

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

DISSERTATION

**Der Effekt des Polyphenols Epigallocatechingallat auf die Bildung von Sauerstoffradikalen
im Reperfusionsschaden in der Skelettmuskulatur der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Liliane Kieback

aus Ludwigshafen am Rhein/Oggersheim

Gutachter/in: 1. Prof .Dr. med. R. Büttemeyer.....
2. Prof. Dr. med. P. M. Vogt.....
3. Prof. Dr. med. R. E. Horch.....

Datum der Promotion: 30.11.2012



Meiner Familie gewidmet

DER EFFEKT DES POLYPHENOLS EPIGALLOCATECHINGALLAT AUF
DIE BILDUNG VON SAUERSTOFFRADIKALEN IM
REPERFUSIONSSCHADEN IN DER SKELETTMUSKULATUR DER
RATTE

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	7
1.1. Ischämiebedingte Gewebsschäden.....	7
1.2 Postischämischer Reperfusionsschaden.....	10
1.3 Protektionsmöglichkeiten vor einem Reperfusionsschaden.....	18
1.4. Ziele der Untersuchungen	22
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1. Kurzbeschreibung des Versuchs	23
2.2. Tierversuchsgenehmigung.....	24
2.3. Versuchstiere.....	24
2.4. Der Cytochrom-C-Biosensor.....	25
2.6. Epigallocatechingallat-Präparation.....	33
2.7. Operation.....	33
2.8. Versuchsablauf.....	34
2.9. Statistik	37
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1. In-vitro-Voruntersuchungen Cytochrom-C-Biosensor (Kontrolle Sensor/ Kalibrierungssignal).....	38
3.2. Ergebnisse Ischämie/ Reperfusion.....	40
3.3. Histologie: Muskelpräparate Kontrollgruppe versus EGCG.....	50
4. DISKUSSION.....	65
4.1. Bewertung der Ergebnisse.....	65
4.2. Bedeutung der computergestützten Messung mit Cytochrom-C-Sensor	66
4.3. Vergleich mit anderen Experimenten	67
4.4. Klinische Bedeutung.....	68
4.5. Limitationen.....	70
4.6. Zusammenfassung.....	71
Abbildungsverzeichnis.....	73

Tabellenverzeichnis	75
Literaturverzeichnis	76
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
LEBENS LAUF	82
Publikationsliste	83
Erklärung an Eides Statt.....	85

1. EINLEITUNG

1.1. ISCHÄMIEBEDINGTE GEWEBSSCHÄDEN

Ischämie ist definiert als die Unterbrechung der Perfusion eines Gewebes mit sauerstoffreichem Blut. Wird die gewebsabhängige Ischämietoleranzzeit überschritten, drohen irreversible Gewebsschäden, die bis zur Zellnekrose führen und auch entfernte Organe oder sogar den gesamten Organismus beeinträchtigen können^{1,2,3,4}.

Es entsteht eine absolute Hypoxie, die eine Umstellung des Zellstoffwechsels zur Folge hat. Die Auswirkung des Sauerstoffmangels auf die einzelne Zelle ist von der Ischämiedauer, dem Zelltyp (verschiedene Organe besitzen unterschiedliche Ischämietoleranzen) und dessen metabolischen Bedürfnissen abhängig⁵. Sauerstoff ist unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase der menschlichen Zelle. Er wird vor allem für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebraucht, die als Hauptenergielieferant der Zelle für energiereiche Phosphatverbindungen in Form des ATP fungiert.

Bei Sauerstoffmangel verbraucht die Zelle zunächst verbleibende Speicher (u. a. aus Myoglobin), und es kommt zur Umstellung auf den anaeroben Stoffwechsel mit Abbau des ATP-Vorrats der Zelle². Der aerobe Zellstoffwechsel wird auf die wesentlich ineffizientere anaerobe Glykolyse umgestellt. Der Bedarf an energiereichen Substraten übertrifft schnell die Produktion. Die Anhäufung von Laktat und Protonen sowie die verminderte Oxidation

von Nicotinamid Adenine Dinucleotid Phosphat (NADPH₂) durch die Mitochondrien führen zur Azidose der Zelle, die wiederum die anaerobe Glykolyse hemmt².

Bei einem ATP-Mangel kommt es zum Abbau von ATP zu ADP, ADP wird zu AMP reduziert und AMP schließlich zu Adenosin. Da Adenosin frei durch die Zellmembran diffundieren kann, vermindert sich das zelluläre Adenosin².

Die intrazelluläre Azidose beeinträchtigt zunächst zelluläre Funktionen, bei stärkerer Ausprägung Membranstrukturen; sie kann bis zum kompletten Funktionsverlust der Zelle führen. Auf Grund des ATP-Mangels kommt es zu einer verminderten Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase, das Membranpotential kann nicht aufrechterhalten werden und Natrium strömt in die Zelle. Durch die intrazelluläre Azidose wird die Na⁺/H⁺-Gegenpumpe stimuliert, was zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führt. Die Na⁺/Ca⁺-Gegenpumpe erlaubt den Ausstrom von Natrium im Austausch mit Calciumionen. Es kommt zu einer Akkumulation von Calcium².

Die Anhäufung osmotisch aktiver Substanzen wie z. B. Laktat und anorganische Phosphate bewirkt ein Zellödem².

Die intrazelluläre Hyperkalziämie induziert verschiedene degenerative Prozesse. Betroffen sind das sarkoplasmatische Retikulum, Phospholipide sowie Proteine des Zytoskeletts; die Degeneration infolge intrazellulärer Hyperkalziämie verändert die Calciumaffinität und Effektivität der kontraktilen Funktionsstrukturen. Zudem verändert die Hyperkalziämie die Tertiärstruktur von Enzymen, z. B. modifiziert sie die Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase².

1.1.1 HYPERKALZIÄMIE/ ZELLUNTERGANG

Infolge der intrazellulären Hyperkalziämie kommt es sekundär zu einer mitochondrialen Hyperkalziämie⁶. Dabei entsteht ein mitochondriales Ödem, die übergeordnete Molekülstruktur der Innenmembran wird zerstört und das für die oxidative Phosphorylierung notwendige Membranpotential aufgehoben. Das Mitochondrium verliert seine Funktion. Mit dem Verlust des Membranpotentials öffnen sich irreversibel mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Poren (PTP). Physiologisch ist die innere Mitochondrienmembran nur für Sauerstoff, Wasser und CO₂ durchlässig⁶. Für alle anderen Substanzen kann der Stoffaustausch nur über spezifische Transportsysteme erfolgen. Die mitochondriale Hyperkalziämie bildet den wesentlichen Trigger zum Öffnen der PTP². Bei Hyperkalziämie und geöffneten PTP wird eine Hyperkontraktur der Myofibrillen ausgelöst⁷.

1.1.2 LEUKOZYTEN/ ADHÄSIONSMOLEKÜLE

Ischämie stimuliert die Ausbildung und Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen an der Oberfläche der intravasalen Endothelzellen wie P-Selektin, L-Selektin, Interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs) und Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekülen (PECAMs), zudem kommt es zur Sekretion von Zytokinen wie TNF α , Interleukin-1, -6, -8 und anderen sowie von vasoaktiven Substanzen wie Endothelin und Thromboxane A₂^{2,8}.

Zusammenfassend seien die wichtigsten zellulären Effekte der Hypoxie aufgezählt:
zelluläre Azidose, Verlust des sarkoplasmatischen Membranpotentials, Zellschwellung, Zerstörung des Zytoskeletts, Reduktion von ATP, Phosphokreatin, Glutathion und alpha-

Tocopherol sowie verstärkte Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen und Sekretion von Zytokinen (TNF alpha, IL-1, -6, -8 u. a.)^{2,9}.

1.2 POSTISCHÄMISCHER REPERFUSIONSSCHADEN

Eine Reperfusion ist essentiell für die Lebens- und Funktionsfähigkeit des Gewebes bzw. Organs. Der Reperfusionsschaden kann paradoxerweise den Nutzen der Wiederherstellung der Durchblutung mit sauerstoffreichem Blut reduzieren. Der Reperfusionsschaden ist definiert als Schädigung des Gewebes, verursacht durch die Wiederherstellung der Zirkulation nach einer Phase der Ischämie^{5,10}. Der wieder verfügbare Sauerstoff ruft eine Vielzahl von Reaktionen und Schäden hervor.⁵ Dies kann bis zum Zelluntergang führen. Während der Reperfusionsphase führt u. a. der intrazelluläre Mangel an Adenosin zur verlangsamt Neusynthese von ATP².

Die Mechanismen, die den Reperfusionsschaden verursachen, und seine zellulären wie klinischen Folgen werden oft unter dem Begriff des Ischämie- Reperfusionssyndroms (I/R-Syndrom= IRS) zusammengefasst. Das I/R-Syndrom löst zunächst im Wesentlichen eine lokale Entzündungsreaktion aus, die vor allem das betroffene Organ schädigt. Es entwickelt sich jedoch eine Reaktion des gesamten Organismus, die zur Schädigung anderer, entfernter Organe führen kann¹.

Histologisch ließ sich nach dreistündiger Ischämiedauer und einstündiger Reperfusionsdauer in Gewebe aus der Leber oder dem Magen-Darmtrakt deutlich mehr Nekrose des Parenchyms (Leber bzw. Mukosamembranen) nachweisen als in der Vergleichsgruppe nach vierstündiger Ischämie ohne Reperfusion³⁻⁵.

1.2.1 PATHOPHYSIOLOGIE DES REPERFUSIONSSCHADENS

Durch die während der Reperfusion massiv produzierten Zytokine wird eine Entzündungsreaktion verursacht. Neutrophile Granulozyten werden durch nun präsentierte Oberflächenadhäsionsmoleküle aktiviert, ihre Konzentration steigt exponentiell und sie gelangen in das Interstitium. Infolge einer Erhöhung der endothelialen Durchlässigkeit mit Flüssigkeits- und Albuminextravasation bildet sich ein interstitielles Ödem aus^{8, 10}.

1.2.2 XANTHIN-OXIDOREDUKTASE

Die Xanthin-Oxidoreduktase spielt eine wesentliche Rolle in der Generierung des IR-Syndroms. Unter normalen Bedingungen wird Xanthin über Hypoxanthin mit Hilfe der Xanthin-Dehydrogenase zu Harnsäure abgebaut. Die Xanthinoxidoreduktase ist die generische Bezeichnung eines Enzyms, das in zwei unterschiedlichen, ineinander umwandelbaren, funktionell verschiedenen Formen auftritt: Xanthindehydrogenase (XD), die physiologisch ständig in vivo exprimiert wird, und die posttranskriptionell veränderte Form Xanthinoxidase (XO)¹¹. Bei Ischämie sowie durch Proteasen, Zytokine und andere Entzündungsmediatoren kommt es zu einem deutlichen Anstieg der XO-Konzentration. Funktionell katalysieren beide Formen XO und XD die Oxidation von unterschiedlichen Substraten, hauptsächlich Hypoxanthin zu Xanthin und Xanthin zu Urat. XD benötigt NAD⁺ als Elektronenakzeptor, um Hypoxanthin zu Xanthin reduzieren zu können bzw. Xanthin zu Urat. Dabei wird als stabiles Reaktionsprodukt das Substrat NADH gebildet. XO kann auf Grund seiner veränderten Struktur NAD⁺ nicht als Elektronenakzeptor

verwenden und benötigt molekularen Sauerstoff für die Purinoxidation. Es kommt zur Erzeugung hochreaktiver freier Sauerstoffradikale sowie auch von Wasserstoffperoxid¹¹.

Die mikrovaskuläre Dysfunktion ist ein früher und für das klinische Ergebnis entscheidender Faktor in der Pathogenese des IRS⁵. Im Versuch wurden molekulare und biochemische Veränderungen innerhalb der Gefäßwand charakterisiert, die für eine akute Entzündungsreaktion kennzeichnend sind¹⁰.

ENDOTHEL

Wesentlicher Regulator für die Homöostase und den Tonus der Gefäße ist das Endothel. Endothelzellen haben eine Vielzahl vitaler Funktionen: Kontrolle des Gefäßtonus und des lokalen Blutflusses, Modulation von Gerinnung und Entzündung, Interventionen/ Eingriffe in das Immunsystem, Kontrolle des Transfers von Mikro- und Makromolekülen von intravasal nach interstitiell, Umwandlung von Prohormonen zu aktiven Hormonen (Angiotensin II). Die Endothelzellen reagieren besonders empfindlich auf die schädlichen Auswirkungen von Hypoxie und Reoxygenierung. In den verschiedenen Abschnitten des Gefäßsystems manifestiert sich das IRS verschiedenartig und mit unterschiedlich starker Ausprägung. Trotz des prinzipiell gleichen Schädigungsmechanismus unterscheiden sich die Reaktionen der Endothelzellen der Arteriolen, Kapillaren und Venolen im IRS¹⁰.

ARTERIOLEN

In der Endothelzelle der Arteriolen manifestiert sich der IR-Schaden als beeinträchtigte Fähigkeit zur Relaxation der glatten Muskelzelle, die endothelabhängig NO-mediert ist. In der frühen Phase der Reperfusion kommt es zunächst zu einer gesteigerten NO-Produktion, wohingegen in der späteren Phase die NO-Produktion sinkt¹⁰. In tierexperimentellen Studien konnte mit der Applikation von endothelunabhängigen Vasodilatoren wie etwa Nitroprussid-Natrium nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit zur Relaxation der postischämischen Arteriolen erhalten bleibt. Die geminderte Gefäßantwort beruht somit nicht auf einem Funktionsdefizit der glatten Gefäßmuskulatur, sondern vielmehr auf einem im Verhältnis gravierenden Überangebot an Superoxidradikalen, die eine Gegenregulationsfähigkeit endogener protektiver Antioxidantien wie NO, GSH, SOD übersteigen. Diese These wird von der Beobachtung gestützt, dass Superoxiddismutase und andere Antioxidantien die Fähigkeit zur endothelabhängigen NO-medierten Gefäßrelaxation in postischämischen Arteriolen wiederherstellen können¹⁰.

In einer tierexperimentellen Arbeit an postischämischer Skelettmuskulatur konnte gezeigt werden, dass der Abfall der NO-Konzentration nicht wesentlich von der Superoxidbildung beeinflusst wird¹².

Aktivierte Leukozyten scheinen eine weitere wichtige Quelle für Superoxid, das nach Reperfusion endothelial produziertes NO inaktivieren kann. Bei Knock-out-Mäusen mit Defizit an Leukozyten- oder endothelialen Adhäsionsmolekülen kommt es anders als bei

der normogenetischen Vergleichsgruppe nicht zur Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation nach IR¹⁰.

KAPILLAREN

Im Kapillargebiet manifestiert sich die endotheliale Dysfunktion vor allem in der verstärkten Extravasion von Flüssigkeit in das Interstitium und in einer Reduktion der Anzahl perfundierter Kapillaren. Aktivierte Leukozyten und von der Basalmembran teilabgelöste geschwollene Endothelzellen scheinen die Kapillaren zu verstopfen. Das interstitielle Ödem wirkt sich von außen komprimierend auf einige der verbleibenden Kapillaren aus, dies kann bis zum Kollaps führen oder zumindest die Perfusion der Blutbestandteile bedrohlich verlangsamen¹⁰.

VENOLEN

Das stärkste Ausmaß der Entzündungsreaktion zeigt sich im Bereich der postkapillären Venolen¹⁰. Das durch die Entzündungsantwort verursachte Ödem komprimiert die Kapillaren und kann so ein „no-reflow“-Phänomen induzieren⁹.

Charakteristische Bestandteile dieser venolären Reaktion sind die Leukozyten-Endotheladhäsion, die transendotheliale Leukozytenmigration, die Rekrutierung von interstitiellen Makrophagen und nicht zuletzt die verstärkte Produktion und Freisetzung freier Radikale. Mastzellen und Makrophagen⁵, die normalerweise im perivenösen Interstitium residieren, werden rekrutiert und aktiviert und organisieren die Erweiterung, Feinabstimmung und Verstärkung der Immunreaktion^{5,10}.

Adhäsionsmoleküle, die sowohl an der Oberfläche von Leukozyten als auch von Endothelzellen exprimiert werden, zeigen im Rahmen eines IRS eine massiv erhöhte Expression, Aktivität, Reagibilität und festere Bindungsfähigkeit als unter Normalbedingungen. Zumindest unter In-vitro-Bedingungen konnte ihre hohe Bedeutung untermauert werden¹⁰.

STICKSTOFFMONOXID (NO)- UND SUPEROXIDKONZENTRATIONEN

Sowohl Superoxid als auch NO spielen anscheinend eine sehr wichtige Rolle bei den Veränderungen der endothelabhängigen Reaktionen im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens⁸. Die Studien deuten darauf hin, dass sowohl die verminderte endothelabhängige Vasodilatation in den Arteriolen als auch die Entzündungsreaktion in den Venolen wesentlich durch eine Imbalance zwischen Superoxid und NO – auf Grund einer massiv verstärkten Superoxidbildung und verminderten NO-Generation – verursacht wird¹⁰.

Die Reperfusion der ischämischen Skelettmuskulatur geht einher mit einer verstärkten Superoxidproduktion und einem Abfall der NO-Konzentration. In einer wesentlich weiterreichenden tierexperimentellen Arbeit wurde untersucht, ob der Superoxidanstieg und der Abfall der NO-Konzentration während der Reperfusionsphase korrelieren¹². Es wurden 14 männliche Wistar-Ratten in eine Verum-Gruppe mit EGCG-Gabe und eine Kontrollgruppe mit Applikation einer NaCl-Lösung eingeteilt. Die Ratten wurden einer zweistündigen Ischämie des Hinterlaufs ausgesetzt. Die Entwicklung der O²- und NO-Bildung in der Reperfusionsphase wurde per Sensor gemessen. Nach EGCG-Gabe war der Anstieg der Superoxidkonzentration signifikant schwächer. Der Abfall der NO-Konzentration wurde dagegen durch die EGCG-Gabe nicht signifikant beeinflusst. Daraus kann geschlossen

werden, dass der Abfall der NO-Konzentration nicht direkt mit der Superoxidkonzentration korreliert.

NO wird in vielen Zellen, insbesondere jedoch in den Endothelzellen, von der NO-Synthetase (NOS) aus L-Arginin gebildet. L-Arginin ist eine Aminosäure mit immunstimulativem Effekt, es verbessert die Wundheilung und den Immunstatus in katabolen Patienten¹³. Die In-vivo-Bedeutung des N(omega)-propyl-L-Arginin in Zusammenhang mit dem Reperfusionsschaden des Skelettmuskels ist noch nicht exakt definiert¹⁴.

FREIE RADIKALE

Beim IR- Syndrom spielen freie Radikale eine entscheidende Rolle. Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte, freie Elektronen besitzen, die sich auf dem äußeren Orbital befinden. Sauerstoffradikale gilt ein besonderes Interesse, da sie physiologisch in allen eukaryoten Zellen während der Energiegewinnung der Mitochondrien, aber auch durch exogene Faktoren entstehen, die die Homöostase stören können. Sauerstoffradikale sind z. B.: Superoxidradikal $O_2^{\cdot-}$, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikal (HO^{\cdot}). Sauerstoffradikale schädigen eine Vielzahl zellulärer Verbindungen wie die Nukleinsäuren der DNA, Nukleotide, Enzyme und Proteine. Da freie Elektronen danach streben, ein Elektronenpaar zu bilden, sind freie Radikale besonders reaktiv¹⁵.

1.2.2 MORPHOLOGISCHE/ HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN

Der postischämische Reperfusionsschaden verursacht am Muskel ein intrazelluläres und interstitielles Ödem. Außerdem entstehen zytoplasmatische Vakuolen¹⁶ sowie eine

leukozytäre und erythrozytäre Infiltration des Muskels. Bei ausgeprägteren Schäden entstehen Fettgewebs- und Myozytennekrosen¹⁷. Elektronenmikroskopisch können Schäden am Zytoskelett, eine Zerstörung des Netzwerkes der Intermediärfilamente, eine Relokalisation der Aktinfilamente um den Nukleolus, eine Zerstörung der Mikrotubuli und des Mitoseapparats sowie eine Schwellung oder gar ein Verlust der Mitochondrien gesehen werden¹⁸.

1.2.3 KLINISCHE BEISPIELE

Das Ischämie-Reperfusionssyndrom tritt täglich im medizinischen Alltag auf. Es seien hier nur einige Beispielsituationen genannt: das Abklemmen der Arterie in der Gefäßchirurgie, die Nutzung der Tourniquet-Blutsperre in der Orthopädie und Extremitätenchirurgie, die Gewebischämien in der Herz- und Transplantationschirurgie und die koronare Revaskularisation im akuten Myokardinfarkt.

Eine spezielle Form der Transplantation ist der Eigengewebettransfer mittels freier Lappenplastiken in der plastischen Chirurgie. Bei dieser Form der autologen Transplantation wird Gewebe des Patienten an eine andere Stelle seines Körpers transferiert. In 90-95% der Fälle ist eine Gewebsdeckung per freier Lappentransplantation erfolgreich¹³. Trotz dieser hohen Erfolgsrate zeigen einige der Patienten postoperativ ein IRS. Dies kann zum teilweisen oder kompletten Verlust der Lappenplastik mit Nekrose führen. Neben dem hohen Zeit- und Kostenaufwand bedeutet dieser Verlust vor allem für den Patienten ein erhebliches Trauma¹³.

Bei der autologen Transplantation entfällt im Gegensatz zu herkömmlichen Transplantationen die immunologische Differenz, d. h. eine Abstoßungsreaktion infolge

einer HLA-Inkompatibilität tritt nicht auf. Daher eignet sich das Modell der freien Lappenplastik zur isolierten Darstellung des IRS-Mechanismus¹³.

1.3 PROTEKTIONSMÖGLICHKEITEN VOR EINEM REPERFUSIONSSCHADEN

Wichtige Möglichkeiten zur Protektion vor einem postischämischen Reperfusionsschaden sind die ischämische Präkonditionierung, die kontrollierte Reperfusion sowie der Einsatz von Antioxidantien⁶.

1.3.1. PRÄKONDITIONIERUNG

Eine hochinteressante Beobachtung hat bereits vor längerer Zeit das pathophysiologische Verständnis des postischämischen Reperfusionsschadens verbessert: Eine für die Zellen nicht letale Ischämie schützt im weiteren Verlauf vor den Folgen einer potentiell letalen Ischämie. Noch interessanter war die Erkenntnis, dass eine ischämische Präkonditionierung nicht unbedingt im von der potentiell letalen Ischämie betroffenen Organ erfolgen muss, sondern in einem anderen Organ durchgeführt werden kann. Das „remote ischemic preconditioning“¹⁹ kann z.B. nicht invasiv durch eine Staubinde oder Blutdruckmanschette erfolgen und eine temporäre Extremitätenischämie zeugen²⁰. Auch hat sich gezeigt, dass sogar eine „Postkonditionierung“ sinnvoll sein kann²¹.

TIERVERSUCHE

Die ischämische Präkonditionierung vermindert – vermutlich Adenosin-induziert – die postischämische Leukozytenadhäsion²². In einem Muskellappenmodell der Ratte konnte

mit einem „remote ischemic preconditioning“ der gleiche Erfolg wie mit einer ischämischen Präkonditionierung des betroffenen Muskellappens erzielt werden²³. In einem weiteren Experiment konnte eine wesentliche Rolle des NO sowohl in der direkten als auch in der entfernt vom betroffenen Organ („remote“) durchgeführten ischämischen Präkonditionierung gezeigt werden²⁴.

KLINISCHE BEISPIELE

Ein der Präkonditionierung verwandter physiologischer Mechanismus wurde in der Skelettmuskulatur beobachtet: Die Kontraktion des Skelettmuskels induziert die Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies und verursacht oxidativen Stress. Antioxidative Abwehrsysteme werden daraufhin physiologisch aktiviert. Die dafür verantwortliche Genexpression wird vor allem durch den nuclear factor kappa B (NFkappaB) und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)^{25,26} vermittelt.

1.3.2. ANTIOXIDANTIEN

Während neutrophile sowie eosinophile und mononukleäre Phagozyten Superoxid für ihre physiologische mikrobizide Wirkung bilden²⁷, führt die Superoxidproduktion in der postischämischen Reperfusionphase zum Untergang körpereigenen Gewebes. Neben NO-Donoren, Inhibitoren der neutrophilen Leukozyten und Inhibitoren der Apoptose gehören Antioxidantien zu den interessantesten Substanzen für die Vermeidung eines postischämischen Reperfusionsschadens¹³. Zur Vermeidung dieser radikalbedingten Schäden kamen in den letzten Jahren natürliche Antioxidantien wie Vitamine und sekundäre Pflanzenstoffe in den Fokus der Forschung²⁸⁻³⁰. Zu den wichtigen Antioxidantien gehören das endogen im Körper gebildete Glutathion sowie exogene Wirkstoffe wie Vitamin E, Vitamin C, Fettsäuren, Riboflavin und Polyphenole.

Antioxidantien sind wichtige Schutzstoffe. Sie können Wasserstoffionen abgeben oder aufnehmen, ohne dabei selbst in aggressive Moleküle umgewandelt zu werden. So können sie auf verschiedenen Stoffwechselwegen im Organismus entstandene freie Radikale abfangen und unschädlich machen.

Polyphenole gehören zu den sekundären Pflanzenstoffen, die als bioaktive Substanzen in Pflanzen vorkommen. Dort dienen sie als Farb-, Bitter-, Geschmacks- und Gerbstoffe. Diese verleihen den Pflanzen kennzeichnende Eigenschaften und können sie z. B. vor Fressfeinden, Besiedlung durch Bakterien und Pilze bewahren. Die Flavonoide sind Vertreter einer Gruppe der Polyphenole. Sie werden aus zwei aromatischen Ringen gebildet, die durch einen Tetrahydropyran Ring verbunden sind. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Oxidationsstufen und Substituenten an den sauerstoffhaltigen und aromatischen Ringen. Zu den Flavonoiden gehören die Catechine, Flavonole und Flavone³¹. Flavonoide sind in der Natur weit verbreitet und finden sich in vielen Obst- und Gemüsesorten. Antioxidativ wirksame Flavonoide wurden u. a. auch in dunkler Schokolade nachgewiesen³². Die Anzahl der natürlich vorkommenden Verbindungen ist sehr groß, so sind bisher über achttausend Flavonoide identifiziert worden.

EGCG

Nach Wasser ist Tee weltweit das am häufigsten genossene Getränk³³. Insbesondere in den 1990er Jahren ist das wissenschaftliche Interesse am Tee allgemein, und am grünen Tee im Speziellen deutlich gestiegen³⁴. Verschiedene epidemiologische Studien wiesen darauf hin, dass Catechine aus Tee das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen senken können^{33,35}. Außerdem wurden antikarzinogene, antioxidative, antivirale und antimikrobielle

Eigenschaften des Tees beschrieben³⁶. Die Catechine und unter ihnen vor allem das EGCG gelten in diesem Zusammenhang als wichtigster Inhalts- und Wirkstoff^{31,37}.

Tee ist das Produkt der Pflanze *Camellia sinensis*. Bei gleichem Rohstoff unterscheiden sich grüner und schwarzer Tee nur in dem Verfahren nach der Ernte. Grüner Tee ist unfermentiert, schwarzer Tee fermentiert. Bei der Herstellung von grünem Tee wird versucht, die Oxidation der im Blatt enthaltenen Polyphenole möglichst vollständig zu unterdrücken. Infolgedessen können die wertvollen Catechine im grünen Tee erhalten bleiben und erklären sich die unterschiedlichen Catechingehalte von grünem und schwarzem Tee bei gleichem Rohstoff³³. Bei schwarzem Tee entsteht das charakteristische Aroma erst durch die Oxidation der Polyphenole zu höhermolekularen Verbindungen wie Theaflavine und Thearubigine.

Grüner Tee enthält vorwiegend Catechine, die den Hauptbestandteil der Flavonoide bilden. Die wichtigsten Einzelverbindungen der im grünen Tee enthaltenen Flavone sind: (-)-Epicatechin (EC), (-)-Epicatechingallat (ECG), (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG). Im grünen Tee hat das Epigallocatechingallat (EGCG) den größten Anteil³⁵ unter den Catechinen³¹.

EGCG repräsentiert mit 48-55% den größten Anteil der Catechine, die anderen sind EC (5-7%) und EGC (9-12%)^{38,39}. Diese Catechine sind bedeutend für den positiven biologischen Effekt von grünem Tee. Unter ihnen gilt ECGC als wichtigster Inhaltsstoff^{33,37}. Grüner Tee und seine Auszüge sind im Experiment versus EGCG nicht weniger wirksam. Im Gegensatz, einige Studien ergaben stärkere und breitere Effekte für den grünen Tee und seine Extrakte. Wahrscheinlich wirken die Catechine des grünen Tees nicht nur additiv, sondern auch synergistisch⁴⁰. Der Troxol-Äquivalent (TE), drückt die mittlere

antioxidative Kapazität eines Stoffes aus und beträgt bei EGCG etwa 760 μmol und liegt damit deutlich über den üblichen Frucht- und Gemüsesorten⁴¹. Bei der Zubereitung mit kochendem Wasser kann man nach fünf Minuten 84 % der Teepolyphenole extrahieren³⁴. Eine typische Tasse grüner Tee, aus 2,5 g getrockneten Teeblättern mit 250 ml kochendem Wasser hergestellt, enthält ca. 620–880 mg wasserlösliches Material aus ca. ein Drittel Catechine und 3–6 % Coffein^{31,38}.

1.4. ZIELE DER UNTERSUCHUNGEN

Dieses Experiment sollte untersuchen, ob EGCG – ein frei verfügbarer, sicher applizierbarer pflanzlicher Radikalfänger – die Extremitätenmuskulatur der Ratte vor der Ausbildung eines postischämischen Reperfusionsschadens schützen kann, wenn es unmittelbar vor der Reperfusion zentralvenös injiziert wird. Als Messparameter diene dabei die Bildung von Superoxidradikalen mit bzw. ohne EGCG-Applikation. Diese computergestützte Messung wurde mit einem speziell für solche Fragestellungen entwickelten Sensor vorgenommen.

Zusätzlich erfolgte nach Abschluss der jeweiligen Messungen die Entnahme des M. gastrocnemius der betroffenen Extremität, um das histologische Ausmaß des postischämischen Reperfusionsschadens mit bzw. ohne EGCG-Applikation zu beurteilen.

Im Versuchsaufbau haben wir darauf verzichtet, das untersuchte Gewebe zu transferieren und zu transplantieren, da so die wesentlichen Störgrößen des potentiell mangelhaften Gefäßanschlusses und des erheblichen Gewebstraumas ausgeschlossen und der IR-Schaden isoliert untersucht werden konnten. Auch die komplexen Mechanismen der

Gewebsabstoßung und ihre Graduierung⁴² mussten im gewählten Experiment nicht berücksichtigt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. KURZBESCHREIBUNG DES VERSUCHS

Für den vorliegenden Versuch wurden 28 männliche Wistar-Ratten operiert. Die Ratten wurden in zwei Gruppen eingeteilt, 14 Tiere erhielten Epigallocatechingallate, 14 Tiere dienten als Kontrollgruppe.

Den Tieren wurde mittels eines standardisierten Verfahrens die V. und A. femoralis unterhalb des Leistenbandes präpariert und Kollateralgefäße ligiert.

Für die Messung der entstehenden O_2^- -Radikale während der Ischämie- und Reperfusionphase wird im Bereich des Muskulus gastrocnemius der Cytochrom-C-Sensor intramuskulär implantiert. Durch das Abbinden der Kollateralen und Anlegen der Mikroclips wird die Unterbrechung des Blutflusses gewährleistet und somit die Ischämiephase eingeleitet. Die Ischämiedauer beträgt 60 Min. bzw. 120 Min. Die Computermessung mit dem Biosensor auf Cytochrom-C-Basis erfolgt kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer, die sich aus der Ischämie- und Reperfusionphase zusammensetzt. Das EGCG wird unmittelbar vor Reperfusionbeginn über den in der Vena jugularis liegenden Venenkatheter appliziert. Vor Ischämiebeginn und max. 240 Min. nach

Beginn der Reperfusion wird den Tieren durch den Venenkatheter Blut aus der Vena jugularis entnommen, das zur Bestimmung der Plasmakonzentration der Metabolite der freien Radikale (MDA) dient.

2.2. TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG

Die Tierversuchsgenehmigung wurde vom Senat für Gesundheit und Soziales unter dem Geschäftszeichen 5.2/ 316-G 0119/ 98 erteilt und mit dem Bescheid auf ein Tierzahlerhöhungsgesuch vom 31.03.2001 um weitere 80 Tiere bewilligt.

2.3. VERSUCHSTIERE

2.3.1. AUSWAHL

Gemäß dem Tierschutzgesetz sollen für Tierversuche möglichst die in der Tierwelt „am niedrigsten“ eingestuften Arten verwendet werden. Bei der Xanthinoxidoreduktase um ein phylogenetisch altes Funktionsprotein, um eine möglichst hohe an die Vergleichbarkeit mit dem menschlichen Organismus und anderen Versuchsreihen zu erhalten, entschieden wir uns für ein Säugetier als Versuchstier. Die Wahl fiel, da hinsichtlich der Operabilität bestimmte Anforderungen an die Größe der Spezies bestanden, auf Ratten, deren Anatomie und Physiologie bekannt ist und die häufig in vergleichbaren Studien verwendet wurden.

2.3.2. HALTUNG

Die Ratten wurden von der Firma Tierzucht Schönewalde GmbH bezogen, wogen zwischen 250 und 400g und waren serologisch, bakteriologisch sowie parasitologisch untersucht worden. Sie wurden in den Versuchstierställen der Abteilung Experimentelle Chirurgie der Charité Campus Mitte in Gemeinschaftskäfigen mit bis zu fünf Tieren je Käfig gehalten. Alle Behälter wurden täglich gereinigt, das gestellte Wasser und das Futter und stand zur freien Verfügung.

Die Tierkäfige befanden sich in voll klimatisierten Räumen. Die Beleuchtung wurde in festen Intervallen per Zeitschaltuhr ein- und ausgeschaltet, und somit konnte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistet werden.

2.4. DER CYTOCHROM-C-BIOSENSOR

Der eingesetzte Biosensor wurde für die Anforderungen eines In-vivo-Einsatzes konzipiert.

Als Arbeitselektrode wurde ein im Querschnitt $0,44 \text{ mm}^2$ messender Golddraht verwendet, der von einer als Gegenelektrode dienenden Stahlkanüle umfasst wurde. Um die elektrische Isolierung zu gewährleisten, wurde der Golddraht mit einer Stahlisolierung ummantelt. Die reaktive Detektionsfläche der Elektrode bildete der nicht isolierte Querschnitt des Golddrahts, der mit der Gegenelektrode abschloss. Dieser Teil des Sensors wurde für die Detektion der Superoxidanionen mit dem Metalloprotein Cytochrom C beschichtet, womit sich eine effektive Detektionsfläche von $0,2 \text{ mm}^2$ ergab⁴³.

Die Länge der Arbeitselektrode betrug 40 mm. Platziert wurde die Elektrode mittels einer Venenkanüle (14 G, mit einem Außendurchmesser von 2,2 mm), deren Kunststoffumhüllung als Führungshilfe zum direkten Kontakt mit dem Gewebe diente.

Eine Ag/ AgCl, 3-M KCl-Elektrode fungierte als zusätzliche Referenzelektrode, die mit der Stahlelektrode in Reihe geschaltet war. Das Detektionsprinzip basierte auf der Reduktion des Cytochrom C: Das Superoxidradikal reduziert das Ferricytochrom, das an der modifizierten Goldoberfläche der Elektrode seinerseits sofort durch das polarisierende Oxidationspotential reduziert wird. Der Anstieg des anodischen Stroms der Sensorelektrode ist äquivalent zur Superoxidkonzentration in der Lösung. Vor und nach jedem In-vivo-Einsatz wurde der Sensor einem In-vitro-Test unterzogen und kalibriert⁴⁴.

2.4.1. FIXIERUNG CYTOCHROM-C-ELEKTRODE

Das Cytochrom C ist ein Protein der mitochondrialen Atmungskette, die bei allen eukaryoten Organismen durch Elektronentransport der Energiegewinnung dienen. Die prosthetische Gruppe, das Häm dieser Peptidkette, besitzt ein Eisenmolekül, das stabil die Oxidationszustände +II und +III annehmen kann. Cytochrom C adsorbiert als oberflächenaktive Substanz spontan an die Oberfläche von Goldelektroden. Dieser Prozess kann jedoch zur funktionseinschränkenden Denaturierung bzw. zu strukturellen Veränderungen des Eiweißmoleküls führen. Um dies zu vermeiden, werden sogenannte Promotoren eingesetzt. Unter einem Promotor versteht man ein Molekül, das an die Oberfläche der Metallelektrode bindet, im untersuchten Potentialbereich inert ist, eine rasche Elektronenübertragung ermöglicht und die Stabilität erhöht. Bei Promotoren unterscheidet man zwischen Proteinen, die frei in der Lösung diffundieren oder an den Promotor adsorbiert oder kovalent gebunden sind. Um den Aufbau der Promotoren zu erklären, kann man sich das Modell einer X-Y-Struktur vorstellen. Das eine Ende des

Moleküls (X) bindet (meist chemisorptiv) fest an die Elektrodenoberfläche, das andere (Y) ragt in die Messlösung hinein^{43, 44}.

Der gebräuchlichste Promotortyp sind Organothiole, die mit der Schwefelgruppe an Goldoberflächen chemisorbieren und ihre freie Endgruppe zur Interaktion mit dem Protein bereitstellen. Die Wahl der Endgruppe Y ist abhängig von der zu nutzenden Wechselwirkung mit dem Protein. Für das Cytochrom C verwendet man am häufigsten eine Carboxylfunktion, um eine vorteilhafte ionische Wechselwirkung mit den basischen Resten in der Nähe der Häm-Tasche des Cytochroms auszubilden und die für den Elektronentransfer günstige Orientierung der elektroaktiven Häm-Gruppe zur Elektrode zu bewirken.

Auf Grund der elektrostatischen Wechselwirkungen wird so eine Adsorption des Proteins an die Promoterschicht ermöglicht. Die kovalente Immobilisierung des adsorbierten Proteins am Promoter – durch Ausbildung von Amidbindungen zwischen der Säuregruppe des Promoters und der Aminogruppe des Proteins – hat den Vorteil, auch bei hohen Ionenstärken und mehrfachem Austausch der Messlösung einen Verbleib des Proteins an der Elektrode zu garantieren.

Die redoxaktive Hämgruppe ist von positiv geladenen Lysinresten umgeben. Diese Lysinreste binden an das negativ geladene Bindungsareal des Reaktionspartners. Dieses Prinzip wurde auf die Modifizierung von Elektrodenoberflächen übertragen: Spacermoleküle, die mit einer Thiolgruppe spontan an die Goldoberfläche binden, besitzen auf der Lösungsseite negativ geladene Gruppen für die Bindung des Cytochrom-C-Moleküls mit der positiv geladenen Hämumgebung. Beispiele sind Mercaptoundecansäure und N-Acethylcystein⁴⁴.

Das elektrostatisch an die Schicht adsorbierte Cytochrom C tauscht effektiv Elektronen mit der modifizierten Elektrode aus. Doch ist die elektrostatische Adsorption nur bei kleinen Salzkonzentrationen wirksam, unter physiologischen Bedingungen dissoziiert das adsorbierte Cytochrom C schnell ab. Folglich ist diese Immobilisierungsmethode für einen im Tierversuch verwendeten Sensor nicht nutzbar.

Die Peptidchemie bietet verschiedene Reaktionen für das kovalente Anbinden des ursprünglich nur elektrostatisch adsorbierten Cytochrom C:

Wasserlösliches Carbodimid verknüpft die Carboxylgruppen des Spacers mit NH_3^+ -Gruppen des Lysins in Cytochrom C. Somit wird erreicht, dass bei der Fixierung das elektrostatisch gebundene Molekül kovalent mit dem Spacer verknüpft wird. Wegen der hohen Dichte von Lysinresten in der Hämumgebung führt diese Reaktion zu einer Orientierung der redoxaktiven Hämgruppe zur Elektrode. So wird ein schneller Elektronenaustausch zwischen dem Häm des Cytochrom C und der Goldelektrode erreicht. Für einen schnellen Elektronenaustausch, d. h. um einen starken Strom zu erzielen, sollte das Spacermolekül möglichst kurz sein^{43,44}.

2.4.2. BIOSENSORPRÄPARATION

Um eine erfolgreiche Beschichtung und Arbeitsweise des Sensors zu erreichen, erwies sich im Versuch eine ausgiebige mechanische Politur zur Reinigung als wirksamstes Verfahren. Zunächst wurde der Sensor für 5 Minuten in reinen Alkohol getaucht, um die Proteindenaturierung auf der Sensoroberfläche zu gewährleisten. Mit dem Autolabsystem (Eco Chemie, Niederlande) wurden die Sensoren über mehrere Zyklen in 0,5 M H_2SO_4

getaucht und zwischen -0.35 V zu $+1.7\text{ V}$ bei 200 mV/s zur elektrochemischen Bewertung bearbeitet⁴⁴.

Der Sensor wird dann auf einem mit Wasser befeuchteten Polierpad (BUEHLER; Illinois, USA) und einem Polierpulver, bestehend aus Aluminiumoxid (Al_2O_3), mit einer Putzkörpergröße von $5\text{ }\mu\text{m}$ poliert. Es folgen Reinigungsschritte mit $0,3\text{ }\mu\text{m}$ und $0,02\text{ }\mu\text{m}$ Aluminiumoxid auf entsprechendem Polierpad für jeweils 5 Minuten in achtförmigen Bewegungen. Zwischen den einzelnen Polierstufen wird der Sensor mittels Ultraschallbad (MERCK eurolab; Modell USR9, Berlin, Deutschland) behandelt, um Rückstände der Putzkörper von der Sensorenoberfläche zu entfernen.

Danach schließt sich die Cyclovoltammetrie an, eine elektrochemische Methode zur Bestimmung von Redoxparametern und Oberflächeneigenschaften.

Ein Potential wird an einer Elektrode angelegt, die mit gleichbleibender Geschwindigkeit zu einem Maximalpotential erhöht (Vorwärts-Scan) und mit gleicher Geschwindigkeit in die entgegengesetzte Richtung bis zu einem gewählten Minimalpotential gesenkt wird (Rückwärts-Scan).

Falls in der Lösung redoxaktive Stoffe vorhanden sind, werden diese bei dem erreichten substanzspezifischen Potential („oxidativer Peak“) im Vorwärts-Scan oxidiert und im Rückwärts-Scan wieder reduziert („reduktiver Peak“).

Nach mehreren Zyklen in 5mM Phosphatpufferlösung bei $\text{pH } 7,1$ zeigte das Cyclovoltammogramm das typische Bild einer sauberen Goldoberfläche. Somit war die Reinheit gewährleistet und die Sensoroberfläche zur Beschichtung vorbereitet. Für 24 Stunden wurde die gesäuberte Elektrode in einer Modifikationslösung, bestehend aus 5 mM 11-Mercaptoundecansäure in Ethanol und Mercaptoundecanol-Lösung gleicher

Konzentration in Ethanol in einem Volumen-Verhältnis 1:3, inkubiert. Für die Adsorption des Cytochrom C wurde die Elektrode in einer Pufferlösung, bestehend aus 30 μM Cytochrom C und 5mM Kaliumlösung, bei einem pH-Wert von 7 über 2 h inkubiert. Dadurch kann das Protein an der Monoschicht adsorbieren. Die kovalente Immobilisation des Cytochrom C auf der Elektrode wurde mit dem Hinzufügen von EDC-Lsg (Sigma) 1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide erreicht, so dass die Endkonzentration der Lösung 5mM betrug.

Durch gründliches Spülen der Elektrode mit destilliertem Wasser wurde diese einsatzbereit gemacht⁴³.

2.4.3. IN-VITRO-VORUNTERSUCHUNGEN DES CYTOCHROM-C-BIOSENSORS

Vor jedem In-vivo-Versuch wurde die Fähigkeit des zu nutzenden Sensors, das Sauerstoffradikal zu messen, in vitro überprüft.

Für die Superoxidanion-Generierung wurde das Xanthin-/Xanthin-Oxidase-System verwendet. Dabei wird das benutzte Substrat Hypoxanthin durch das Enzym Xanthinoxidase katalytisch in Harnsäure, Wasserstoffperoxid und in Superoxidanionen umgesetzt.

XOD

Hypoxanthin + 2O_2 -----> Harnsäure + H_2O_2 + Superoxidanion (O_2^-)

Diese Reaktionsgleichung stellt den in vivo ablaufenden Prozess der Sauerstoffradikalbildung dar.

2.5. MESSAPPARATUR UND REAGENZIEN

2.5.1. MESSAPPARATUR

Die In-vitro-Versuche wurden in einer elektrochemischen Rührzelle mit einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Für die Messung wurde die Arbeitselektrode (Elbau GmbH, Germany) auf konstante + 100 mV vs. die Ag/ AgCl Gegenelektrode polarisiert und in eine 0,1M PBS Pufferlösung mit 0,1M EDTA bei pH 7.5 25 C^o getaucht. Für die Aufbereitung der Pufferlösung wurde ein Natriumdihydrogenphosphat- und ein Dinatriumhydrogenphosphatpuffer von Fluka benutzt. Beide Puffer wurden im Verhältnis 45: 55 gemischt, der Ziel-pH lag bei 7,5 und wurde mittels einer Glaselektrode kontrolliert.

Ein Biopotentiostat (EKFdiagnostic, Germany) übermittelte das Sensorsignal als Strom zum Computer. Das Messsignal des anodischen Stromflusses wurde via Potentiostat (Servorec 220-2, Gossen-Metrawatt, Germany) übertragen und durch einen Computer aufgezeichnet und visualisiert, so dass während der gesamten Versuchsdauer eine Kontrolle möglich war. Die ermittelten Daten wurden hierzu mit einem Softwareprogramm

von EKF (EKFDiagnostic, Germany) in eine Excel-Datei übertragen und konnten somit auch graphisch aufgearbeitet werden.

Die computergestützte Messung des Cytochrom-C-Sensors wurde bei einem konstanten Oxidationspotential aufgezeichnet und zur Evaluierung der Sauerstoffsuperoxidkonzentration genutzt. Zu 1 ml Pufferlösung in der Messzelle wurden zunächst mittels Pipette 50 µM Hypoxanthin und kurz darauf 25 µM XOD hinzugefügt. XOD katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor; als Produkt dieser Reaktion entstehen Sauerstoffradikale.

Superoxiddismutase (SOD) (Sigma, Deutschland) ist ein sehr potenter Radikalfänger. SOD katalysiert die Dismutasereaktion: $2 O_2^- + 2 H^+ = O_2 + H_2O_2$. SOD wurde in diesem Versuch verwendet, um sicherzustellen, dass das gemessene Signal durch die Sauerstoffradikale hervorgerufen wurde. Das Sauerstoffsuperoxidsignal wurde durch die hinzugefügten 5µl SOD (5000-10000 U) vollständig beseitigt und das Ruhesignal gemessen.

2.5.2. REAGENZIEN

Xanthinoxidase XOD (EC 1.1.3.22) aus Buttermilch (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland);

Cytochrom C (EEC-No.: 232-7009) aus Pferdeherzen (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland);

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide EDC (E-1769) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland);

Hypoxanthin (6-Hydropurine) (H-9377) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland);

Superoxiddismutase SOD (EC 1.15.1.1) aus Schweineerythrozyten (S-2515) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland);

Epigallocatechingallat EGCG (E4143) aus grünem Tee (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

2.6. EPIGALLOCATECHINGALLAT-PRÄPARATION

Das von der Firma Sigma erhältliche EGCG-Konzentrat wurde in einer physiologischen NaCl-Lösung (0,9%) aufgelöst und in der Konzentration 4mg/ kgKG den Ratten i.v. appliziert.

2.7. OPERATION

2.7.1. NARKOSE

Die Ratten wurden mit einer Pentobarbital NaCl-Lsg. (35-40 mg/ kgKG) intraperitoneal anästhesiert. Die Anästhesie wurde durch intermittierende Bolusgabe aufrechterhalten.

Die Entscheidung für die Applikation wurde abhängig von der individuellen Atemfrequenz und -tiefe sowie der Reaktion der Tiere auf äußere Reize zum Auslösen von Schutzreflexen getroffen (Kornealreflex/ Schnauzenhaare).

2.7.2. OPERATIONSABLAUF

Die anästhesierten Tiere wurden zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf einer Wärmematte operiert. Zunächst wurden sie in Rückenlage positioniert und an den Extremitäten mit Klebestreifen fixiert. Nach der Desinfektion des Operationsgebiets erfolgte der Hautschnitt in der Leistenbeuge, sodann durch stumpfe Präparation des Subkutangewebes die Darstellung des Gefäß-/Nervenbündels. Um den feinen Strukturen gerecht zu werden, wurde die Präparation ab diesem Zeitpunkt ausschließlich unter dem Mikroskop (Jena Optik, Deutschland) und mit Hilfe mikrochirurgischer Instrumente (Texas Instruments, USA) vorgenommen.

Mit Ausgang vom Ligamentum inguinale wurden, unter Schonung des Nervus femoralis, die Artera und Vena femoralis einzeln frei präpariert und dargestellt sowie ihre Kollateralgefäße mit chirurgischem Nahtmaterial ligiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Durchblutung mikroskopisch kontrolliert werden konnte und der untersuchte M. gastrocnemius ausschließlich von der Arteria femoralis distal des Abgangs der den M. gracilis versorgenden Gefäße perfundiert wurde.

2.8. VERSUCHSABLAUF

2.8.1. IMPLANTATION DES SENSORS IM MUSKEL

Durch eine Hautinzision im Bereich des medialen Unterschenkels des Hinterlaufs wurde nun, mit Erhalt der Muskelfaszie, die Muskulatur für den Sensor zugänglich gemacht. Platziert wurden der Sensor und die Gegenelektrode mit einer Venenkanüle (14 G mit einem Außendurchmesser von 2.2 mm), deren Kunststoffumhüllung als Führungshilfe zum Erreichen eines direkten Kontaktes mit dem Gewebe diente. Dieser Vorgang wurde durch Tasten kontrolliert. Ebenso konnte die korrekte Position des Sensors durch passive Bewegung im oberen Sprunggelenk des Hinterlaufs verifiziert werden.

Für die präischämische Blutabnahme sowie die Applikation der EGCG-Lösung musste ein venöser Zugang gelegt werden, der sich allerdings nicht an der operierten Extremität befinden durfte, um eine Beeinflussung der Messergebnisse etwa durch eine venöse Thrombose oder gar Stase des traumatisierten Gefäßes zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde nach einem Hautschnitt am Hals unter mikroskopischer Sicht die Vena jugularis frei präpariert. Für die Applikation bzw. Blutentnahme wurden sehr feine (25G) Kanülen (Firma Braun) verwendet, die gewöhnlich für die Liquorpunktion genutzt werden.

Die Unterbrechung der Perfusion in der ischämischen Phase von 60 bzw. 120 Minuten wurde mit atraumatischen Gefäßklammern (Bulldog, Vascu-Statt Scanlan, USA) für die Arterie und Vene gewährleistet. Durch Ausstreichen mit der mikrochirurgischen Pinzette in Richtung der Durchblutung wurde die korrekte Lage der Clips sowie die vollständige Unterbrechung des Blutflusses kontrolliert.

Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde der Blutfluss in der untersuchten Extremität durch die Entfernung der Gefäßclips und vorsichtige Manipulation mit einem befeuchteten Wattestäbchen wiederhergestellt, um auf diese Weise die Reperfusion einzuleiten. Die erfolgreich wiederhergestellte Reperfusion konnte nun unter dem

Operationsmikroskop beobachtet werden. Es stellte sich als vorteilhaft heraus, die Gefäße mit einer NaCl-Lösung feucht zu halten und die Beleuchtungszeit mit der Mikroskoplampe einzuschränken, um eine Erwärmung und das Austrocknen des Gefäßabschnitts und damit eine mögliche Beeinflussung der Fließeigenschaften zu vermeiden. Die Messwerte wurden kontinuierlich über den Zeitraum der Ischämie- und Reperfusionsphase erfasst (in den Gruppen 1h Kontrolle + 1h EGCG > 120 Min., in den Gruppen 2h Kontrolle + 2h EGCG > 240 Min.).

Alle Daten der computergestützten Messung wurden elektronisch gespeichert und später mit Hilfe des Softwareprogramms Excel graphisch aufgearbeitet.

Unmittelbar nach dem Ende des Versuchs und der Datenaufzeichnung wurden die Tiere durch intravenöse Injektion einer letalen Dosis NaPentobarbital+ Kalium-Lösung getötet.

2.8.2. APPLIKATION VERUM

Bei den Gruppen 1h mit EGCG (n=6) und 2 h EGCG (n=7) wurde den Ratten 5 Minuten vor Entfernung der Mikroclips und somit zu Beginn der Reperfusionsphase 4 mg/ kgKG EGCG in physiologischer Kochsalzlösung in die Vena jugularis appliziert. Um eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch diese Injektion auszuschließen, wurde bei einer Gruppe mit n=3 Tieren zum selben Zeitpunkt die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung ohne Zusatz von EGCG gespritzt.

2.8.3. KONSERVIERUNG DES MUSKELS

Um eine weitere Möglichkeit zu erhalten, die unterschiedlichen Auswirkungen des Reperfusionsschadens mit und ohne Applikation des Polyphenols EGCG zu bewerten, wurden die Muskeln nach Beendigung der Versuche und Tötung der Tiere zur

histologischen Auswertung entnommen. Die Muskulatur wurde allein mit mikrochirurgischen Instrumenten an den Sehnen gefasst, um eine zusätzliche Traumatisierung des Muskelgewebes zu vermeiden und auszuschließen, dass die histologische Auswertung dadurch verfälscht wurde. Die Gewebeproben wurden in Formalin konserviert und bei 7° C gekühlt.

2.9. STATISTIK

Die mathematisch-statistischen Berechnungen wurden mit SPSS für Windows, Version 8.0, durchgeführt. Das Datenmaterial bestand aus den Messwerten der EGCG- und Kontrollgruppen-Tiere in pA. In der deskriptiven Statistik wurden das arithmetische Mittel (Mittelwert), die Standardabweichung (SD), der Median, das Minimum, das Maximum und die Spannweite berechnet. Da es sich um kleine Stichproben handelt, wurden bei der statistischen Testung durchgängig parameterfreie Verfahren mit einer hohen Effizienz gewählt. Beim Gruppenvergleich kam der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney (Rangtest zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben) zur Anwendung. Für die Testung paariger Beobachtungen (Vergleich 1h mit 2h Ischämie innerhalb jeder Gruppe) wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Vorzeichen-Rang-Test) angewandt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $\alpha=5\%$ bzw. $p=0,05$ festgelegt. Die Berechnungen erstellte die Statistikerin Frau Dr. Angelika Guckler, Berlin.

3. ERGEBNISSE

3.1. IN-VITRO-VORUNTERSUCHUNGEN CYTOCHROM-C-BIOSENSOR (KONTROLLE SENSOR/ KALIBRIERUNGSSIGNAL)

Vor der Implantation des Sensors in das lebende Tier wurde die Funktion des Sensors jeweils in einer Messzelle überprüft und einer Kalibrierung unterzogen. So sollte die volle Funktionsfähigkeit und exakte Messung gewährleistet werden. Als Kalibrierungssignal diente das Signal der Superoxidgenerierung mit 1 mMol/l Hypoxanthin und 100 mU Xanthinoxidase. Die Spezifität des Sensors wurde bei jeder externen Kalibrierung mit der Zugabe von 5 U Superoxiddismutase demonstriert, nach der Zugabe von SOD sistierte die Superoxidgenerierung. In der Abbildung 1 ist ein solches Kalibrierungssignal dargestellt.

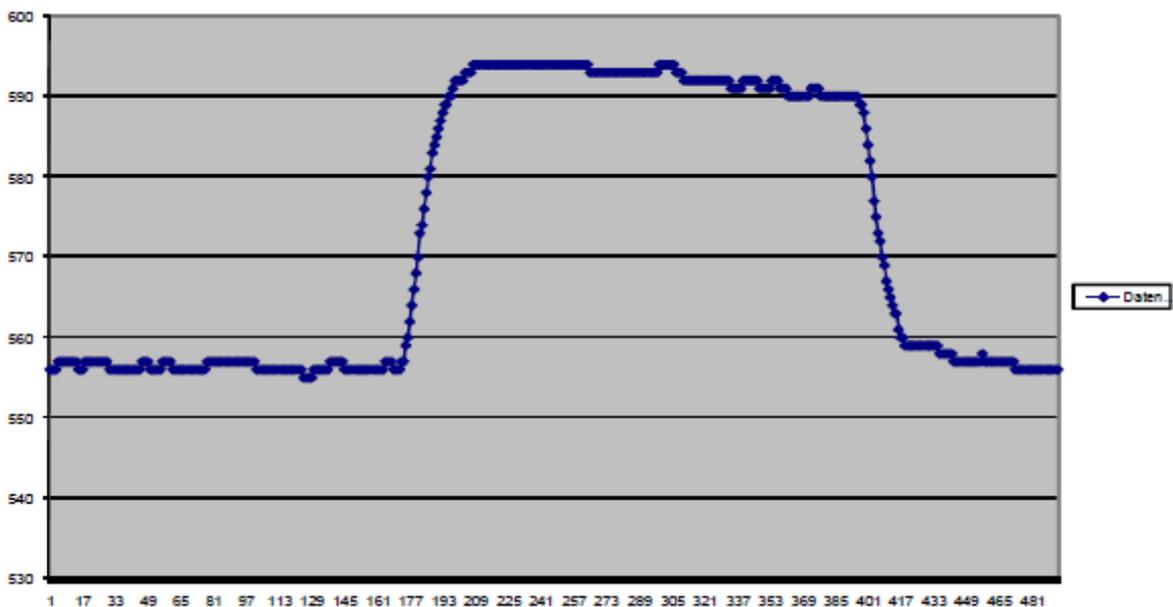


Abb. 1: Kalibrierungssignal: Auf der Ordinate ist der Signalstrom in pA dargestellt, auf der Abszisse ist die Zeit in Sek. abgebildet.

3.2. ERGEBNISSE ISCHÄMIE/ REPERFUSION

3.2.1. ERGEBNISSE KONTROLLGRUPPE 1H

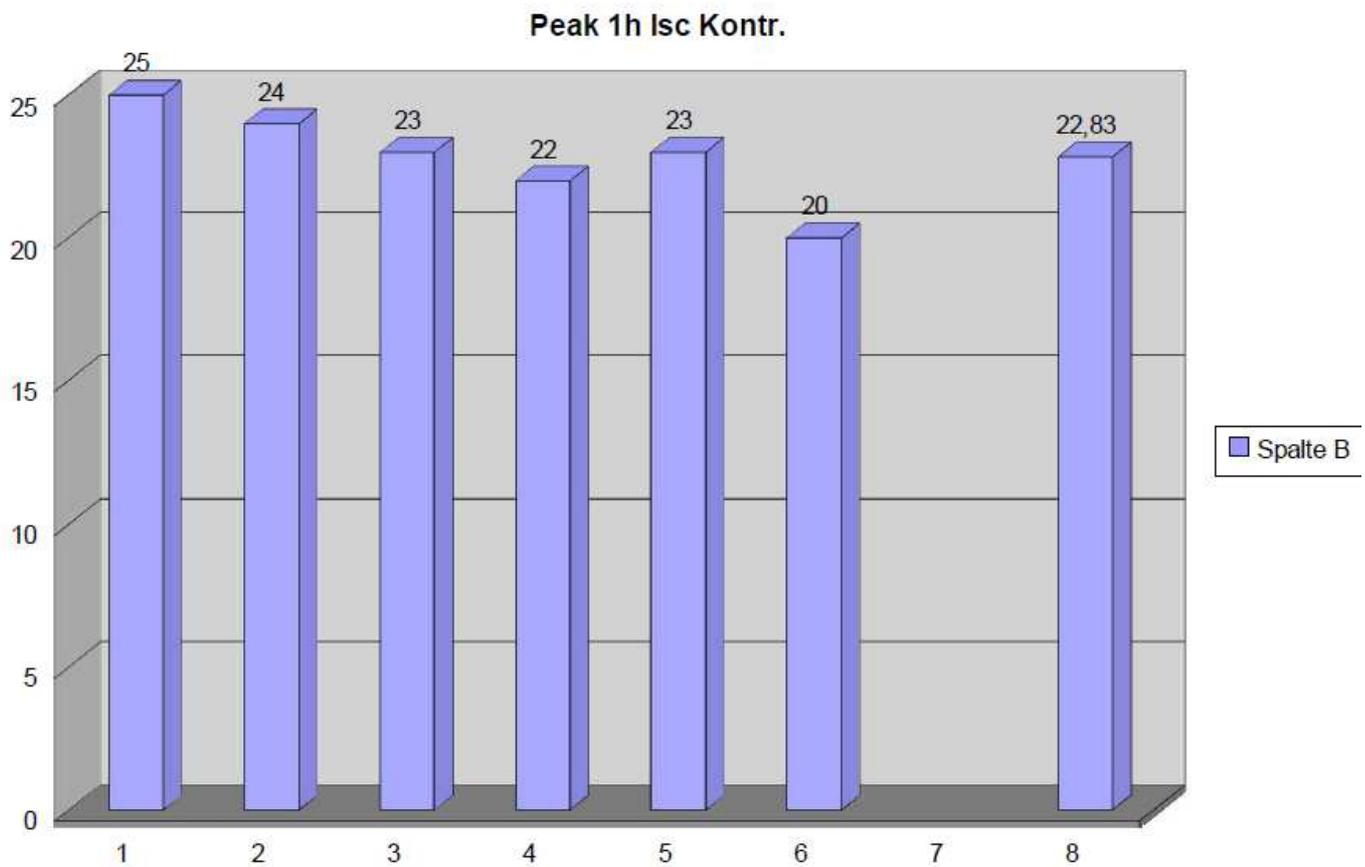


Abb. 2: Darstellung der Messergebnisse der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar, der Median beträgt 23.

In der Abbildung sind die jeweiligen maximalen Superoxidkonzentrationen für die Versuche der ersten Kontrollgruppe nach einstündiger Ischämie und Reperfusion dargestellt.

Der höchste gemessene Ausschlag betrug 25 pA, der niedrigste 20 pA, dies ergibt einen Mittelwert von 22,83 pA bei einem Median von 23 pA.

23pA entsprechen einer Erhöhung der Superoxidkonzentration um 188 nmol/ L.

3.2.2. ERGEBNISSE EGCG 1H

Der höchste gemessene Ausschlag betrug in der Gruppe 60 Min. Ischämie und EGCG-Applikation 18 pA, der niedrigste 6 pA, dies ergibt einen Mittelwert von 11,85 pA bei einem Median von 11 pA.

11 pA entsprechen einer Erhöhung der Superoxidkonzentration von 90 nmol/L. Auf Grund der heterogeneren Ergebnisse wurden in dieser Gruppe 7 Versuche durchgeführt.

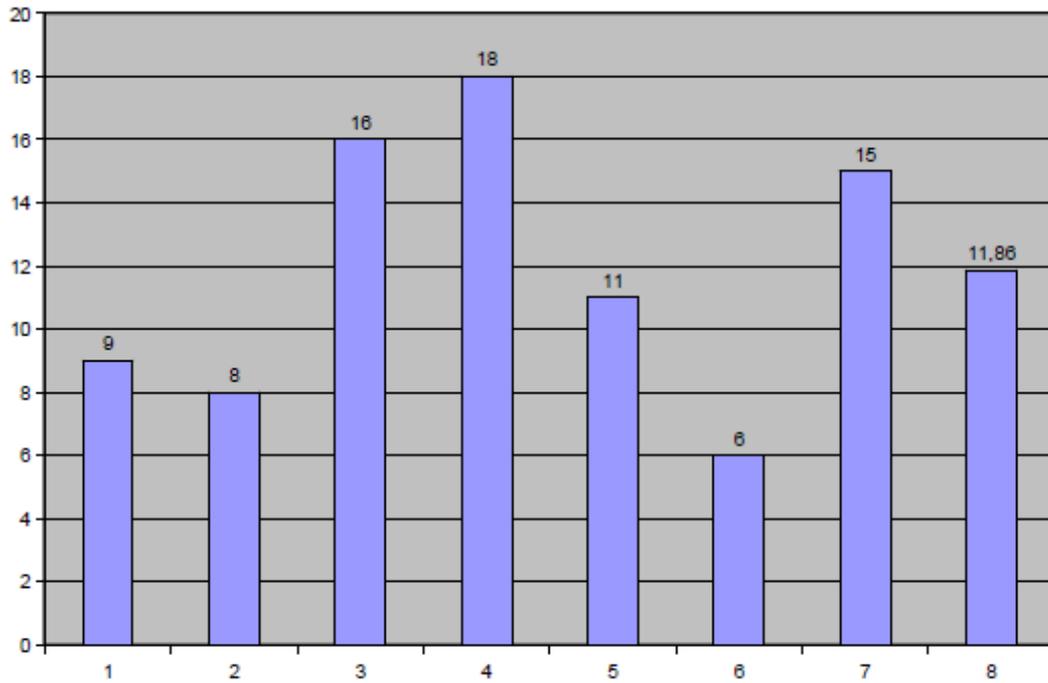


Abb. 3: Darstellung der Messergebnisse der EGCG-Gruppe nach 60 Min. Ischämie in pA.

Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

3.2.3. ERGEBNISSE NAACL 1H

In einer weiteren Kontrollgruppe mit 3 Tieren wurde nach einstündiger Ischämiezeit Natriumchloridlösung anstatt EGCG-Lösung injiziert, im gleichen Volumen wie der Gruppe mit EGCG-Applikation.

Der höchste gemessene Wert betrug in dieser Gruppe 26 pA, der niedrigste 21 pA, der Mittelwert liegt bei 23.7 pA.

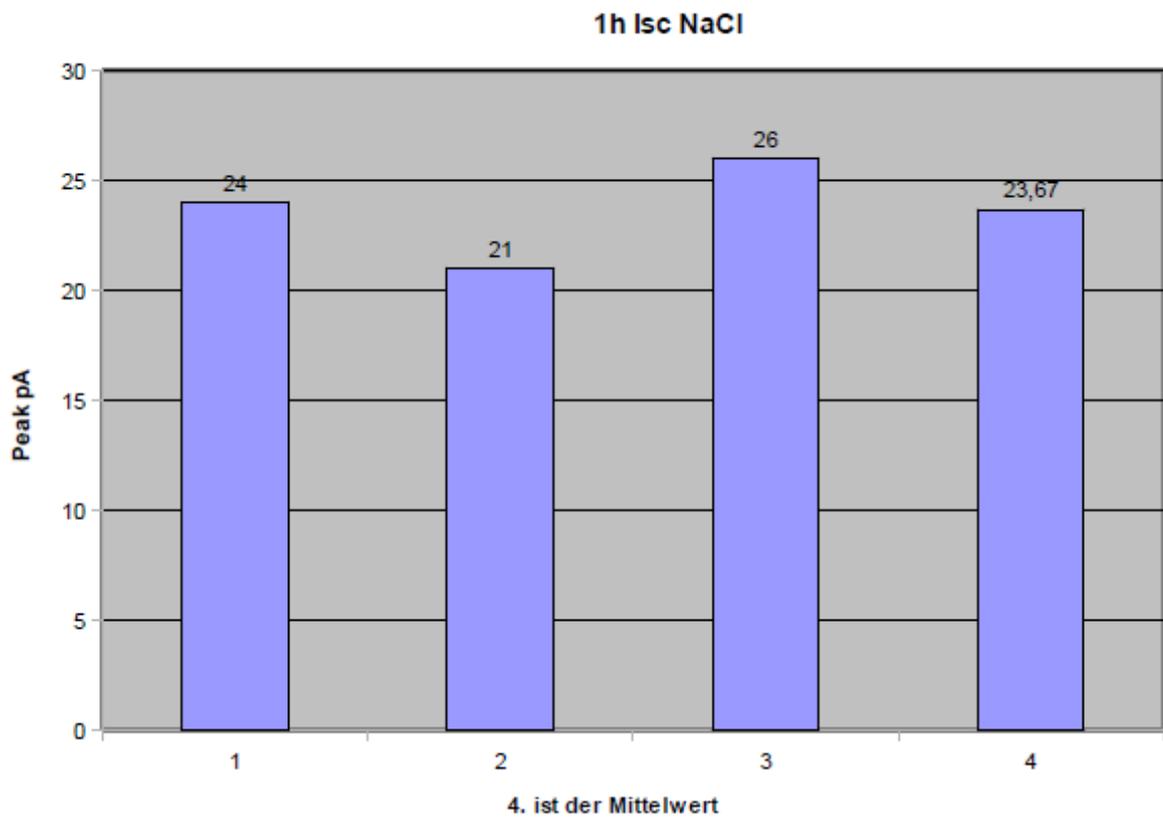


Abb. 4 : Darstellung der Messergebnisse der NaCl-Gruppe nach 60 Min. Ischämie in pA.
Der 4. Wert stellt den Mittelwert dar.

3.2.4. VERGLEICH 1H KONTROLLE/ EGCG / NaCl

Im direkten Vergleich zwischen den 60 Min. Ischämie-Gruppen (Kontrolle vs. EGCG, die NaCl-Gruppe wurde bei n=3 nicht in den statistischen Vergleich einbezogen) zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Die Kontrollen unterscheiden sich signifikant ($p=0,0027^{**}$) von EGCG. Die Werte der Kontrollen sind höher. Die Applikation von EGCG führte zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen Superoxidradikalkonzentration.

Die Werte der Kontrollgruppe und der NaCl-Gruppe sind fast identisch.

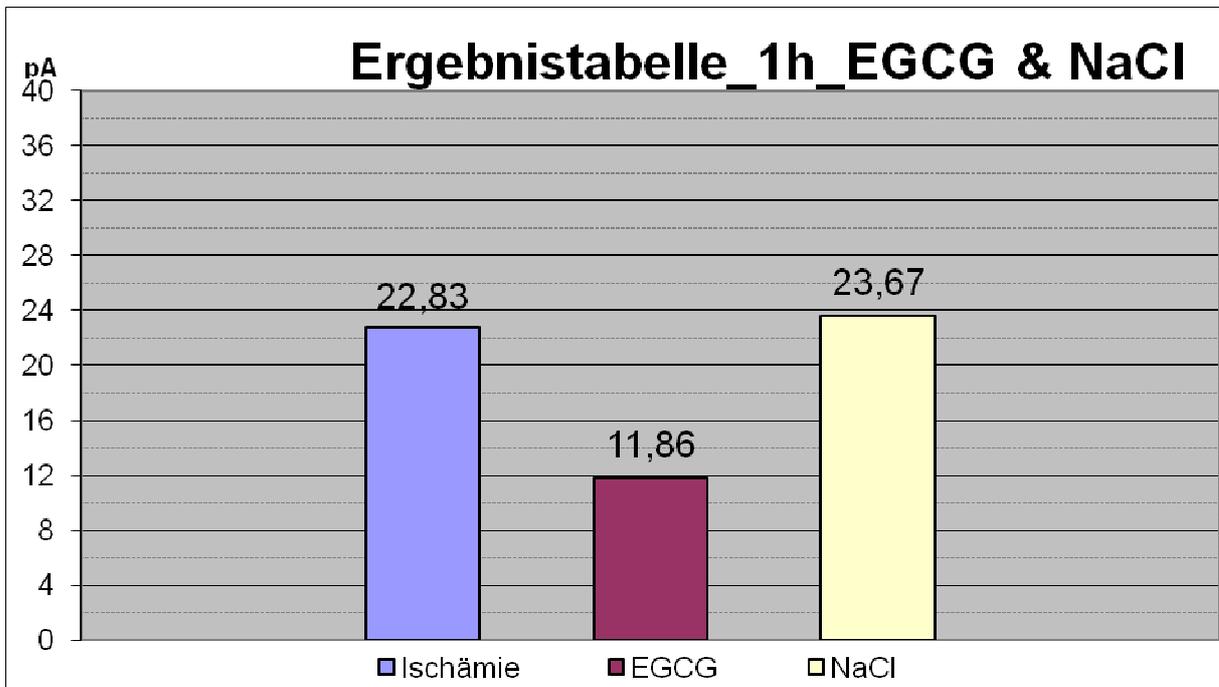
Abb. 5: Vergleich nach 1 Stunde: Kontrolle, EGCG, NaCl

3.2.5. ERGEBNISSE KONTROLLGRUPPE 2H

In der Abbildung unten sind die jeweiligen maximalen Superoxidkonzentrationen für die Versuche der zweiten Kontrollgruppe nach zweistündiger Ischämie dargestellt.

Der höchste gemessene Ausschlag betrug 31 pA, der niedrigste 18 pA, dies ergibt einen Mittelwert von 25,43 pA bei einem Median von 27 pA.

27 pA entsprechen einer Erhöhung der Superoxidkonzentration um 220 nmol/L.



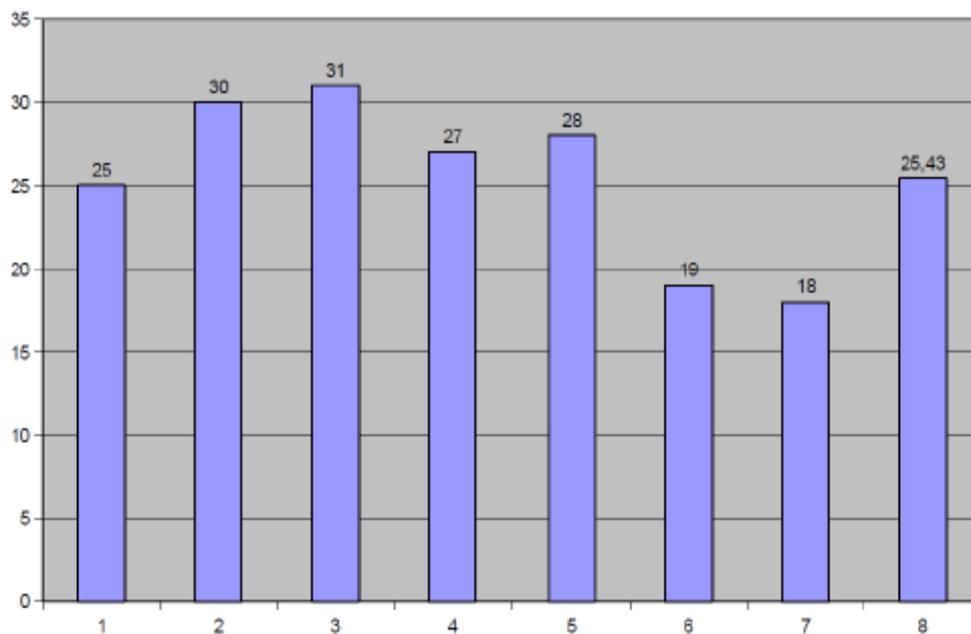


Abb. 6: Darstellung der Messergebnisse der Kontrollgruppe nach 120 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

3.2.6. ERGEBNISSE EGCG 2H

Die Applikation von EGCG führte zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen Superoxidradikalkonzentration. Der höchste gemessene Ausschlag betrug in der Gruppe 120 Min. Ischämie und EGCG-Applikation 20 pA, der niedrigste 8 pA, dies ergibt einen Mittelwert von 15,5 pA bei einem Median von 16,5pA.

16,5 pA entsprechen einer Erhöhung der Superoxidkonzentration um 135 nmol/l.

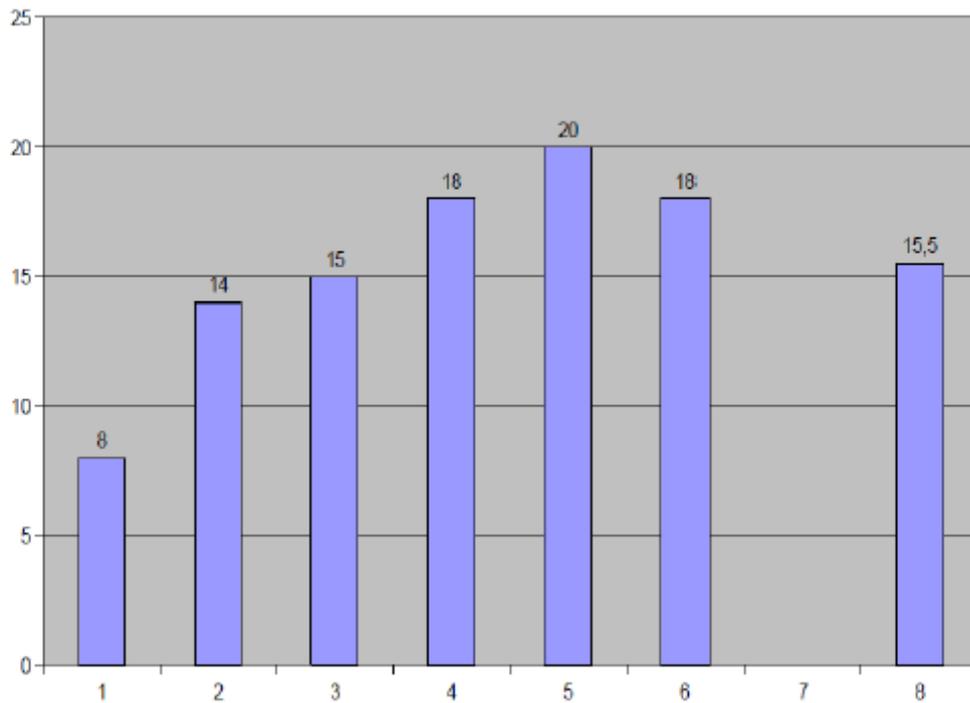


Abb.7: Darstellung der Messergebnisse der EGCG-Gruppe nach 120 Min. Ischämie in pA.

Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

3.2.7. Vergleich Kontrolle/ EGCG 2h

In den Gruppen mit zweistündiger Ischämiezeit zeigt sich wie in den Gruppen nach einstündiger Ischämiezeit ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der EGCG-Gruppe. Die Messwerte unterscheiden sich signifikant ($p=0,0097^{**}$) von ECGC. Die Werte der Kontrollgruppe sind höher.

3.2.8. VERGLEICH EGCG 1H VERSUS 2H

Die statistische Auswertung zeigte bei einem $p=0,2228$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten nach 1h versus 2h.

3.2.9. VERGLEICH KONTROLLGRUPPE 1H VERSUS 2H

Die statistische Auswertung zeigte bei einem $p=0,0782$ keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten nach 1h versus 2h.

3.2.10. MITTELWERTE/ MEDIANE

Die Mittelwerte und Mediane der Gruppen sind jeweils sehr ähnlich. Dies belegt die hohe Qualität der Daten trotz der relativ geringen Anzahl von Versuchstieren.

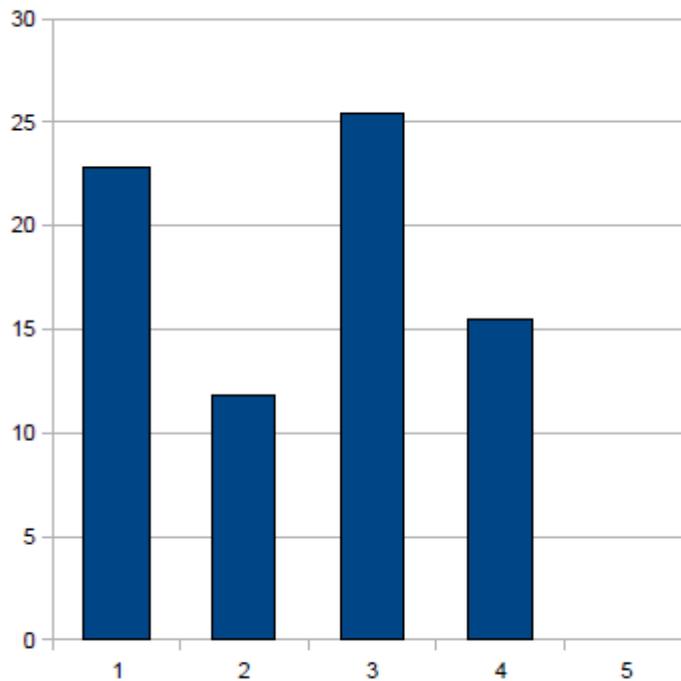


Abb. 8: Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen

1: Kontrollgruppe mit 60 Min. Ischämie

2: Gruppe mit EGCG-Gabe und 60 Min. Ischämie

3: Kontrollgruppe mit 120 Min. Ischämie

4: Gruppe mit EGCG-Gabe und 120 Min. Ischämie

Abb. 9: Vergleich der Mediane der unterschiedlichen Gruppen

1: Kontrollgruppe mit 60 Min. Ischämie

2: Gruppe mit EGCG-Gabe und 60 Min. Ischämie

3: Kontrollgruppe mit 120 Min. Ischämie

4: Gruppe mit EGCG-Gabe und 120 Min. Ischämie

max. Peak pA	1h Isc Kontr.	2h Isc Kontr.	1h Isc EGCG	2h Isc EGCG	1h NaCl
	25	25	9	8	24
	24	30	8	14	21
	23	31	16	15	26
	22	27	18	18	
	23	28	11	20	
	20	19	6	18	
		18	15		
Mittelwert	22,83	25,43	11,86	15,5	23,67
Median	23	27	11	16,5	24
Standardabw.	1,72	5,13	4,53	4,28	2,52

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse der Gruppen

3.3. HISTOLOGIE: MUSKELPRÄPARATE KONTROLLGRUPPE VERSUS EGCG

Nach Beendigung der Messungen und Tod der Tiere wurde bei den Tieren der M. gastrocnemius des operierten Beins sorgsam frei präpariert und in Formalin konserviert. Es erfolgte eine HE-Färbung der Schnitte.

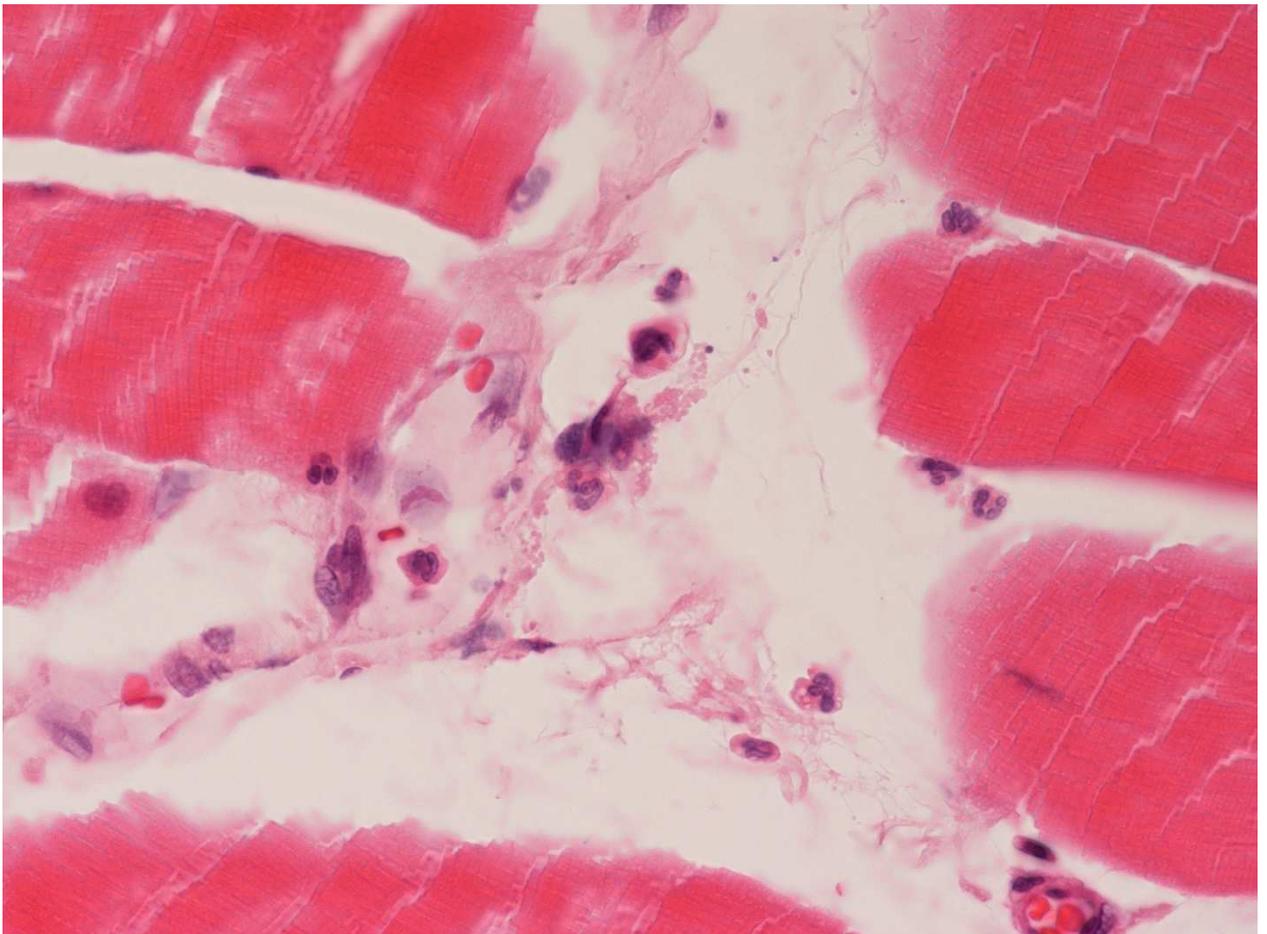


Abb. 10: Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion. Die Länge des unteren Bildrands beträgt 204 μm .

Im histologischen Schnitt zeigt sich eine deutliche Verbreiterung des Interstitiums als Merkmal eines Ödems. In der Bildmitte und am rechten unteren Bildrand sind Gefäße

angeschnitten. Intravasal und perivaskulär befinden sich zahlreiche eingewanderte Granulozyten. Eine teilweise Rhabdomyolyse mit Vakuolisierung und Verlust der Querstreifung wird sichtbar. Eine Vakuolisierung gilt als Kennzeichen des Zelluntergangs, ist jedoch nicht durch Granulozyten induziert.

Neben nekrotischen Muskelzellen überwiegen noch die vitalen Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur.

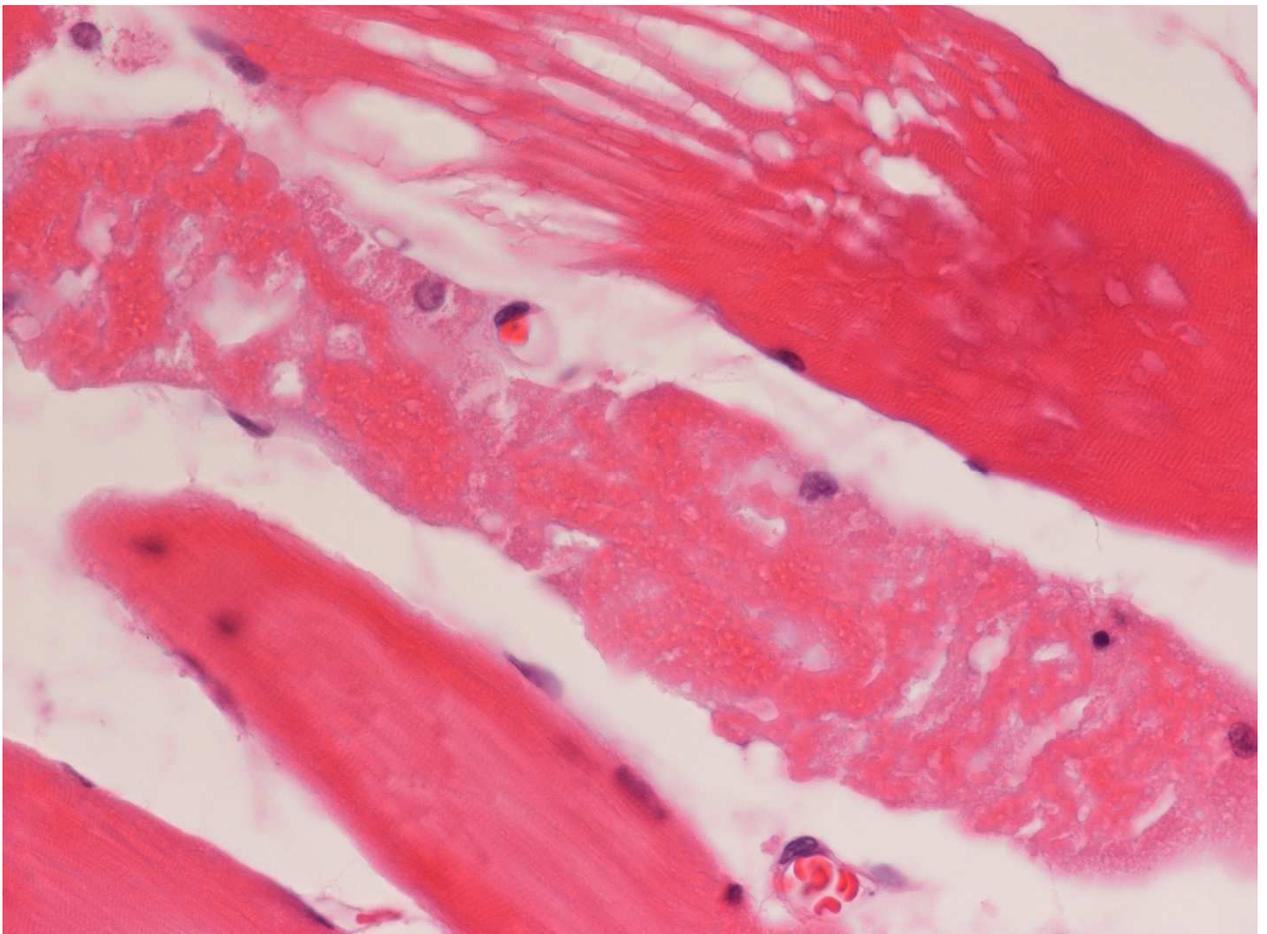


Abb. 11: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 204 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Im Bild sieht man bei der obersten Zelle eine deutliche Vakuolisierung und Myolysen. Bei der in der Mitte des Bildes abgebildeten Zelle ist die Myolyse noch weiter fortgeschritten, zeigt ebenfalls Vakuolisierung und zusätzlich Zellfragmentierung, das verbreiterte Interstitium als Merkmal des Ödems findet sich ebenfalls. In der Abbildung sieht man deutlich die perivaskuläre Ansammlung von Leukozyten sowie eine beginnende Demarkation.

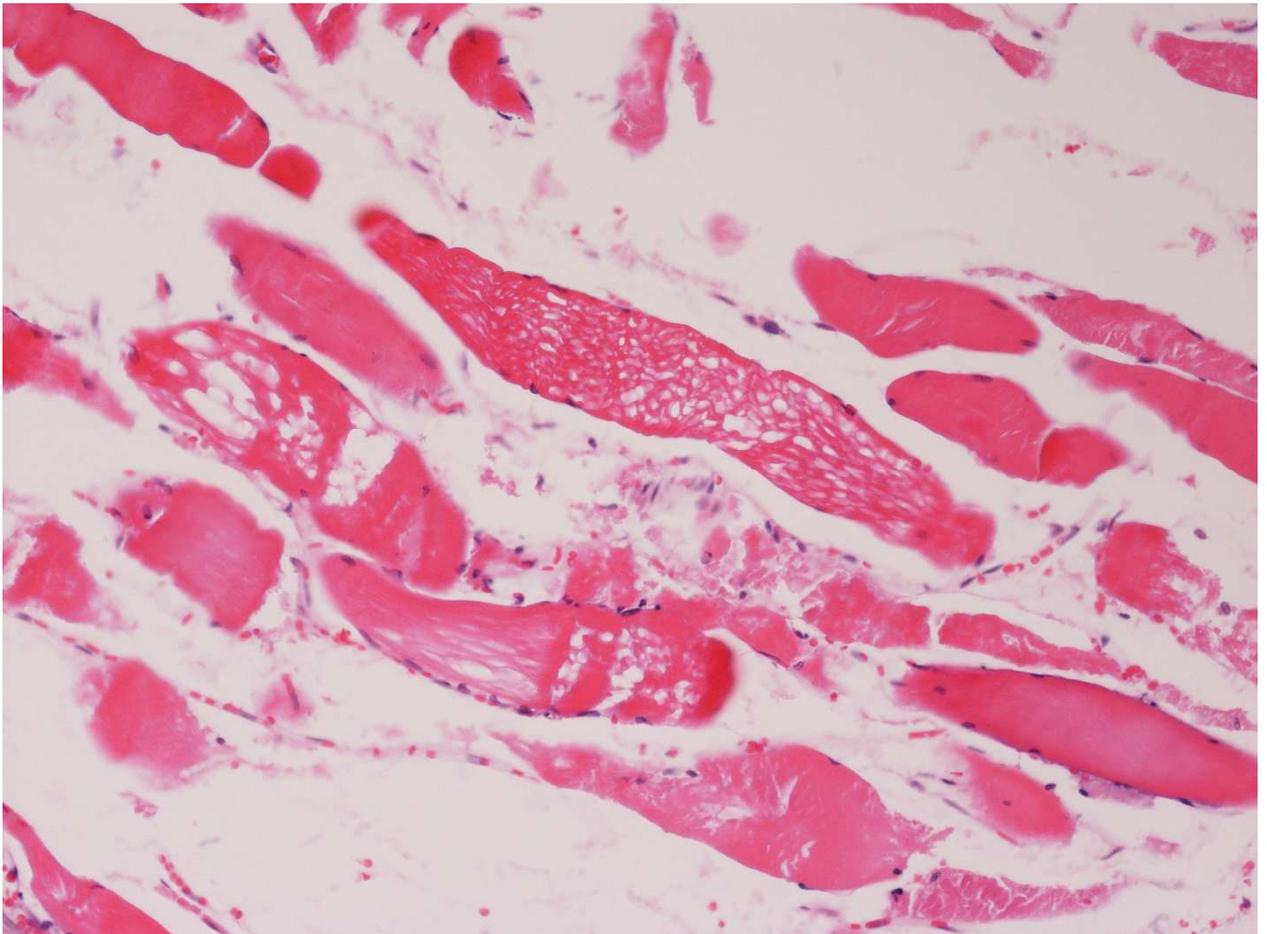


Abb. 12: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

In einer größeren Übersicht bei einer kleineren Vergrößerung zeigen sich die verschiedenen Merkmale der postischämischen Gewebsschädigung nebeneinander: Vakuolisierung, Zellfragmentierung, Myolyse, deutliches Ödem sowie eingewanderte Granulozyten.

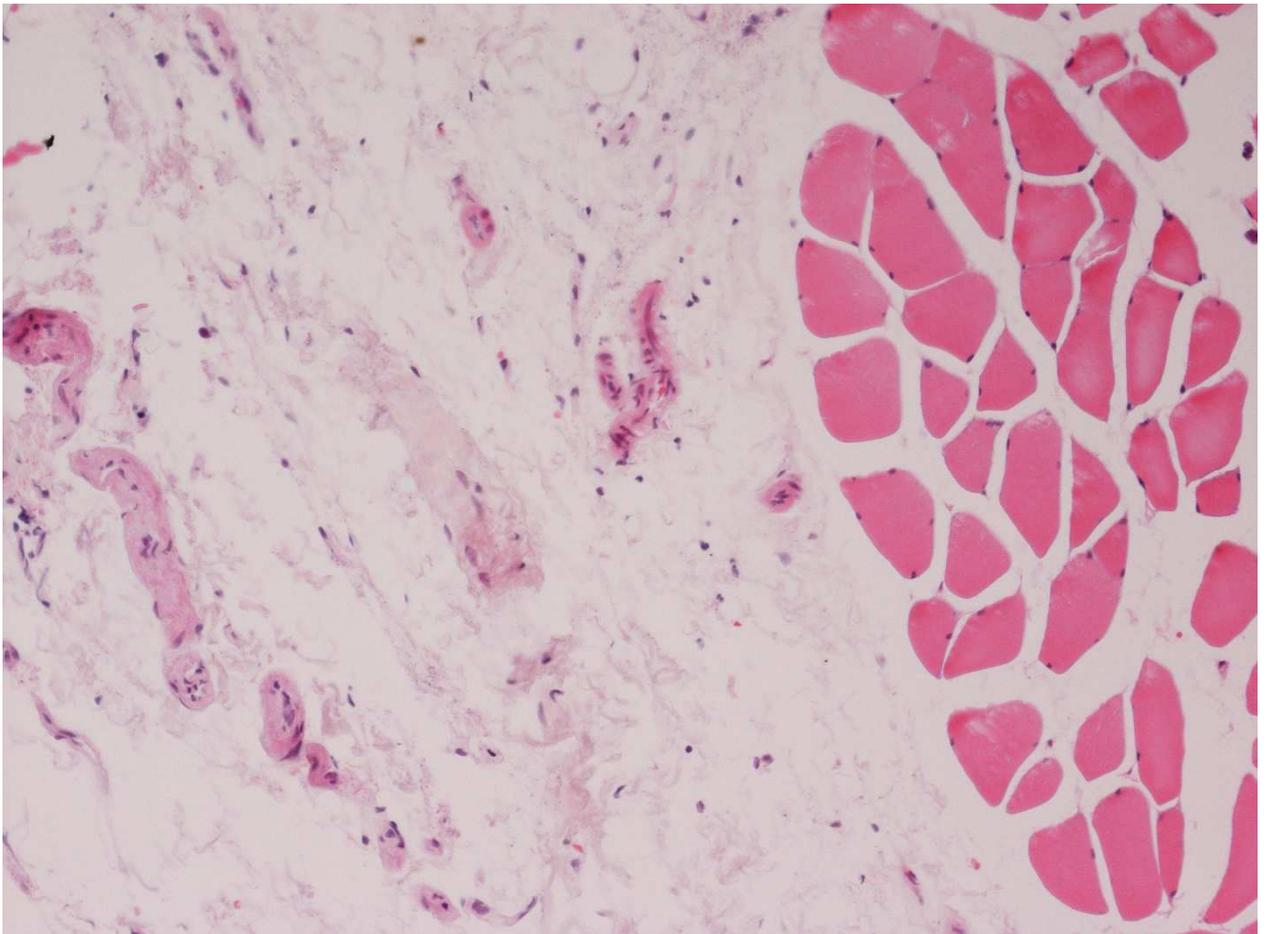


Abb. 13: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Es stellt sich das perivaskuläre und intrafaszikuläre Ödem dar.

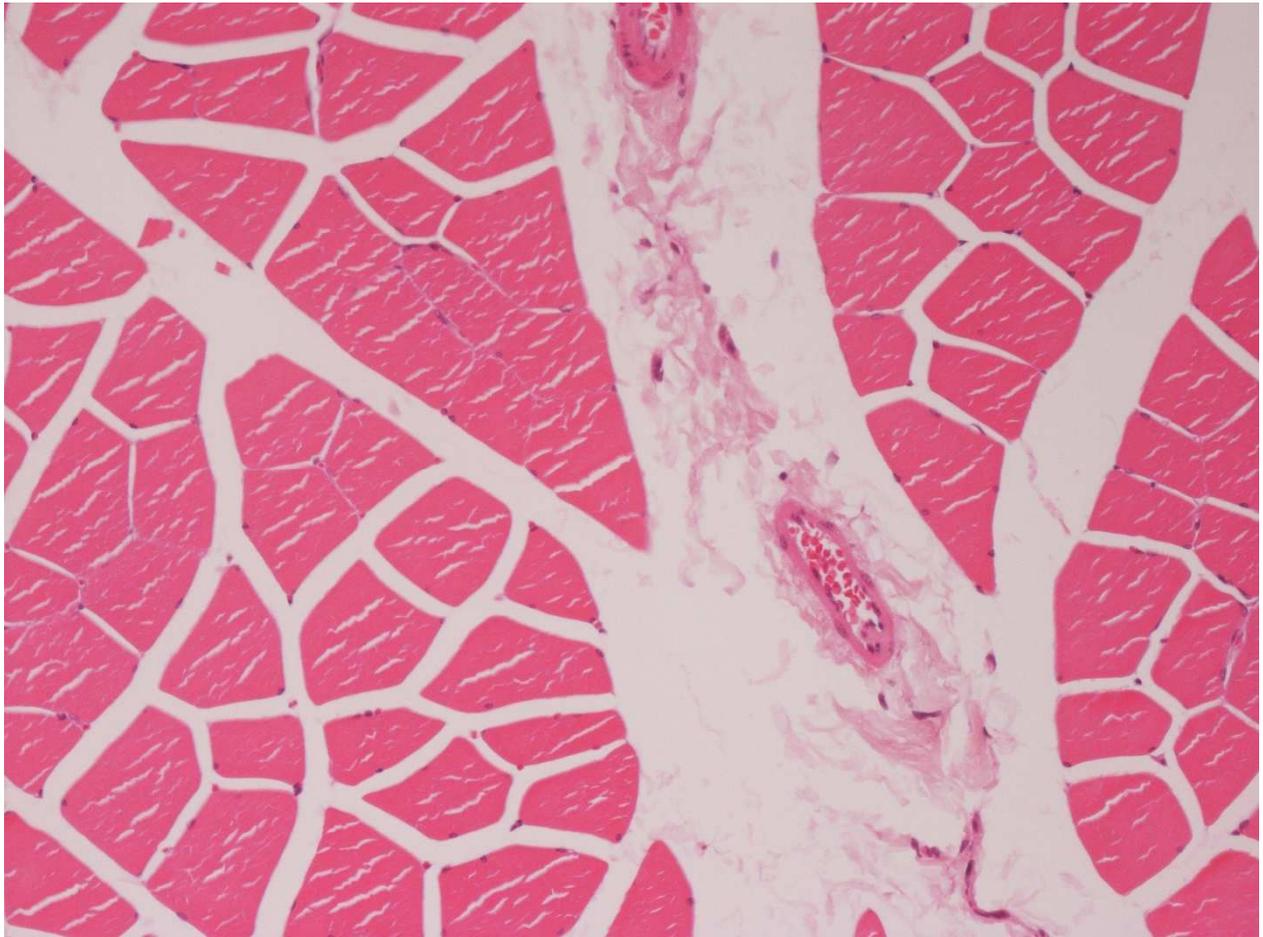


Abb. 14: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min.

Reperfusion

Hier zeigt sich ein deutlich geringeres perivaskuläres Ödem, kaum Granulozyteneinwanderung, keine Vakuolisierung oder Nekrosen der Muskelzellen. Die Spalträume innerhalb der Muskelzellen sind durch den Wasserentzug und die Fixierung mit Alkohol bedingte Artefakte.



Abb. 15: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Hier zeigt sich ebenfalls ein deutlich geringeres Ödem intramuskulär, Granulozyten sind nicht eingewandert, es sind keine Nekrosen sichtbar.

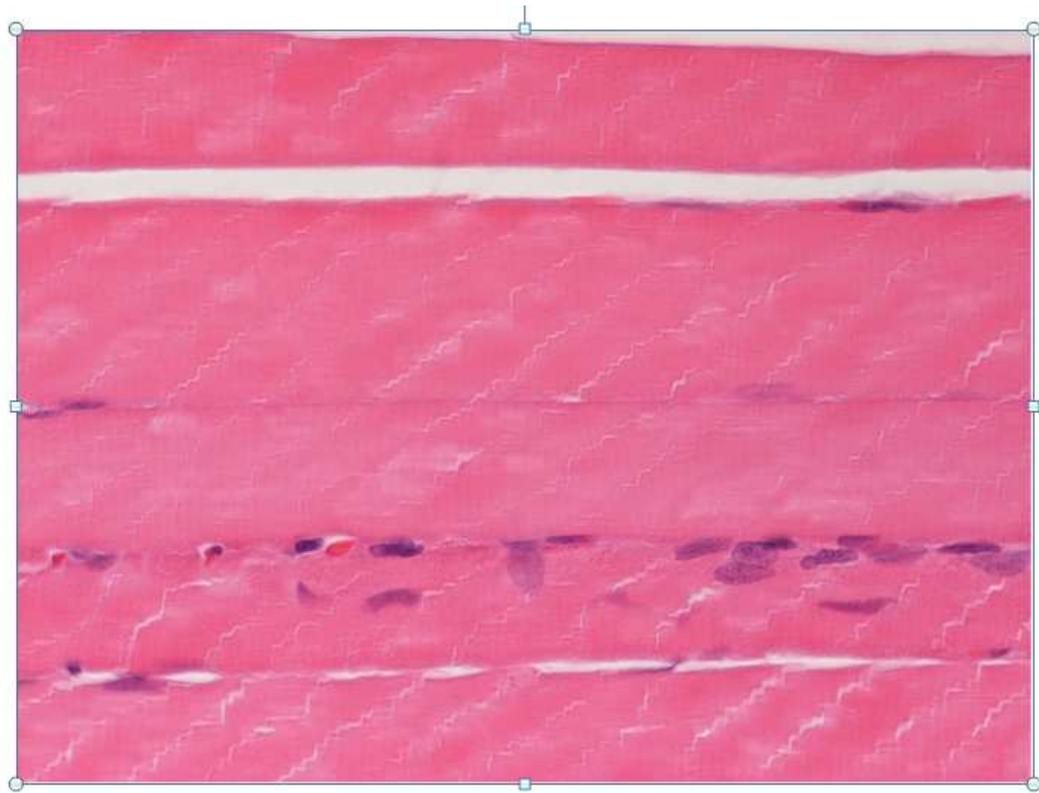


Abb. 16: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 204 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Es zeigt sich eine vitale quergestreifte Muskelzelle, keine Vakuolisierung, keine Granulozyten.

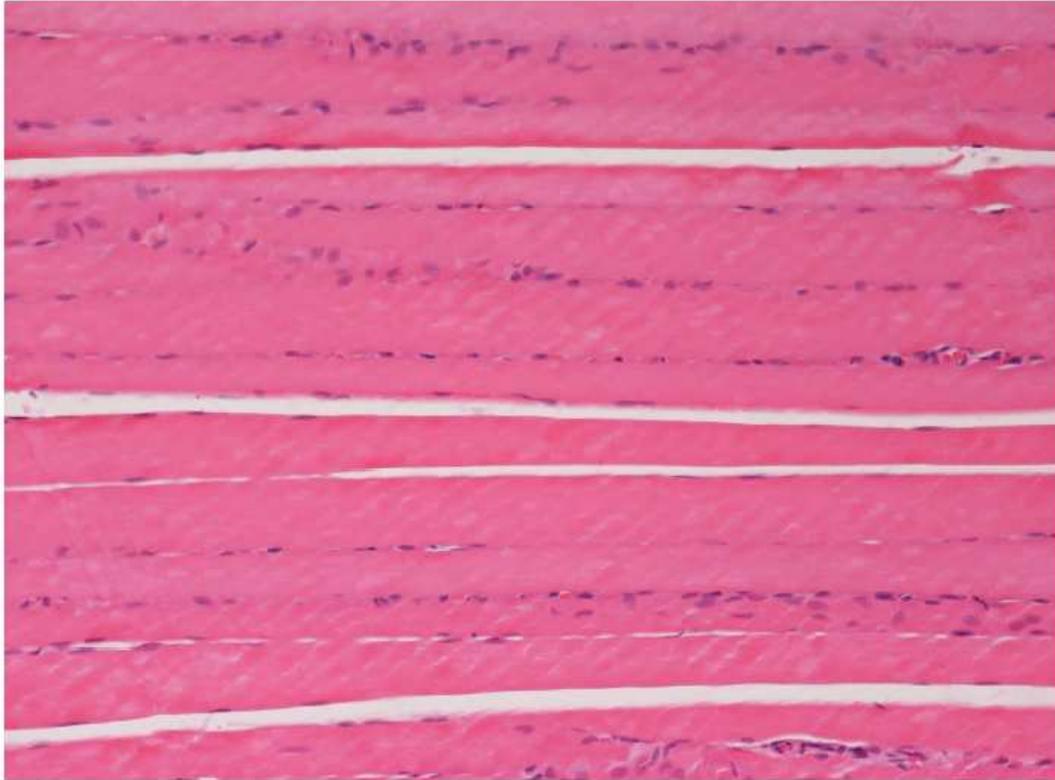


Abb. 17: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Es zeigen sich vitale quergestreifte Muskelzellen, das intramuskuläre Ödem ist nur sehr schwach ausgeprägt, Granulozyten treten kaum in Erscheinung.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die histologischen Schnitte der Gruppe 1 h mit EGCG-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erheblich geringere Gewebsschädigung aufweisen. Dies zeigt sich insbesondere in der geringeren Anzahl fokaler Myolysen.

Beginnender Zelluntergang, interstitielles und intrazelluläres Ödem, Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Leukozyten sowie Karyolysis können auch hier verzeichnet werden, sind aber deutlich schwächer ausgeprägt.

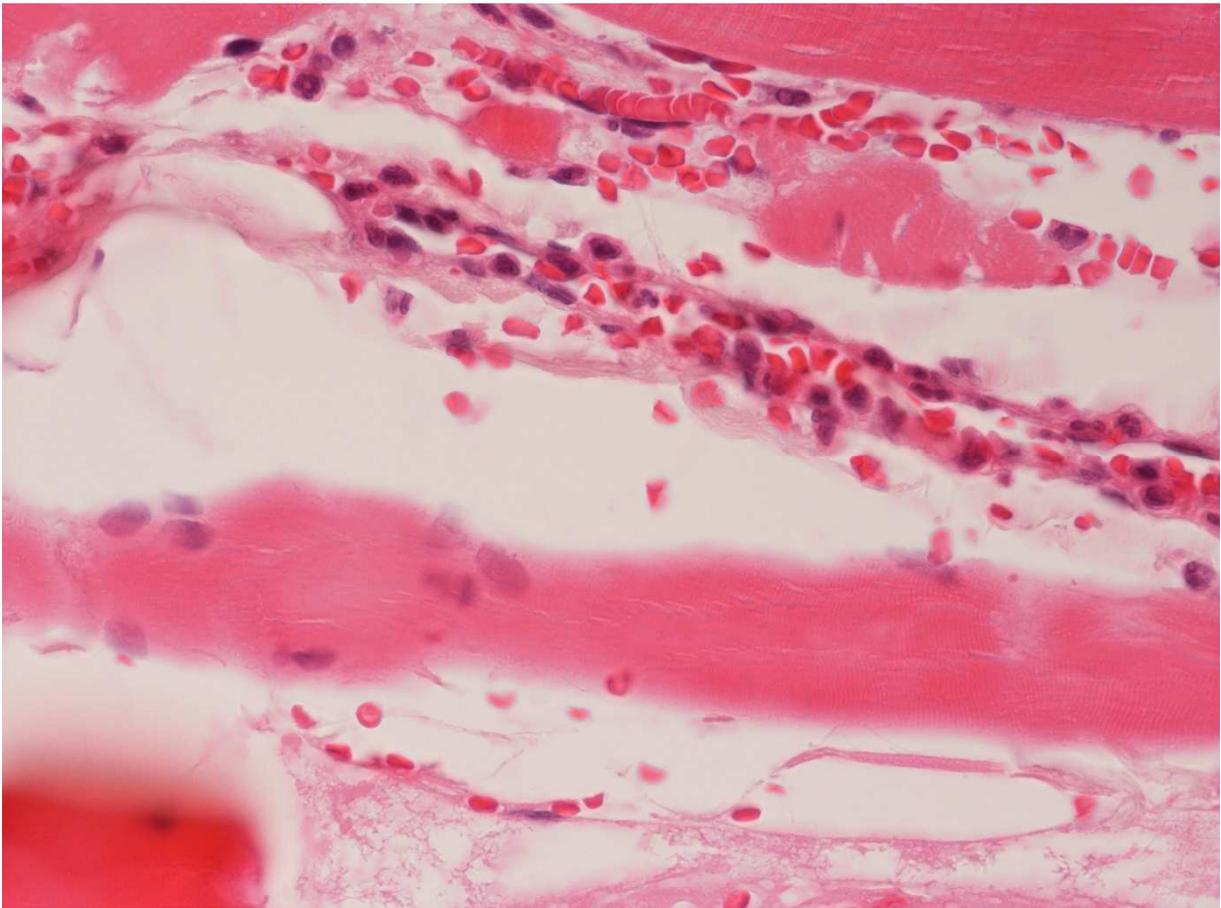


Abbildung 18: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 204 μ m. Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte der Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion.

Im histologischen Schnitt zeigt sich eine deutliche Verbreiterung des Interstitiums als Merkmal eines Ödems. In der Bildmitte ist ein Gefäß angeschnitten, hier zeigt sich deutlich die Leukozytenadhärenz und Leukozytendiapedese. Ebenso befinden sich intravasal und perivaskulär zahlreiche eingewanderte Granulozyten.

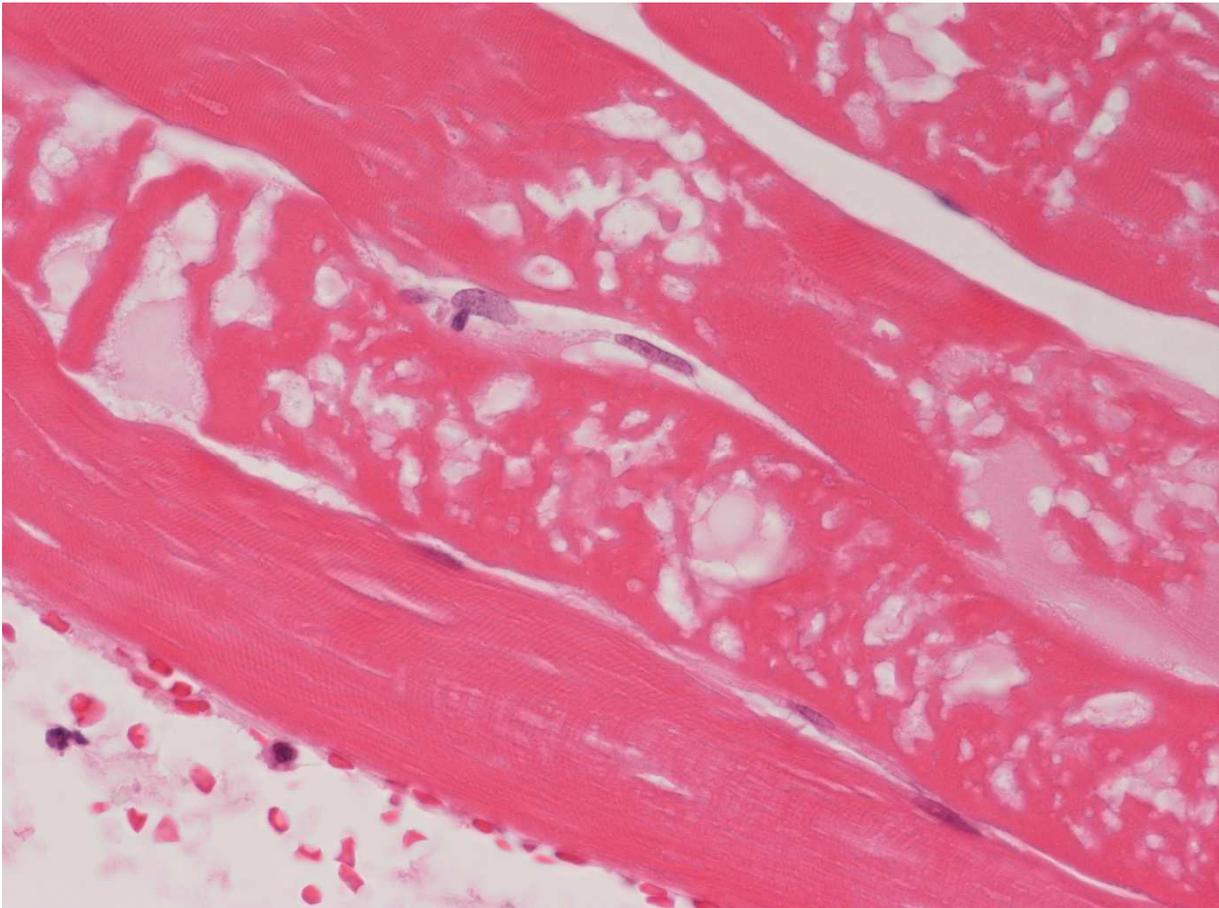


Abbildung 19: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 204 μ m. Längsschnitt des M. Gastrocnemius der Ratte, Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion.

Hier wird die Rhabdomyolyse, mit Vakuolisierung und Verlust der Querstreifung sichtbar.

Vakuolisierung gilt als Kennzeichen des Zelluntergangs, der nicht durch Granulozyten induziert wird .

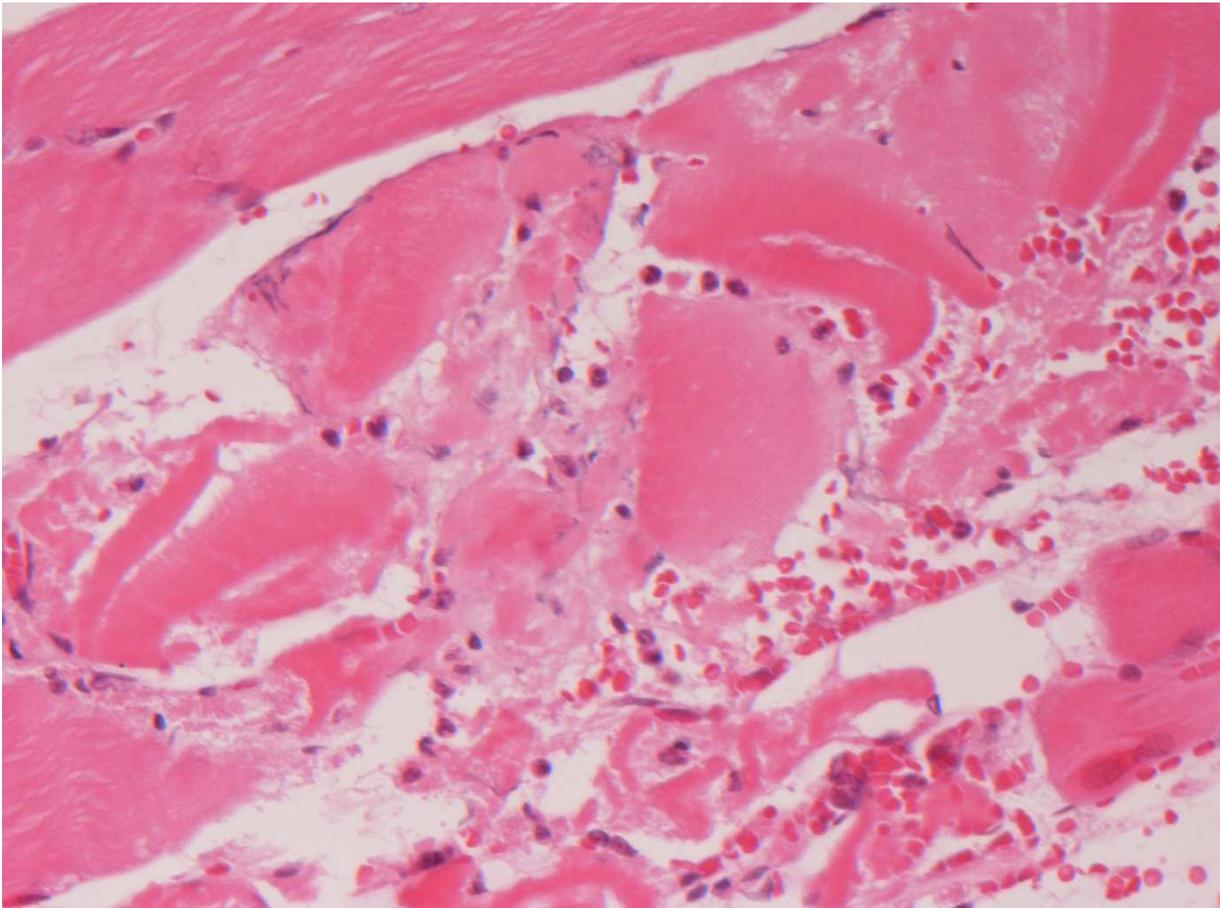


Abbildung 20: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 306 μm . Längsschnitt des M. Gastrocnemius der Ratte, Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion.

In diesem Bild sind die Muskelzellnekrosen offensichtlich, diese zeigen sich u.a. in der Vakuolisierung und Myolysen. Bei der in der Mitte des Bildes abgebildete Zelle ist die Myolyse besonders deutlich fortgeschritten, zeigt ebenfalls Vakuolisierung und zusätzlich Zellfragmentierung. Granulozyten sind eingewandert, ein verbreitertes Interstitium als Merkmal des Ödems findet sich hier ebenfalls. Neben der Demarkation des postischämischen Gewebes zeigt sich die perivaskuläre Ansammlung von Leukozyten.



Abbildung 21: Querschnitt des quergestreifter Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 1225 μm . Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion.

Diese Vergrößerung wurde gewählt, um eine Übersicht über das Gewebe zu erhalten. Bereits in dieser relativ schwachen Vergrößerung erscheint das Gewebe wesentlich vitaler, das Ödem ist nur schwach ausgeprägt, es hat kaum eine Einwanderung von Granulozyten stattgefunden, bei den Muskelzellen zeigen sich weder Vakuolisierung noch Nekrosen.

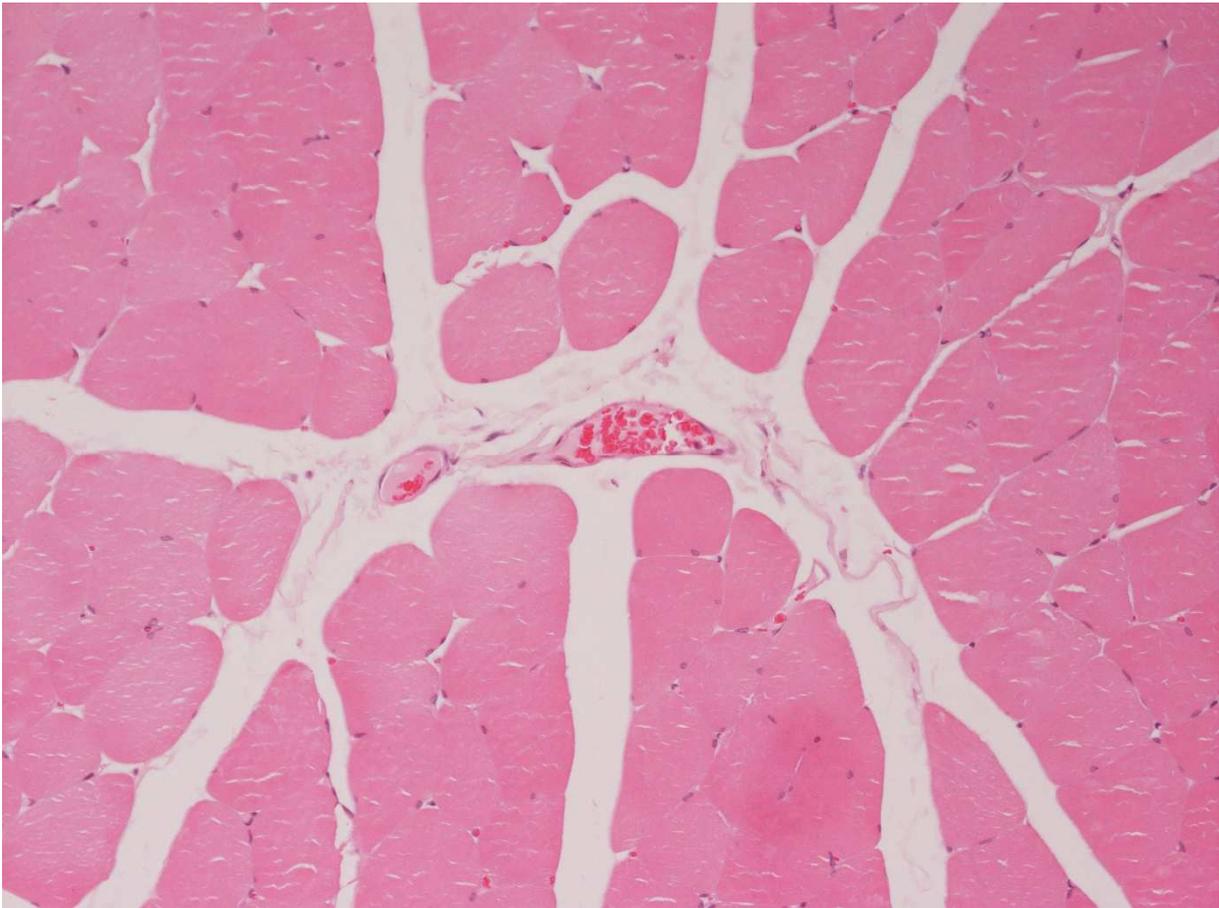
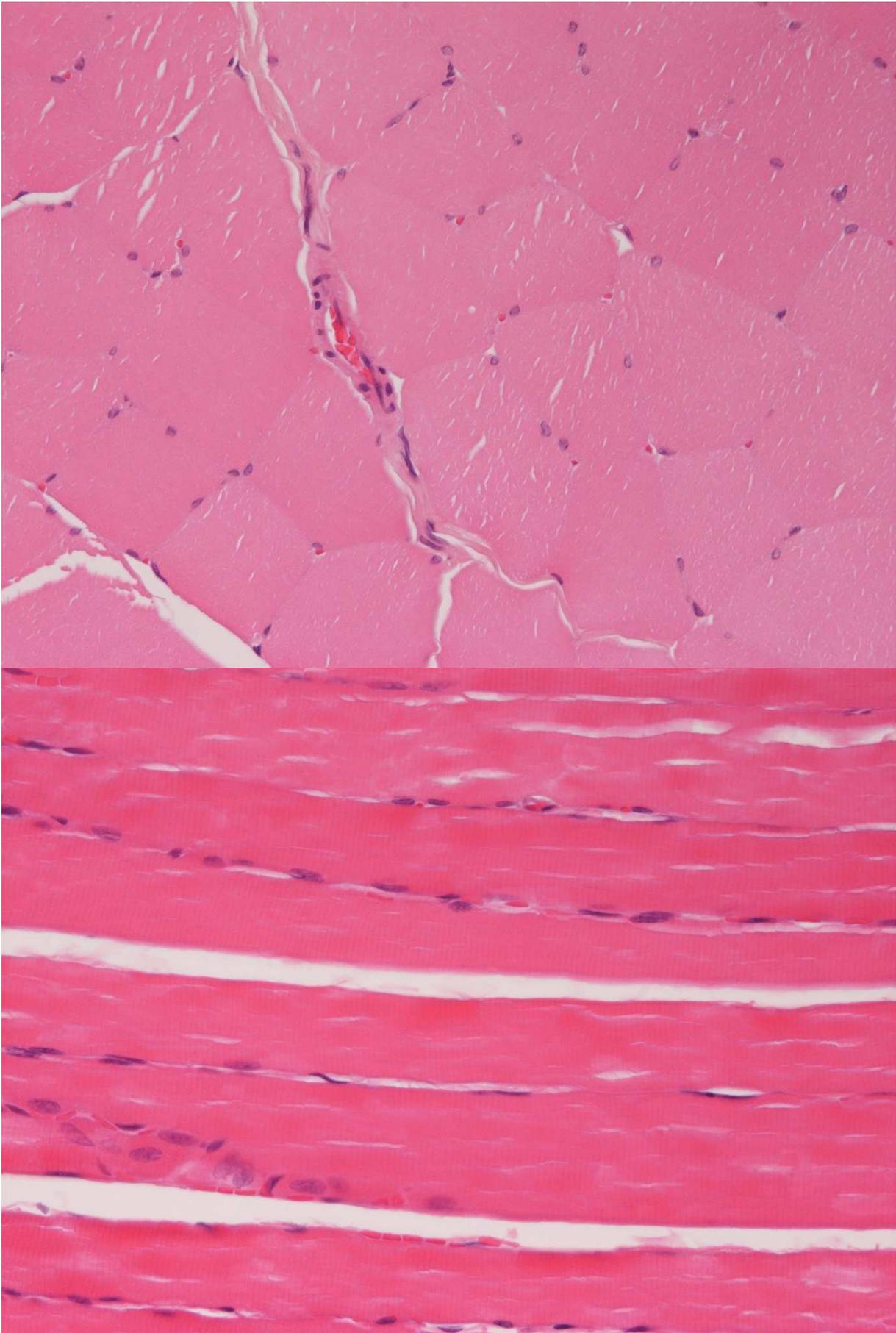


Abbildung 22: Querschnitt des quergestreifter Muskulatur des M. Gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion.

In der Mitte des Bildes zeigt sich ein im Querschnitt angeschnittenen Gefäß. Intravasal befinden sich Erythrozyten, jedoch keine adhärenenten Leukozyten bzw. Leukostase. Auch perivaskulär und im Interstitium befinden sich keine Leukozyten, somit fehlt der Nachweis für eine Diapedese, die erst nach einer Interaktion mit Leukozyt und Adhäsionsmolekül statt findet. Das Ödem ist hier ebenfalls nur gering ausgeprägt. Es zeigen sich weder eine Zellvakuolisierung, noch Nekrosen.



In den Abbildungen der vorherigen Seite zeigt Nr. 23 einen Querschnitt und Nr. 24 einen Längsschnitt quergestreifter Muskulatur des M. Gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 306 μm . Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion.

Auch in diesen Schnitten bestätigt sich der wie zuvor beschriebene Befund, kaum Ausbildung eines Ödems, keine Zellnekrosen, keine Leukozyteninfiltration.

4. DISKUSSION

4.1. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Trotz der relativ geringen Anzahl von Tieren zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zugunsten EGCG. Dies demonstriert den ausgeprägten protektiven Effekt von EGCG zur Minderung des postischämischen Reperfusionsschadens. Da sich nach zweistündiger Ischämie ebenso gute Effekte wie nach einer Stunde Ischämiedauer zeigten, kann auf einen wesentlichen Schutzeffekt von EGCG selbst nach längerer Ischämie geschlossen werden; anhand der ähnlichen Messwerte kann sogar ein protektiver Effekt nach wesentlich längerer Ischämie in Betracht gezogen werden. Die Werte der Kontrollgruppe und der NaCl- Gruppe nach 60 Min. Ischämie sind fast identisch, deshalb kann man davon ausgehen, dass die Injektion selbst zu keiner Verfälschung der Messwerte geführt hat.

Da sich in den histologischen Schnitten der Muskelpräparate der EGCG-Gruppe signifikant geringere Gewebsschädigungen als in der Kontrollgruppe zeigten, wird die klinische Relevanz der verminderten Superoxidkonzentration infolge der EGCG-Gabe eindrucksvoll untermauert. Gleichzeitig wird damit auch die klinische Relevanz des gewählten Versuchsprotokolls bestätigt.

4.2. BEDEUTUNG DER COMPUTERGESTÜTZTEN MESSUNG MIT CYTOCHROM-C-SENSOR

Die elektrochemische Messung der Aktivität verschiedener Antioxidantien mit dem Cytochrom-C-Sensor hat sich als sensitiv und relativ preiswert erwiesen. Die praktische Anwendbarkeit wurde demonstriert, indem die antioxidative Kapazität unterschiedlicher Flavonoide verglichen wurde⁴⁵. Die zuverlässige Messbarkeit der Superoxidbildung in der postischämischen Reperfusionphase wurde bereits in einem analogen Tierversuch ohne Antioxidantien-Gabe vorgeführt⁴⁶. Die Messung der Superoxidbildung wurde z. B. auch in einer Zellkultur mit Glioblastomzellen demonstriert⁴⁷.

Der computergestützten In-vivo-Messung mit dem Cytochrom-C-Sensor fiel eine Schlüsselrolle für die erfolgreiche Versuchsdurchführung zu. Nur in vivo konnte eine exakte Messung des Ausmaßes der Superoxidbildung – und damit des maximalen Effekts und der Dynamik des Reperfusionsschadens während der Ischämie- und Reperfusionphase – gewährleistet werden. Die Werte konnten durch die elektronische Datenübertragung exakt aufgezeichnet werden. Damit ergab sich anscheinend eine deutlich zuverlässigere quantitative Messung als mit früheren Versuchsmodellen. Allerdings könnte dies nur durch einen direkten Vergleich der hier angewandten Messmethode mit früheren Messmodellen nachgewiesen werden.

Die im Kapitel 2, „Material und Methoden“, beschriebene aufwändige Vorbereitung der Messelektrode vor Beginn der Messung war zweifellos eine Voraussetzung für die hohe Messqualität bzw. dafür, dass bei der relativ geringen Zahl der Tiere nur geringe Standardabweichungen auftraten. Für zukünftige Versuche mit ähnlicher Zielsetzung kann der gewählte Cytochrom-C-Sensor sehr gute Voraussetzungen bieten.

4.3. VERGLEICH MIT ANDEREN EXPERIMENTEN

Polyphenole sind in verschiedenen Pflanzen vorhanden⁴⁸. Ihre Fähigkeit, als „Radikalfänger“ zu agieren, hängt anscheinend mit der Anzahl und Position aromatischer Hydroxylgruppen am aromatischen Ring zusammen⁴⁹. Viele gesundheitsfördernde Effekte des Tee-Konsums werden den Polyphenolen zugeschrieben⁵⁰. Die antioxidativen Effekte der Catechine sind seit längerem untersucht⁵¹. Die dafür verantwortlichen Anteile der Strukturformel wurden detailliert analysiert⁵². EGCG kann mit einem hohen Reinheitsgrad synthetisiert werden⁵³.

An isolierten Rattenherzen konnte durch Epigallocatechingallat-Gabe in Form eines Extraktes von grünem Tee 5 Minuten vor und 30 Minuten nach postischämischer Reperfusion eine Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung der Cardiodynamik gezeigt werden⁵⁴. Verschiedene Strategien zur Verminderung des postischämischen Reperfusionsschadens nach Rekanalisation bei Myokardinfarkt zeigten allerdings in klinischen Studien bisher keine überzeugenden Erfolge⁶.

Angesichts der Erfolge der ischämischen Präkonditionierung ist das Interesse an der Pathophysiologie der Reperfusionsphase wieder gewachsen. Pathophysiologisch konnten u. a. die „reperfusion injury salvage kinase (RISK)“ und die „mitochondrial permeability transition pore (PTP)“ identifiziert werden⁶. Während antioxidative, antithrombotische, antiinflammatorische und lipidsenkende Effekte der Flavonoide belegt sind, gibt es zur klinischen Beeinflussung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Teekonsum uneinheitliche Daten³³.

Im Tierversuch (an Ratten) konnte mittels Hyperoxie durch 100 % Sauerstoffbeatmung der postischämische Reperfusionsschaden nach 40-minütiger Ischämie der Arteria mesenterica superior gemindert werden⁵⁵.

4.4. KLINISCHE BEDEUTUNG

Klinisch steht natürlich im Vordergrund, eine möglichst zeitnahe Reperfusion zu erreichen. Eine Verminderung des postischämischen Reperfusionsschadens hat u. a. deshalb große Bedeutung, weil dieser auch systemische Reaktionen im Sinne einer systemischen inflammatorischen Antwort (SIRS) bis zum Multiorganversagen und Tod hervorrufen kann^{1,10}. Wichtige Ansätze sind die ischämische Präkonditionierung (in den letzten Jahren wurde dabei stark auf das „remote ischemic preconditioning“¹⁹ fokussiert), die kontrollierte Reperfusion sowie der therapeutische Einsatz von Antioxidantien⁶. In dieser Arbeit wurde die antioxidative Therapie mit EGCG untersucht.

Tee, insbesondere auch grüner Tee, wird seit Jahrtausenden von Menschen getrunken. Relevante unerwünschte Wirkungen sind dabei zumindest bei Erwachsenen nicht aufgetreten. Im Gegenteil, in der Literatur sind günstige prognostische Auswirkungen des regelmäßigen Konsums von grünem Tee beschrieben. Den Catechinen und insbesondere EGCG wird dabei eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben.

In der Literatur wird auf die Notwendigkeit verstärkter klinischer Forschung auf dem Gebiet des postischämischen Reperfusionsschadens hingewiesen¹³. Wenn sich Unterschiede im Ausmaß der Sauerstoffradikalbildung nach Anwendung von EGCG in weiteren Experimenten bestätigen lassen, ergibt sich eine enorme klinische Relevanz. Bei

einer absehbaren Ischämie- /Reperfusionssituation wie im Beispiel der freien Lappenplastik erscheinen Studien zu den klinischen Effekten einer vorherigen EGCG-Anwendung gerechtfertigt. Dabei bliebe zu klären, welcher Zeitpunkt und welche Dauer der EGCG-Anwendung die Reduktion des Reperfusionsschadens optimal begünstigen. Sehr interessant erscheint auch die Frage, ob der orale Konsum von grünem Tee vor einer solchen Operation bereits zu einer Reduktion des Reperfusionsschadens führen kann. In einem Tierexperiment (an Ratten) zeigte sich nach oraler Aufnahme dreier Tee-Catechine zwar nur eine geringe systemische Verfügbarkeit von EGCG, aber eine wesentlich längere terminale Eliminations-Halbwertszeit als nach intravenöser Applikation⁴⁰. Anhand dieser Daten kann auf einen Vorteil der oralen Gabe spekuliert werden. Epicatechin wurde nun in einem anderen Experiment an Ratten nach oraler Aufnahme frühzeitig in einem hohen Maß verstoffwechselt⁵⁶. Deshalb sind in vivo möglicherweise wesentlich höhere Dosen als in vitro erforderlich.

Über ihre antioxidative Wirkung hinaus sind Polyphenole in der Lage, den Cholesterinspiegel zu senken, was bei chinesischen Probanden nachgewiesen wurde⁵⁷. In einer Studie mit männlichen Probanden, die Rotwein konsumierten, wurde allerdings die Ex-vivo-Lipoproteinoxidation nicht durch im Wein enthaltene Phenole beeinflusst⁵⁸. In einer weiteren Studie mit 9 Männern und Frauen waren die Plasma-Catechin-Konzentrationen nach Konsum von alkoholfreiem oder alkoholhaltigem Rotwein identisch. Der alkoholhaltige Rotwein beschleunigte aber die Catechin- Aufnahme aus dem Plasma⁵⁹. In einer epidemiologischen Studie war der Konsum großer Mengen grünen Tees mit einem verringerten Risiko für ein Magenkarzinom assoziiert. Der mutmaßlich zugrunde liegende Mechanismus wurde in einem Tierversuch demonstriert⁶⁰. Für das Prostatakarzinom wurde im Tierversuch (an Ratten und Mäusen) eine präventive Wirkung von aus grünem Tee

isolierten Polyphenolen gezeigt⁶¹. Bei Tieren mit bereits vorhandenen malignen Tumoren verursachte EGCG eine starke Reduktion des Tumorwachstums⁶². Im Tierversuch (Mäuse mit Prostatakarzinom) wurde unter oraler Gabe aus grünem Tee isolierter Polyphenole eine fast komplette Inhibition der Metastasierung beobachtet⁶³. Als ein wirksamer pathophysiologischer Mechanismus wurde eine Proteasomeninhibition beschrieben⁶⁴.

Eine anscheinend altersabhängige Inhibition des P450 2B1 wurde beobachtet⁶⁵. Ein in der traditionellen afrikanischen Medizin gegen Fieber, Gonorrhoe und Hautinfektionen eingesetztes Extrakt enthält Catechine⁶⁶. Über eine bakterizide Wirkung können Catechine sogar die Effektivität der β -Laktam-Antibiotika gegen MRSA steigern⁶⁷.

Sehr interessant erscheint auch die Frage, ob Polyphenole möglicherweise über ihre antioxidative Wirkung hinaus durch die Blockade des programmierten Zelltods einen lebensverlängernden Effekt haben können⁶⁸.

4.5. LIMITATIONEN

Wie mehrfach erwähnt, wurden die Versuche mit einer relativ kleinen Anzahl von Tieren durchgeführt, was angesichts der hochsignifikanten Unterschiede zwischen der EGCG- und der Kontrollgruppe aber die Aussagefähigkeit der Ergebnisse nicht wesentlich einschränkt.

Andere bestätigende Experimente mit EGCG zur Reduktion des postischämischen Reperfusionsschadens liegen nach meiner Kenntnis für den Skelettmuskel nicht vor, d. h. längerfristige Effekte der EGCG-Applikation nach einer mehr als zweistündigen Ischämie

wurden nicht untersucht. Hier liegt nicht nur ein wesentlicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, ein Experiment mit einer längeren Beobachtungsdauer und einer größeren Anzahl von Versuchstieren könnte die in dieser Arbeit für ein- bis zweistündige Ischämien beobachteten Ergebnisse auch bestätigen.

In einem Ischämie/ Reperfusionsexperiment mit nicht hypertensiven und spontan hypertensiven Ratten konnten, analog zu unseren Ergebnissen, durch EGCG-Applikation die Einschränkung der Nierenfunktion signifikant vermindert und die Gewebsregeneration deutlich verbessert werden⁶⁹.

Es sei ausdrücklich erwähnt, dass in dieser Arbeit kein Nachweis des Pathomechanismus der benefiziellen Effekte von EGCG geführt wurde und die Versuche nicht dafür konzipiert waren.

4.6. ZUSAMMENFASSUNG

Der postischämische Reperfusionsschaden stellt ein bedeutendes Problem in der klinischen Medizin dar. Er kann im schlimmsten Fall über ein Multiorganversagen zum Tod führen. Folgerichtig sind bereits erhebliche wissenschaftliche Anstrengungen unternommen worden, Wege zu einer Minderung des Reperfusionsschadens zu finden.

In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Experiment wurde untersucht, ob EGCG als frei verfügbarer und sicher applizierbarer pflanzlicher Radikalfänger die Extremitätenmuskulatur der Ratte vor der Ausbildung eines postischämischen Reperfusionsschadens schützen kann, wenn es unmittelbar vor der Reperfusion zentralvenös injiziert wird. Als Messparameter diene dabei die Bildung von

Superoxidradikalen mit bzw. ohne EGCG-Applikation. Diese Messung erfolgte computergestützt mit einem speziell für solche Fragestellungen entwickelten Sensor.

Zusätzlich wurde jeweils nach Abschluss der Messungen der M. gastrocnemius der betroffenen Extremität entnommen, um das histologische Ausmaß des postischämischen Reperfusionsschadens mit bzw. ohne EGCG-Applikation zu beurteilen.

Sowohl hinsichtlich der Bildung von Superoxidradikalen als auch histologisch konnte in diesem Tierexperiment eine eindrucksvolle Reduktion des postischämischen Reperfusionsschadens durch EGCG-Applikation nachgewiesen werden. Eine klinische Untersuchung etwa bei der freien Lappenplastik erscheint daher vertretbar und erfolgversprechend.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Kalibrierungssignal: Auf der Ordinate ist der Signalstrom in pA dargestellt, auf der Abszisse ist die Zeit in Sek. abgebildet.

Abb. 2: Darstellung der Messergebnisse der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar, der Median beträgt 23.

Abb. 3: Darstellung der Messergebnisse der EGCG-Gruppe nach 60 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

Abb. 4: Darstellung der Messergebnisse der NaCl-Gruppe nach 60 Min. Ischämie in pA. Der 4. Wert stellt den Mittelwert dar.

Abb. 5: Vergleich nach 1 Stunde: Kontrolle, EGCG, NaCl

Abb. 6: Darstellung der Messergebnisse der Kontrollgruppe nach 120 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

Abb. 7: Darstellung der Messergebnisse der EGCG-Gruppe nach 120 Min. Ischämie in pA. Der 8. Wert stellt den Mittelwert dar.

Abb. 8: Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen

Abb. 9: Vergleich der Mediane der unterschiedlichen Gruppen

Abb. 10: Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 11: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 204 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 12: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 13: Querschnitt des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der 1. Kontrollgruppe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 14: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 15: Querschnitt des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 16: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 204 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abb. 17: Längsschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 μm . Tier der Gruppe mit EGCG-Gabe nach 60 Min. Ischämie und 60 Min. Reperfusion

Abbildung 18: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 204 μm . Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte der Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion

Abbildung 19: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 204µm. Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte, Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion

Abbildung 20: die Länge des unteren Bildrandes beträgt 306 µm. Längsschnitt des M. gastrocnemius der Ratte, Kontroll-Gruppe 120 min Ischämie und 120 min Reperfusion

Abbildung 21: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 1225 µm. Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion

Abbildung 22: Querschnitt der quergestreiften Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 612 µm. Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion

Abbildung 23 Querschnitt des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 306 µm. Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion

Abbildung 24 zeigt einen Längsschnitt quergestreifter Muskulatur des M. gastrocnemius, die untere Bildlänge beträgt 306 µm. Tier der Gruppe nach 120 min Ischämie, EGCG-Gabe und 120 min Reperfusion

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse der Gruppen

LITERATURVERZEICHNIS

1. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002;26:115-21.
2. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol* 2009;26:537-47.
3. Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, et al. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2004;78:250-6.
4. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-53.
5. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
6. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007;357:1121-35.
7. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002;34:2518-9.
8. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002;105:248-58.
9. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179:169-87.
10. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-66.
11. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002;9:161-75.
12. Stoffels F, Lohofener F, Beisenhirtz M, Lisdat F, Buttemeyer R. Concentration decrease of nitric oxide in the postischemic muscle is not only caused by the generation of O₂. *Microsurgery* 2007;27:565-8.
13. van den Heuvel MG, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RR. Review: Ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:721-6.
14. Gowda C, Toomayan GA, Qi WN, et al. The effects of N(omega)-propyl-L-arginine on reperfusion injury of skeletal muscle. *Nitric Oxide* 2004;11:17-24.
15. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78:547-81.
16. Ethridge RT, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Evers BM. Acute pancreatitis results in induction of heat shock proteins 70 and 27 and heat shock factor-1. *Pancreas* 2000;21:248-56.
17. Benz S, Pfeffer F, Adam U, Schareck W, Hopt UT. Impairment of pancreatic microcirculation in the early reperfusion period during simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transpl Int* 1998;11 Suppl 1:S433-5.
18. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998;83:117-32.
19. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79:377-86.
20. Kuntscher MV, Hartmann B, Germann G. Remote ischemic preconditioning of flaps: a review. *Microsurgery* 2005;25:346-52.
21. Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update. *Nat Rev Cardiol* 2011.

22. Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte adhesion and emigration. *Am J Physiol* 1996;271:H2052-9.
23. Kuntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobile R, Gebhard MM, Germann G. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery* 2002;22:221-6.
24. Kuntscher MV, Kastell T, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, Germann G. Acute remote ischemic preconditioning II: the role of nitric oxide. *Microsurgery* 2002;22:227-31.
25. Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 2007;42:582-93.
26. Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;44:142-52.
27. Babior BM. The enzymatic basis for O₂ production by human neutrophils. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1353-8.
28. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol Lett* 1998;102-103:5-18.
29. Ames BN, Gold LS. The prevention of cancer. *Drug Metab Rev* 1998;30:201-23.
30. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002;36:177-87.
31. Gesundheitsfördernde Wirkung von Tee (*Camellia sinensis*) - ein Überblick. Teeverband, 2007.
32. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003;424:1013.
33. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:218-28.
34. Germershausen OI, P. Alltagsdrogen oder Allheilmittel. *Pharmazeutische Zeitung* 2001.
35. Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:41-9.
36. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 2002;113 Suppl 9B:71S-88S.
37. Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 2000;44:158-63.
38. Prior RL, Cao G. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220:255-61.
39. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1173-81.
40. Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med* 2000;66:444-7.
41. Bohm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, Schwartz SJ. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem* 2002;50:221-6.
42. Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 1996;97:139-48; discussion 49-51.
43. Beissenhirtz M. Cytochrom C- basierter Superoxidsensor in organischen Medien: Universität Potsdam; 2001.
44. Beissenhirtz M. Proteinmultischichten und Proteinmutanten für neuartige empfindliche Superoxidbiosensoren: Universität Potsdam; 2005.
45. Ignatov S, Shishniashvili D, Ge B, Scheller FW, Lisdat F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosens Bioelectron* 2002;17:191-9.
46. Buttemeyer R, Philipp AW, Mall JW, Ge B, Scheller FW, Lisdat F. In vivo measurement of oxygen-derived free radicals during reperfusion injury. *Microsurgery* 2002;22:108-13.
47. Manning P, McNeil CJ, Cooper JM, Hillhouse EW. Direct, real-time sensing of free radical production by activated human glioblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1304-9.
48. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 1996;59:205-15.
49. Bors W, Michel C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1413-26.

50. Li L, Chan TH. Enantioselective synthesis of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the active polyphenol component from green tea. *Org Lett* 2001;3:739-41.
51. Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki T, Toyoda M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Arch Biochem Biophys* 1999;362:79-86.
52. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 1996;21:895-902.
53. Kohri T, Nanjo F, Suzuki M, et al. Synthesis of (-)-[4-³H]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration. *J Agric Food Chem* 2001;49:1042-8.
54. Kim CJ, Kim JM, Lee SR, Jang YH, Kim JH, Chun KJ. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate targeting myocardial reperfusion limits infarct size and improves cardiac function. *Korean J Anesthesiol* 2010;58:169-75.
55. Waisman D, Brod V, Wolff R, et al. Effects of hyperoxia on local and remote microcirculatory inflammatory response after splanchnic ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H643-52.
56. Piskula MK, Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998;128:1172-8.
57. Maron DJ, Lu GP, Cai NS, et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2003;163:1448-53.
58. Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 2000;71:67-74.
59. Bell JR, Donovan JL, Wong R, et al. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr* 2000;71:103-8.
60. Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, et al. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res* 1995;55:2081-4.
61. Gupta S, Ahmad N, Mohan RR, Husain MM, Mukhtar H. Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 1999;59:2115-20.
62. L'Allemain G. [Multiple actions of EGCG, the main component of green tea]. *Bull Cancer* 1999;86:721-4.
63. Gupta S, Hastak K, Ahmad N, Lewin JS, Mukhtar H. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10350-5.
64. Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:13322-30.
65. Huynh HT, Teel RW. Effects of plant-derived phenols on rat liver cytochrome P450 2B1 activity. *Anticancer Res* 2002;22:1699-703.
66. Coetzee J, McIteka L, Malan E, Ferreira D. Structure and synthesis of the first procassinidin dimers based on epicatechin, and gallo- and epigallo-catechin. *Phytochemistry* 2000;53:795-804.
67. Shiota S, Shimizu M, Mizushima T, et al. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biol Pharm Bull* 1999;22:1388-90.
68. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-6.
69. Jang YH, Lee YC, Park NH, et al. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate protection from ischemia/reperfusion-induced renal injury in normotensive and hypertensive rats. *Transplant Proc* 2006;38:2190-4.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Signifikanzniveau
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
α -TÄ	α -Tocopheroläquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ⁺	Kalzium
CAM	Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesions molecules)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Diphenylamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechingallat
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
GSH	Glutathion
H	Wasserstoff
HX	Hypoxanthin
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
I.E.	Internationale Einheiten
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRS	Ischämierereperfusionssyndrom
K	Kalium

KG	Körpergewicht
LAK-Zellen	lymphokinaktivierte Killerzellen
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Lipoproteine geringer Dichte(low density lipoprotein)
MAP	Kinasen mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MDA	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidase
MPS	mononukleäres phagozytotisches System
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na ⁺	Natriumion
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS -	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
nNOS -	neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
OH-	Hydroxylradikal
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAF	Plättchen aktivierender Faktor (platelet activating factor)
PECAM	Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmoleküle
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transition-Poren
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxiddismutase

UV	Ultraviolett
v	Volumen
XD	Xanthine Dehydrogenase
XO	Xanthine Oxidase

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

1.) Philipp, A.W., Schlenzka, L., Mall, J.W., Beissenhirtz, M, Lisdat, F

Epigallocatechin Gallate can significantly decrease oxygen free radicals in reperfusion injury in vivo

Transplant Proceedings 2003 Dec; 35(8): 3116-20

2.) Philipp, A.W., Schlenzka, L., Mall, J.W., Büttemeyer, R.

Die intravenöse Gabe des Polyphenols Epigallocatechingallat führt zu einer Verminderung der Superoxidradikal Entstehung im postischämischen Gewebsschaden

Chirurgisches Forum 2003, Band 32 (2003) 481-483

Vorträge:

Philipp, A.W., Schlenzka, L., Mall, J.W., Büttemeyer, R.

Epigallocatechin Gallate can significantly decrease oxygen free radicals in reperfusion injury in vivo

American Plastic Surgery Research Council

Las Vegas, April 2003

Philipp, A.W., Schlenzka, L., Mall, J.W., Büttemeyer, R.

Die intravenöse Gabe des Polyphenols Epigallocatechingallat führt zu einer Verminderung der Superoxidradikal Entstehung im postischämischen Gewebsschaden

Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie

München, Mai 2003

A.W. Philipp, L. Schlenzka, J.W. Mall, M.K. Beissenhirtz, F. Lisdat, R. Büttemeyer

Epigallocatechin Gallate can significantly decrease oxygen free radicals in the reperfusion injury in vivo

3. Deutsches Biosensor Symposium Potsdam, April 2003

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. J. M. Müller, Chefarzt und Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Charité Berlin, der es mir ermöglichte, an der Universitätsmedizin Berlin zu promovieren.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. R. Büttemeyer für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung bei seiner Bearbeitung und die konstruktive Kritik bei der Erstellung der Niederschrift der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. A. W. Philipp danken für seine wissenschaftliche Betreuung, praktische Anleitung sowie die Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und Operationen.

Des weiteren danke ich Herrn PD Dr. F. Lisdat, Leiter der Arbeitsgruppe des Instituts für Biochemie und molekulare Physiologie der Universität Potsdam, und seinen Mitarbeitern (insbesondere Herrn Moritz Beißenhirtz) für die Weiterentwicklung und Beschichtung des Sensors.

Außerdem danke ich Frau Dr. D. Pfeiffer der Firma BST für die Bereitstellung des Sensors und die großzügige finanzielle Unterstützung.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern der Versuchslabore und des Tierstalls für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe.

Sehr herzlichen Dank möchte ich auch meinem derzeitigen Chef Herrn Professor Dr. M. Wendt, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, für seine freundliche Unterstützung, sowie Herrn PD Dr. D. Pavlovic für die Hilfe und Unterstützung bei der Literatursuche aussprechen.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. F. Dombrowski für die Erstellung der Photographien der histologischen Schnitte sowie Erläuterungen danken.

Ganz besonders danke ich meiner Familie und meinen Freuden, die mich über die lange Zeit immer wieder motiviert, angespornt und unterstützt haben.

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich, Liliane Kieback, dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Der Effekt des Polyphenols Epigallocatechingallat auf die Bildung von Sauerstoffradikalen im Reperfusionsschaden in der Skelettmuskulatur der Ratte“ von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Dissertationsschrift stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die benutzte Literatur sind vollständig angegeben.