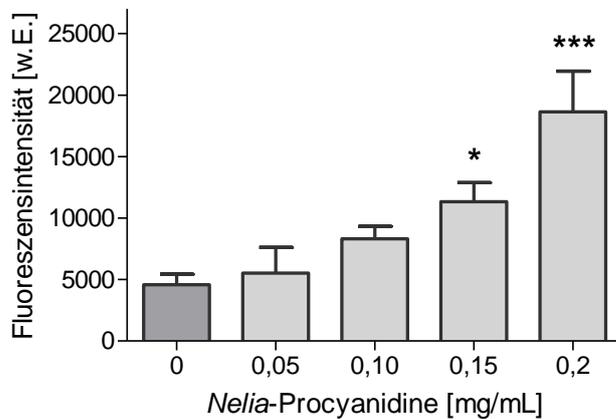


Abb. 3-42: ROS-Generierung durch *Nelia*-Procyanidine

Einfluss von steigenden Konzentrationen der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine auf die Generierung von ROS, nachgewiesen durch den Fluoreszenzindikator DCFH₂-DA in HUVECs. Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVECs. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in vier unabhängigen Versuchen (n = 4). Ergebnisse wurden prozentual (%) auf die Kontrolle bezogen *, $p \leq 0,005$; ***, $p \leq 0,0005$.

3.6 Proteinexpression mittels Western-Blot Verfahren

3.6.1 Prinzip

Das Western-Blot Verfahren ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis des Ausmaßes der Expression bestimmter Proteine in einem Proteingemisch mittels spezifischer Antikörper.

Die Zugabe eines SDS-Detergenzienpuffers bewirkt einerseits die Denaturierung der räumlichen Proteinstruktur in die Primärstruktur und andererseits eine homogene, negative Ladungsverteilung aller Proteine. Auf Grund des unterschiedlichen Molekulargewichtes erfolgt mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine Auftrennung in Richtung der Anode. Kleine, niedermolekulare Proteine wandern schneller durch die Matrix, wogegen große, hochmolekulare Proteine mit der Gitterstruktur des Gels stärker wechselwirken. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld mittels Semi-dry Blotting auf eine geeignete Trägermembran übertragen. Durch spezifische Antikörper-Zugabe ist es möglich, das zu untersuchende Protein oder dessen phosphorylierte Form durch Generierung von Chemilumineszenz mit geeigneten Detektionsreagenzien nachzuweisen.

In dieser Arbeit diente das Verfahren zur Bestimmung und Bestätigung der bereits in den Organbadstudien ermittelten Signalkaskaden der Procyanidine. Untersucht wurde die Expression der phosphorylierten Formen von eNOS und Akt nach Einwirkung von *2,3-cis*- und *2,3-trans* Procyanidinen. Zur Untersuchung des Phosphorylierungslevels wurden die HUVEC-Kulturen mit steigenden Procyanidin-Konzentrationen (0,05 - 0,2 mg/mL) 30 Minuten inkubiert. Zusätzlich wurden Stimulatoren bzw. Inhibitoren (Wortmannin: PI3K/Akt-Inhibitor, L-NAME: eNOS-Inhibitor; Allopurinol: Xanthinoxidase-Inhibitor; Apocynin: NADPH-Oxidase-Inhibitor; Rotenon: Hemmstoff der Atmungskette; MnTMPyP: SOD-Mimetikum) eingesetzt. Die Bestimmung der unphosphorylierten Formen, eNOS und Akt, dienten jeweils der internen Kontrolle (Ladekontrolle), welche zusätzlich zur Überprüfung der gleichmäßigen Auftragung der Proteingesamtmenge genutzt wurde. Die Blots wurden mittels densitometrischer Auswertung aus vier unabhängigen Versuchen ins Verhältnis gesetzt.

3.6.2 Resultate: p-Akt-Expressionslevel in Anwesenheit der Procyanidine

Die exemplarisch abgebildeten Western-Blot Resultate zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme des p-Akt-Expressionslevels nach Zugabe der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine im Vergleich zu unbehandelten HUVECs. Die Kombination aus Procyanidinen (0,2 mg/mL) und Inhibitoren bzw. Aktivatoren zeigt eine verminderte p-Akt Expression (Abb. 3-43).

Densitometrische Auswertung: Die Procyanidin-Konzentrationen 0,1 und 0,2 mg/mL bewirkten eine signifikante Steigerung des p-Akt-Expressionslevels im Vergleich zu den unbehandelten HUVECs. In Anwesenheit von Wortmannin (30 μ M) und MnTMPyP (100 μ M) wurde die durch Procyanidine ausgelöste Expression von p-Akt signifikant vermindert. Unter Einfluss der Kombination aus Allopurinol (10 μ M) und Apocynin (100 μ M) wurde die p-Akt-Expression der *Nelia*-Procyanidine, aber nicht die der *Salix*-Procyanidine, signifikant vermindert. Im gleichen Ausmaß trat dies unter Behandlung der *Salix*-Procyanidine in Anwesenheit von Rotenon (10 μ M) auf (Abb. 3-44).

Nelia:

<i>Nelia</i> -PC (mg/mL)	—	0,2	0,1	0,05	0,2	0,2	0,2
Inhibitoren	—	—	—	—	Wort- mannin	MnTM PyP	Allo/ Apo

Salix:

<i>Salix</i> -PC (mg/mL)	—	0,2	0,1	0,05	0,025	0,2	0,2	0,2
Inhibitoren	—	—	—	—	—	Wort- mannin	MnTM PyP	Rot- enon

Abb. 3-43 p-Akt- und Akt-Proteinexpression hervorgerufen durch Procyanidine

Konzentrationsabhängige Akt-Phosphorylierung in Anwesenheit von *Nelia*- (OBEN) und *Salix*-Procyanidinen (UNTEN) in HUVECs nachgewiesen durch einen spezifischen Antikörper im Western-Blot Verfahren. Effekte der Procyanidine in Anwesenheit von Wortmannin (30 μ M), MnTMPyP (100 μ M) und Allopurinol/Apocynin (Allo/Apo; 10 μ M / 100 μ M) oder Rotenon (10 μ M) auf das p-Akt-Expressionslevel. Akt diente als Ladekontrolle und wurde parallel detektiert.

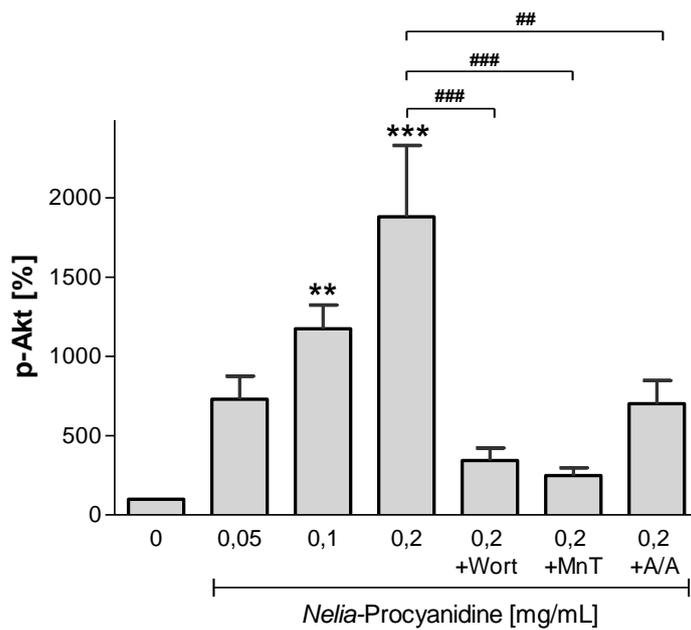
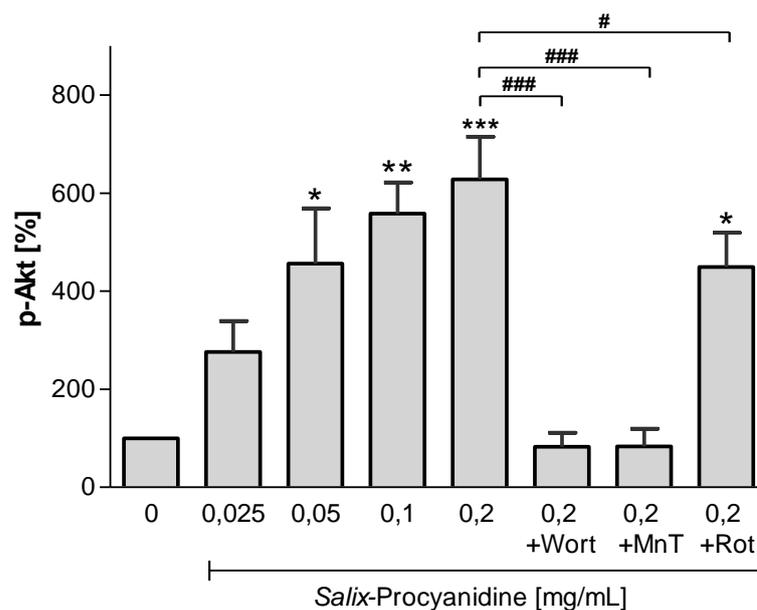
Nelia:*Salix*:

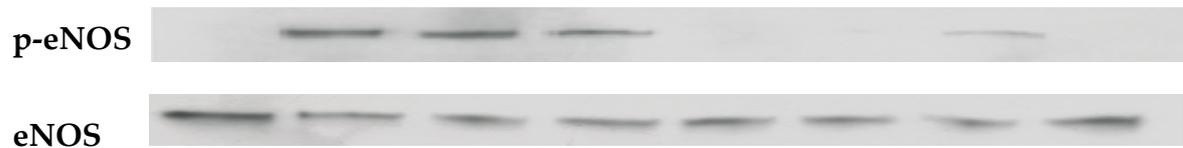
Abb. 3-44: Densitometrische Darstellung der p-Akt Expression durch Procyanidine

Densitometrische Auswertung der konzentrationsabhängigen Effekte von *Nelia*- (OBEN) und *Salix*-Procyanidinen (UNTEN) auf das p-Akt-Expressionslevel in HUVECs in An- und Abwesenheit von Wortmannin (Wort; 30 μ M), MnTMPyP (MnT; 100 μ M) und Allopurinol/Apocynin (A/A; 10 μ M / 100 μ M) oder Rotenon (Rot; 10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der p-Akt-Expression in Prozent (%) bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %) \pm S.E.M. (n = 4 unabhängige Versuche). *, #: $p \leq 0,05$; **, #: $p \leq 0,01$; ***, ###: $p \leq 0,001$, wobei *: Phosphorylierungslevel im Vergleich zur Kontrolle und #: Expression ausgelöst von 0,2 mg/mL Procyanidine im Vergleich mit Inhibitorbehandlung.

3.6.3 Resultate: p-eNOS-Expressionslevel in Anwesenheit der Procyanidine

Der ausgewählte Blot zeigt die konzentrationsabhängige Phosphorylierung der eNOS in HUVECs durch *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Der Phosphorylierungsgrad lässt sich durch Zugabe von inhibierenden- und aktivierenden Substanzen beeinflussen. Die dazugehörige eNOS-Ladekontrolle ist in gleicher Weise dargestellt (Abb. 3-45).

Densitometrische Auswertung: Die Reproduzierbarkeit der vier unabhängigen Versuche wurde in einem Säulendiagramm dargestellt. Procyanidine bewirkten eine konzentrationsabhängige Zunahme des Phosphorylierungsgrades der eNOS, wobei die Konzentrationen 0,05 - 0,2 mg/mL signifikant-erhöhte Expressionen bezüglich der unbehandelten Kontrolle lieferten. Wortmannin (30 μ M), MnTMPyP (100 μ M) und L-NAME (200 μ M) hemmten die Procyanidin-vermittelte p-eNOS-Expression (Abb. 3-46). Die Kombination aus Allopurinol (10 μ M) und Apocynin (100 μ M) bewirkte eine signifikante Verminderung der Proteinexpression im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 0,2 mg/mL *Nelia*-Procyanidine. Rotenon (10 μ M) hatte, in Bezug auf die *Salix*-Procyanidin-Konzentration von 0,2 mg/mL, einen signifikanten Einfluss auf die Expression der eNOS (Abb. 3-46).

Nelia:

<i>Nelia</i> -PC (mg/mL)	—	0,2	0,1	0,05	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Inhibitoren	—	—	—	—	Wort- mannin	MnTM PyP	Allo/ Apo		L-NAME

Salix:

<i>Salix</i> -PC (mg/mL)	—	0,2	0,1	0,05	0,025	0,2	0,2	0,2	0,2
Inhibitoren	—	—	—	—	—	Wort- mannin	MnTM PyP	Rot- enon	L-NAME

Abb. 3-45 p-eNOS- und eNOS-Proteinexpression hervorgerufen durch Procyanidine

Konzentrationsabhängige eNOS-Phosphorylierung in Anwesenheit von *Nelia*- (OBEN) und *Salix*-Procyanidinen (UNTEN) in HUVECs nachgewiesen durch einen spezifischen Antikörper im Western-Blot Verfahren. Effekte der Procyanidine in Anwesenheit von Wortmannin (30 μ M), MnTMPyP (100 μ M) und Allopurinol/Apocynin (Allo/Apo; 10 μ M / 100 μ M) oder Rotenon (10 μ M) auf das p-eNOS-Expressionlevel. eNOS diente als Ladekontrolle und wurde parallel detektiert.

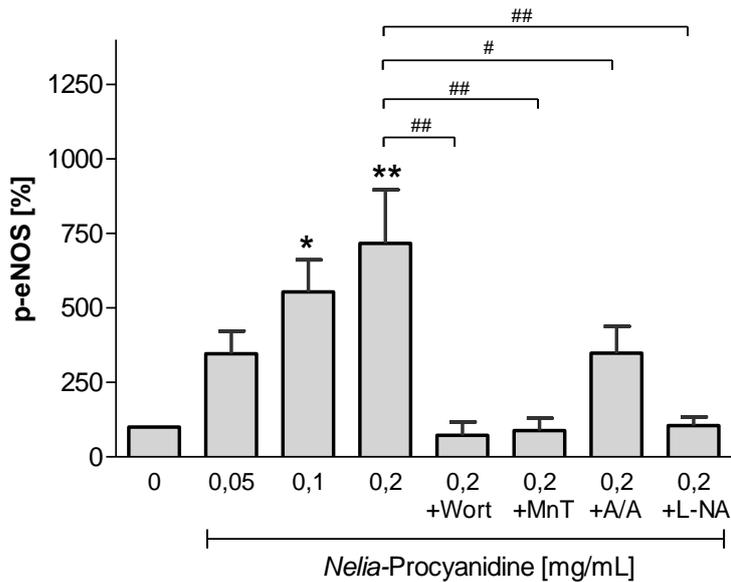
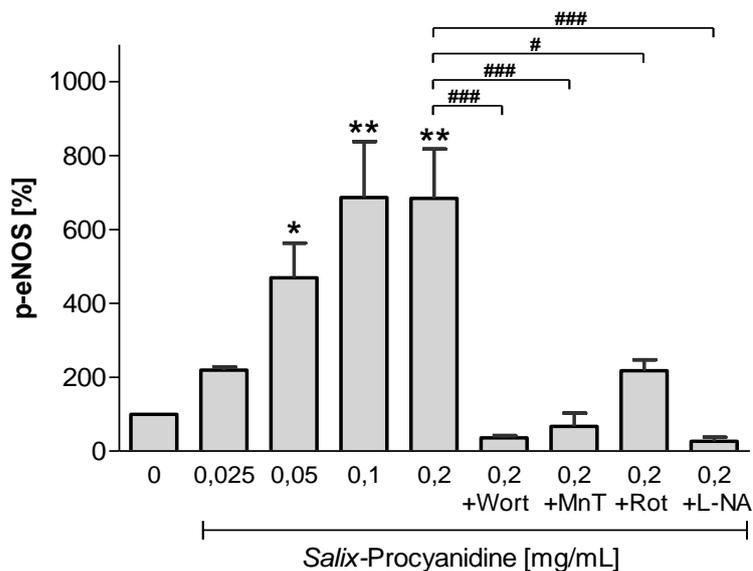
Nelia:*Salix*:

Abb. 3-46: Densitometrische Darstellung der p-eNOS Expression durch Procyanidine

Densitometrische Auswertung der konzentrationsabhängigen Effekte von *Nelia*- (OBEN) und *Salix*-Procyanidinen (UNTEN) auf das p-eNOS-Expressionslevel in HUVECs in An- und Abwesenheit von Wortmannin (Wort; 30 μ M), MnTMPyP (MnT; 100 μ M), L-NAME (L-NA; 200 μ M) und Allopurinol/Apocynin (A/A; 10 μ M / 100 μ M) oder Rotenon (Rot; 10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der p-eNOS-Expression in Prozent (%) bezogen auf die unbehandelten Zellen (100 %) \pm S.E.M. (n = 4 unabhängige Versuche). *, #: p \leq 0,05; **, ## : p \leq 0,01; ***, ### : p \leq 0,001, wobei *: Phosphorylierungslevel im Vergleich zur Kontrolle und #: Expression ausgelöst von 0,2 mg/mL Procyanidine im Vergleich mit Inhibitorbehandlung.

3.7 Lipoprotein-Inkubations-Assay

Eine pathologisch erhöhte oxLDL-Konzentration im Organismus bewirkt neben der Schädigung des Endothels durch inflammatorische Prozesse und der Suppression von intrazellulärem NO auch eine Einwanderung von Monozyten in die Endothelzelle, was folglich zu einer Schaumzellenbildung führt. Alle diese Prozesse begünstigen eine Entwicklung der Arteriosklerose (Vgl. Kap. 1.2.1). Extrazelluläres oxLDL kann durch den LOX-1 Rezeptor in die Endothelzelle eingeschleust werden. Auch innerhalb der Zelle kann LDL zu oxLDL durch intrazelluläres ROS oxidiert werden.

3.7.1 Prinzip

Durch Zugabe der antioxidativ wirkenden Procyanidine ist es möglich, die Endothelzelle vor übermäßiger Bildung von schädlichem oxLDL zu schützen (Steffen et al., 2005; Ou et al., 2009). Das ROS-Scavenger-Potential von Polyphenolen ist seit Langem bekannt (Rice-Evans et al., 1996; Yokozawa et al., 2002). Zusätzlich werden den Polyphenolen auch eine Blockade des LOX-1 Rezeptors (Nishizuka et al., 2011) und auf Grund dessen, die verminderte Aufnahme an oxLDL zugeschrieben. Zur Überprüfung der protektiven Wirkung der *Nelia*- und *Salix*-Procyanidine wurden Inkubationsexperimente durchgeführt. Ziel war es, die Endothel-zerstörende Wirkung des oxLDL durch Procyanidin-Vorinkubation zu vermindern.

3.7.2 Resultate

In Inkubationsversuchen wurden Konzentrations-Wirkungskurven in An- und Abwesenheit der jeweiligen Procyanidinfraktionen (10 µg/mL), des oxLDL (200 mg/mL) und des LDL (200 mg/mL) sowie der Kombination aus Procyanidinen und oxLDL oder LDL erstellt. Die unbehandelten Koronararterien relaxierten durch kumulative Zugabe von Bradykinin (0,3 nM -1 µM) nahezu vollständig. Die zuvor mit *Nelia*- und *Salix*-Procyanidinen inkubierten Arterien zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Bradykinin-Kontrolle.

In Anwesenheit von LDL und der Kombination LDL und Procyanidine blieb die durch Bradykinin ausgelöste Relaxation ebenso unbeeinflusst. Wurden die Arterienringe mit oxLDL inkubiert, bewirkte dies praktisch eine Inaktivierung der Endothelfunktion. Die Ringe verblieben wie erwartet nach Zugabe von Bradykinin im kontrahierten Ausgangszustand (Abb. 3-47). Allerdings konnte durch Behandlung mit der Kombination aus oxLDL und *Salix*-Procyanidine bzw. *Nelia*-Procyanidine die Endothel-schädigende Wirkung des oxLDL signifikant reduziert werden. Der Verlauf der Kombination aus *Salix* und oxLDL ähnelt dem Verlauf der Kontrollkurve (Abb. 3-47). Eine signifikante, konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Kontrolle wies die Kombination aus oxLDL und *Nelia*-Procyanidine auf (Abb. 3-47). Nach Beendigung der kumulativen Zugabe des Bradykinins wurde zu den mit oxLDL-behandelten Arterien Nitroprussid-Natrium (SNP; 0,3 μ M) gegeben. Der NO-Donator bewirkte eine 100%ige Relaxation des vorbehandelten Organs (dargestellt als Inset).

3.8 Assays zur Überprüfung der antioxidativen Eigenschaften der Procyanidin-angereicherten Extrakte

Im Allgemeinen besitzen Polyphenole durch ihre phenolischen Hydroxygruppen die Möglichkeit, freie Radikale abzufangen und die radikalische Ladung über das aromatische System zu delokalisieren. Man spricht daher von einer antioxidativen Wirkung der Polyphenole (Scalbert et al., 2005). Um die Radikalfänger-Eigenschaften der verwendeten Procyanidin-angereicherten Extrakte sowie einiger sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bestimmen zu können, wurden die folgenden Assays durchgeführt.

3.8.1 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)-Assay

Der DPPH-Assay dient dem Nachweis von Substanzen mit Radikalfänger- (Scavenger-) Potential und wurde ursprünglich 1958 entwickelt (Blois, 1958). Modifizierte Formen dieses Assays sind bis heute gängige Forschungsmethoden zur Untersuchung der antioxidativen Aktivität von Substanzen (Nuengchamnong et al., 2009).

3.8.1.1 Prinzip

Das DPPH-Radikal ist eine bei Raumtemperatur lösliche, stabile, violett-gefärbte Substanz und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 517 nm. Scavenger-Verbindungen bewirken durch Übertragung eines Wasserstoffatoms eine Reduktion des DPPH-Radikals zum 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin (Abb. 3-48). Bei diesem Schritt gehen die radikalischen Eigenschaften des Moleküls verloren und die Lösung weist eine stabile, gelbe Farbe auf. Die resultierende Verringerung der Absorption bei 517 nm kann durch spektralphotometrische Messung erfasst werden.

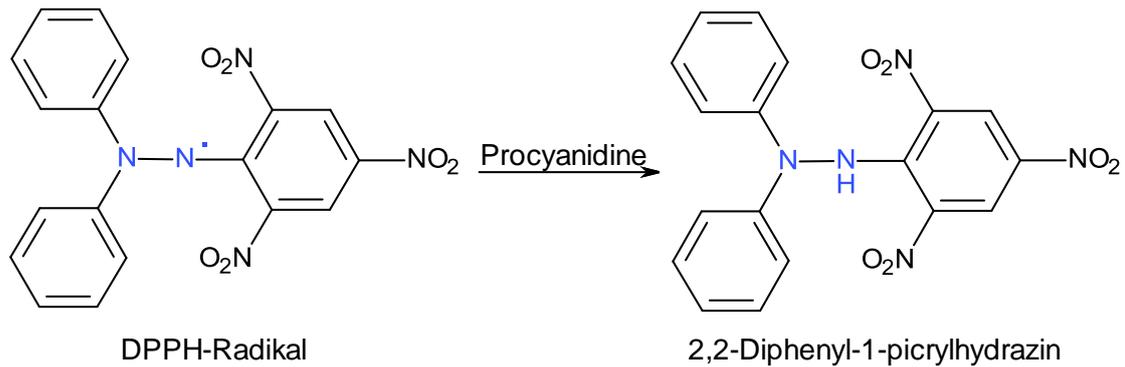


Abb. 3-48: Reduktion des DPPH-Radikals in Anwesenheit von Procyanidinen zu 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin

3.8.1.2 Resultat

Alle getesteten Substanzen konnten konzentrationsabhängig das DPPH-Radikal abfangen und zeigten daher eine antioxidative Aktivität.

Besonders starke antioxidative Eigenschaften und damit ein hohes Radikal-Scavenger-Potential konnten die 2,3-*cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT. zeigen ($IC_{50} = 10,16 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$) (Abb. 3-49). Moderater aktiv waren die 2,3-*trans* Procyanidine aus *Salix* spp. (IC_{50} -Wert = $14,363 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$) und der *Pelargonium*-Extrakt (IC_{50} -Wert = $14,74 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$) (Abb. 3-49).

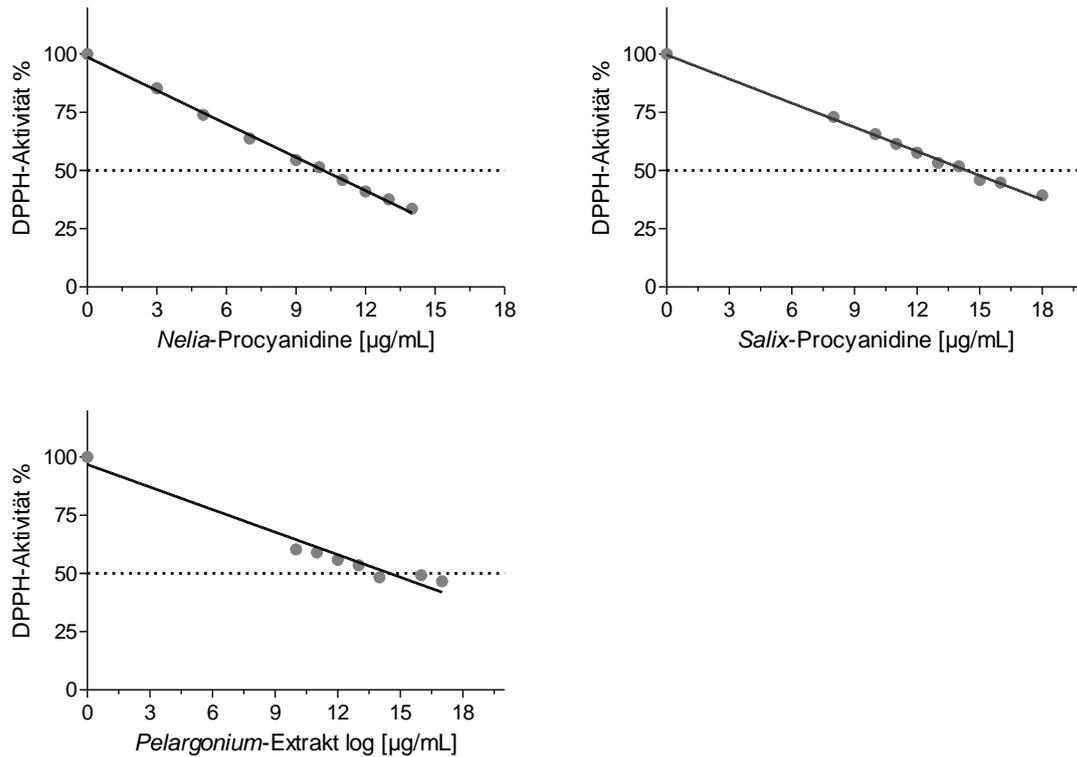


Abb. 3-49: Abnahme der DPPH-Aktivität in Gegenwart der *Nelia*- oder *Salix*-Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extraktes

Lineare Abhängigkeit der Abnahme des DPPH-Radikals in Bezug auf steigende Konzentrationen ($\mu\text{g/mL}$) der *Nelia*- oder *Salix*-Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extraktes. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in vier unabhängigen Versuchen ($n = 4$).

3.8.2 Griess-Assay

3.8.2.1 Prinzip

Der Griess-Assay ist eine Methode zur spektralphotometrischen Quantifizierung von Nitrit. Sulfanilamid (Griess-Lösung B; 1 % in 5%iger ortho-Phosphorsäure) reagiert in einer Diazotierungsreaktion mit freiem Nitrit zum Diazoniumsalz. Anschließend kommt es zur Kopplung mit *N*-(1-Naphthyl)-ethyldiamindichlorid (Griess-Lösung A; 0,1 %) zu einem farbigen Azofarbstoff (Abb. 3–50). Bei einer Wellenlänge von 560 nm kann das gebildete Endprodukt vermessen werden (Moshage et al., 1995; Sun et al., 2003).

In diesem modifizierten Versuchsaufbau diente Nitroprussid-Na als definierter NO-Donor. Durch konstante UV-Bestrahlung löst sich NO quantitativ aus der

Komplexbindung und wird im sauren Milieu proportional in das stabile Nitrit-Ion überführt. Ob die Testsubstanzen NO-Radikalfänger-Eigenschaften besitzen und ob diese konzentrationsabhängig sind, lässt sich durch eine kumulative Zugabe der procyanidinhaltigen Extrakte feststellen. Umso weniger NO für die Diazotierungsreaktion zu Verfügung steht, desto höher sind die Radikalfängereigenschaften der Testsubstanzen einzuschätzen.

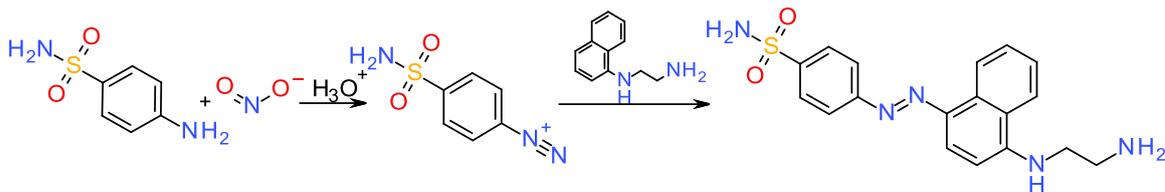


Abb. 3-50 Schematische Darstellung der Bildung eines Azofarbstoffes in Anwesenheit von Nitrit

3.8.2.2 Resultate

Alle geprüften Testsubstanzen zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Nitrit-Konzentration (%). Die gemessenen NO-Konzentrationen wurden auf eine unbehandelte Referenz als 100 %-Kontrolle bezogen.

Zur besseren Abschätzung der NO-Radikalfänger-Eigenschaften der procyanidinreichen Extrakte wurden zunächst Versuche mit definierten Reinsubstanzen unternommen. Epigallocatechingallat (EGCG) wies die stärksten antioxidativen Effekte (IC₅₀ = 110,41 ± 2,6 µmol/mL). Epicatechin und Catechin zeigten hingegen moderate Scavenger-Aktivität im Vergleich zu EGCG (IC₅₀ Epicatechin = 148,86 ± 6,5 µmol/mL; IC₅₀ Catechin = 208,51 ± 10,4 µmol/mL) (Abb. 3-51).

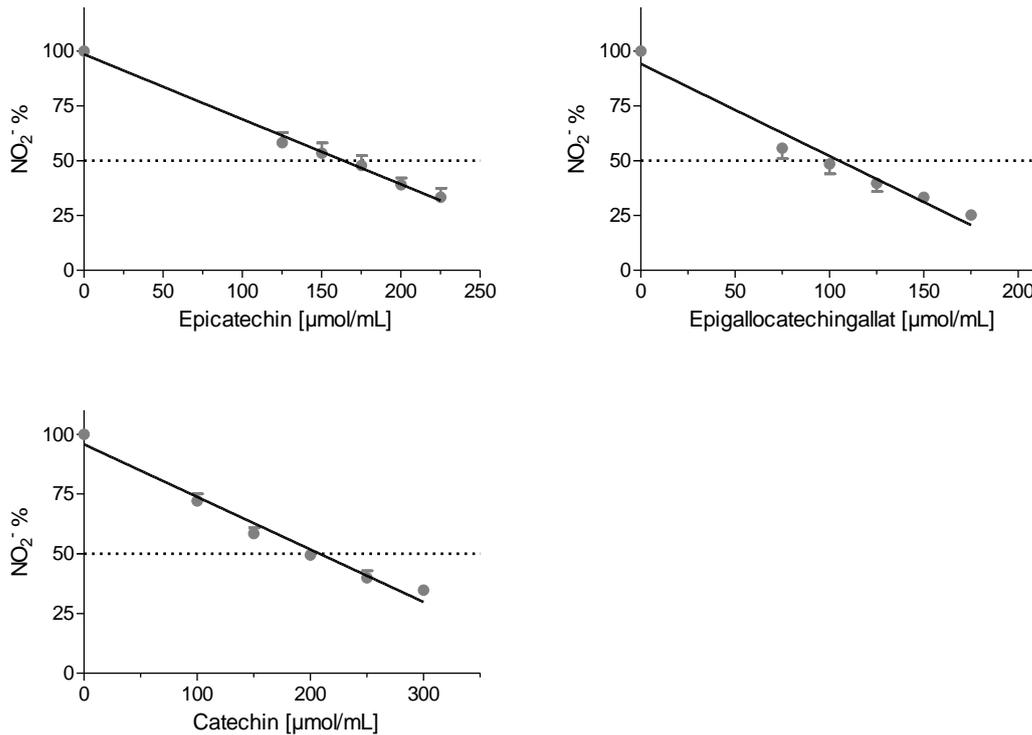


Abb. 3-51: Abnahme der Nitrit-Konzentration in Gegenwart der Reinsubstanzen

Einfluss der steigenden Konzentrationen (μmol/mL) von Epicatechin, Epigallocatechingallat und Catechin auf die Konzentration von NO, nachgewiesen durch Bildung eines Azofarbstoffs. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. in drei unabhängigen Versuchen (n = 3). Ergebnisse wurden relativ (%) auf die Kontrolle bezogen.

Im Gegensatz zu den mäßigen IC₅₀-Werten von *Salix* spp. (IC₅₀ = 75,95 ± 3,2 μg/mL) und des *Pelargonium*-Extraktes (IC₅₀ = 72,97 ± 3,9 μg/mL) zeigten *Nelia*-Procyanidine eine ausgeprägte antioxidative Aktivität (IC₅₀ = 46,10 ± 0,4 μg/mL) (Abb. 3-52) und somit ein stärkeres Scavenger-Potential.

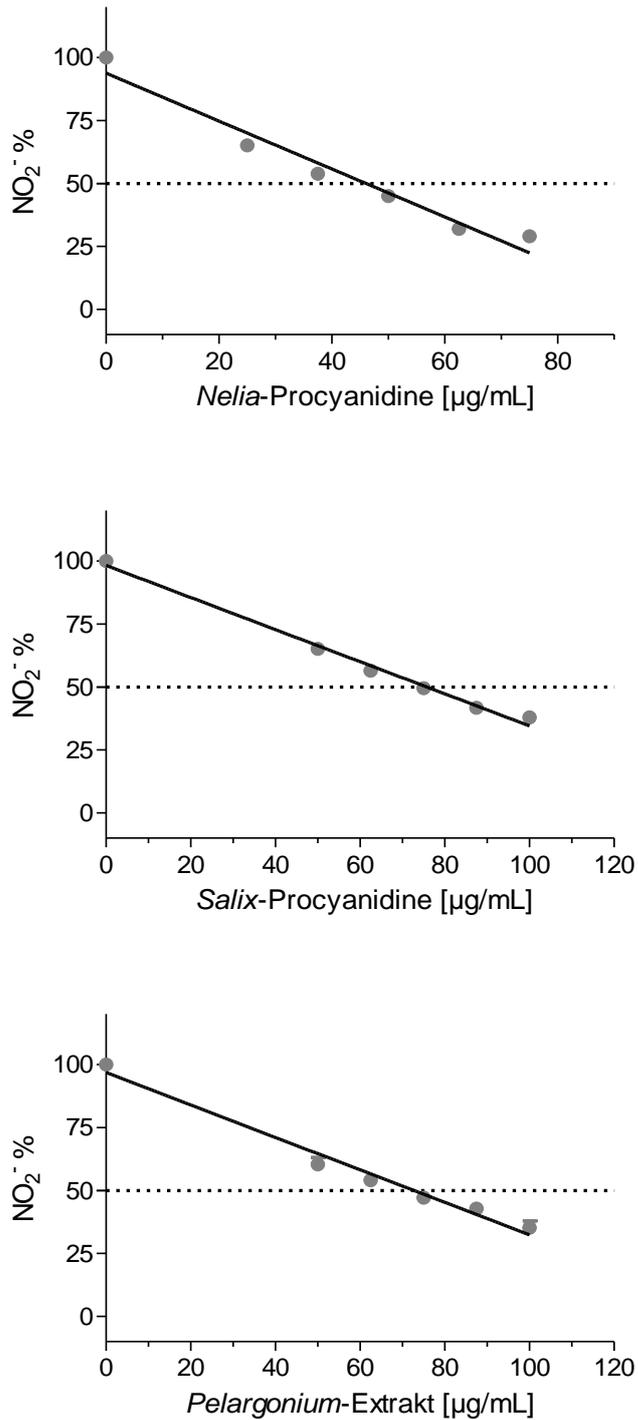


Abb. 3-52: Abnahme der Nitrit-Konzentration in Gegenwart der Polyphenole

Einfluss der steigenden Konzentrationen ($\mu\text{g/mL}$) der *Nelia*- oder *Salix*-Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extraktes auf die Konzentration von NO nachgewiesen durch Bildung eines Azofarbstoffs. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Die Daten wurden relativ (%) auf die Kontrolle bezogen.

3.8.3 Xanthinoxidase-Assay

Die Xanthinoxidase (XO) gehört zu der Gruppe der körpereigenen Oxidoreduktasen und enthält im aktiven Zentrum als Kofaktor ein Molybdänatom. Physiologisch dient die XO dem Purinnukleotid-Abbau, wobei das anfallende Hypoxanthin in zwei Schritten über das Zwischenprodukt Xanthin zur Harnsäure oxidiert wird. Die wasserlösliche Harnsäure kann über die Niere ausgeschieden werden.

Die Elektronen dieses oxidativen Prozesses werden vollständig auf Sauerstoff übertragen und es entsteht je Reaktionsschritt ein Superoxid-Anion-Radikal (O_2^-) (Abb. 3-53). In Bezug auf den XO-Assay werden für polyphenolische Verbindungen zwei Möglichkeiten zur Reduktion der O_2^- beschrieben. Zum einen der Scavenger-Charakter der Polyphenole (Sato et al., 1996) und zum anderen ist ein diskutierter Angriffspunkt das aktive Zentrum der Xanthinoxidase selbst (Hayashi et al., 1988; Dew et al., 2005).

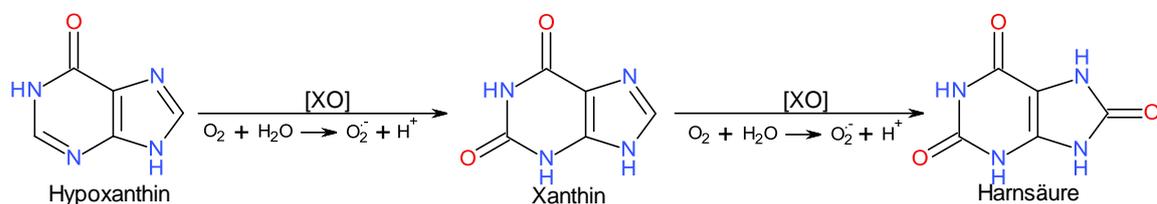


Abb. 3-53: Schematische Darstellung der Oxidation des Hypoxanthins zur Harnsäure unter Bildung von O_2^-

3.8.3.1 Prinzip

Ein Indikator für das gebildete O_2^- des Purinnukleotid-Abbaus ist das Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Das gelbe Salz wird durch die Superoxid-Anionen unter Ringöffnung des Tetrazoliumringsystems reduziert. Die nun dunkelblau gefärbte Formazanlösung weist ein Absorptionsmaximum bei 550 nm auf und kann mittels Plattenreader photometrisch ausgewertet werden (Abb. 3-54). In Anwesenheit von Substanzen mit Radikalfänger-Eigenschaften

vermindert sich die Absorption in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (= 100 %), da weniger Superoxid-Anionen für die Reduktion des NBT bereitstehen. Da das O_2^- durch Oxidation des Substrates stetig neu gebildet wird, wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten minütlich gemessen. Der lineare Anstieg an reduziertem NBT (proportional zur gebildeten O_2^- -Menge) wurde für alle Konzentrationspunkte separat bestimmt. Durch Bestimmung der IC_{50} -Werte lässt sich das prozentuale Verhältnis der Xanthinoxidase-Aktivität zu dem Scavenger-Potential der Testsubstanzen ausdrücken.

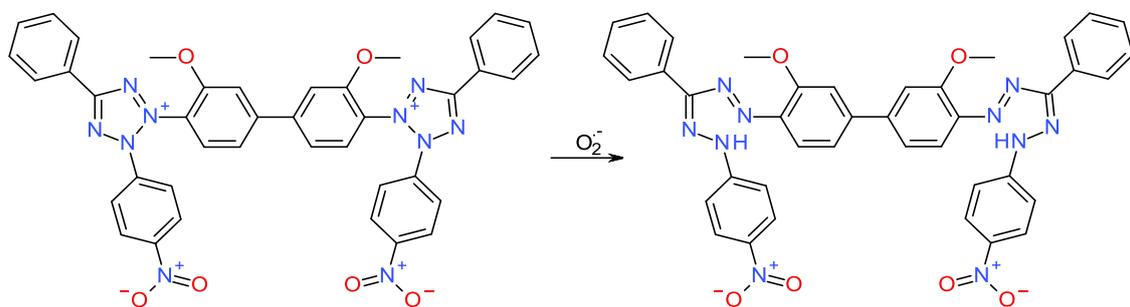


Abb. 3-54: Reduktion des Tetrazoliums unter Einfluss von O_2^- zum Formazan

3.8.3.2 Resultat

In Anwesenheit der Procyanidine kam es zur konzentrationsabhängigen, linearen Abnahme der generierten O_2^- -Konzentration im relativen Vergleich zur Kontrolle. Mit einem IC_{50} -Wert von $3,40 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$ zeigten die 2,3-*cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT. die stärksten antioxidativen Effekte (Abb. 3-55). Im direkten Vergleich zeigten die 2,3-*trans* Procyanidine aus *Salix* spp. mit einem IC_{50} -Wert von $4,26 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ ähnliche antioxidative Effekte. Am schwächsten aktiv waren die Prodelphinidine/Procyanidine des *Pelargonium*-Extrakts, der einen gemittelten IC_{50} -Wert von $4,98 \pm 0,95 \mu\text{g/mL}$ aufwies (Abb. 3-55).

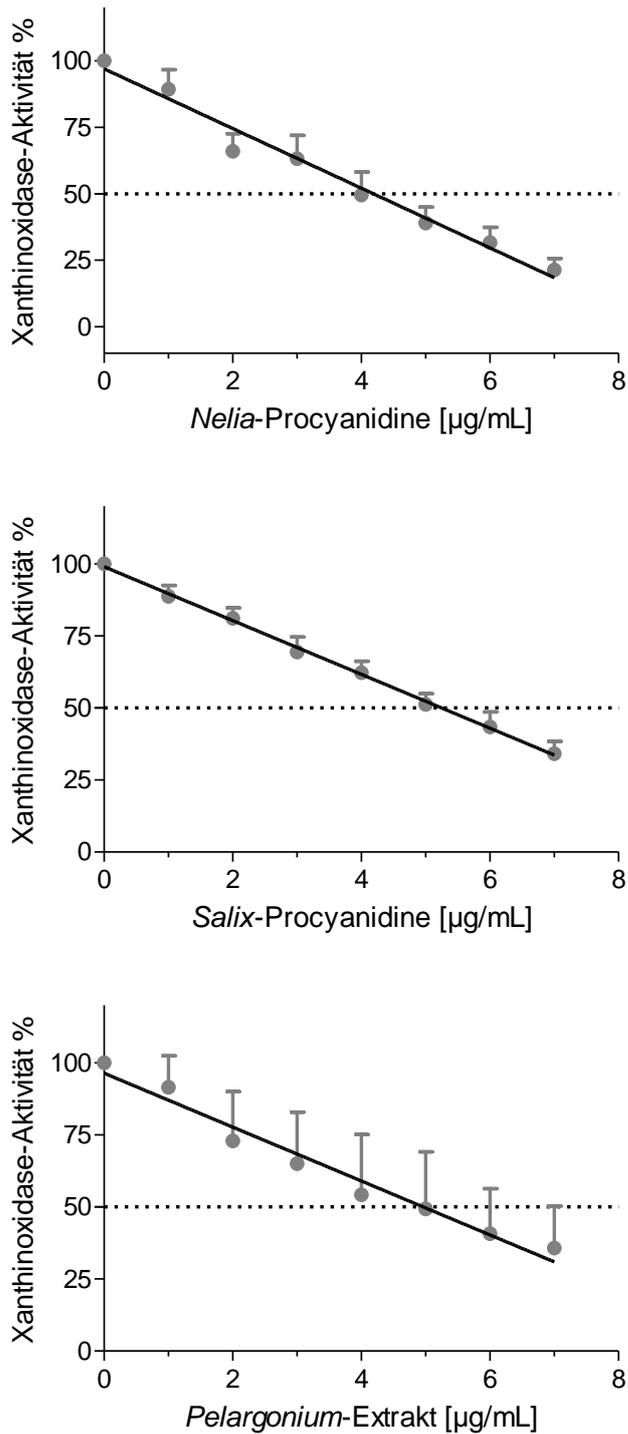


Abb. 3-55: Abnahme der Superoxid-Anion-Konzentration in Gegenwart der Polyphenole

Lineare Abhängigkeit der Abnahme von O_2^- in Bezug auf steigende Konzentrationen ($\mu\text{g/mL}$) der *Nelia*- oder *Salix*-Procyanidine sowie des *Pelargonium*-Extrakts. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. in fünf unabhängigen Versuchen ($n = 5$). Die Daten wurden prozentual (%) auf die Kontrolle bezogen.

Diskussion

4 Diskussion

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung des dilatatorischen Wirkmechanismus der strukturell-definierten Procyanidin-Fractionen an den Koronararterien des Schweins. Forschergruppen haben innerhalb der chemisch heterogenen Gruppe der Polyphenole bzw. der Procyanidine bereits mehrfach eine Endothel-vermittelte Relaxation an unterschiedlichen Gefäßtypen nachgewiesen (Vgl. Tab. 1.6-1). Über die untersuchten polyphenolischen Extrakte fehlen aber oftmals detaillierte Informationen über deren chemische Zusammensetzung (Fitzpatrick et al., 2000; Schini-Kerth et al., 2010). Es wurden zwar Aussagen über die relaxierenden Effekte in Bezug auf den Polymerisationsgrad der Polyphenole getroffen und teilweise auch über das vorliegende Hydroxylierungsmuster der oligomeren Flavan-3-ole, allerdings fehlten Angaben zur Stereochemie sowie zur Verknüpfungsart der Flavanylbausteine.

In dieser Arbeit war es erstmals möglich, die vasodilatierenden Eigenschaften von chemisch definierten Procyanidin-Fractionen zu charakterisieren und somit erste Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten im Wirkmechanismus aufzuzeigen. Die in dieser Arbeit verwendeten Procyanidin-Fractionen sind in Tab. 2.4-1. dargestellt. Nach einem vorherigen Screening von verschiedenen polyphenolischen Testsubstanzen bezüglich deren relaxierenden Wirkpotentials, fiel die Auswahl für tiefer greifende Untersuchungen auf die Procyanidine aus *Salix* spp. und *Nelia meyeri* SCHWANT..

In der Pharmazie wird der traditionellen Anwendung von Weiden-Arten eine gesundheitsfördernde Wirkung zur Behandlung von Fieber, rheumatischen Erkrankungen und Kopfschmerzen zugesprochen (Hedner und Everts, 1998; Schmid et al., 2001). Neben Derivaten der Salicylsäure sind auch eine Reihe von Polyphenolen, wie z.B. 2,3-*trans* Procyanidine, bekannt (Kolodziej, 1990; Kammerer et al., 2005) (Abb. 4-1).

Nelia meyeri SCHWANT. ist eine in Südafrika beheimatete Sukkulente, deren Blätter seltene 4-Arylflavan-3-ole enthalten. Die dominierenden Procyanidine weisen primär eine 2,3-*cis*-Konfiguration der Flavanolgrundbausteine (Epicatechin) auf (Kolodziej, 1984) (Abb. 4-1). Das Pflanzenmaterial zur Gewinnung der Testsubstanzen wurde durch chromatographische Methoden fraktioniert und die vorliegenden Strukturen durch $^1\text{H-NMR}$ spektroskopische Untersuchungen analysiert.

Bei den verwendeten procyanidinischen Testsubstanzen handelt es sich um dimere bis hexamere Procyanidine, deren Unterschied in der Stereochemie zu finden ist. Die oligomeren Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT. sind überwiegend aus [4 β ,8]-verknüpften Epicatechin-Grundbausteinen aufgebaut, wogegen die oligomeren Procyanidine aus *Salix* spp. vorwiegend aus [4 α ,8]-verknüpften Catechin-Grundbausteinen bestehen.

Anfänglich wurden Experimente mit dem polyphenolischen *Crataegus*-Extrakt WS[®] 1442 durchgeführt (Crataegutt[®]; Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG). Die in verschiedenen Ländern zugelassenen Zubereitungen enthalten einen Trockenextrakt aus Weissdornblättern mit Blüten (überwiegend oligomere Procyanidine und biogene Amine) und sind gegen eine nachlassende Leistungsfähigkeit des Herzens, entsprechend Stadium II nach NYHA, zugelassen (Leuchtgens, 1993). Die vielseitigen kardioprotektiven Eigenschaften des pflanzlichen Arzneimittels konnten in *in vitro*- und *in vivo*-Studien nachgewiesen werden (Schwinger et al., 2000; Veveris et al., 2004). Auch eine Endothelvermittelte Relaxation des *Crataegus*-Extrakts WS[®] 1442 wurde in *in vitro*-Studien an der Rattenaorta und der Koronararterie des Schweins aufgezeigt (Anselm et al., 2009).

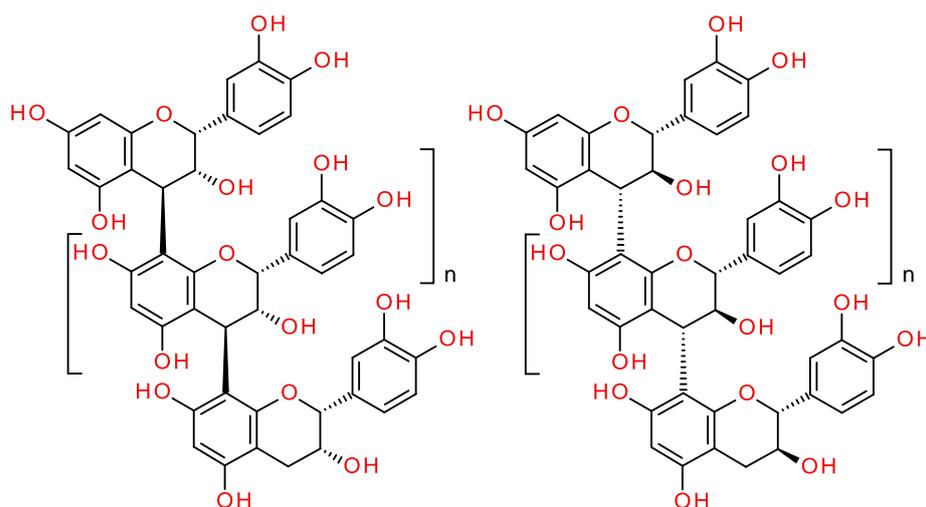


Abb. 4-1: Repräsentative Procyanidin-Strukturen

LINKS: Repräsentative Struktur eines 2,3-*cis* oligomeren Procyanidins mit [4 β ,8]-verknüpften Epicatechin-Grundbausteinen; **RECHTS:** Repräsentative Struktur eines 2,3-*trans* oligomeren Procyanidins mit [4 α ,8]-verknüpften Catechin-Grundbausteinen

Nachfolgend sollten die relaxierenden Effekte aller Testsubstanzen mit einem Fokus auf die 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine von *Nelia meyeri* und *Salix* spp. demonstriert werden. Sinn war es, die zu Grunde liegende Signalkaskade der jeweiligen Procyanidine in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Stereochemie zu charakterisieren. Da es sich in den Publikationen fast ausschließlich um undefinierte, polyphenolhaltige Extrakte oder nur wenig charakterisierte Procyanidin-Fractionen handelt, ist eine grundlegende Struktur-Wirkungsbeziehung bisher nur ansatzweise beschrieben und wenig belegt.

4.1 Konzentrationsabhängigkeit der relaxierenden Effekte der polyphenolischen Testsubstanzen

Die relaxierenden Eigenschaften der Procyanidin-Fractionen (*Nelia*-Procyanidine, *Salix*-Procyanidine, *Betula*-Procyanidine, *Crataegus oxycantha*-Procyanidine und *Crataegus* spp.-Procyanidine) und des standardisierten, ethanolischen *Pelargonium*-Extraktes EPs 7630 wurden an vorkontrahierten Koronararterienringen (≥ 2 mm)

des Schweins getestet. Alle Testsubstanzen führten bei einer kumulativen Zugabe von 3 - 32 µg/mL spontan zu einer vollständigen Vasodilatation der Gefäßringe (Abb. 3-1). Der *Pelargonium*-Extrakt sowie *Crataegus*-Extrakt WS® 1442 zeigte starke relaxierende Eigenschaften ($-\log IC_{50}$ mg/mL = $2,86 \pm 0,22$ mg/mL bzw. $2,81 \pm 0,21$ mg/mL) und wurde daher in einigen weiterführenden Inhibitions-Experimenten näher untersucht. Da es sich allerdings bei dem *Pelargonium*-Extrakt EPs 7630 um ein Gemisch aus Procyanidinen, Prodelphinidinen und weiteren Inhaltsstoffen handelt, sollte das Hauptaugenmerk auf die chemisch-definierten und hochaufgereinigten Procyanidin-Fractionen gelegt werden. Hier zeigten die 2,3-*cis*- aus *Nelia meyeri* SCHWANT. ($-\log IC_{50}$ mg/mL = $2,73 \pm 0,25$ mg/mL) und die 2,3-*trans* Procyanidine aus *Salix* spp. ($-\log IC_{50}$ mg/mL = $2,77 \pm 0,47$ mg/mL) ein ebenso starkes relaxierendes Potential. *Betula*-Procyanidine und *Crataegus oxycantha*-Procyanidine (jeweils dimere bis tetramere (Epi-)Catechin-Bausteine) zeigten weniger stark ausgeprägte Effekte und wurden daher im Folgenden nicht näher untersucht.

In Experimenten mit einem Gefäßinnendurchmesser von $\leq 0,5$ mm wurden beispielhaft *Salix*-Procyanidine ausgewählt, um mögliche Unterschiede bezüglich der Wirkstärke und der zugrunde liegenden Signalkaskade aufzuzeigen. In der Literatur wurden bisher kaum Untersuchungen an unterschiedlichen Gefäßlumina in Hinsicht auf Polyphenole durchgeführt. Die kumulativen Zugaben der 2,3-*trans* Procyanidine konnten eine vollständige Relaxation in den vorkontrahierten Koronararterienringen des Schweins hervorrufen ($-\log IC_{50}$ mg/mL = $2,19 \pm 0,1$ mg/mL) (Abb. 3-26). Auffällig war, dass im direkten Vergleich mit Koronararterien mit einem Innendurchmesser ≥ 2 mm, höhere Konzentrationen notwendig waren, um das vorkontrahierte Gefäß vollständig zu dilatieren (3 - 100 µg/mL). Dieses überraschende Ergebnis zeigt, dass die Potenz der eingesetzten 2,3-*trans* Procyanidine in Abhängigkeit zur Größe des Gefäßlumens steht.

4.2 Endothelabhängigkeit und Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges

Die relaxierenden Effekte der Polyphenole werden zumeist einem funktionstüchtigen Endothel zugeschrieben. So konnten in unterschiedlichen Studien nach Entfernung des Endothels an der isolierten Rattenaorta, Kaninchenaorta und Koronararterie des Schweins durch Zugabe von verschiedenartigen Polyphenolen keine direkte und spontan-ablaufende Dilatation hervorgerufen werden. Blieb das Endothel jedoch unversehrt, konnte eine Relaxation der vorkontrahierten Gefäßtypen demonstriert werden (Edirisinghe et al., 2008; Madeira et al., 2009). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden Experimente an isolierten Koronararterien vom Schwein mit mechanisch-entferntem Endothel durchgeführt, um das Relaxationsvermögen von 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidinen sowie des *Pelargonium*-Extraktes zu überprüfen. Nach der Kontraktion mit U46619 wurden durch die Procyanidine nur marginale relaxierende Effekte ausgelöst (Abb. 3-3). Wie auch in den zitierten Literaturangaben beschrieben, scheint ein funktionstüchtiges und unverletztes Endothel für die spontane Procyanidin-vermittelte Relaxation erforderlich zu sein.

Um den Signalweg der Polyphenol-induzierten Endothel-abhängigen Relaxation besser charakterisieren zu können, wurde die Beteiligung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der löslichen Guanylylcyclase (sGC) an Arterien mit einem Innendurchmesser $\leq 0,5$ mm und ≥ 2 mm überprüft. Zunächst wurden hierfür die verfügbaren Polyphenol-angereicherten Extrakte im Organbad auf ihr Verhalten unter Einfluss des eNOS-Hemmstoffes L-NAME getestet. Die Notwendigkeit einer eNOS-induzierten NO-Produktion für eine vollständige Relaxation der vorkontrahierten Koronararterien konnte durch alle Testsubstanzen in beiden Arteriengrößen aufgezeigt werden (Abb. 3-4). Eine besonders ausgeprägte Beeinflussung zeigten 2,3-*cis* Procyanidine und der *Pelargonium*-Extrakt. Eine vollständige Hemmung der Relaxation wurde jedoch in keinem Fall erreicht (Abb. 3-4). An Arterien mit i.D. $\leq 0,5$ mm konnten

vergleichbare Resultate gewonnen werden (Abb. 3-27). Ein bemerkenswerter Unterschied der NO-Signalkaskade hinsichtlich der untersuchten Arteriengrößen konnte daher nicht gezeigt werden. Es wurde deutlich, dass NO einen signifikanten Einfluss auf die Polyphenol-vermittelte Dilatation ausübt, jedoch weitere Faktoren an dem Signalweg beteiligt sein mussten um eine vollständige Relaxation zu erreichen. Analoge Ergebnisse konnten an Koronararterien des Schweins unter Verwendung eines Weintraubenschalen-Extraktes gezeigt werden. Eine Vorinkubation mit L-NAME verringerte zwar die dilatierenden Effekte des Extrakt konnte diese aber nicht vollständig aufheben (Madeira et al., 2009). Auch zahlreiche andere Arbeitsgruppen zeigten eine NO-vermittelte Relaxation durch Polyphenole (Vgl. Tab. 1.6-1). Auch *in vivo* konnte an KHK-erkrankten Ratten nach dem Konsum von Rotwein eine gesteigerte eNOS-Aktivität bzw. eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit demonstriert werden (Rush et al., 2007; Agouni et al., 2009).

Unterstützend zu den Ergebnissen im Organbad wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit mittels Western-Blot Verfahren die Expression der phosphorylierten Form der eNOS (p-eNOS) überprüft. Durch 30minütige Inkubation von HUVECs mit 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidinen konnte eine konzentrationsabhängige p-eNOS-Expression nachgewiesen werden (Kap. 3.6). Bereits 0,05 mg/mL der 2,3-*trans*- und 0,1 mg/mL der 2,3-*cis* Procyanidin-Konzentration konnten eine signifikante Expression der p-eNOS bewirken. In Gegenwart von L-NAME kam es erwartungsgemäß zu einer marginalen Expression des phosphorylierten Enzyms, vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollzellen. Diese auf zellulärer Ebene gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Ergebnisse der Inhibitions-Experimente in den Organbadstudien. Vergleichbare Resultate konnten bereits vorherige Studien unter Verwendung von Endothelzellen demonstrieren. Beispielhaft zeigte die Inkubation der Koronar-Endothelzellen vom Schwein mit *Crataegus*-Extrakt WS® 1442 eine zeitabhängige Phosphorylierung der eNOS (Ser1177) (Anselm et al., 2009). Auch Leikert et al.

demonstrierten einen Einfluss von Rotwein-Procyanidinen mit einer Konzentration von 400 mg/mL auf die Expression der p-eNOS sowie eine nachgewiesene Steigerung der NO-Produktion in HUVECs (Leikert et al., 2002). In beiden Studien mussten allerdings höhere Konzentrationen an polyphenolischer Testsubstanz eingesetzt werden als in den eigenen Arbeiten.

Unterstützend zu den Ergebnissen der eNOS-Hemmung wurden Inhibitions-Experimente zur Überprüfung der sGC-Beteiligung durchgeführt. Nach Vorinkubation der isolierten Geweberinge mit dem Inhibitor ODQ wurde die Polyphenol-induzierte Relaxation aller Testsubstanzen deutlich abgeschwächt (Abb. 3-5; Abb. 3-27). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Anselm et al.. Die ODQ-Inkubation bewirkte eine deutliche Reduzierung der durch Traubensaft induzierten Relaxation (Anselm et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Polyphenol-Zusammensetzung die NO/cGMP-Signalkaskade maßgeblich an der Endothel-vermittelten Polyphenol-induzierten Relaxation beteiligt ist.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass ein funktionstüchtiges Endothel die Grundvoraussetzung für die spontan-auftretenden und direkt relaxierenden Effekte der Procyanidine darstellt. Ferner konnte die wesentliche Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges in Koronararterien mit kleinem oder größerem Innendurchmesser sichergestellt werden. Mittels Western-Blot Analyse wurde eine Expression der p-eNOS unter Einfluss von *2,3-cis*- und *2,3-trans* Procyanidinen in HUVECs nachgewiesen. Ein deutlicher Unterschied in der Wirkungsweise bezüglich der *2,3-cis*- und *2,3-trans* Procyanidinen konnte allerdings nicht gezeigt werden. Die Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges an der Procyanidin-vermittelten Relaxation ist in Abb. 4-2 dargestellt.

4.3 Einfluss der Kalium-Kanäle

Üblicherweise bewirkt eine K⁺-Kanal-Aktivierung des Endothels, z.B. durch eine erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentration einen K⁺-Ausstrom aus der Endothelzelle. Dies führt über eine Hyperpolarisation zur Dilatation der glatten Muskelzelle (Nelson und Quayle, 1995; Sobey, 2001).

In der Literatur sind hinsichtlich der Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Polyphenol-vermittelten Relaxation vielerlei unterschiedliche Annahmen postuliert worden. Untersuchungen an einer zuvor mit Phenylephrin kontrahierten menschlichen Brustwandarterie sowie der Rattenaorta ergaben, dass das polyphenolische Phytoalexin Resveratrol eine konzentrationsabhängige Relaxation hervorrief, die durch Blockade von spannungsabhängigen Kalium-(K_v)-Kanälen mittels 4-Aminopyridin (4-AP) beeinflusst werden konnte. In Gegenwart des K_{ATP}-Inhibitors Glibenclamid und des BK_{Ca}-Kanal-Blockers Tetraethylammoniumchlorid (TEA) erfolgte keine Modulation des Effekts (Novakovic et al., 2006; Novakovic et al., 2006). Die durch Apfel-Procyanidine vermittelte Hyperpolarisation an Endothelzellen der Rattenaorta konnte durch Inkubation mit den jeweiligen Hemmstoffen, wie 4-AP, Glibenclamid, TEA oder Iberiotoxin (IbTx), signifikant vermindert werden (Byun et al., 2012). Experimente an der isolierten Rattenaorta ergaben, dass die durch *Crataegus*-Extrakt induzierte Dilatation unter Einfluss von TEA, aber nicht von Glibenclamid, deutlich abgeschwächt wurde (Kim et al., 2000). Um die Procyanidin-vermittelte Relaxation besser charakterisieren zu können, wurde das Hauptaugenmerk auf die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (K_v), ATP-sensitiven Kalium-Kanäle (K_{ATP}) und Calcium-abhängigen Kalium-Kanäle (K_{Ca}) gelegt. Die Ergebnisse der Inhibitions-Experimente schließen eine Beteiligung von K_v-, K_{ATP}- und BK_{Ca}-Kanälen, an der Signalkaskade der polyphenolischen Testsubstanzen aus (Abb. 3-6; Abb. 3-7).

4.3.1 Einfluss von EDHF

In der Literatur sind zahlreiche Nachweise über eine Beteiligung von EDHF an der physiologischen Gefäßrelaxation durch Hyperpolarisation und deren Assoziation mit endothelialen IK_{Ca} - und SK_{Ca} -Kanälen zu finden (Busse et al., 2002; Félétou und Vanhoutte, 2009). Calcium-abhängige Kalium-Kanäle (K_{Ca}) werden durch Spannungsänderung jeder Art, unter anderem von der freien, intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) aktiviert (Calderone, 2002; Ko et al., 2008). Mit erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ steigt die K_{Ca} -Öffnungswahrscheinlichkeit, welche zum K^+ -Ausstrom und damit zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle führt (Griffith, 2004). Über eine Hyperpolarisation der Muskelzelle kommt es zur Dilatation des Gefäßes (Vgl. 1.5.2) (Edwards und Weston, 2001).

2003 konnte erstmals an isolierten Koronararterien des Schweins eine Endothel-abhängige, EDHF-vermittelte Relaxation durch phenolische Komponenten des Rotweins (RWPC) nachgewiesen werden (Ndiaye et al., 2003). Durch Einsatz des unspezifischen K_{Ca} -Blockers Charybdotoxin (CTX) in Kombination mit dem selektiven IK_{Ca} -Blocker Apamin konnte eine Hemmung der relaxierenden Effekte aufgezeigt werden. In Kombination mit L-NAME wurden die relaxierenden Effekte sogar gänzlich aufgehoben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen in den folgenden Jahren weitere Forschergruppen. So konnte an unterschiedlichen Gefäßarterien durch Zugabe der genannten K_{Ca} -Inhibitoren die Polyphenol-abhängige Dilatation vermindert werden (Kwan et al., 2003; Madeira et al., 2005; Rocha et al., 2007). Wie vorangegangene Studien an unterschiedlichen Gefäßtypen verschiedener Spezies zeigten, ließen auch die Beobachtungen an der Koronararterie des Schweins die Schlussfolgerung zu, dass die Procyanidin-abhängige Dilatation EDHF-vermittelt sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit hatte die Kombination aus Charybdotoxin und Apamin keinen Einfluss auf die ausgelöste Relaxation in den untersuchten Arterien mit unterschiedlichem Innendurchmesser (Abb. 3-8; Abb. 3-28). Folglich scheinen, im Vergleich mit den

Literaturangaben, die vasorelaxierenden Effekte der Polyphenole je nach Substitutionstyp EDHF-abhängig oder -unabhängig abzulaufen. Auch die Annahme, dass in Arterien mit i.D. $\leq 0,5$ mm EDHF eine wesentliche Rolle an der Gefäßdilatation spielt (Luksha et al., 2009), wurde durch den Einsatz von 2,3-*trans* Procyanidinen nicht bestätigt (Abb. 3-28). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass der Innendurchmesser nicht ausreichend klein gewählt war, um die EDHF-Effekte eindeutig nachzuweisen. Erst in Kombination mit L-NAME konnte der EDHF-vermittelte Effekt verstärkt werden, da im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit L-NAME eine deutlich stärkere Hemmung in beiden Testarterien zu beobachten war (Abb. 3-8; Abb. 3-28). Eine plausible Erklärung könnte sein, dass durch zusätzliche Hemmung der eNOS eine Verstärkung und damit Demaskierung des EDHF-Signalweges erreicht wurde. Möglicherweise kommt es durch die Inhibitor-induzierte Blockade der K_{Ca} -Kanäle und der Calmodulin-abhängigen eNOS zu einem Überangebot an $[Ca^{2+}]_i$ im Endothel. Dies könnte zu einer Depolarisation der Endothelzelle mit anschließender Kontraktion der glatten Muskelzelle führen (Griffith, 2004). In Übereinstimmung dazu publizierten auch andere Forschergruppen eine völlige Aufhebung der relaxierenden Wirkung polyphenolischer Testsubstanzen, zum Beispiel für den *Crataegus*-Extrakt WS[®] 1442 oder Extrakte aus Weintraubenschalen, an vorkontrahierten Koronararterien des Schweins in Anwesenheit von Charybotoxin, Apamin und L-NAME (Anselm et al., 2009; Madeira et al., 2009). Um eine konkrete Aussage über die Beteiligung der K_{Ca} -Subtypen an der EDHF-vermittelten Relaxation treffen zu können, wurde der unselektive K_{Ca} -Hemmstoff CTX gegen den selektiven IK_{Ca} -Hemmstoff TRAM 34 ausgetauscht. Das Resultat ist analog zu dem von CTX. Durch Blockade von SK_{Ca} - und IK_{Ca} konnte der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve nicht verändert werden. Durch die Kombination mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME wurden die EDHF-Signalkaskade in beiden Arterientypen demaskiert (Abb. 3-8; Abb. 3-28).

Auch die Beteiligung von Gap-Junctions an der Überleitung der K_{Ca} -vermittelten Hyperpolarisation wurde in Betracht gezogen. Durch Anlagerung von zwei Connexonen entsteht ein Verbindungskanal, der einen Stoffaustausch (Iontentransport) von zwei benachbarten Zellen steuern kann (Söhl und Willecke, 2004). Studien ergaben, dass eine von der Endothelzelle ausgelöste Hyperpolarisation durch Gap-Junctions auf die glatte Muskelzelle übertragen wird (Edwards et al., 2000; Griffith, 2004). Jene Beteiligung an der Signalkaskade in den Koronararterien mit i.D. ≥ 2 mm. konnte in den durchgeführten Inhibitions-Experimenten ausgeschlossen werden (Abb. 3-10). Im Gegensatz dazu konnte in Experimenten an der mesenteralen Arterie der Ratte unter Einwirkung des Gap-Junction Inhibitors Carbenoxolon die Konzentrations-Wirkungskurve von Polyphenolen aus Rotwein signifikant beeinflusst werden (Dal-Ros et al., 2009). Offensichtlich spielt die jeweilige Polyphenol-Zusammensetzung und/oder der Gefäßtyp eine entscheidende Rolle. Die Übertragung der Hyperpolarisation konnte anhand der durchgeführten Versuche nicht eindeutig belegt werden. Mögliche Beteiligungen von weiteren Faktoren oder Kanälen (Vgl. Kap. 1.5.2) können nicht ausgeschlossen werden (Féléto und Vanhoutte, 2009; Garland et al., 2011). Auffällig waren die Resultate an Arterienringen mit i.D. $\leq 0,5$ mm: In Anwesenheit von Carbenoxolon wurde die Signalkaskade der Relaxation der *2,3-trans* Procyanidine behindert (Abb. 3-29). Die Beteiligung von Gap-Junctions an der Überleitung einer Hyperpolarisation scheint von der Gefäßgröße abhängig zu sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die relaxierenden Effekte der *2,3-cis*- und *2,3-trans* Procyanidine an der Koronararterie des Schweins mit funktionstüchtigem Endothel über eine K_V -, BK_{Ca} - und K_{ATP} - unabhängige Signalkaskade verlaufen. Die Beteiligung von K_{Ca} -Kanälen konnte in beiden Lumina der Koronararterien erst durch zusätzliche Blockade des NO/cGMP-Signalweges nachgewiesen werden. Erstmals wurde durch spezifische Inhibition

der endothelialen SK_{Ca}- und IK_{Ca}-Kanäle ein BK_{Ca}-unabhängiger EDHF-Signalweg unter Verwendung einer reinen Procyanidin-Fraktion aufgezeigt. Eine unterschiedliche Einflussnahme von EDHF und NO in Koronararterien mit großem und kleinem Innendurchmesser konnte in dem Versuchsmodell nicht aufgezeigt werden. Interessant war die Beteiligung von Gap-Junctions an der Hyperpolarisation in Arterien mit i.D. $\leq 0,5$ mm, die in größeren Arterien nicht beobachtet werden konnte. Die Beteiligung der relevanten K_{Ca}-Kanäle an der Procyanidin-vermittelten Relaxation sind in Abb. 4-2 dargestellt.

4.4 Beteiligung von Redox-sensitive Proteinkinasen

Mehrfach wurde die Rolle der Redox-sensitiven PI3K/Akt-Aktivierung, in Bezug auf die Polyphenol-abhängige Relaxation von Gefäßen beschrieben (Anselm et al., 2007; Edirisinghe et al., 2008; Edirisinghe et al., 2008; Shao et al., 2009; Rattmann et al., 2012). Entsprechend den Angaben in der Literatur wurden Experimente an U46619-vokontrahierten, isolierten Gefäßen mit funktionstüchtigem Endothel in Anwesenheit des PI3-Kinase-Hemmstoffs Wortmannin durchgeführt. Die durch 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine sowie dem *Pelargonium*-Extrakt ausgelöste Gefäßdilatation wurde in Anwesenheit von Wortmannin drastisch reduziert (Abb. 3-11). Auch in Arterien mit kleinem Innendurchmesser konnten vergleichbare Ergebnisse mit 2,3-*trans* Procyanidinen gezeigt werden (Abb. 3-32). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer uneingeschränkten Funktionsweise des Enzyms. Die PI3-Kinase/Akt stellt damit eine wesentliche Komponente in der Signalkaskade der Procyanidin-vermittelten Relaxation dar. Zur genaueren Charakterisierung wurden Untersuchungen zur Expression der phosphorylierten Form von Akt (p-Akt) in HUVECs durchgeführt. Mit Hilfe des Western-Blot Verfahrens konnte nach einer 30minütigen Inkubationszeit eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung des Enzyms durch 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine aufgezeigt werden (Abb. 3-43; Abb. 3-44). Bereits eine Zugabe

von 50 µg/mL der 2,3-*trans*- und 100 µg/mL der 2,3-*cis* Procyanidine bewirkte einen signifikanten Anstieg der p-Akt-Expression in HUVECs. In Kombination mit Wortmannin wurde diese Phosphorylierung erwartungsgemäß gehemmt (Abb. 3-44). Diese Ergebnisse gehen mit dem bisherigen Forschungsstand einher: In Endothelzellen aus der Koronararterie des Schweins ergaben sich bei einer Konzentration von 300 µg/mL *Crataegus* Extrakt WS 1442® eine Konzentrations- und zeitabhängige Phosphorylierung von Akt (Anselm et al., 2009). Ebenso konnte an Aorten-Endothelzellen des Rinds durch 15minütige Inkubation mit EGCG aus dem Grünen Tee eine konzentrationsabhängige Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Kim et al., 2007).

Zu den Redox-sensitiven, mitogen-aktivierten Protein-(MAP)-Kinasen gehören die p38-MAP-Kinase und die extrazellulär-Signalregulierte Kinase (ERK) mit den Isoformen ERK1 und ERK2. Eine Beteiligung der p38-MAP-Kinase an der Signalkaskade wurde mehrfach nachgewiesen. Durch Polyphenole des Schwarzen Tees wurde eine p38-MAP-Kinase-vermittelte Aktivierung des Estrogenrezeptors aufgezeigt, die folgend zu einer Phosphorylierung der PI3K/Akt führte (Anter et al., 2005). Konträr dazu konnte durch Einsatz von Traubenschalenextrakt an der isolierten Koronararterie des Schweins keine Beteiligung der genannten Proteinkinasen nachgewiesen werden (Madeira et al., 2009). Dies unterstreicht die Vermutung, dass verschiedene Polyphenole durchaus verschiedene Aktionen induzieren. Um Erkenntnisse über die Rolle der MAP-Kinasen an der Procyanidin-vermittelten Relaxation zu erhalten, wurden Organbad-Experimente in Gegenwart von Inhibitoren der p38-MAP-Kinase und der ERK1/2-Kinasen durchgeführt (Abb. 3-12; Abb. 3-13). Da keine signifikante Beeinflussung der induzierten Relaxation in Anwesenheit der Inhibitoren festgestellt wurde, ist eine Beteiligung dieser Proteinkinasen unter den experimentell-gewählten Bedingungen auszuschließen.

Ein weiterer Ansatzpunkt in der Erwägung eines Procyanidin-induzierten Signalweges war die Beteiligung der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Nach Autophosphorylierung dieser Redox-sensitiven Rezeptoren erfolgt eine Übertragung des Phosphates auf mögliche Zielproteine (Horn, 2009). Beispiele sind der membranständige, vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor-(VEGF-) Rezeptor oder die intrazelluläre Src-Kinase. Beide Kinasen wurden bereits im Zusammenhang mit einer eNOS-Aktivierung sowie als direkter Angriffspunkt der Polyphenole beschrieben (Lamy et al., 2002; Haynes et al., 2003; Wen et al., 2008; Anselm et al., 2009). Weder die Src-Inhibition durch PP2 noch die Blockade des VEGF-Rezeptors SU5416 konnten den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve beeinflussen (Abb. 3-14; Abb. 3-15). In Bezug auf die dilatierenden Eigenschaften der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine scheinen Tyrosin-Kinasen keine bedeutende Rolle zu spielen. Da andere Forschergruppen eine Src-abhängige Phosphorylierung der Akt-Kinase durch polyphenolische Verbindungen nachweisen konnten, ist davon auszugehen, dass Polyphenol-induzierte Vasorelaxationen sowohl Src-abhängig als auch -unabhängig verlaufen (Anselm et al., 2009; Madeira et al., 2009). Dies konnte beispielsweise an Aorten-Endothelzellen des Rinds durch Inkubation mit EGCG aus dem Grünen Tee demonstriert werden. Innerhalb von 15 Minuten kam es zu einer konzentrationsabhängigen Phosphorylierung der Akt, die durch den Src-Kinase-Hemmstoff PP2 signifikant vermindert wurde (Kim et al., 2007).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Redox-sensitive PI3K/Akt-Signalweg maßgeblich und unabdinglich an den Endothel-abhängigen relaxierenden Effekten der untersuchten Procyanidine und polyphenolreichen Extrakte in den getesteten Arteriengrößen beteiligt ist. Auch in Expressions-Analysen an HUVECs konnte eine Aktivierung von Akt durch Nachweis der phosphorylierten Form gezeigt werden. Bezüglich der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine scheinen die weiter untersuchten Proteinkinasen wie die p38-MAP-Kinase, ERK1/2-Kinase,

Src-Kinase und der VEGF-Rezeptor keinen Einfluss auf die ausgelöste Signalkaskade zu haben. Die Beteiligung der PI3K/Akt an der Procyanidin-vermittelten Relaxation ist in Abb. 4-2 dargestellt.

4.5 Einfluss von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)

Die Beteiligung von ROS an der Polyphenol-induzierten Relaxation, durch Aktivierung von Redox-sensitiven Proteinkinasen, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Auger et al., 2010; Stoclet und Schini-Kerth, 2011). Es wird vermutet, dass Polyphenole eine endotheliale, intrazelluläre ROS-Generierung auslösen. Der Grund hierfür sowie mögliche ROS-Quellen sind bis heute weitestgehend unbekannt bzw. strittig. In den folgenden Seiten werden Ansätze zur Aufklärung dieser Fragestellung gegeben.

Intrazelluläres ROS: Mit Hilfe des DCFH-DA-Assays war es möglich, die intrazelluläre ROS-Generierung in Endothelzellen durch Einfluss von Procyanidinen zu untersuchen (Abb. 3-42). Mittels Fluoreszenzmessung konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der intrazellulären ROS-Generierung durch Zugabe der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine gezeigt werden. Zunächst ist dieses Ergebnis erstaunlich, da den Procyanidinen eine antioxidative Aktivität zugesprochen wird (Kap. 1.3.1). Bemerkenswerterweise konnte in Organbadstudien in Anwesenheit des zellgängigen, unspezifischen ROS-Scavengers NAC (Abb. 3-19) oder durch den zellgängigen selektiven O₂-Scavenger Tiron (Abb. 3-18) keine Beeinflussung der dilatierenden Effekte der Procyanidine festgestellt werden. Diese Beobachtung war überraschend, da durch die zelluläre Aufnahme von NAC und Tiron, ähnlich wie bei der Zugabe von Procyanidinen, eine ROS-Inaktivierung anzunehmen war. Dieses Phänomen konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht geklärt werden, korreliert

allerdings mit anderen Untersuchungen an Koronararterien des Schweins unter Verwendung von Polyphenolen (Anselm et al., 2009).

Beeinflussung der SOD: An isolierten Koronararterien wurde der Einfluss des SOD-Mimetikums MnTMPyP auf die relaxierenden Effekte der Testprocyanidine untersucht. Der Zusatz des MnTMPyP bewirkt einen verstärkten O_2^- -Abbau zum Wasserstoffperoxid (Abb. 1-1). Angelehnt an vorausgegangene Studien konnte eine deutliche Hemmung der Procyanidin-induzierten Relaxation unter Einfluss des Mimetikums festgestellt werden (Schini-Kerth et al., 2011). Um einen direkten Zusammenhang von ROS und der Aktivierung der PI3-Kinase auf molekularer Ebene zu liefern, wurden Western-Blot Experimente durchgeführt. In Anwesenheit von MnTMPyP konnte eine deutliche Minimierung der p-Akt- und p-eNOS-Expression durch 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine gezeigt werden (Abb. 3-44; Abb. 3-46). Das Ergebnis geht mit der Annahme einher, dass durch endotheliale, intrazelluläre O_2^- -Erhöhung die Redox-sensitiven Proteinkinasen aktiviert werden (Schini-Kerth et al., 2011; Alhosin et al., 2013). Mit anderen Worten: die intrazelluläre O_2^- -Generierung spielt in gewisser Weise eine Rolle bei der Procyanidin-induzierten Vasorelaxation.

Beteiligung weiterer prooxidativer Enzyme: Die Xanthinoxidase (XO) fördert den oxidativen Abbau von Hypoxanthin oder Xanthin zur Harnsäure. Bei jeder Teilreaktion entstehen O_2^- . Die Membran-gebundene NADPH-Oxidase (NOX) überträgt Elektronen von NADPH auf intrazellulären Sauerstoff, wobei ebenfalls O_2^- entsteht (Rada et al., 2004). Die beiden prooxidativen Enzyme haben einen hohen Anteil an der intrazellulären O_2^- -Produktion (Vgl. Kap. 1.2.1.2). In Inhibitions-Experimente an isolierten Gefäßringen hatte die separate Blockade der Oxidasen durch Allopurinol und Apocynin keinerlei Auswirkungen auf die relaxierenden Effekte der Testprocyanidine (Kap. 3.1.8.1). Diese Ergebnisse korrelieren mit Befunden für EGCG (Auger et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurden in Kombinationsversuchen die dilatorischen Effekte der 2,3-*cis*

Procyanidine signifikant beeinflusst (Abb. 3-17). Erstmals konnte gezeigt werden, dass die enzymatische O_2^- -Generierung einen bedeutenden Einfluss auf den relaxierenden Wirkmechanismus der 2,3-*cis* Procyanidine hat. Auch in Western-Blot Experimenten konnte ein Einfluss der Kombination aus Allopurinol und Apocynin auf die Expression der p-Akt und der p-eNOS in HUVECs gezeigt werden (Kap. 3.6). Auffälligerweise bleiben die relaxierenden Effekte der 2,3-*trans* Procyanidine in alleiniger Gegenwart oder in Kombination der Oxidase-Hemmstoffe unbeeinflusst (Abb. 3-17). Daher lässt sich annehmen, dass die O_2^- -Generierung beider prooxidativer Enzyme eine wichtige Grundvoraussetzung für die dilatatorische Signalkaskade der 2,3-*cis*-, aber nicht der 2,3-*trans* Procyanidine, darstellt.

Beteiligung der mitochondrialen Atmungskette: Neben den prooxidativen Enzymen ist die Atmungskette (AK) ein bedeutender Lieferant von intrazellulärem ROS. Freie Radikale, vor allem das O_2^- , sind Nebenprodukte der Atmungskette, die oftmals durch fehlerhafte Elektronenübertragung entstehen (Klinke et al., 2009). In Inhibitions-Experimenten konnten die dilatierenden Effekte der 2,3-*trans* Procyanidine durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette nachgewiesen werden (Abb. 3-19). Auch in Western-Blot Analysen wurde in Anwesenheit von Rotenon die Expression der p-Akt und p-eNOS durch Behandlung mit 2,3-*trans* Procyanidinen minimiert (Kap.3.6). Interessanterweise hatte Rotenon keinen Einfluss auf den Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve der 2,3-*cis* Procyanidine (Abb. 3-19). Dieses Ergebnis wiederum geht einher mit früheren Untersuchungen mit Epigallocatechin-3-O-gallat und Weintraubenschalenextrakt an isolierten Koronararterien. Auch hier konnte kein Einfluss von Rotenon auf die Relaxation festgestellt werden (Madeira et al., 2009; Auger et al., 2010). Im Falle der 2,3-*trans* Procyanidine konnte die Atmungskette als bedeutende ROS-Quelle identifiziert werden. Der dilatierende Mechanismus der 2,3-*cis* Procyanidine scheint hingegen unabhängig von der Atmungskette abzulaufen.

Zusammenfassend ließ sich in Endothelzellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der ROS-Generierung unter Einwirkung von definierten Procyanidin-Fractionen nachweisen. Es konnte die Rolle von O_2^- für den relaxierenden Wirkmechanismus der Procyanidine spezifiziert werden. Durch den beschleunigten Abbau von O_2^- in Gegenwart von MnTMPyP wurde die Relaxation maßgeblich vermindert. Desweiteren konnten die Xanthinoxidase in Kombination mit der NADPH-Oxidase sowie die Atmungskette als mögliche O_2^- -Quellen, in Abhängigkeit von der Stereochemie der Procyanidine, identifiziert werden. Erstmals konnte an hoch-aufgereinigten Procyanidin-Fractionen eine Beteiligung von O_2^- an der relaxierenden Signalkaskade nachgewiesen werden. Im Falle der *2,3-cis* Procyanidine spielen offensichtlich prooxidative Enzyme eine Rolle und bei den *2,3-trans* Procyanidinen die Atmungskette. Zusätzlich konnte durch Western-Blot Analysen durch Verwendung entsprechender Inhibitoren gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Akt maßgeblich von der intrazellulären ROS-Generierung abhängt. Damit scheint eine Redox-sensitive Aktivierung der Akt als sichergestellt und die O_2^- -Generierung die Voraussetzung für eine Procyanidin-vermittelte Relaxation über den PI3K/Akt Signalweg zu sein. Offen bleibt das Phänomen, dass NAC und Tiron keinen minimierenden Effekt auf die intrazelluläre ROS-Konzentration zeigen. Die Beteiligung der O_2^- -Generierung an der Procyanidin-vermittelten Relaxation ist in Abb. 4-2 dargestellt.

4.6 Einfluss von Calcium-Ionen

Im physiologischen Zustand führt das freie intrazelluläre Calcium $[Ca^{2+}]_i$ im Zytosol der Endothelzelle zu einer Aktivierung der CaM-abhängigen eNOS und steuert außerdem die Öffnungswahrscheinlichkeit der endothelialen K_{Ca} -Kanäle (Fleming und Busse, 2003; Félétou und Vanhoutte, 2009). Die Freisetzung von NO und der Ausstrom von K^+ aus der Endothelzelle bewirkt letztendlich eine Relaxation der Muskelzelle. Folglich sollte in Inhibitions-Experimenten die

Beteiligung von endotheliale[m] $[Ca^{2+}]_i$ an der Procyanidin-vermittelten Relaxation überprüft werden.

SOCCs und IP_3 -Rezeptoren: Gefäßringe mit unterschiedlichem Innendurchmesser wurden zunächst mit dem Inhibitor 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. 2-APB hat zahlreiche Angriffspunkte in einer Zelle, welche stark konzentrationsabhängig sind. Im geringeren Konzentrationsbereich ($\leq 50 \mu M$) kommt es vor allem zu einer Hemmung des IP_3 -Rezeptors. Unter physiologischen Bedingungen regulieren die IP_3 -sensitiven Rezeptoren die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER ins Zytosol der Endothelzelle.

In höheren Konzentrationen ($\geq 50 \mu M$) behindert 2-APB zusätzlich den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch sogenannte SOCCs (Store-operated calcium channels) (Sugawara et al., 1997; Ascher-Landsberg et al., 1999; Dobrydneva und Blackmore, 2001; Prakriya und Lewis, 2001; Bootman et al., 2002). Deren eigentliche Aufgabe besteht darin, den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol der Endothelzelle fördern. Eine Aktivierung der an der Plasmamembran lokalisierten SOCCs wiederum wird vor allem durch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER bedingt (Lewis, 2007). Eine Differenzierung zwischen CRAC (engl: Calcium release activated channel)- und TRP-Kanälen ist nicht eindeutig möglich. In der Literatur wird darüber hinaus 2-APB auch eine unspezifische Inhibition der Gap-Junctions zugesprochen (Bai et al., 2006). Die Inkubation der Arterienringe $\geq 2mm$ mit $10 \mu M$ 2-APB konnte die vollständige Relaxation der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine nicht verändern. Allerdings wurde bei niedrigen Procyanidin-Konzentrationen der Kurvenverlauf signifikant beeinflusst (Abb. 3-23). Offensichtlich spielt eine Beteiligung des IP_3 -Rezeptors nur eine untergeordnete Rolle an der Procyanidin-vermittelten zytosolischen Ca^{2+} -Modulation. Bei einer Konzentration von $100 \mu M$ 2-APB wurden die relaxierenden Effekte der Testsubstanzen durch zusätzliche Hemmung der SOCCs

deutlich beeinflusst (Abb. 3-24; Abb. 3-38). Das Ergebnis indiziert, dass bei Procyanidin-Zugabe der Ca^{2+} -Einstrom durch endotheliale SOCCs begünstigt wird. Unter dem Einfluss der Procyanidine kommt es durch die Aktivierung von SOCCs zu einem Anstieg der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration und damit zu einer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängigen Relaxation. Die Bedeutung einer Erhöhung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration für die relaxierenden Effekte der RWPCs wurde durch Inhibitions- und Western-Blot Experimente bereits nachgewiesen (Martin et al., 2002).

Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen einer Erhöhung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration und einer Aktivierung der CaM-abhängigen eNOS und/oder der endothelialen K_{Ca} -Kanäle, wurde 2-APB (100 μM) mit den entsprechenden Inhibitoren kombiniert. Interessant war, dass 2-APB mit L-NAME die relaxierenden Eigenschaften der Procyanidine nahezu vollständig aufhob (Abb. 3-24). Im Gegensatz dazu konnte 2-APB in Kombination mit CTX/APA keine zusätzliche Inhibition auslösen (Abb. 3-24). Dass durch Verminderung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration und zusätzliche Blockade der eNOS eine Hemmung der Procyanidin-vermittelten Relaxation stattfindet, warf zunächst Fragen auf. Bekannt ist, dass eine erhöhte, endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration zur Steigerung der Aktivität der CaM-abhängigen eNOS beiträgt (Fleming und Busse, 2003). Durch den kombinierten Einsatz von L-NAME und 2-APB würde man somit einen ähnlichen Kurvenverlauf wie unter alleinigem Einsatz von 2-APB (Abb. 3-24) oder L-NAME (Abb. 3-4) erwarten.

Ein möglicher Lösungsansatz könnte die Beteiligung der endothelialen K_{Ca} -Kanäle sein. Eine minimierte Konzentration von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steht im Zusammenhang mit einer verminderten Öffnungswahrscheinlichkeit der endothelialen IK_{Ca} - und SK_{Ca} -Kanäle der Endothelzelle (Félétou und Vanhoutte, 2009). Ähnlich wie bei der kombinierten Zugabe von TRAM 34/Apamin mit L-NAME (Abb. 3-9) könnte durch die gesenkte, endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration bei gleichzeitiger

Hemmung der eNOS eine Demaskierung der EDHF-vermittelten Relaxation erreicht werden.

Ein weiterer Lösungsansatz stellt die Procyanidin-vermittelte Ca^{2+} -unabhängige eNOS Aktivierung dar. Durch eine verringerte endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration wurde auch die Aktivität der CaM-abhängigen eNOS beeinflusst. Im Experiment jedoch wurde, wie bereits beschrieben, durch gleichzeitige Zugabe von 2-APB und L-NAME die Konzentrations-Wirkungskurve signifikant stärker gehemmt als bei Einzelzugabe der Inhibitoren. Dies zeigt, dass Procyanidine möglicherweise über eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges eine Ca^{2+} -unabhängige eNOS-Phosphorylierung initiieren. Unterstützend postulierten Dimmler et al. mit Hilfe der Western-Blot Analyse an HUVECs eine analoge Ca^{2+} -unabhängige eNOS-Phosphorylierung induziert durch Scherkräfte (Dimmeler et al., 1999). Ähnliche Aussagen finden sich vielfach in der Literatur (Fulton et al., 1999; Gao et al., 2002; Hartell et al., 2005).

Etwas anders ist der Sachverhalt in Arterien mit i.D. $\leq 0,5$ mm. In Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ 2-APB wurde der Kurvenverlauf rechtsverschoben sowie die E_{max} -Werte signifikant reduziert (Abb. 3-30). Unter Einfluss der Procyanidine wurde somit ein Anstieg der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration über SOCCs nachgewiesen. In Kombination mit L-NAME oder mit CTX/Apamin konnten hier keine zusätzliche Beeinflussung des Kurvenverlaufs beobachtet werden. Dieses konträre Ergebnis überrascht im Vergleich zu Arterien ≥ 2 mm. Womöglich trägt eine Erhöhung der SOCCs-vermittelten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration zu einer verstärkten Aktivierung der eNOS und Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von K_{Ca} gleichermaßen bei.

Ryanodin-Rezeptor: Der Liganden-gesteuerte Ryanodinrezeptor ist strukturell mit dem IP_3 -Rezeptor verwandt, bei dessen Stimulation das im ER/SR gespeicherte Ca^{2+} in das Zytosol freigesetzt wird. Sein Ligand, das Ryanodin, kann rezeptorspezifisch binden und diesen hemmen. Im Organbad konnte Ryanodin

keine relevanten Effekte auslösen (Abb. 3-25). Die Procyanidin-vermittelte Relaxation verläuft unabhängig vom Ryanodin-Rezeptor. Konträre Ergebnisse konnten an der bovinen Aorta demonstriert werden. Durch Zugabe von RWPCs wurde durch Blockade des Ryanodin-Rezeptors die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration gesenkt (Martin et al., 2002).

Zusammengefasst kommt es unter dem Einfluss der Procyanidine durch die Aktivierung des SOCE-Signalwegs zu einem Anstieg der endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration. Diese führt in Arterien (i.D. ≥ 2 mm) zu einer verstärkten Öffnungswahrscheinlichkeit der endothelialen K_{Ca} -Kanäle, und nachfolgend zu einer Hyperpolarisation und Relaxation des Gefäßes. Ein direkter Zusammenhang der CaM-abhängigen eNOS mit einem erniedrigten $[Ca^{2+}]_i$ -Level wurde nicht beobachtet. Eine Ca^{2+} -unabhängige eNOS-Aktivierung durch die Procyanidine kann nicht ausgeschlossen werden. Da durch Blockade des IP_3 - und Ryanodin-Rezeptors keine deutliche Beeinflussung der Procyanidin-vermittelten Relaxation festgestellt wurde, scheint die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch in Arterien $\leq 0,5$ mm wurde der Einfluss der Procyanidine auf die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration nachgewiesen. Durch zusätzliche Hemmung der eNOS oder der K_{Ca} -Kanäle während der Blockade der SOCCs konnten keine zusätzlichen Hemmeffekte beobachtet werden. Die Beteiligung der SOCCs an der Procyanidin-vermittelten Relaxation ist in Abb. 4-2 dargestellt.

SERCA: Der ATP-abhängige Membrantransporter SERCA pumpt kontinuierlich gegen das Konzentrationsgefälle zytosolisches Ca^{2+} in das SR der glatten Muskelzelle. Die Aktivität dieser Pumpe ist umso höher, je mehr Ca^{2+} im Zytosol vorhanden sind (Wu et al., 2001). Unter Einwirkung von Thapsigargin, einem selektiven Inhibitor der SERCA, konnten keine ausgeprägten dilatierenden Effekte durch Zugabe der Procyanidine festgestellt werden (Abb. 3-25; Abb. 3-31). Die Aktivität von SERCA scheint für die Procyanidin-vermittelte Relaxation eine

Notwendigkeit darzustellen. Bei Hemmung der ATPase durch Thapsigargin steigt das Überangebot an $[Ca^{2+}]_i$ und löst somit eine Dauerkontraktion der glatten Muskelzelle aus (Ledoux et al., 2006). Die Beteiligung von SERCA an der Procyanidin-vermittelten Relaxation ist in Abb. 4-2 dargestellt.

4.7 Beteiligung der Phosphodiesterase-3

Die an der glatten Muskelzelle lokalisierte Phosphodiesterase-3 (PDE-3) spielt eine wichtige Rolle im Abbau der Second Messenger cAMP. Durch Zugabe des PDE-3-Inhibitors Milrinon kommt es zu einem verminderten Abbau von cAMP. Über die Proteinkinase A wird eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase beschrieben, die letztendlich eine Vasorelaxation auslöst (White et al., 2000). Bereits Ende der Siebziger- und Anfang der Achtzigerjahre wurden die inhibitorischen Eigenschaften der Flavonoide in Bezug auf die Phosphodiesterase nachgewiesen (Ruckstuhl und Landry, 1981; Beretz et al., 1986; Ko et al., 2004). Durch einen verminderten Abbau des Second Messenger cAMP bedingt durch Polyphenole und Flavonoide wurde eine Vasorelaxation ausgelöst. Die Inhibitions-Experimente zeigten, dass der Zusatz des PDE-3-Inhibitors Milrinon die Konzentrations-Wirkungskurve der 2,3-*cis* Procyanidine linksverschiebt. Die Effekte der 2,3-*trans* Procyanidine blieben hingegen unbeeinflusst (Abb. 3-21). Durch die verstärkte Relaxation in Anwesenheit von Milrinon scheint eine Beteiligung der PDE-3 an der Signalkaskade der 2,3-*cis* Procyanidine keine essentielle Rolle zu spielen, da sonst keine zusätzlichen relaxierende Effekte zu erwarten wären. Interessant ist, dass 2,3-*cis* Procyanidine offensichtlich keine hemmenden Effekte auf die PDE-3 zeigen. Möglicherweise ist der stereochemische Unterschied der beiden Isomere für eine Hemmung der PDE-3 maßgebend.

4.8 Beteiligung des Estrogenrezeptors

Die Beteiligung des membranständigen Estrogenrezeptors an der Polyphenol-vermittelten Relaxation wurde bereits mehrfach veröffentlicht. 1997 konnte an humanen Zellkulturen das Phytoestrogen Resveratrol als potenter Agonist identifiziert werden (Gehm et al., 1997). In isolierten Arterien und in der Zellkultur waren Polyphenole in der Lage, über eine Stimulation von Estrogenrezeptoren eine PI3K/Akt-vermittelte Aktivierung der eNOS herbeizuführen (Haynes et al., 2003; Chalopin et al., 2010; Schini-Kerth et al., 2010). Ebenso wurde an Aorten-Endothelzellen des Rinds, durch Inkubation mit Polyphenolen aus dem Schwarzen Tee, innerhalb von 15 Minuten eine konzentrationsabhängige eNOS-Phosphorylierung nachgewiesen, die durch den Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 signifikant vermindert wurde (Anter et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurden an Koronararterien des Schweins eine Estrogenrezeptor-unabhängige Aktivierung des Src/PI3K/Akt-Signalweges aufgezeigt (Anselm et al., 2009). In Einklang mit den Resultaten von Anselm et al. wurde auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit keine Beteiligung des Estrogenrezeptors nach Behandlung mit 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidinen sowie den Prodelphinidinen des EPs 7630 Spezialextraktes beobachtet (Abb. 3-20). Es lässt sich daher feststellen, dass die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch den Estrogenrezeptor abhängig von der Polyphenolstruktur ist.

4.9 Einfluss von Gi-Protein-Rezeptoren

Die membranständigen Gi-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind ubiquitär im Körper verbreitet und somit auch auf der Endothelzelle lokalisiert. Dass Gi-Proteine im Zusammenhang mit einer Endothel-abhängigen und -unabhängigen Relaxation stehen, konnte an Arterienringen in Inhibitions-Experimenten nachgewiesen werden (Flavahan et al., 1989). Bezüglich einer Gi-

vermittelten Relaxation durch Polyphenole wurde eine Erhöhung von zytosolischen Ca^{2+} -Spiegeln und eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen eNOS festgestellt (Martin et al., 2002). Diese Datenlage konnte für 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine nicht bestätigt werden (Abb. 3-16). Die Endothel-vermittelte Vasodilatation verläuft G_i -unabhängig.

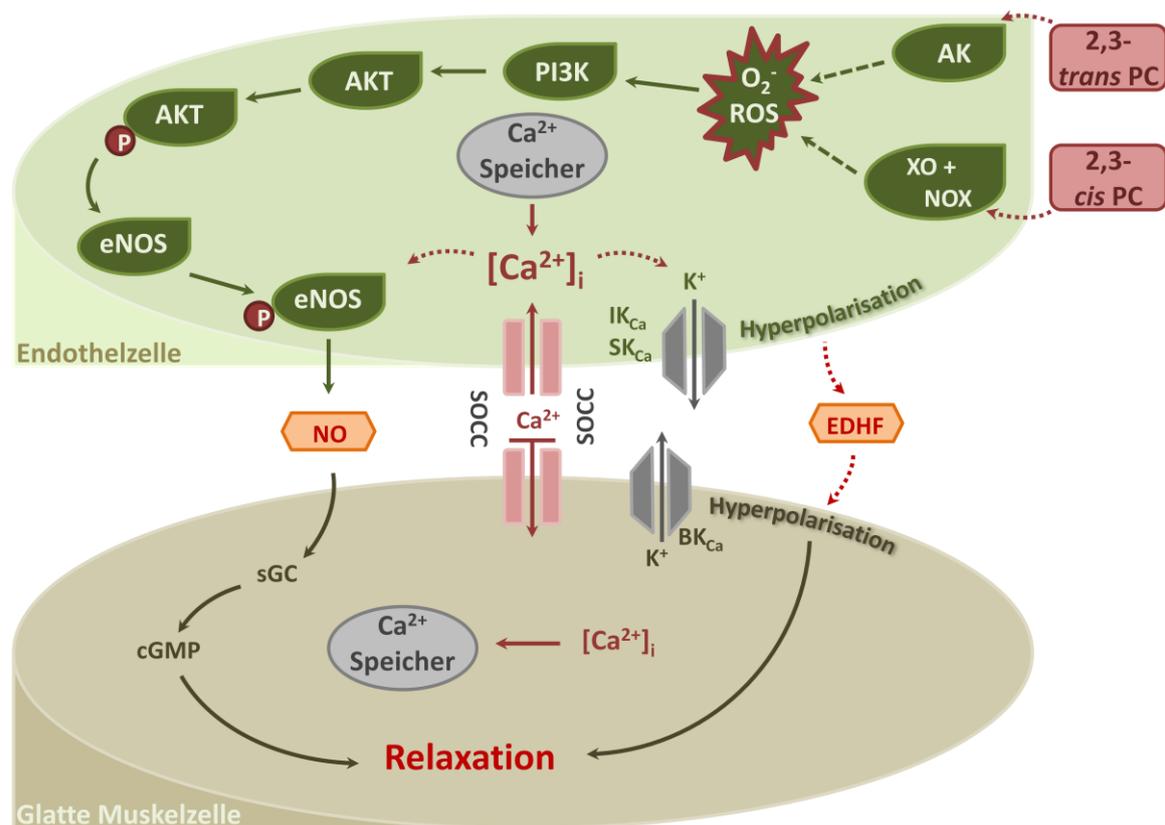


Abb. 4-2: Beteiligte Signalkaskade der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine

Beteiligte Signalwege der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine (PC) in Bezug auf ihr Endothel-vermitteltes Relaxationsvermögen an der Koronararterie des Schweins.

(AK–Atmungskette; XO–Xanthinoxidase; NOX–NADPH-Oxidase)

4.10 Relaxierenden Effekte von 2,3-*trans* Procyanidinen an Arterien mit entferntem Endothel

Die zunehmende Manifestierung einer Arteriosklerose geht mit einem Verlust an funktionstüchtigem Endothel in Arterien einher (Bai et al., 2010). Die physiologische Regulation der Vasomotorik, Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion, Proliferation der glatten Muskelzelle sowie die Freisetzung

verschiedener parakriner Faktoren wie NO gerät mehr und mehr ins Ungleichgewicht (Epstein und Ross, 1999) (Kap. 1.2). In Anbetracht der steigenden kardiovaskulären Erkrankungsrate wird die Forschung auf diesem Gebiet immer mehr vorangetrieben und innovative medikamentöse Therapien entwickelt. Da Koronararterien bevorzugte Gefäße für arteriosklerotische Veränderungen sind, wurde als Modell für die folgenden Experimente die Koronararterie des Schweins gewählt, dessen Endothel mechanisch entfernt wurde (Hansson, 2005). Diese Methodik wurde ebenfalls in Studien zur Endothel-unabhängigen Relaxation des Flavonoids Scutellarin an der isolierten Rattenaorta (Pan et al., 2008) und einer Dichlormethanfraktion aus *Anogeissus leiocarpus* an der isolierten Koronararterie des Schweins angewandt (Belemnabaab et al., 2013).

Im Abschnitt 3.3 sind die relaxierenden Effekte der *2,3-trans* Procyanidine an vorkontrahierten, isolierten Koronararterien des Schweins mit unterschiedlichem Gefäßinnendurchmesser (i.D. $\leq 0,5$ mm und i.D. ≥ 2 mm) nach Entfernung des Endothels dargestellt. Im Gegensatz zur Endothel-abhängigen Relaxation handelt es sich hier um einen langsamen und kontinuierlichen Verlauf, der durch die kumulative Zugabe der *2,3-trans* Procyandine hervorgerufen wurde (Abb. 3-33). Der langsame, kontinuierliche Verlauf der Relaxation in Geweberingen mit entferntem Endothel verweist auf eine andere Signalkaskade als in Ringen mit funktionstüchtigem Endothel. Im Vergleich zu Arterien mit funktionstüchtigem Endothel waren hier höhere Konzentrationen (1 - 100 $\mu\text{g/mL}$) notwendig, um eine komplette Vasorelaxation zu erreichen. Ähnliche Konzentrationseffekte wurden auch durch andere Forschergruppen aufgezeigt, beispielsweise für das Flavonoid Pinocembrin an isolierten Rattenaorten mit und ohne Endothel (Zhu et al., 2007). Die Endothel-intakten Geweberinge wurden bei einer Pinocembrin-Konzentration von 10^{-4} M vollständig dilatiert. Zur Charakterisierung einer möglichen Signalkaskade wurden die folgenden Inhibitions-Experimente durchgeführt.

4.10.1 Rezeptoren der glatten Muskelzelle

Die β_2 -Adrenorezeptoren gehören zu den G_s-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind auf der Membran der glatten Muskelzelle lokalisiert. Durch Stimulation kommt es zu einer zytosolischen cAMP-Erhöhung und anschließend zu einer Gefäßdilatation (Gekle et al., 2010). Der β_2 -Adrenorezeptor-Agonist Salbutamol hatte keinen Einfluss auf die ausgelöste Relaxation (Abb. 3-34). Dies steht in Übereinstimmung zu Studien an der Rattenaorta. Durch Vorinkubation mit dem β_1/β_2 -Blocker Propranolol wurde die durch das Flavonoid Scutellarin ausgelöste Relaxation nicht beeinflusst (Pan et al., 2008).

4.10.2 Bedeutung der SOCCs und der Kv-Kanäle

Die Aktivierung der Kalium-Kanäle bewirkt üblicherweise einen Ausstrom von K⁺ aus der Muskelzelle sowie eine Behinderung des Einstroms von Ca²⁺ in die Selbige (Nelson und Quayle, 1995; Sobey, 2001). Letztendlich führt dies zu einer Hyperpolarisation und anschließender Dilatation der glatten Muskelzelle. Bei einer physiologisch-ausgelösten Kontraktion kommt es zu einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR und einem Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ über die SOCCs der glatten Muskelzelle. Im Rahmen der durchgeführten Inhibitions-Experimente mit entferntem Endothel konnte eine Beteiligung der SOCCs und der Kv-Kanäle ausgeschlossen werden (Abb. 3-37; Abb. 3-38). In Übereinstimmung dazu wurde in Studien an der Koronararterie des Schweins mit dem Flavonoid Pinocembrin ebenso keine Beteiligung von SOCCs und Kv-Kanäle nachgewiesen (Belemnabaab et al., 2013). Dies steht im Gegensatz zu Resultaten an der menschlichen Brustwandarterie (HIMA) unter Verwendung von Resveratrol (Novakovic et al., 2006).

4.10.3 ROS

Der Einfluss von ROS auf die glatte Muskelzelle wurde in Inhibitions-Experimenten in Anwesenheit des unspezifischen ROS-Scavengers NAC und des O₂-Scavengers Tiron überprüft. In Anwesenheit der Inhibitoren konnte eine

deutliche Linksverschiebung der 2,3-*trans* Procyanidin-vermittelten Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet werden (Abb. 3-35). Durch die Abnahme der intrazellulären ROS-Konzentration kommt es zu einer Verstärkung der Procyanidin-induzierten Vasorelaxation in Arterien ohne Endothel. Damit wurde ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den gewonnenen Ergebnissen nach Inkubation mit Tiron oder NAC mit Koronararterien mit funktionstüchtigem Endothel aufgezeigt (Abb. 3-17; Abb. 3-19). Interessanterweise kam es unter Blockade der Atmungskette durch Rotenon, bei niedrigen Procyanidin-Konzentrationen zunächst zu einem signifikanten Hemmeffekt, der allerdings in der Höchstkonzentration nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3-35).

4.11 Antioxidative Eigenschaften der eingesetzten Polyphenole

Eine der Hauptursachen für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist eine vorangegangene oxidative Gefäßschädigung. Hierbei kommt es zu einem pathologischen Ungleichgewicht zwischen RNS/ROS-Generierung und antioxidativen Prozessen, was letztendlich zum oxidativen Stress der Zelle und einer Zellschädigung führt (Touyz, 2004) Wie bereits erläutert (Kap. 1.2.1), wurde vielfach das antioxidative Potential der Polyphenole in zahlreichen *in vitro*-Versuchen nachgewiesen (Kap. 1.3.1) Häufig werden kardioprotektive und antiarteriosklerotische Effekte von Flavonoiden und Polyphenolen ihrer antioxidativen Wirkungsweise, der Aktivierung von antioxidativ-fungierenden Enzymen sowie der Hemmung von prooxidativen Enzymen, zugeschrieben (Mazur et al., 1999; Harborne und Williams, 2000; Heim et al., 2002; Arts und Hollman, 2005).

Neben den bereits beschriebenen dilatierenden Effekten der polyphenolischen Testsubstanzen soll in diesem zweiten Abschnitt der Untersuchungen das antioxidative Potential der 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine und des

Pelargonium-Extrakt genauer untersucht werden. Alle Testsubstanzen zeigten direkte und ausgeprägte ROS- bzw. RNS-Scavenger-Effekte im DPPH- bzw. Griess-Assay. Das stärkste antioxidative Potential zeigten die 2,3-*cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT., gefolgt von den 2,3-*trans* Procyanidinen aus *Salix* spp. und dem *Pelargonium*-Extrakt mit einem hohen Anteil an Prodelphinidinen (Kap.3.8.2; Kap.3.8.1). Das antioxidative Potenzial lässt sich vor allem auf die strukturellen Begebenheiten der Flavan-3-ole zurückführen. Insbesondere die 4-Oxo-Funktion und die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 des Heterozyklus tragen zu einer Vergrößerung des delokalisierten π -Elektronensystems nach Aufnahme des Radikals bei (Bors et al., 1990). Neben dem Polymerisationsgrad des Moleküls spielt auch die Konfiguration und Gesamtanzahl der Hydroxygruppen eine essentielle Rolle an dem antioxidativen Wirkpotential der Flavan-3-ole. Die antioxidative Aktivität ist direkt proportional zur Anzahl an Hydroxygruppen im Gesamtmolekül (Cao et al., 1997). Eine bis zu 10-fache Wirkverstärkung in Bezug auf ROS- und RNS-Scavenger-Eigenschaften wird durch eine zusätzliche freie Hydroxygruppe am C-3 des Heterozyklus erreicht (Haenen et al., 1997).

Auch die *cis*-Stereochemie der Substituenten am C-2 und C-3 des Benzopyran-Grundkörpers fördern die antioxidative Kapazität des Flavan-3-ols (Heim et al., 2002). Die Resultate der durchgeführten *in vitro*-Assays gehen mit der beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehung der eingesetzten Flavan-3-ole einher. Auffällig ist, dass die 2,3-*cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT., im Vergleich zu den 2,3-*trans* Procyanidinen von *Salix* spp., stärkere Radikalfängereigenschaften aufweisen (Abb. 3-49; Abb. 3-52). Wie beschrieben, scheint die stereochemische Anordnung der Substituenten des C-Ringes eine essentielle Rolle zu spielen. Im DPPH- und Griess-Assay zeigten die 2,3-*cis* Procyanidine die ausgeprägtesten Scavenger-Effekte. Somit scheint die *cis*-Stereochemie der Substituenten am C-2 und C-3 des Benzopyran-Grundkörpers

die antioxidative Kapazität des Flavan-3-ols zu fördern (Heim et al., 2002). Dieses Phänomen ist auch bei den Monomeren Epicatechin (EC) und Catechin (C) im Griess-Assay zu beobachten (Abb. 3-51). Hier weist die *cis*-ständige Anordnung der Substituenten im Grundkörper des EC ein stärkeres RNS-Abfänger-Potential auf. Die NO-Scavenger-Aktivität von EGCG ist aufgrund einer verbesserten Mesomeriestabilisierung durch die O-Galloyl-Gruppierung in Position 3 des C-Ringes am stärksten ausgeprägt.

Die *2,3-trans* Procyanidine von *Salix* spp. und der *Pelargonium*-Extrakt weisen im DPPH- und Griess-Assay im Vergleich zu den *Nelia*-Procyanidinen moderate antioxidative Eigenschaften auf (Abb. 3-49; Abb. 3-52). Dennoch zeigten alle polyphenolischen Testsubstanzen ausgeprägte Radikalfänger-Eigenschaften. Neben den bereits genannten strukturellen Eigenschaften der Procyanidine spielt die 3`4`-Catechol-Struktur des B-Rings für das Abfangen des DPPH- und NO-Radikals eine Rolle. Hintergrund hierfür ist die mögliche Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken (Heim et al., 2002).

Auch die im Xanthinoxidase-Assay gewonnenen Ergebnisse ergeben ein ähnliches Bild. Die *2,3-cis* Procyanidine verminderten am stärksten die enzymatische O₂-Bildung (Abb. 3-55). Im Gegensatz zum DPPH- und Griess-Assay kommt hier nicht nur das Radikalfänger-Potential der Polyphenole, sondern auch eine Enzym-Hemmung und die damit verbundene reduzierte O₂-Bildung in Betracht (Sato et al., 1996; Dew et al., 2005). Die Resultate zeigen, dass die *2,3-cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT. eine höhere antioxidative Aktivität im Vergleich zu den *2,3-trans* Procyanidinen aus *Salix* spp. und den Prodelphinidinen des *Pelargonium*-Extrakts aufweisen. Sollte eine zusätzliche Hemmung der Xanthinoxidase durch die Polyphenole eine Rolle spielen, scheinen auch hier die *2,3-cis* Procyanidine ausgeprägtere Hemmeffekte im Vergleich zu den *2,3-trans* Procyanidinen zu zeigen.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass 2,3-*cis*- und 2,3-*trans* Procyanidine sowie der *Pelargonium*-Extrakt in allen durchgeführten Assays ausgeprägte antioxidative Eigenschaften zeigen, da die Konzentration an DPPH-Radikal sowie das generierte NO signifikant gesenkt wurden. Auch das durch enzymatische Umsetzung entstandene O₂⁻ wurde durch Procyanidine maßgeblich reduziert. Neben dem reinen ROS- und RNS-Abfängerpotential kommt hier auch eine zusätzliche Polyphenol-vermittelte Hemmung der Xanthinoxidase in Frage. Die strukturellen Unterschiede der Procyanidine stehen offensichtlich im direkten Zusammenhang mit ihrer antioxidativen Wirkpotenz.

4.12 OxLDL-Inkubationsassay

Die Oxidation von LDL und die anschließende Aufnahme in die Gefäßwand stellt eines der Schlüsselereignisse in der Entwicklung und Progression der Arteriosklerose dar (Hulthe und Fagerberg, 2002; Holvoet et al., 2003). OxLDL führt neben einer Begünstigung der Monozytenadhäsion zu einer verminderten Transkription der eNOS (Kap. 1.2.1.1). Auch vorherrschender oxidativer Stress und damit die erhöhte ROS-Generierung in der Zelle begünstigt die Oxidation von LDL (Griendling und FitzGerald, 2003). Mit Hilfe dieses Assays sollte die vasoprotektive Wirkung der Procyanidine gegenüber gefäßschädigenden Lipoproteinen durch Überprüfung der Bradykinin-induzierten Endothel-abhängigen Relaxation an vorkontrahierten, isolierten Koronararterien des Schweins nachgewiesen werden. Die Resultate zeigen, dass die unbehandelten sowie die mit Procyanidinen vorbehandelten, funktionstüchtigen Arterien durch kumulative Zugabe von Bradykinin vollständig dilatieren (Abb. 3-47). Eine Vorinkubation mit LDL oder der Kombination aus LDL und Procyanidinen hatte ebenso keine Auswirkungen auf die relaxierenden Effekte. In Übereinstimmung dazu, konnten auch andere Arbeitsgruppen ebenfalls keine oder nur marginale

Schädigungen des Endothels durch Behandlung mit LDL nachweisen (Jacobs et al., 1990; Kugiyama et al., 1990; Hein et al., 2000).

Wurden die funktionstüchtigen Gefäßringe jedoch mit oxLDL vorinkubiert, konnte keine Endothel-abhängige Relaxation durch Bradykinin beobachtet werden (Abb. 3-47). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die enorme Beeinträchtigung der Funktionalität des Endothels durch oxLDL. Die gefäßschädigenden Effekte von oxLDL sind mehrfach beschrieben (Jacobs et al., 1990; Kugiyama et al., 1990; Simon et al., 1990; Hein et al., 2000). Wurden die Arterienringe vor der Zugabe von oxLDL mit 2,3-*cis*- oder 2,3-*trans* Procyanidinen inkubiert, wurde eine vollständige Dilatation der Gefäßringe beobachtet (Abb. 3-47). Unter Einfluss der Procyanidine konnte die endothelschädigende Wirkung von oxLDL nahezu vollständig aufgehoben werden. Ein Grund für die vasoprotektiven Effekte der Procyanidine könnte die Hemmung in der Anbindung von oxLDL an den „lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1“ (LOX-1) sein. Die Aufgabe des membranständigen Rezeptors LOX-1 ist die Einschleusung von oxLDL in die Intima. Eine Aktivierung dieses Rezeptors steht unter anderem im engen Zusammenhang mit einer Abschwächung der eNOS-Aktivität (Elio et al., 2013). Anhand von LOX-1 ELISA-Testungen, Real-time PCR oder Immunoblotting konnten an Zellkulturen eine LOX-1-Hemmung verschiedener Procyanidine nachgewiesen werden (Ou et al., 2010; Nishizuka et al., 2011). Eine weitere denkbare Erklärung bieten die unter Kap. 3.8 beschriebenen antioxidativen Eigenschaften der Procyanidine. Möglicherweise kann die oxidierte Form des LDL in Wechselwirkung mit den anwesenden Procyanidinen treten.

Folglich war es mit Hilfe dieses oxLDL-Inkubationsassays möglich, Arterien mit funktionstüchtigem Endothel durch Zugabe von oxLDL pathologischen Umständen auszusetzen und damit eine auffällig starke Beeinträchtigung der Funktion des Endothels zu erreichen. Wurden die mit oxLDL versetzten

Gefäßringe mit Procyanidinen vorinkubiert, wurde das Endothel nicht beschädigt. Die endothelabhängige Relaxation, ausgelöst durch Bradykinin, war vergleichbar mit den unbehandelten Kontroll-Organen.

4.13 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay wurden mögliche zytotoxische Effekte der Procyanidine auf die Vitalität der HUVEC-Kulturen bestimmt. Problematisch hierbei ist, dass phenolische Naturstoffe in konzentrationsabhängiger Weise in der Lage sind, MTT zu reduzieren und damit falsch-positive Ergebnisse zu erzeugen (Peng et al., 2005; Kram et al., 2006). Aufgrund des beschriebenen Versuchsaufbaus (Vgl. Kap. 2.10) konnte diese Beeinflussung der Procyanidine weitestgehend ausgeschlossen werden. Generell wird den Procyanidinen ein protektiver und schützender Effekt vor oxidativen und inflammatorischen Schädigungen in Endothelzellen nachgesagt (Youdim et al., 2002). So konnten Flavonoide aus *Spirodela polyrrhiza* (L.) SCHLEID in HUVEC-Kulturen eine durch H₂O₂-induzierte Zellschädigung aufgrund ihre antioxidativen Eigenschaften verhindern (Wang et al., 2007). Daher waren die Resultate des durchgeführten MTT-Assays nicht überraschend. Erst nach 24 Stunden wurde die Zellviabilität um rund 30 % in der höchsten Procyanidin-Konzentration von 0,2 mg/mL signifikant vermindert (*Nelia*: $E_{\max} = 67,4 \pm 2,5 \%$; *Salix*: $E_{\max} = 70,4 \pm 3,5 \%$) (Abb. 3-40). Im Vergleich zu anderen teils zytotoxisch eingestuften Pflanzenstoffen, sind die aufgezeigten Ergebnisse als positiv anzunehmen (Hebestreit et al., 2006; Lucas et al., 2011).

4.14 Fazit und Ausblick

Umfragen zufolge werden Naturheilmittel in der Bevölkerung immer beliebter. Nach einer Studie über „Naturheilmittel 2010“ des Instituts für Demoskopie Allensbach nutzte in den 1970er rund die Hälfte der Bevölkerung in Westdeutschland Naturheilmittel. 2010 hatte sich der Anteil auf 72 % erhöht. Vor allem in der Selbstmedikation werden Natur-basierte Arzneimittel besonders von jüngeren Patienten immer gefragter. Hinsichtlich der Tatsache, dass nach Schätzungen der WHO kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen gehören, zeigt diese Forschungsarbeit aktuellen und innovativen Bezug.

An verschiedenen Koronararterien des Schweins konnten in Anwesenheit der chemisch-definierten 2,3-*cis* Procyanidine von *Nelia meyeri* SCHWANT. und der 2,3-*trans* Procyanidine der *Salix* spp. konzentrationsabhängige relaxierende Effekte aufgezeigt werden. Besonders ausgeprägt waren die relaxierenden Effekte in Koronararterien mit funktionstüchtigem Endothel. Neben der direkten Wirkung der polyphenolischen Testsubstanzen auf die Gefäße wurde die vorwiegend auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückzuführende gefäßschützende und gesundheitsfördernde Wirkweise aufgezeigt. An isolierten Koronararterien des Schweins konnte in Anwesenheit der Procyanidine zusammen mit dem Lipoprotein oxLDL dessen endothel-schädigende Wirkung nahezu vollständig aufgehoben werden. Zusätzlich zeigten *in vitro* Experimente ausgeprägte antioxidative Eigenschaften der fraktionierten Procyanidine. Diese positiven Ergebnisse könnten vor allem bei der Therapie der endothelialen Dysfunktion und der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle spielen. Mit diesen aufschlussreichen Resultaten wurden erste Schritte in Richtung *in vivo* Studien geebnet, um in ferner Zukunft bei Herz-Kreislaferkrankungen eine pflanzliche Alternative zu den chemischen Arzneimitteln zu bieten.

5 Zusammenfassung

Die Arteriosklerose ist die häufigste systemische entzündliche Erkrankung, die die Intima großer bis mittelgroßer Arterien betrifft. Kommt es zur Manifestation einer Arteriosklerose an den Koronararterien, die durch sogenannte kardiovaskuläre Risikofaktoren verschlimmert wird, führt dies meistens zu einer koronaren Herzerkrankung (KHK). Zahlreiche epidemiologische und klinische Studien haben eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel und der Mortalität sowie Morbidität von Herz-Kreislauf-Krankheiten aufgezeigt. Die häufig publizierte gesundheitsfördernde Wirkung der Polyphenole umfasst vasoprotektive, antiarteriosklerotische, antiinflammatorische und vasodilatorische Effekte auf das kardiovaskuläre System und kann verschiedenen Eigenschaften der Polyphenole zugeschrieben werden. Speziell den Flavanolen und Procyanidinen wurde bereits eine direkte Wirkung auf die Blutgefäße nachgewiesen, wobei die Endothelzellen eine Schlüsselrolle spielen. Unter physiologischen Bedingungen bildet die Endothelzelle vasoaktive Substanzen, sogenannte Autakoide, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind. Zu den vasoprotektiven Faktoren gehören unter anderem das Stickstoffmonoxid (NO), der endothelium-derived hyperpolarization factor (EDHF) und das Prostacyclin. Pathologische Zustände wie die endotheliale Dysfunktion führen häufig zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO und EDHF und somit zu einer erhöhten Bildung von oxidativem Stress und Produktion vasokonstriktorischer Faktoren.

Die Flavan-3-ole sind monomere Bausteine der Proanthocyanidine und unterscheiden sich in ihrem Hydroxylierungsmuster des B-Ringes, wobei reine Catechin/Epicatechin-Kondensate als Procyanidine bezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf eine mögliche therapeutische Relevanz der hochgereinigten und chemisch definierten di- bis

hexameren Procyanidine aus *Salix* spp. (Salicaceae) und aus *Nelia meyeri* SCHWANT. (Mesembryanthemaceae) gelegt. Die 2,3-trans Procyanidine von *Salix* umfassen eine Mischung aus [4 α ,8]-Flavan-3-ole, während die 2,3-cis Procyanidine von *Nelia* überwiegend aus [4 β ,8]-interflavanyl Bindungen zusammengesetzt sind.

Das primäre Thema dieser Arbeit ist die Procyanidin-vermittelte Vasorelaxation von Koronararterien des Schweins (Innendurchmesser 2-3 mm). Die Endothelintakten Ringe wurden in Organbädern mit dem Thromboxan A₂-Mimetikum U46619 bei 37 °C kontrahiert. Durch kumulative Zugabe der polyphenolischen Testsubstanzen kam es zu einer konzentrationsabhängigen, spontanen Relaxation des Gewebes. Durch die mechanische Entfernung des Endothels konnte dieser Effekt auf die Gefäßmuskulatur nahezu verhindert werden. Hiermit wurde die unabdingbare Notwendigkeit eines funktionstüchtigen Endothels für die spontane Relaxation deutlich. Um einen Einblick in den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus der verwendeten Procyanidine zu erhalten, wurden anschließende Inhibitions- bzw. Aktivierungs-Experimente im Organbad durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten sowohl eine Beteiligung des durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der löslichen Guanylylcyclase (sGC) gekennzeichneten NO-Signalwegs als auch der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt) der Endothelzelle. Unterstützend dazu ergaben Western-Blot Analysen eine konzentrationsabhängige Expression der p-Akt und der p-eNOS in Anwesenheit der Procyanidine in HUVECs. Diese Befunde legen nahe, dass unabhängig von der Gefäßgröße die Procyanidin-vermittelte Relaxation überwiegend von NO reguliert wurde. Neben der NO-vermittelten Relaxation mussten jedoch für eine vollständige Vasodilatation noch weitere Signalwege eine Rolle spielen. Als weitere beteiligte Signalkaskade konnten Hinweise für eine EDHF-vermittelte Relaxation aufgezeigt werden. So kam es

in Anwesenheit der Procyanidine zu einer Aktivierung der endothelialen K_{Ca} -Kanäle. Durch Inhibitionsexperimente konnte besonders die Beteiligung von IK_{Ca} (intermediate conductance Kalium-Kanäle) und SK_{Ca} (small conductance Kalium-Kanäle) herausgestellt werden. Desweiteren wurde die Bedeutung von freien, intrazelluläre Calcium-Ionen ($[Ca^{2+}]_i$) im Endothel untersucht, da diese nachweislich im Zytosol an der Aktivierung der eNOS und der IK_{Ca} bzw. SK_{Ca} beteiligt sind. Ein Einstrom von Ca^{2+} durch die SOCCs (Speicher-aktivierender Calcium-Kanal) scheint eine Notwendigkeit für eine vollständige Procyanidin-vermittelte Relaxation darzustellen. Eine weitere bedeutende Rolle an der Signalkaskade der Procyanidin-vermittelten Relaxation spielen die Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), insbesondere das Superoxid-Anion (O_2^-). In HUVECs konnte durch den DCFH-DA-Assay zum Einen eine konzentrationsabhängige signifikante Erhöhung von intrazellulärem ROS in Anwesenheit der Procyanidine nachgewiesen werden. Zum Anderen bestätigten Western-Blot Analysen durch Zusatz von Inhibitoren die essentielle Rolle des O_2^- . Als mögliche endotheliale ROS-Quellen konnten die NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und die Atmungskette identifiziert werden, wobei die Beteiligung dieser in Abhängigkeit der jeweiligen Stereochemie des Procyanidins stand. Zusammenfassend konnte eine Redox-sensitive, Endothel-abhängige Vasorelaxation an Koronararterien des Schweins aufgezeigt werden.

Um mögliche Änderungen der Signalkaskade in Bezug auf die Gefäßgröße zu untersuchen, wurden Ringe der Koronararterien mit einem Innendurchmesser von $\leq 0,5$ mm in separaten Experimenten verwendet. Relevante Unterschiede in der relaxierenden Signalkaskade der Procyanidine konnten nicht beobachtet werden.

Oxidativer Stress ist die Folge eines Ungleichgewichts der Prooxidantien und Antioxidantien in einem Organismus und stellt damit ein Schlüsselphänomen der arteriosklerotischen Erkrankung dar. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde

das antioxidative Potential der Procyanidine sowie deren gefäßprotektive Wirkung gegenüber Lipoproteinen *in-vitro* untersucht. Mit Hilfe eines Lipoprotein-Assays konnte eine endothelschädigende Wirkung von oxidiertem LDL (oxLDL), nicht aber des LDL, auf die Koronararterie gezeigt werden. Durch oxLDL-Inkubation der Ringe wurde die Endothel-abhängige Relaxation von Bradykinin deutlich herabgesetzt. Durch Vorbehandlung der Gefäßringe mit den procyanidinhaltigen Testsubstanzen blieb der beschriebene schädigende Effekt des oxLDL aus. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die *2,3-cis*- und *2,3-trans* Procyanidine gefäßschützende Wirkungen gegen oxLDL in pathologischen Zuständen wie Arteriosklerose zeigen könnten. Zusätzlich konnte in verschiedenen *in vitro*-Experimenten eine starke antioxidative Wirkung und ein hohes Radikalfänger-Potenzial der getesteten Procyanidine nachgewiesen werden. Alle eingesetzten Polyphenole waren in der Lage, freie Radikale wie das Stickstoffmonoxid (Griess-Assay) und das stabile DPPH-Radikal abzufangen. Darüber hinaus konnte eine Reduktion des enzymatisch-generierten Superoxid-Anions (Xanthinoxidase-Assay) in Anwesenheit der polyphenolischen Testsubstanzen demonstriert werden.

6 Summary

Arteriosclerosis is the most common systemic inflammatory disease that affects the intima of large and medium-sized arteries. A manifestation of arteriosclerosis in coronary arteries is triggered by cardiovascular risk factors usually leading to coronary heart disease (CHD).

Numerous epidemiological and clinical evidences have indicated an inverse correlation between the regular consumption of polyphenol-rich food and risk for developing cardiovascular diseases. Polyphenols such as procyanidins and flavanols are suggested to exert beneficial effects on the cardiovascular system by, for example, the improvement of endothelial function, inhibition of lipoprotein (LDL) oxidation, and scavenging of reactive oxygen species (ROS).

Endothelial cells play a key role in the control of the vascular tone through the production of vasoprotective factors including nitric oxide (NO), endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) and prostacyclin. Endothelial dysfunction is a key event in the development of cardiovascular diseases commonly associated with a reduced bioavailability of NO and EDHF. The blunted vasorelaxation was shown to be associated with an increased NADPH oxidase-dependent oxidative stress and production of vasoconstrictor factors.

Procyanidins are oligomeric flavan-3-ols which differ in their hydroxylation pattern of the B ring. The procyanidins that exclusively consist of (epi)catechin units are designated procyanidins. In the present study, we focussed on the vasorelaxant potentials of highly purified and chemically defined procyanidin samples composed of di- to hexameric 2,3-*trans*-[4 α ,8]- (*Salix* spp.; Salicaceae) and 2,3-*cis*- [4 β ,8]-procyanidins (*Nelia meyeri* SCHWANT; Mesembryanthemaceae), respectively.

The main part of this work addressed the vasorelaxant effects of these procyanidins in porcine coronary arteries (inner diameter: 2 to 3 mm). In endothelium-intact rings pre-contracted with U46619 (thromboxane A₂ mimetic), the tested samples evoked a concentration-dependent relaxation, while endothelium-denuded rings did not show relaxant responses. To get insight into the underlying relaxing mechanism(s) induced by the procyanidins, experiments were performed in the presence of inhibitors of distinct signalling pathways. These studies clearly demonstrated a major role of the NO signalling pathway, evident from activation of eNOS and sGC, respectively. The PI3K/Akt signalling pathway was identified as an upstream effector of the NO signalling pathway. Confirmatory evidence of the activation of Akt and eNOS was obtained by Western blotting using HUVECs. The procyanidin samples induced the phosphorylation of Akt and eNOS in a concentration-dependent manner, thus confirming the results of our tissue bath studies. Since the relaxation of the vessels was only depressed but not abolished in the presence of the NO synthase inhibitor L-NAME, mechanisms other than eNOS activation may in addition be involved in the vasorelaxant response to the procyanidins. Indeed, vasorelaxation has also been shown to be facilitated by EDHF signalling. EDHF-mediated responses are caused by different factors, including the activation of endothelial calcium-activated potassium channels (K_{Ca}). Experiments with K_{Ca} subtype inhibitors showed an involvement of IK_{Ca} and SK_{Ca} in the relaxant response to procyanidins. Moreover, the importance of an increase in endothelial [Ca²⁺]_i-levels for the activation of endothelial K_{Ca} channels and the eNOS was evaluated. Our data demonstrated that the opening of endothelial store-operated Ca²⁺ channels (SOCCs) induced by the procyanidins had an influence on the relaxant signalling pathway.

Additional experiments using tissue bath studies and Western blot analyses indicated a key role for an intracellular redox-sensitive mode of action in eNOS

activation triggered by the procyanidins. NADPH oxidase, xanthine oxidase and the respiratory chain were identified as potential sources of ROS, with conspicuous differences in the origin of ROS with respect to *2,3-cis* and *2,3-trans* procyanidins. Furthermore, using the DCFH-DA assay, procyanidin-induced ROS formation in HUVECs was in a concentration-dependent manner.

In summary, these findings suggested that *2,3-trans* and *2,3-cis* procyanidins are potential endothelium-dependent vasodilators in porcine coronary arteries. The relaxant response is largely mediated by activation of the PI3K/Akt and the NO/cGMP signalling pathway in a redox sensitive manner and, to a lesser extent, via the EDHF pathway.

To investigate possible differences in the relaxant response in relation to the vessel size, separate experiments using coronary arteries with an inner diameter of ≤ 0.5 mm were performed. Relevant differences in the signalling pathway of both used vessel sizes were not observed.

Oxidative stress resulting from an imbalance of prooxidants and antioxidants is a major cause of various chronic diseases. The second part of this work thus focussed on beneficial vasoprotective effects of the procyanidins against oxLDL under *in vitro* conditions. The endothelium-dependent relaxation to bradykinin was significantly reduced in rings incubated with oxLDL. This detrimental effect of oxLDL was completely inhibited by pre-incubations with procyanidins. Thus, our results indicate that *2,3-trans* and *2,3-cis* procyanidins may exhibit vasoprotective effects against oxLDL in pathological conditions such as atherosclerosis.

Finally, the procyanidins tested also showed strong antioxidant (xanthinoxidase assay) and radical scavenging activities (Griess assay, DPPH-free radical method) under *in vitro* conditions.

Literatur- & Abbildungsverzeichnis

7 Literaturverzeichnis

- AGOUNI, A., LAGRUE-LAK-HAL, A.-H., MOSTEFAL, H. A., TESSE, A., MULDER, P., ROUET, P., DESMOULIN, F., HEYMES, C., MARTÍNEZ, M. C. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (2009); Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa); *PLoS One*; 4: e5557
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. and KNOWLES, R. G. (2001); Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition; *Biochemical Journal*; 357: 593-615
- ALEXOPOULOS, N., VLACHOPOULOS, C., AZNAOURIDIS, K., BAOU, K., VASILIADOU, C., PIETRI, P., XAPLANTERIS, P., STEFANADI, E. and STEFANADIS, C. (2008); The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals; *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*; 15: 300-305
- ALHOSIN, M., ANSELM, E., RASHID, S., KIM, J. H., MADEIRA, S. V., BRONNER, C. and SCHINI-KERTH, V. B. (2013); Redox-sensitive up-regulation of eNOS by purple grape juice in endothelial cells: role of PI3-kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a; *PLoS One*; 8: e57883
- ANDRIAMBELOSON, E., KLESCHYOV, A. L., MULLER, B., BERETZ, A., STOCLET, J. C. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (1997); Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta; *British Journal of Pharmacology*; 120: 1053-1058
- ANDRIAMBELOSON, E., MAGNIER, C., HAAN-ARCHIPOFF, G., LOBSTEIN, A., ANTON, R., BERETZ, A., STOCLET, J. C. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (1998); Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta; *The Journal of Nutrition*; 128: 2324-2333
- ANDRIANTSITOHAINA, R., AUGER, C., CHATAIGNEAU, T., ETIENNE-SELLOUM, N., LI, H., MARTINEZ, M. C., SCHINI-KERTH, V. B. and LAHER, I. (2012); Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols; *British Journal of Nutrition*; 108: 1532-1549
- ANSELM, E., CHATAIGNEAU, M., NDIAYE, M., CHATAIGNEAU, T. and SCHINI-KERTH, V. B. (2007); Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src-and Akt-dependent activation of eNOS; *Cardiovascular Research*; 73: 404-413
- ANSELM, E., SOCORRO, V. F. M., DAL-ROS, S., SCHOTT, C., BRONNER, C. and SCHINI-KERTH, V. B. (2009); Crataegus special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src-and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 53: 253-260
- ANTER, E., CHEN, K., SHAPIRA, O. M., KARAS, R. H. and KEANEY, J. F. (2005); p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor α -dependent pathway in response to black tea polyphenols; *Circulation Research*; 96: 1072-1078
- ARTS, I. C. and HOLLMAN, P. C. (2005); Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 81: 317S-325S
- ARTS, I. C., HOLLMAN, P. C., FESKENS, E. J., DE MESQUITA, H. B. B. and KROMHOUT, D. (2001); Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 74: 227-232
- ASCHER-LANDSBERG, J., SAUNDERS, T., ELOVITZ, M. and PHILLIPPE, M. (1999); The effects of 2-aminoethoxydiphenyl borate, a novel inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor modulator on myometrial contractions; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 264: 979-982
- ASSMANN, G., SCHULTE, H., VON ECKARDSTEIN, A. and HUANG, Y. (1996); High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport; *Atherosclerosis*; 124: S11-S20
- AUGER, C., GÉRAIN, P., LAURENT-BICHON, F., PORTET, K., BORNET, A., CAPORICCIO, B., CROS, G., TEISSÉDRE, P.-L. and ROUANET, J.-M. (2004); Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52: 5297-5302
- AUGER, C., KIM, J.-H., CHABERT, P., CHAABI, M., ANSELM, E., LANCLAU, X., LOBSTEIN, A. and SCHINI-KERTH, V. B. (2010); The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 393: 162-167
- BAI, D., DEL CORSSO, C., SRINIVAS, M. and SPRAY, D. C. (2006); Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB); *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 319: 1452-1458
- BAI, X., WANG, X. and XU, Q. (2010); Endothelial damage and stem cell repair in atherosclerosis; *Vascular Pharmacology*; 52: 224-229
- BAKOWSKI, D. and PAREKH, A. B. (2007); Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid; *Current Biology*; 17: 1076-1081
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A. and FREEMAN, B. A. (1990); Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 87: 1620-1624
- BELEMNABAAB, L., OUEÐRAOGO, S., AUGER, C., CHATAIGNEAU, T., TRAOREA, A., GUISSOUA, I., LUGNIER, C., SCHINI-KERTH, V. B. and BUCHER, B. (2013); Endothelium-independent and endothelium-dependent vasorelaxation by a dichloromethane fraction from *Anogeissus leiocarpus* (dc) guill. Et Perr.(combretaceae): possible involvement of

- cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition; *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*; 10: 173-179
- BELL, D. R. and GOCHENAUR, K. (2006); Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts; *Journal of Applied Physiology*; 100: 1164-1170
- BENITO, S., LOPEZ, D., SAIZ, M., BUXADERAS, S., SANCHEZ, J., PUIG-PARELLADA, P. and MITJAVILA, M. (2002); A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta; *British Journal of Pharmacology*; 135: 910-916
- BENOWITZ, N. L. (1997); The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease; *Preventive Medicine*; 26: 412-417
- BERETZ, A., BRIANÇON-SCHIED, F., STIERLÉ, A., CORRE, G., ANTON, R. and CAZENAIVE, J.-P. (1986); Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate; *Biochemical Pharmacology*; 35: 257-262
- BLOIS, M. S. (1958); Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical; *Nature*; 181: 1199-1200
- BOOTMAN, M. D., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., RODERICK, H. L., BERRIDGE, M. J. and PEPIATT, C. M. (2002); 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca^{2+} release; *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*; 16: 1145-1150
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990); Radical chemistry of flavonoid antioxidants; *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*; 165-170
- BORS, W. and MICHEL, C. (2002); Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols; *Annals of the New York Academy of Sciences*; 957: 57-69
- BRANDES, R. P., FLEMING, I. and BUSSE, R. (2005); Endothelial aging; *Cardiovascular Research*; 66: 286-294
- BRAYDEN, J. E. and NELSON, M. T. (2006); Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone; *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*; 291: H2090-H2097
- BREDT, D. and SNYDER, S. (1994); Nitric oxide: a physiologic messenger molecule; *Annual Review of Biochemistry*; 63: 175-195
- BRIXIUS, K., WILLMS, S., NAPP, A., TOSSIOS, P., LADAGE, D., BLOCH, W., MEHLHORN, U. and SCHWINGER, R. H. (2006); Crataegus special extract WS® 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177; *Cardiovascular Drugs and Therapy*; 20: 177-184
- BRUGGISSER, R., VON DAENIKEN, K., JUNDT, G., SCHAFFNER, W. and TULLBERG-REINERT, H. (2002); Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay; *Planta Medica*; 68: 445-448
- BUSSE, R., EDWARDS, G., FÉLÉTOU, M., FLEMING, I., VANHOUTTE, P. M. and WESTON, A. H. (2002); EDHF: bringing the concepts together; *Trends in Pharmacological Sciences*; 23: 374-380
- BUSSE, R. and FLEMING, I. (1995); Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation; *Annals of Medicine*; 27: 331-340
- BUSSE, R., FLEMING, I. and HECKER, M. (1993); Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation; *European Heart Journal*; 14 Suppl I: 2-9
- BUSSE, R., TROGISCH, G. and BASSENGE, E. (1985); The role of endothelium in the control of vascular tone; *Basic Research in Cardiology*; 80: 475-490
- BYUN, E.-B., KOREMATSU, S., ISHIKAWA, T., NISHIZUKA, T., OHSHIMA, S., KANDA, T. and MATSUI, T. (2012); Apple procyanidins induce hyperpolarization of rat aorta endothelial cells via activation of K^+ channels; *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 23: 278-286
- CAI, H. and HARRISON, D. G. (2000); Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress; *Circulation Research*; 87: 840-844
- CALDERONE, V. (2002); Large-conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channels: function, pharmacology and drugs; *Current Medicinal Chemistry*; 9: 1385-1395
- CAO, G., SOFIC, E. and PRIOR, R. L. (1997); Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships; *Free Radical Biology and Medicine*; 22: 749-760
- CHALOPIN, M., TESSE, A., MARTÍNEZ, M. C., ROGNAN, D., ARNAL, J.-F. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (2010); Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium; *PLoS One*; 5: e8554
- CHANCE, B., SIES, H. and BOVERIS, A. (1979); Hydroperoxide metabolism in mammalian organs; *Physiological Reviews*; 59: 527-605
- CHEN, G., SUZUKI, H. and WESTON, A. H. (1988); Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels; *British Journal of Pharmacology*; 95: 1165-1174
- CLAPHAM, D. E. (2007); Calcium signaling; *Cell*; 131: 1047-1058
- COOK, N. and SAMMAN, S. (1996); Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources; *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 7: 66-76
- COTELLE, N., BERNIER, J.-L., CATTEAU, J.-P., POMMERY, J., WALLET, J.-C. and GAYDOU, E. M. (1996); Antioxidant properties of hydroxy-flavones; *Free Radical Biology and Medicine*; 20: 35-43
- DAL-ROS, S., BRONNER, C., SCHOTT, C., KANE, M. O., CHATAIGNEAU, M., SCHINI-KERTH, V. B. and CHATAIGNEAU, T. (2009); Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 328: 478-486
- DALBÓ, S., MOREIRA, E. G., BRANDAO, F. C., HORST, H., PIZZOLATTI, M. G., MICKE, G. A. and RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. (2008); Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries; *Journal of Pharmacological Sciences*; 106: 234-241

- DE MOURA, R. S., MIRANDA, D. Z., PINTO, A. C. A., SICCA, R. F., SOUZA, M. A., RUBENICH, L. M., CARVALHO, L. C. M., RANGEL, B. M., TANO, T. and MADEIRA, S. V. (2004); Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 44: 302-309
- DEW, T. P., DAY, A. J. and MORGAN, M. R. (2005); Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53: 6510-6515
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. and ZEIHNER, A. M. (1999); Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation; *Nature*; 399: 601-605
- DOBRYDNEVA, Y. and BLACKMORE, P. (2001); 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets; *Molecular Pharmacology*; 60: 541-552
- DUARTE, J., ANDRIAMBELOSON, E., DIEBOLT, M. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (2004); Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilation; *Physiological Research*; 53: 595-602
- EDIRISINGHE, I., BURTON-FREEMAN, B. and KAPPAGODA, T. (2008); Mechanism of the endothelium-dependent relaxation evoked by a grape seed extract; *Clinical Science*; 114: 331-337
- EDIRISINGHE, I., BURTON-FREEMAN, B., VARELIS, P. and KAPPAGODA, T. (2008); Strawberry extract caused endothelium-dependent relaxation through the activation of PI3 kinase/Akt; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56: 9383-9390
- EDWARDS, G., THOLLON, C., GARDENER, M., FELETOU, M., VILAINE, J. P., VANHOUTTE, P. and WESTON, A. (2000); Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery; *British Journal of Pharmacology*; 129: 1145-1154
- EDWARDS, G. and WESTON, A. (2001); EDHF—are there gaps in the pathway?; *The Journal of Physiology*; 531: 299-299
- ELIO, G., ENRICO, V., IVANO, B., BARBARA, P., PAOLO, D. P., RICCARDO, R. and LIVIO, D. C. (2013); LOX-1 and its Implications on Cardiovascular Diseases a Possible New Perspective Target on Atherosclerosis; *Journal of Clinical & Experimental Cardiology*; 4: 2
- ELLIOTT, A. J., SCHEIBER, S. A., THOMAS, C. and PARDINI, R. S. (1992); Inhibition of glutathione reductase by flavonoids: a structure-activity study; *Biochemical Pharmacology*; 44: 1603-1608
- EPSTEIN, F. H. and ROSS, R. (1999); Atherosclerosis—an inflammatory disease; *New England Journal of Medicine*; 340: 115-126
- FÉLÉTOU, M. (2011); The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators; *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*; 3: 1-306
- FÉLÉTOU, M. and VANHOUTTE, P. (2009); EDHF: an update; *Clinical Science*; 117: 139-155
- FÉLÉTOU, M. and VANHOUTTE, P. M. (1988); Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle; *British Journal of Pharmacology*; 93: 515-524
- FÉLÉTOU, M. and VANHOUTTE, P. M. (2006); Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture); *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*; 291: H985-1002
- FÉLÉTOU, M. and VANHOUTTE, P. M. (2006); Endothelium-derived hyperpolarizing factor where are we now?; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 26: 1215-1225
- FITZPATRICK, D. F., BING, B. and ROHDEWALD, P. (1998); Endothelium-dependent vascular effects of Pycnogenol; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 32: 509-515
- FITZPATRICK, D. F., FLEMING, R. C., BING, B., MAGGI, D. A. and O'MALLEY, R. M. (2000); Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48: 6384-6390
- FITZPATRICK, D. F., HIRSCHFIELD, S. L. and COFFEY, R. G. (1993); Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products; *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*; 265: H774-H778
- FLAVAHAN, N. A., SHIMOKAWA, H. and VANHOUTTE, P. (1989); Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries; *The Journal of Physiology*; 408: 549-560
- FLEMING, I. and BUSSE, R. (1999); Signal transduction of eNOS activation; *Cardiovascular Research*; 43: 532-541
- FLEMING, I. and BUSSE, R. (2003); Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase; *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 284: R1-R12
- FÖRSTERMANN, U., BOISSEL, J.-P. and KLEINERT, H. (1998); Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III); *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*; 12: 773-790
- FRAGA, C. G. (2007); Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions; *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*; 59: 308-315
- FRANKEL, E., GERMAN, J., KINSELLA, J., PARKS, E. and KANNER, J. (1993); Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine; *The Lancet*; 341: 454-457
- FREEDMAN, J. E., PARKER, C., LI, L., PERLMAN, J. A., FREI, B., IVANOV, V., DEAK, L. R., IAFRATI, M. D. and FOLTS, J. D. (2001); Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release; *Circulation*; 103: 2792-2798
- FULTON, D., GRATTON, J.-P., MCCABE, T. J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. and SESSA, W. C. (1999); Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt; *Nature*; 399: 597-601
- FULTON, D., GRATTON, J. P., MCCABE, T. J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. and SESSA, W. C. (1999); Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt; *Nature*; 399: 597-601

- FURCHGOTT, R. F., CHERRY, P. D., ZAWADZKI, J. V. and JOTHIANANDAN, D. (1984); Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 6 Suppl 2: S336-S343
- FURCHGOTT, R. F. and ZAWADZKI, J. V. (1980); The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; *Nature*; 288: 373-376
- GAO, F., GAO, E., YUE, T.-L., OHLSTEIN, E. H., LOPEZ, B. L., CHRISTOPHER, T. A. and MA, X.-L. (2002); Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation; *Circulation*; 105: 1497-1502
- GARG, U. C. and HASSID, A. (1989); Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators; *American Journal of Physiology-Cell Physiology*; 257: F60-F66
- GARLAND, C. J., HILEY, C. R. and DORA, K. A. (2011); EDHF: spreading the influence of the endothelium; *British Journal of Pharmacology*; 164: 839-852
- GEHM, B. D., MCANDREWS, J. M., CHIEN, P.-Y. and JAMESON, J. L. (1997); Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 94: 14138-14143
- GEKLE, M., WISCHMEYER, E., GRÜNDER, S., PETERSEN, M. and SCHWAB, A. (2010); *Taschenlehrbuch Physiologie*
- GELEHRTER, T. D. and SZNYCER-LASZUK, R. (1986); Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in cultured human endothelial cells; *Journal of Clinical Investigation*; 77: 165
- GELEIJNSE, J. M., LAUNER, L. J., VAN DER KUIP, D. A., HOFMAN, A. and WITTEMAN, J. C. (2002); Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 75: 880-886
- GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. (1987); Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis; *Circulation*; 76: 504-507
- GRIENDLING, K. K. and FITZGERALD, G. A. (2003); Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS; *Circulation*; 108: 1912-1916
- GRIFFITH, T. M. (2004); Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?; *British Journal of Pharmacology*; 141: 881-903
- GROVER, G. J. and GARLID, K. D. (2000); ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 32: 677-95
- GUERRA JR, R., BROTHERTON, A., GOODWIN, P., CLARK, C., ARMSTRONG, M. and HARRISON, D. (1989); Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of EDRF; *Journal of Vascular Research*; 26: 300-314
- HAENEN, G. R., PAQUAY, J. B., KORTHOUWER, R. E. and BAST, A. (1997); Peroxynitrite scavenging by flavonoids; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 236: 591-593
- HANSSON, G. K. (2005); Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease; *New England Journal of Medicine*; 352: 1685-1695
- HARBORNE, J. B. and WILLIAMS, C. A. (2000); Advances in flavonoid research since 1992; *Phytochemistry*; 55: 481-504
- HARLAN, J. M. (1987); Consequences of leukocyte-vessel wall interactions in inflammatory and immune reactions; *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*; 13: 434-444
- HARTELL, N. A., ARCHER, H. E. and BAILEY, C. J. (2005); Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B; *Biochemical Pharmacology*; 69: 781-790
- HAYASHI, T., SAWA, K., KAWASAKI, M., ARISAWA, M., SHIMIZU, M. and MORITA, N. (1988); Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids; *Journal of Natural Products*; 51: 345-348
- HAYNES, M. P., LI, L., SINHA, D., RUSSELL, K. S., HISAMOTO, K., BARON, R., COLLINGE, M., SESSA, W. C. and BENDER, J. R. (2003); Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen; *The Journal of Biological Chemistry*; 278: 2118-2123
- HE, F., NOWSON, C., LUCAS, M. and MACGREGOR, G. (2007); Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies; *Journal of Human Hypertension*; 21: 717-728
- HEBESTREIT, P., WENG, A., BACHRAN, C., FUCHS, H. and MELZIG, M. (2006); Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album; *Toxicon*; 47: 330-335
- HEDNER, T. and EVERTS, B. (1998); The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain; *Clinical Rheumatology*; 17: 17-25
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. and BOBILYA, D. J. (2002); Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships; *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 572-584
- HEIN, T. W., LIAO, J. C. and KUO, L. (2000); oxLDL specifically impairs endothelium-dependent, NO-mediated dilation of coronary arterioles; *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*; 278: H175-H183
- HEINZEL, B., JOHN, M., KLATT, P., BOHME, E. and MAYER, B. (1992); Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase; *Biochemical Journal*; 281: 627-630
- Herrmann, K. (1991); *Obst, Gemüse und deren Dauerwaren und Erzeugnisse; Taschenbuch für Lebensmittelchemiker und-technologien*; 337-357
- HERTOG, M., SWEETNAM, P. M., FEHILY, A. M., ELWOOD, P. C. and KROMHOUT, D. (1997); Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 65: 1489-1494

- HERTOG, M. G., FESKENS, E. J., KROMHOUT, D., HERTOG, M., HOLLMAN, P., HERTOG, M. and KATAN, M. (1993); Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study; *The Lancet*; 342: 1007-1011
- HERTOG, M. G., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A. and NEDELJKOVIC, S. (1995); Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study; *Archives of Internal Medicine*; 155: 381-386
- HEWAWASAM, G. S. (2008); Studies on Interactions of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium Ion-ATPase (SERCA) with Antiapoptotic Protein Bcl-2
- HOGG, N., KALYANARAMAN, B., JOSEPH, J., STRUCK, A. and PARTHASARATHY, S. (1993); Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide Potential role in atherogenesis; *FEBS Letters*; 334: 170-174
- HOKANSON, J. E. and AUSTIN, M. A. (1996); Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a metaanalysis of population-based prospective studies; *Journal of Cardiovascular Risk*; 3: 213-219
- HOLVOET, P., HARRIS, T. B., TRACY, R. P., VERHAMME, P., NEWMAN, A. B., RUBIN, S. M., SIMONSICK, E. M., COLBERT, L. H. and KRITCHEVSKY, S. B. (2003); Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly findings from the Health, Aging, and Body Composition study; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 23: 1444-1448
- HOLVOET, P., KRITCHEVSKY, S. B., TRACY, R. P., MERTENS, A., RUBIN, S. M., BUTLER, J., GOODPASTER, B. and HARRIS, T. B. (2004); The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort; *Diabetes*; 53: 1068-1073
- HORN, F. (2009); *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*
- HORRIGAN, L. A., HOLOHAN, C. A., LAWLESS, G. A., MURTAGH, M. A., WILLIAMS, C. T. and WEBSTER, C. M. (2013); Blueberry juice causes potent relaxation of rat aortic rings via the activation of potassium channels and the H₂S pathway; *Food & Function*; 4: 392-400
- HOWARD, B. V., ROBBINS, D. C., SIEVERS, M. L., LEE, E. T., RHOADES, D., DEVEREUX, R. B., COWAN, L. D., GRAY, R. S., WELTY, T. K. and GO, O. T. (2000); LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL the Strong Heart Study; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 20: 830-835
- HULTHE, J. and FAGERBERG, B. (2002); Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study); *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 22: 1162-1167
- HUPPELSBERG, J. (2005); *Kurzlehrbuch Physiologie*; 2
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. and CHAUDHURI, G. (1987); Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 84: 9265-9269
- IGNARRO, L. J., CIRINO, G., CASINI, A. and NAPOLI, C. (1999); Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 34: 879-886
- JACOBS, M., PLANE, F. and BRUCKDORFER, K. R. (1990); Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta; *British Journal of Pharmacology*; 100: 21-26
- JIANG, C., SARREL, P. M., LINDSAY, D. C., POOLE-WILSON, P. A. and COLLINS, P. (1991); Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol in vitro; *British Journal of Pharmacology*; 104: 1033-1037
- JOCHMANN, N., LORENZ, M., KROSIGK, A. V., MARTUS, P., BÖHM, V., BAUMANN, G., STANGL, K. and STANGL, V. (2008); The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea; *British Journal of Nutrition*; 99: 863-868
- KAISER, L. and SPARKS, H. V., JR. (1987); Endothelial cells. Not just a cellophane wrapper; *Archives of Internal Medicine*; 147: 569-573
- KALIORA, A., DEDOUSSIS, G. and SCHMIDT, H. (2006); Dietary antioxidants in preventing atherogenesis; *Atherosclerosis*; 187: 1-17
- KAMMERER, B., KAHLICH, R., BIEGERT, C., GLEITER, C. H. and HEIDE, L. (2005); HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations; *Phytochemical Analysis*; 16: 470-478
- Kandaswami, C. and Middleton Jr, E. (1994); Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids; *Free Radical Biology and Medicine*; 351-376
- KANNEL, W. B. and MCGEE, D. (1979); Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study; *Diabetes Care*; 2: 120-126
- KAYSER, O. and KOLODZIEJ, H. (1995); Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*; *Phytochemistry*; 39: 1181-1185
- KIM, J.-A., FORMOSO, G., LI, Y., POTENZA, M. A., MARASCIULO, F. L., MONTAGNANI, M. and QUON, M. J. (2007); Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn; *The Journal of Biological Chemistry*; 282: 13736-13745
- KIM, S. H., KANG, K. W., KIM, K. W. and KIM, N. D. (2000); Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta; *Life Sciences*; 67: 121-131
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. and SILBERNAGL, S. (2009); *Physiologie*
- KLOTZ, L. O. (2002); Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen; *The Journal of Biological Chemistry*; 383: 443-456
- KO, E. A., HAN, J., JUNG, I. D. and PARK, W. S. (2008); Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells; *Journal of Smooth Muscle Research*; 44: 65-81

- KO, W.-C., SHIH, C.-M., LAI, Y.-H., CHEN, J.-H. and HUANG, H.-L. (2004); Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships; *Biochemical Pharmacology*; 68: 2087-2094
- KOŁODZIEJ, H. (1984); Occurrence of procyanidins in *Nelia meyeri*; *Phytochemistry*; 23: 1745-1752
- KOŁODZIEJ, H. (1989); Procyanidins from medicinal birch: bonding patterns and sequence of units in triflavanoids of mixed stereochemistry; *Phytochemistry*; 28: 3487-3492
- KOŁODZIEJ, H. (1990); Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark; *Phytochemistry*; 29: 955-960
- KOŁODZIEJ, H., FERREIRA, D. and ROUX, D. G. (1984); Synthesis of condensed tannins. Part 12. Direct access to [4, 6]- and [4, 8]-all-2, 3-cis-procyanidin derivatives from (–)-epicatechin: assessment of bonding positions in oligomeric analogues from *Crataegus oxyacantha* L; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*; 343-350
- KOOLMAN, J. and RÖHM, K.-H. (2009); *Taschenatlas Biochemie des Menschen*
- KOSTYUK, V., POTAPOVICH, A., STRIGINOVA, E., KOSTYUK, T. and AFANAS'EV, I. (2004); Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 428: 204-208
- KOTSOVOLIS, G. and KALLARAS, K. (2010); The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis; *Hippokratia*; 14: 88
- KRAM, D., THÄLE, C., KIDERLEN, A. and KOŁODZIEJ, H. (2006); Assessment of antileishmanial and cytotoxic activities of some phenolic acids using the MTT assay—a critical evaluation; *Planta Medica*; 72: P_215
- KUBES, P., SUZUKI, M. and GRANGER, D. (1991); Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 88: 4651-4655
- KUGIYAMA, K., KERNS, S. A., MORRISSETT, J. D., ROBERTS, R. and HENRY, P. D. (1990); Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins; *Nature*; 344: 160-162
- KWAN, C.-Y., CHEN, C.-X., DEYAMA, T. and NISHIBE, S. (2003); Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action; *Vascular Pharmacology*; 40: 229-235
- KWAN, C.-Y., ZHANG, W.-B., DEYAMA, T. and NISHIBE, S. (2004); Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides* Oliv. bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 369: 206-211
- LAMY, S., GINGRAS, D. and BÉLIVEAU, R. (2002); Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation; *Cancer Research*; 62: 381-385
- LANG, F. and SILBERNAGL, S. (2013); *Taschenatlas der Pathophysiologie*
- LEDoux, J., WERNER, M. E., BRAYDEN, J. E. and NELSON, M. T. (2006); Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone; *Physiology*; 21: 69-78
- LEE, J.-O., CHANG, K., KIM, C. Y., JUNG, S. H., LEE, S.-W. and OAK, M.-H. (2010); *Lysimachia clethroides* extract promote vascular relaxation via endothelium-dependent mechanism; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 55: 481-488
- LEIKERT, J. F., RÄTHEL, T. R., WOHLFART, P., CHEYNIER, V., VOLLMAR, A. M. and DIRSCH, V. M. (2002); Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells; *Circulation*; 106: 1614-1617
- LEMMER, B. and BRUNE, K. (2010); *Pharmakotherapie*
- LEUCHTGENS, H. (1993); *Crataegus* Special Extract WS 1442 in NYHA II heart failure. A placebo controlled randomized double-blind study; *Fortschritte der Medizin*; 111: 352-354
- LEWIS, R. S. (2007); The molecular choreography of a store-operated calcium channel; *Nature*; 446: 284-287
- LORENZ, M., URBAN, J., ENGELHARDT, U., BAUMANN, G., STANGL, K. and STANGL, V. (2009); Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved; *Basic Research in Cardiology*; 104: 100-110
- LOUNSBURY, K. M., HU, Q. and ZIEGELSTEIN, R. C. (2000); Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature; *Free Radical Biology and Medicine*; 28: 1362-1369
- LUCAS, I., LAUBE, U. and KOŁODZIEJ, H. (2011); In vitro antileishmanial activity of resveratrol appears associated with cell cytotoxicity rather than antiparasitic properties; *Planta Medica*; 77: PM19
- LUKSHA, L., AGEWALL, S. and KUBLICKIENE, K. (2009); Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease; *Atherosclerosis*; 202: 330-344
- LÜLLMANN-RAUCH, R. (2008); *Histologie*
- MABUCHI, H., KOIZUMI, J., SHIMIZU, M. and TAKEDA, R. (1989); Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia; *Circulation*; 79: 225-232
- MADAMANCHI, N. R., VENDROV, A. and RUNGE, M. S. (2005); Oxidative stress and vascular disease; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 25: 29-38
- MADEIRA, S. V. F., AUGER, C., ANSELM, E., CHATAIGNEAU, M., CHATAIGNEAU, T., SOARES DE MOURA, R. and SCHINI-KERTH, V. B. (2009); eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries; *Journal of Vascular Research*; 46: 406-416
- MADEIRA, S. V. F., DE CASTRO RESENDE, A., OGNIBENE, D. T., DE SOUSA, M. A. V. and SOARES DE MOURA, R. (2005); Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin; *Pharmacological Research*; 52: 321-327
- MAHER, M. A., MATA CZYNSKI, H., STEFANIAK, H. M. and WILSON, T. (2000); Cranberry juice induces nitric oxide-dependent vasodilation in vitro and its infusion transiently reduces blood pressure in anesthetized rats; *Journal of Medicinal Food*; 3: 141-147

- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C. and JIMÉNEZ, L. (2004); Polyphenols: food sources and bioavailability; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 79: 727-747
- MANN, G. E., ROWLANDS, D. J., LI, F. Y., DE WINTER, P. and SIOW, R. C. (2007); Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression; *Cardiovascular Research*; 75: 261-274
- MARTIN, S., ANDRIAMBELOSON, E., TAKEDA, K. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (2002); Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production; *British Journal of Pharmacology*; 135: 1579-1587
- MAZUR, A., BAYLE, D., ROCK, E. and RAYSSIGUIER, Y. (1999); Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro; *Atherosclerosis*; 145: 421-422
- MEYNE, K. (2003); *Handbuch Arterielle Verschlusskrankheit*
- MILLER, E. and ULLREY, D. (1987); The pig as a model for human nutrition; *Annual Review of Nutrition*; 7: 361-382
- MINK, P. J., SCRAFFORD, C. G., BARRAJ, L. M., HARNACK, L., HONG, C.-P., NETTLETON, J. A. and JACOBS, D. R. (2007); Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 85: 895-909
- MISRA, H. P. (1974); Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols; *The Journal of Biological Chemistry*; 249: 2151-2155
- MISRA, H. P. and FRIDOVICH, I. (1972); The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin; *The Journal of Biological Chemistry*; 247: 6960-6962
- MOMBOULL, J.-V. and VANHOUTTE, P. M. (1999); Endothelial dysfunction: from physiology to therapy; *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 31: 61-74
- MÖRL, H., HADERS, P. and VON FALLOIS, J. (1998); *Koronare Herzkrankheit: Diagnostik und Therapie in der Praxis*
- MOSHAGE, H., KOK, B., HUIZENGA, J. R. and JANSEN, P. (1995); Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation; *Clinical Chemistry*; 41: 892-896
- MOSMANN, T. (1983); Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays; *Journal of Immunological Methods*; 65: 55-63
- MULLEN, W., MCGINN, J., LEAN, M. E., MACLEAN, M. R., GARDNER, P., DUTHIE, G. G., YOKOTA, T. and CROZIER, A. (2002); Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50: 5191-5196
- MUNRO, J. and COTRAN, R. (1988); The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation; *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*; 58: 249-261
- MÜNZZEL, T., DAIBER, A., ULLRICH, V. and MÜLSCH, A. (2005); Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 25: 1551-1557
- NAKAMURA, Y., MATSUMOTO, H. and TODOKI, K. (2002); Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta; *Japanese Journal of Pharmacology*; 89: 29-35
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU, T., ANDRIANTSITOHAINA, R., STOCLET, J.-C. and SCHINI-KERTH, V. B. (2003); Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 310: 371-377
- NDIAYE, M., CHATAIGNEAU, T., CHATAIGNEAU, M. and SCHINI-KERTH, V. B. (2004); Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway; *British Journal of Pharmacology*; 142: 1131-1136
- NELSON, M., CHENG, H., RUBART, M., SANTANA, L., BONEV, A., KNOT, H. and LEDERER, W. (1995); Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks; *Science*; 270: 633-637
- NELSON, M. T. and QUAYLE, J. M. (1995); Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle; *American Journal of Physiology-Cell Physiology*; 268: C799-822
- NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D. E., BOELEN, P. G., VAN NORREN, K. and VAN LEEUWEN, P. A. (2001); Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 74: 418-425
- NIKOL, S., ARMEANU, S., ENGELMANN, M. G., PELISEK, J., FUCHS, A., ZHRINGER, C., BARTOLI, J. M., MESANA, T. and ROLLAND, P. H. (2001); Evaluation of endovascular techniques for creating a porcine femoral artery occlusion model; *Journal of Endovascular Therapy*; 8: 401-407
- NISHIZUKA, T., FUJITA, Y., YUKO, S., NAKANO, A., KAKINO, A., OHSHIMA, S., KANDA, T., YOSHIMOTO, R. and SAWAMURA, T. (2011); Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox; *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*; 87: 104
- NOVAKOVIC, A., BUKARICA, L. G., KANJUHI, V. and HEINLE, H. (2006); Potassium Channels-Mediated Vasorelaxation of Rat Aorta Induced by Resveratrol; *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*; 99: 360-364
- NOVAKOVIC, A., GOJKOVIC-BUKARICA, L., PERIC, M., NEZIC, D., DJUKANOVIC, B., MARKOVIC-LIPKOVSKI, J. and HEINLE, H. (2006); The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery; *Journal of Pharmacological Sciences*; 101: 85-90
- NUENGCHAMNONG, N., KRITASILP, K. and INGANINAN, K. (2009); Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay; *Food Chemistry*; 117: 750-756

- OU, H.-C., LEE, W.-J., LEE, I.-T., CHIU, T.-H., TSAI, K.-L., LIN, C.-Y. and SHEU, W. H.-H. (2009); Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells; *Journal of Applied Physiology*; 106: 1674-1685
- OU, H.-C., SONG, T.-Y., YEH, Y.-C., HUANG, C.-Y., YANG, S.-F., CHIU, T.-H., TSAI, K.-L., CHEN, K.-L., WU, Y.-J. and TSAI, C.-S. (2010); EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signaling; *Journal of Applied Physiology*; 108: 1745-1756
- PADILLA, E., RUIZ, E., REDONDO, S., GORDILLO-MOSCOSO, A., SLOWING, K. and TEJERINA, T. (2005); Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines; *European Journal of Pharmacology*; 517: 84-91
- PALMER, R. M., ASHTON, D. S. and MONCADA, S. (1988); Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine; *Nature*; 333: 664-666
- PALMER, R. M., FERRIGE, A. G. and MONCADA, S. (1987); Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor; *Nature*; 327: 524-526
- PAN, Z., FENG, T., SHAN, L., CAI, B., CHU, W., NIU, H., LU, Y. and YANG, B. (2008); Scutellarin-induced endothelium-independent relaxation in rat aorta; *Phytotherapy Research*; 22: 1428-1433
- PAREKH, A. B. and PUTNEY, J. W., JR. (2005); Store-operated calcium channels; *Physiological Reviews*; 85: 757-810
- PEIRO, C., REDONDO, J., RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. A., ANGULO, J., MARIN, J. and SANCHEZ-FERRER, C. F. (1995); Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation; *Hypertension*; 25: 748-751
- PENG, L., WANG, B. and REN, P. (2005); Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 45: 108-111
- PIAZZA, M., FUTREGA, K., SPRATT, D. E., DIECKMANN, T. and GUILLETTE, J. G. (2012); Structure and dynamics of calmodulin (CaM) bound to nitric oxide synthase peptides: effects of a phosphomimetic CaM mutation; *Biochemistry*; 51: 3651-3661
- POU, S., POU, W., BREDT, D., SNYDER, S. and ROSEN, G. (1992); Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase; *The Journal of Biological Chemistry*; 267: 24173-24176
- PRAKRIYA, M. and LEWIS, R. S. (2001); Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors; *The Journal of Physiology*; 536: 3-19
- RADA, B. K., GEISZT, M., KÁLDI, K., TIMÁR, C. and LIGETI, E. (2004); Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing; *Blood*; 104: 2947-2953
- RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. and MONCADA, S. (1987); Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium; *The Lancet*; 2: 1057-1058
- RATTMANN, Y. D., ANSELM, E., KIM, J. H., DAL-ROS, S., AUGER, C., MIGUEL, O. G., SANTOS, A. R., CHATAIGNEAU, T. and SCHINI-KERTH, V. B. (2012); Natural product extract of *Dicksonia sellowiana* induces endothelium-dependent relaxations by a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS in porcine coronary arteries; *Journal of Vascular Research*; 49: 284-298
- REES, D. D., PALMER, R. M. and MONCADA, S. (1989); Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 86: 3375-3378
- RENAUD, S. D. and DE LORGERIL, M. (1992); Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease; *The Lancet*; 339: 1523-1526
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. and PAGANGA, G. (1996); Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids; *Free Radical Biology and Medicine*; 20: 933-956
- RICHARD, J. (1987); [Coronary risk factors. The French paradox]; *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*; 80: 17-21
- RIMM, E. B., KATAN, M. B., ASCHERIO, A., STAMPFER, M. J. and WILLETT, W. C. (1996); Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals; *Annals of Internal Medicine*; 125: 384-389
- ROCHA, A., CARVALHO, L., SOUSA, M., MADEIRA, S. F., SOUSA, P., TANO, T., SCHINI-KERTH, V., RESENDE, A. and SOARES DE MOURA, R. (2007); Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat; *Vascular Pharmacology*; 46: 97-104
- ROGERS, P. A., CHILIAN, W. M., BRATZ, I. N., BRYAN, R. M. and DICK, G. M. (2007); H₂O₂ activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive Kv channels in coronary vascular smooth muscle; *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*; 292: H1404-H1411
- ROSS, J. A. and KASUM, C. M. (2002); Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety; *Annual review of Nutrition*; 22: 19-34
- ROSSI, A. E. and DIRKSEN, R. T. (2006); Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle; *Muscle Nerve*; 33: 715-731
- RUCKSTUHL, M. and LANDRY, Y. (1981); Inhibition of lung cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases by flavonoids and other chromone-like compounds; *Biochemical Pharmacology*; 30: 697-702
- RUSH, J. W., QUADRILATERO, J., LEVY, A. S. and FORD, R. J. (2007); Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats; *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.); 232: 814-822
- SADIK, C. D., SIES, H. and SCHEWE, T. (2003); Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action; *Biochemical Pharmacology*; 65: 773-781
- SANDOW, S. L., TARE, M., COLEMAN, H. A., HILL, C. E. and PARKINGTON, H. C. (2002); Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor; *Circulation Research*; 90: 1108-1113
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. and SABATINI, D. M. (2005); Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex; *Science*; 307: 1098-1101

- SARR, M., NGOM, S., KANE, M. O., WELE, A., DIOP, D., SARR, B., GUEYE, L., ANDRIANTSITOHAINA, R. and DIALLO, A. S. (2009); In vitro vasorelaxation mechanisms of bioactive compounds extracted from Hibiscus sabdariffa on rat thoracic aorta; *Nutrition & Metabolism*; 6: 45
- SATO, M., RAMARATHNAM, N., SUZUKI, Y., OHKUBO, T., TAKEUCHI, M. and OCHI, H. (1996); Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 44: 37-41
- SCALBERT, A., JOHNSON, I. T. and SALTMARSH, M. (2005); Polyphenols: antioxidants and beyond; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 81: 215S-217S
- SCHEWE, T., STEFFEN, Y. and SIES, H. (2008); How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 476: 102-106
- SCHINI-KERTH, V. B., AUGER, C., ETIENNE-SELLOUM, N. and CHATAIGNEAU, T. (2010); Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF; *Advances in Pharmacology*; 60: 133-175
- SCHINI-KERTH, V. B., AUGER, C., KIM, J.-H., ÉTIENNE-SELLOUM, N. and CHATAIGNEAU, T. (2010); Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF; *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*; 459: 853-862
- SCHINI-KERTH, V. B., ÉTIENNE-SELLOUM, N., CHATAIGNEAU, T. and AUGER, C. (2011); Vascular protection by natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence; *Planta Medica*; 77: 1161-1167
- SCHMID, B., KÖTTER, I. and HEIDE, L. (2001); Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract; *European Journal of Clinical Pharmacology*; 57: 387-391
- SCHOETZ, K., ERDELMEIER, C., GERMER, S. and HAUER, H. (2008); A detailed view on the constituents of EPs 7630; *Planta Medica*; 74: 667-674
- SCHWINGER, R. H., PIETSCH, M., FRANK, K. and BRIXIUS, K. (2000); Crataegus special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP-independently; *Journal of Cardiovascular Pharmacology*; 35: 700-707
- SELLOUM, L. D., REICHL, S., MÜLLER, M., SEBIHI, L. L. and ARNHOLD, J. (2001); Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 395: 49-56
- SESSO, H. D., GAZIANO, J. M., LIU, S. and BURING, J. E. (2003); Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women; *The American Journal of Clinical Nutrition*; 77: 1400-1408
- SHAO, Z. H., WOJCIK, K. R., DOSSUMBEKOVA, A., HSU, C., MEHENDALE, S. R., LI, C. Q., QIN, Y., SHARP, W. W., CHANG, W. T. and HAMANN, K. J. (2009); Grape seed proanthocyanidins protect cardiomyocytes from ischemia and reperfusion injury via Akt-NOS signaling; *Journal of Cellular Biochemistry*; 107: 697-705
- SHARRETT, A. R., BALLANTYNE, C., COADY, S., HEISS, G., SORLIE, P., CATELLIER, D. and PATSCH, W. (2001); Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoproteins AI and B, and HDL density subfractions the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study; *Circulation*; 104: 1108-1113
- SIEMS, W. (2005); *Oxidativer Stress und Pharmaka*; 15
- SIES, H. (1997); Oxidative stress: oxidants and antioxidants; *Experimental Physiology*; 82: 291-295
- SIES, H. and CADENAS, E. (1985); Oxidative stress: damage to intact cells and organs; *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 311: 617-631
- SIES, H., STAHL, W. and SEVANIAN, A. (2005); Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress; *The Journal of Nutrition*; 135: 969-972
- SIMON, B. C., CUNNINGHAM, L. D. and COHEN, R. A. (1990); Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery; *Journal of Clinical Investigation*; 86: 75
- SINGER, H. A. and PEACH, M. J. (1982); Calcium-and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta; *Hypertension*; 4: 19-25
- SOBEY, C. G. (2001); Potassium channel function in vascular disease; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 21: 28-38
- SÖHL, G. and WILLECKE, K. (2004); Gap junctions and the connexin protein family; *Cardiovascular Research*; 62: 228-232
- SOWERS, J. R., EPSTEIN, M. and FROHLICH, E. D. (2001); Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease an update; *Hypertension*; 37: 1053-1059
- STEFFEN, Y., GRUBER, C., SCHEWE, T. and SIES, H. (2008); Mono- O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase; *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 469: 209-219
- STEFFEN, Y., SCHEWE, T. and SIES, H. (2005); Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 331: 1277-1283
- STEFFEN, Y., SCHEWE, T. and SIES, H. (2007); (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 359: 828-833
- STOCLET, J.-C., CHATAIGNEAU, T., NDIAYE, M., OAK, M.-H., EL BEDOUI, J., CHATAIGNEAU, M. and SCHINI-KERTH, V. B. (2004); Vascular protection by dietary polyphenols; *European Journal of Pharmacology*; 500: 299-313
- STOCLET, J., KLESCHYOV, A., ANDRIAMBELOSON, E., DIEBOLT, M. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (1999); Endothelial no release caused by red wine polyphenols; *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*; 50: 535-540
- STOCLET, J. C. and SCHINI-KERTH, V. (2011); Dietary flavonoids and human health; *Annales Pharmaceutiques Francaise*; 69: 78-90

- SUGAWARA, H., KUROSAKI, M., TAKATA, M. and KUROSAKI, T. (1997); Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor; *The EMBO Journal*; 16: 3078-3088
- SUN, J., ZHANG, X., BRODERICK, M. and FEIN, H. (2003); Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay; *Sensors*; 3: 276-284
- TAUBERT, D., BERKELS, R., GROSSER, N., SCHRÖDER, H., GRÜNDEMANN, D. and SCHÖMIG, E. (2004); Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action; *British Journal of Pharmacology*; 143: 159-165
- TIJBURG, L., MATTERN, T., FOLTS, J., WEISGERBER, U. and KATAN, M. (1997); Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review; *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*; 37: 771-785
- TOKOUDAGBA, J.-M., AUGER, C., BRÉANT, L., N'GOM, S., CHABERT, P., IDRIS-KHODJA, N., GBAGUIDI, F., GBENOU, J., MOUDACHIROU, M. and LOBSTEIN, A. (2010); Procyanidin-rich fractions from *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery; *Journal of Ethnopharmacology*; 132: 246-250
- TOUYZ, R. M. (2004); Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 37: 1263-1273
- TOUYZ, R. M. (2004); Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension what is the clinical significance?; *Hypertension*; 44: 248-252
- TURRENS, J. F. (1997); Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain; *Bioscience Reports*; 17: 3-8
- VAN ACKER, S. A., VAN DEN BERG, D.-J., TROMP, M. N., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W. P., VAN DER VIJGH, W. J. and BAST, A. (1996); Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids; *Free Radical Biology and Medicine*; 20: 331-342
- VÁSQUEZ-VIVAR, J., KALYANARAMAN, B., MARTÁSEK, P., HOGG, N., MASTERS, B. S. S., KAROU, H., TORDO, P. and PRITCHARD, K. A. (1998); Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 95: 9220-9225
- VEVERIS, M., KOCH, E. and CHATTERJEE, S. S. (2004); Crataegus special extract WS® 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion; *Life Sciences*; 74: 1945-1955
- VON BIRGELEN, C., HARTMANN, M., MINTZ, G. S., VAN HOUWELINGEN, K. G., DEPPEMANN, N., SCHMERMUND, A., BÖSE, D., EGGBRECHT, H., NEUMANN, T. and GÖSSL, M. (2004); Relationship between cardiovascular risk as predicted by established risk scores versus plaque progression as measured by serial intravascular ultrasound in left main coronary arteries; *Circulation*; 110: 1579-1585
- WANG, B., PENG, L., ZHU, L. and REN, P. (2007); Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 60: 36-40
- WEN, W., LU, J., ZHANG, K. and CHEN, S. (2008); Grape seed extract inhibits angiogenesis via suppression of the vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway; *Cancer Prevention Research*; 1: 554-561
- WHITE, R. E., KRYMAN, J. P., EL-MOWAFY, A. M., HAN, G. and CARRIER, G. O. (2000); cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BKCa channel activity in coronary artery smooth muscle cells; *Circulation Research*; 86: 897-905
- WILCOX, J. N., SUBRAMANIAN, R. R., SUNDELL, C. L., TRACEY, W. R., POLLOCK, J. S., HARRISON, D. G. and MARSDEN, P. A. (1997); Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 17: 2479-2488
- WISEMAN, H. and HALLIWELL, B. (1996); Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer; *Biochemical Journal*; 313: 17-29
- WU, K.-D., BUNGARD, D. and LYTTON, J. (2001); Regulation of SERCA Ca²⁺ pump expression by cytoplasmic [Ca²⁺] in vascular smooth muscle cells; *American Journal of Physiology-Cell Physiology*; 280: C843-C851
- WULF, H., MILLER, M. J., HÄNSEL, W., GRISSMER, S., CAHALAN, M. D. and CHANDY, K. G. (2000); Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 97: 8151-8156
- YOKOZAWA, T., NAKAGAWA, T. and KITANI, K. (2002); Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50: 3549-3552
- YOUNDIM, K. A., MCDONALD, J., KALT, W. and JOSEPH, J. A. (2002); Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults; *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 13: 282-288
- ZENEBE, W., PECHANOVA, O. and ANDRIANTSITOHAINA, R. (2003); Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity; *Physiological Research*; 52: 425-432
- ZERN, T. L. and FERNANDEZ, M. L. (2005); Cardioprotective effects of dietary polyphenols; *The Journal of Nutrition*; 135: 2291-2294
- ZHU, X.-M., FANG, L.-H., LI, Y.-J. and DU, G.-H. (2007); Endothelium-dependent and-independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings; *Vascular Pharmacology*; 46: 160-165

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Vereinfachtes Schema der O ₂ -Generierung	7
Abb. 2-1: Schweineherz und isolierte Koronararterien	31
Abb. 2-2: Mikroskopische Aufnahme der beiden genutzten Koronararterien	32
Abb. 2-3: Schema der kumulativen Testsubstanz-Zugabe.....	35
Abb. 2-4: Mikroskopische Aufnahme von HUVEC-Zellen.....	40
Abb. 2-5: Übersicht der Versuchsanordnung	54
Abb. 3-1: Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaften der Testsubstanzen.....	60
Abb. 3-2: Vehikel-Kontrolle.....	61
Abb. 3-3: Bedeutung des Endothels bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	62
Abb. 3-4: Bedeutung der eNOS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	63
Abb. 3-5: Bedeutung der sGC bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	64
Abb. 3-6: Bedeutung der K _{ATP} -Kanälen bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	65
Abb. 3-7: Bedeutung von Kalium-Kanälen bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	66
Abb. 3-8: Bedeutung der K _{Ca} -Kanäle allein sowie in Verbindung mit eNOS bei der Procyanidin- vermittelten Relaxation	67
Abb. 3-9: Bedeutung der spezifischen K _{Ca} -Kanäle allein sowie in Verbindung mit eNOS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	68
Abb. 3-10: Bedeutung der Gap-Junctions bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	69
Abb. 3-11: Bedeutung der PI3K/Akt bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	70
Abb. 3-12: Bedeutung der p38-MAP-Kinase bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	71
Abb. 3-13: Bedeutung der ERK1/2 bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	72
Abb. 3-14: Bedeutung der VEGF-Rezeptoren bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	73
Abb. 3-15: Bedeutung der Src-Kinase bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	73
Abb. 3-16: Bedeutung der Gi-Proteine bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	74
Abb. 3-17: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	75
Abb. 3-18: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	76
Abb. 3-19: Bedeutung von ROS bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	77
Abb. 3-20: Bedeutung der Estrogenrezeptoren bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	78
Abb. 3-21: Bedeutung der PDE-3 bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	79
Abb. 3-22: Bedeutung von mTOR bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	80
Abb. 3-23: Bedeutung der SOCCs und des IP ₃ -Rezeptors bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	81
Abb. 3-24: Bedeutung des SOCE-Signalwegs bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	82
Abb. 3-25: Bedeutung von SERCA und des Ryanodin-Rezeptors bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation	83
Abb. 3-26: Dilatierende Effekte der <i>Salix</i> -Procyanidine	84
Abb. 3-27: Bedeutung der eNOS und sGC bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	85
Abb. 3-28: Bedeutung des EDHF-Signalweges bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	86
Abb. 3-29: Bedeutung der Gap-Junctions bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	86
Abb. 3-30: Bedeutung des SOCE-Signalwegs und des IP ₃ -Rezeptors bei der Procyanidin- vermittelten Relaxation	87
Abb. 3-31: Bedeutung der SERCA bei der Procyanidin-vermittelten Relaxation.....	88
Abb. 3-32: Bedeutung der PI3K/Akt an der Procyanidin-vermittelten Relaxation	88
Abb. 3-33: Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaften der <i>Salix</i> -Procyanidine in Arterien unterschiedlicher Größen und entferntem Endothel.....	90
Abb. 3-34: Bedeutung der β_2 -Rezeptoren	90
Abb. 3-35: Bedeutung von ROS	92
Abb. 3-36: Bedeutung der Gap-Junctions.....	93

Abb. 3-37: Bedeutung der Kv-Kanäle.....	93
Abb. 3-38: Bedeutung des SOCE-Signalwegs und des IP ₃ -Rezeptors	94
Abb. 3-39: Mitochondriale Umwandlung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalszes in das offenkettige, wasserunlösliche Formazan.	95
Abb. 3-40: Zellviabilitätstestung mittels MTT-Assay	96
Abb. 3-41: Reduktionsstufen des Fluoreszenzfarbstoff DCFH-DA innerhalb der Zelle.....	97
Abb. 3-42: ROS-Generierung durch <i>Nelia</i> -Procyanidine	98
Abb. 3-43 p-Akt- und Akt-Proteinexpression hervorgerufen durch Procyanidine.....	101
Abb. 3-44: Densitometrische Darstellung der p-Akt Expression durch Procyanidine	102
Abb. 3-45 p-eNOS- und eNOS-Proteinexpression hervorgerufen durch Procyanidine	104
Abb. 3-46: Densitometrische Darstellung der p-eNOS Expression durch Procyanidine.....	105
Abb. 3-47: Relaxierende Effekte von Bradykinin unter Einwirkung von Lipoproteinen und <i>Nelia</i> - oder <i>Salix</i> -Procyanidinen	108
Abb. 3-48: Reduktion des DPPH-Radikals in Anwesenheit von Procyanidinen zu 2,2-Diphenyl-1- picrylhydrazin	110
Abb. 3-49: Abnahme der DPPH-Aktivität in Gegenwart der <i>Nelia</i> - oder <i>Salix</i> -Procyanidine sowie des <i>Pelargonium</i> -Extraktes	111
Abb. 3-50 Schematische Darstellung der Bildung eines Azofarbstoffes in Anwesenheit von Nitrit .	112
Abb. 3-51: Abnahme der Nitrit-Konzentration in Gegenwart der Reinsubstanzen.....	113
Abb. 3-52: Abnahme der Nitrit-Konzentration in Gegenwart der Polyphenole.....	114
Abb. 3-53: Schematische Darstellung der Oxidation des Hypoxanthins zur Harnsäure unter Bildung von O ₂ ⁻	115
Abb. 3-54: Reduktion des Tetrazoliums unter Einfluss von O ₂ ⁻ zum Formazan	116
Abb. 3-55: Abnahme der Superoxid-Anion-Konzentration in Gegenwart der Polyphenole	117
Abb. 4-1: Repräsentative Procyanidin-Strukturen	121
Abb. 4-2: Beteiligte Signalkaskade der 2,3- <i>cis</i> und 2,3- <i>trans</i> Procyanidine.....	143

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Originalarbeiten

KAUFELD A. M., PERTZ H. H., KOLODZIEJ H. (2013); 2,3-cis-Procyanidins Elicit Endothelium-Dependent Relaxation in Porcine Coronary Arteries via Activation of the PI3/Akt Kinase Signaling Pathway; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 61: 9609-9616

KAUFELD A. M., PERTZ H. H., KOLODZIEJ H. (2014); A Chemically Defined 2,3-trans Procyanidin Fraction from Willow Bark Causes Redox-Sensitive Endothelium-Dependent Relaxation in Porcine Coronary Arteries; Journal of Natural Products; 77: 1607-1614

9.2 Poster

KAUFELD A. M., PERTZ H. H., KOLODZIEJ H. (2011); Procyanidins of *Nelia meyeri* SCHWANT. elicits endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries by activation of the PI3/Akt signalling pathway; 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Antalya; Planta Medica; 77: PM18

KAUFELD A. M., PERTZ H. H., KOLODZIEJ H. (2012) Procyanidins of willow bark induce an endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries by activation of the PI3/Akt signaling pathway; DPHG Jahrestagung, Greifswald

9.3 Vorträge

KAUFELD A. M., PERTZ H. H., KOLODZIEJ H. (2012) Endothel-vermittelte Dilatation der Koronararterie des Schweins durch Procyanidine des Sukkulente *Nelia meyeri* SCHWANT. über die Aktivierung des PI3/Akt Signalweges; Tag der Pharmazie, Berlin

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 29.10.2014

Aurica-Maria Kaufeld