

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

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

Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Vasodilatation induziert durch Teepolyphenole

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stephanie Lehmann
Tierärztin aus Dresden

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4092

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

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

Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei der Vasodilatation induziert durch Teepolyphenole

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stephanie Lehmann
Tierärztin
aus Dresden

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4092

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Verena Stangl
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Mahtab Bahramsoltani

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
vasodilatation, polyphenole, tea, ingredients, HPLC, antioxidants,
epigallocatechin gallate, theaflavine

Tag der Promotion: 08.10.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-013-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Grüner und schwarzer Tee	3
2.1.1 Allgemeines	3
2.1.2 Teeinhaltsstoffe	4
2.1.3 Kardiovaskuläre Wirkungen der Teepolyphenole	6
2.2 Blutgefäßaufbau und Vasodilatation	8
2.2.1 Blutgefäßaufbau und Funktionen des Endothels	8
2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO [•]) und Vasodilatation	9
2.3 Antioxidative und prooxidative Mechanismen im Organismus	11
2.3.1 Freie Radikale - die zwei Gesichter	11
2.3.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS)	12
2.3.2.1 Hydroxidradikal (OH ⁻)	13
2.3.2.2 Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	13
2.3.2.3 Hydroxylradikal ([•] OH)	14
2.3.2.4 Stickstoffmonoxid (NO [•]) und Peroxynitrit (ONOO ⁻)	14
2.3.3 Anteil antioxidativer und prooxidativer Effekte bei der Wirkung von Teepolyphenolen	15
2.4 Potentielle Mechanismen der Vasodilatation durch Teepolyphenole	19
2.4.1 Der eNOS-NO-Signalweg	19
2.4.2 Die mögliche Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies	20
2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Materialien und Geräte	23
3.1.1 Materialien	23
3.1.2 Geräte	24
3.1.3 Lösungen	25
3.2 Das Aortenringmodell	26
3.2.1 Präparation der Aorta	26
3.2.2 Technische Ausstattung und Durchführung	27
3.2.3 Durchführung der Vasoreaktivitätsexperimente	29
3.3 Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UHPLC)	31
3.3.1 Prinzip	31
3.3.2 Durchführung	32
3.4 Amplex Red Wasserstoffperoxid Test	33
3.4.1 Prinzip	33
3.4.2 Durchführung	33
3.5 Software und statistische Auswertung	35

4	Ergebnisse	36
4.1	Vasoreaktivitätsexperimente mit und ohne Zugabe von Antioxidantien	36
4.1.1	Acetylcholin	36
4.1.2	EGCG aus grünem Tee	38
4.1.3	Grüner Tee	41
4.1.4	TF3 aus schwarzem Tee	44
4.1.5	Schwarzer Tee	46
4.2	Zeitkinetik der Substanzkonzentrationen im Krebs-Henseleit-Puffer	50
4.2.1	EGCG aus grünem Tee	51
4.2.2	TF3 aus schwarzem Tee	53
4.3	Bestimmung der H₂O₂-Konzentrationen im Krebs-Henseleit-Puffer	55
4.3.1	EGCG aus grünem Tee	55
4.3.2	Grüner Tee	57
4.3.3	TF3 aus schwarzem Tee	58
4.3.4	Schwarzer Tee	60
4.3.5	Zusammenfassung der H ₂ O ₂ -Konzentrationsmessungen	61
4.4	Zusammenfassung der Effekte der verwendeten Substanzen	63
5	Diskussion	64
5.1	Vasodilatation durch Teepolyphenole	64
5.2	Stabilität von Teepolyphenolen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	67
5.3	Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Vasodilatation durch Teepolyphenole	70
5.4	H ₂ O ₂ -Bildung durch Teepolyphenole	73
5.5	Möglicher Signalweg für Teepolyphenole	76
5.6	Abschlussbemerkung	76
6	Zusammenfassung	79
7	Summary	81
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Literaturverzeichnis	85
10	Publikationsverzeichnis	96
11	Danksagung	97
12	Selbständigkeitserklärung	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
AKT	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cu ²⁺	Kupferionen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin-3-gallat
EDHF	aus dem Endothel stammender Entspannungsfaktor (engl. <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fe ²⁺	Eisen-II-Ion
FMD	flussvermittelte Vasodilatation
FOXO1	Forkhead-Box-Protein 01
g	Gramm
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff in Wasser gelöst)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNO ₂	Hydrogennitrit
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ko	Kontrolle
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i>)
M	molar (mol/l)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mM	millimolar (1 mM = 0.001 mol/l = 1 mmol/l)
MnTMPyP	Mangan(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor Kappa B
nm	Nanometer
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO \cdot	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ $^{\cdot-}$	Hyperoxidanion (Superoxid, -anion)
OH $^{\cdot}$ / \cdot OH	Hydroxidion/ Hydroxylradikal
ONOO $^{\cdot-}$	Peroxynitrit
PEG	Polyethylenglykol
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PKA	Proteinkinase A
ppm	Teile von einer Million (engl. <i>parts per million</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNS	reaktive Stickstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

Ser	Serin
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SOD	Superoxiddismutase
TF1	Theaflavin
TF2A	Theaflavin-3-monogallat
TF2B	Theaflavin-3'-monogallat
TF3	Theaflavin-3,3'-digallat
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (engl. <i>units</i>)
UHPLC	Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
Vol.	Volumen
XA	Xanthin
XO	Xanthinoxidase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

1 Einleitung

Grünem und schwarzem Tee werden zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System zugeschrieben. Insbesondere wird der Schutz vor Arteriosklerose, Bluthochdruck und die positive Wirkung auf die Gefäßfunktion diskutiert. Darüber hinaus wurden auch antioxidative Effekte beschrieben. Diese positiven Effekte werden Polyphenolen zugeschrieben. Grüner und schwarzer Tee sind reich an Polyphenolen, wie dem Catechin Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) im grünen Tee und dem Theaflavin Theaflavin-3,3'-digallat (TF3) im schwarzen Tee.

Ein gängiges Modell zur Untersuchung vasodilatatorischer Eigenschaften von Tee und dessen Inhaltsstoffen ist das *ex vivo* Aortenringmodell. Es findet Anwendung in der vaskulären Pharmakologie und stellt die *in vivo* Situation im Blutgefäß nach. Dabei werden in einer Organbad-Anlage isolierte Gefäßringe von Ratten nach Zugabe verschiedener Stimuli auf ihre Relaxationsfähigkeit getestet. Dieses Modell wurde auch für die folgenden Fragestellungen verwendet.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in isolierten Aortenringen eine dosis- und endothelabhängige Vasodilatation bei grünem und schwarzem Tee, sowie EGCG und TF3 zeigen (Lorenz et al. 2009 und 2015; San Cheang et al. 2015). EGCG aktivierte in Endothelzellen über eine Signalkaskade die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und führte dadurch zu nachfolgender Stickstoffmonoxidproduktion und Vasodilatation. Die Aktivierung der eNOS erfolgt über verschiedene Proteinkinasen (Reiter et al. 2010).

In diesem Zusammenhang ist bislang ungeklärt, wie die beschriebene Signalkaskade vermittelt wird. Es ist unklar, ob rezeptorvermittelte Signalwege involviert sind (Kumazoe et al. 2013) oder ob Autooxidation der Polyphenole unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle spielt (Sang et al. 2007; Neilson et al. 2010). *In vitro* wurden auch prooxidative Effekte von Teepolyphenolen beobachtet. Teepolyphenole können selbst oxidiert werden und dadurch ROS wie das Hydroperoxydion ($O_2^{\cdot-}$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) generieren. Es wird diskutiert, ob die Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot})-vermittelte Relaxation der Gefäße eine redoxempfindliche Reaktion ist, die die Anwesenheit von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 benötigt (Kim et al. 2007; Auger et al. 2010; Tsai 2017).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage einer möglichen Autooxidation von Teepolyphenolen unter Bildung von ROS nachgegangen werden. Studienergebnisse zur Autooxidation von EGCG wurden auf grünen und schwarzen Tee, sowie TF3 als Bestandteil

des schwarzen Tees, erweitert. Damit sind die Ergebnisse für viele verschiedene Teepolyphenole anwendbar.

Um die Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies O_2^- und H_2O_2 an der Vasodilatation durch Teepolyphenole zu untersuchen, wurden extra- und intrazelluläre Antioxidantien verwendet (Katalase, Superoxiddismutase, Mangan(III)tetrakis(1-methyl-)porphyrin). Dazu erfolgte die Messung der durch EGCG, TF3, sowie grünen und schwarzen Tee induzierten Vasodilatation unter dem Einfluss der verschiedenen Antioxidantien. Des Weiteren sollten Stabilitätsmessungen von EGCG und TF3 Aufschluss über eine mögliche Autooxidation der Teepolyphenole geben. In einem dritten Untersuchungsabschnitt wurde die durch EGCG, TF3, grünen und schwarzen Tee generierte Menge an H_2O_2 gemessen.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Vasodilatation von Teepolyphenolen geben und somit zu einem besseren Verständnis der positiven Effekte von grünem und schwarzem Tee auf das Herz-Kreislauf-System beitragen.

2 Literaturübersicht

2.1 Grüner und schwarzer Tee

2.1.1 Allgemeines

Tee ist mit einem pro Kopf-Verbrauch von 40 Liter im Jahr nach Wasser das weltweit am meisten konsumierte Getränk. Es werden jährlich ungefähr drei Milliarden Kilogramm Tee produziert und konsumiert. Während in den westlichen Ländern vorwiegend schwarzer Tee konsumiert wird, wird in Asien traditionell eher grüner Tee getrunken (Sumpio et al. 2006). Eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien untersuchten die Wirkungen auf verschiedene Organsysteme und lassen eine positive Wirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen und einige Krebsformen vermuten. Daneben werden eine blutdrucksenkende Wirkung, neuroprotektive, sowie antibakterielle, antivirale und antioxidative Effekte vermutet. Auch wenn diese Ergebnisse sehr viel versprechend sind, bedarf es weiterer Untersuchungen, um die genaue Wirkung auf den menschlichen Organismus zu verstehen (Cabrera et al. 2006; Li 2018).

Tee wird aus den Blättern und Knospen des immergrünen Teestrauches *Camellia sinensis* hergestellt und enthält nahezu 4000 bioaktive Substanzen, von denen über 200 identifiziert wurden. Polyphenole sind die Hauptbestandteile des grünen und schwarzen Tees (Mujtaba und Dou 2012; Kellogg et al. 2017). Abhängig vom Herstellungsprozess erhält man nicht-fermentierten grünen Tee, halb-fermentierten Oolong Tee oder fermentierten schwarzen Tee (Wang et al. 2016). Bei der Fermentation kommt es zu einem Oxidationsprozess der Polyphenole durch die Polyphenoloxidase: Catechine werden zu Theaflavinen und Thearubigenen umgewandelt. Da grüner Tee nach der Ernte sofort gedämpft oder kurz erhitzt wird, kommt es zur Inaktivierung der Polyphenoloxidase und die Catechine bleiben im Wesentlichen unverändert. Bei der Herstellung von schwarzem Tee werden die Blätter nach der Ernte gewelkt, getrocknet und gerollt. So bleibt die Polyphenoloxidase erhalten und es entstehen die Theaflavine und Thearubigene, welche dem schwarzen Tee seine typische schwarze Farbe verleihen und ähnliche physiologische und biochemische Eigenschaften wie die Catechine aufweisen (Crespy und Williamson 2004; Sumpio et al. 2006). Beim Oolong Tee wird dieser Oxidationsprozess nach etwa 30 Minuten gestoppt, während er bei der Herstellung von schwarzem Tee 60-90 Minuten andauert (Sumpio et al. 2006).

2.1.2 Teeinhaltsstoffe

Die gesundheitsfördernden Effekte in grünem und schwarzem Tee werden den Polyphenolen zugeschrieben, welche in großen Mengen enthalten sind, sich jedoch in der Zusammensetzung und Art der Komponenten unterscheiden (Sang et al. 2011). Die zu den Polyphenolen gehörenden Flavonoide bestehen aus mindestens zwei aromatischen Ringen, welche durch eine Carbonbrücke verbunden sind und jeweils mindestens eine Hydroxylgruppe enthalten (Stangl et al. 2007). Flavonoide werden in sechs Untergruppen eingeteilt: Flavone, Flavanone, Isoflavone, Flavonole, Flavanole und Anthocyanine. Flavanole und Flavonole machen 30 % des Trockengewichts frischer Teeblätter aus, zu welchen auch die Catechine (Flavan-3-ole) gehören. Die Catechine des grünen Tees unterscheiden sich in ihrem Hydroxylierungsmuster am B-Ring (R2) und der Anwesenheit der Galloylgruppe (R1). Die vier wichtigsten Catechine sind (Balentine et al. 1997) (Abb. 1):

Epigallocatechin-3-gallat (EGCG),
Epigallocatechin (EGC),
Epicatechin-3-gallat (ECG) und
Epicatechin (EC).

EGCG als das Hauptcatechin im grünem Tee trägt einen Anteil von 10 % an der Gesamtmasse und zeigt von den Catechinen die höchste biologische Aktivität (Sumpio et al. 2006; Tsai et al. 2017). Eine Tasse grünen Tees enthält zwischen 20 und 100 Milligramm (mg) EGCG (Stangl et al. 2006).

Während der Fermentation des schwarzen Tees wird ein Teil der farblosen Catechine des grünen Tees durch die Polyphenoloxidase zu einer Reihe orange- bis braun-farbener polymerischer Komplexe, den Theaflavinen, oxidiert (Takemoto et al. 2017). Theaflavine und Thearubigene sind die Hauptkomponenten im schwarzen Tee. Die wichtigsten Vertreter der Theaflavine sind (Tu et al. 2016) (Abb. 1):

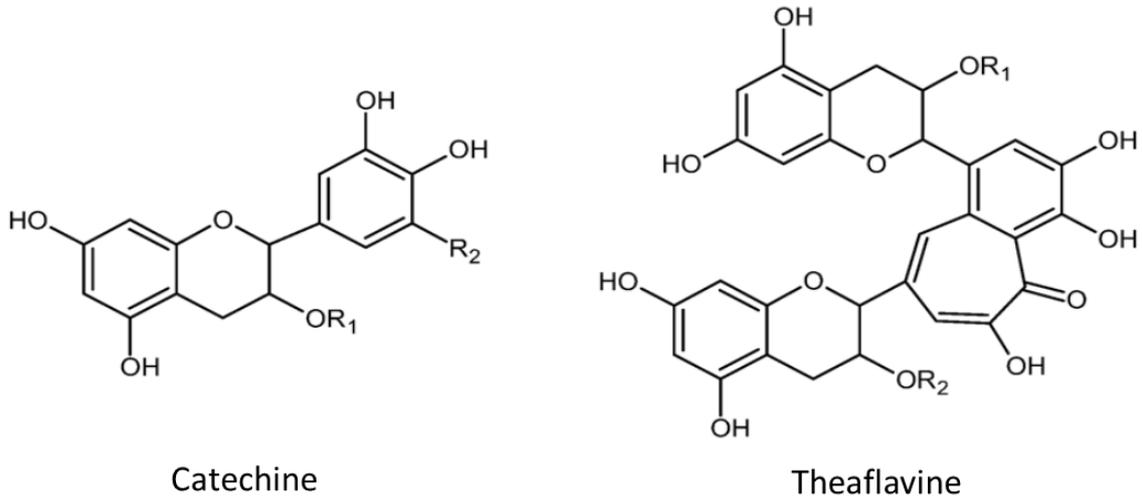
Theaflavin (TF1),
Theaflavin-3-monogallat (TF2A),
Theaflavin-3'-monogallat (TF2B) und
Theaflavin-3,3'-digallat (TF3).

TF3 ist aufgrund seiner hohen biologischen Aktivität eines der wichtigsten Theaflavine im schwarzen Tee (Gao et al. 2016).

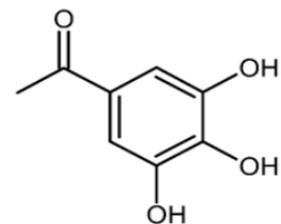
Des Weiteren enthalten grüner und schwarzer Tee neben Polyphenolen auch Alkaloide (Koffein, Theobromin), Aminosäuren (hauptsächlich L-Theanin), Kohlenhydrate, Proteine,

Chlorophyll, Mineralstoffe (Kalzium, Aluminium, Mangan, Fluoride), flüchtige Komponenten und andere nicht identifizierte Inhaltsstoffe (Fernando und Soysa 2015).

Der Anteil und die Konzentration der Substanzen im Tee hängen vom Verarbeitungsprozess, geographischer Lage, Wachstumsbedingungen der Teepflanze, Art des Tees und Zubereitung des Aufgusses ab (Cabrera et al. 2006).



	R1	R2
Epicatechin (EC)	H	H
Epigallocatechin (EGC)	H	OH
Epicatechin-3-gallate (ECG)	G	H
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	G	OH
Theaflavin (TF1)	H	H
Theaflavin-3-gallate (TF2A)	H	G
Theaflavin-3'-gallate (TF2B)	G	H
Theaflavin-3,3'-digallate (TF3)	G	G



Galloylgruppe (G)

Abb. 1: Struktur der im Tee vorliegenden Catechine und Theaflavine (Stangl et al. 2007), mit freundlicher Genehmigung von Oxford Journals

2.1.3 Kardiovaskuläre Wirkungen der Teepolyphenole

Es wird angenommen, dass die meisten gesundheitsfördernden Wirkungen des grünen und schwarzen Tees von seinen Polyphenolen ausgehen. In zahlreichen epidemiologischen Studien werden positive Effekte von Tee auf das Herz-Kreislauf-System vermutet.

In vielen prospektiven Kohortenstudien wurden Untersuchungen zur Senkung der Mortalitätsrate durch Konsum von Tee durchgeführt. So konnte eine regelmäßige Catechin-Einnahme bei Männern im Alter von 65 bis 84 Jahren das Risiko an einer Herzerkrankung zu sterben, senken (Arts et al. 2001). In einer über 11 Jahre durchgeführten Studie an 40.000 Japanern im Alter von 40-79 Jahren ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen, senkte das Trinken von grünem Tee dosisabhängig das Risiko an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung zu versterben (Kuriyama et al. 2006). Der Konsum von 3-6 Tassen Tee pro Tag senkte über einen Untersuchungszeitraum von 13 Jahren das Mortalitätsrisiko bei koronarer Herzkrankheit (De Koning Gans et al. 2010). Bei einer weiteren Studie an Herzinfarktpatienten wurde die Mortalitätsrate um 31 % bei moderatem (<14 Tassen pro Woche) und um 39 % bei starkem Teekonsum (>14 Tassen pro Woche) vermindert (Mukamal et al. 2002). Eine Metaanalyse von 10 Kohortenstudien und 7 Fall-Kontroll-Studien zeigte, dass mit steigendem Konsum von grünem Tee das Risiko an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung zu erkranken, sinkt (Peters et al. 2001). Täglicher Teekonsum reduzierte das Risiko einer ischämischen Herzerkrankung (Li et al. 2017).

Daneben liegen zahlreiche epidemiologische Studien vor, die die positiven Effekte von grünem und schwarzem Tee auf die Arteriosklerose beschreiben. Die Catechine des grünen Tees beeinflussen über verschiedene Wege den Lipidstoffwechsel und beugen der Bildung atherosklerotischer Plaques vor, indem sie die Absorption von Triacylglyceriden und Cholesterol senken und die Exkretion von Fett erhöhen (Raederstorff et al. 2003). Grüner Tee schützte männliche Herzinfarkt-Patienten vor Arteriosklerose, nicht aber weibliche Patientinnen (Sasazuki et al. 2000). In einer prospektiven Kohortenstudie an gesunden Probanden wurden die Kalkablagerungen in der *Aorta abdominalis* bestimmt. Ab vier Tassen schwarzen Tee pro Tag wurde eine positive Wirkung auf die Entwicklung der Arteriosklerose nachgewiesen (Geleijense et al. 1999). Auch auf das Fortschreiten von Plaques in den Koronararterien hatte der Konsum von >2 Tassen Tee pro Tag einen positiven Effekt (Reis et al. 2010). Moderate Teetrinker (>1 Tasse Tee pro Tag) zeigten ein langsames Fortschreiten der Verkalkung in den Koronararterien und ein reduziertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zu Probanden, die keinen Tee tranken (Miller et al. 2017). Bei Arteriosklerose kommt es zu Ablagerungen in den Blutgefäßwänden und damit

einhergehender arterieller Gefäßsteifigkeit. In China wurden über einen Zeitraum von drei Jahren gesunde Probanden auf den Zusammenhang von Teekonsum und Gefäßsteifigkeit untersucht. Die Gefäßsteifigkeit nahm bei Konsum von grünem Tee über einen Zeitraum von mindestens 1 Jahr und von >450 ml am Tag ab (Li et al. 2014).

In zahlreichen Studien wurde außerdem die Auswirkung von Teekonsum auf den Blutdruck untersucht. Bei älteren Frauen sanken mit steigender Menge von schwarzem Tee signifikant der systolische und diastolische Blutdruck. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass regelmäßiger Teekonsum zur Senkung des Blutdruckes bei älteren Frauen führt (Hodgson et al. 2003). In China ergab eine epidemiologische Studie an Probanden ohne Bluthochdruck, dass der Konsum von 120-599 ml Tee am Tag das Risiko für Bluthochdruck um 46 % und der Konsum von mehr als 600 ml Tee am Tag das Risiko um 65 % senkte. Bei Teekonsum von mehr als einem Jahr kam es zu keiner weiteren Risikosenkung (Yang et al. 2004). Eine Querschnittsstudie in China untersuchte den Zusammenhang von Teekonsum und die Veränderung des Blutdruckes über einen 5-Jahres-Zeitraum. Bei den Teilnehmern sank der diastolische und systolische Blutdruck bei täglichem Konsum von grünem Tee, bei schwarzem Tee konnte dieser Effekt nur auf den systolischen Blutdruck nachgewiesen werden. Das Trinken von Tee hatte keinen Einfluss auf den Blutdruck bei Rauchern (Tong et al. 2014).

Weitere Studien zeigten den positiven Einfluss von Teekonsum auf die arterielle Vasodilatation, gemessen mittels Gefäßultraschall an der *Arteria brachialis*. Die endothelabhängige arterielle Vasodilatation verbesserte sich bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) sowohl bei kurzfristigem Schwarztee-Konsum (Messung 2 h nach 450 ml Teeaufnahme), als auch bei langfristigem Schwarztee-Konsum (tägliche Aufnahme von 900 ml Tee über vier Wochen) (Duffy et al. 2001). Patienten mit Bluthochdruck profitierten von einem 2x-täglichen Konsum von schwarzem Tee (150 mg Polyphenole). Die endotheliale Vasodilatation verbesserte sich signifikant (Grassi et al 2016).

Gesunde Raucher zeigten im Vergleich zu Nichtrauchern nach künstlicher Minderdurchblutung des Oberarms einen signifikant geringeren Blutfluss während der Phase der reaktiven Hyperämie. Nach Konsum eines an Catechinen reichen grünen Tees erhöhte sich der Blutfluss signifikant (Nagaya et al. 2004).

2.2 Blutgefäßaufbau und Vasodilatation

2.2.1 Blutgefäßaufbau und Funktionen des Endothels

Blutgefäße bestehen aus drei Schichten: Der innen gelegenen *Tunica intima*, die aus einem auf einer Basalmembran aufliegendem einzelligen Endothelzellverband und einer subendothelialen Bindegewebsschicht besteht. Die mittlere Schicht der Gefäßwand ist die *Tunica media*, bestehend aus glatten Muskelzellen und elastischen und kollagenen Fasern. Sie reguliert in Abhängigkeit des Blutdrucks den Gefäßdurchmesser. Die äußere Schicht der Blutgefäße bildet die *Tunica adventitia*, welche aus lockerem Bindegewebe besteht und kollagene und elastische Fasern, Fibroblasten, Blutgefäße und Nerven enthält und der Verankerung in der Umgebung dient (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Das Endothel bildet als die dem Blutstrom zugewandte Gefäßseite eine multifunktionelle Grenzschicht, die alle Gefäße aus dem Herz-Kreislaufsystem auskleidet. Es erfüllt verschiedenste Funktionen als semipermeable Barriere, Sensor, Integrator und Signalgeber und reguliert die Fibrinolyse. Als selektive, permeable Membran kann das Endothel durch spezialisierte Strukturen wie z.B. Zell-Zell-Verbindungen, Mikrovesikel oder transzelluläre Kanäle Makromoleküle von und in den intravaskulären Raum transportieren. Eine weitere wichtige Funktion stellt der Signalaustausch zwischen Blut und Gewebe dar, ermöglicht durch die Expression verschiedenster Rezeptoren für z.B. Zytokine, Insulin oder Wachstumsfaktoren wie VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) (Rösen 2002).

Durch die Bildung von vasorelaxierenden Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin und EDHF (aus dem Endothel stammender Entspannungsfaktor) und vasokonstringierenden Substanzen, wie Endothelin-1 und Angiotensin II, sorgt das Endothel für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Vasorelaxation und -konstriktion. Durch die Bildung von sowohl Agonisten als auch Antagonisten werden die Gefäßfunktionen und deren dynamisches Gleichgewicht bestimmt. Störungen dieses Gleichgewichts werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und sind Kennzeichen vieler Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose oder Bluthochdruck (Rösen 2002). Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch eine verminderte Vasodilatation und prothrombotische Stadien in den Gefäßen. Sie spielt eine wichtige Rolle in allen Stadien einer Herzerkrankung und dient als wichtiger Indikator für die Entwicklung einer solchen. Bei endothelialer Dysfunktion kommt es zum Ungleichgewicht verschiedener vasoaktiver Substanzen, von denen neben NO auch Endothelin-1 und Angiotensin II eine wichtige Rolle spielen (Raji 2006).

2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO) und Vasodilatation

Charakteristisch für ein intaktes Endothel ist es, auf Acetylcholin mit Vasorelaxation zu reagieren (Rösen 2002). Mediator für die Relaxation glatter Muskelzellen der Gefäßintima ist NO, welches als einer der wichtigsten vom Endothel hergestellten Faktoren der vaskulären Hämostase identifiziert wurde (Ignarro et al. 1987; Griffith et al. 1988). Bei gestörter Endothelfunktion wird NO vermindert gebildet und trägt somit zur endothelialen Dysfunktion bei (Raji 2006; Jing et al. 2017).

NO wird durch drei verschiedene Isoenzyme (NO-Synthasen) gebildet: die in Endothelzellen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten vorkommende endotheliale NO-Synthase (eNOS bzw. NOS III); die in Nervenzellen vorkommende neuronale NO-Synthase (nNOS bzw. NOS I); die in vielen Zelltypen im Rahmen inflammatorischer Reaktionen induzierbare NO-Synthase (iNOS bzw. NOS II) (Rösen 2002; Bruckdorfer 2005; Brunel et al. 2016).

In den Endothelzellen reagiert die Aminosäure L-Arginin mit Sauerstoff zu L-Citrullin und NO, katalysiert durch die eNOS (Abb. 2) (Andrew und Mayer 1999). Dafür benötigt sie verschiedene Kofaktoren wie molekularen Sauerstoff, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Häm und Tetrahydrobiopterin.

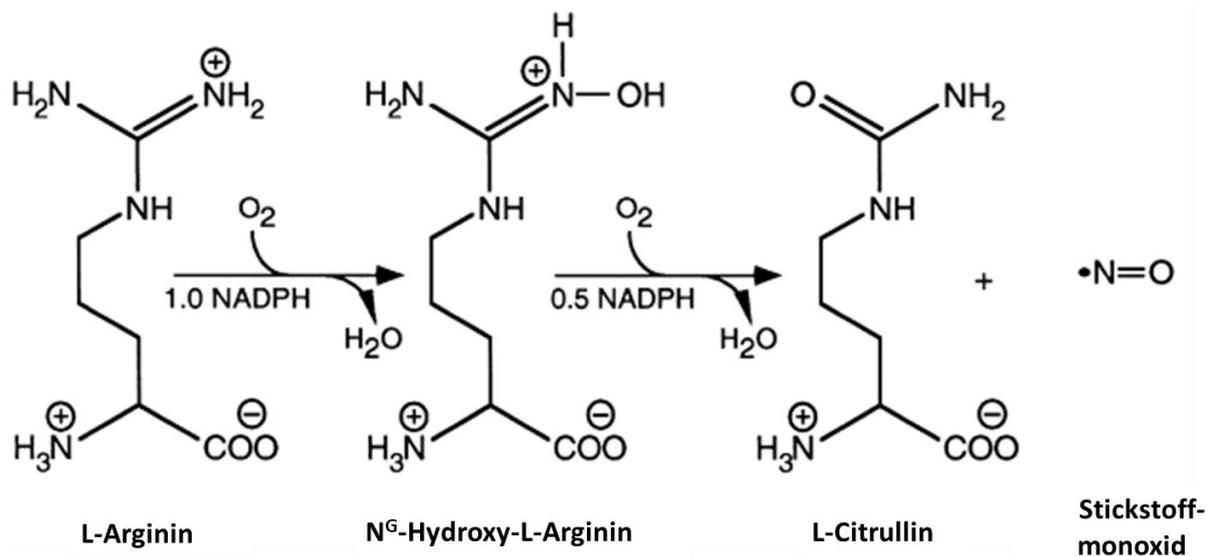


Abb. 2: Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) (Andrew und Mayer 1999), mit freundlicher Genehmigung von Oxford Journals

Die Aktivität der eNOS selbst wird durch Phosphorylierungen gesteuert. So führen z.B. Bradykinin und Insulin zu einer Aktivierung spezifischer Proteinkinasen und dadurch zur Phosphorylierung der eNOS (Rösen 2002).

Das gebildete NO^\cdot diffundiert aus den Endothelzellen in die glatten Muskelzellen der *Tunica media*. Dort aktiviert es sein Zielprotein, die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Durch dessen Aktivität bildet sich aus dem Nukleotid Guanosintriphosphat (GTP) das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) mit nachfolgender Relaxation in den glatten Muskelzellen der *Tunica media* (Abb. 3) (Bruckdorfer 2005).

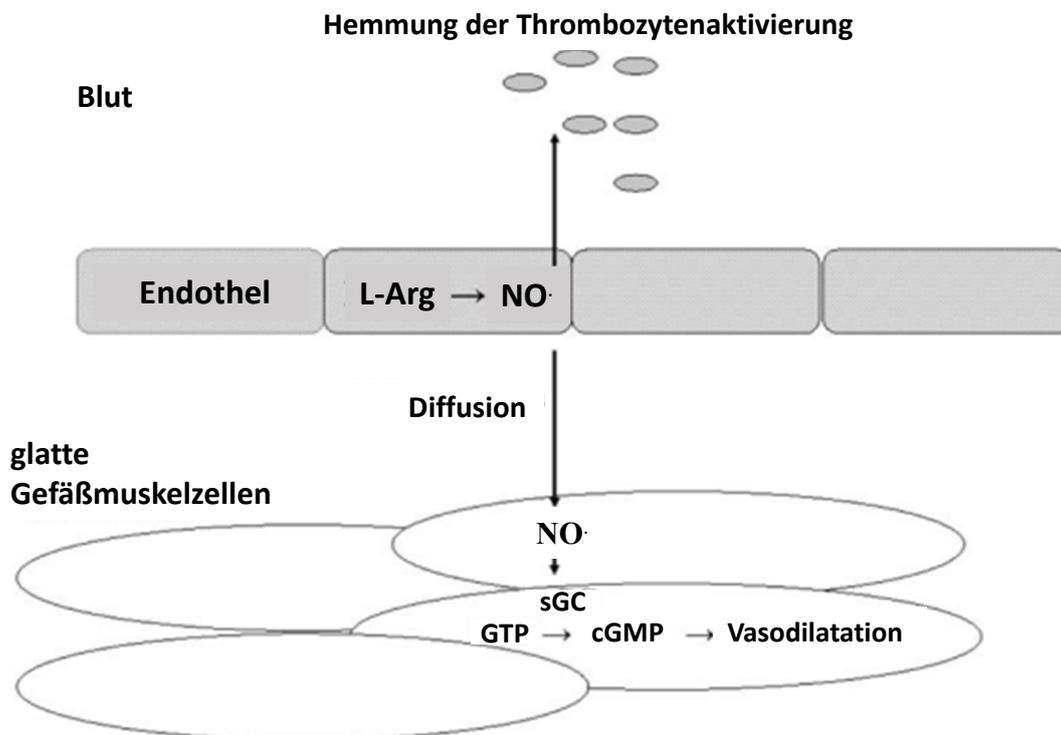


Abb. 3: Durch Stickstoffmonoxid (NO^\cdot) induzierte Vasodilatation (Bruckdorfer 2005), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

2.3 Antioxidative und prooxidative Mechanismen im Organismus

2.3.1 Freie Radikale - die zwei Gesichter

Freie Radikale sind Moleküle oder Molekülfragmente, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (Petersen 2012). Sie entstehen durch Elektronenaufnahme oder -abgabe eines Nichtradikals und haben ein starkes Bestreben durch Elektronenaufnahme oder -abgabe eine stabile Elektronenkonfiguration zu erreichen (Dröge 2002). Deswegen sind sie äußerst instabil, hochreaktiv und haben eine extrem kurze Halbwertszeit (Petersen 2012).

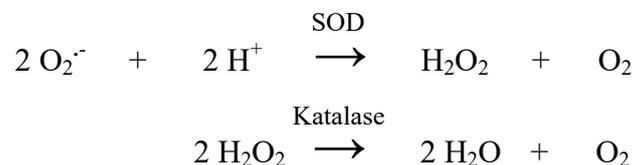
Freie Radikale sind Produkte eines normalen Zellmetabolismus. Sie entstehen u.a. im Rahmen der mitochondrialen Elektronentransportkette, wo aufgrund von Fehlübertragungen von Elektronen Hyperoxidationen entstehen können. Außerdem entstehen freie Radikale im Rahmen des Purinabbaus (Xanthinoxidase), durch neutrophile Granulozyten und durch Ultraviolett (UV)- oder radioaktive Strahlung. Als Folge kommt es zur Schädigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden. Zu den freien Radikalen zählen ROS und reaktive Stickstoffspezies (RNS), die durch Enzyme wie die NO-Synthase (NOS) und die NADPH-Oxidase generiert werden. Bei einer Überproduktion von freien Radikalen entsteht oxidativer bzw. nitrosativer Stress, ein schädigender Prozess, der zur Zerstörung von Zellstrukturen wie Lipiden, Zellmembranen, Proteinen und DNA führen kann (Valko et al. 2007; Davies et al. 2017). Oxidativer Stress wird in Verbindung gebracht mit verschiedenen Erkrankungen wie Krebs, Nierenerkrankungen, Neurodegeneration, Diabetes, Hypercholesterinämie und Vaskulopathien wie Arteriosklerose, Bluthochdruck und koronarer Herzkrankheit (Griendling 2003; Radomska-Leśniewska et al. 2017).

Viele Jahre ging man von einer ausschließlich zellschädigenden Wirkung der ROS und RNS aus, bis später wichtige Funktionen belegt wurden. Freie Radikale dienen als Signalmoleküle, z.B. das Hydroxylradikal zur Aktivierung des sekundären Botenstoffes cGMP (Mittal et al. 1977) und NO bei der Vasodilatation und vaskulären Homöostase. ROS wie Hyperoxidationen und Wasserstoffperoxid erfüllen wichtige immunologische Funktionen und erhöhen in T-Zellen die Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 (Roth und Dröge 1987) und aktivieren den nukleären Transkriptionsfaktor Kappa B (NF- κ B) (Schreck et al. 1991). Es gibt genügend Belege dafür, dass lebende Organismen sich nicht nur an eine Koexistenz mit freien Radikalen angepasst haben, sondern auch Mechanismen zur Nutzung dieser entwickelt haben. Wichtige physiologische Aufgaben freier Radikale und deren Derivate sind z.B. die Regulation des vaskulären Tonus, das Erfassen der

Sauerstoffspannung und Regulation von Funktionen, die durch die Sauerstoffkonzentration gesteuert werden, Signaltransduktion und Reaktion auf oxidativen Stress zur Sicherstellung der Redoxhomöostase. Besonders das sensible Gleichgewicht zwischen protektiven und schädigenden Effekten der freien Radikale (Redoxhomöostase) ist ein wichtiger Aspekt in lebenden Organismen und wird bestimmt durch die Produktionsrate freier Radikale und deren Elimination durch verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien (Dröge 2002). So können ROS als Signalmoleküle Tumorzellen aktivieren, aber auch antikanzerogen wirken, indem sie den Zellalterungsprozess und Zellapoptose induzieren. Dieses Beispiel macht deutlich, dass es sich bei freien Radikalen um Moleküle mit "zwei Gesichtern" handelt, die eine duale Rolle im Organismus einnehmen (Valko et al. 2007).

2.3.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS)

Als Teil eines normalen Zellmetabolismus entstehen *in vivo* primär ROS und RNS (z.B. NO und Peroxynitrit (ONOO⁻)) (Valko et al. 2007). ROS sind partiell reduzierte Metaboliten des molekularen Sauerstoff (O₂) und besitzen im Vergleich zu diesem eine höhere Reaktivität. Zu diesen Sauerstoffmetaboliten gehören das Hyperoxidanion (O₂⁻), H₂O₂ und das sehr reaktionsfreudige Hydroxylradikal ([•]OH). Die Reaktion läuft über vier Reduktionsstufen von O₂ bis hin zu Wasser (H₂O). Zur Beseitigung dieser toxischen Nebenprodukte, die zu Schäden an Lipiden, DNA und Proteinen führen können, gibt es verschiedene antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD, ein Metallenzym mit Kupfer-, Mangan- oder Zinkionen, Reduktion von O₂⁻ zu H₂O₂) und die Katalase bzw. Gluthationperoxidase (Reduktion von H₂O₂ zu H₂O) (Yu 1994; Thannickal und Fanburg 2000):



2.3.2.1 Hyperoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)

Das Hyperoxidanion ist die wichtigste reaktive Sauerstoffspezies (Valko et al. 2007) und entsteht durch die Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff. $O_2^{\cdot-}$ entsteht vorwiegend im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien und in phagozytierenden Zellen im Rahmen der Freisetzung von ROS (oxidativer Burst) (Buresh und Berg 2015). $O_2^{\cdot-}$ kann nicht über biologische Membranen diffundieren und reagiert bei physiologischem pH-Wert zu H_2O_2 und O_2 . Neutralisierendes antioxidatives Enzym ist die SOD. Durch die hohen Konzentrationen mitochondrialer SOD sind die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentrationen *in vivo* jedoch sehr gering (Thannickal und Fanburg 2000).

Außerdem können in der Haber-Weiss-Reaktion Hyperoxidanionen mit H_2O_2 zu Hydroxylradikalen ($\cdot OH$) und Hydroxidionen (OH^-) reagieren. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Anwesenheit von Eisenionen, welche unter Stress durch $O_2^{\cdot-}$ aus bestimmten Enzymen herausgelöst werden. Diese Reaktionen treten *in vitro* auf, die Signifikanz *in vivo* ist bis jetzt nicht geklärt (Valko et al. 2007; Leitão et al. 2017).

2.3.2.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wasserstoffperoxid entsteht überwiegend durch die Reduktion von $O_2^{\cdot-}$ im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien. Es kann aber auch in Peroxisomen im Rahmen von verschiedenen Stoffwechselfvorgängen (z.B. Fettsäureabbau) über H_2O_2 -produzierende Enzyme wie z.B. die Glykolat- oder Uratoxidasen direkt aus molekularem Sauerstoff durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion gebildet werden (Thannickal und Fanburg 2000). H_2O_2 kommt in verschiedenen Bakterien, Spermatozoen, Phagozyten, Mitochondrien, Mikrosomen, Chloroplasten und der Linse des Menschen vor (Halliwell und Gutteridge 1990). Es ist wesentlich stabiler als $O_2^{\cdot-}$ und kann über biologische Membranen diffundieren (Thannickal und Fanburg 2000; Buresh und Berg 2015).

Die Toxizität von H_2O_2 auf Zellen und Organismen ist sehr unterschiedlich. Während einige Bakterien und Tierzellen schon bei geringsten Konzentrationen geschädigt werden, gibt es photosynthetische Algen, die große Mengen an H_2O_2 produzieren. Diese Variabilität hängt von der unterschiedlichen Aktivität H_2O_2 -abbauender Enzyme und der gebildeten Menge hochreaktiver H_2O_2 -Metaboliten ab (Halliwell und Gutteridge 1990).

Um die Konzentration an H_2O_2 in den Körperzellen zu regulieren gibt es zwei antioxidative Enzyme: die Katalase und die selenhaltige Glutathion-Peroxidase. Bei beiden Reaktionen entstehen zwei Moleküle H_2O . Während die Katalase den dafür benötigten Wasserstoff aus

einem zweiten Molekül H_2O_2 bezieht und dabei O_2 entsteht, erhält die Glutathionperoxidase den Wasserstoff durch die Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) (Horn et al. 2003). Bei niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen ist die Glutathionperoxidase aktiver, bei hohen Konzentrationen die Katalase (Yu 1994).

H_2O_2 moduliert als sekundärer Botenstoff die zelluläre Signaltransduktion. Durch Tyrosinphosphorylierung wird der mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg aktiviert (Valko et al. 2007).

2.3.2.3 Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$)

Beim Hydroxylradikal handelt es sich um ein sehr reaktives Teilchen mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Es reagiert sehr schnell mit Molekülen in dessen unmittelbarer Umgebung. Die Hauptquelle für die Entstehung von $\cdot\text{OH}$ ist die Eisen-II-Ion (Fe^{2+})-vermittelte Fenton-Reaktion (Valko et al. 2007). Hydroxylradikale führen zu einer Proteindenaturierung durch Aminosäureoxidation, zu Kohlenhydratperoxidation und DNA-Schäden (Yu 1994).

2.3.2.4 Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) und Peroxynitrit ($\text{ONOO}\cdot$)

Stickstoffmonoxid besitzt ein ungepaartes Elektron und gehört zu den RNS. Es entsteht durch spezielle NO-Synthasen, welche die Aminosäure L-Arginin zu Citrullin metabolisieren (Kapitel 2.2.2). Seine Halbwertszeit beträgt nur einige Sekunden und es kann sich frei und schnell durch Zytoplasma und Zellmembranen bewegen. Es erfüllt viele physiologische Aufgaben wie z.B. als Neurotransmitter, bei der Blutdruckregulation und Vasodilatation (Valko et al. 2007).

Die toxischen Effekte von $\text{NO}\cdot$ sind durch die Bildung von $\text{ONOO}\cdot$ bedingt (Sindler et al. 2009). Bei Entzündungsprozessen produzieren Zellen des Immunsystems im Rahmen des "oxidativen burst" gleichermaßen $\text{NO}\cdot$ und $\text{O}_2\cdot^-$. Diese beiden Radikale können in großen Mengen $\text{ONOO}\cdot$ bilden, welches zu DNA-Schäden und Lipidperoxidation führen kann (Valko et al. 2007).

In Abbildung 4 sind wichtige vaskuläre ROS und RNS in einer Grafik zusammengefasst (Griendling und FitzGerald 2003).

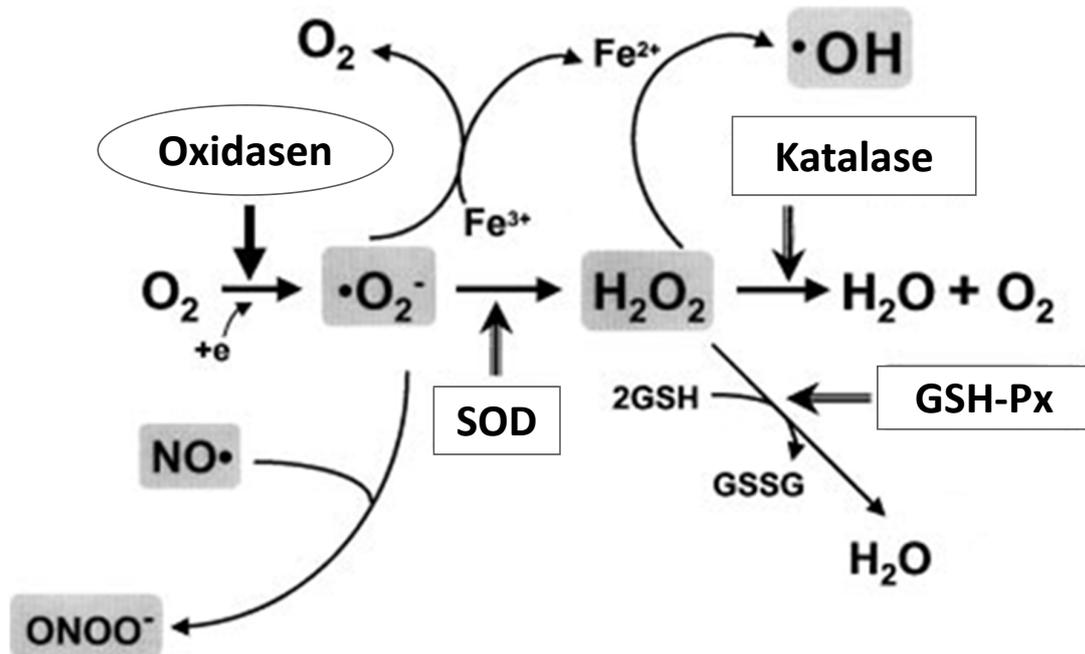


Abb. 4: Vaskuläre reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Molekularer Sauerstoff (O₂) wird durch Oxidasen zu Hyperoxidanion (O₂⁻) umgewandelt. Dieses konvertiert entweder durch Superoxiddismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂), oder durch Reduktion von Fe³⁺ wieder zu molekularem Sauerstoff (O₂), oder mit Stickstoffmonoxid (NO•) zu Peroxynitrit (ONOO⁻). Wasserstoffperoxid (H₂O₂) reagiert dann entweder durch Katalase oder Gluthationperoxidase zu Wasser (H₂O), oder nach Reaktion mit Fe²⁺ zu einem Hydroxylradikal (•OH) (Griendling und FitzGerald 2003), mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health

2.3.3 Anteil antioxidativer und prooxidativer Effekte bei der Wirkung von Teepolyphenolen

Die postulierten positiven Wirkungen von Tee auf die Gesundheit werden den antioxidativen Eigenschaften der Teepolyphenole zugeschrieben, d.h. sie können freie Radikale neutralisieren. Das regelmäßige Trinken von Tee verbessert den antioxidativen Status und schützt so vor oxidativen Schäden im Körper. Erba et al. (2005) untersuchten dies an gesunden Probanden, die über 42 Tage täglich zwei Tassen grünen Tee tranken. Es konnte ein signifikanter Anstieg der absoluten antioxidativen Aktivität, eine Senkung des Plasma-Peroxid-Levels und induzierter DNA-Schäden in Lymphozyten nachgewiesen werden. So können Teepolyphenole reaktive Verbindungen wie Hyperoxid- und Hydroxylradikale, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit neutralisieren und somit deren schädigende Wirkung auf Lipidmembranen, Proteine, Aminosäuren und DNA reduzieren. Durch die spezielle chemische Struktur der Teepolyphenole können sie mit Metallionen Chelatkomplexe bilden und somit der Bildung freier Radikale entgegen wirken (Khan und Mukhtar 2007). Anhand eines Oxidationsmodells mit Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) konnte gezeigt werden, dass Theaflavine dieselbe antioxidative Kapazität wie Catechine besitzen, die Fermentation

somit keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit der Neutralisation freier Radikale hat. Das antioxidative Potential der einzelnen Polyphenole im Tee verläuft in der Reihenfolge $TF3 > ECG > EGCG \geq TF2B \geq TF2A > TF1 \geq EC > EGC$ (Leung et al. 2001).

In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde die antioxidative Kapazität der Teepolyphenole nachgewiesen. Die Aufnahme einer einmaligen Dosis grünen oder schwarzen Tees führte zu einer signifikanten Erhöhung der antioxidativen Plasmaaktivität, gemessen an der Fähigkeit des Plasmas Eisen zu reduzieren. Das Maximum wurde jeweils nach 60 Minuten erreicht, wobei grüner Tee eine höhere Wirkung als schwarzer Tee erreichte (Leenen et al. 2000). In der Aorta von hypertensiven Ratten kam es nach Aufnahme von grünem Tee zu einem Anstieg der Katalase-Expression und einer Abnahme der Stickstoffmonoxidkonzentration im Plasma (Negishi et al. 2004). Wiederholter Teekonsum führte zur Senkung von oxidativem Stress im Körper. Bei Rauchern und Nichtrauchern konnte nach Konsum von 6 Tassen grünen Tees pro Tag über einen Zeitraum von einer Woche eine Reduktion oxidativer DNA-Schäden, Lipid-Peroxidation und freier Radikalbildung nachgewiesen werden (Klaunig et al. 1999). Einige Studien untersuchten die Stabilität der Teecatechine und konnten während des Zerfalls von EGCG das Entstehen verschiedener Produkte feststellen. So waren *in vitro* unter oxidativen alkalischen Bedingungen von EGCG nach 5 Minuten nur noch 19,4 % im Darmsekret (pH 8,5) und 60,7 % im Plasma von Mäusen (pH 7,8) nachweisbar, was für die Instabilität von EGCG spricht (Yoshino et al. 1999). Dabei konnten drei verschiedene Produkte nachgewiesen werden: Theasinensin A, P-2 und Theasinensin D, ein Isomer von Theasinensin A. Nach 5 Minuten waren diese drei Produkte zu 35,1 % im Darmsekret und zu 21,9 % im Plasma von Mäusen nachweisbar. Die Fähigkeit mit Fe^{2+} -Ionen Chelatkomplexe zu bilden, war bei allen drei Produkten größer als bei EGCG. Die Radikalfängereigenschaft für O_2^- war bei P-2 sogar signifikant stärker als bei EGCG. Diese durch Autooxidation entstandenen Produkte sollen wiederum *in vivo* für die antioxidativen Effekte bei Konsum von grünem Tee verantwortlich sein (Yoshino et al. 1999).

Neben den genannten antioxidativen Eigenschaften besitzen Teepolyphenole aber auch prooxidative Eigenschaften. So können sie selbst oxidiert werden und dadurch ROS bilden. Dies wurde bislang in zahlreichen *in vitro*-Studien untersucht. Es wird teilweise sogar angenommen, dass die biologischen Effekte von EGCG durch dessen Oxidation und der damit einhergehenden ROS-Bildung bedingt sind (Sang et al. 2007).

Hong et al. (2002) wiesen in menschlichen Adenokarzinomzellen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) die EGCG-Dimere Theasinensin A und P-2 nach. Dabei war EGCG unter sauren Bedingungen (pH 2,0 - 5,5) eher stabil als unter

neutralen (pH 7,4 und 37 °C), wo es schnell der Autooxidation unterlag. Theasinensin A und P2 erreichten nach 2 - 4 h ihr Maximum und waren, nachdem EGCG nicht mehr nachweisbar war, noch in größeren Konzentrationen vorhanden. Es wird angenommen, dass in Zellkultur durch Oxidation immer diese Dimere entstehen.

In vitro unterlagen die wässrigen Extrakte aus grünem und schwarzem Tee unter Standardbedingungen (pH 7, 200 µmol/l O₂, 100 µmol/l Teepolyphenole) einem intensiven Autooxidationsprozess. Dieser nahm mit steigendem pH-Wert zu und konnte durch Zugabe von SOD unterbrochen werden (Roginsky und Alegria 2005).

Auch Mochizuki et al. (2002) postulieren die Autooxidation der vier Catechine EGCG, ECG, EGC, EC. Durch Sauerstoff kommt es zur Ein-Elektronen-Oxidation des B-Ringes und es entsteht ein Semichinon-Radikal und O₂^{•-}, welches zu H₂O₂ reduziert wird. Mit steigendem pH-Wert nimmt auch die Autooxidationsrate zu. Die Zugabe von SOD unterdrückte die Autooxidation der Catechine, Kupferionen (Cu²⁺) erhöhten sie.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Sang et al. (2007) stützen die These der *in vitro*-Autooxidation von EGCG in verschiedene Dimere/Chinone. Chinone sind Oxidationsprodukte von Aromaten, insbesondere von Phenolen. Sie enthalten unter Aufhebung der Aromatizität des Ringes zwei Carbonylgruppen (C=O). Die Carbonylgruppen lassen sich leicht wieder zu Hydroxygruppen (-OH) reduzieren. Die Halbwertszeit für EGCG (50 und 200 µM) lag bei ungefähr 2 h und nach 24 h war EGCG nicht mehr nachweisbar. In derselben Zeit entstanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Oxidationsprodukte, die in Echtzeit mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten. Die Arbeitsgruppe postuliert einen Autooxidationsprozess unter neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen, bei dem EGCG durch Sauerstoff oxidiert wird und ein EGCG-Radikal (EGCG[•]) und O₂^{•-} formt, vermutlich katalysiert durch Cu²⁺ oder Fe³⁺. O₂^{•-} reagiert mit einem anderen EGCG-Molekül zu einem EGCG-Radikal und H₂O₂. Das EGCG-Radikal könnte unter neutralen/leicht alkalischen Bedingungen ein EGCG-Anionen-Radikal sein (EGCG^{•-}). Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff zu einem EGCG-Chinon unter Bildung von O₂^{•-}, welches erneut mit einem EGCG-Molekül reagiert. Diese Kettenreaktion ist in Abbildung 5 dargestellt.

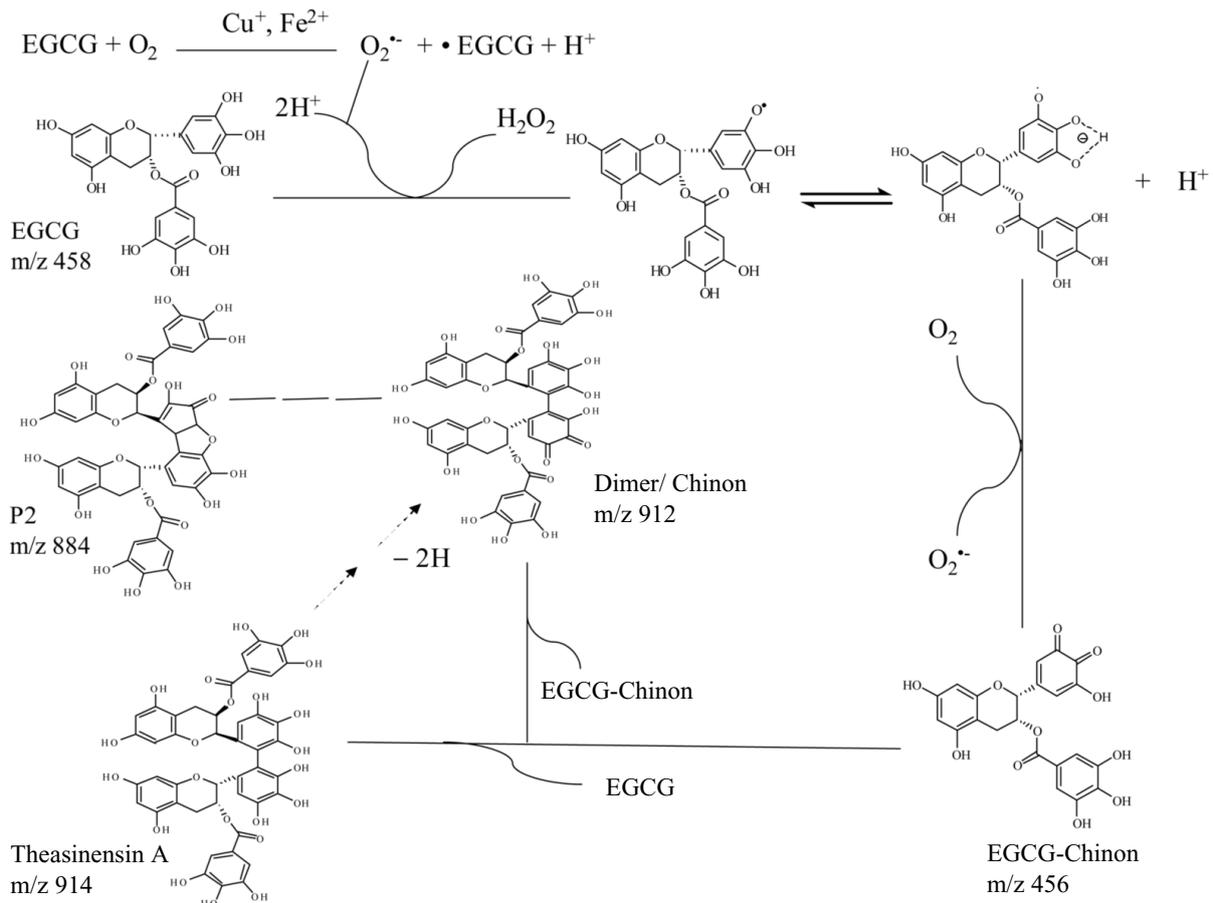


Abb. 5: Möglicher Mechanismus der Autooxidation von EGCG (Sang et al. 2007), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

Die Oxidationsprodukte konnten jedoch *in vivo* im Plasma von Mäusen nach hochkonzentrierter EGCG-Gabe nicht nachgewiesen werden (50 mg/kg EGCG *i.p.* über drei Tage). Stattdessen wurden die methylierten und konjugierten Metaboliten von EGCG nachgewiesen. Somit stellt diese Arbeitsgruppe die Autooxidation von EGCG *in vivo* in Frage (Sang et al. 2007).

2.4 Potentielle Mechanismen der Vasodilatation durch Teepolyphenole

2.4.1 Der eNOS-NO-Signalweg

Das Teecatechin EGCG aktiviert in Endothelzellen über eine Signalkaskade die eNOS und führt dadurch zu nachfolgender NO-Produktion und Vasodilatation (Lorenz et al. 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die eNOS-Aktivierung durch EGCG (50 bis 100 mikromolar (μM)) über Proteinkinasen erfolgt. Es wurde folgende Signalkaskade postuliert: über Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3-Kinase), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängige Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase B (AKT) erfolgt eine Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Serin (Ser)-1179 der eNOS (Lorenz et al. 2004).

Auch Reiter et al. (2010) postulieren den PI3-Kinase/AKT-Signalweg, der zur eNOS-Aktivierung mit anschließender NO-Produktion und damit einhergehender Vasodilatation durch EGCG führt. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass dabei der PI3-Kinase-abhängige Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein 01 (FOX01) die Wirkungen von EGCG beeinflusst. Auch Lu et al. (2017) vermuten FOX01 im Signalweg von EGCG.

In porzinen Endothelzellen erhöhte schwarzer Tee sowohl die Katalyseaktivität der eNOS als auch die Bioaktivität von NO. Dabei wird eine Signalkaskade über die PI3-Kinase, AKT-Kinase und p38 MAPK mit nachfolgender Phosphorylierung an Ser-1177 der eNOS postuliert (Anter et al. 2004). Kim et al. (2007) vermuten ebenfalls einen Signalweg von EGCG über die PI3-Kinase, AKT-Kinase und eNOS, jedoch unter zusätzlicher Beteiligung von ROS und Tyrosinkinase Fyn.

In vitro erhöhten in bovinen Endothelzellen grüner und schwarzer Tee signifikant die Aktivität der endothelialen NO-Synthase. *Ex vivo* führten beide Teesorten in isolierten Aortenringen von Ratten vergleichbar zu endothelabhängiger Vasodilatation und *in vivo* erhöhten bei gesunden Frauen sowohl grüner als auch schwarzer Tee die endotheliale Vasodilatation (Jochmann et al. 2008).

EGCG führte sowohl in isolierten Schweine-Aortenringen (Auger et al. 2010) als auch in isolierten Ratten-Aortenringen zu einer dosis- und endothelabhängigen Vasodilatation (Grassi et al. 2008; Aggio et al. 2013).

Jedoch sind die *ex vivo* Ergebnisse bezüglich der Vasoreaktivität in isolierten Aortenringen nicht konstant. So wurden sowohl keine Effekte, als auch vasokonstriktive Effekte durch Teecatechine beschrieben (Sanae et al. 2002; Shen et al. 2003). Ab einer Konzentration von

30 μM führte EGCG zu einer Vasokontraktion (Andriambeloso et al. 1998). Mögliche Erklärungen für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten in unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen für die Änderungen im Vasomotorentonus liegen, oder an den Konzentrationen individueller Teecatechine in den untersuchten Tees.

Im Signaltransduktionsweg der Teepolyphenole wird außerdem die Beteiligung von Rezeptoren wie dem Östrogenrezeptor (Anter et al. 2005) und dem Lamininrezeptor (Tachibana et al. 2004; Kumazoe et al. 2013; Gundimeda et al. 2015) diskutiert. Auch eine Interaktion von EGCG mit dem membranständigen Protein Caveolin konnte gezeigt werden (Hsieh et al. 2013).

2.4.2 Die mögliche Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies

Wie zuvor in Kapitel 2.3.3 beschrieben, besitzen Teepolyphenole prooxidative Eigenschaften und können selbst oxidiert werden. Durch diesen auch als Autooxidation bezeichneten Vorgang entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die an der Vasodilatation beteiligt sein könnten.

Eines dieser ROS ist H_2O_2 . Viele Arbeitsgruppen beschrieben die Generierung von H_2O_2 durch Teepolyphenole in Zellkultur (Long et al. 2000; Hong et al. 2002; Nakagawa et al. 2004; Weisburg et al. 2004; Hou et al. 2005; Gundimeda et al. 2015). Es wird vermutet, dass die Menge des gebildeten H_2O_2 abhängig vom Zellkulturmedium ist, denn bei Einsatz unterschiedlicher Zellkulturmedien kam es zur Bildung unterschiedlicher Mengen an H_2O_2 . Daher ist es möglich, dass die H_2O_2 -Produktion auf chemische Reaktionen zwischen Kulturmedium und Testsubstanz zurückzuführen ist (Long et al. 2000 und 2007). Neben dem Zellkulturmedium hatten auch Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Inkubationszeit einen Einfluss auf die Menge des gebildeten H_2O_2 (Hong et al. 2002). Takumi-Kobayashi et al. (2008) sehen den pH-Wert als einen Schlüsselfaktor bei der H_2O_2 -Produktion in Zellkultur. Ab pH 6 nahm die H_2O_2 -Produktion zu.

Nakagawa et al. (2004) untersuchten die Mechanismen der EGCG-induzierten Apoptose in humanen Tumorzellen. Mit dem durch EGCG induzierten Anstieg der H_2O_2 -Konzentration wurde die Fenton-Reaktion unter Anwesenheit von Fe^{2+} ausgelöst. Dadurch entstanden hochtoxische Hydroxylradikale, welche die Apoptose bewirkten.

Wurde während der Inkubation Katalase hinzu gegeben, kam es zur Abschwächung bzw. Unterdrückung der durch EGCG hervorgerufenen Effekte (Nakagawa et al. 2004; Weisburg et al. 2004).

H₂O₂ ist nicht nur als wichtiger intrazellulärer Mediator bekannt (Sundaresan et al. 1995; Bae et al. 1997; Goldstein et al. 2005; Ellinsworth et al. 2016), sondern kann auch direkt AKT aktivieren (Esposito et al. 2003; Zhao et al. 2016), welche als wichtige Proteinkinase im Signalweg von EGCG identifiziert wurde (Kapitel 2.4.1).

Verschiedene Studien identifizierten vom Endothel freigegebenes H₂O₂ als EDHF, welches zu nachfolgender Vasodilatation führte. In Mesenterialarterien des Endothels konnte freigegebenes H₂O₂ als EDHF in Mäusen und Menschen identifiziert werden (Matoba et al. 2000 und 2002; Liu et al. 2011; Zhang et al. 2012). In Koronararterien des Menschen kam es ebenfalls zur Bildung von H₂O₂ in Endothelzellen (Miura et al. 2003; Liu et al. 2011; Ellinsworth et al. 2016). Die von endothelialen NO-Synthasen gebildeten Hyperoxidanionen sind wichtige Vorläufer zur Bildung von EDHF/H₂O₂ in Mäusen (Takaki et al. 2008). Auch Hydroxylradikale werden als Vermittler der durch Acetylcholin induzierten Vasodilatation diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass NO[•] mit O₂^{•-} zu ONOO⁻ reagiert, welches bei physiologischem pH-Wert zu Hydrogennitrit (HNO₂) und nachfolgend zu Hydroxylradikalen und Stickstoffdioxid (NO₂) zersetzt wird. Die dabei gebildeten Hydroxylradikale relaxierten isolierte Aortenringe (Prasad et al. 1996).

2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Beitrag reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an den vasodilatatorischen Wirkungen von Teepolyphenolen aufgeklärt werden.

Es wird vermutet, dass Catechine aufgrund ihrer oxidativen Eigenschaften ROS wie Hydroperoxydionen ($O_2^{\cdot-}$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduzieren und/oder diese ROS selbst produzieren. Um die Beteiligung dieser ROS an der Vasodilatation von Teepolyphenolen zu untersuchen, wurden sowohl extra- als auch intrazelluläre Antioxidantien verwendet (Katalase, Superoxiddismutase, Mangan(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP)). Die Versuche wurden mit EGCG aus grünem Tee, mit TF3 aus schwarzem Tee sowie mit grünem und schwarzem Tee durchgeführt.

Die Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von ROS an der Vasodilatation von Teepolyphenolen erfolgten in mehreren Schritten, um die Ergebnisse mit verschiedenen Methoden zu verifizieren. Basis aller Untersuchungen bildete das Ratten-Aortenringmodell, welches als *ex vivo* Versuchsmodell die *in vivo* Situation im Blutgefäß nachstellt. Um die Beteiligung der reaktiven Sauerstoffspezies $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 an der Vasodilatation durch Teepolyphenole zu untersuchen, wurde der Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die durch EGCG, TF3, grünen und schwarzen Tee induzierte Vasodilatation gemessen.

Im nächsten Schritt wurde die zeitabhängige Veränderung der Polyphenolkonzentration im Aortenringmodell untersucht. Mittels Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurden die Konzentrationen von EGCG und TF3 mit und ohne Zugabe von Antioxidantien bestimmt.

Anschließend wurde die durch Teepolyphenole generierte Menge an H_2O_2 gemessen. Diese Bestimmungen erfolgten ebenfalls mit und ohne Zugabe von Antioxidantien. Hierzu wurde ein quantitativer fluorometrischer Test eingesetzt, der die gebildete H_2O_2 -Menge mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA)-Lesegerät misst.

Die erzielten Ergebnisse sollen Aufschluss über einen möglichen Autooxidationsprozess bzw. die Beteiligung von ROS bei der Vasodilatation durch Teepolyphenole geben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Materialien

Materialien	Hersteller
Acetanilid	Merck
Acetylcholin*	Sigma
Aqua ad injectabilia	Braun
Destilliertes Wasser	Millo-Q50 von Millipore
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)*	Roth
Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)*	Sigma
Ethanol Vol.-70%	Herbeta-Arzneimittel
Forene 100 % (Isofluran)	Abbott
Grüner Tee, Assam	Kings Teegarden
Kaliumchlorid (KCl)*	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)*	Roth
Katalase (aus Rinderleber, lyophilisiertes Pulver, 4540 U/mg Protein)	Sigma
Mangan(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP)*	Calbiochem
Natriumchloridlösung 0,9%	Braun
Phenylephrin*	Sigma
Schwarzer Tee, Assam	Kings Teegarden
Superoxiddismutase (SOD, 3999 U/mg Protein)*	Sigma
Theaflavin-3-3'-digallat (TF3)*	Mitsui Norin, Japan
Thiopental Inresa 0,5 mg (Thiopental-Natrium)	Inresa Arzneimittel
*gelöst in destilliertem Wasser	
Amplex Red Wasserstoffperoxid Test:	Invitrogen
Amplex Red Reagenz (5 Fläschchen mit jeweils 154 Mikrogramm (μg) Reagenz)	
Dimethylsulfoxid (DMSO, 700 Mikroliter (μl))	
5x Reaktionspuffer (28 ml von 0,25 M Natriumphosphat (Na_3PO_4), pH 7,4)	
Meerrettichperoxidase (HRP, 1 Fläschchen mit 10 Einheiten (U))	
Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 3 %ig, stabilisiert mit 200 ppm Acetanilid)	
Reaktionsansatz pro Vertiefung Mikrotiterplatte: 50 μl Perfusat-Probe und 50 μl Arbeitslösung	

3.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	BD
Doppelwandige Glasgefäße für Organbäder	Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich
ELISA-Reader Spectra max 340PC 384	Molecular Devices
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Erlenmeyerkolben, 5000 ml	Duran
Feinpositionierelement Vernier Control Typ 850 N	Hugo Sachs Elektronik
Inhalationskammer	Eigenbau
Injektionskanülen (0,45 x 25 mm; 1,20 x 40 mm)	Braun
Kontraktionskraftaufnehmer FMI TIM-1020	Föhr Medical Instruments
Kunststoffschläuche	VWR
Messplatzgerüst (Spezialanfertigung)	Gemmel Metalle
Mikrofederschere	Aesculap
Petrischalen	Falcon
Platinhaken	Eigenbau
pH-Meter	WTW
Präparationsbesteck	Aesculap
Präparationsmikroskop (Vergrößerungen 1x, 2x)	Eschenbach
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Falcon
Rollenpumpe	Ismatec
Umlaufthermostat mit Wasserbad	Haake und Julabo
Wasserstrahlpumpe	Labor-Pilz
Vortex	Heidolph
96 Loch-Mikrotiterplatte	Sarstedt

3.1.3 Lösungen

Lösungen	Hersteller
Krebs-Henseleit-Lösung modifiziert:	
144 mM Natriumchlorid (NaCl)	Roth
5,9 mM Kaliumchlorid (KCl)	Roth
1,6 mM Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth
1,2 mM Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth
11,1 mM D-Glukose	Roth
1 µM Diclophenac	Sigma
<p>Zur Herstellung von 5 l Krebs-Henseleit-Lösung wurden in einem Erlenmeyerkolben 42,05 g NaCl, 2,2 g KCL, 0,9 g CaCl₂, 0,7 g MgSO₄, 0,8 g KH₂PO₄, 10 g Glukose, 10,5 g NaHCO₃ zusammen mit 1 ml Diclophenac (einer 5 mM Stammlösung) in destilliertem Wasser gelöst, auf 5 Liter aufgefüllt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.</p>	
Kaliumphosphatpuffer, 50 mM, pH 7,0:	
<p>Herstellung einer jeweils 1 M Stammlösung von (1) K₂HPO₄ x 3 H₂O, 22,82 g gelöst in 100 ml destilliertem Wasser und (2) KH₂PO₄ 13,61 g gelöst in 100 ml destilliertem Wasser. 61,5 ml von (1) und 38,5 ml von (2) wurden zur Herstellung von 100 mM Kaliumphosphatpuffer gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, anschließend 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt.</p>	
Arbeitslösung Amplex Red Wasserstoffperoxid Testverfahren:	
4,85 ml 1x Reaktionspuffer (4 ml 5x Reaktionspuffer + 16 ml H ₂ O, anionisiert)	
50 µl von 10 mM Amplex Red Stammlösung (1 Fläschchen Amplex Red Reagenz gelöst in 60 µl DMSO)	
100 µl von 10 U/ml HRP Stammlösung (1 Fläschchen gelöst in 1 ml 1x Reaktionspuffer)	

3.2 Das Aortenringmodell

3.2.1 Präparation der Aorta

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden männliche Wistarratten (Körpergewicht 300-350 g) von Charles Rivers Laboratories, Deutschland, verwendet. Die Tiere wurden in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin nach den Richtlinien des Europäischen und Deutschen Gesetzes zur Verwendung von Labortieren gehalten und standardisiert mit Standardpellets und Wasser *ad libitum* gefüttert. Tötung und Organentnahme erfolgten im Kardiologischen Forschungslabor. Eine Tötungsanzeige für die durchgeführten Versuche lag vor (T0026/05).

Zur Narkotisierung der Tiere wurde eine Inhalationskammer verwendet und die Tiere mit 1 ml Isofluran narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose erfolgte die Euthanasie durch intraperitoneale Injektion von 0,3 g Thiopental/kg Körpergewicht. Nach Überprüfung des Herzstillstandes mittels Auskultation erfolgte die Präparation. Nach Befestigung der Ratte auf der Präparationsvorrichtung und Desinfektion mit Ethanol (70%), wurde nach einem Hautschnitt entlang der Medianen das Abdomen im Bereich *Linea alba* und der Thorax im Bereich Sternum mit Schere und Pinzette eröffnet. Nach Durchtrennung der *Vena cava caudalis* und Entfernung der Bauchorgane samt Zwerchfell, erfolgte eine gründliche Spülung der Bauchhöhle mit 4°C kalter Natriumchlorid-Lösung (0,9%). Danach wurden Thymus und Lunge entfernt. Nach erneuter Spülung erfolgte mit einer sehr feinen Präparationsschere die vorsichtige Entnahme der *Aorta thoracalis* entlang der Wirbelkörper. Anschließend wurde die *Aorta thoracalis* in eine Kulturschale mit 4°C kalter Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Um Blutkoagula aus dem Inneren des Gefäßes zu entfernen, wurde dieses mittels einer Injektionskanüle und kalter Krebs-Henseleit-Lösung gespült. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop und in 4°C kalter, Carbogen (Gasgemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂)-begaster Krebs-Henseleit-Lösung in einer Silikon-beschichteten Petrischale. Auf dieser konnte die Aorta mit feinen Kanülen befestigt und mittels Pinzette und Mikrofederschere von Fett und Bindegewebe befreit werden. Danach wurde sie ein weiteres Mal gespült und konnte dann in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten werden. So wurden durchschnittlich 14 Gefäßringe pro Aorta gewonnen.

3.2.2 Technische Ausstattung und Durchführung

Der Bau der Messplätze für isolierte Gefäßringe erfolgte durch Dipl. Ing. (FH) Thomas Düsterhöft, Mitarbeiter des Kardiologischen Forschungslabors, in Anlehnung an schon vorhandene Baueinrichtungen in anderen Forschungseinrichtungen.

Es standen zwei Messplätze zur Verfügung, an denen zeitgleich je sechs Aortenringe auf ihre Vasoreaktivität getestet werden konnten (Abb. 6).



Abb. 6: Messplatz für sechs Aortenringe zur Messung der Vasoreaktivität

Jede der zwölf Messvorrichtungen bestand aus einem doppelwandigen Glasgefäß, einem Kontraktionskraftaufnehmer und einem Feinpositionierelement.

Die doppelwandigen Glasgefäße bestanden aus einem inneren Hohlraum (Organbad mit eingehängtem Aortenring) und einem äußeren Hohlraum und waren stabil im Messplatzgerüst verankert.

Im Organbad wurde je ein Aortenring an zwei Platinhaken eingehängt, wobei der untere Platinhaken stabil an einer Öse am Boden eingehängt wurde und der obere Platinhaken mit einem Kontraktionskraftaufnehmer verbunden war (Abb. 7). Dieser maß die an den Ringen entwickelten Spannungswerte und war in einem Feinpositionierelement aufgehängt (Abb. 8). Über dieses konnte die Vorspannung der Aortenringe eingestellt werden.



Abb. 7: Doppelwandiges Glasgefäß mit eingehängtem Aortenring im Organbad



Abb. 8: Kontraktionskraftaufnehmer und Feinpositionierelement

Die erzeugten Spannungsänderungen wurden in einem Messwertfassungssystem verstärkt und einem Analog-Digital-Wandler zugeführt. Diese digitalen Ausgangswerte wurden am Computer weiterverarbeitet und über ein kommerzielles Auswerte- und Darstellungsprogramm (LabView, National Instruments) ausgewertet, welches die Messwerte in Echtzeit als kontinuierliche Kurven darstellte und gleichzeitig im Excel-Format speicherte. Die Relaxation wurde in den Graphen als prozentualer Anteil der durch Phenylephrin induzierten maximalen Vorkontraktion dargestellt.

Die im Organbad eingespannten Gefäßringe wurden mit 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung umspült und fortlaufend mit Carbogen begast. Dies diente der Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 und einer kontinuierlichen Durchmischung bei Zugabe von Substanzen in das Organbad.

Die Organbäder waren über Kunststoffschläuche mit einem erwärmten (37°C), Carbogen-begasten und mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Glasbehälter verbunden (Abb. 6). Die Organbäder konnten über einen Ablauf am Glasboden separat voneinander abgesaugt und wieder gefüllt werden. Dies erfolgte über das Öffnen der Wasserstrahlpumpe (absaugen der Krebs-Henseleit-Lösung) und Einschalten der Rollenpumpe (Zufuhr der Krebs-Henseleit-Lösung aus dem Glasgefäß).

Die doppelwandigen Organbäder wurden in ihrem äußeren Hohlraum mit 37°C warmen Wasser durchströmt. Dieser äußere Hohlraum war über weitere Kunststoffschläuche mit einem Thermostat mit Warmwasserbad verbunden, so dass in den Organbädern eine gleichbleibende Temperatur von 37°C gewährleistet war. Dabei waren die Organbäder mit der Krebs-Henseleit-Lösung durch das Glasgefäß vom Heizwasser getrennt.

3.2.3 Durchführung der Vasoreaktivitätsexperimente

Nachdem die Aortenringe wie zuvor beschrieben in das mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllte Organbad eingehängt wurden, konnte das Programm LabView gestartet werden und der Versuch beginnen.

Als erstes wurden die Aortenringe schrittweise auf 2 g vorgespannt und einmalig nachgespannt. Nach 5-minütiger Äquilibration folgte die Zugabe von 50 mM Kaliumchlorid, um die rezeptorunabhängige Kontraktionsfähigkeit zu testen. Nicht funktionsfähige Ringe wurden ausgetauscht. Nach Erreichen der maximalen Kontraktion erfolgte ein zweimaliger Auswaschvorgang mit Krebs-Henseleit-Lösung und eine 10-minütige Äquilibration. Danach konnten die Ringe erneut ausgewaschen und auf 2 g nachgespannt werden. Es folgte eine 45-minütige Phase der Äquilibration und falls erforderlich eine mehrmalige Nachjustierung, in der die Ringe ein stabiles Spannungsniveau bei 2 g erreichen. Während der Phase der Äquilibration erfolgte abhängig vom Experiment die Einmalgabe antioxidativer Enzyme in ausgewählte Organbäder (nachfolgend als Vorinkubation bezeichnet). Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene antioxidative Enzyme eingesetzt:

- Superoxiddismutase (500 Enzymeinheiten (U)/ml)
- Katalase (200 U/ml)
- Mangan(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP) (10 μ M).

SOD (Stammlösung 10 U/ μ L) und MnTMPyP (Stammlösung 0,1 M) wurden in destilliertem Wasser gelöst. MnTMPyP ist ein zellpermeables SOD-Mimetikum. Katalase (Stammlösung 100 U/ μ l) wurde in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) gelöst. Die Konzentrationen der einzelnen Enzyme wurden in Anlehnung an die Literatur gewählt. Alle Enzyme wurden aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Um zu überprüfen, ob die genannten antioxidativen Enzyme unspezifische Effekte auf die Vasodilatation in den Aortenringen haben, wurde in einer separaten Versuchsreihe der NO-abhängige Vasodilatator Acetylcholin (Ach, Stammlösung 100 μ M), gelöst in destilliertem Wasser, in den Konzentrationen von 10 nM bis 10 μ M eingesetzt. Über eine direkte Aktivierung des muskarinergen M3-Rezeptors an glatten Muskelzellen führt Acetylcholin zu intrazellulärer NO-Bildung mit nachfolgender Vasodilatation. Es löst somit unabhängig von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine Vasodilatation aus (Gericke et al. 2011).

Nach der Gabe des Antioxidans erfolgte die Vorkontraktion der Gefäßringe mit dem α_1 -Rezeptoragonist Phenylephrin (Stammlösung 100 μ M), gelöst in destilliertem Wasser, in

einer Konzentration von 50 nM. Nach etwa 30 Minuten wurde ein stabiles Kontraktionsniveau (*steady state*) erreicht.

Es erfolgte nun alle 30 Minuten die kumulative Gabe eines vom jeweiligen Experiment abhängigen Teepolyphenols (Vasodilators) in ausgewählte Organbäder.

Für die Untersuchungen wurden vier verschiedene Interventionen verwendet:

- EGCG (0,1 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM)
- TF3 (20 nM, 200 nM, 500 nM, 1 µM, 2 µM)
- grüner Tee (5 µl, 10 µl, 20 µl, 35 µl, 50 µl)
- schwarzer Tee (5 µl, 10 µl, 20 µl, 35 µl, 50 µl).

Zur Herstellung der EGCG-Stammlösung (10 mM) wurden 50 mg EGCG in 11 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Arbeitslösung (1 mM) wurde aus 100 µl Stammlösung und 900 µl destilliertem Wasser hergestellt. Die Stammlösung für TF3 (5 mM) wurde aus 43,4 mg TF3, gelöst in 10 ml destilliertem Wasser, angefertigt. Die Arbeitslösung für TF3 (200 µM) wurde aus 10 µl Stammlösung und 240 µl destilliertem Wasser hergestellt. Die Stammlösungen für EGCG und TF3 wurden in geeignete Mengen portioniert und bis zum Gebrauch im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Die Arbeitslösungen wurden vor jedem Experiment frisch zubereitet.

Die Herstellung von grünem und schwarzem Tee wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Mario Lorenz übernommen. 6 g grüner Tee wurde mit 500 ml kochendem Wasser übergossen und 3 min abgedeckt ziehen gelassen. Der schwarze Tee wurde in 500 ml kochendem Wasser mit 5 g Teeblättern für 3 min gebrüht. Die Bestimmung der Konzentrationen von EGCG bzw. TF3 durch HPLC erfolgte im Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Die TF3-Konzentration im schwarzen Tee betrug 11,1 µM (Lorenz et al 2009), die EGCG-Konzentration im grünen Tee 1031 µM. Somit wurde nach Zugabe von 50 µl grünem bzw. schwarzem Tee an den Aortenringen eine Endkonzentration von ca. 5 µM EGCG bzw. ca. 0,06 µM TF3 erreicht.

Die Konzentrationen des grünen und schwarzen Tees und der Teepolyphenole EGCG und TF3 wurden in Anlehnung an zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführte Vasorelaxationsexperimente gewählt. Um eine Aussage über die Effekte von EGCG und grünem Tee in physiologisch relevanten Konzentrationen treffen zu können, wurde der oben aufgeführte Konzentrationsbereich gewählt. In bereits publizierten Ergebnissen (Lorenz et al. 2004) konnte gezeigt werden, dass die dosisabhängige Vasodilatation bei einer EGCG-Konzentration von 1 µM beginnt. Nach jeder einzelnen EGCG-Gabe erfolgte eine initiale, reversible Kontraktion, gefolgt von einer anhaltenden Vasodilatation.

Mitgeführt wurden Kontrollringe (Ko), die mit Phenylephrin vorkontrahiert, aber nur mit der entsprechenden Menge Wasser behandelt wurden.

Das zeitliche Behandlungsschema der Vasodilatationsversuche ist in Abbildung 9 dargestellt.

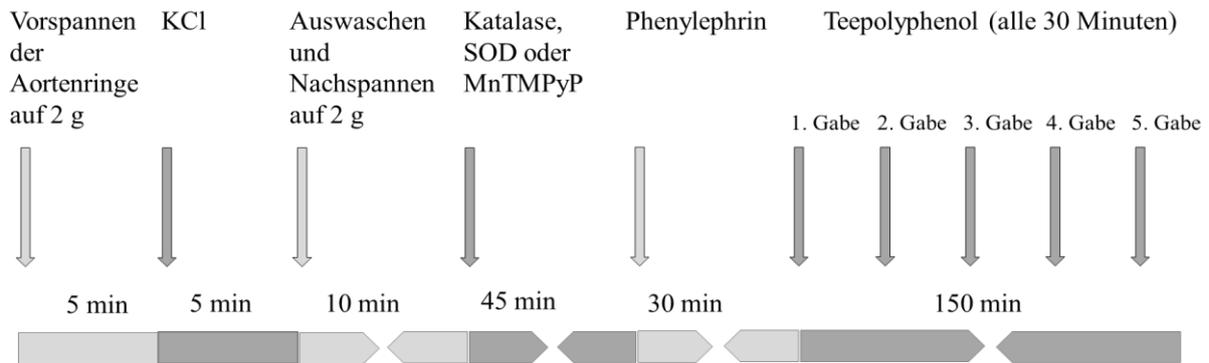


Abb. 9: Zeitliches Behandlungsschema der Vasoreaktivitätsexperimente

3.3 Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UHPLC)

Für die Bestimmung der Konzentrationen der Teepolyphenole in Abhängigkeit von verschiedenen antioxidativen Enzymen im Zeitverlauf wurde das Verfahren der Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie (UHPLC) eingesetzt. Die Untersuchungen wurden im Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Benno Zimmermann durchgeführt.

3.3.1 Prinzip

Die Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie/UHPLC ist eine Methode zur Analyse löslicher fester und flüssiger Substanzgemische. Mittels HPLC können Gemische in ihre Bestandteile zerlegt und ihre Komponenten qualitativ und quantitativ analysiert werden. Das Chromatogramm ist die grafische Darstellung des Trennungsvorgangs. Das Prinzip beruht auf zwei miteinander in Verbindung stehenden Phasen, einer stationären (Säulen gefüllt mit feinkörnigen Materialien) und einer mobilen (polare oder unpolare Lösungsmittel) Phase. Die UHPLC stellt eine Weiterentwicklung der HPLC dar, indem kürzere und dünnere Säulen verwendet werden und dadurch Materialverbrauch und Analysenzeit deutlich minimiert und eine höhere Trennleistung gewährleistet werden kann.

Die Messungen der Teesubstanzen EGCG und TF3 erfolgten mittels UHPLC mit einem Acquity UPLC System (Waters, Milford, MA, USA). Die Ausstattung bestand aus einer

Binärpumpe, einem Autosampler bei 10°C, einem Säulenofen bei 40°C, einem bei 190 bis 500 nm lesenden Diodenarray-Detektor und einem Acquity TQD Quadrupol-Massenspektrometer. Das Säulensystem bestand aus einer Waters BEH Phenylsäule (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) mit einer VanGuard Vorsäule bei einer Flussrate von 0,6 ml/min. Die Eluenten (mobile Phase) bestanden aus mobiler Phase A Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure und mobiler Phase B Wasser und 0,1 % Ameisensäure. Die Trennung erfolgte über folgende Gradienten: 0 min 6 % A, 1,5 min 13 % A, 3 min 20,5 % A, 4,5 min 42,5 % A, 4,8-5,5 min 100 % A, 5,8-6,3 min 6 % A. EGCG und TF3 wurden quantifiziert durch externe Kalibrierung mit reinem EGCG (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und TF3 (LGC Standards, Wesel, Deutschland) als Referenzstoffe. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 278 nm.

3.3.2 Durchführung

In Anlehnung an die wie zuvor in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Vasorelaxationsexperimente, wurden diese für die UHPLC-Konzentrationsmessungen leicht modifiziert:

Die Konzentrationsmessungen erfolgten repräsentativ an den beiden Teepolyphenolen als Einmalgabe in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen: EGCG (1 µM und 10 µM) und TF3 (0,5 µM und 2 µM). Die Einmalgaben von EGCG und TF3 erfolgten jeweils 30 Minuten nach der Phenylephrin-Gabe.

Um die zeitabhängige Konzentration von EGCG und TF3 nachweisen zu können, erfolgte eine Probenentnahme aus der Krebs-Henseleit-Lösung zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der jeweiligen Einmalgabe: nach 1, 15 und 30 Minuten.

Es wurden Proben zu je 1 ml aus den Glasgefäßen entnommen. Die entnommenen Proben wurden sofort in mit 37 % Salzsäure (11,6 M) gefüllte Eppendorfgefäße überführt. Dies bewirkt eine pH-Wert-Senkung auf pH 3,4 und verhindert somit den spontanen Zerfall der Teepolyphenole, da diese mit steigendem pH-Wert zunehmend instabil werden (Kapitel 2.3.3).

Die Probe wurde gemischt, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und danach bei -80°C gelagert. Die Übersendung der Proben an die Universität Bonn erfolgte auf Trockeneis.

Um einen Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Stabilität der Teepolyphenole im Krebs-Henseleit-Puffer unter den Versuchsbedingungen zu untersuchen, wurden die antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und MnTMPyP wie zuvor in Kapitel 3.2.3 beschrieben hinzugegeben.

3.4 Amplex Red Wasserstoffperoxid Test

Um die Bildung von Wasserstoffperoxid nachzuweisen, wurde im Aortenringmodell die Konzentration von H_2O_2 in der Krebs-Henseleit-Lösung gemessen. Dieser quantitative Nachweis der H_2O_2 -Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung erfolgte mit dem Amplex Red Wasserstoffperoxid Test von der Firma Invitrogen.

In den Experimenten wurden sowohl EGCG und TF3 als auch grüner und schwarzer Tee mit und ohne Antioxidantien auf ihre Fähigkeit zur Bildung von H_2O_2 untersucht.

3.4.1 Prinzip

In Gegenwart von Meerrettichperoxidase (HRP) reagiert das Amplex Red Reagenz (N-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazine; farblos, nicht fluoreszierend) in einer stöchiometrischen 1:1 Reaktion mit H_2O_2 zum rot-fluoreszierenden Oxidationsprodukt Resorufin. HRP katalysiert die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O (Abb. 10).

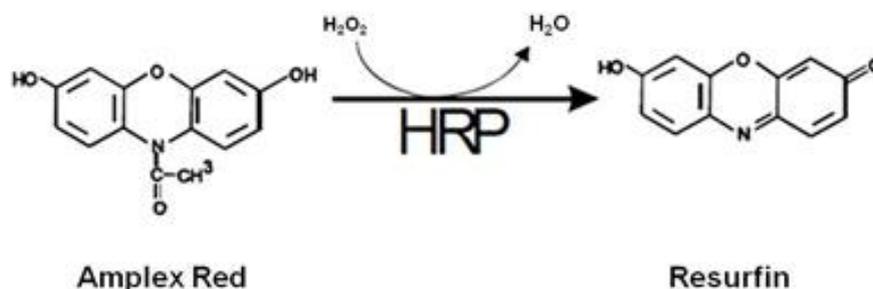


Abb. 10: Umwandlung von Amplex Red zum rot fluoreszierenden Resorufin unter Reduktion von H_2O_2 zu Wasser, mit freundlicher Genehmigung von BioTek Instruments.

3.4.2 Durchführung

Zum Nachweis einer konzentrationsabhängigen H_2O_2 -Bildung wurden die Teepolyphenole EGCG und TF3 als Einmalgabe in zwei unterschiedlichen Konzentrationen der Krebs-Henseleit-Lösung im Glasgefäß zugegeben: EGCG (1 μM und 10 μM) und TF3 (0,5 μM und 2 μM). Grüner Tee und schwarzer Tee wurden zu je 50 μl zugegeben. Die Einmalgaben erfolgten 30 Minuten nach der Phenylephrin-Gabe und dienten der besseren Detektion von H_2O_2 und zur Gewinnung absoluter H_2O_2 -Messwerte. Um die zeitabhängige Produktion von H_2O_2 nachweisen zu können, erfolgte eine Probenentnahme aus der Krebs-Henseleit-Lösung zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der jeweiligen Einmalgabe: nach 1, 15 und

30 Minuten. Es wurden Kontrollen mit Krebs-Henseleit-Lösung ohne jegliche Zugabe von Substanzen mitgeführt, deren Probenentnahme aus dem Glasgefäß ebenso nach 1, 15 und 30 Minuten erfolgte.

Das im Amplex Red Wasserstoffperoxid Test verwendete 3 %ige H_2O_2 wurde laut der Firma Invitrogen mit 200 ppm Acetanilid stabilisiert. Um einem schnellen Zerfall des in der Krebs-Henseleit-Lösung entstandenen H_2O_2 entgegenzuwirken, wurde die aus den Glasgefäßen entnommene Krebs-Henseleit-Lösung (je Probe 198 μl) mit 200 μM Acetanilid (je Probe 2 μl) stabilisiert. Die Überführung erfolgte in 1 ml Reaktionsgefäße. Die Probe wurde gemischt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Alle Reagenzien des Amplex Red Wasserstoffperoxid Tests wurden nach Herstellerangaben angefertigt. In je zwei Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Doppelwertbestimmung) wurden 50 μl der Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Als Standard dienten 50 μl H_2O_2 (3 %ig, stabilisiert) in einem Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 10 μM , als Leerwert wurde 50 μl 1x Reaktionspuffer verwendet. Um die Reaktion zu starten, wurden 50 μl der Arbeitslösung dazu gegeben.

Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln erfolgte im ELISA-Lesegerät die spektrophotometrische Messung der Absorption von Resorufin bei $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Die H_2O_2 -Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Standardkurve mithilfe der Software SoftMax Pro 5.4. (Version 5; MDS Analytical Technologies (US)) und wurde in μM dargestellt.

Dieser Assay ist hoch sensitiv, da die H_2O_2 -Konzentration mit einer Nachweisgrenze von 50 nM bestimmt werden kann.

3.5 Software und statistische Auswertung

Folgende Software wurde verwendet:

- Microsoft Office XP 2013 (Word, Excel, Power Point)
- Sigma Plot 8.0 zur Erstellung von Diagrammen
- SPSS Statistics (Version 22)

Die Darstellung der Vasoreaktivitätsexperimente erfolgte mit dem Datenanalyse- und Grafikprogramm Sigma Plot. Die Darstellung der Ergebnisse aus den UHPLC- und Amplex Red-Messreihen erfolgte mit Excel und Power Point. Die Abbildungen zeigen Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von der angegebenen Anzahl von Experimenten. Die angeführte Anzahl der Experimente entspricht den individuellen Aortenringen. Die einzelnen Experimente wurden jeweils mit mindestens drei Tieren durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Bei Vorliegen von statistischer Signifikanz wurden signifikante Unterschiede zwischen den Einzelgruppen durch einen Post-hoc Test (Tukey-Test) ermittelt, um für multiples Testen zu korrigieren. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Vasoreaktivitätsexperimente mit und ohne Zugabe von Antioxidantien

4.1.1 Acetylcholin

Die Aortendilatation erfolgte, wie in allen drei Abbildungen gezeigt, bei kumulativer Acetylcholin-Gabe von 10 nM bis 10 μ M im Zeitintervall von je 5 Minuten (Abb. 11). Als Kontrolle diente Wasser. Die Vasodilatation ist als prozentualer Anteil der durch die mit Phenylephrin induzierte Kontraktion der Aortenringe dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Acetylcholin auch unter Zugabe der Antioxidantien Katalase (200 U/ml), SOD (500 U/ml) und MnTMPyP (10 μ M) zu einer Vasodilatation führte. Das heißt, die eingesetzten Antioxidantien hatten keinen unspezifischen Effekt auf die Vasodilatation und neutralisierten spezifisch reaktive Sauerstoffspezies.

Das Antioxidans Katalase katalysiert intrazellulär die Reaktion von H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Es gab somit Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von H_2O_2 an der Vasodilatation durch Teepolyphenole.

SOD, ein extrazelluläres Antioxidans, katalysiert die Bildung von H_2O_2 und O_2 aus $\text{O}_2^{\cdot-}$.

MnTMPyP ist ein intrazelluläres SOD-Mimetikum (Auger et al. 2010). Es führt intrazellulär zur gleichen chemischen Reaktion wie SOD. Damit sollte überprüft werden, ob intrazellulär $\text{O}_2^{\cdot-}$ in die Vasodilatation durch Teepolyphenole involviert war.

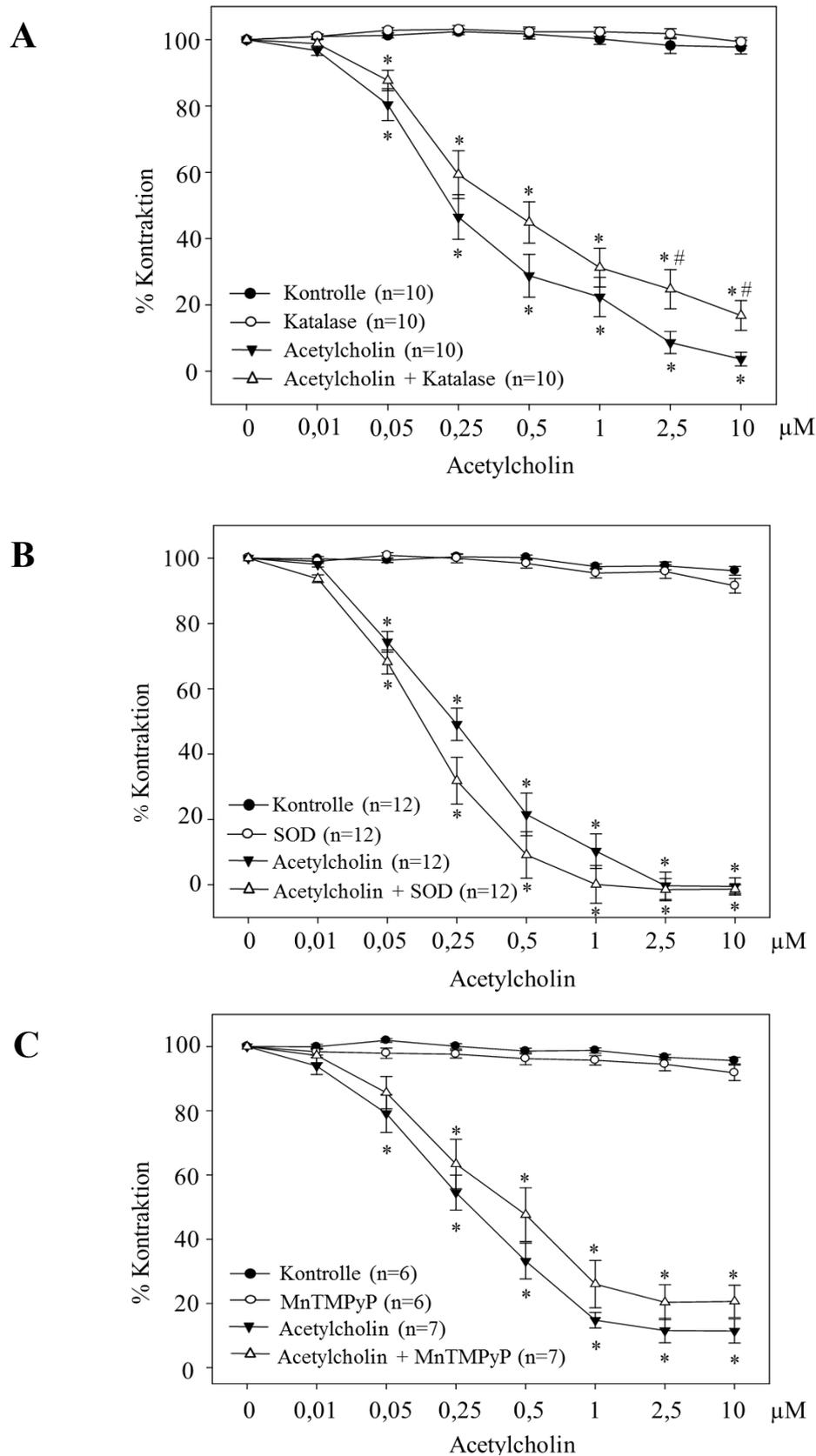


Abb. 11: Acetylcholin-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Antioxidantien. **A** Einfluss von Katalase (200 U/ml), **B** von SOD (500 U/ml), und **C** von MnTMPyP (10 µM) auf kumulative Acetylcholin-Gaben. Vorkontraktion mit Phenylephrin. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu Acetylcholin.

4.1.2 EGCG aus grünem Tee

Nach Prüfung der Spezifität der Antioxidantien mit Hilfe von Acetylcholin wurde die EGCG-induzierte Vasodilatation in Abhängigkeit der antioxidativen Enzyme Katalase, SOD und MnTMPyP untersucht. Es wurde geprüft, ob die Vorinkubation der Ringe mit einem Antioxidans zu einer Veränderung der endothelabhängigen Vasodilatation durch EGCG nach Vorkontraktion mit Phenylephrin führt.

Die Zugabe von Katalase sollte eine mögliche Beteiligung von H_2O_2 an der Vasodilatation durch EGCG untersuchen. Die Vorinkubation der Aortenringe mit 200 U/ml Katalase führte zu einer vollständigen Aufhebung der EGCG-induzierten, endothelabhängigen Vasorelaxation. Während die unbehandelten EGCG-Ringe bis auf $8,7 \pm 2,7$ % der Vorkontraktion relaxierten, zeigten die mit Katalase vorbehandelten Ringe im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Vasodilatation ($75,5 \pm 5,3$ %, Angaben beziehen sich auf die letzte EGCG-Gabe von $10 \mu M$, Mittelwerte \pm SEM). Ab einer EGCG-Konzentration von $2,5 \mu M$ erreichte EGCG einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle und zu EGCG + Katalase (Abb. 12).

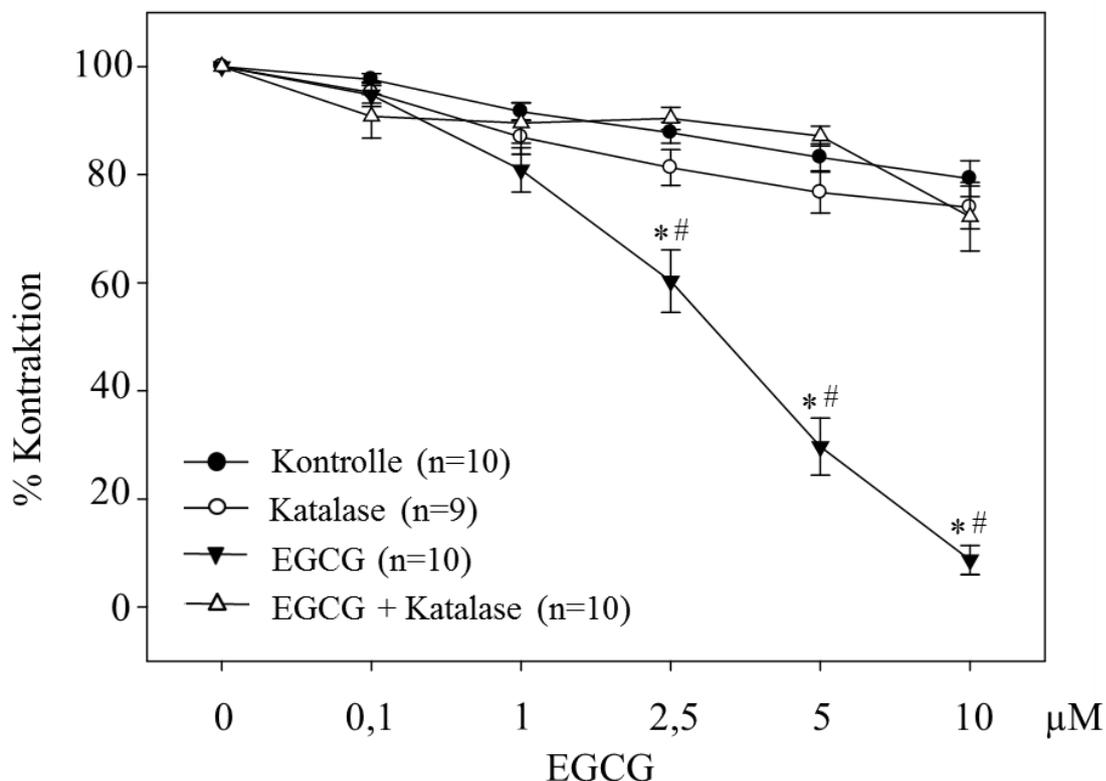


Abb. 12: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml). Signifikante Aufhebung der EGCG-induzierten Vasorelaxation nach Vorbehandlung mit Katalase. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu EGCG + Katalase.

Um zu überprüfen, ob die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ in die EGCG-induzierte Vasodilatation involviert ist, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von SOD untersucht.

Die Vorbehandlung der Ringe mit 500 U/ml SOD führte zu einer leichten Verstärkung der EGCG-induzierten, endothelabhängigen Vasorelaxation. Die Vasodilatation der mit SOD vorbehandelten EGCG-Ringe begann bei 1 μ M und blieb über die gesamte Messung stärker als ohne SOD. Während die mit SOD vorbehandelten Ringe bis auf $6,25 \pm 3,68$ % der Vorkontraktion dilatierten, erreichten die EGCG-Ringe ohne SOD nur $10,37 \pm 2,41$ % (Angaben beziehen sich auf die letzte EGCG-Gabe von 10 μ M). Ab 5 μ M erreichte EGCG statistische Signifikanz zur Kontrolle, während sie bei EGCG + SOD ab 1 μ M erreicht wurde. Sowohl alleinige SOD-Gabe, als auch EGCG + SOD führten zu einer leichten, nicht signifikanten Verstärkung der Vasorelaxation im Vergleich zur Kontrolle bzw. im Vergleich zu EGCG (Abb. 13).

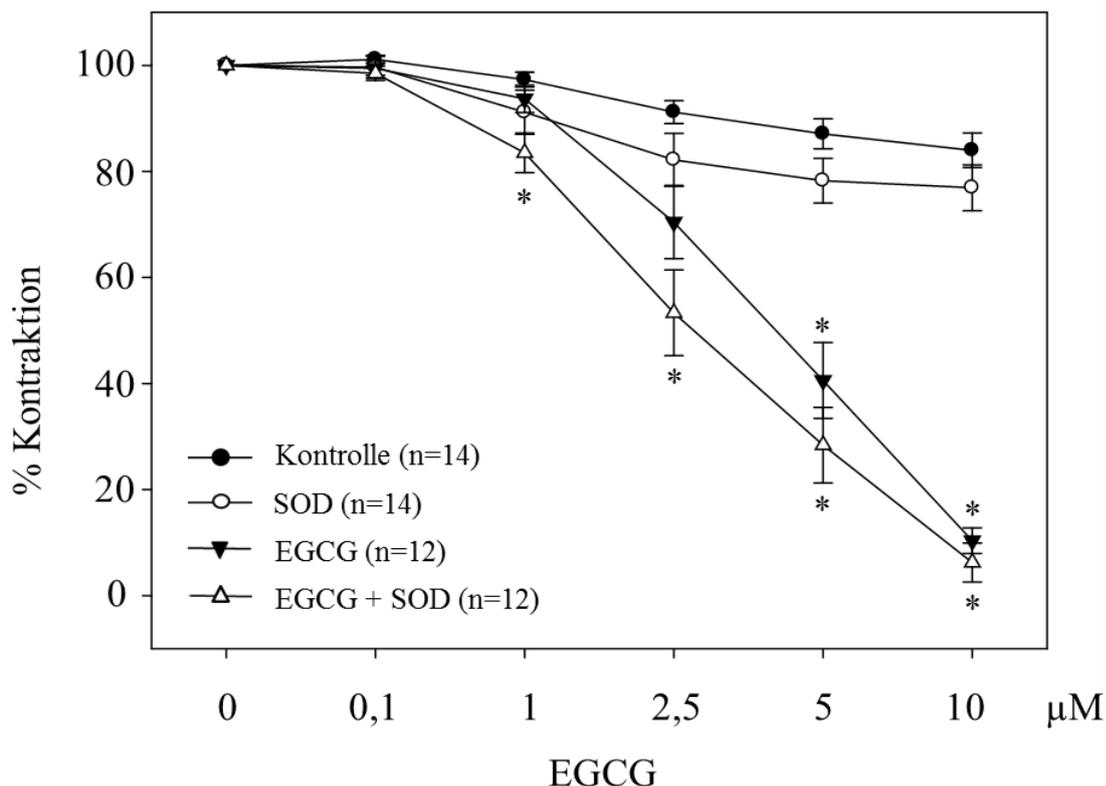


Abb. 13: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml). Zunahme der EGCG-induzierten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit SOD. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle.

Mit MnTMPyP, einem intrazellulären SOD-Mimetikum, sollte überprüft werden, ob intrazellulär O_2^- in die Vasodilatation durch EGCG involviert ist.

Die Vorbehandlung der Aortenringe mit $10 \mu\text{M}$ MnTMPyP führte zu einer vollständigen Aufhebung der EGCG-induzierten, endothelabhängigen Vasodilatation. Die Dilatation der mit MnTMPyP vorbehandelten EGCG-Ringe verlief nahezu identisch mit den Kontrollringen, sowie der Ringe, die nur mit MnTMPyP behandelt wurden. Die EGCG-Ringe dilatierten bis auf $8,1 \pm 1,7 \%$ der Vorkontraktion (Angabe bezieht sich auf die letzte EGCG-Gabe von $10 \mu\text{M}$). Ab einer EGCG-Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ erreichte EGCG eine statistische Signifikanz zur Kontrolle und zu EGCG + MnTMPyP (Abb. 14).

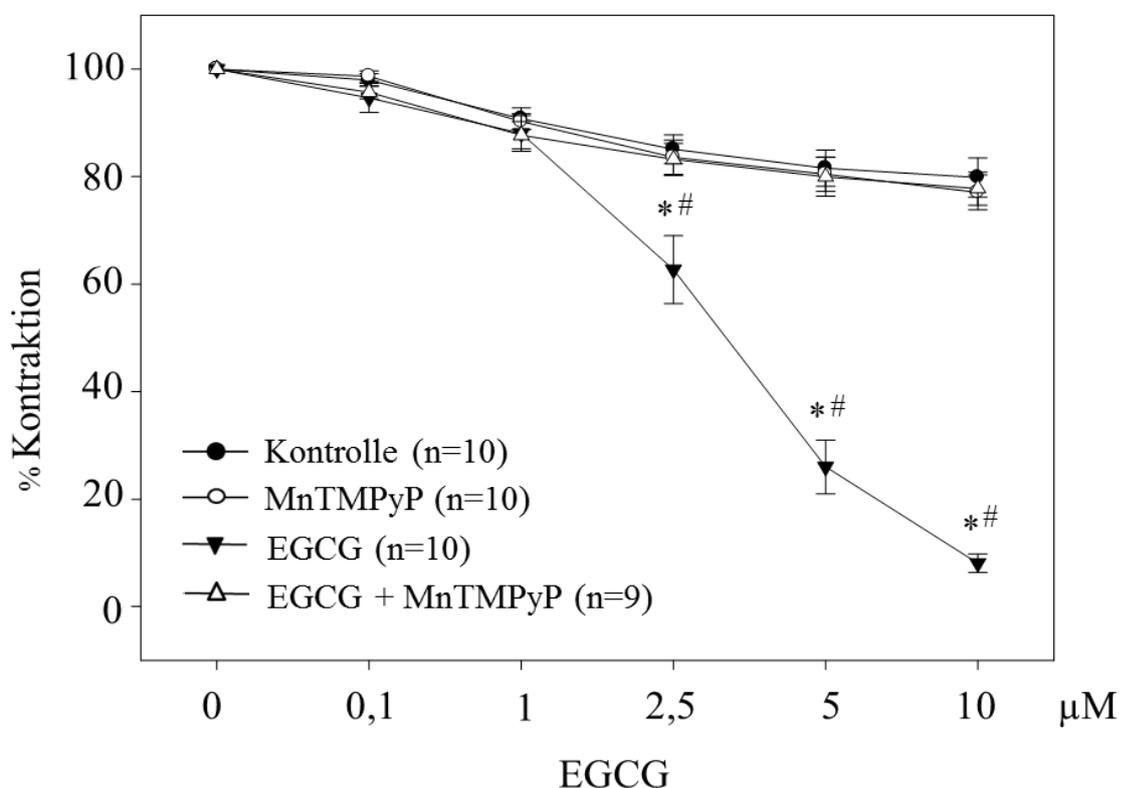


Abb. 14: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP ($10 \mu\text{M}$). Blockierung der EGCG-induzierten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit MnTMPyP. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu EGCG + MnTMPyP.

4.1.3 Grüner Tee

Da eine offensichtliche Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies beim isolierten Teepolyphenol EGCG aus grünem Tee gezeigt wurde, sollte in einem weiteren Schritt die Wirkung der verschiedenen Antioxidantien auf grünen Tee untersucht werden. Wie bei EGCG wurde auch bei grünem Tee die Vasodilatation in Abhängigkeit von den antioxidativen Enzymen Katalase, SOD und MnTMPyP untersucht.

Die Vorbehandlung der Ringe mit 200 U/ml Katalase verhinderte die durch grünen Tee induzierte, endothelabhängige Vasodilatation vollständig (Abb. 15).

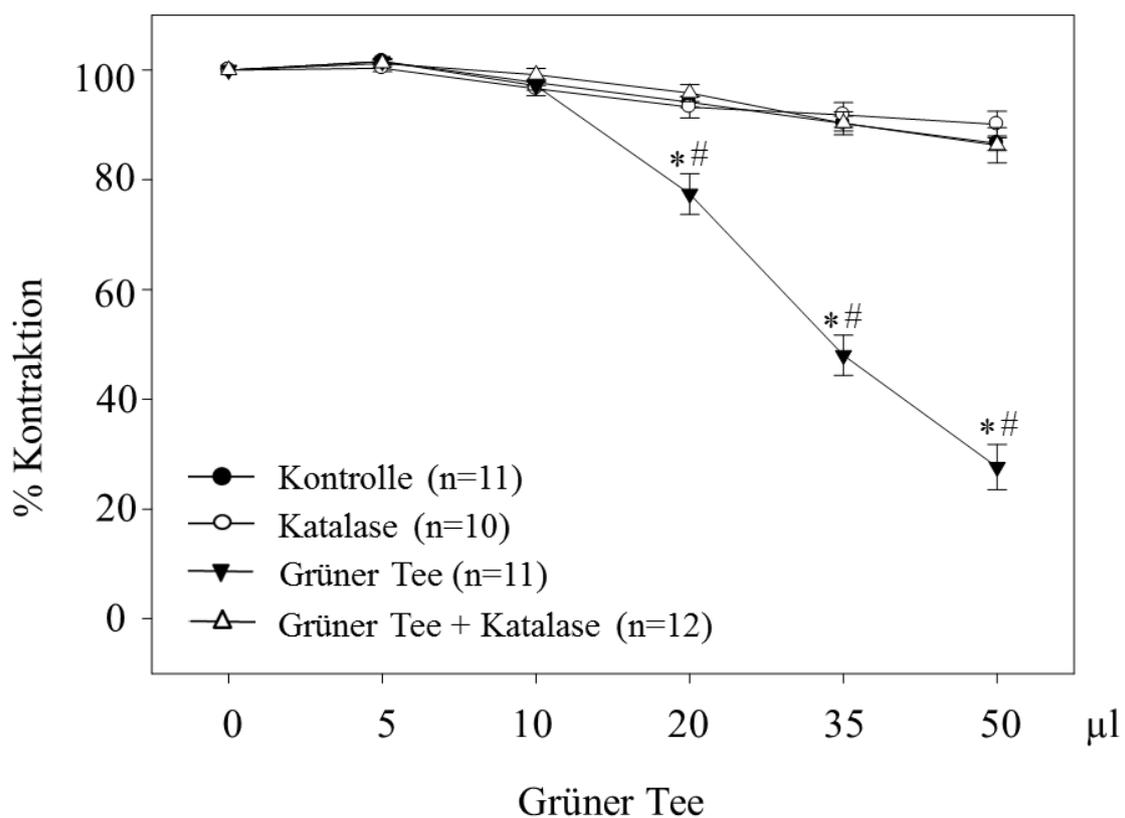


Abb. 15: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml). Vollständige Aufhebung der durch grünen Tee induzierten Vasodilatation nach Zugabe von Katalase. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu grünem Tee + Katalase.

Während die Aortenringe mit grünem Tee bis auf $27,7 \pm 4,1$ % der Vorkontraktion dilatierten, zeigten die Ringe mit grünem Tee + Katalase keine Relaxation ($86,3 \pm 3,2$ %) und verliefen auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontrollringe ($86,6 \pm 1,31$ % der Vorkontraktion, Angaben beziehen sich auf die letzte Grüntee-Gabe von 50 µl). Grüner Tee erreichte ab einer Konzentration von 20 µl statistische Signifikanz zur Kontrolle und zu grünem Tee + Katalase (Abb. 15).

In einem nächsten Schritt wurde mit SOD überprüft, ob extrazelluläres $O_2^{\cdot-}$ an der Vasodilatation durch grünen Tee beteiligt ist.

Die Vorbehandlung der Ringe mit 500 U/ml SOD verstärkte die durch grünen Tee induzierte, endothelabhängige Vasodilatation. Während die Aortenringe mit grünem Tee auf $12,9 \pm 3,8$ % der Vorkontraktion relaxierten, erreichten die mit SOD vorbehandelten Ringe $2,21 \pm 1,27$ % (Angaben beziehen sich auf die letzte Gabe von 50 μ l grünem Tee). Ab einer Konzentration von 20 μ l grünem Tee und ab einer Konzentration von 10 μ l grünem Tee + SOD bestand eine statistische Signifikanz zur Kontrolle (Abb. 16).

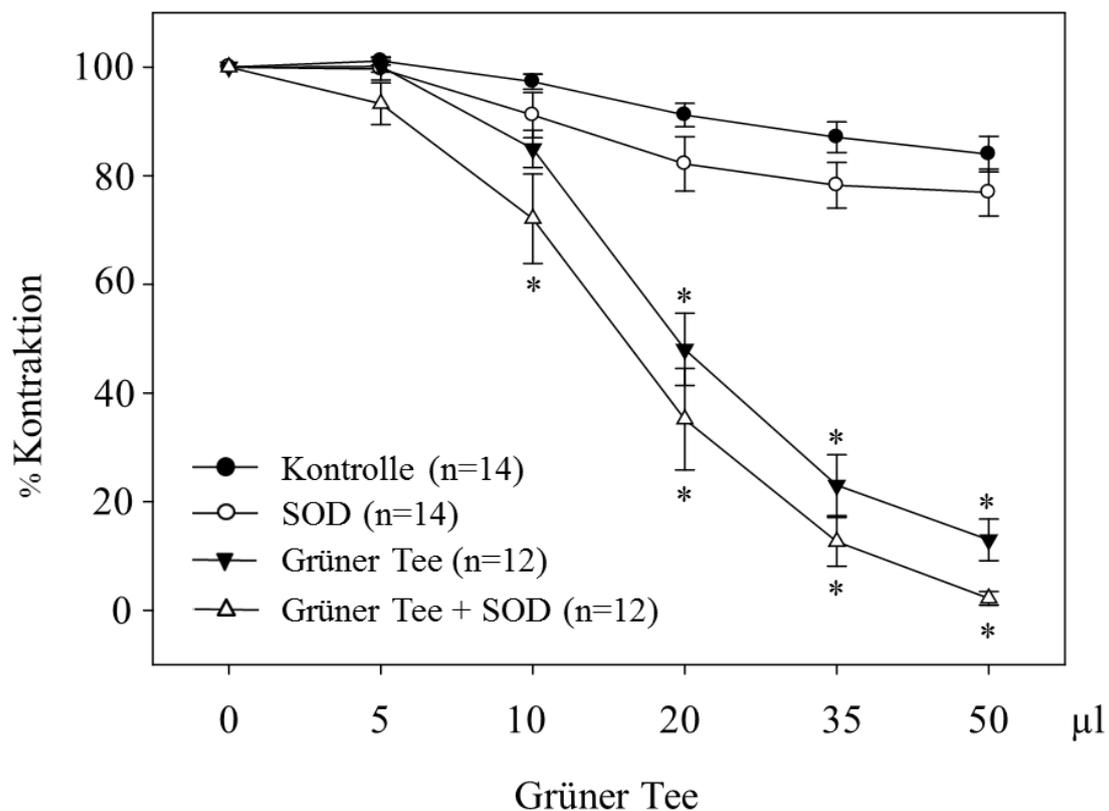


Abb. 16: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml). Leichte, dosisabhängige Verstärkung der durch grünen Tee induzierten Vasodilatation nach Zugabe von SOD. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle.

Des Weiteren erfolgte analog zu EGCG auch bei grünem Tee die Zugabe des Antioxidans MnTMPyP. Die Vorbehandlung der Aortenringe mit 10 μ M MnTMPyP führte zu einer vollständigen Inhibition der durch grünen Tee induzierten Vasodilatation. Die mit grünem Tee behandelten Aortenringe dilatierten bis auf $37,5 \pm 3,2$ % der Vorkontraktion, während die mit MnTMPyP sich auf $73,6 \pm 2,7$ % der Vorkontraktion und somit auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontrollringe befanden (Angaben beziehen sich auf die letzte Gabe von 50 μ l grünem Tee). Ab einer Konzentration von 20 μ l grüner Tee wurde eine statistische Signifikanz zur Kontrolle erreicht, ab 35 μ l auch zu grünem Tee + MnTMPyP (Abb. 17).

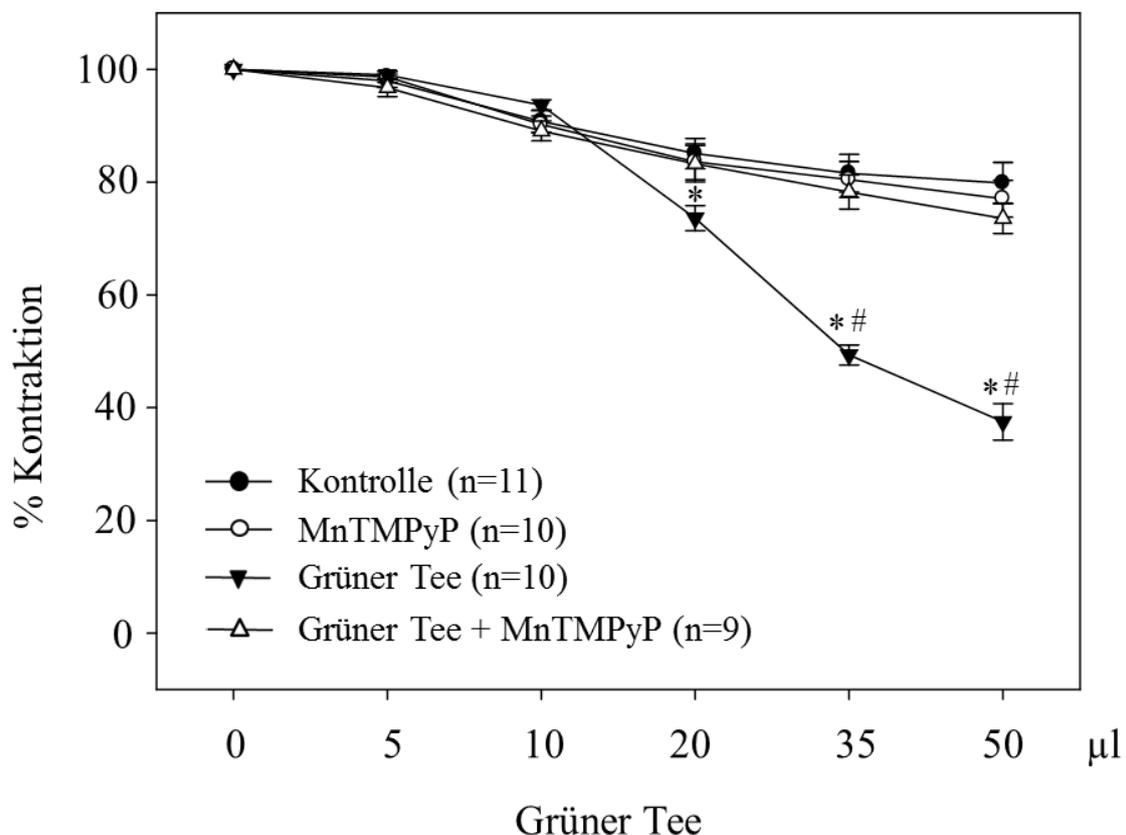


Abb. 17: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 μ M). Vollständige Blockierung der durch grünen Tee induzierten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit MnTMPyP. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu grünem Tee + MnTMPyP.

4.1.4 TF3 aus schwarzem Tee

Mit den zuvor verwendeten antioxidativen Enzymen Katalase (200 U/ml), SOD (500 U/ml) und MnTMPyP (10 μ M) wurde überprüft, ob es nach Zugabe der Antioxidantien zu einer Veränderung der endothelabhängigen Vasorelaxation im Vergleich zu den Kontrollringen ohne Antioxidans kommt.

Katalase führte zu einer vollständigen Aufhebung der TF3-induzierten, endothelabhängigen Vasodilatation. Die mit Katalase vorbehandelten TF3-Ringe zeigten keine Vasodilatation und verliefen auf dem gleichen Niveau wie die Kontrollen sowie die mit Katalase vorbehandelten Ringe. Die TF3-Ringe hingegen zeigten eine deutliche Vasodilatation und dilatierten bis auf $28,8 \pm 4,7$ % der Vorkontraktion (Angabe bezieht sich auf die letzte TF3-Gabe von 2 μ M). Ab einer TF3-Konzentration von 1 μ M wurde eine statistische Signifikanz zur Kontrolle und zu TF3 + Katalase erreicht (Abb. 18).

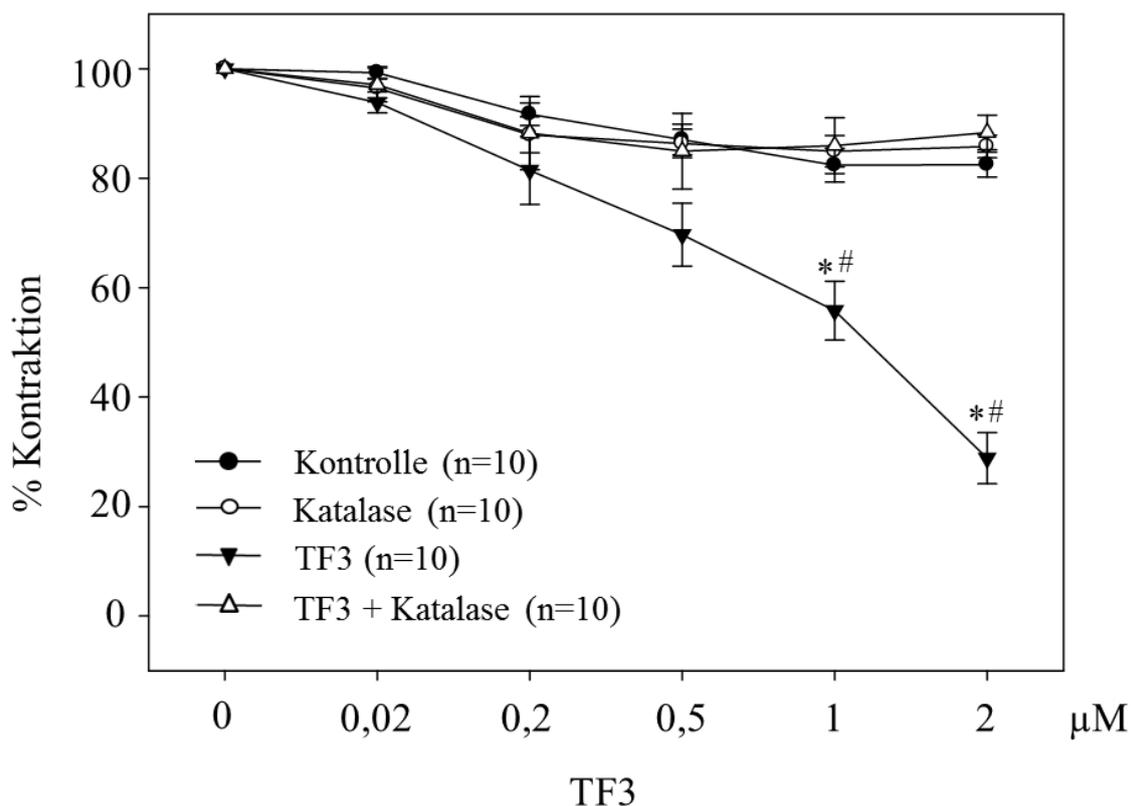


Abb. 18: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml). Vollständige Inhibition der TF3-vermittelten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit Katalase. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase.

Die Vorbehandlung der Aortenringe mit SOD (500 U/ml) verstärkte wie bei EGCG und grünem Tee auch bei TF3 die endothelabhängige Vasodilatation. Sowohl Aortenringe mit TF3, als auch die mit TF3 + SOD dilatierten bei 2 μM auf ein vergleichbares Niveau. Jedoch wiesen die TF3-Ringe mit SOD über den gesamten Zeitverlauf eine stärkere Vasodilatation auf als die nur mit TF3 behandelten Aortenringe. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Auch die alleinige SOD-Gabe führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer leichten, nicht signifikanten Verstärkung der Vasodilatation (Abb. 19).

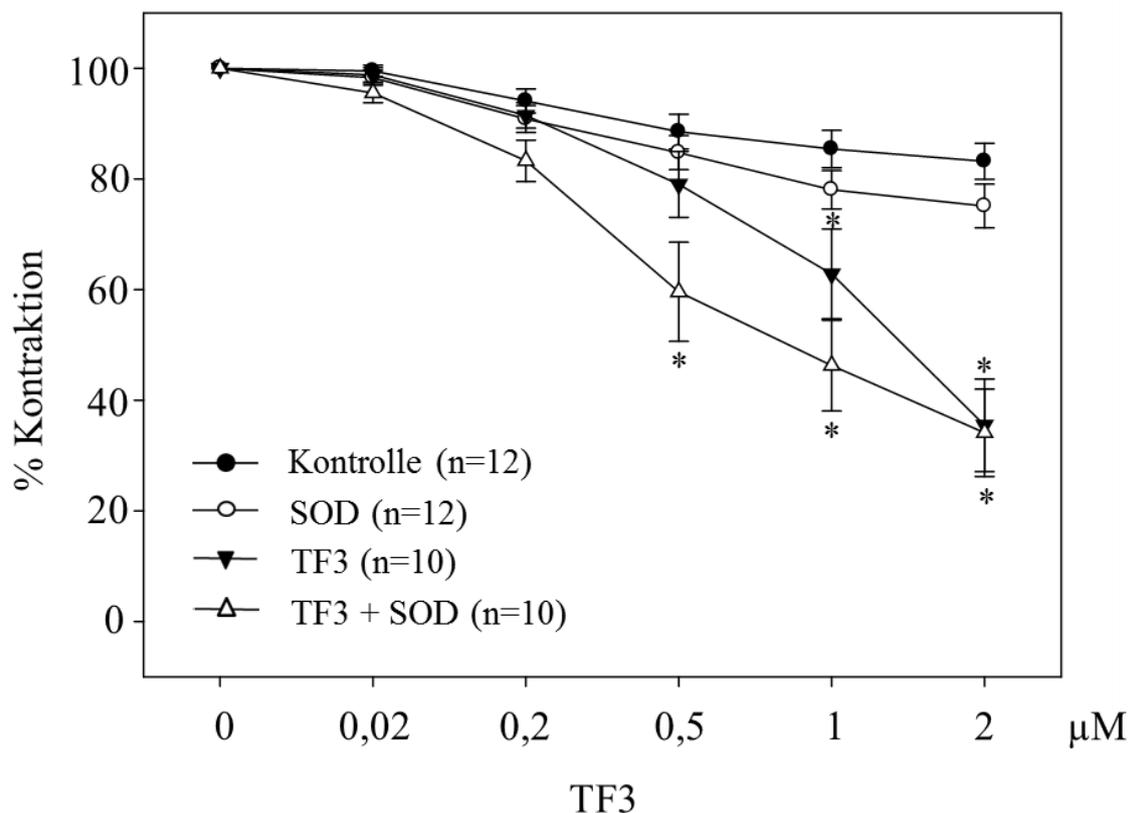


Abb. 19: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml). Partielle Zunahme der TF3 induzierten Vasodilatation nach Zugabe von SOD. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle.

Wie bei EGCG und grünem Tee kam es auch bei TF3 nach Vorbehandlung mit MnTMPyP (10 μM) zu einer vollständigen Blockierung der TF3-induzierten, endothelabhängigen Vasodilatation (Abb. 20).

Die mit MnTMPyP vorbehandelten TF3-Ringe erreichten bei der letzten Gabe $74,9 \pm 2,7$ % der Vorkontraktion, vergleichbar mit den MnTMPyP- ($74,8 \pm 2,5$ %) und den Kontrollringen ($84,4 \pm 3,3$ %). Aortenringe, die nur TF3 erhielten, dilatierten bis auf $31,7 \pm 2,9$ % der Vorkontraktion. TF3 erreichte eine statistische Signifikanz zur Kontrolle ab 500 nM und zu TF3 + MnTMPyP ab 1 μM (Abb. 20). Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass

auch beim Theaflavin TF3 die Vorbehandlung mit MnTMPyP zu einer vollständigen Aufhebung der Vasodilatation führt.

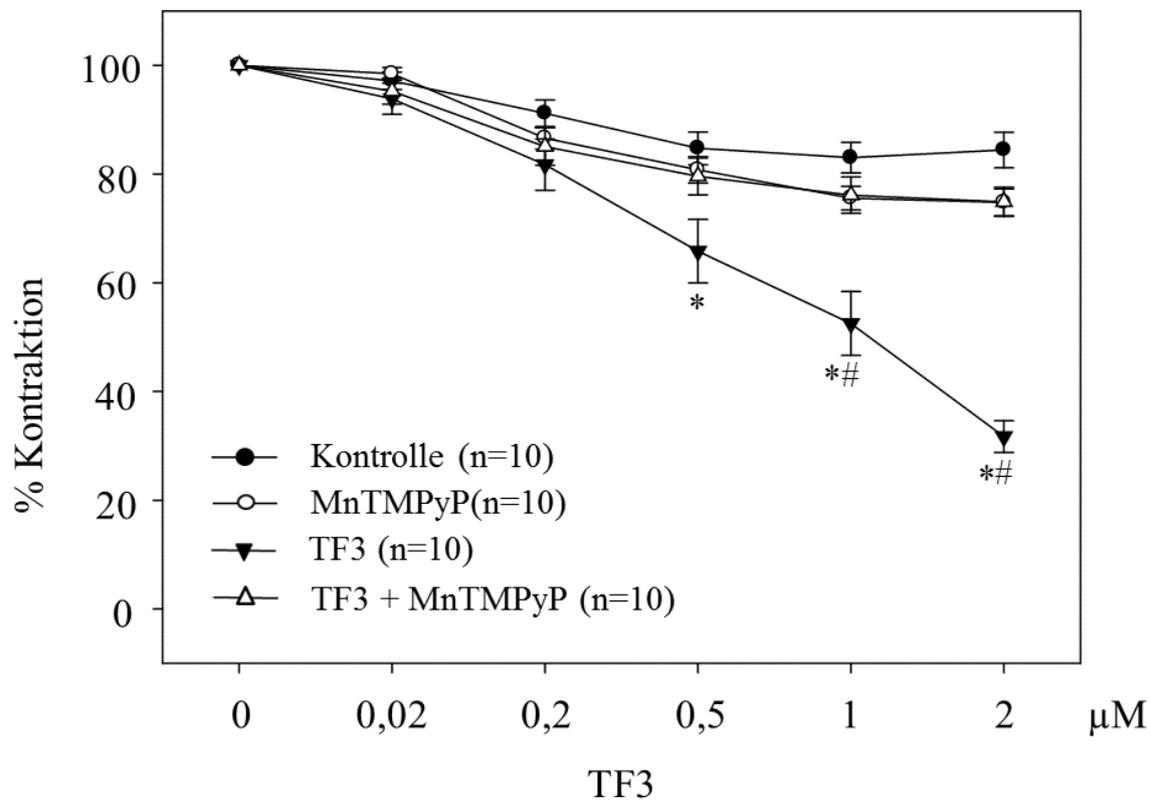


Abb. 20: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 µM). Vollständige Inhibition der TF3-induzierten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit MnTMPyP. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu TF3 + MnTMPyP.

4.1.5 Schwarzer Tee

Da eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Vasodilatation beim isolierten Teepolyphenol TF3 aus schwarzem Tee gezeigt wurde, sollte in einem weiteren Versuch geprüft werden, ob sie auch an der Vasodilatation durch schwarzen Tee beteiligt sind.

Aortenringe mit schwarzem Tee zeigten eine deutliche Vasodilatation von $24 \pm 5,8$ % der Vorkontraktion (Abb. 21). Die Vorinkubation der Aortenringe mit 200 U/ml Katalase ließ auch bei schwarzem Tee auf eine Beteiligung von H_2O_2 an der Vasodilatation schließen, denn diese wurde durch Katalase vollständig inhibiert ($76,3 \pm 4,3$ % der Vorkontraktion, Angaben beziehen sich auf die letzte Gabe von 50 µl schwarzem Tee). Ab einer Konzentration von 10 µl schwarzem Tee wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle erreicht, ab 20 µl auch zu schwarzem Tee + Katalase (Abb. 21).

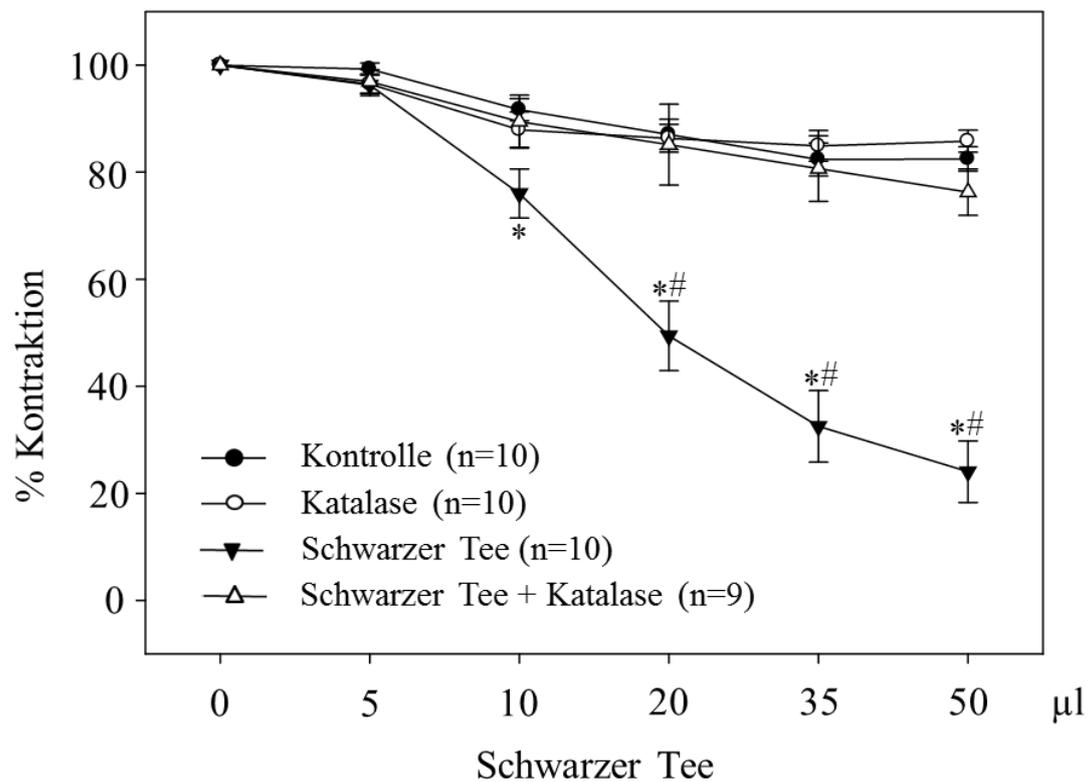


Abb. 21: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml). Die Vorinkubation der Aortenringe mit Katalase führte zu einer vollständigen Aufhebung der durch schwarzen Tee induzierten Vasodilatation. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu schwarzem Tee + Katalase.

Die Vorbehandlung der Aortenringe mit 500 U/ml SOD verstärkte die durch schwarzen Tee induzierte, endothelabhängige Vasodilatation deutlich ($3,3 \pm 4,9$ % der Vorkontraktion). Mit schwarzem Tee dilatierten die Aortenringe auf $34 \pm 5,6$ % (Angaben beziehen sich auf die letzte Gabe von 50 µl schwarzem Tee). Ab 35 µl schwarzem Tee war dieser Unterschied statistisch signifikant zu schwarzem Tee + SOD. Auch die alleinige SOD-Gabe führte im Vergleich zu den Kontrollringen zu einer leichten, nicht signifikanten Verstärkung der Vasodilatation (Abb. 22).

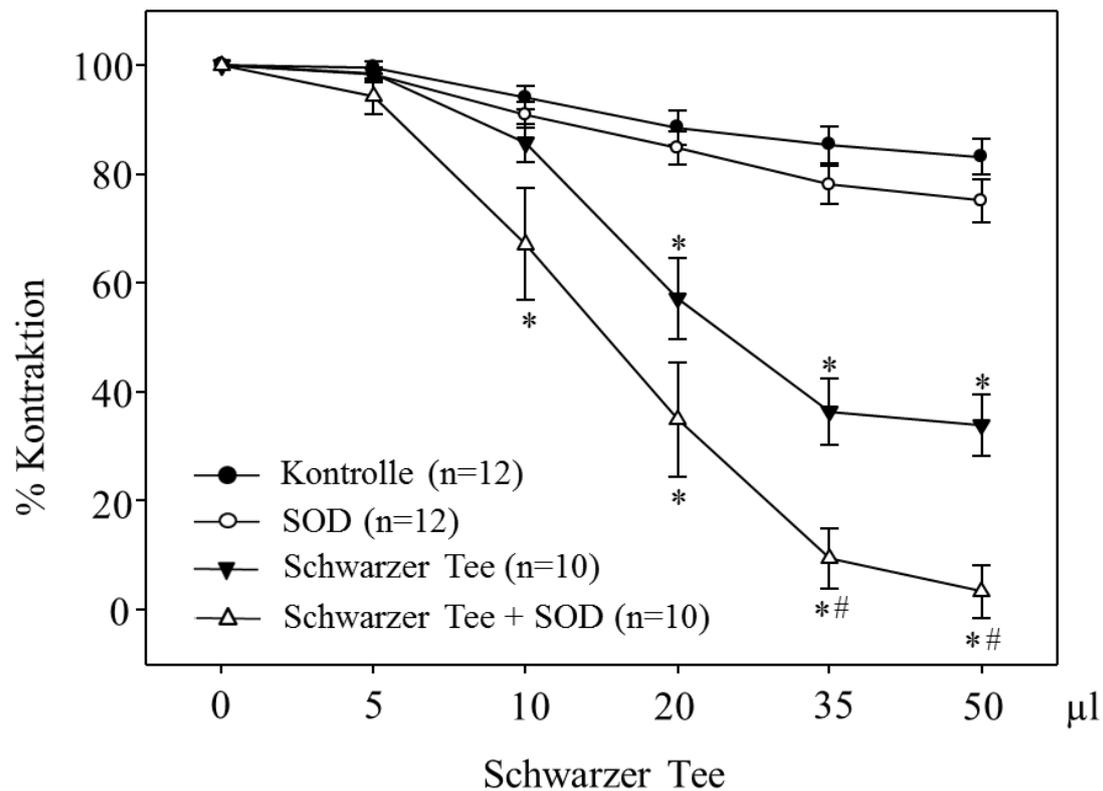


Abb. 22: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml). Signifikante, dosisabhängige Verstärkung der durch schwarzen Tee induzierten Vasodilatation nach Vorbehandlung mit SOD. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vgl. zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu schwarzem Tee.

Wie bei EGCG, grünem Tee und TF3 blockierte der intrazelluläre Superoxidationen-Radikalfänger MnTMPyP auch bei schwarzem Tee die Vasodilatation vollständig. Aortenringe mit schwarzem Tee + MnTMPyP erreichten bei der letzten Gabe $77,7 \pm 2,4$ % der Vorkontraktion, vergleichbar mit den MnTMPyP- und den Kontrollringen. Mit schwarzem Tee behandelte Aortenringe dilatierten bis auf $23,1 \pm 3,8$ % der Vorkontraktion (Angaben beziehen sich auf die letzte Gabe von 50 μ l schwarzem Tee). Ab einer Konzentration von 20 μ l schwarzem Tee bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle und zu schwarzem Tee + MnTMPyP (Abb. 23).

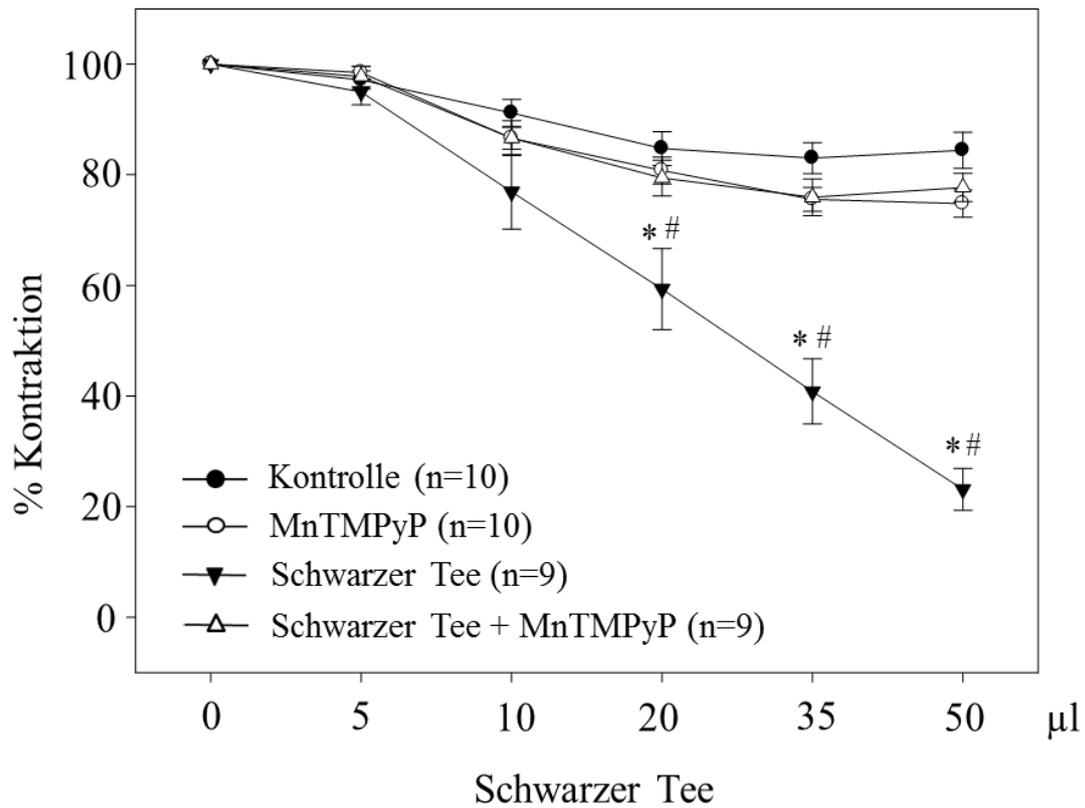


Abb. 23: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 µM). Die Vorbehandlung der Aortenringe mit MnTMPyP führte zu einer vollständigen Inhibition der durch schwarzen Tee induzierten Vasodilatation. Darstellung der Relaxation in % der Vorkontraktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus der angegebenen Anzahl von Versuchen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, # $p < 0,05$ im Vgl. zu schwarzem Tee + MnTMPyP.

4.2 Zeitkinetik der Substanzkonzentrationen im Krebs-Henseleit-Puffer

Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand der Vasoreaktivitätsexperimente der Einfluss verschiedener Antioxidantien auf die Vasodilatation bei Teepolyphenolen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Katalase und MnTMPyP die Vasodilatation bei allen Interventionen vollständig verhinderten, während sie durch SOD bei schwarzem Tee signifikant verstärkt wurde. Auch bei EGCG, TF3 und grünem Tee wurde die Vasodilatation durch SOD leicht verstärkt ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Ergebnisse könnten auf eine Autooxidation von Teepolyphenolen hinweisen. Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, wurde von anderen Arbeitsgruppen der Prozess der Autooxidation von EGCG in Zellkulturmedien postuliert, bei dessen Zerfall verschiedene Metaboliten entstanden.

Daher sollte im nächsten Teil der Versuche ein möglicher Zerfall von Teepolyphenolen untersucht werden. Mittels UHPLC erfolgte eine quantitative Bestimmung der EGCG- und TF3-Konzentrationen im Puffer in Abhängigkeit von der Zeit sowie nach Vorbehandlung mit verschiedenen Antioxidantien.

EGCG und TF3 wurden jeweils in zwei unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen eingesetzt, EGCG mit 1 μM und 10 μM und TF3 mit 0,5 μM und 2 μM . Eine Konzentrationsbestimmung in der Krebs-Henseleit-Lösung erfolgte 1, 15 und 30 Minuten nach der Einmalgabe der jeweiligen Substanzen.

4.2.1 EGCG aus grünem Tee

Zuerst erfolgte eine quantitative Bestimmung der EGCG-Konzentrationen mit Zugabe von 1 μM EGCG. Es wurden die Antioxidantien Katalase (200 U/ml) und SOD (500 U/ml) eingesetzt. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse nach der Einmalgabe von 1 μM EGCG dargestellt.

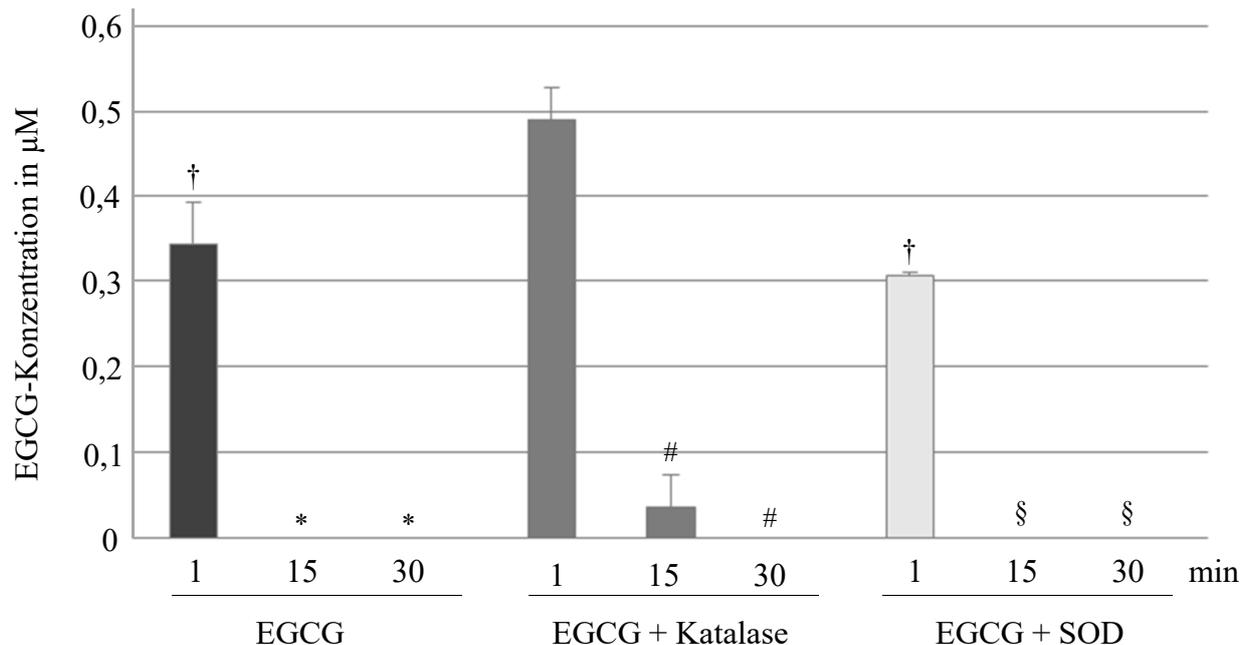


Abb. 24: EGCG-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung mit Zugabe von 1 μM EGCG und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Starke Abnahme der EGCG-Konzentration unabhängig von der Zugabe der Antioxidantien Katalase und SOD. Darstellung der EGCG-Konzentration in μM , Mittelwerte \pm SEM. $n=3$ für alle Versuche. * $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG nach 1 Minute, # $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + Katalase nach 1 Minute, § $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + SOD nach 1 Minute, † $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + Katalase nach 1 Minute.

In allen Behandlungsgruppen (EGCG, EGCG + Katalase, EGCG + SOD) nahmen die EGCG-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit stark ab und erreichten statistische Signifikanz zu ihren jeweiligen Werten nach 1 Minute. EGCG war in allen Gruppen nach spätestens 30 Minuten nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse illustrieren sehr deutlich den drastischen Zerfall von EGCG (Abb. 24).

Die maximale Vasodilatation in den Ringversuchen wurde bei einer EGCG-Konzentration von 10 μM erreicht. Daher wurde auch eine quantitative Bestimmung der EGCG-Konzentrationen im Krebs-Henseleit-Puffer bei einer Konzentration von 10 μM EGCG durchgeführt. Als Antioxidantien wurden Katalase (200 U/ml), SOD (500 U/ml) und MnTMPyP (10 μM) eingesetzt (Abb. 25).

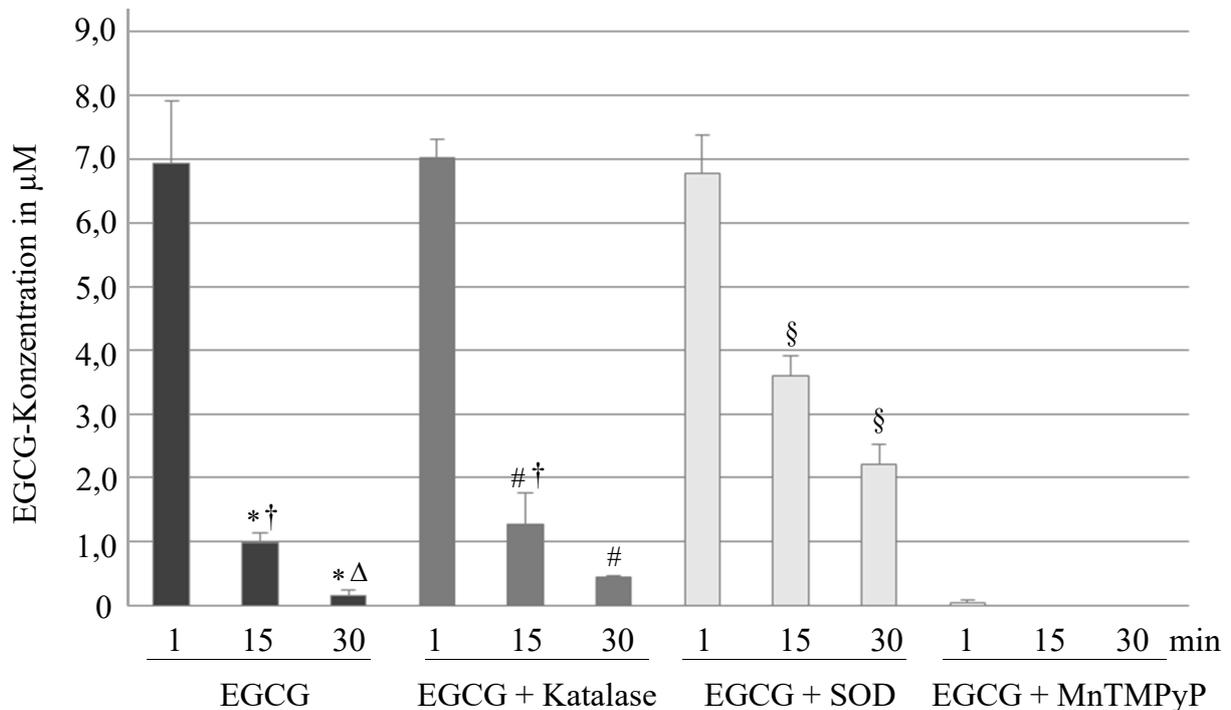


Abb. 25: EGCG-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 10 μM EGCG und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml), SOD (500 U/ml) bzw. MnTMPyP (10 μM). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Abnahme der EGCG-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit. Darstellung der EGCG-Konzentration in μM , Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG nach 1 Minute, # $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + Katalase nach 1 Minute, § $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + SOD nach 1 Minute, † $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + SOD nach 15 Minuten, Δ $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG + SOD nach 30 Minuten.

Bei 10 μM EGCG nahmen die EGCG-Konzentrationen in drei Behandlungsgruppen zeitabhängig und signifikant ab (EGCG, EGCG + Katalase, EGCG + SOD). Dabei bestand nach 15 Minuten für EGCG und EGCG + Katalase ein statistischer Unterschied zu EGCG + SOD (Abb. 25).

Nach vorheriger Katalasebehandlung entsprachen die EGCG-Konzentrationen in etwa denen ohne Antioxidans. Die Vorbehandlung mit SOD konnte EGCG im zeitlichen Verlauf deutlich stabilisieren und verlängerte dessen Halbwertszeit in der Krebs-Henseleit-Lösung. Für EGCG + MnTMPyP war nach 1 Minute nur noch ein Messwert kurz über der Nachweisgrenze detektierbar ($0,05 \pm 0,05 \mu\text{M}$). Danach war kein EGCG mehr nachweisbar (Abb. 25).

4.2.2 TF3 aus schwarzem Tee

Neben der Konzentrationsbestimmung des Teecatechins EGCG aus grünem Tee wurden die Untersuchungen auch auf das Theaflavin TF3 aus schwarzem Tee ausgedehnt. Da bislang keine Untersuchungen zur Zeitkinetik dieses Teeinhaltsstoffes im Krebs-Henseleit-Puffer vorlagen, sollte untersucht werden, ob auch TF3 einem möglichen Zerfall unterliegt. Wie zuvor bei EGCG wurde auch bei TF3 die Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit und den Antioxidantien Katalase und SOD untersucht. Auf den Einsatz des Antioxidans MnTMPyP wurde verzichtet. Es erscheint nicht als antioxidative Substanz bei Teepolyphenolen geeignet. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für die Einmalgabe von $0,5 \mu\text{M}$ TF3 zusammengefasst.

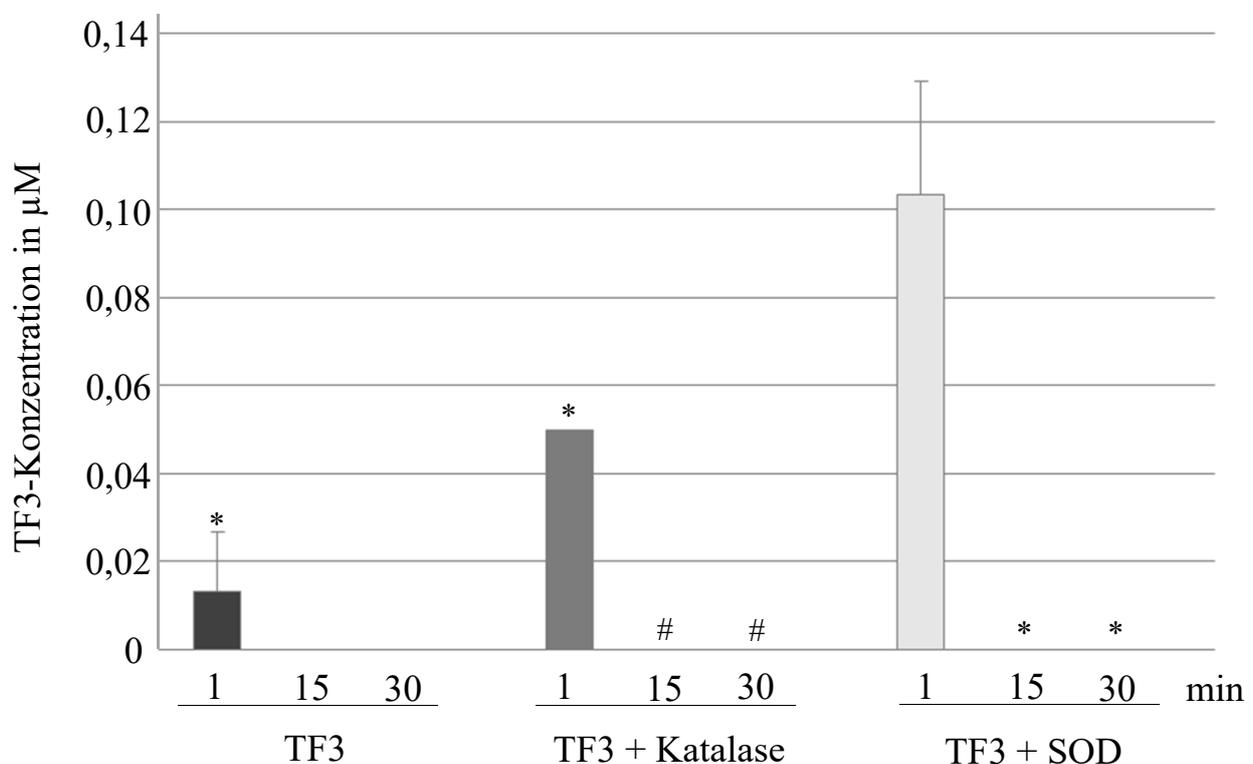


Abb. 26: TF3-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ TF3 und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml) nach 1, 15 und 30 Minuten. Zeitabhängige Abnahme der TF3-Konzentration bei allen Versuchen. Darstellung der TF3-Konzentration in μM , Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + SOD nach 1 Minute, # $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase nach 1 Minute.

In allen Behandlungsgruppen (TF3, TF3 + Katalase, TF3 + SOD) war nach 15 Minuten kein TF3 mehr nachweisbar (Abb. 26). Die Ergebnisse zeigen den schnellen Zerfall von TF3. Bei Vorbehandlung mit einem Antioxidans (Katalase bzw. SOD) war TF3 nach 1 Minute in einer höheren Konzentration nachweisbar als ohne Antioxidans. Dieser Effekt war bei

Vorbehandlung mit SOD stärker als mit Katalase. Bei Vorbehandlung mit SOD bestand bei 1 Minute ein statistischer Unterschied zu TF3 und zu TF3 + Katalase (Abb. 26).

Da bei der geringen Ausgangskonzentration von 0,5 μM TF3 schon nach 15 Minuten kein TF3 mehr nachweisbar war, wurde zur genaueren Untersuchung der Zeitkinetik eine höhere TF3-Ausgangskonzentration von 2 μM gewählt. Der Zeitverlauf des TF3-Zerfalls wurde bei dieser Konzentration deutlicher. Als antioxidative Enzyme wurden wie zuvor Katalase (200 U/ml) und SOD (500 U/ml) eingesetzt (Abb. 27).

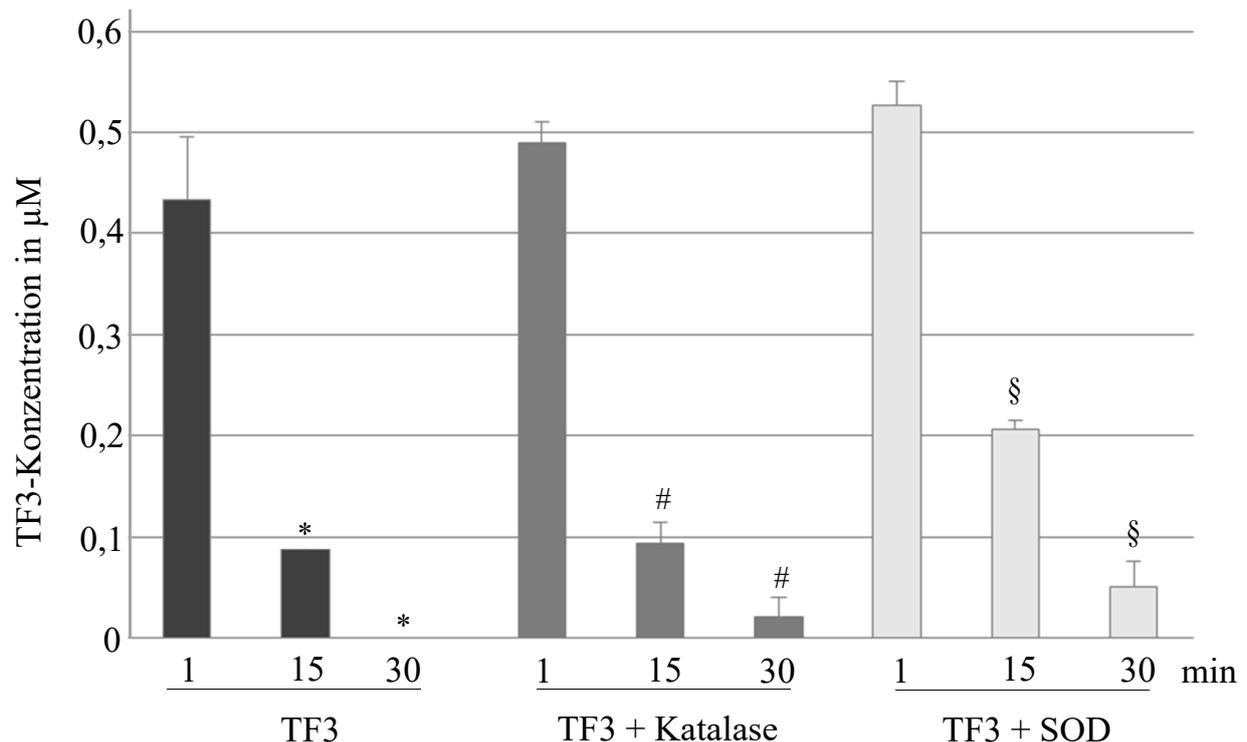


Abb. 27: TF3-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 2 μM TF3 und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Zeitabhängige Abnahme der TF3-Konzentration in allen Gruppen. Darstellung der TF3-Konzentration in μM , Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 nach 1 Minute, # $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase nach 1 Minute, § $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + SOD nach 1 Minute.

Bei 2 μM TF3 nahmen die Substanzkonzentrationen in allen Behandlungsgruppen (TF3, TF3 + Katalase, TF3 + SOD) signifikant ab, wobei ab 15 Minuten Signifikanz zu den jeweiligen Messwerten nach 1 Minute erreicht wurde. Bei alleiniger TF3-Gabe war nach 30 Minuten kein TF3 mehr nachweisbar. Vorbehandlung mit den Antioxidantien Katalase und SOD verlängerte die Halbwertszeit von TF3. Dieser Effekt war bei SOD deutlich stärker ausgeprägt als bei Katalase. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede (Abb. 27).

4.3 Bestimmung der H₂O₂-Konzentrationen im Krebs-Henseleit-Puffer

4.3.1 EGCG aus grünem Tee

Die H₂O₂-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach EGCG-Gabe von 1 und 10 µM wurden nach 1, 15 und 30 Minuten gemessen. Bei 1 µM EGCG wurde eine Verdopplung der H₂O₂-Konzentration von 1 Minute (0,06 ± 0,02 µM) zu 30 Minuten (0,12 ± 0,05 µM) festgestellt. 1 µM EGCG führte somit zeitabhängig zu einer vermehrten Bildung von H₂O₂ im Krebs-Henseleit-Puffer (Abb. 28). Die Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) verhinderte vollständig die Bildung von H₂O₂ über den gesamten Zeitverlauf, so dass die H₂O₂-Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. SOD reduzierte geringfügig die H₂O₂-Bildung im Vergleich mit EGCG. Zusätzlich wurden auch H₂O₂-Konzentrationen ohne Zugabe einer Substanz gemessen (Kontrollen). Die Ergebnisse zeigen, dass auch in der reinen Krebs-Henseleit-Lösung H₂O₂ gebildet wurde. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Bei 15 und 30 Minuten waren EGCG und EGCG + SOD signifikant unterschiedlich zu EGCG + Katalase (Abb. 28).

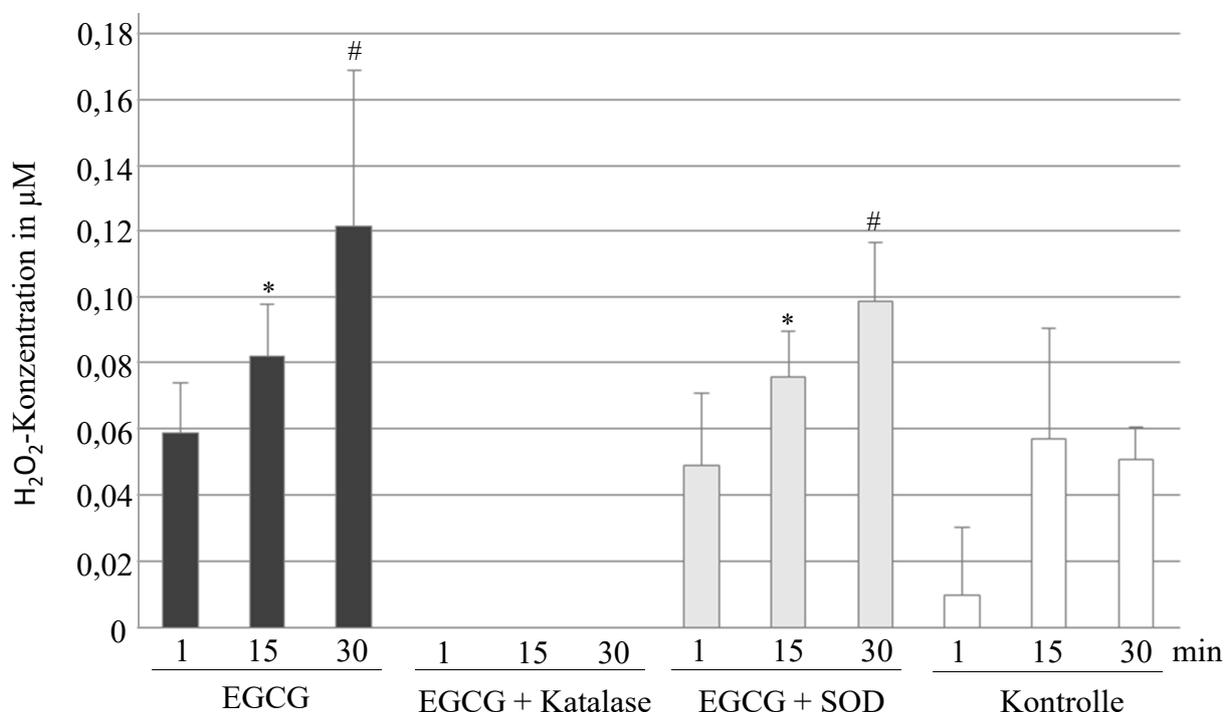


Abb. 28: H₂O₂-Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 1 µM EGCG mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Die Messung erfolgte nach 1, 15 und 30 Minuten. Zunahme der H₂O₂-Konzentration nach Zugabe von EGCG und von EGCG + SOD. Darstellung der H₂O₂-Konzentration in µM. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, n=4. *p<0,05 im Vgl. zu EGCG + Katalase nach 15 Minuten, #p<0,05 im Vgl. zu EGCG + Katalase nach 30 Minuten.

Das Ausmaß der Bildung von H_2O_2 in den verschiedenen Behandlungsgruppen wurde bei einer EGCG-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wesentlich deutlicher. EGCG führte bereits nach einer Minute zu einer starken H_2O_2 -Bildung ($0,90 \pm 0,15 \mu\text{M}$), mit einem Maximum nach 30 Minuten ($1,15 \pm 0,24 \mu\text{M}$) (Abb. 29).

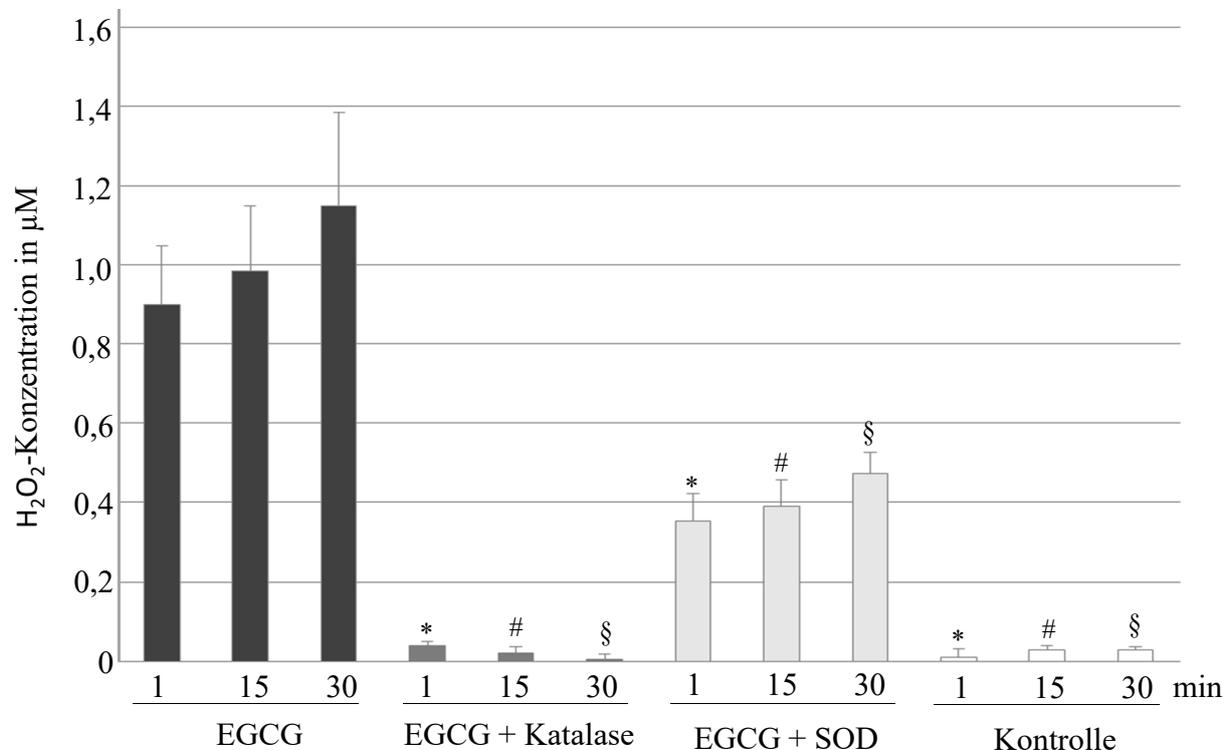


Abb. 29: H_2O_2 -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ EGCG mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Die Messungen erfolgten nach 1, 15 und 30 Minuten. Darstellung der H_2O_2 -Konzentration in μM , Mittelwerte \pm SEM, $n=4$. * $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG nach 1 Minute, # $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG nach 15 Minuten, § $p<0,05$ im Vgl. zu EGCG nach 30 Minuten.

Nach Vorbehandlung mit Katalase wurden über den gesamten Zeitverlauf nur sehr geringe Mengen an H_2O_2 gebildet. Nach einer Minute betrug die H_2O_2 -Konzentration $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ gegenüber EGCG mit $0,90 \pm 0,15 \mu\text{M}$ und sank nach 30 Minuten auf $0,01 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Die H_2O_2 -Produktion wurde auch durch SOD inhibiert, jedoch deutlich geringer als bei Katalase. Die maximale H_2O_2 -Konzentration nach 30 Minuten betrug bei Vorbehandlung mit SOD $0,47 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Abb. 29). Die gemessenen H_2O_2 -Werte in den Kontrollen entsprachen in etwa denen bei den Versuchen mit $1 \mu\text{M}$ EGCG (Abb. 28 und 29). Innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf. Jedoch erreichte die EGCG-induzierte H_2O_2 -Konzentration über alle Zeitpunkte statistische Signifikanz zu den jeweiligen Kontrollen, und zu EGCG + SOD und EGCG + Katalase (Abb. 29).

4.3.2 Grüner Tee

Bei grünem Tee erreichte die H_2O_2 -Konzentration im Krebs-Henseleit-Puffer ihr Maximum nach 1 Minute ($1,13 \pm 0,36 \mu\text{M}$) und blieb über den gesamten Zeitverlauf auf einem ähnlich hohem Niveau (Abb. 30). Katalase inhibierte die Entstehung von H_2O_2 , so dass nach 1 Minute die H_2O_2 -Konzentration ca. 20-fach niedriger war als bei grünem Tee ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ versus $1,13 \pm 0,36 \mu\text{M}$). Im Zeitverlauf stieg auch nach Vorbehandlung mit Katalase die H_2O_2 -Konzentration leicht an. SOD verminderte die H_2O_2 -Bildung durch grünen Tee deutlich und erreichte das Maximum nach 30 Minuten ($0,41 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf. Die H_2O_2 -Konzentration durch grünen Tee erreichte über den gesamten Zeitraum statistische Signifikanz zur jeweiligen Kontrolle und zu grünem Tee + Katalase, sowie bei 1 und 30 Minuten auch zu grünem Tee + SOD (Abb. 30). Insgesamt waren die H_2O_2 -Konzentrationen nach grünem Tee in etwa vergleichbar mit $10 \mu\text{M}$ EGCG (Abb. 29 und 30).

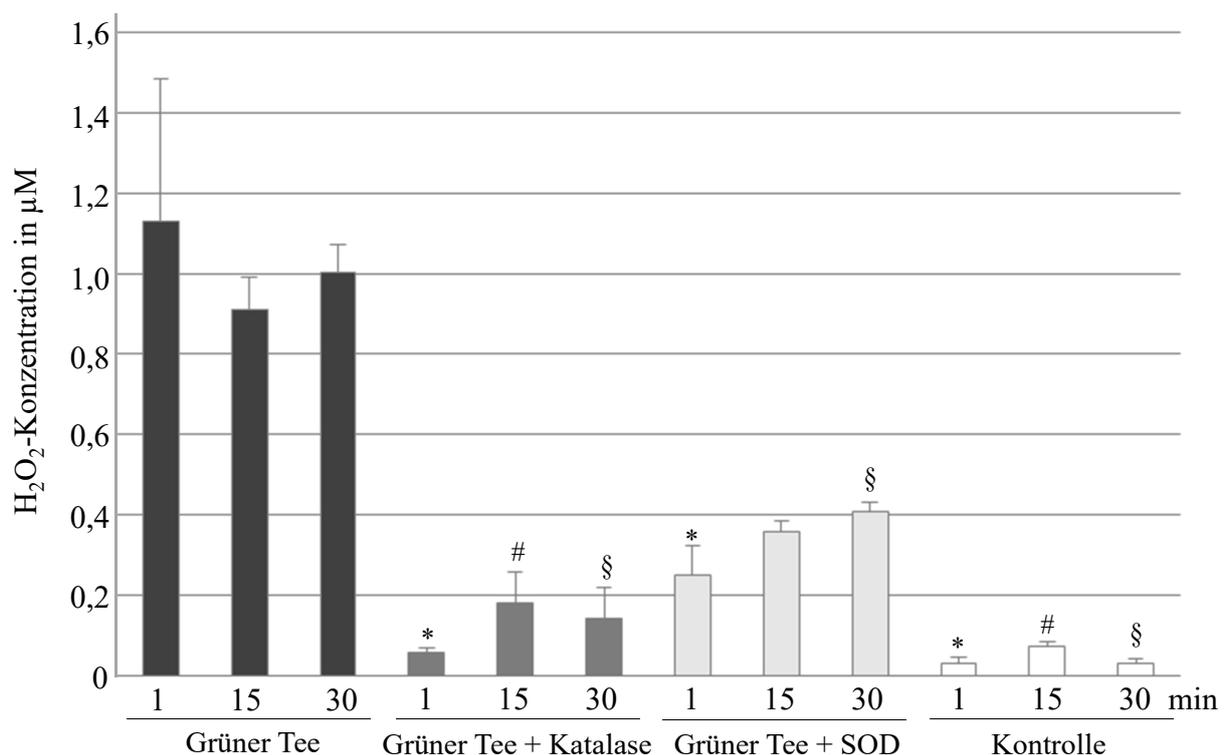


Abb. 30: H_2O_2 -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von $50 \mu\text{l}$ grünem Tee mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Darstellung der H_2O_2 -Konzentration in μM . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=4$. * $p < 0,05$ im Vgl. zu grünem Tee nach 1 Minute, # $p < 0,05$ im Vgl. zu grünem Tee nach 15 Minuten, § $p < 0,05$ im Vgl. zu grünem Tee nach 30 Minuten.

4.3.3 TF3 aus schwarzem Tee

Die H_2O_2 -Bestimmungen durch EGCG und grünen Tee wurden auch auf das Theaflavin TF3 aus schwarzem Tee ausgedehnt. TF3 wurde in den Konzentrationen 0,5 und 2 μM eingesetzt (entspricht den Vasorelaxationsexperimenten) und die H_2O_2 -Bildung in der Krebs-Henseleit-Lösung nach 1, 15 und 30 Minuten gemessen.

0,5 μM TF3 in der Krebs-Henseleit-Lösung führte zu einer vermehrten H_2O_2 -Bildung im Zeitverlauf und zur Kontrolle und erreichte bei 30 Minuten ein Maximum von $0,19 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (Abb. 31). Die durch 0,5 μM TF3 gebildete maximale H_2O_2 -Menge war dabei höher als bei 1 μM EGCG (Abb. 28 und 31).

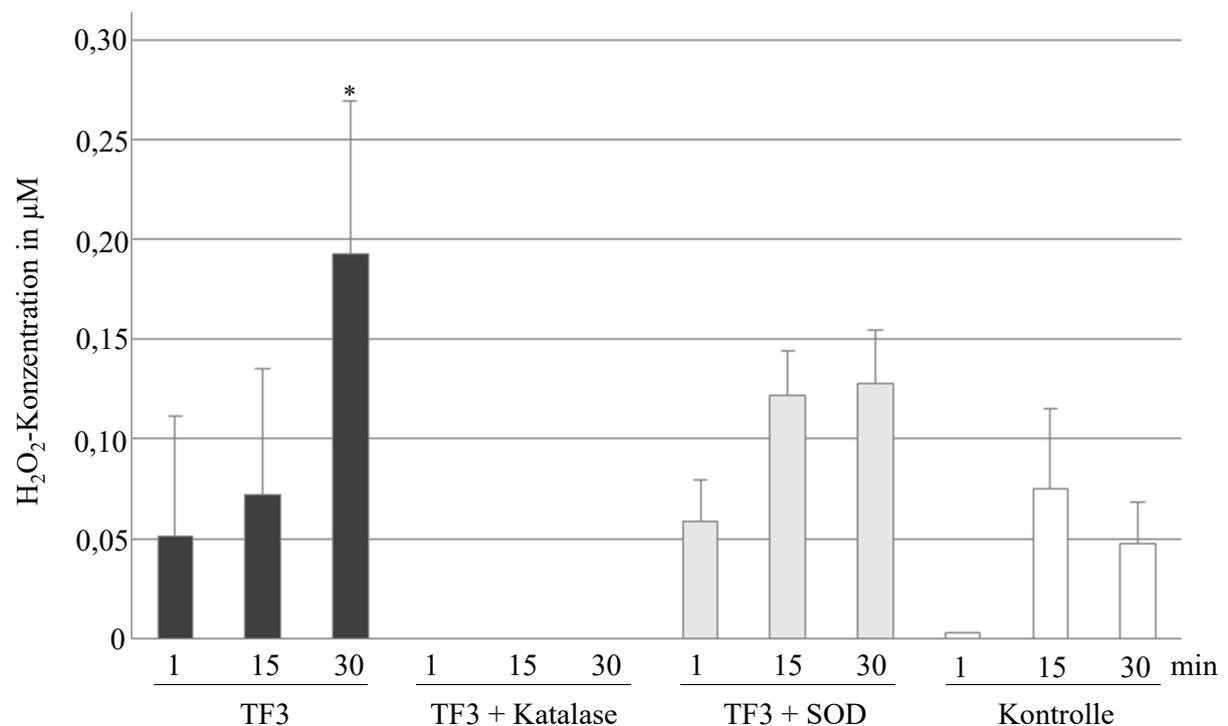


Abb. 31: H_2O_2 -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 0,5 μM TF3 mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Zeitabhängige Zunahme der H_2O_2 -Konzentrationen bei TF3 und TF3 + SOD. Darstellung der H_2O_2 -Konzentration in μM . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase nach 30 Minuten.

Katalase (200 U/ml) verhinderte über den gesamten Zeitverlauf vollständig die Bildung von H_2O_2 , so dass es unter der Nachweisgrenze lag. SOD führte im Zeitverlauf zu einem Anstieg der H_2O_2 -Bildung durch TF3 mit $0,13 \pm 0,03 \mu\text{M}$ H_2O_2 nach 30 Minuten. Ein statistisch signifikanter Unterschied von 0,5 μM TF3 zu den Kontrollen wurde nicht beobachtet. Bei 30 Minuten erreichte die durch TF3 produzierte Menge an H_2O_2 einen signifikanten Unterschied zu TF3 + Katalase (Abb. 31).

In den Vasoreaktivitätsexperimenten wurde die maximale Vasodilatation bei einer TF3-Konzentration von 2 μM erreicht. Daher wurde auch eine quantitative Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration im Krebs-Henseleit-Puffer mit 2 μM TF3 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

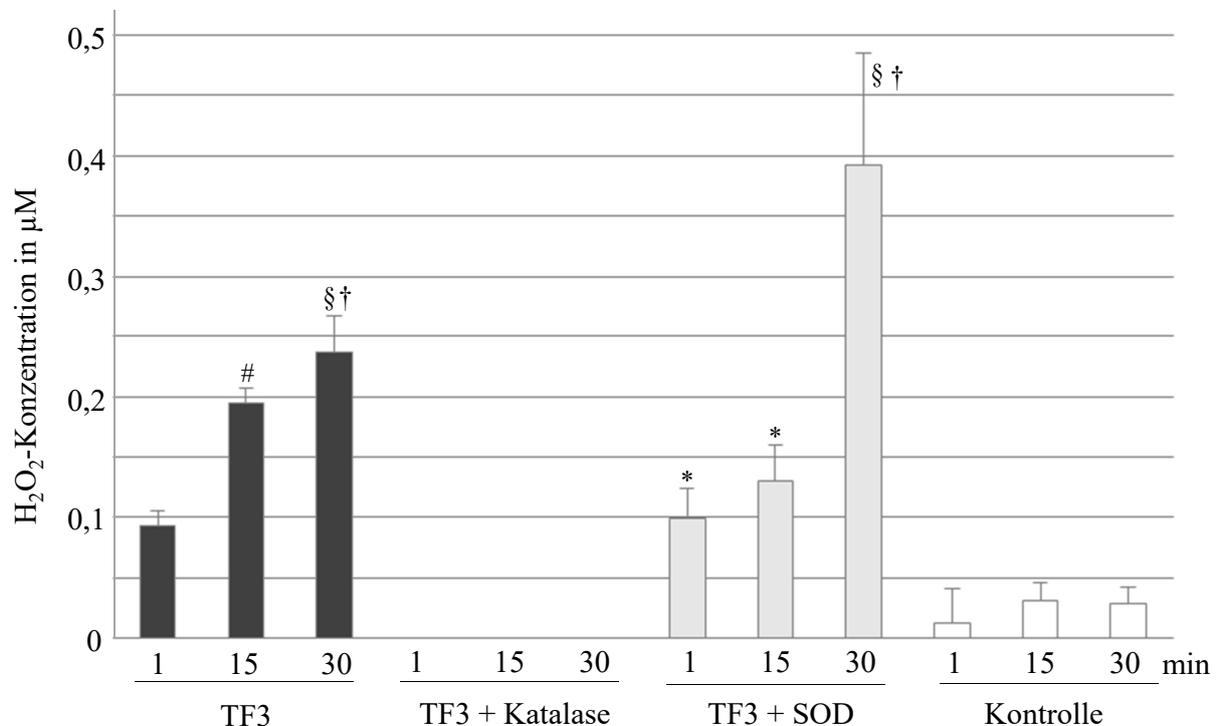


Abb. 32: H_2O_2 -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 2 μM TF3 mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Zeitabhängige Zunahme der H_2O_2 -Konzentration bei TF3 und TF3 + SOD. Vorbehandlung mit Katalase blockierte die H_2O_2 -Bildung. Darstellung der H_2O_2 -Konzentration in μM . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + SOD nach 30 Minuten, [#] $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase nach 15 Minuten, [§] $p<0,05$ im Vgl. zu TF3 + Katalase nach 30 Minuten, [†] $p<0,05$ im Vgl. zur Kontrolle nach 30 Minuten.

2 μM TF3 erhöhte zeitabhängig die H_2O_2 -Konzentration auf $0,09 \pm 0,01$ μM nach 1 Minute und auf $0,24 \pm 0,03$ μM nach 30 Minuten. Damit war sie insgesamt etwas höher als bei 0,5 μM TF3. Katalase führte auch hier zu einer vollständigen Blockierung der H_2O_2 -Bildung, während SOD zu einem starken Anstieg von H_2O_2 führte. Die hohe H_2O_2 -Konzentration bei 30 Minuten führte zu einem signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe (Abb. 32).

4.3.4 Schwarzer Tee

Das isolierte Theaflavin TF3 führte in der Krebs-Henseleit-Lösung zu einer deutlichen H_2O_2 -Bildung. Da schwarzer Tee eine Vielzahl von weiteren Inhaltsstoffen wie z.B. die Thearubigene enthält, wurde auch die H_2O_2 -Bildung durch schwarzen Tee nach Vorbehandlung mit den Antioxidantien Katalase und SOD gemessen (Abb. 33).

Bei schwarzem Tee kam es ebenfalls zu einer starken zeitabhängigen H_2O_2 -Bildung, die leicht über der von grünem Tee lag (Abb. 30 und 33). Das Maximum der H_2O_2 -Konzentration wurde nach 15 Minuten erreicht ($1,48 \pm 0,43 \mu M$) und blieb nach 30 Minuten auf etwa dem gleichen Niveau ($1,47 \pm 0,29 \mu M$) (Abb. 33). Die bei $2 \mu M$ TF3 gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen lagen deutlich unter denen von schwarzem Tee (Abb. 32 und 33). Katalase verhinderte nahezu vollständig die Bildung von H_2O_2 , so dass die H_2O_2 -Konzentrationen über den gesamten Zeitverlauf zwischen $0,07$ und $0,22 \mu M$ lagen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von grünem Tee. Vorbehandlung mit SOD führte ebenfalls zu einer H_2O_2 -Bildung. Sie lag geringfügig höher als in den Kontrollen und bei schwarzem Tee + Katalase, aber deutlich unter schwarzem Tee (Abb. 33). Die H_2O_2 -Konzentrationen nach Vorbehandlung mit SOD waren zwischen grünem und schwarzem Tee vergleichbar (Abb. 30 und 33).

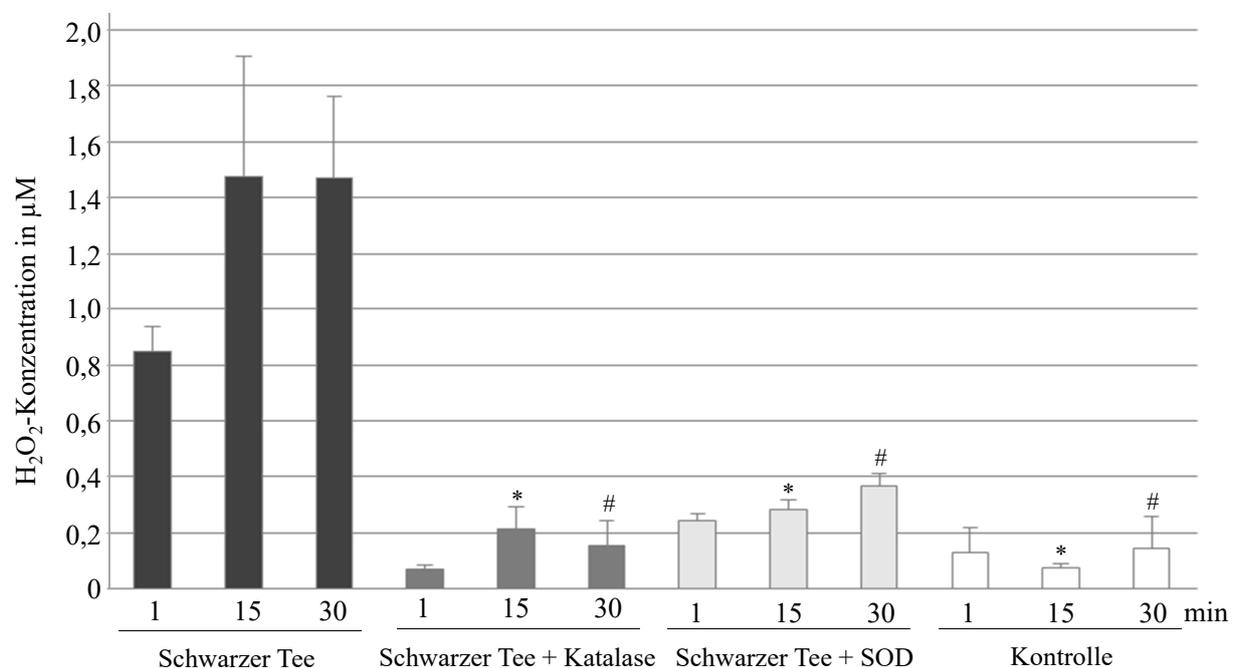


Abb. 33: H_2O_2 -Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von $50 \mu l$ schwarzem Tee mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase ($200 U/ml$) bzw. SOD ($500 U/ml$). Messung nach 1, 15 und 30 Minuten. Zeitabhängige Zunahme der H_2O_2 -Konzentrationen bei schwarzem Tee. Die Vorbehandlung mit Katalase bzw. SOD führte zur Reduktion von H_2O_2 . Darstellung der H_2O_2 -Konzentrationen in μM . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $n=4$. * $p < 0,05$ im Vgl. zu schwarzem Tee nach 15 Minuten, # $p < 0,05$ im Vgl. zu schwarzem Tee nach 30 Minuten.

Innerhalb der Behandlungsgruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf. Jedoch war nach Vorbehandlung mit Katalase und SOD eine signifikante Reduktion der H₂O₂-Produktion im Vergleich zu schwarzem Tee beobachtet worden (Abb. 33).

4.3.5 Zusammenfassung der H₂O₂-Konzentrationsmessungen

Es kam bei allen Teepolyphenolen zur Bildung von H₂O₂ in der Krebs-Henseleit-Lösung. Dabei war das Ausmaß der H₂O₂-Bildung abhängig von der Intervention. Schwarzer Tee führte zur höchsten H₂O₂-Konzentration mit einem Maximum von $1,48 \pm 0,43 \mu\text{M}$, gefolgt von $10 \mu\text{M}$ EGCG mit $1,15 \pm 0,24 \mu\text{M}$ und grünem Tee mit $1,13 \pm 0,36 \mu\text{M}$. TF3 führte in beiden verwendeten Konzentrationen zur geringsten H₂O₂-Produktion.

Das Antioxidans Katalase blockierte in allen Behandlungsgruppen die H₂O₂-Bildung stark oder sogar vollständig. Dabei lagen die H₂O₂-Messwerte bei $1 \mu\text{M}$ EGCG und bei TF3 unter der Nachweisgrenze (Abb. 34).

Die Vorbehandlung mit SOD inhibierte die H₂O₂-Bildung partiell. Das Ausmaß der Inhibition war abhängig von der Konzentration und dem verwendeten Teepolyphenol. Bei $10 \mu\text{M}$ EGCG, grünem und schwarzem Tee waren die maximalen H₂O₂-Konzentrationen nach Vorbehandlung mit SOD ähnlich. Die H₂O₂-Konzentrationen lagen deutlich unter denen ohne Antioxidans und unterschiedlich stark über denen nach Vorbehandlung mit Katalase. Die inhibitorische Wirkung von SOD war bei $1 \mu\text{M}$ EGCG und bei TF3 weniger stark ausgeprägt (Abb. 34).

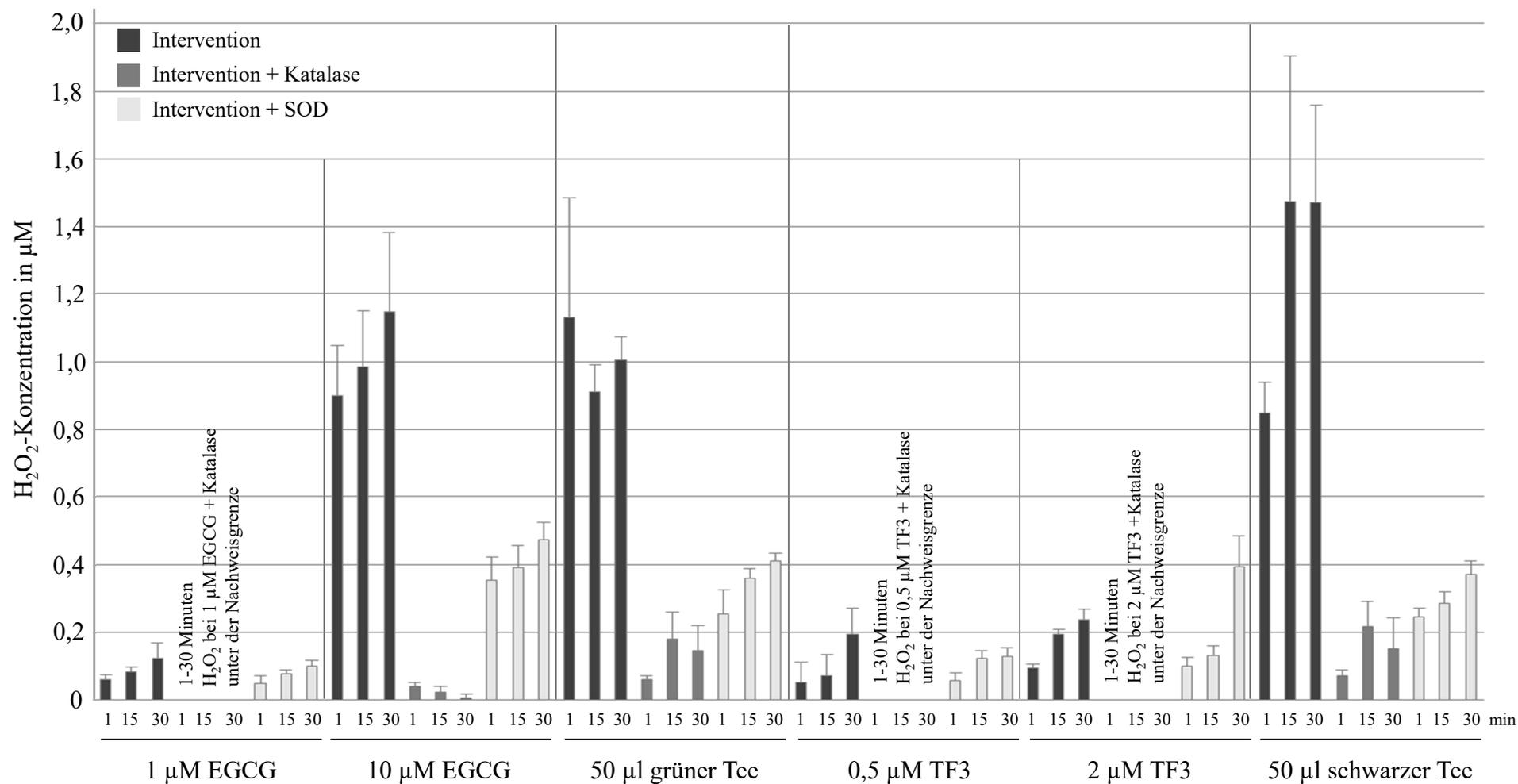


Abb. 34: Zusammenfassung der H_2O_2 -Konzentrationsmessungen

4.4 Zusammenfassung der Effekte der verwendeten Substanzen

Die Ergebnisse aller Untersuchungen sind in Abbildung 35 schematisch dargestellt und zeigen eine Zunahme (↑), Abnahme (↓) bzw. keine signifikante Veränderung (-) der Vasodilatation bzw. Polyphenol- und H₂O₂-Konzentrationen.

	Vasodilatation	Polyphenol-Konzentration	H ₂ O ₂ -Konzentration
EGCG	↑	↓	↑
EGCG + Katalase	-	↓	-
EGCG + SOD	↑	↓	-
EGCG + MnTMPyP	-	unter der Nachweisgrenze	
Grüner Tee	↑		↑
Grüner Tee + Katalase	-		-
Grüner Tee + SOD	↑		-
Grüner Tee + MnTMPyP	-		
TF3	↑	↓	↑
TF3 + Katalase	-	↓	unter der Nachweisgrenze
TF3 + SOD	↑	↓	↑
TF3 + MnTMPyP	-		
Schwarzer Tee	↑		↑
Schwarzer Tee + Katalase	-		-
Schwarzer Tee + SOD	↑		-
Schwarzer Tee + MnTMPyP	-		

Abb. 35: Schematische Darstellung der Ergebnisse aus den Vasodilatationsversuchen und den Polyphenol- und H₂O₂-Konzentrationsmessungen.

5. Diskussion

5.1 Vasodilatation durch Teepolyphenole

Studienergebnisse der Arbeitsgruppe zur Vasodilatation bei grünem und schwarzem Tee zeigten einen vergleichbaren Umfang der Relaxation in Aortenringen von Ratten (Jochmann et al. 2008, Lorenz et al. 2009). Dies deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Vasodilatation durch schwarzen Tee war minimal stärker als bei grünem Tee. Auch *in vivo* erhöhten bei gesunden Frauen sowohl grüner als auch schwarzer Tee die endotheliale Vasodilatation (Jochmann et al. 2008). Diese mit grünem Tee vergleichbar guten dilatativen Eigenschaften des schwarzen Tees sind erklärbar durch das Zusammenspiel verschiedener Inhaltsstoffe im schwarzen Tee, wie die Thearubigene und Theaflavine. Sie gleichen den geringeren Gehalt an Catechinen wieder aus und tragen so zur Vasodilatation bei. Grüner und schwarzer Tee stimulierten in vergleichbarem Umfang dosisabhängig die eNOS-Aktivität und Phosphorylierung in Endothelzellen boviner Aorten (Jochmann et al. 2008, Lorenz et al. 2009). Trotz der sehr geringen TF3-Konzentration von 0,06 μM an den Aortenringen in der vorliegenden Studie, löste schwarzer Tee eine starke Vasodilatation aus. Somit sind wahrscheinlich andere Teeinhaltsstoffe wie die Thearubigene oder andere Theaflavine für die positiven Wirkungen von schwarzem Tee auf die Gefäßfunktion verantwortlich.

Das Teecatechin EGCG aktivierte in Endothelzellen über eine Signalkaskade die eNOS und führte dadurch zu nachfolgender NO-Produktion und Vasodilatation. Die eNOS-Aktivierung durch EGCG erfolgte über Proteinkinasen wie PI3-Kinase, PKA und AKT-Kinase mit einer Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser-1179 der eNOS (Lorenz et al. 2004, Kim et al. 2007, Reiter et al. 2010). Darüber hinaus postulierten Anter et al. (2004) den PI3/AKT-Kinase-Signalweg mit nachfolgend involvierter p38 MAPK, die zur Phosphorylierung an Ser-1177 und Dephosphorylierung an Threonin (Thr)-495 der eNOS führte. Von den verschiedenen Catechinen produzierte 100 μM EGCG die höchste Menge an NO[•], TF3 in äquipotenten Dosen stimulierte hingegen die eNOS-Aktivität stärker (Lorenz et al. 2009).

Untersuchungen an isolierten Aortenringen bei eNOS-knock-out Mäusen führten bei Wildtyp-Mäusen zu einer starken EGCG-induzierten Vasodilatation, wohingegen sie bei knock-out Mäusen vollständig ausblieb. Grüner Tee ergab vergleichbare Ergebnisse. Für die Vasodilatation durch EGCG wird demnach eine funktionsfähige NOS in den Endothelzellen

benötigt, damit in den Blutgefäßen ausreichend NO[•] für die Vasodilatation gebildet wird (Lorenz et al. 2015). EGCG löste je nach Studie in unterschiedlichen Konzentrationen eine Vasodilatation aus. In isolierten Aortenringen von Ratten dilatierten diese ab 1 µM EGCG (Lorenz et al. 2004; Grassi et al. 2008; Aggio et al. 2013). Jede EGCG-Gabe führte zu einer kurzen, reversiblen Kontraktion, gefolgt von einer langanhaltenden Vasorelaxation mit statistischer Signifikanz ab 10 µM (Lorenz et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit dilatierete 1 µM EGCG die Aortenringe auf durchschnittlich 87 % der Vorkontraktion. Abweichend dazu zeigten Auger et al. (2010), dass EGCG in isolierten porzinen Aortenringen erst ab einer Konzentration von 100 µM eine Vasodilatation auslöste. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind erklärbar durch verschiedene Tierarten (Ratten- und Schweineaorten), unterschiedlicher Versuchsaufbau (z.B. Menge der Krebs-Henseleit-Lösung in den Glasgefäßen), Präparation der Aorten (z.B. Breite der Aortenringe, individuelle Präparationstechniken) und der Beschaffenheit der Versuchssubstanzen (z.B. Isolationsprozess, Hersteller). Verschiedene Studien verweisen auf die Bedeutung von intra- und extrazellulärem Kalzium für die Vasoreaktivität (Thomas et al. 2002; Shen et al. 2003). Daher wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit ausschließlich unter Anwesenheit von Kalzium durchgeführt, welches Bestandteil der Krebs-Henseleit-Lösung war.

Die Literaturdaten bezüglich der Vasoreaktivität der unterschiedlichen Catechine in isolierten Aortenringen sind jedoch nicht einheitlich. So hatte EC in Aortenringen keinen Effekt auf die Vasorelaxation (Andriambeloso et al. 1998). Auch vasokonstriktive Effekte durch Teecatechine wurden beschrieben: 10 µM EGCG löste eine Vasokontraktion aus, vermutlich durch Inaktivierung von NO[•] (Sanae et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Shen et al. (2003) fand, dass neben EGCG auch EGC (3 bis 300 µM) zu einer Vasokontraktion führte. Die Catechine EC und ECG lösten hingegen keine Kontraktion aus, so dass die Arbeitsgruppe davon ausgeht, dass der B-Ring der Catechine für die Vasokontraktion verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte eine kurze, aber reversible Vasokontraktion nach EGCG-, TF3-, Grün- und Schwarzteegebe beobachtet werden. Es gab keine Hinweise auf eine anhaltende Vasokontraktion durch EGCG, TF3 sowie grünen und schwarzen Tee. Die Phase der kurzen Kontraktion ist bislang nicht erklärt. Die Beobachtungsintervalle zwischen den einzelnen Interventionsgaben betragen in der vorliegenden Studie 30 Minuten. Ein möglicher Grund für die Messung einer Vasokontraktion durch die Arbeitsgruppe um Shen et al. (2003) könnte in einem zu kurzen Beobachtungszeitraum an den Gefäßringen liegen.

Zu den vasodilatatorischen Eigenschaften von TF3 gibt es nur wenige Untersuchungen. 10 µM EGCG und 2 µM TF3 zeigten eine vergleichbare Vasodilatation von ca. 40 % der

Vorkontraktion (Lorenz et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden auch 10 μ M EGCG und 2 μ M TF3 verwendet, jedoch dilatierten die Aortenringe mit EGCG deutlich stärker als die mit TF3 (ca. 10 % vs. 30 % der Vorkontraktion nach der letzten Gabe).

Es ist jedoch nicht gesichert, ob die günstigen Effekte von Flavonoiden auf die Gefäßfunktion überhaupt den Catechinen zuzuschreiben sind oder nicht von anderen Inhaltsstoffen oder Metaboliten im grünen und schwarzen Tee verursacht werden (Widlansky et al. 2005 und 2007). So vermittelt EGCG *in vitro* zwar viele positive Effekte auf die Gefäßfunktion, *in vivo* ist dessen Beitrag zu einer verbesserten Endothelfunktion durch grünen Tee aber bislang ungeklärt. Die Gefäßfunktion wird nachweislich und langanhaltend durch grünen und schwarzen Tee günstig beeinflusst. In einer Metaanalyse von neun Humanstudien verbesserte moderater Teekonsum signifikant die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) (Ras et al. 2011). Unter der FMD versteht man die endothelabhängige Vasodilatation, welche als prognostischer Marker für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen angesehen wird. Im Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit verbesserte EGCG aus grünem Tee nach 2 h zwar die arterielle Dilatation, nach zwei Wochen war dies jedoch nicht mehr der Fall und EGCG auch nicht mehr nachweisbar (Widlansky et al. 2007). Ebenso korrelierten die Catechin-Konzentrationen (ECG, EC) nach Einnahme von schwarzem Tee nicht mit der Endothelfunktion oder verbesserter antioxidativer Kapazität (Widlansky et al. 2005). Kakao, reich an EC, wurde mit einer Verbesserung von Gefäßfunktion, Blutdruck und FMD (Hooper et al. 2012) sowie einer Senkung des kardiovaskulären Risikos assoziiert (Buitrago-Lopez et al. 2011). Die Gabe von reinem EC hatte jedoch keinen Einfluss auf Blutdruck oder arterielle Gefäßsteifigkeit und veränderte die FMD nicht signifikant (Dower et al. 2015).

Eine Cross-over-Studie der Arbeitsgruppe an gesunden Menschen fand erstmals, dass EGCG höchstwahrscheinlich nicht an einer verbesserten Endothelfunktion durch grünen Tee beteiligt ist (Lorenz et al. 2017). Nach Verabreichung von 200 mg EGCG in unterschiedlichen Formulierungen (grüner Tee, Grünteeextrakt, isoliertes EGCG) wurde die FMD gemessen. Nach Aufnahme von isoliertem EGCG war die Plasmakonzentration von EGCG am höchsten, ein Effekt auf die FMD konnte jedoch nicht beobachtet werden. Obwohl nach grünem Tee die gemessene EGCG-Plasmakonzentration am geringsten von allen Interventionen war, wurde eine signifikante Verbesserung der FMD festgestellt. Die Plasmakonzentrationen der Catechine EC, ECG und EGC aus grünem Tee waren sehr gering und korrelierten nicht mit der FMD. Auch Grünteeextrakt hatte keinen Einfluss auf die FMD. Somit spielen möglicherweise andere Teekomponenten oder Metaboliten bei der

Vasodilatation eine Rolle, wie z.B. Koffein, methylierte Teepolyphenole oder konjugierte und nicht-konjugierte Formen der Catechine (Lorenz et al. 2017).

5.2 Stabilität von Teepolyphenolen *in vitro* und *in vivo*

Die Stabilität von Teepolyphenolen war schon Inhalt von mehreren Untersuchungen. Sang et al. (2005) vermuteten Autooxidation und Epimerisation als Hauptursachen für die Instabilität von EGCG *in vitro*. Die Menge der gebildeten EGCG-Dimere wurde durch verschiedene Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt, Metallionen und antioxidatives Niveau beeinflusst. Die Autoren verwiesen auf die Wichtigkeit weiterführender Untersuchungen zur Stabilität von EGCG zur Vermeidung möglicher Artefakte (Sang et al. 2005). EGCG war unter sauren Bedingungen (pH 2,0 - 5,5) eher stabil als unter neutralen (pH 7,4 und 37 °C), wo es schnell durch Sauerstoff oxidiert wurde (Hong et al. 2002). Roginsky und Alegria (2005) stellten unter Standardbedingungen diesen Autooxidationsprozess auch bei den wässrigen Extrakten aus grünem und schwarzem Tee fest. Mit steigendem pH-Wert nahm die Autooxidation zu.

Mehrere Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass EGCG *in vitro* einer Autooxidation mit nachfolgender Entstehung verschiedener Dimere/Chinone unterliegt. Yoshino et al. (1999) untersuchten unter *in vitro*-Bedingungen die Entstehung von EGCG-Dimeren in heparinisiertem Mäuseplasma (pH 7,8) und künstlichem Darmsekret (1,5%ige Natriumhydrogencarbonatlösung, pH 8.5). Die Arbeitsgruppe identifizierte während des Zerfalls von EGCG drei verschiedene Produkte: Theasinensin A, P-2 und Theasinensin D. Von EGCG war nach 5 Minuten nur noch 19,4 % im künstlichen Darmsekret und 60,7 % im heparinisierten Mäuseplasma nachweisbar. Hong et al. (2002) wiesen in HT-29-Zellen die EGCG-Dimere Theasinensin A und P2 nach. Die Dimere erreichten ihre maximalen Konzentrationen nach 2 - 4 h und waren auch nach dem Zerfall von EGCG in größeren Konzentrationen vorhanden. In einer Untersuchung von EGCG (50 und 200 µM) in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-Puffer (Tris-HCl-Puffer; 20 mM Tris-HCl, pH 7,2), lag die Halbwertszeit von EGCG bei ungefähr 2 h, nach 24 h war kein EGCG mehr nachweisbar. In derselben Zeit entstanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Oxidationsprodukte. Dabei wurde ein Autooxidationsprozess unter neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen postuliert (Sang et al. 2007). Auch andere Autoren beobachteten die Autooxidation von EGCG in Zellkultur, welche mit steigendem pH-Wert zunahm. Durch

Sauerstoff kam es zur Ein-Elektronen-Oxidation des B-Ringes und es entstanden Semichinon-Radikale und $O_2^{\cdot-}$, welche zu H_2O_2 reduziert wurden (Mochizuki et al. 2002; Neilson et al. 2010).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen den Zerfall von EGCG und TF3 *in vitro*. Bei 1 μ M EGCG bzw. 0,5 μ M TF3 waren nach 1 Minute nur noch geringste Mengen und nach 15 Minuten keinerlei Substanz mehr nachweisbar. Im Vergleich dazu wird der Zerfall bei 10 μ M EGCG deutlicher. Nach 1 Minute waren noch 70 % und nach 30 Minuten lediglich 1,6 % des EGCG nachweisbar. 2 μ M TF3 unterlag ebenfalls einem zeitabhängigen Zerfallsprozess, bei dem nach 1 Minute noch 21 % vorhanden und nach 30 Minuten die Nachweisgrenze erreicht war.

Untersuchungen zum Zerfall der Einzelsubstanzen im grünen und schwarzen Tee wurden nicht durchgeführt, da dies durch die Vielzahl der beteiligten Teeinhaltsstoffe technisch schwierig ist. Es wurden auch keine Untersuchungen zur Entstehung von Dimeren während des Zerfallszeitraumes durchgeführt.

Die Konzentrationsmessungen unter Einfluss der Antioxidantien Katalase und SOD ergaben für EGCG und TF3 teils überraschende Resultate. Sowohl Katalase als auch SOD hatten einen stabilisierenden Einfluss auf EGCG und TF3.

Bei 1 μ M EGCG war dieser Effekt besonders nach Vorbehandlung mit Katalase ausgeprägt. Dabei war EGCG nach 1 Minute in einer signifikant höheren Konzentration vorhanden als ohne Vorbehandlung mit Katalase und nach 15 Minuten in gering erhöhter Konzentration ohne Signifikanz zu erreichen. Bei 10 μ M EGCG konnte der stabilisierende Effekt nach Vorbehandlung mit SOD festgestellt werden, da EGCG nach 15 und 30 Minuten mit signifikantem Unterschied in einer höheren Konzentration vorlag als ohne Antioxidans. Auch Katalase hatte im Trend einen stabilisierenden Effekt auf EGCG, dieser Unterschied konnte nicht als signifikant nachgewiesen werden. Bei 0,5 μ M TF3 war nach Vorbehandlung mit SOD nach 1 Minute TF3 in einer signifikant höheren Konzentration vorhanden als ohne Antioxidans. Auch die Vorbehandlung von 0,5 μ M TF3 mit Katalase hatte nach 1 Minute einen leicht stabilisierenden, nicht signifikanten Effekt auf TF3. Bei 2 μ M TF3 war durch beide Antioxidantien im Trend eine Stabilisierung festzustellen, für diesen Effekt konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Insgesamt war bei beiden Teepolyphenolen der stabilisierende Effekt durch SOD etwas stärker als durch Katalase.

Ein stabilisierender Effekt durch SOD wurde auch von Mochizuki et al. (2002), Roginsky und Alegria (2005) und Hou et al. (2005) gezeigt. Die Zugabe von SOD inhibierte signifikant die Oxidation von Teepolyphenolen und verlangsamte den Autooxidationsprozess.

Die Stabilitätsmessungen der Teepolyphenole nach Vorbehandlung mit SOD stimmen im Trend mit den vorliegenden Ergebnissen der Vasodilatationsversuche überein, in denen bei schwarzem Tee eine signifikante und bei EGCG, TF3 und grünem Tee eine nicht signifikante Verstärkung der Vasodilatation nach Vorbehandlung mit SOD beobachtet werden konnte. SOD verlangsamte die Autooxidation der Teepolyphenole, verlängerte deren Halbwertszeit und trug dadurch zu einer stärkeren Vasodilatation bei. Eine vollständige Inhibierung der Autooxidation durch SOD ist sehr unwahrscheinlich, da die Konzentrationen von EGCG und TF3 im Zeitverlauf abnahmen.

Eine schnelle Autooxidation der Teepolyphenole *in vitro* ist sehr wahrscheinlich. Die Situation *in vivo* kann sich dagegen ganz anders darstellen. Der Sauerstoffpartialdruck ist *in vitro* viel höher als *in vivo* (152 vs. 40 mmHG) (Sang et al. 2007) und schafft oxidative Bedingungen, die eine Autooxidation von Teepolyphenolen begünstigen. Dies ist ebenso im Aortenringmodell bei dauerhafter Begasung mit 95 % Sauerstoff der Fall. Somit ist der schnelle Zerfall der Teepolyphenole im Aortenringmodell möglicherweise u.a. auf die oxidativen Bedingungen zurückzuführen. Des Weiteren betrug der pH-Wert in der Krebs-Henseleit-Lösung konstant 7,4. Somit könnte zusätzlich die von mehreren Arbeitsgruppen vermutete Instabilität unter neutralen Bedingungen eine Rolle spielen.

Möglicherweise findet ein rascher Zerfall der Teepolyphenole nur *in vitro* statt. Denn *in vivo* konnten die Oxidationsprodukte im Plasma von Mäusen nach hochkonzentrierter EGCG-Gabe (50 mg/kg EGCG *i.p.* über drei Tage) nicht nachgewiesen werden, stattdessen die methylierten und konjugierten Metaboliten von EGCG (Sang et al. 2007). Zudem war EGCG im Plasma von Menschen auch noch einige Stunden nach Verabreichung nachweisbar. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden nach 1-4 h erreicht, und nach 24 h (Van Amelsvoort et al. 2001; Chow et al. 2001; Lee et al. 2002) bzw. zwei Wochen (Widlansky et al. 2007) war kein EGCG mehr nachweisbar. Somit scheinen Catechine *in vivo* physiologischen Metabolisierungs- und Abbauprozessen zu unterliegen, wohingegen *in vitro* ein rascher Zerfallsprozess mit Bildung von Dimeren/Chinonen und reaktiven Sauerstoffspezies wahrscheinlich ist.

5.3 Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Vasodilatation durch Teepolyphenole

Verschiedene Studien deuten auf einen Autooxidationsprozess bzw. das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Vasodilatation von Teepolyphenolen hin.

Der von Lorenz et al. (2004) postulierte Signalweg über die PI3-Kinase, PKA und AKT-Kinase mit nachfolgender Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser-1179 der eNOS, wurde durch die Ergebnisse von Kim et al. (2007) bestätigt. Jedoch ging die Arbeitsgruppe Kim et al. (2007) davon aus, dass die durch EGCG-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (inklusive H_2O_2) einen Teil der intrazellulären Signalkaskade oberhalb der PI3-Kinase darstellt (Abb. 36).

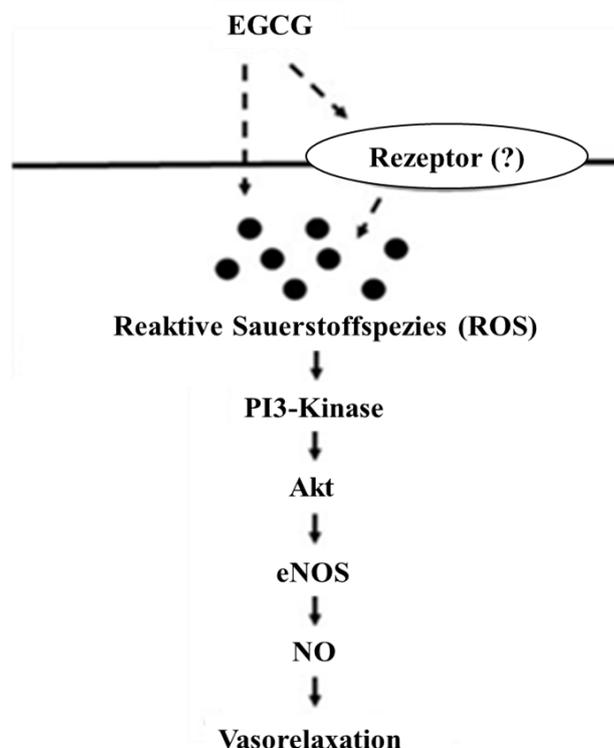


Abb. 36: Möglicher Mechanismus der Vasodilatation durch EGCG.

Um die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Vasodilatation von Teepolyphenolen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene antioxidative Enzyme wie Katalase und Superoxiddismutase (SOD) eingesetzt.

Versuche in Zellkultur mit Endothelzellen und Hepatozyten ergaben unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung von Antioxidantien auf den Signalweg der Teepolyphenole. Lorenz et al. (2009) konnten in Aortenendothelzellen von Rindern keinen Effekt von Katalase, Polyethylenglykol-Katalase (PEG-Katalase) und SOD auf die EGCG-stimulierte eNOS-Aktivität nachweisen. Hingegen inhibierte die zellgängige PEG-Katalase

(500 U/ml) die Stimulation der eNOS-Aktivität durch TF3 um ca. 50 %. Dies deutet auf eine intrazelluläre Beteiligung von H_2O_2 im Signalweg von TF3 hin. Die Ergebnisse von Anter et al. (2004) zeigten hingegen in Aortenendothelzellen von Schweinen keinen Effekt der PEG-Katalase auf die durch schwarzen Tee induzierte eNOS-Aktivität. Dabei wurden geringe Konzentrationen der PEG-Katalase (100 U/ml) benutzt. In Hepatozyten scheint die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies sogar essentiell für die Aktivierung der 5'-AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) durch EGCG zu sein. PEG-Katalase (500 U/ml) verhinderte diesen Signalweg (Collins et al. 2007).

In der vorliegenden Studie wurde das zellgängige Antioxidans PEG-Katalase nicht verwendet, da für den Signalweg der Bildungsort von H_2O_2 keinen Einfluss hat. H_2O_2 diffundiert problemlos durch Zellwände und kann somit auch bei extrazellulärer Bildung intrazellulär wirken. Aktuelle Studien vermuten Aquaporine für den Transport von H_2O_2 durch Zellwände (Tamma et al. 2018).

Die Arbeitsgruppe Auger et al. (2010) untersuchte die molekularen Mechanismen der eNOS-Stimulation durch EGCG und führte Vasorelaxationsversuche mit EGCG an Koronararterienringen von Schweinen durch. Es wurden dabei sehr hohe, eher unphysiologische Dosen von 100 μM EGCG eingesetzt. Dabei führte EGCG ab einer Konzentration von 100 μM zu einer endothelabhängigen Vasodilatation. Zellgängige Antioxidantien wie PEG-Katalase (500 U/ml) und MnTMPyP (100 μM , intrazelluläres SOD-Mimetikum) reduzierten diese Relaxation der Koronararterienringe durch EGCG deutlich. MnTMPyP führte im Vergleich zu PEG-Katalase zu einer stärkeren Inhibition der Vasorelaxation. Extrazelluläre natürliche Antioxidantien wie SOD und Katalase (jeweils 500 U/ml) und Inhibitoren reaktiver Sauerstoffspezies wie NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase und Cytochrom P450 hatten keine Effekte auf die Vasorelaxation. Ein EGCG-Derivat, bei dem alle Hydroxylgruppen der Gallatgruppe methyliert wurden, führte weder zur Vasorelaxation, noch zur Bildung intrazellulärer ROS (Auger et al. 2010). Die NO-vermittelte Relaxation der Gefäße durch EGCG ist als eine redoxempfindliche Reaktion beschrieben worden, die die Anwesenheit von intrazellulärem $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 benötigt. Dabei sollen die durch EGCG gebildeten Hyperoxidanionen als frühes Signal die PI3-Kinase/AKT-abhängige eNOS-Phosphorylierung auslösen. Es ist wahrscheinlich, dass es sich um einen Autooxidationsprozess der Hydroxylgruppen der Gallatgruppe von EGCG handelt, bei dem es während der Umwandlung von EGCG in ein Dimer/Chinon zur Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ kommt, welches dann den stimulierenden Effekt von EGCG auf die eNOS über den PI3-Kinase/AKT-Signalweg auslöst (Auger et al. 2010).

Sang et al. (2007) vermuteten $O_2^{\cdot-}$ im Signalweg von EGCG. Während des Autooxidationsprozesses von EGCG wird Sauerstoff oxidiert und ein EGCG- und Hydroperoxidradikal geformt. Das Hydroperoxidradikal reagiert mit einem anderen EGCG-Molekül zu einem EGCG-Radikal und H_2O_2 . Von endothelialen NO-Synthasen gebildetes $O_2^{\cdot-}$ wurde als wichtiger Vorläufer zur Bildung von EDHF in Mäusen identifiziert (Takaki et al. 2008).

Das zellgängige SOD-Mimetikum MnTMPyP (10 μ M) blockierte in unseren Versuchen in allen Aortenringen die Polyphenol-induzierte Vasodilatation vollständig. Auch Auger et al. (2010) stellten diese Inhibition der EGCG-induzierten Vasodilatation fest. Bei den Messungen der Substanzkonzentrationen war in der vorliegenden Arbeit nach 1 Minute nur noch ein Messwert kurz über der Nachweisgrenze detektierbar. Dies lässt den Schluss zu, dass das synthetische Antioxidans MnTMPyP zu einer sofortigen Destabilisierung der EGCG-Moleküle führt. Es erscheint daher nicht als antioxidative Substanz bei Teepolyphenolen geeignet und wurde aus diesem Grund bei allen weiteren Messungen der Substanz- und H_2O_2 -Konzentrationen nicht mehr verwendet.

5.4 H_2O_2 -Bildung durch Teepolyphenole

Die Summe der Ergebnisse der Vasodilatationsversuche und Substanzkonzentrationsmessungen deuten auf eine maßgebliche Beteiligung von H_2O_2 an der Vasodilatation durch Teepolyphenole im Aortenringmodell hin.

Ein möglicher Einfluss von H_2O_2 auf die Vasodilatation wurde bereits in einigen Arbeiten untersucht. In porzinen Aortenendothelzellen führte H_2O_2 Kalzium-abhängig zu verbesserter eNOS-Aktivität und NO-Bioaktivität. H_2O_2 aktivierte AKT und erhöhte die Phosphorylierung an Ser-1177 der eNOS (Thomas et al. 2002). Die Aktivierung des PI3/AKT-Kinase-Signalweges durch H_2O_2 konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. In intestinalen Epithelzellen von Ratten stimulierte H_2O_2 die Phosphorylierung der AKT über den PI3-Kinase-abhängigen Signalweg (Zhou et al. 2005). Die Inhibition der PI3/AKT-Kinase verhinderte die durch H_2O_2 ausgelöste Neurotoxizität in Zellen (Yu et al. 2017). Ein Produkt der Arachidonsäure (20-HETE) stimulierte in Endothelzellen die NADPH-Oxidase mit $O_2^{\cdot-}$ - und nachfolgender H_2O_2 -Bildung. H_2O_2 aktivierte dabei die PI3/AKT-Kinase mit Phosphorylierung der eNOS und gesteigerter NO-Freisetzung (Bodiga et al. 2010). Vom Endothel freigesetztes H_2O_2 wurde als EDHF identifiziert, welches zu nachfolgender Vasodilatation führte. In Mesenterialarterien von Ratten führte H_2O_2 dosisabhängig zur

Vasodilatation (Park et al. 2015). Sato et al. (2003) untersuchten den Einfluss der bei exogener Zugabe von Xanthin (XA) und Xanthinoxidase (XO) gebildeten ROS auf den vaskulären Tonus von humanen Koronararteriolen. Das durch XA/XO exogen und endogen gebildete $O_2^{\cdot -}$ führte zu spontaner H_2O_2 -Produktion mit nachfolgender Vasodilatation, die durch Katalase unterdrückt wurde.

Auch die Bildung von H_2O_2 durch EGCG konnte gezeigt werden. In menschlichen Adenokarzinomzellen entstanden nach 50 μM EGCG 25 μM H_2O_2 (Hong et al. 2002). In bovinen Aortenendothelzellen konnte nach Behandlung mit EGCG mittels Fluoreszenz H_2O_2 nachgewiesen werden (Kim et al. 2007). Auch in Hepatozyten führte EGCG zur Bildung von H_2O_2 (Collins et al. 2007).

Erkenntnisse zur Bildung von H_2O_2 bei der Vasodilatation durch Teepolyphenole im Aortenringmodell gibt es bislang nicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante H_2O_2 -Bildung durch EGCG und TF3, sowie grünen und schwarzen Tee gezeigt werden. Die H_2O_2 -Konzentrationen unter Kontrollbedingungen waren dabei sehr gering und lagen im Durchschnitt bei 0,05 μM H_2O_2 . Chemische Reaktionen zwischen den einzelnen Substanzen der Krebs-Henseleit-Lösung haben wahrscheinlich zur H_2O_2 -Bildung geführt. Solche Wechselwirkungen wurden auch schon für Versuche in Zellkultur beschrieben, wo sie zwischen Teepolyphenol und Zellkulturmedium vermutet wurden. Beim Einsatz unterschiedlicher Zellkulturmedien kam es zur Bildung unterschiedlicher Mengen an H_2O_2 durch Teepolyphenole (Kapitel 2.4.2, Long et al. 2000 und 2007).

Die Ergebnisse der H_2O_2 -Konzentrationsmessungen korrelierten mit denen der Vasodilatationsversuche: je höher die gemessene H_2O_2 -Konzentration, desto stärker die beobachtete Vasodilatation. Zudem nahm mit steigender H_2O_2 -Konzentration auch die Polyphenolkonzentration ab.

Bei grünem Tee und 10 μM EGCG waren vergleichbare H_2O_2 Mengen nachweisbar, obwohl bei grünem Tee die EGCG-Konzentration an den Aortenringen nur halb so hoch war (5 μM vs. 10 μM). Somit scheinen im grünen Tee neben EGCG auch noch andere Inhaltsstoffe für die Entstehung von H_2O_2 verantwortlich zu sein. EGCG löste trotz vergleichbarer H_2O_2 -Konzentrationen eine wesentlich stärkere Vasodilatation als grüner Tee aus, was möglicherweise auf vasoaktiv hemmende Substanzen im grünen Tee zurückzuführen sein könnte.

Bei 1 μM EGCG wurde eine geringe Menge H_2O_2 gemessen, das in den Vasodilatationsversuchen eine leichte Dilatation auslöste. Obwohl die EGCG-Konzentration

ab 15 Minuten unter der Nachweisgrenze lag, konnte auch nach 30 Minuten eine H_2O_2 -Bildung beobachtet werden. Die Bildung von ROS (incl. H_2O_2) durch EGCG-Dimere/Chinone könnte hierfür verantwortlich sein. Eine Chinon-Bildung durch EGCG wird vermutet (Yoshino et al. 1999; Hong et al. 2002; Mochizuki et al. 2002; Sang et al. 2007; Hernández et al. 2006).

Trotz geringer TF3-Konzentration im schwarzen Tee, war die nachweisbare H_2O_2 -Menge bei schwarzem Tee am höchsten. Andere Teeinhaltsstoffe wie die Thearubigene und weitere Theaflavine könnten maßgeblich zur H_2O_2 -Bildung durch schwarzen Tee beitragen.

Bei TF3 als Einzelsubstanz wurden nur geringe H_2O_2 -Konzentrationen gemessen. Die bei $2 \mu\text{M}$ TF3 im Zeitverlauf kontinuierlich zunehmende H_2O_2 -Konzentration korrelierte mit der parallel abnehmenden TF3-Konzentration. Die für EGCG vermutete Chinon-Bildung mit nachfolgender ROS-Bildung könnte auch für TF3 zutreffen und die beobachtete H_2O_2 -Bildung erklären. Weiterführende Untersuchungen zur Bildung von TF3-Chinonen würden darüber Aufschluss geben.

Die gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen wurden durch Vorbehandlung mit Katalase deutlich vermindert. Dieser Effekt war bei grünem und schwarzem Tee weniger stark ausgeprägt als bei den Einzelsubstanzen und ist wahrscheinlich auf die Vielzahl weiterer H_2O_2 -bildender Teeinhaltsstoffe im Tee zurückzuführen.

In Versuchen zu antikanzerogenen Mechanismen von EGCG wurde durch Katalase eine Abschwächung und Unterdrückung der durch EGCG hervorgerufenen Effekte beobachtet (Sakagami et al. 2001; Nakagawa et al. 2004; Hou et al. 2005). *In vitro* wurden in Leukämiezellen unter EGCG-Exposition hohe Konzentrationen von Topoisomerase-DNA-Komplexen nachgewiesen. Katalase verhinderte die Bildung dieser Komplexe, was darauf schließen lässt, dass H_2O_2 diese Aktivität vermittelt (López-Lázaro et al. 2011).

In den Vasodilatationsversuchen der vorliegenden Studie verstärkte die Vorbehandlung mit SOD die Teepolyphenol-induzierte Vasodilatation bei schwarzem Tee signifikant. Bei EGCG, TF3 und grünem Tee war durch Zugabe von SOD im Trend eine leichte Verstärkung der Vasodilatation festzustellen. Für diesen Effekt konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die verstärkte Vasodilatation deutet auf eine zusätzliche Bildung von H_2O_2 durch SOD hin. Somit wäre zu erwarten gewesen, dass die H_2O_2 -Konzentrationen nach Vorbehandlung mit SOD erhöht sind. Dies war jedoch in der Regel nicht der Fall. Möglicherweise spielte ein stabilisierender Effekt durch SOD eine Rolle, so dass die Halbwertszeit der Teepolyphenole verlängert und deren Autooxidation verlangsamt wurde. Neben den beschriebenen können auch noch andere Mechanismen die Vasodilatation durch Teepolyphenole auslösen.

5.5 Möglicher Signalweg für Teepolyphenole

Im Aortenringmodell entstanden vermutlich durch den Zerfall der Teepolyphenole extrazellulär O_2^- und H_2O_2 . Katalase verhinderte die Teepolyphenol-induzierte Relaxation der Aortenringe, SOD verstärkte hingegen signifikant bei schwarzem Tee die Vasodilatation. Eine Verstärkung der Vasodilatation durch SOD war auch bei EGCG, TF3 und grünem Tee zu beobachten, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine extrazelluläre H_2O_2 -Bildung schließen. Dabei ist H_2O_2 sehr wahrscheinlich als Signalmolekül der PI3/AKT-Kinase vorgeschaltet.

Auch Kim et al. (2007) vermuteten ROS (inklusive H_2O_2) in der Teepolyphenol-induzierten Signalkaskade oberhalb der PI3-Kinase, jedoch geht die Arbeitsgruppe von einer intrazellulären ROS-Bildung aus. Da H_2O_2 über biologische Membranen diffundiert, kann sowohl extra- als auch intrazellulär gebildetes H_2O_2 eine Vasodilatation auslösen.

Die Teepolyphenole EGCG und TF3 unterlagen im Aortenringmodell einem schnellen Zerfallsprozess, der vermutlich durch die oxidativen Bedingungen ausgelöst wurde. Ein Autooxidationsprozess mit Bildung verschiedener Dimere/Chinone, die zusätzlich zur Bildung von ROS beitragen, ist wahrscheinlich.

Daneben wird aber auch die Beteiligung von Rezeptoren im Signalweg der Teepolyphenole angenommen. Rezeptoren und ROS könnten gemeinsam an der Vasodilatation beteiligt sein: Teepolyphenole könnten über eine rezeptorvermittelte Signalkaskade die Bildung von ROS im Zellinneren auslösen, welche nachfolgend ebenfalls die PI3/AKT-Kinase aktivieren.

5.6 Abschlussbemerkung

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals anhand des *ex vivo* Aortenringmodells die unterschiedlichen Effekte der Antioxidantien Katalase und SOD auf die Vasodilatation von EGCG, TF3, grünem und schwarzem Tee. Es konnte für alle Interventionen gezeigt werden, dass die Vasodilatation maßgeblich durch H_2O_2 vermittelt wird, und dass sowohl EGCG als auch TF3 einem raschen Zerfallsprozess unterliegen. Dies kann auch für die Teepolyphenole im grünen und schwarzen Tee vermutet werden.

Neben H_2O_2 scheinen noch andere reaktive Spezies an der Vasodilatation der Teepolyphenole beteiligt zu sein. Zur Aufklärung dieser Mechanismen bedarf es weiterer Untersuchungen. Ein möglicher Autooxidationsprozess sollte außer für EGCG auch für andere Teepolyphenole

untersucht werden, um die Rolle von Chinonen bei der Signaltransduktion weiter aufzuklären.

Es ist bekannt, dass moderater sub-toxischer oxidativer Stress den Widerstand der Zellen gegen nachfolgende toxische ROS-Konzentrationen erhöht (Davies et al. 2017). Der in dieser Studie nachgewiesene prooxidative Effekt von EGCG, TF3, grünem und schwarzem Tee löst möglicherweise moderaten oxidativen Stress aus und kann somit zu den beschriebenen positiven Effekten von EGCG, TF3 sowie grünem und schwarzem Tee beitragen.

Trotz aller Belege, die für prooxidative Prozesse der Polyphenole sprechen, konnte dies *in vivo* bislang nicht bestätigt werden. Da H_2O_2 täglich im Körper produziert wird, existieren effektive intra- und extrazelluläre Schutzmechanismen. Takumi-Kobayashi et al. (2008) gehen davon aus, dass Zellen *in vivo* wesentlich bessere antioxidative Schutzmechanismen besitzen als *in vitro*, da H_2O_2 *in vitro* zu DNA-Schädigungen führte, dies jedoch bislang *in vivo* nicht bestätigt werden konnte. Die antioxidativen Effekte der Teepolyphenole traten vorwiegend *in vivo* auf. Unter *in vitro* Kulturbedingungen waren eher prooxidative Effekte zu beobachten. *In vitro* werden Umgebungssauerstoff und gelöster Sauerstoff zu O_2^- und H_2O_2 reduziert. Hinzu kommt, dass unter Kulturbedingungen ein O_2 -Partialdruck von 150 mmHg (entspricht 20 % O_2) angewendet wird. Im Blut liegt dieser jedoch bei 75-100 mmHg, in Körpergeweben sogar noch niedriger. Die prooxidativen Effekte der Catechine können in Körpergeweben, wo der O_2 -Partialdruck wesentlich geringer ist als unter Zellkulturbedingungen, wahrscheinlich nicht ablaufen.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich prooxidativer und antioxidativer Effekte von Teepolyphenolen bedarf es weiterführender Untersuchungen, da auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Aortenringmodell ein *in vitro* Modell darstellt. Daher kann vermutet werden, dass die prooxidativen Effekte durch das Versuchsmodell bedingt sind. Die Begasung der Krebs-Henseleit-Lösung mit 95 % O_2 könnte sowohl die H_2O_2 -Bildung mit nachfolgender Vasodilatation als auch den Zerfall der Teepolyphenole bedingen. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die während des Autooxidationsprozesses gebildeten ROS ebenso zum Zerfall der Teepolyphenole beitragen.

In vivo könnten auch andere Teeinhaltsstoffe wie z.B. die Thearubigene für die vasodilatorischen Effekte verantwortlich sein. Deren Anteil im schwarzen Tee wird auf mindestens 60 % geschätzt (Haslam 2003), Theaflavine nur 2-6 %, Catechine 3-10 % (Yang

und Landau 2000). Es wird vermutet, dass Thearubigene maßgeblich die endothelialen Effekte im schwarzen Tee vermitteln (Lorenz et al. 2009). Thearubigene sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen mit unterschiedlichsten Molekulargewichten, von denen 5000-10.000 verschiedene Verbindungen detektiert werden konnten (Kuhnert et al. 2010). Der Nachweis genau definierter Thearubigene und deren Wirkung ist bislang nicht möglich, so dass Belege für deren positive Wirkung auf die Vasodilatation fehlen.

Der positive Beitrag von grünem Tee auf die Gefäßfunktion wurde bislang den enthaltenen Polyphenolen, insbesondere dem Catechin EGCG, zugeschrieben. An gesunden Probanden konnte erstmals gezeigt werden, dass EGCG höchstwahrscheinlich nicht an einer verbesserten Endothelfunktion durch grünen Tee beteiligt ist. Es wäre somit möglich, dass andere Inhaltsstoffe oder Metaboliten im grünen Tee die Vasodilatation vermitteln (Lorenz et al. 2017).

6 Zusammenfassung

Grünem und schwarzem Tee werden zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System zugeschrieben. Insbesondere wird der Schutz vor Arteriosklerose, Bluthochdruck und die positive Wirkung auf die Gefäßfunktion diskutiert. Darüber hinaus wurden auch antioxidative Effekte der Teepolyphenole beschrieben. *In vitro* wurden aber auch prooxidative Effekte von Teepolyphenolen beobachtet. Diese können selbst oxidiert werden und dadurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroperoxydionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bilden. Einige Arbeitsgruppen gehen von einer Autooxidation mit Bildung von Dimeren/Chinonen der Teepolyphenole aus, was bislang nur *in vitro* gezeigt werden konnte. In diesem Zusammenhang ist bislang nur teilweise verstanden, wie die beschriebenen vasodilatatorischen Effekte der Polyphenole vermittelt werden. Es ist unklar, ob rezeptorvermittelte Signalwege involviert sind oder ob Autooxidation mit Bildung von ROS eine Rolle spielt. Bisher ist bekannt, dass Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) in den Endothelzellen über Proteinkinasen die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch Phosphorylierungen aktiviert und dadurch zu steigender Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und nachfolgender Vasodilatation führt. Als involvierte Proteinkinasen konnten die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3-Kinase), cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und Proteinkinase B (AKT) identifiziert werden. Es wird diskutiert, ob die NO -vermittelte Relaxation der Gefäße eine redoxempfindliche Reaktion ist, die die Anwesenheit von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ benötigt. Diese könnten als frühes Signal die PI3-Kinase/AKT-abhängige eNOS-Phosphorylierung auslösen.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Autooxidation unter Bildung von ROS als übergeordneten Auslöser des PI3/AKT-Kinase-Signalweges untersucht werden. Studienergebnisse zur Autooxidation von EGCG wurden in der vorliegenden Arbeit auf grünen und schwarzen Tee, sowie Theaflavin-3,3'-digallat (TF3) als Bestandteil des schwarzen Tees, erweitert und somit auf verschiedene Teepolyphenole übertragen.

Die Untersuchungen erfolgten in mehreren Schritten, um die Ergebnisse mit verschiedenen Methoden zu verifizieren. Basis aller Untersuchungen bildete das Aortenringmodell aus der Ratte, welches als *ex vivo* Versuchsmodell die *in vivo* Situation im Blutgefäß nachstellt. Um die Beteiligung der ROS H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ an der Vasodilatation durch Teepolyphenole zu untersuchen, wurde zu Beginn eines jeden Experimentes als Einmalgabe Superoxiddismutase (SOD, 500 U/ml), Katalase (200 U/ml) oder Mangan(III)tetrakis(1-methyl-)porphyrin (MnTMPyP, 10 μM) dem Organbad zugegeben. Mitgeführt wurden Kontrollringe, die nur

mit Wasser behandelt wurden. Zur Messung der Vasodilatation erfolgte alle 30 Minuten die Gabe von EGCG (0,1 - 10 μM), TF3 (0,02 - 2 μM), sowie grünem oder schwarzem Tee (5 -50 μl , was bei 50 μl ca. 5 μM EGCG bzw. 0,06 μM TF3 entsprach) in die Organbäder. Die Teepolyphenol-induzierte Vasodilatation wurde bei allen Interventionen durch Katalase vollständig verhindert, bei schwarzem Tee durch SOD hingegen signifikant verstärkt. Eine nicht signifikante Verstärkung der Vasodilatation durch SOD war auch bei EGCG, TF3 und grünem Tee zu beobachten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass H_2O_2 maßgeblich die Vasodilatation auslöst.

Die Stabilitätsmessungen von EGCG und TF3 gaben Aufschluss über eine mögliche Autooxidation der Teepolyphenole. EGCG (1 und 10 μM) und TF3 (0,5 und 2 μM) wurden als Einmalgabe dem Organbad zugegeben und nach 1, 15 und 30 Minuten Proben entnommen. Die Messungen von EGCG und TF3 mittels Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie zeigten einen raschen Konzentrationsabfall im zeitlichen Verlauf und unterstützen damit die These der Autooxidation. Dies kann auch für die Teepolyphenole im grünen und schwarzen Tee vermutet werden. Katalase und SOD hatten einen stabilisierenden Effekt auf EGCG und TF3, so dass beide Polyphenole zum Teil in höheren Konzentrationen nachweisbar waren als ohne Antioxidantien.

Des Weiteren wurde mit dem Amplex Red Wasserstoffperoxid Test die durch EGCG und TF3, sowie grünen und schwarzen Tee generierte Menge an H_2O_2 gemessen. EGCG (1 und 10 μM), TF3 (0,5 und 2 μM), sowie grüner und schwarzer Tee (50 μl) wurden als Einmalgabe dem Organbad zugegeben und nach 1, 15 und 30 Minuten Proben entnommen. Bei grünem und schwarzem Tee sowie EGCG und TF3 war nach kurzer Zeit H_2O_2 nachweisbar, dessen Entstehung nach Vorbehandlung mit Katalase und SOD stark vermindert wurde. Es gibt darüber hinaus auch die Möglichkeit der Beteiligung weiterer ROS an der Vasodilatation.

Aus den vorhandenen Ergebnissen kann auf einen extrazellulären Zerfall/Autooxidation der Teepolyphenole unter H_2O_2 -Bildung geschlossen werden. Das extrazellulär gebildete H_2O_2 kann in die Zellen diffundieren und intrazellulär den PI3/AKT-Signalweg mit nachfolgender Phosphorylierung der eNOS und Vasodilatation auslösen. Die hier vorliegende Arbeit stützt damit die Vermutung, dass Teepolyphenole auch prooxidativ wirken können und trägt zum Verständnis der Mechanismen der Vasodilatation durch Teepolyphenole bei. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich prooxidativer und antioxidativer Effekte von Teepolyphenolen bedarf es jedoch weiterführender Untersuchungen. Zudem muss der Frage nachgegangen werden, ob andere Inhaltsstoffe oder Metaboliten im grünen und schwarzen Tee die Vasodilatation vermitteln.

7 Summary

The role of reactive oxygen species during vasodilatation by tea polyphenols

Green and black tea are attributed to numerous health promoting effects on the cardiovascular system. In particular, the protection against arteriosclerosis, hypertension and the positive effect on vascular function is discussed. In addition, antioxidant effects of tea polyphenols have been described. *In vitro*, however, prooxidative effects of tea polyphenols have also been observed. They can be oxidized themselves and thereby form reactive oxygen species (ROS) like hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide ($O_2^{\cdot-}$). Some studies assume autooxidation of tea polyphenols with the formation of dimers/quinones, which has been demonstrated *in vitro* only.

In this context, it is still unclear how the described vasodilatory effects of polyphenols are mediated. It is unknown if receptor-mediated signaling pathways are involved or if autooxidation with the formation of ROS takes place. In endothelial cells, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) activates the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by phosphorylation of protein kinases that results in increased nitric oxide (NO) production and vasodilatation. Phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3-kinase), cAMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase B (AKT) were identified as protein kinases involved in this process. It is discussed whether the NO-mediated relaxation of the vessels is a redox-sensitive reaction that requires the presence of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$. These could trigger the PI3-kinase/AKT-dependent eNOS phosphorylation as an early signal.

In the present work, the possible autooxidation with the formation of ROS as a trigger of the PI3/AKT kinase signaling pathway was investigated. Previous results on the autooxidation of EGCG were extended to green and black tea, as well as to theaflavin-3,3'-digallate (TF3) as a component of black tea.

The investigations were carried out in several steps in order to verify the results with different methods. All investigations were done with the rat aortic ring model, an *ex vivo* experimental model, which simulates the *in vivo* situation in the blood vessels. To investigate the involvement of the ROS H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ in the vasodilation of tea polyphenols, a single dose of superoxide dismutase (SOD, 500 U/ml), catalase (200 U/ml) or mangan(III)tetrakis(1-methyl-)porphyrine (MnTMPyP, 10 μ M) was added to organ baths at the beginning of each experiment. Control rings were treated with water only.

To measure vasodilation, every 30 minutes EGCG (0.1 - 10 μM), TF3 (0.02 - 2 μM), green or black tea (5 -50 μl , which correspond to about 5 μM EGCG or 0.06 μM TF3 at 50 μl) were given to organ baths. Tea polyphenol-induced vasodilatation in the aortic ring model was completely prevented by catalase, but was significantly enhanced by SOD in black tea and not significantly enhanced in EGCG, TF3 and green tea. The results suggest that H_2O_2 is a major cause of vasodilatation.

The stability measurements of EGCG and TF3 revealed a possible autooxidation of tea polyphenols. EGCG (1 and 10 μM) and TF3 (0.5 and 2 μM) were added as a single dose to organ bath and sampled after 1, 15 and 30 minutes. Measurements of EGCG and TF3 concentrations through ultra-high-pressure liquid chromatography revealed a strong reduction over time and thus support the hypothesis of autooxidation. This may also be suspected for the tea polyphenols in green and black tea. Catalase and SOD had a stabilizing effect on EGCG and TF3, so that both polyphenols were partly detectable in higher concentrations than without antioxidant.

Furthermore, the Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay was used to measure the amount of H_2O_2 induced by EGCG and TF3, as well as green and black tea. EGCG (1 and 10 μM), TF3 (0.5 and 2 μM), as well as green and black tea (50 μl) were added as a single dose to the organ bath and sampled after 1, 15 and 30 minutes. By using green and black tea, as well as EGCG and TF3, H_2O_2 was measured within a short time, that was diminished by pretreatment with catalase and SOD. However, the involvement of further ROS in the process of vasodilatation cannot be excluded.

From the present results, an extracellular decay/autooxidation of tea polyphenols with concurrent formation of H_2O_2 is concluded. These extracellular generated H_2O_2 can diffuse into the cells and trigger the PI3/AKT signaling pathway followed by phosphorylation of eNOS and vasodilatation. The present work thus supports the assumption of prooxidative effects of tea polyphenols and contributes to the understanding of the mechanisms of vasodilatation by tea polyphenols. However, due to the contrary results regarding the prooxidative and antioxidant effects of tea polyphenols, further investigations are needed. In addition, the question must be investigated whether other ingredients or metabolites in green and black tea mediate vasodilation.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur der im Tee vorliegenden Catechine und Theaflavine	5
Abb. 2: Bildung von Stickstoffmonoxid (NO)	9
Abb. 3: Durch Stickstoffmonoxid (NO) induzierte Vasodilatation	10
Abb. 4: Vaskuläre reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen	15
Abb. 5: Möglicher Mechanismus der Autooxidation von EGCG	18
Abb. 6: Messplatz für sechs Aortenringe zur Messung der Vasoreaktivität	27
Abb. 7: Doppelwandiges Glasgefäß mit eingehängtem Aortenring im Organbad	28
Abb. 8: Kontraktionskraftaufnehmer und Feinpositionierelement	28
Abb. 9: Zeitliches Behandlungsschema der Vasoreaktivitätsexperimente	31
Abb. 10: Umwandlung von Amplex Red zum rot fluoreszierenden Resorufin unter Reduktion von H_2O_2 zu Wasser	33
Abb. 11: Acetylcholin-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Antioxidantien	37
Abb. 12: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml)	38
Abb. 13: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml)	39
Abb. 14: EGCG-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 μ M)	40
Abb. 15: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml)	41
Abb. 16: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml)	42
Abb. 17: Durch grünen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 μ M)	43
Abb. 18: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml)	44
Abb. 19: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml)	45
Abb. 20: TF3-induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 μ M)	46
Abb. 21: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von Katalase (200 U/ml)	47
Abb. 22: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von SOD (500 U/ml)	48
Abb. 23: Durch schwarzen Tee induzierte Vasodilatation mit und ohne Zugabe von MnTMPyP (10 μ M)	49

Abb. 24: EGCG-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung mit Zugabe von 1 μ M EGCG und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	51
Abb. 25: EGCG-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 10 μ M EGCG und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml), SOD (500 U/ml) bzw. MnTMPyP (10 μ M)	52
Abb. 26: TF3-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 0,5 μ M TF3 und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml) nach 1, 15 und 30 Minuten	53
Abb. 27: TF3-Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 2 μ M TF3 und Vorbehandlung mit und ohne Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	54
Abb. 28: H ₂ O ₂ -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 1 μ M EGCG mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	55
Abb. 29: H ₂ O ₂ -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 10 μ M EGCG mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	56
Abb. 30: H ₂ O ₂ -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 50 μ l grünem Tee mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	57
Abb. 31: H ₂ O ₂ -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 0,5 μ M TF3 mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	58
Abb. 32: H ₂ O ₂ -Nachweis in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 2 μ M TF3 mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	59
Abb. 33: H ₂ O ₂ -Konzentrationen in der Krebs-Henseleit-Lösung nach Zugabe von 50 μ l schwarzem Tee mit und ohne Vorbehandlung mit Katalase (200 U/ml) bzw. SOD (500 U/ml)	60
Abb. 34: Zusammenfassung der H ₂ O ₂ -Konzentrationsmessungen	62
Abb. 35: Schematische Darstellung der Ergebnisse aus den Vasodilatationsversuchen und den Polyphenol- und H ₂ O ₂ -Konzentrationsmessungen	63
Abb. 36: Möglicher Mechanismus der Vasodilatation durch EGCG	70
Abb. 37: Möglicher Mechanismus der verstärkten Teepolyphenol-induzierten Vasodilatation durch SOD	72

9 Literaturverzeichnis

Aggio A, Grassi D, Onori E, D'Alessandro A, Masedu F, Valenti M, Ferri C. (2013). Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur J Nutr.* 52, 263-72.

Andrew PJ, Mayer B (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 43, 521-31.

Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* 128, 2324-33.

Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF Jr (2004). Activation of endothelial nitric oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem.* 279, 46637-43.

Anter E, Chen K, Shapira OM, Karas RH, Keaney JF Jr (2005). p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor alpha-dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circ Res.* 96, 1072-8.

Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D (2001). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* 74, 227-32.

Auger C, Kim JH, Chabert P, Chaabi M, Anselm E, Lanciaux X, Lobstein A, Schini-Kerth VB (2010). The EGCG-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochem Biophys Res Commun.* 393, 162-7.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272, 217-21.

Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37, 693-704.

Bodiga S, Gruenloh SK, Gao Y, Manthathi VL, Dubasi N, Falck JR, Medhora M, Jacobs ER (2010). 20-HETE-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is mediated by NADPH oxidase, H₂O₂, and PI3-kinase/Akt. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 298, L564-74.

Bruckdorfer R (2005). The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 26, 3-31.

Brunel A, Lang J, Couture M, Boucher JL, Dorlet P, Santolini J (2016). Oxygen activation in NO synthases: evidence for a direct role of the substrate. *FEBS Open Bio.* 6, 386-97.

Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, Warnakula S, Wood A, Di Angelantonio E, Franco OH (2011). Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 343, d4488.

- Buresh R, Berg K (2015). A tutorial on oxidative stress and redox signaling with application to exercise and sedentariness. *Sports Med Open*. 1, 3.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R (2006). Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*. 25, 79-99.
- Chow HH, Cai Y, Alberts DS, Hakim I, Dorr R, Shahi F, Crowell JA, Yang CS, Hara Y (2001). Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10, 53-8.
- Collins QF, Liu HY, Pi J, Liu Z, Quon MJ, Cao W (2007). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 282, 30143-9.
- Crespy V, Williamson G (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr*. 134, 3431S-3440S.
- Davies JMS, Cillard J, Friguet B, Cadenas E, Cadet J, Cayce R, Fishmann A, Liao D, Bulteau AL, Derbré F, Rébillard A, Burstein S, Hirsch E, Kloner RA, Jakowec M, Petzinger G, Sauce D, Sennlaub F, Limon I, Ursini F, Maiorino M, Economides C, Pike CJ, Cohen P, Salvayre AN, Halliday MR, Lundquist AJ, Jakowec NA, Mechta-Grigoriou F, Mericskay M, Mariani J, Li Z, Huang D, Grant E, Forman HJ, Finch CE, Sun PY, Pomatto LCD, Agbulut O, Warburton D, Neri C, Rouis M, Cillard P, Crapeau J, Rosenbaum J, Davies KJA (2017). The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *Geroscience*. 39, 499-550.
- De Koning Gans JM, Uiterwaal CS, van der Schouw YT, Boer JM, Grobbee DE, Verschuren WM, Beulens JW (2010). Tea and coffee consumption and cardiovascular morbidity and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30, 1665-71.
- Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, Zock PL, Kromhout D, Hollman PC (2015). Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am J Clin Nutr*. 101, 914-21.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82, 47-95.
- Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA (2001). Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 104, 151-6.
- Ellinsworth DC, Sandow SL, Shukla N, Liu Y, Jeremy JY, Gutterman DD (2016). Endothelium-Derived Hyperpolarization and Coronary Vasodilation: Diverse and Integrated Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids, Hydrogen Peroxide, and Gap Junctions. *Microcirculation*. 23, 15-32.
- Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem*. 16, 144-9.

- Esposito F, Chirico G, Montesano Gesualdi N, Posadas I, Ammendola R, Russo T, Cirino G, Cimino F (2003). Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires SRC activity. *J Biol Chem.* 278, 20828-34.
- Fernando CD, Soysa P (2015). Extraction kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing. *Nutr J.* 14, 74.
- Gao Y, Rankin GO, Tu Y, Chen YC (2016). Theaflavin-3, 3'-digallate decreases human ovarian carcinoma OVCAR-3 cell-induced angiogenesis via Akt and Notch-1 pathways, not via MAPK pathways. *Int J Oncol.* 48, 281-92.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC (1999). Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med.* 159, 2170-4.
- Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VG, Goloborodko E, Patzak A, Wess J, Pfeiffer N (2011). Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300, H1602-8.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H (2005). Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* 7, 1021-31.
- Grassi D, Aggio A, Onori L, Croce G, Tiberti S, Ferri C, Ferri L, Desideri G (2008). Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *J Nutr.* 138, 1554S-1560S.
- Grassi D, Draijer R, Schalkwijk C, Desideri G, D'Angeli A, Francavilla S, Mulder T, Ferri C (2016). Black tea increases circulating endothelial progenitor cells and improves flow mediated dilatation counteracting deleterious effects from a fat load in hypertensive patients: a randomized controlled study. *Nutrients.* 8, pii: E727.
- Griendling KK, FitzGerald GA (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation.* 108, 1912-6.
- Griffith TM, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH (1988). Endothelium-derived relaxing factor. *J Am Coll Cardiol.* 12, 797-806.
- Gundimeda U, McNeill TH, Barseghian BA, Tzeng WS, Rayudu DV, Cadenas E, Gopalakrishna R (2015). Polyphenols from green tea prevent antineuritogenic action of Nogo-A via 67-kDa laminin receptor and hydrogen peroxide. *J Neurochem.* 132, 70-84.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1-85.
- Haslam E (2003). Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry.* 64, 61-73.
- Hernández I, Alegre L, Munné-Bosch S (2006). Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants. *Phytochemistry.* 67, 1120-6.
- Hsieh SR, Hsu CS, Lu CH, Chen WC, Chiu CH, Liou YM (2013). Epigallocatechin-3-gallate-mediated cardioprotection by Akt/GSK-3 β /caveolin signalling in H9c2 rat cardiomyoblasts. *J Biomed Sci.* 20, 86.

- Hodgson JM, Devine A, Puddey IB, Chan SY, Beilin LJ, Prince RL (2003). Tea intake is inversely related to blood pressure in older women. *J Nutr.* 133, 2883-6.
- Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS (2002). Stability, cellular uptake, biotransformation and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62, 7241-6.
- Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, Cassidy A (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Clin Nutr.* 95, 740-51.
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B (2003). *Biochemie des Menschen.* Thieme Verlag. 482.
- Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS (2005). Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res.* 65, 8049-56.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84, 9265-9.
- Jing T, Ya-Shu K, Xue-Jun W, Han-Jing H, Yan L, Yi-An Y, Fei C, Xue-Bo L (2017). Sirt6 mRNA-incorporated endothelial microparticles (EMPs) attenuates DM patient-derived EMP-induced endothelial dysfunction. *Oncotarget.* 8, 114300-114313.
- Jochmann N, Lorenz M, Krosigk Av, Martus P, Böhm V, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2008). The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr.* 99, 863-8.
- Kellogg JJ, Graf TN, Paine MF, McCune JS, Kvalheim OM, Oberlies NH, Cech NB (2017). Comparison of Metabolomics Approaches for Evaluating the Variability of Complex Botanical Preparations: Green Tea (*Camellia sinensis*) as a Case Study. *J Nat Prod.* 80, 1457-1466.
- Khan N, Mukhtar H (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci.* 81, 519-33.
- Kim JA, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, Quon MJ (2007). Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem.* 282, 13736-45.
- Klaunig JE, Xu Y, Han C, Kamendulis LM, Chen J, Heiser C, Gordon MS, Mohler ER 3rd (1999). The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220, 249-54.
- Kuhnert N, Drynan JW, Obuchowicz J, Clifford MN, Witt M (2010). Mass spectrometric characterization of black tea thearubigins leading to an oxidative cascade hypothesis for thearubigin formation. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24, 3387-404.

- Kumazoe M, Kim Y, Bae J, Takai M, Murata M, Suemasu Y, Sugihara K, Yamashita S, Tsukamoto S, Huang Y, Nakahara K, Yamada K, Tachibana H (2013). Phosphodiesterase 5 inhibitor acts as a potent agent sensitizing acute myeloid leukemia cells to 67-kDa laminin receptor-dependent apoptosis. *FEBS Lett.* 587, 3052-7.
- Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I (2006). Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA.* 296, 1255-65.
- Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (2002). Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11, 1025-32.
- Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.* 54, 87-92.
- Leitão EFV, Ventura E, de Souza MAF, Riveros JM, do Monte SA (2017). Spin-Forbidden Branching in the Mechanism of the Intrinsic Haber-Weiss Reaction. *ChemistryOpen.* 6, 360-363.
- Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr.* 131, 2248-51.
- Li CH, Yang YC, Wu JS, Huang YH, Lee CT, Lu FH, Chang CJ (2014). Increased tea consumption is associated with decreased arterial stiffness in a Chinese population. *PLoS One.* 9, e86022.
- Li J (2018). Neuroprotective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on autoimmune thyroiditis in a rat model by an anti-inflammation effect, anti-apoptosis and inhibition of TRAIL signaling pathway. *Exp Ther Med.* 15, 1087-1092.
- Li X, Yu C, Guo Y, Bian Z, Si J, Yang L, Chen Y, Ren X, Jiang G, Chen J, Chen Z, Lv J, Li L; China Kadoorie Biobank Collaborative Group (2017). Tea consumption and risk of ischaemic heart disease. *Heart.* 103, 783-789.
- Liu Y, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX, Gutterman DD (2011). H₂O₂ is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circ Res.* 108, 566-73.
- Long LH, Clement MV, Halliwell B (2000). Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Commun.* 273, 50-3.
- Long LH, Kirkland D, Whitwell J, Halliwell B (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutat Res.* 634, 177-83.
- López-Lázaro M, Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Austin CA (2011). Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis.* 26, 489-98.

- Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Düsterhöft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2004). A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem.* 279, 6190-5.
- Lorenz M, Urban J, Engelhardt U, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2009). Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res Cardiol.* 104, 100-10.
- Lorenz M, Klinkner L, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2015). Endothelial NO production is mandatory for epigallocatechin-3-gallate-induced vasodilation: results from eNOS knockout (eNOS^{-/-}) mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 65, 607-10.
- Lorenz M, Rauhut F, Hofer C, Gwosc S, Müller E, Praeger D, Zimmermann BF, Wernecke KD, Baumann G, Stangl K, Stangl V (2017). Tea-induced improvement of endothelial function in humans: no role for epigallocatechin gallate (EGCG). *Sci Rep.* 7, 2279.
- Lu Y, Chen J, Xian T, Zhou Y, Yuan W, Wang M, Gan Y, Wang K, Xiong S, Ma C, Yu X, Huang Q (2017). Epigallocatechin-3-gallate suppresses differentiation of adipocytes via regulating the phosphorylation of FOXO1 mediated by PI3K-AKT signaling in 3T3-L1 cells. *Oncotarget.* 9, 7411-7423.
- Lüllmann-Rauch Renate, Paulsen Friedrich (2012). Taschenlehrbuch Histologie. 4. vollständig überarbeitete Auflage. Thieme Verlag. 242-245.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 106, 1521-30.
- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A (2002). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 290, 909-13.
- Miller PE, Zhao D, Frazier-Wood AC, Michos ED, Averill M, Sandfort V, Burke GL, Polak JF, Lima JAC, Post WS, Blumenthal RS, Guallar E, Martin SS (2017). Associations of Coffee, Tea, and Caffeine Intake with Coronary Artery Calcification and Cardiovascular Events. *Am J Med.* 130, 188-197.
- Mittal CK, Murad F (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 4360-4.
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD (2003). Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 92, e31-40.
- Mochizuki M, Yamazaki S, Kano K, Ikeda T (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta.* 1569, 35-44.
- Mujtaba T, Dou QP (2012). Black tea polyphenols inhibit tumor proteasome activity. *In Vivo.* 26, 197-202.

- Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA (2002). Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*. 105, 2476-81.
- Nagaya N, Yamamoto H, Uematsu M, Itoh T, Nakagawa K, Miyazawa T, Kangawa K, Miyatake K (2004). Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart*. 90, 1485-6.
- Nakagawa H, Hasumi K, Woo JT, Nagai K, Wachi M (2004). Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*. 25(9), 1567-74.
- Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y (2004). Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 134, 38-42.
- Neilson AP, Song BJ, Sapper TN, Bomser JA, Ferruzzi MG (2010). Tea Catechin auto-oxidation dimers are accumulated and retained by Caco-2 human intestinal cells. *Nutr Res*. 2010 30, 327-40.
- Park SW, Noh HJ, Sung DJ, Kim JG, Kim JM, Ryu SY, Kang K, Kim B, Bae YM, Cho H (2015). Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Pflugers Arch*. 467, 285-97.
- Peters U, Poole C, Arab L (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 154, 495-503.
- Petersen RC. Reactive Secondary Sequence Oxidative Pathology Polymer Model and Antioxidant Tests (2012). *Int Res J Pure Appl Chem*. 2, 247-285.
- Prasad K, Bharadwaj LA (1996). Hydroxyl radical--a mediator of acetylcholine-induced vascular relaxation. *J Mol Cell Cardiol*. 28, 2033-41.
- Radomska-Leśniewska DM, Bałan BJ, Skopiński P (2017). Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. *Cent Eur J Immunol*. 42, 370-376.
- Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P (2003). Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem*. 14, 326-32.
- Raj L (2006). Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 8, 30-9.
- Ras RT, Zock PL, Draijer R (2011). Tea consumption enhances endothelial-dependent vasodilation; a meta-analysis. *PLoS One*. 6, e16974.
- Reis JP, Loria CM, Steffen LM, Zhou X, van Horn L, Siscovick DS, Jacobs DR Jr, Carr JJ (2010). Coffee, decaffeinated coffee, caffeine, and tea consumption in young adulthood and atherosclerosis later in life: the CARDIA study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30, 2059-66.
- Reiter CE, Kim JA, Quon MJ (2010). Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology*. 151, 103-14.

- Roginsky V, Alegria AE (2005). Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *J Agric Food Chem.* 53, 4529-35.
- Rösen P (2002). Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *J Kardiol.* 9, 556-62.
- Roth S, Dröge W (1987). Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol.* 108, 417-24.
- Sakagami H, Arakawa H, Maeda M, Satoh K, Kadofuku T, Fukuchi K, Gomi K (2001). Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxidants. *Anticancer Res.* 21, 2633-41.
- San Cheang W, Yuen Ngai C, Yen Tam Y, Yu Tian X, Tak Wong W, Zhang Y, Wai Lau C, Chen ZY, Bian ZX, Huang Y, Ping Leung F (2015). Black tea protects against hypertension-associated endothelial dysfunction through alleviation of endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep.* 15, 10340.
- Sanae F, Miyaichi Y, Kizu H, Hayashi H (2002). Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aorta with endothelium. *Life Sci.* 71, 2553-62.
- Sang S, Lee MJ, Hou Z, Ho CT, Yang CS (2005). Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J Agric Food Chem.* 53, 9478-84.
- Sang S, Yang I, Buckley B, Ho CT, Yang CS (2007). Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic Biol Med.* 43, 362-71.
- Sang S, Lambert JD, Ho CT, Yang CS (2011). The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol Res.* 64, 87-99.
- Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K, Liu Y, Washio M, Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Arai H, Doi Y, Kawano T, Nakagaki O, Takada K, Koyanagi S, Hiyamuta K, Nii T, Shirai K, Ideishi M, Arakawa K, Mohri M, Takeshita A (2000). Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol.* 10, 401-8.
- Sato A, Sakuma I, Gutterman DD (2003). Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285, H2345-54.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-58.
- Shen JZ, Zheng XF, Wei EQ, Kwan CY (2003). Green tea catechins evoke a phasic contraction in rat aorta via H₂O₂-mediated multiple-signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30, 88-95.

- Sindler AL, Delp MD, Reyes R, Wu G, Muller-Delp JM (2009). Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol.* 587, 3885-97.
- Stangl V, Lorenz M, Stangl K (2006). The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res.* 50, 218-28.
- Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M (2007). Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 73: 348-58.
- Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH (2006). Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg.* 202, 813-25.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 270, 296-9.
- Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol.* 11, 380-1.
- Takaki A, Morikawa K, Murayama Y, Yamagishi H, Hosoya M, Ohashi J, Shimokawa H (2008). Roles of endothelial oxidases in endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 52, 510-7.
- Takemoto M, Takemoto H, Kouno H, Soeda T, Moriya T (2017). A Simple, Enzymatic Biotransformation Method Using Fresh Green Tea Leaves Efficiently Generates Theaflavin-Containing Fermentation Water That Has Potent Physiological Functions in Mice and Humans. *Biol Pharm Bull.* 40, 860-866.
- Takumi-Kobayashi A, Ogura R, Morita O, Nishiyama N, Kasamatsu T (2008). Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins in vitro and implications for risk assessment. *Mutat Res.* 657, 13-8.
- Tamma G, Valenti G, Grossini E, Donnini S, Marino A, Marinelli RA, Calamita G (2018). Aquaporin Membrane Channels in Oxidative Stress, Cell Signaling, and Aging: Recent Advances and Research Trends. *Oxid Med Cell Longev.* 2018, 1501847.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279, L1005-28.
- Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr (2002). Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 277, 6017-24.
- Tong X, Taylor AW, Giles L, Wittert GA, Shi Z (2014). Tea consumption is inversely related to 5-year blood pressure change among adults in Jiangsu, China: a cross-sectional study. *Nutr J.* 13, 98.
- Tsai CY, Chen CY, Chiou YH, Shyu HW, Lin KH, Chou MC, Huang MH, Wang YF (2017). Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Human Herpesvirus 8 Replication and Induces ROS Leading to Apoptosis and Autophagy in Primary Effusion Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2017 19.

- Tu Y, Kim E, Gao Y, Rankin GO, Li B, Chen YC (2016). Theaflavin-3, 3'-digallate induces apoptosis and G2 cell cycle arrest through the Akt/MDM2/p53 pathway in cisplatin-resistant ovarian cancer A2780/CP70 cells. *Int J Oncol.* 48, 2657-65.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.
- Van Amelsvoort JM, Van Hof KH, Mathot JN, Mulder TP, Wiersma A, Tijburg LB (2001). Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica.* 31, 891-901.
- Wang C, Lv S, Wu Y, Gao X, Li J, Zhang W, Meng Q (2016). Oolong tea made from tea plants from different locations in Yunnan and Fujian, China showed similar aroma but different taste characteristics. *Springerplus.* 5, 576.
- Weisburg JH, Weissman DB, Sedaghat T, Babich H (2004). In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 95, 191-200.
- Widlansky ME, Duffy SJ, Hamburg NM, Gokce N, Warden BA, Wiseman S, Keaney JF Jr, Frei B, Vita JA (2005). Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med.* 38, 499-506.
- Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, Keaney JF Jr, Vita JA (2007). Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Nutr.* 26, 95-102.
- Yang CS, Landau JM (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr.* 130, 2409-12.
- Yang YC, Lu FH, Wu JS, Wu CH, Chang CJ (2004). The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med.* 164, 1534-40.
- Yoshino K, Suzuki M, Sasaki K, Miyase T, Sano M (1999). Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *J Nutr Biochem.* 10, 223-9.
- Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74, 139-62.
- Yu J, Lin JJ, Yu R, He S, Wang QW, Cui W, Zhang JR (2017). Fucoxanthin prevents H₂O₂-induced neuronal apoptosis via concurrently activating the PI3-K/Akt cascade and inhibiting the ERK pathway. *Food Nutr Res.* 61, 1304678.
- Zhang DX, Borbouse L, Gebremedhin D, Mendoza SA, Zinkevich NS, Li R, Gutterman DD (2012). H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ Res.* 110, 471-80.

Zhao S, Li L, Wang S, Yu C, Xiao B, Lin L, Cong W, Cheng J, Yang W, Sun W, Cui S (2016). H₂O₂ treatment or serum deprivation induces autophagy and apoptosis in naked mole-rat skin fibroblasts by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncotarget*. 7, 84839-84850.

Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH (2005). Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res*. 58, 1192-7.

10 Publikationsverzeichnis

Ich werde Ko-Autorin in der folgenden Publikation sein:

“Vasodilation of tea polyphenols ex vivo is mediated by hydrogen peroxide under rapid compound decay.”

Manuskript in Vorbereitung

11 Danksagung

Herrn PD Dr. Christoph Gabler vom Institut für Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin danke ich für die sehr engagierte Begutachtung und konstruktiv kritische Auseinandersetzung mit meiner Dissertation. Dies hat mich motiviert meiner Doktorarbeit den nötigen Feinschliff zu geben.

Frau Prof. Verena Stangl danke ich für die Überlassung dieses sehr spannenden Themas und für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit im Kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Fakultät der Charité.

Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz danke ich für seine kontinuierliche und stets kompetente Betreuung, die sehr gute fachliche Unterstützung und für die vielen praktischen und wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge in jeder Phase dieser Arbeit. Dies hat mir geholfen, meine Arbeit stets weiterzuentwickeln und die einzelnen Teile zu einem Ganzen zusammenzuführen.

Herrn Dipl. Ing. Thomas Düsterhöft danke ich für die technische und organisatorische Begleitung während meiner gesamten Labortätigkeit. Seine geduldige Unterstützung bei der Bewältigung verschiedenster Probleme im Laboralltag waren mir eine enorme Hilfe.

Frau Dr. rer. nat. Antje Ludwig danke ich für die hilfreichen Anregungen bei der Durchführung der statistischen Auswertung.

Angelika Vietzke danke ich für vielfältige Hilfestellungen in verschiedenen Bereichen wie dem ELISA-Reader und bei spezifischen Fragen der Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors danke ich für das freundliche und stets sehr angenehme Arbeitsklima.

Herrn Benno Zimmermann von der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn danke ich für die Durchführung der UHPLC-Messungen, ohne die ein Teil dieser Arbeit nicht hätte angefertigt werden können.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie für das Verständnis und die Unterstützung während der Höhen und Tiefen, die mit dem Schreiben einer Dissertation einhergehen.

12 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Stephanie Lehmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 08.10.2019

Stephanie Lehmann



9 783967 290134

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-013-4